

Molekulárna genetika človeka

Metódy identifikácie a izolácie ľudských génov

Vladimír Ferák

Metódy identifikácie a izolácie nových génov

- **Funkčné klonovanie** („priama genetika“)
 - proteín → AA sekvencia → oligosondy → skríning knižníc
 - proteín → protilátka → imunoprecipitácia na polyzómoch
 - proteín → protilátka → skríning cDNA knižníc
- **Pozičné klonovanie** („obrátená genetika“)
 - určenie pozície génu v mape
 - kráčanie po chromozóme
 - konštrukcia kontigu
 - hľadanie klonov s kódujúcimi sekvenciami
 - identifikácia klonu s hľadaným génom
 - klonovanie hľadaného génu, jeho charakterizovanie
 - overenie (pacienti)
- **Kandidátne gény**
 - vyhľadávanie v databázach (bioinformatický prístup)
 - využitie zvieracieho modelu (myš)

Funkčné klonovanie („priama genetika“)

- **Východisko:** génový produkt (proteín) alebo protilátka k nemu
- **Štandardný postup:**
 - sekvencia AA proteínu
 - preklad z AA do sekvencie DNA (pozor: degenerácia kódu!)
 - syntéza degenerovaných DNA oligo-sond
 - skríning cDNA knižníc
 - pozitívne klony použiť ako sondy pri skríningu genómovej knižnice
 - pozitívne klony v DNA knižnici: overiť na pacientoch
- **Iná možnosť: imunoprecipitácia na polyzómoch**
 - na polyzómoch: mRNA a polypeptid na jednom mieste
 - historicky úspešná (1980-90), už sa však nepoužíva

Funkčné klonovanie: príprava DNA oligosond

AA sekvencia:

...- Ala – Glu – Val – Val – Ser – Ala - ...

...GCA GAA GUA GUA AGC GCA

...GCC GAG GUC GUC AGU GCC

...GCG GUG GUG UCA GCG

...GCU GUU GUU UCC GCU

... UCG

... UCU

$$4 \times 2 \times 4 \times 4 \times 6 \times 4 = 3072 \text{ x degen. oligo}$$

(zmiešané sondy)

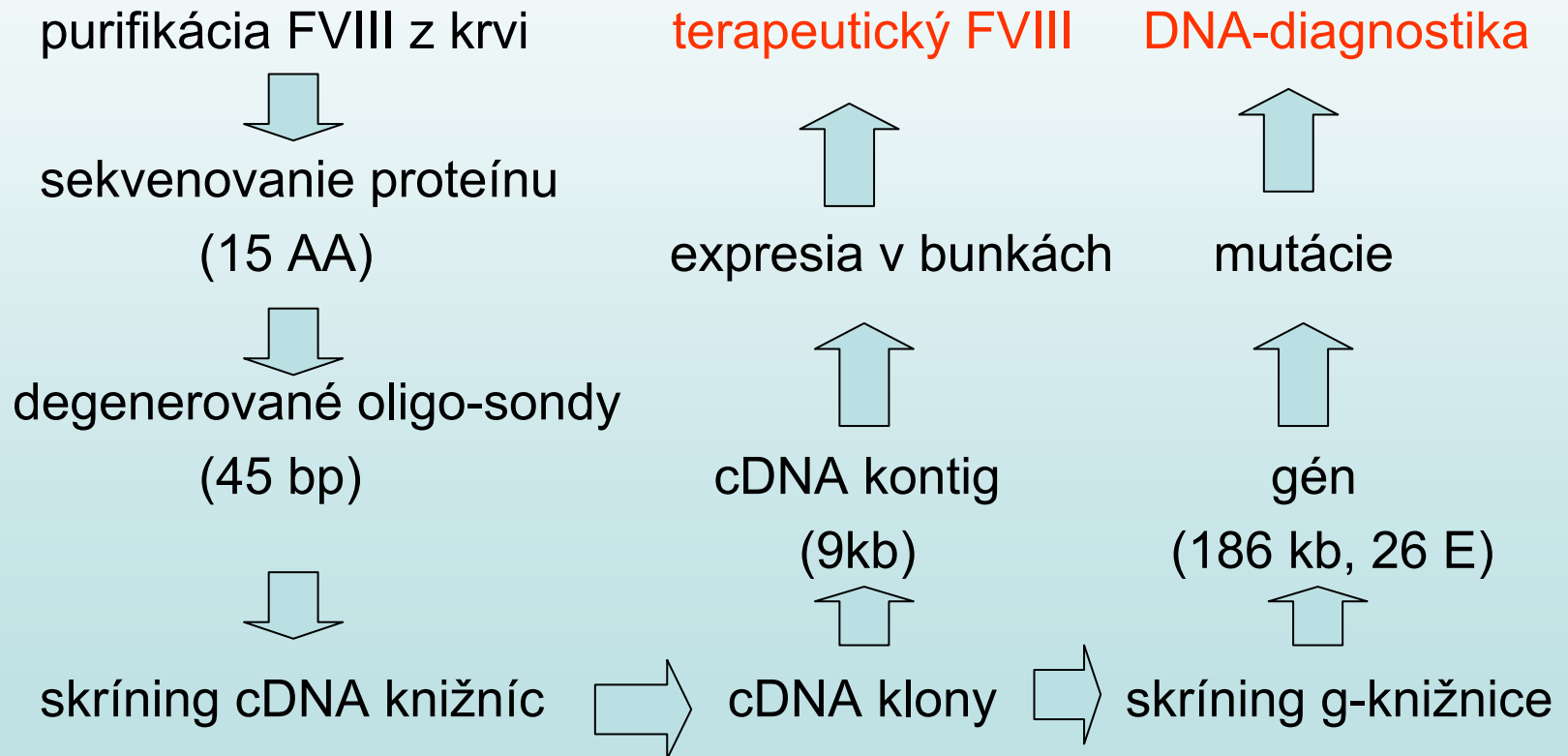
6 - 7 AA → 18 – 21 bp → postačujúca špecifickosť

Sondami skrínujeme cDNA knižnice (z tkanív, kde sa gén exprimuje)



Príklad génu identifikovaného funkčným klonovaním: gén pre faktor FVIII – hemofília A

(Gitschier et al. 1984)



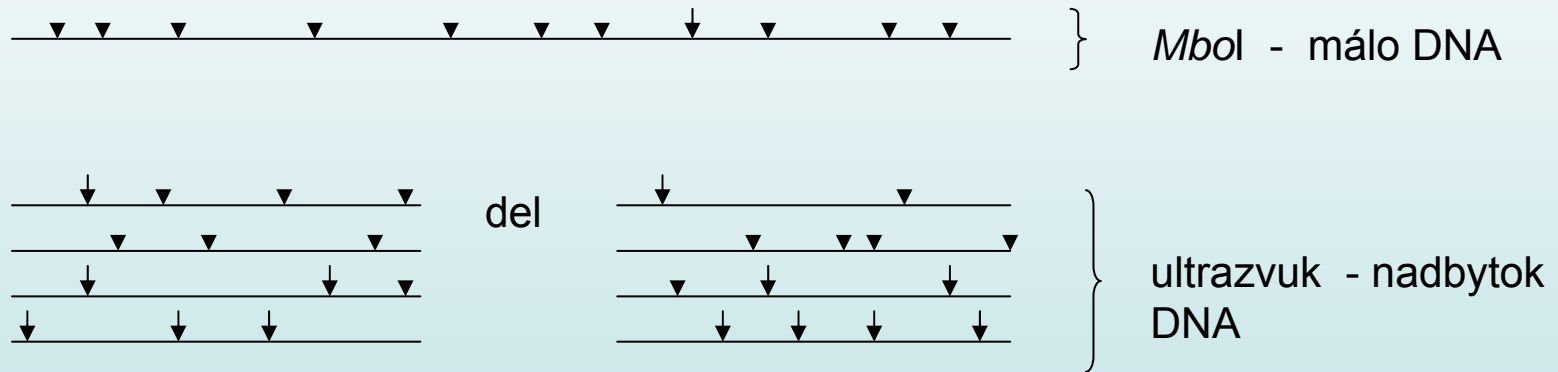
Pozičné klonovanie: určenie lokalizácie génu

- **Chromozómové prestavby** (delécie, translokácie)
 - hľadať pacientov s monogénnym ochorením a s chrom. deléciou (občas súčasne viac monogénnych ochorení u jedného pacienta)
 - monogénne ochorenie plus chrom. translokácia
 - metóda klonovania deletovaného génu: **subtraktívna hybridizácia**
- **Strata heterozygotnosti (LOH) pri TSG**
 - len pri hľadaní tumor-supresívnych génov
 - porovnávať STR v DNA z nádoru a z norm. tkaniva (tí istí pacienti)
 - hľadať STR v ktorom v DNA z nádoru nastala LOH
- **Väzba s lokalizovanými polymorfizmami**
 - zhromaždiť väzbovo-informatívne rodiny
 - **stanoviť lod-skóre** s jednotlivými STR (prípadne VNTR alebo SNP)
 - nájsť tesne viazané STR (VNTR, SNP) pred aj za génom
 - „chromosome walking“ medzi týmito STR: **zostaviť kontig** (knižnicu usporiadaných klonov)

