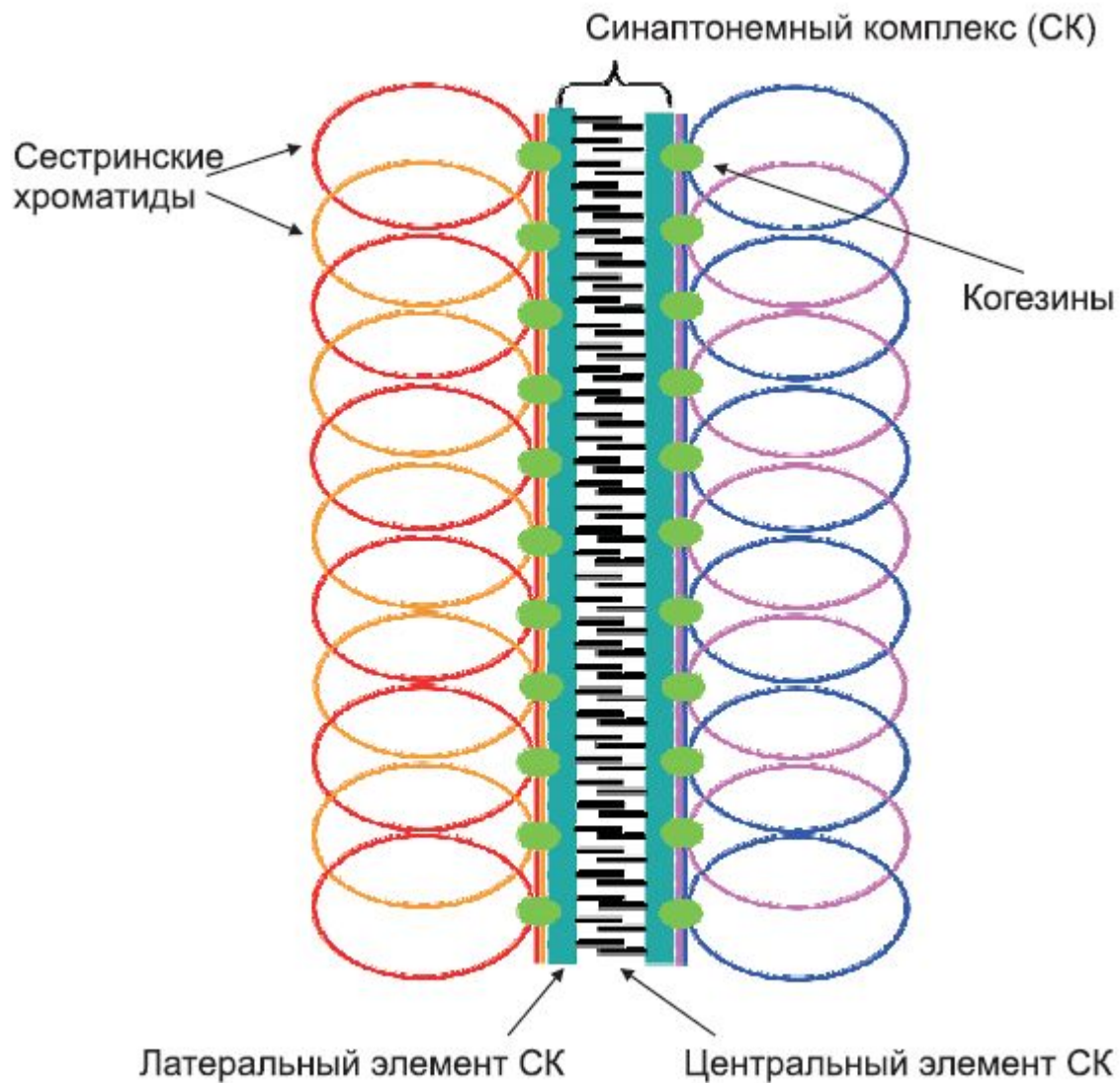


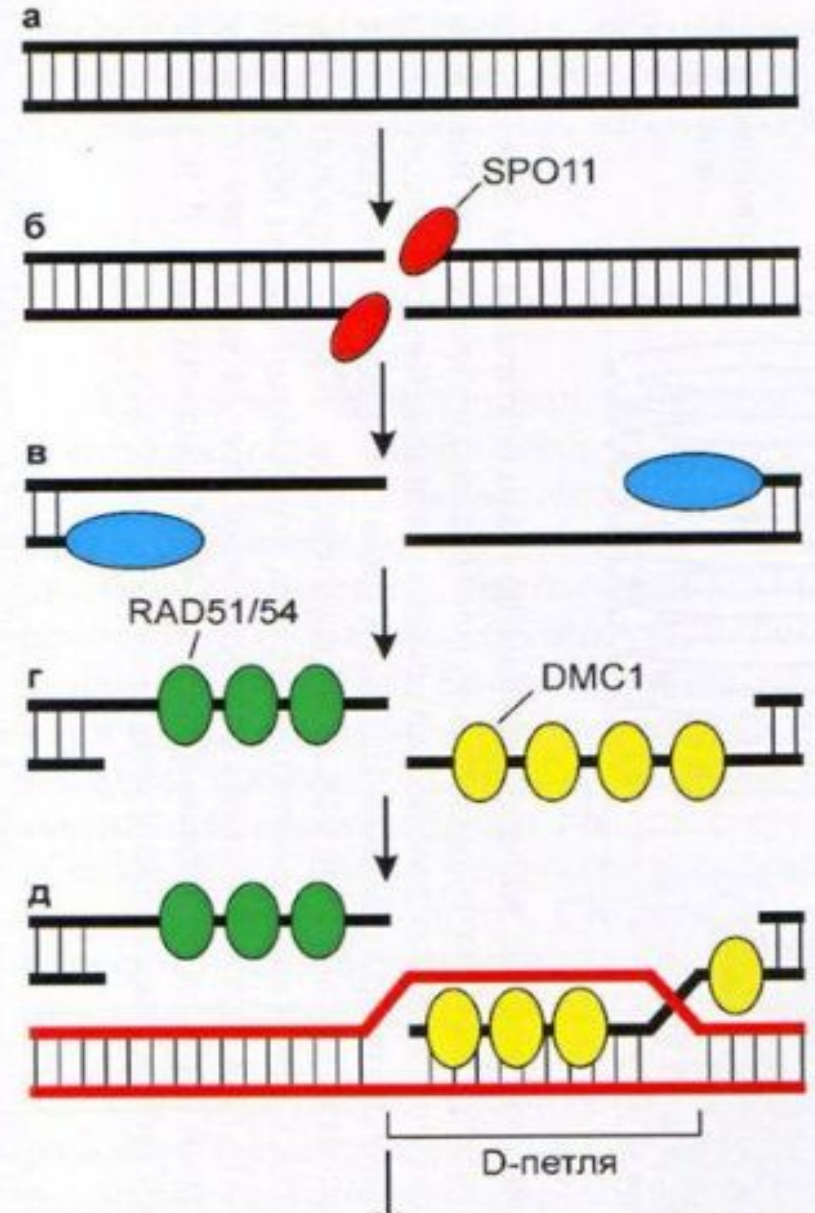
Схема строения синаптонемного комплекса

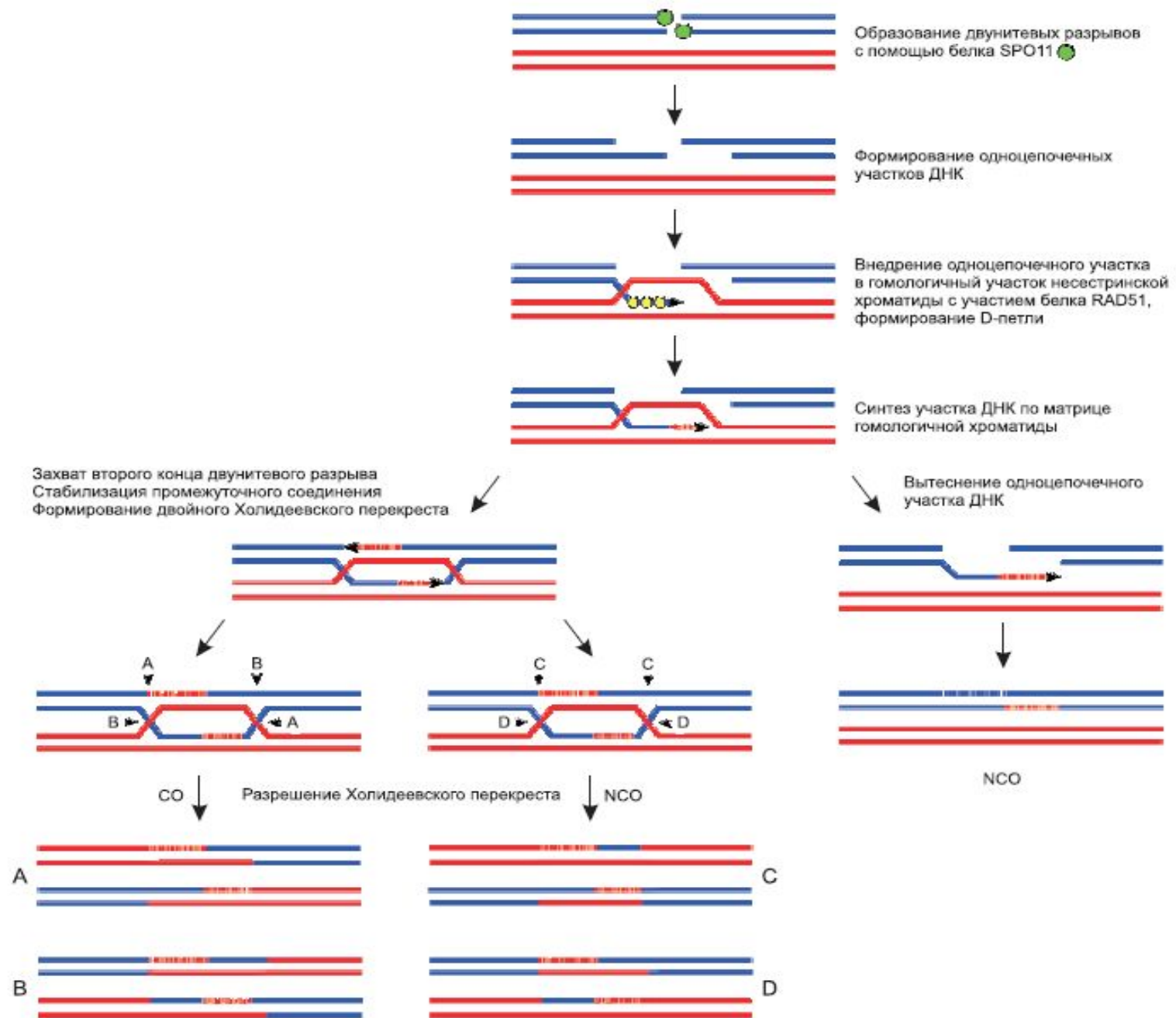


Молекулярный механизм кроссинговера

Двунитевые разрывы вносятся в ДНК с помощью белка SPO11

В местах разрывов образуются одноцепочечные 3'-концы, которые с помощью RecA-подобных белков (у эукариот это RAD51 и DMC1) внедряются в неповрежденный гомологичный участок одной из двух несестринских хроматид. Именно этот контакт запускает сборку белков центрального элемента синаптонемного комплекса, они начинают накапливаться в местах первичного контакта гомологичных хромосом.





Белки мисматч репарации MLH1 и MLH3

Картирование генов

Построение генетических и цитологических карт



СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Толмачева Екатерина Николаевна
Кандидат биологических наук,
доцент кафедры биологии и генетики

- **Картирование генов** - определение положения данного гена на какой-либо хромосоме относительно других генов.