Klonovanie DNA fragmentov z chromozómovej delécie: „subtraktívna hybridizácia“

Normálna DNA: štiepená RE (napr. *Mbol*) – klonovateľné fragmenty

DNA pacienta s deléciou: fragment. mechanicky (ultrazvuk) – neklonovateľné

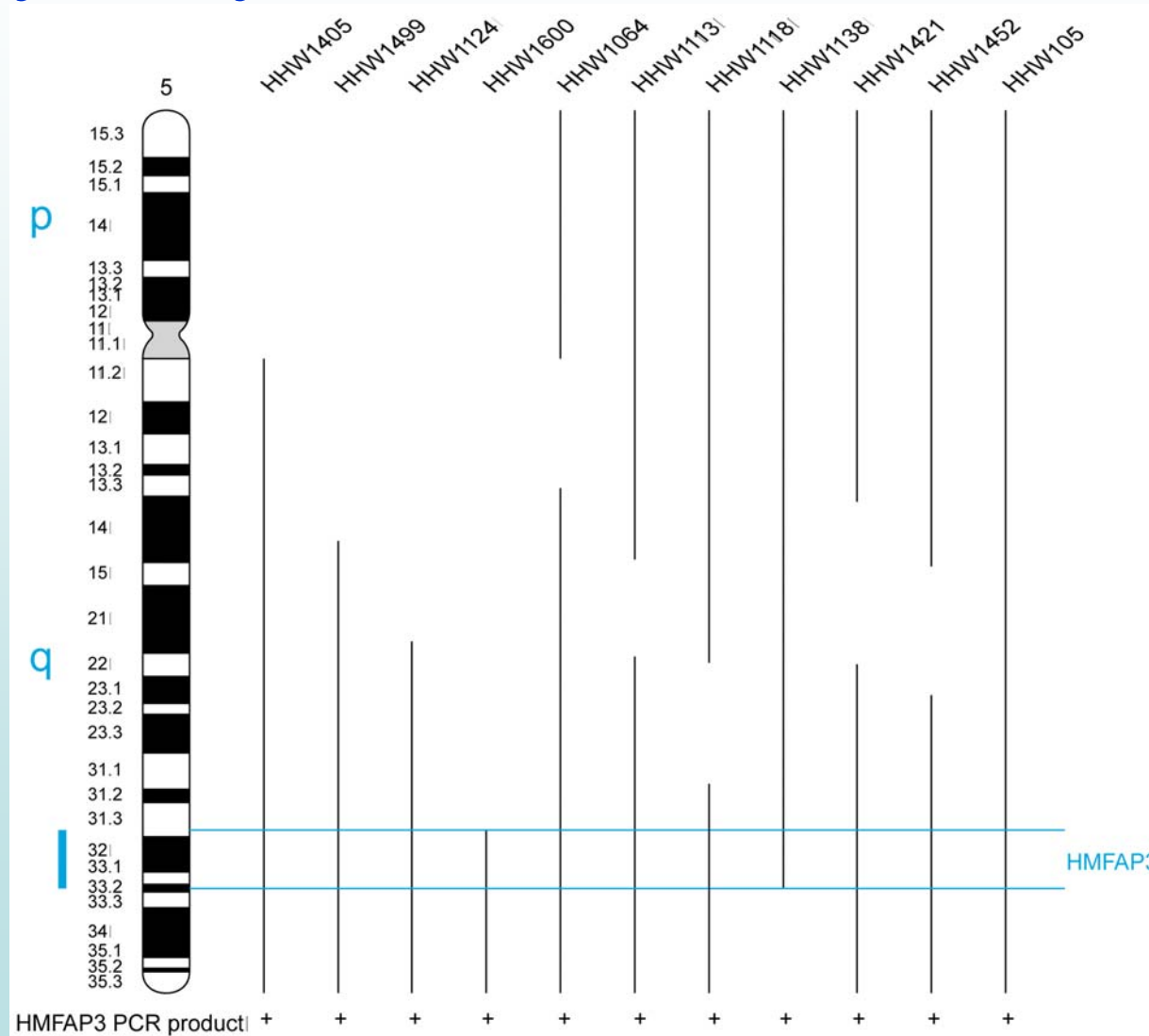


↓
denaturácia DNA

↓
reasociácia

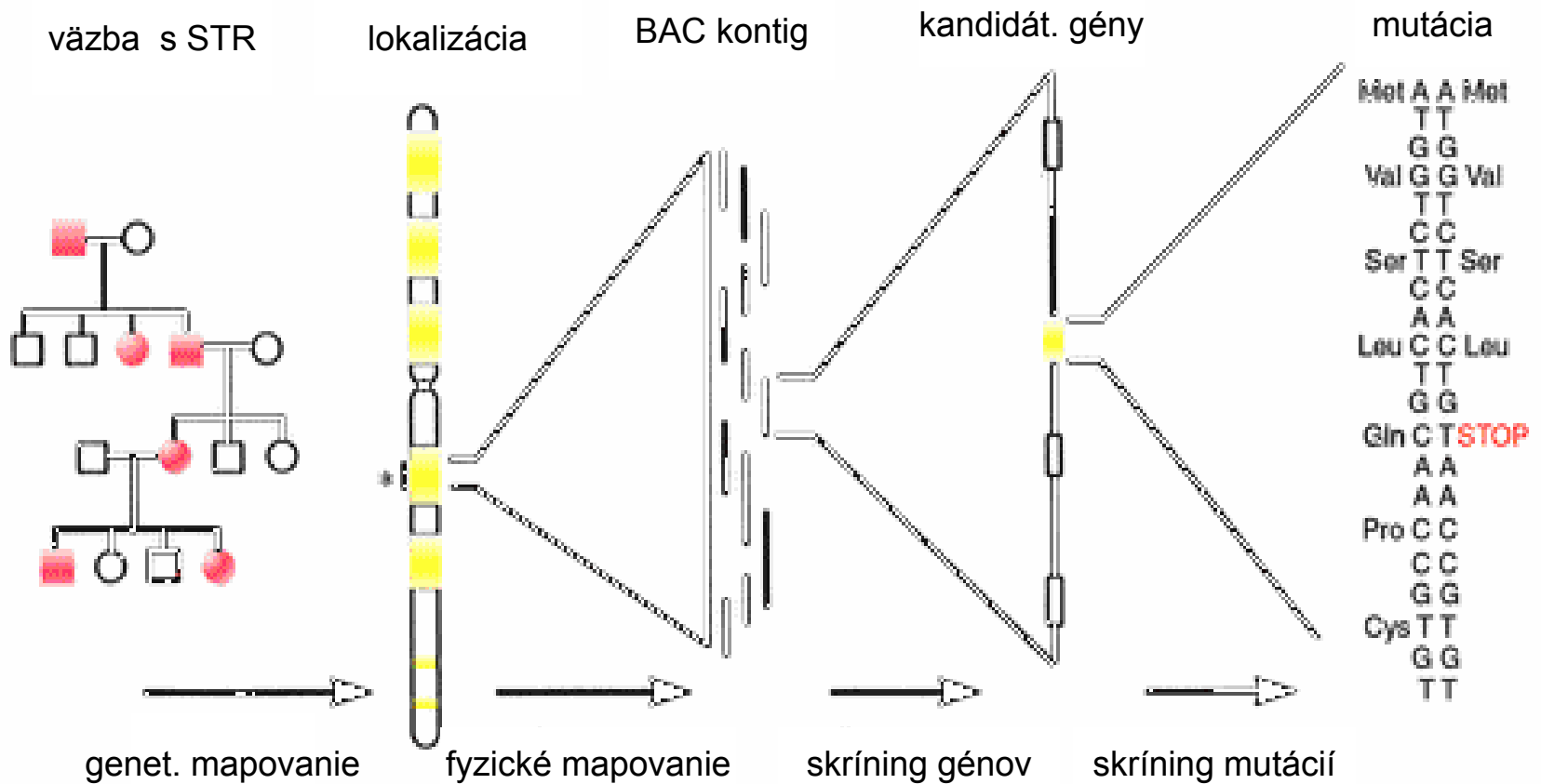
abnorm. – abnorm: neklonovateľné
abnorm. – norm: neklonovateľné
norm. – norm: **klonovateľné!**

Subchromozomálna lokalizácia pomocou hybridných buniek s chrom. deléciami

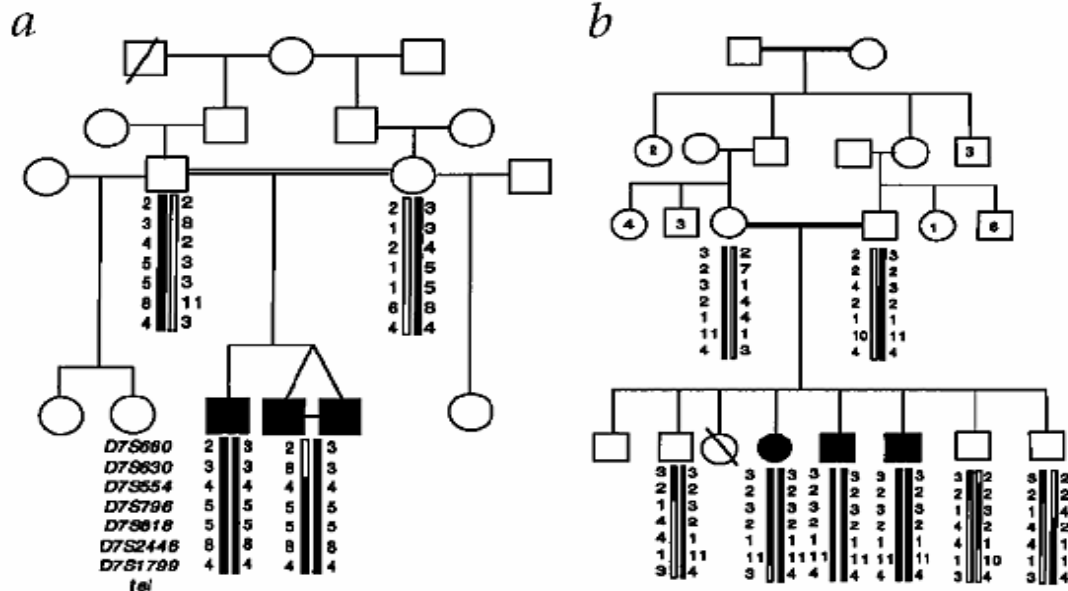


HMFAP3:
mikrofibrilárny
proteín

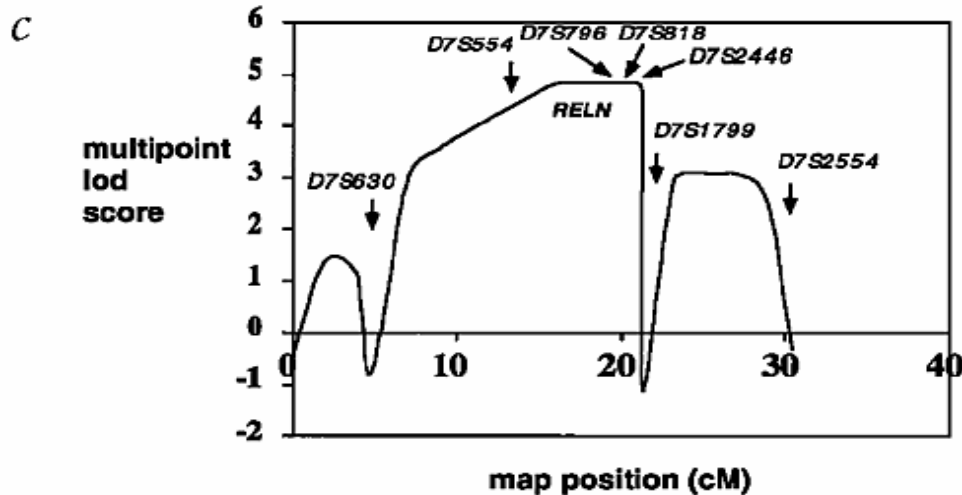
Hlavné kroky pozičného klonovania



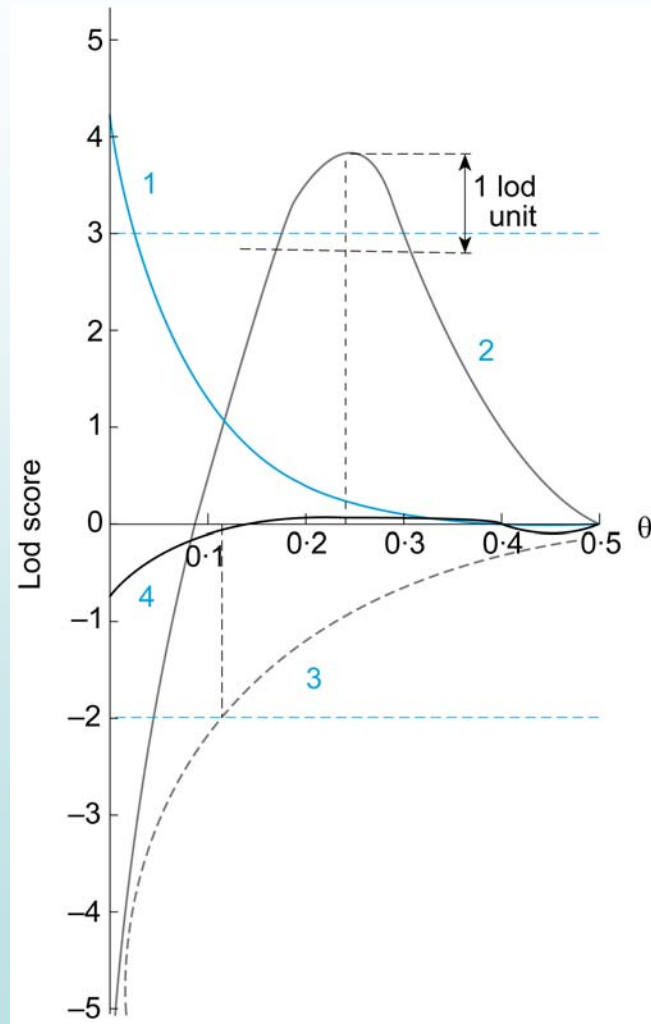
Hľadanie viazaných STR: väzbová analýza



- zhromaždiť väzbovo-informatívne rodiny
- typizovať STR markery so známou lokalizáciou
- pre každý marker vypočítať lod-skore
- lod-skore $>3,0 \rightarrow$ väzba
- \rightarrow poznáme lokalizáciu



Grafické znázornenie lod-skóre

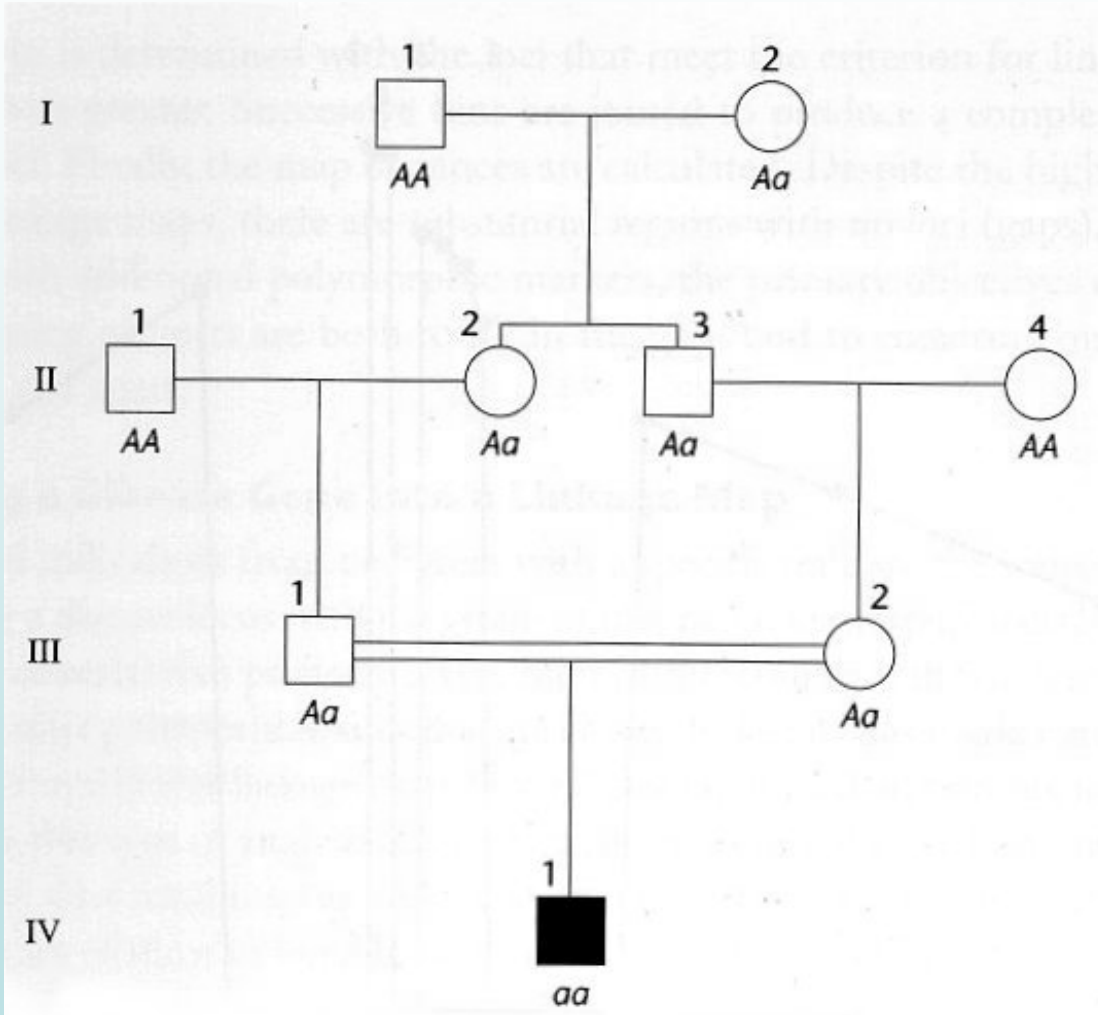


Konvenčné hodnoty lod-skóre:

> 3 ... dôkaz väzby

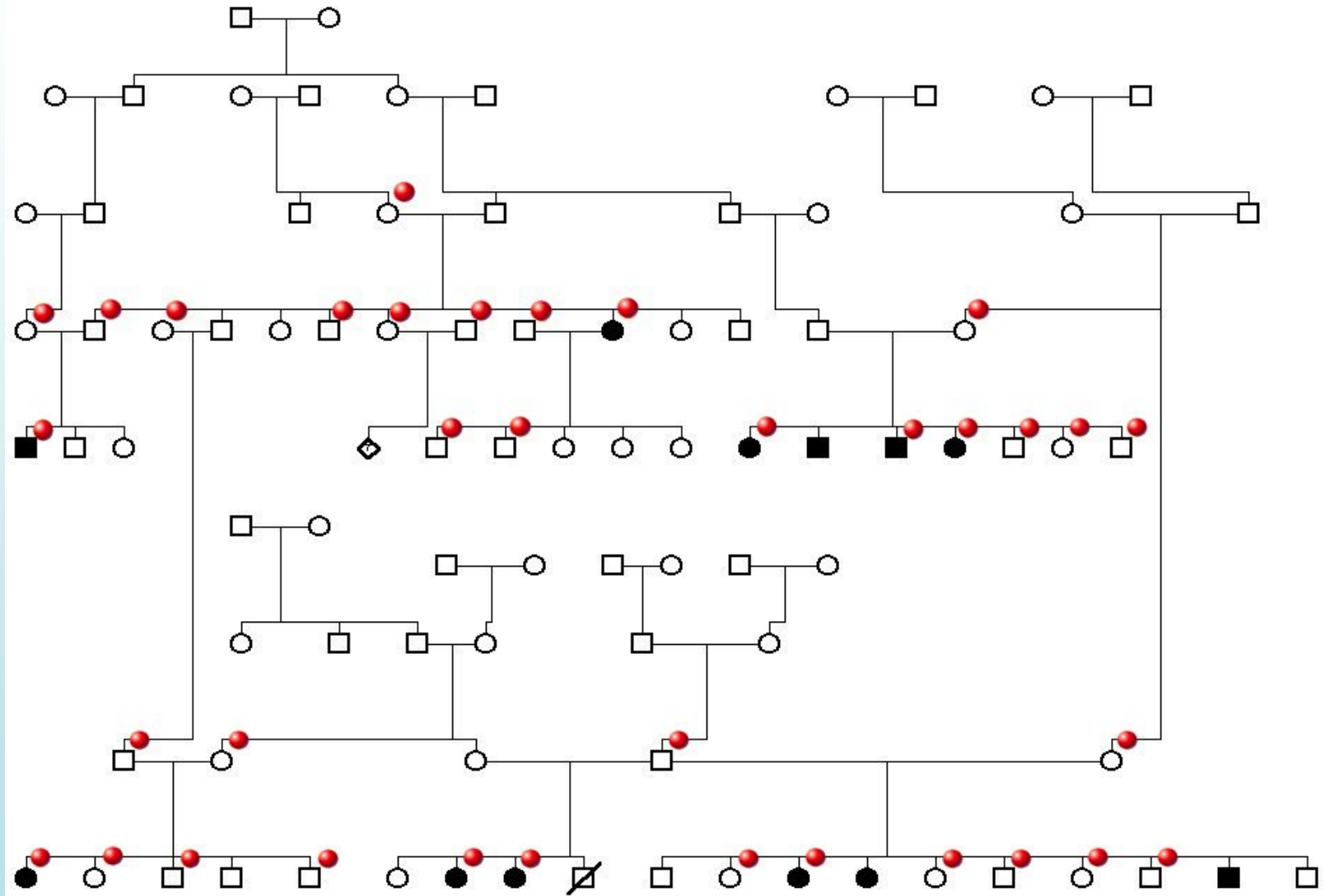
< -2 ... dôkaz neprítomnosti väzby

Autozygótne mapovanie

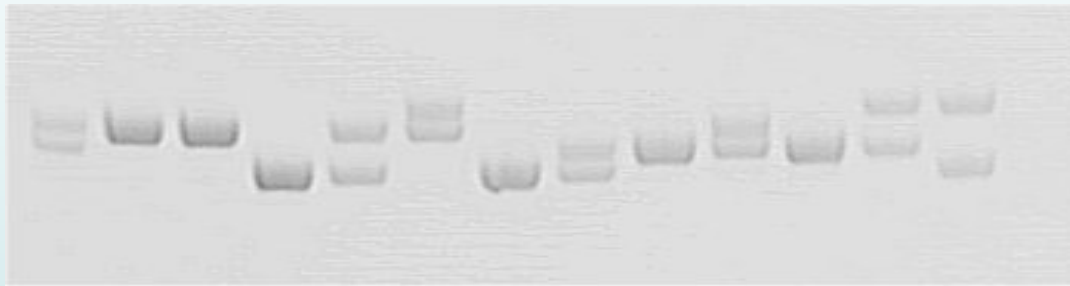


Inbredný homozygot **aa**
IV/1 zdedí od spoločného
predka svojich rodičov I/2
spolu s alelou **a** aj alely
tesne viazaných
polymorfizmov: je pre ne
homozygot („**autozygot**“)