Используются три основных группы методов картирования генов

- **физическое** (определение с помощью рестрикционных карт, электронной и световой микроскопии).
- **Генетическое** (определение частот рекомбинаций между генами)
- **Цитогенетическое** (гибридизация *in situ*, получение монохромосомных клеточных гибридов, делеционной метод и др.)

Генетические и физические карты хромосом

- **Генетическое картирование** основано на использовании генетических методов для построения карт, показывающих позиции генов и других последовательностей в геноме.
 - Генетические методы включают гибринологические эксперименты или, в случае с людьми, генеалогический метод (анализ родословных)

- Морган представлял себе гены упорядоченными по длине хромосом, как бусинки в ожерелье



- Экспериментальные данные привели его к идее создания **генетических карт хромосом**
- Очевидно, что *чем дальше находятся два гена друг от друга, тем больше вероятность разрыва нити, связывающей их, и получения новых сочетаний генов*
- Стало возможным *определить относительное расстояние между генами в хромосоме путем простого расчета процента кроссинговера*

- Частота кроссинговера (расстояние между генами):

$$= \frac{\text{число кроссоверных организмов}}{\text{общее число потомков}} * 100\%$$

- Эта частота строго пропорциональна расстоянию между сцепленными генами и измеряется в ***морганидах***
- *1 морганида соответствует 1% рекомбинантных гамет или генотипов, полученных при анализирующем скрещивании*

Частота рекомбинаций

$$\text{ЧР} = \frac{\text{Число рекомбинантов}}{\text{Общее число потомков}} \times 100$$

Серое тело, длинные крылья (BbVv)	– 965 (41,5%)
Черное тело, короткие крылья (bbvv)	– 944 (41,5%)
Серое тело, короткие крылья (Bbv)	– 206 (8,5%)
Черное тело, длинные крылья (bbVv)	– 185 (8,5%)
Всего рекомбинантов	- 391 (17%)
Всего потомков	- 2300 (100%)

$$\text{ЧР} = \frac{206 + 185}{2300} \times 100 = \mathbf{17\%} \quad \text{или} \quad \mathbf{17 \text{ морганид}}$$

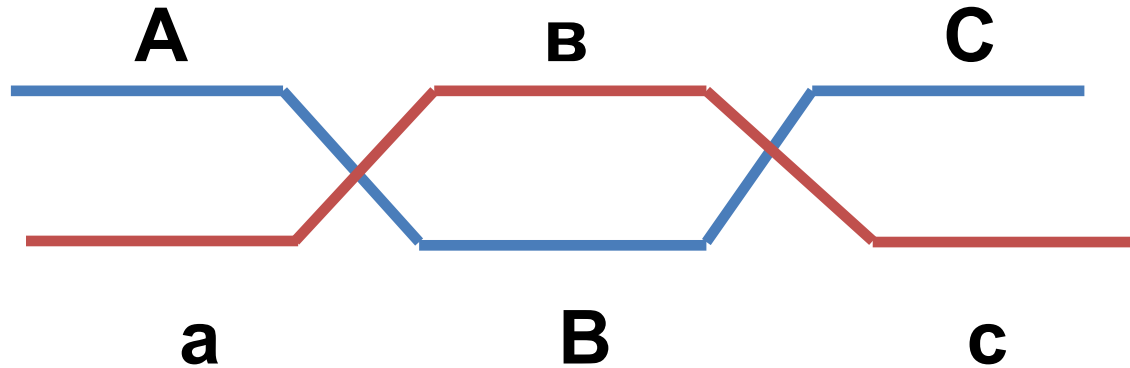
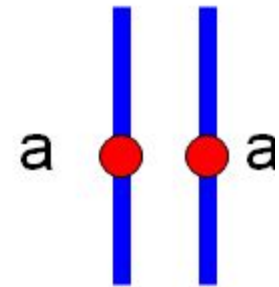
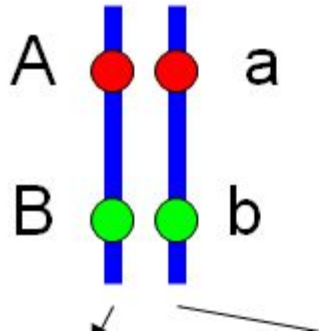
Расчёт расстояния между генами