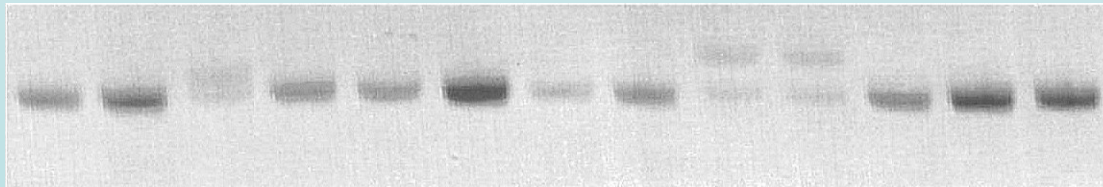
Autozygotné mapovanie: rodokmeň z genetického izolátu (Rómovia) s AR ochorením (RP)



Autozygotné mapovanie: genotypizácia postihnutých

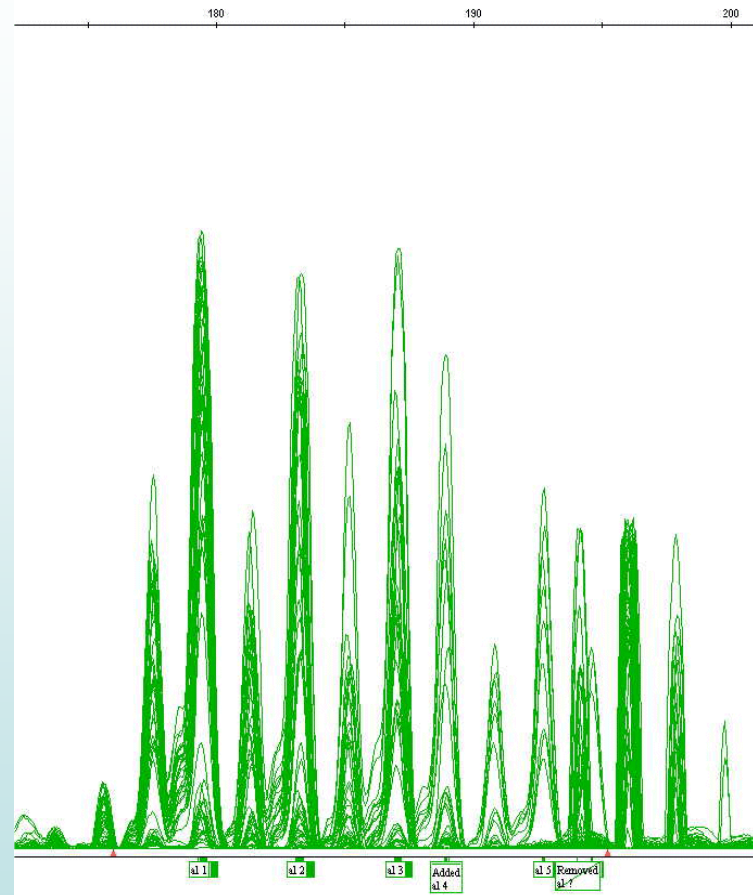
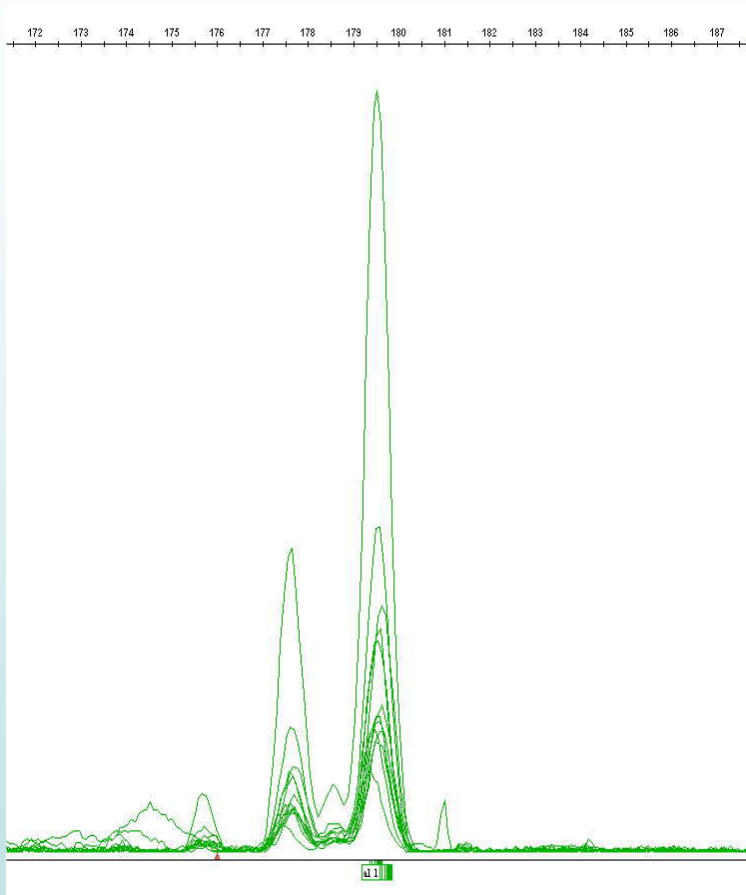


Polymorfizmus vzdialený od génu zodpovedného za ochorenie



Polymorfizmus ležiaci v blízkosti hľadaného génu

Pozitívny výsledok autozygotného mapovania: D14S63 a AR retinitis pigmentosa

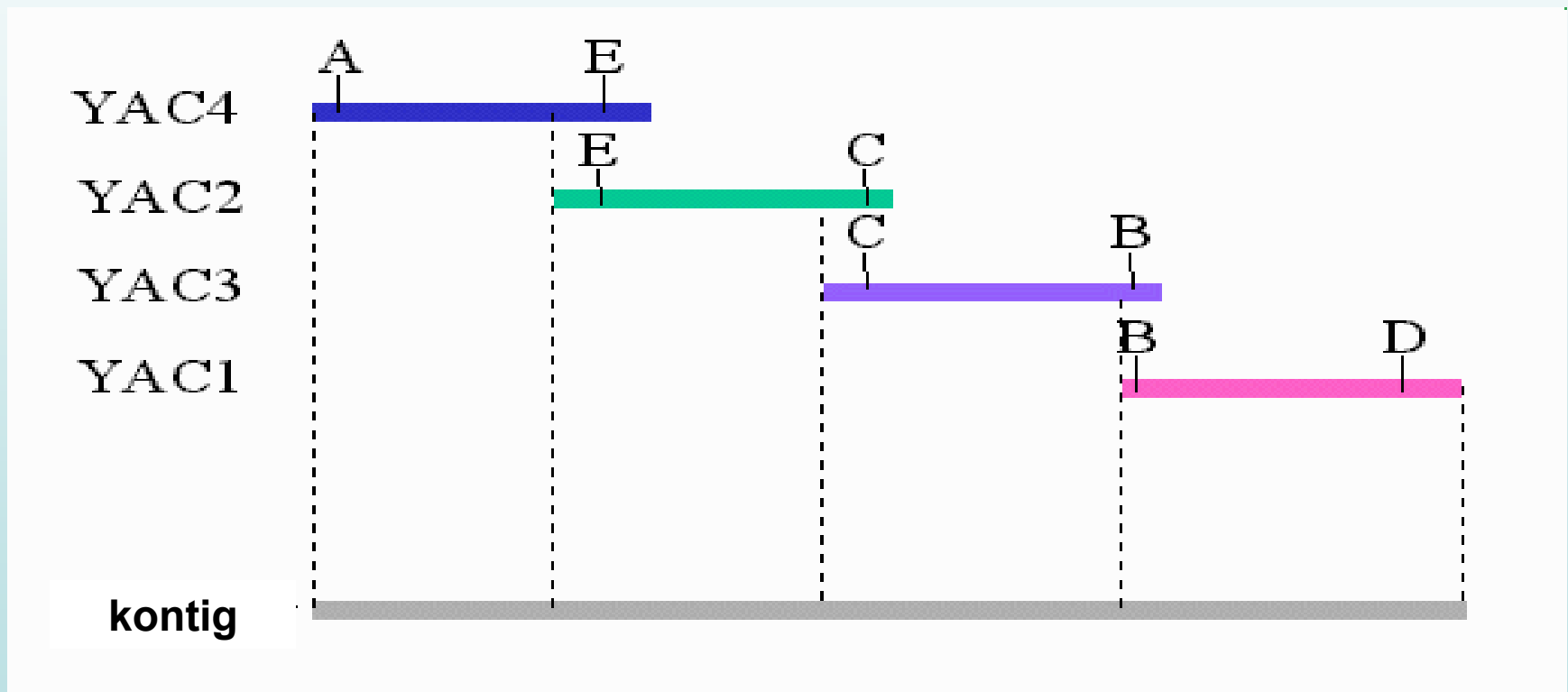


Autozygotné mapovanie s polymorfným markerom D14S63.

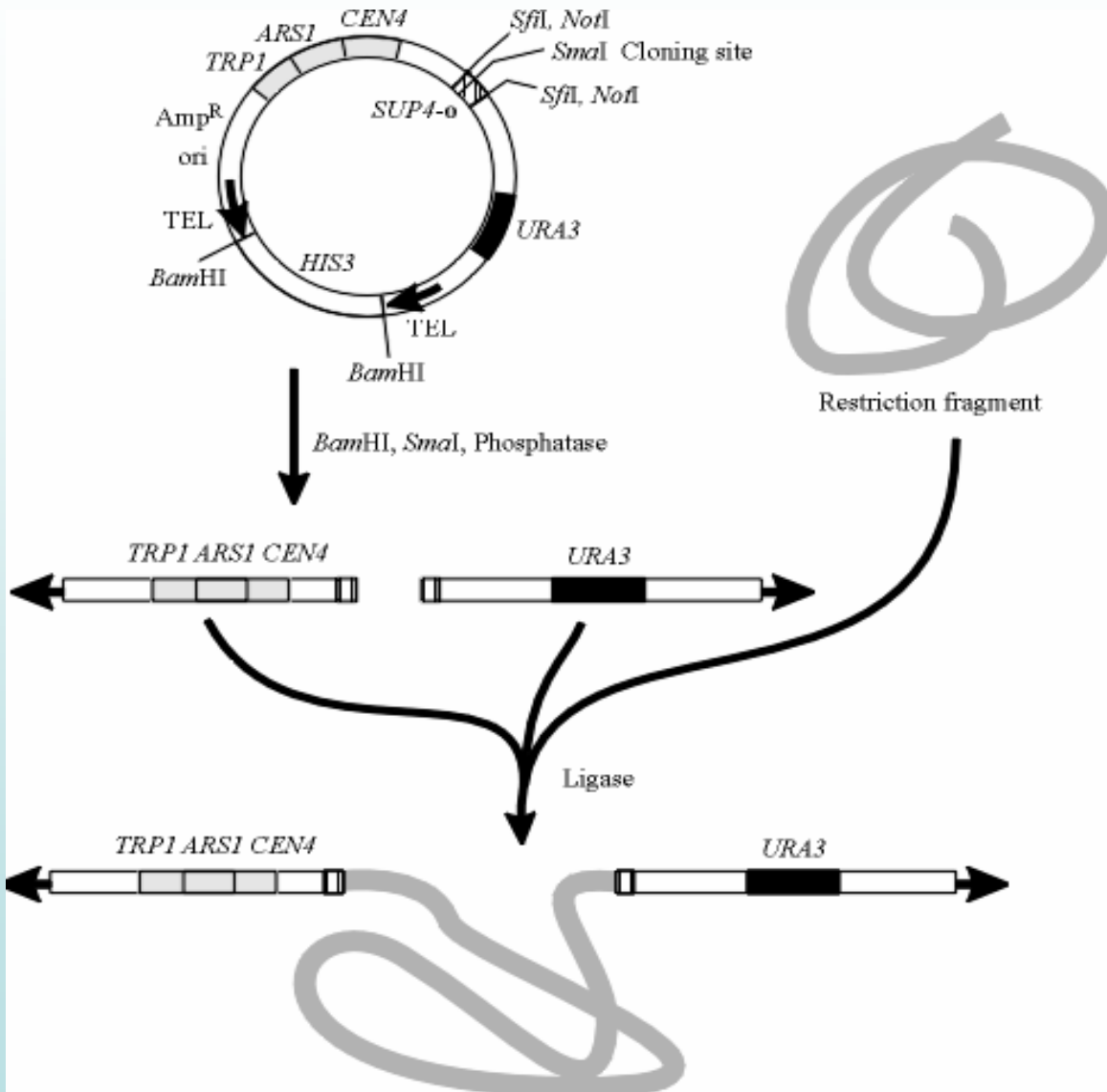
Všetci pacienti (na obrázku vľavo) nesú jednu alelu v homozygotnom stave v porovnaní s ich zdravými príbuznými (vpravo), u ktorých je v rôznych genotypoch zastúpených celkovo 6 rôznych aliel.

Kontig: súbor prekrývajúcich sa klonov z genómovej knižnice

Vektory: YAC – yeast artificial chromosomes
BAC – bacterial artificial chromosomes



YAC: yeast artificial chromosome

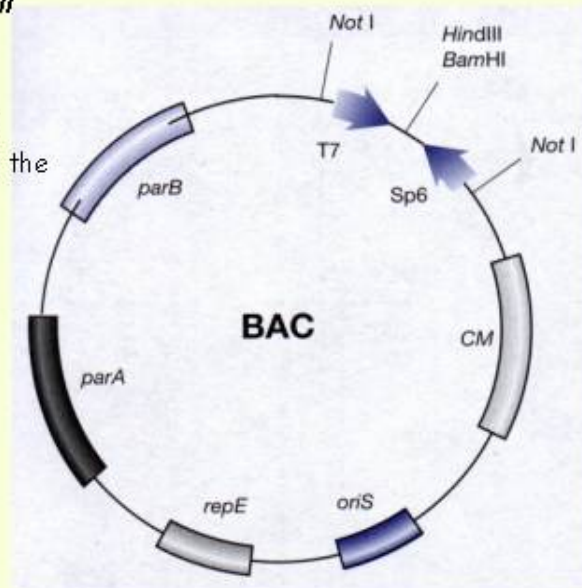


- CEN – centroméra
- ARS – ori
- TEL – teloméra
- URA, TRP – selekč. markery
- Inzerty 100 – 700 kb
- transformácia buniek *S. cerevisiae*
 - ↓
- selekcia
 - ↓
- klony, knižnica
 - ↓
- kontig

BAC: bacterial artificial chromosome

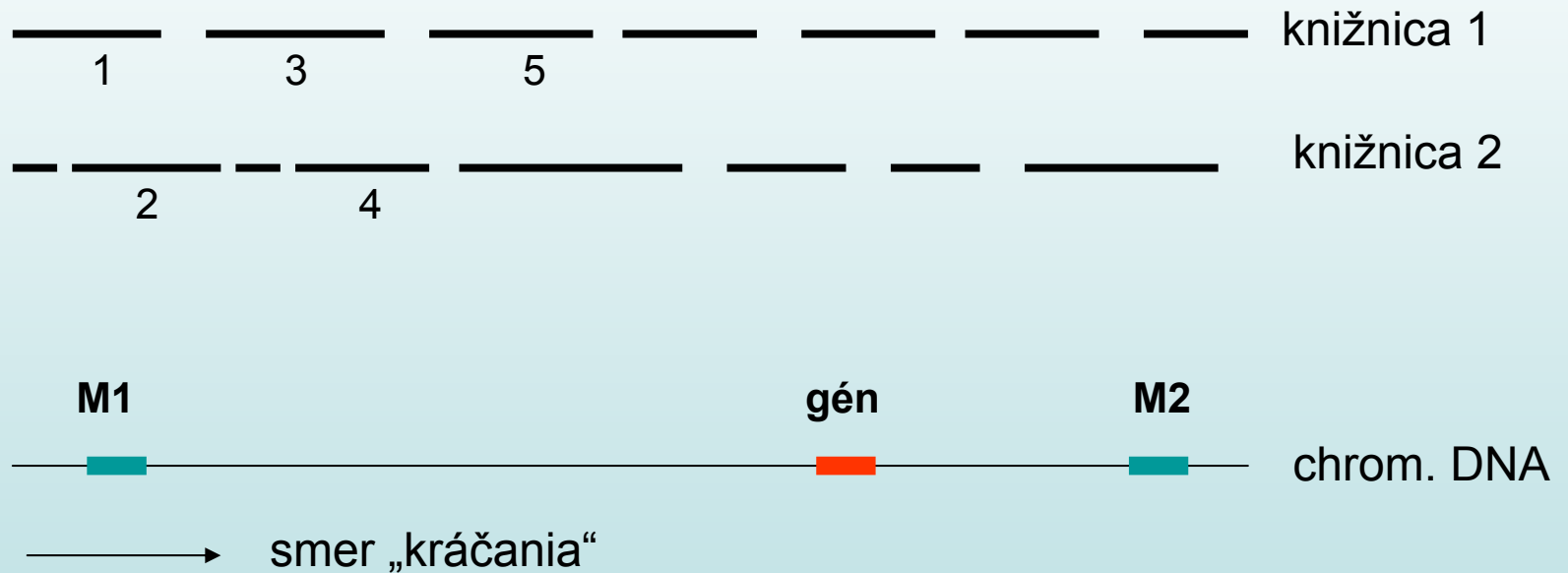
BAC vectors can accommodate DNA fragments up to 300 kb

- **BAC vectors are similar to standard *E. coli* plasmid vectors**
 - Contain the origin and genes encoding the ORI-binding proteins required for plasmid replication
 - derived from a naturally occurring **large** plasmid, the *F-factor*
 - Low copy number (1-2 copies per cell)
 - Low transformation efficiency overcome by electroporating recombinant DNA into *E. coli*
- **Advantages of BACs compared to YACs**
 - Stable
 - Ease of transformation
 - Speed of growth of *E. coli* host
 - Simpler to purify
 - More user-friendly



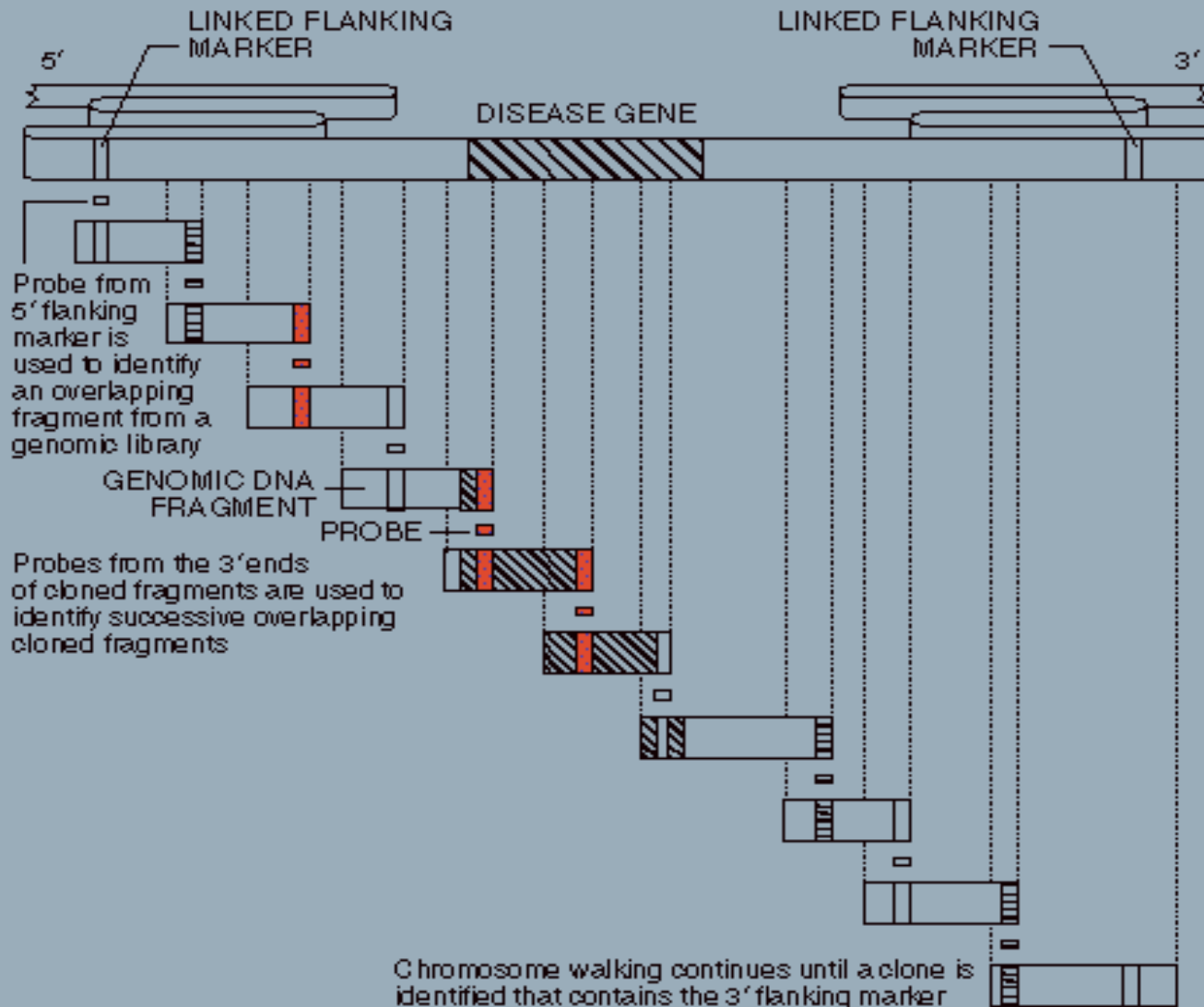
Chromosome walking: „kráčanie po chromozóme“

dve genómové knižnice, K1 a K2, každá získaná iným RE:

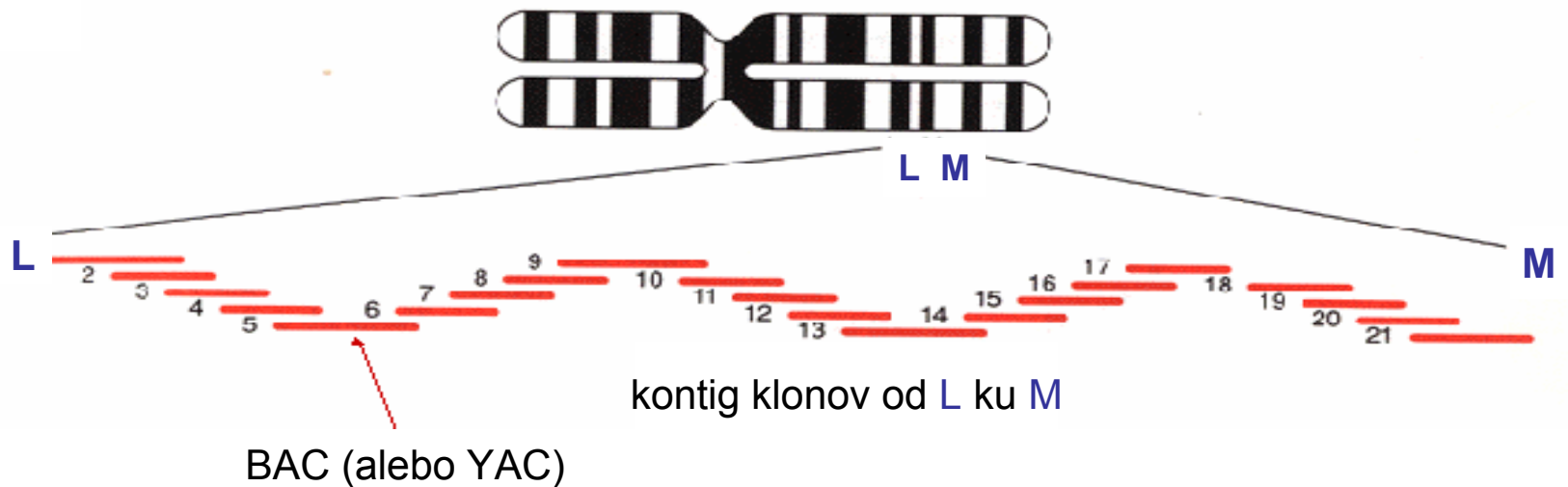


„Chromosome walking“: kráčanie po chromozóme

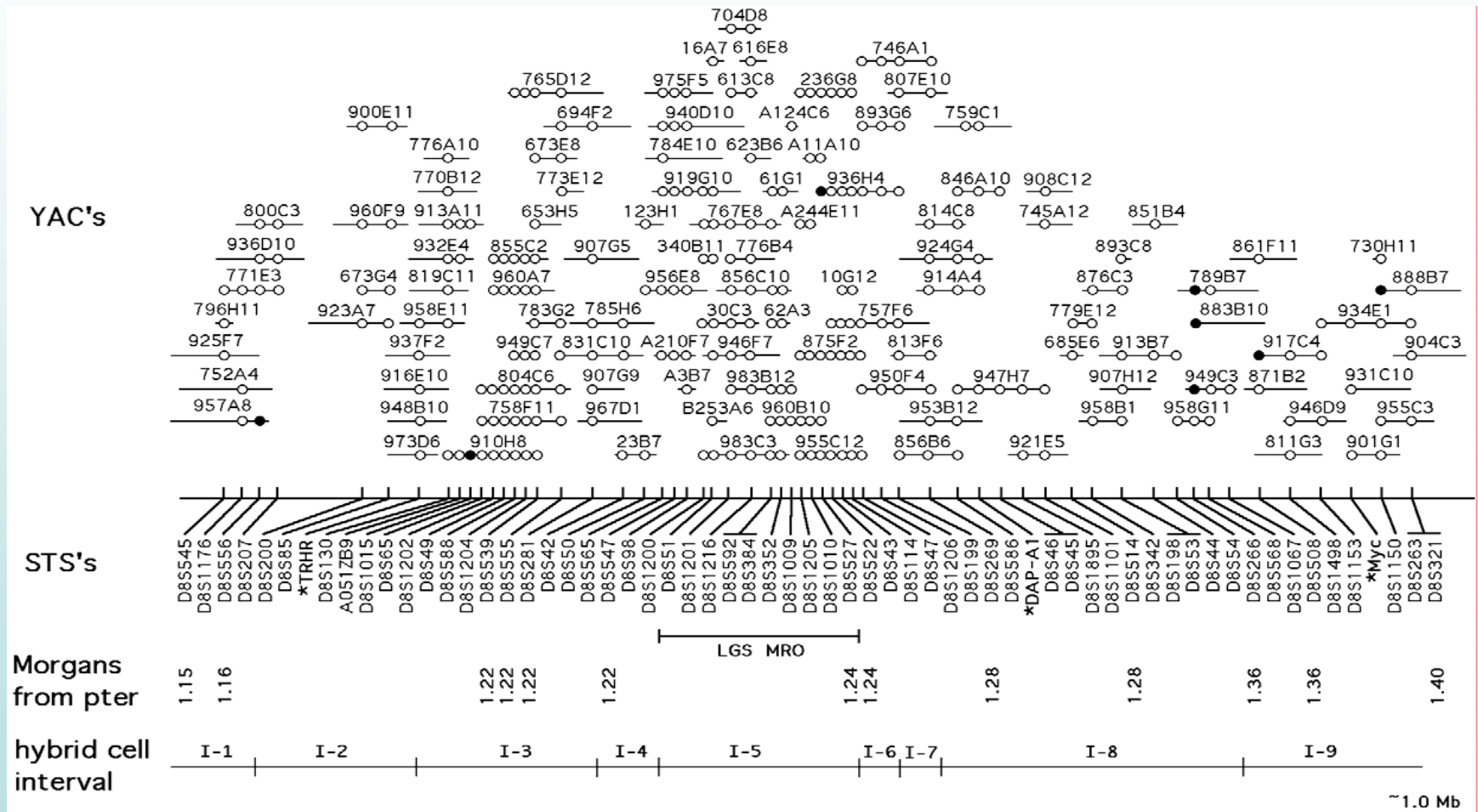
ORNL-DW/G 91M-17370



Konštrukcia kontigu



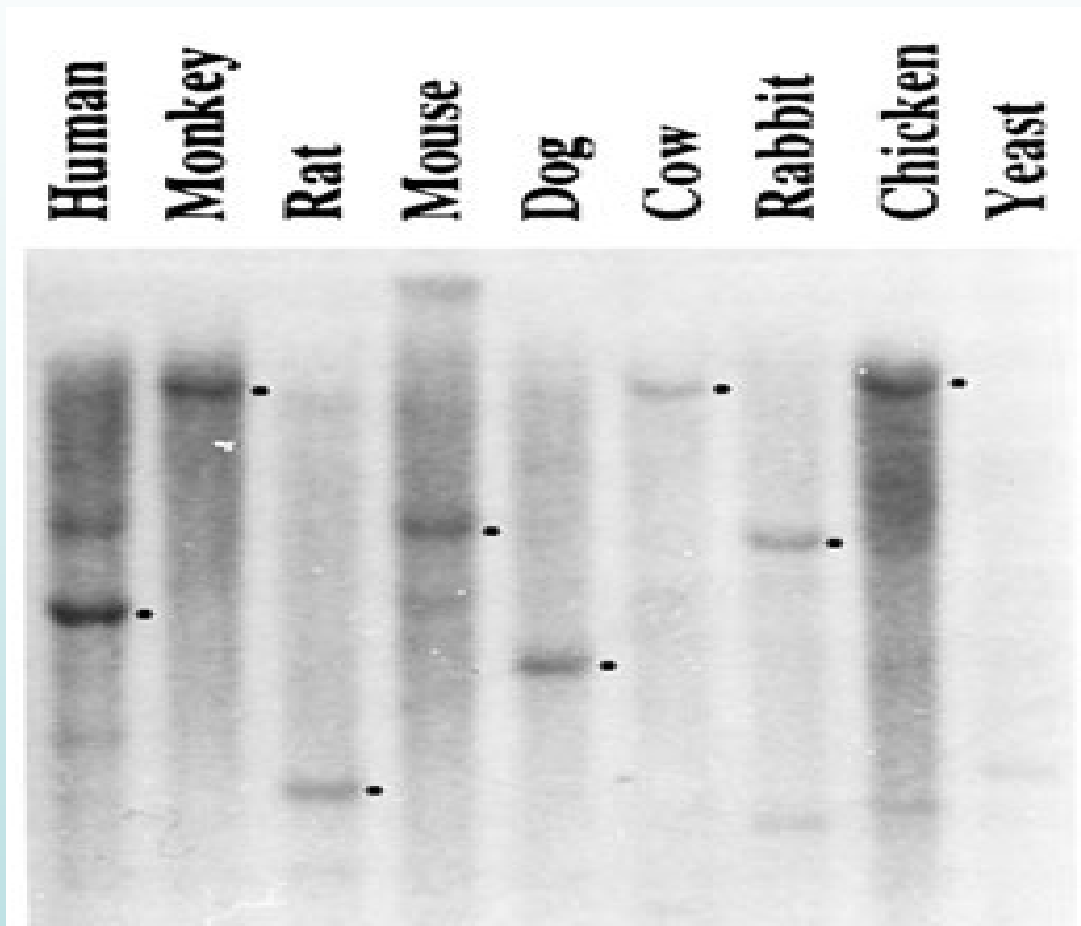
Kontig průžku 8q23 (20 cM)



Hľadanie génu na kontigu

- Ako identifikovať inzert s génom:
 - „Zoo-blotting“
 - identifikácia CpG ostrovčekov
 - klonovanie pomocou CpG ostrovčekov
 - skríning cDNA knižníc
 - „exon trapping“
 - sekvenovanie
- Ako identifikovať na tomto inzerte **hľadaný gén**:
 - kandidátne gény (bioinformatika, databázy...)
 - homológia s myším modelom
 - skríning mutácií u pacientov (SSCP, DGGE...)

„Zoo-blotting“: hybridizácia inzertu s DNA rôznych živočíchov



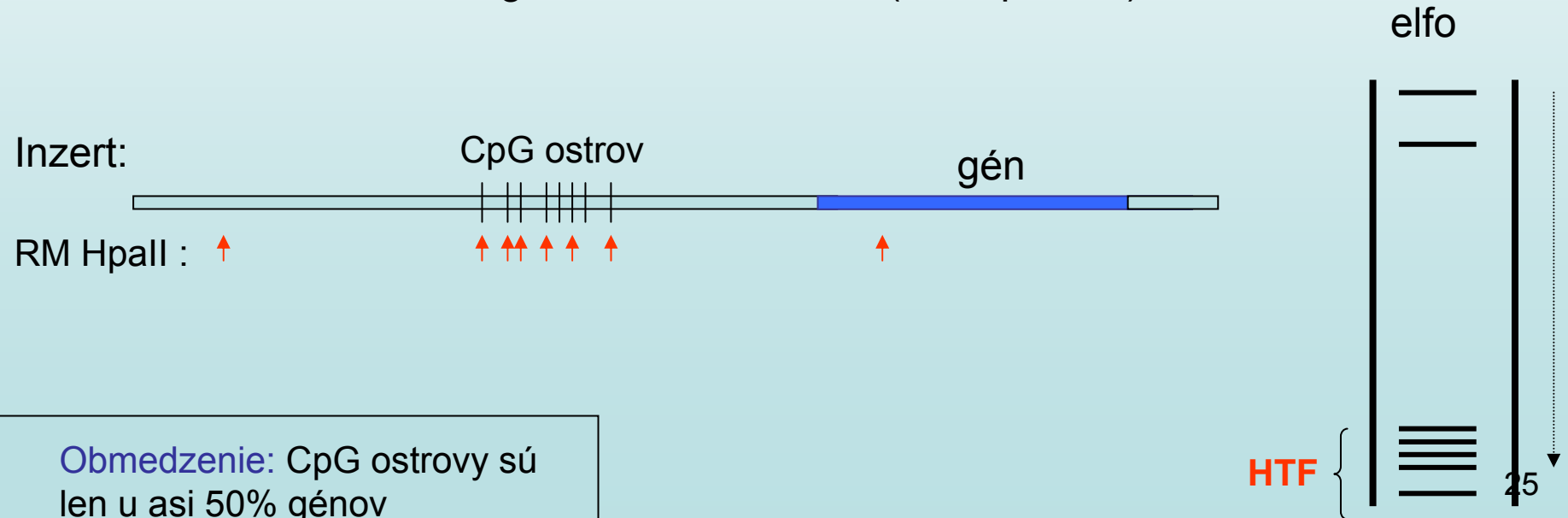
- **Použitie:** skriningové vyhľadavanie klonov (z knižnice), obsahujúcich kódujúcu sekvenciu (gén alebo jeho časť)
- **Princíp:** kódujúce sekvencie sú obyčajne evolučne konzervované
- Ak nevznikne hybridizačný signál: inzert asi neobsahuje kódujúcu sekvenciu

Identifikácia klonov s CpG ostrovčekmi

(Bird et al., 1986)

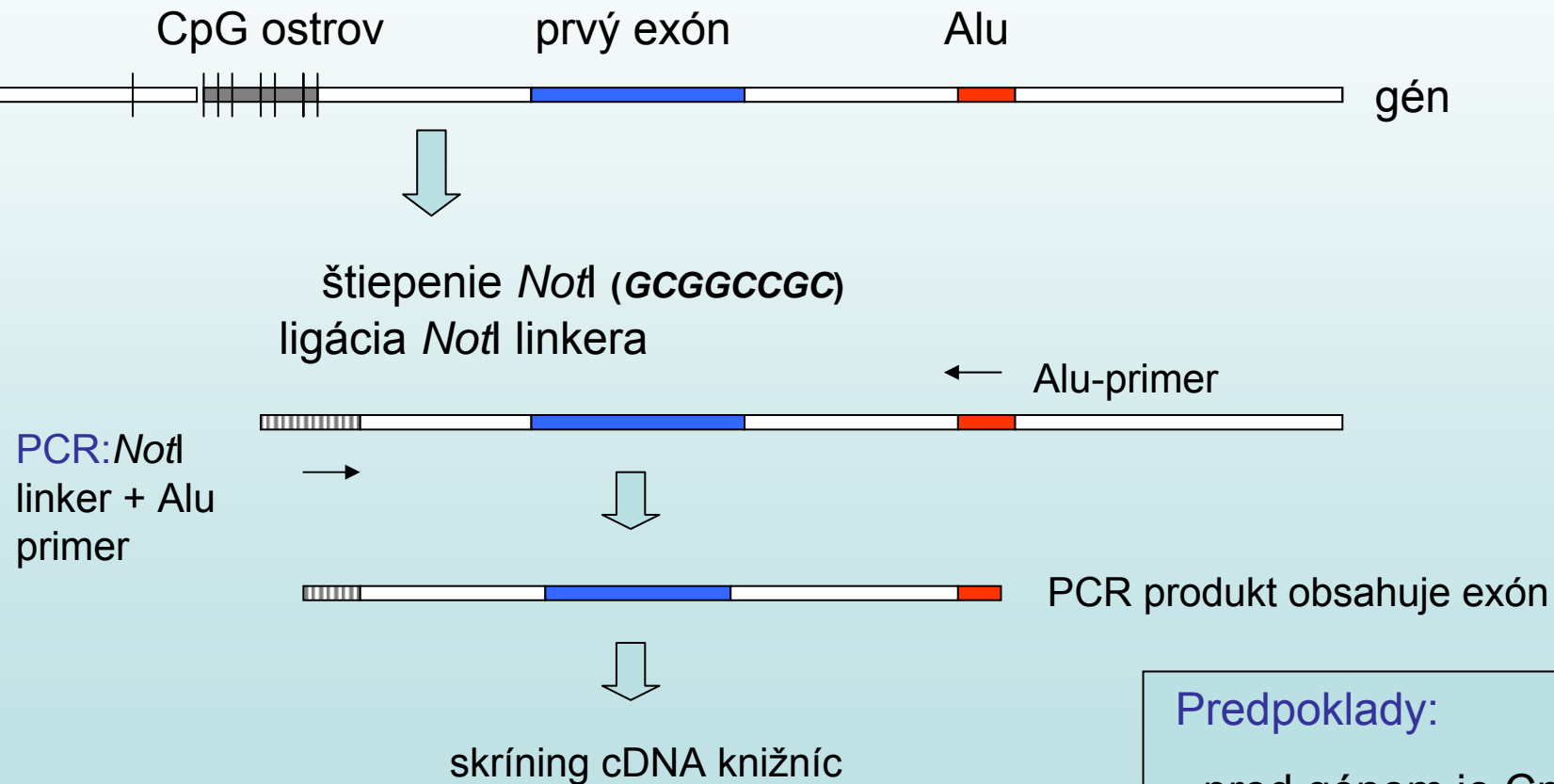
CpG ostrovčeky:

- C nemetylovaný (inde v genóme C pred G takmer vždy metylovaný)
- dĺžka 1- 2 kb
- časté pred „housekeeping“ génmi (asi 20x častejšia ako inde)
- *HpaII* (rozpoznáva CCGG, ak C je nemetylovaný)
- *HpaII* štiepi CpG ostrovy na krátke fragmenty (HTF)
- tie možno detegovať elektroforézou (séria pruhov)



Klonovanie / PCR CpG ostrovčekov

(Patel et al. 1991)

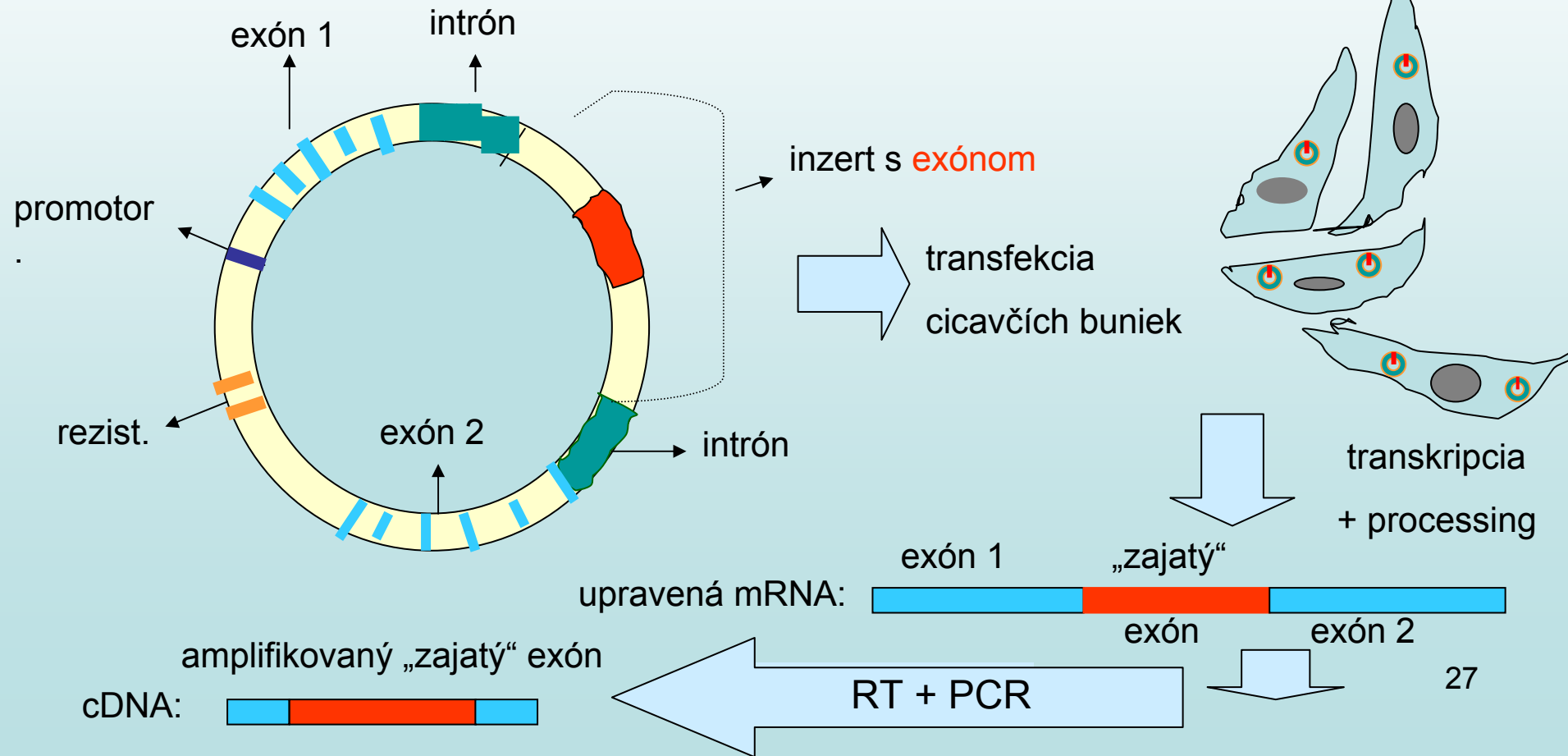


Predpoklady:

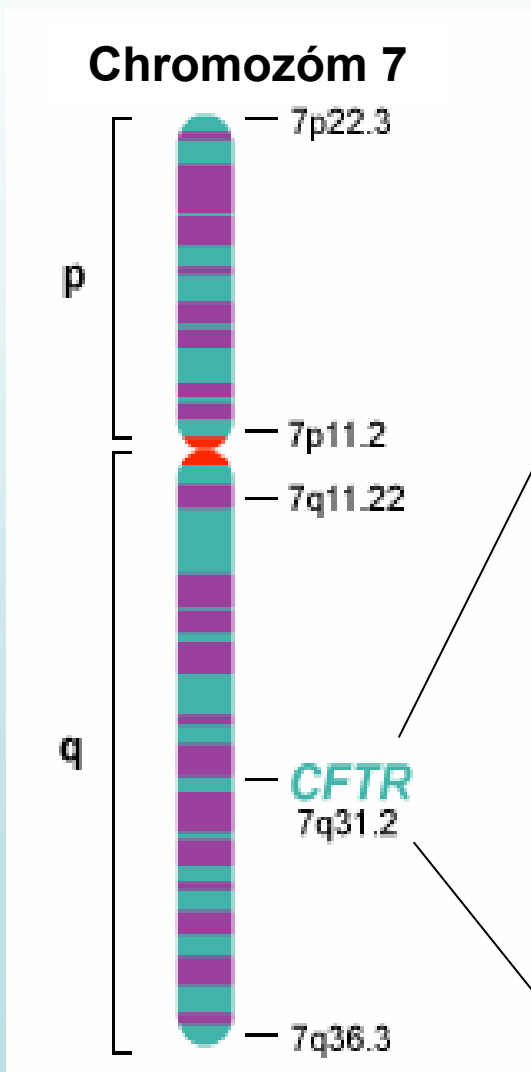
- pred génom je CpG ostrov
- v 1. intróne génu je Alu

Amplifikácia exónu: „exon trapping“

„trapping“ expresný plazmid s inzertom, obsahujúcim **exón**



Príklad pozičného klonovania: **gén CFTR** – cystická fibróza



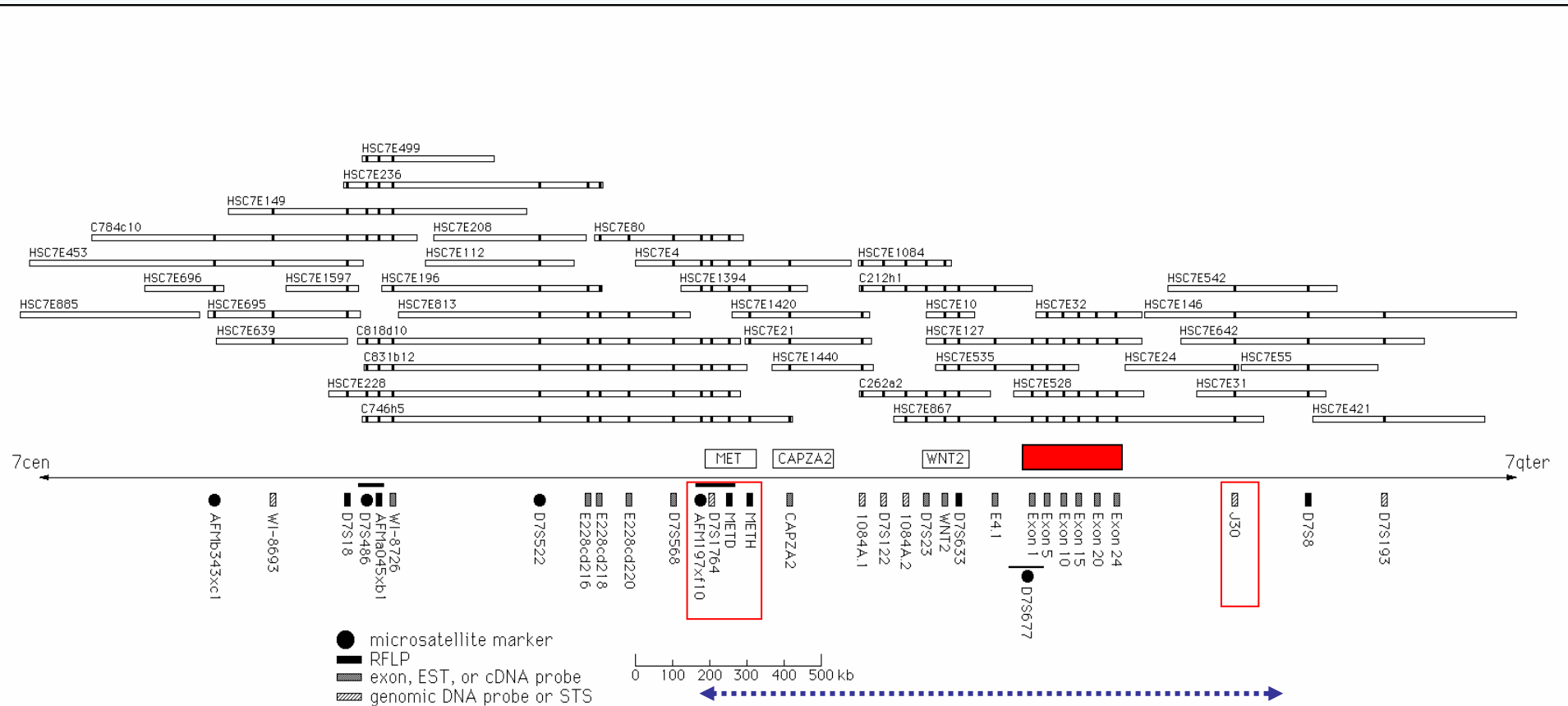
polymorfizmus

cM

COL1A1	19
DOCR1	15
PON	5
metD	<1
metH	<1
CF gén (CFTR)	
79A	<1
7c22	4.5
TCRB	10

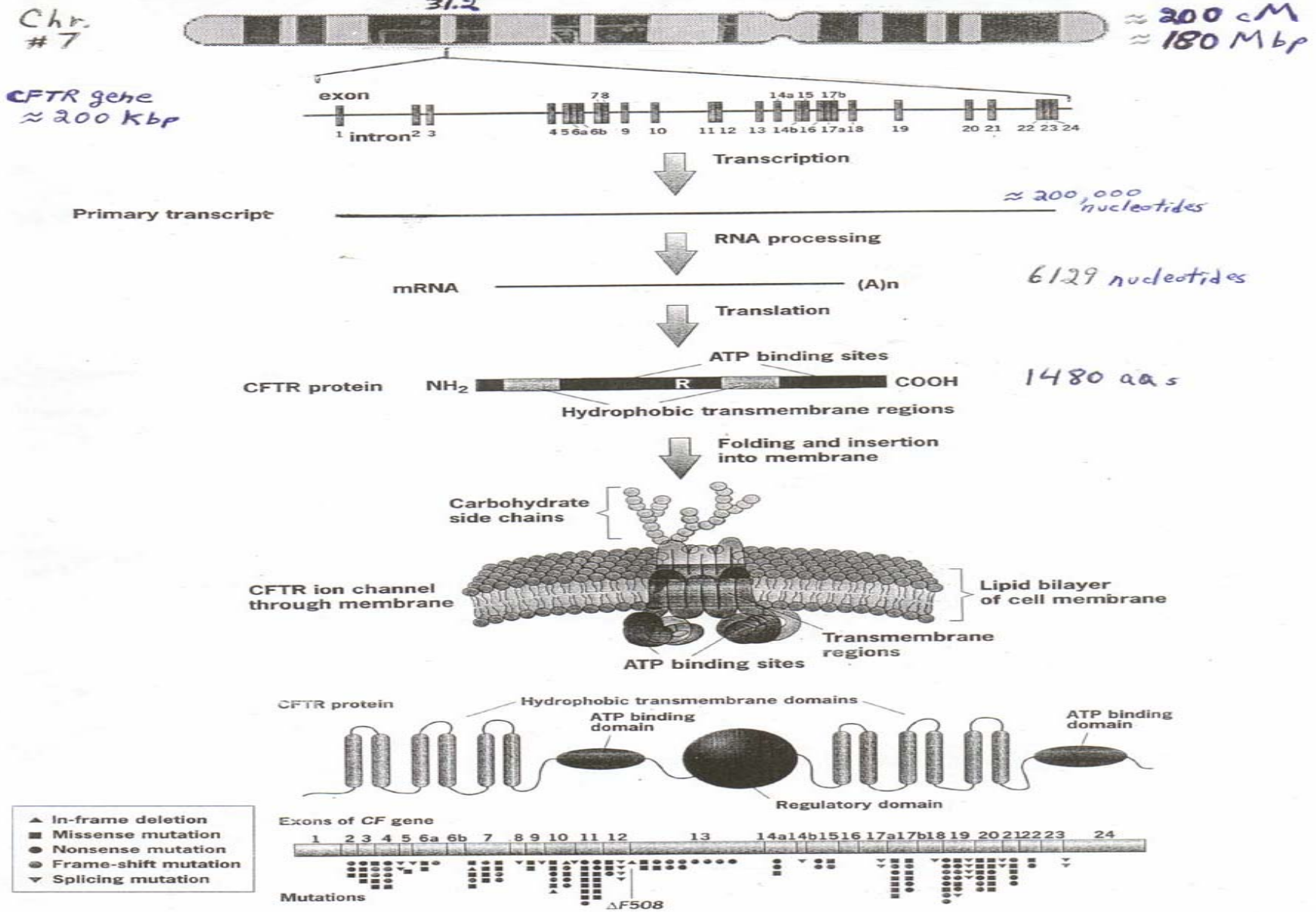
chrom. walking; kontig

Cystická fibróza: kontig, obsahující CFTR gén



posledné „kroky“ : F. Collins et al., 1989

CFTR gén, jeho produkt, mutácie a CF



Prvých 10 rokov pozičného klonovania (vybrané ochorenia)

rok	ochorenie	lokalizácia	gén	chrom. abnorm
1986	Duchenne sval.dystr.	Xp21.3	DMD	delX(p21.3)
	retinoblastóm	13q14	RB	del(13)(q13.1-q14.5)
1989	cystická fibróza	7q31.2	CFTR	žiadna
1990	neurofibromatóza	17q11.2	NF1	translokácie 17
	Wilmsov tumor	11p13	WT1	del(11)(p14p13)
1991	fam. polyposis coli	5q21	APC	del(5)(q15q22)
	syndróm frag. X	Xq27.3	FMR1	fragilné miesto
	myotonická dystrofia	19q13.3	DMPK	žiadna
1993	Hutingtonova chorea	4p16	HD	žiadna
	tuberózna skleróza	16p13	TSC2	žiadna
1994	achondroplázia	4p16	RGFR3	žiadna
	karcinóm prsníka	17q21	BRCA1	žiadna
1995	spinálna sval. dystrofia	5q13	SMN1	žiadna