Гаметы	Генотип зигот	Число особей		%
Некроссоверы ABC abc	ABC/abc abc/abc	150 143	293	56,2
Кроссинговер между A и B Abc aBc	Abc/abc aBc/abc	37 42	79	15,2
Кроссинговер между B и C ABc aBc	ABc/abc aBc/abc	70 65	135	25,9
Кроссинговер между A и B, между B и C ABc aBc	ABc/abc aBc/abc	8 6	14	2,7

P: AaBb

x

aabb



A и B – 79 + 14=93

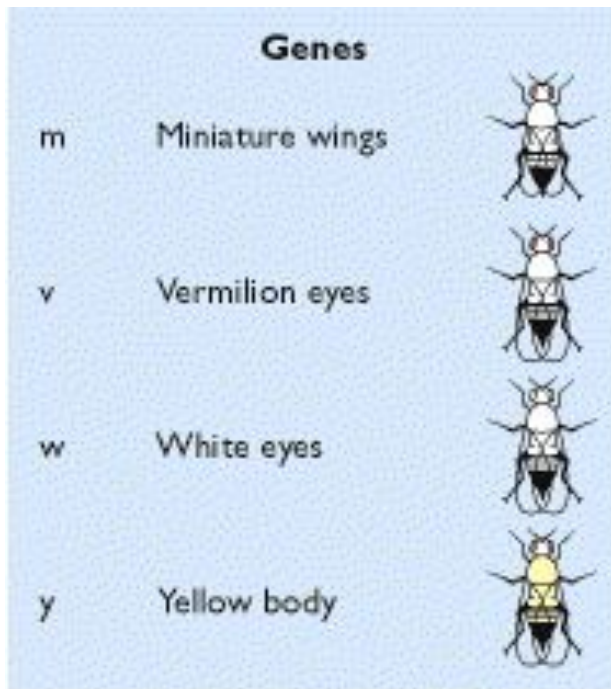
93/521 = 17,9%

B и C – 135+14= 149

149/521=28,6%

A – C= 17,9% + 28,6%=46,5%

- **А. Стертевант в 1913 г.** составил первую генетическую карту локализации генов в X-хромосоме дрозофилы
- Генетические карты уже разработаны для дрозофилы, мыши, нейроспоры; для высших растений: кукурузы, риса, ячменя и др.



Recombination frequencies

Between m and v = 3.0%

Between m and y = 33.7%

Between v and w = 29.4%

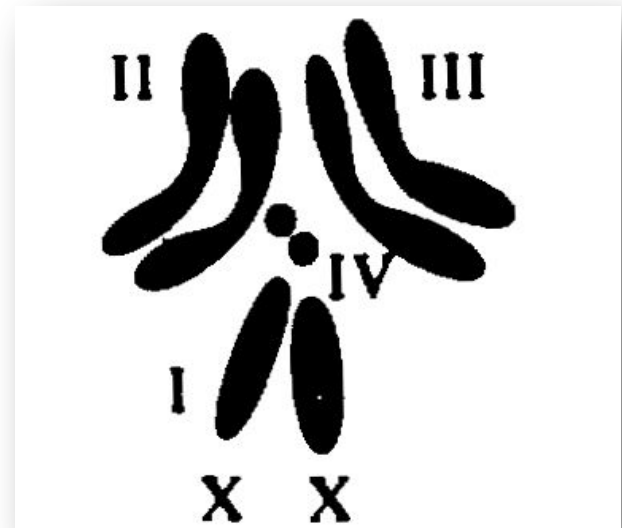
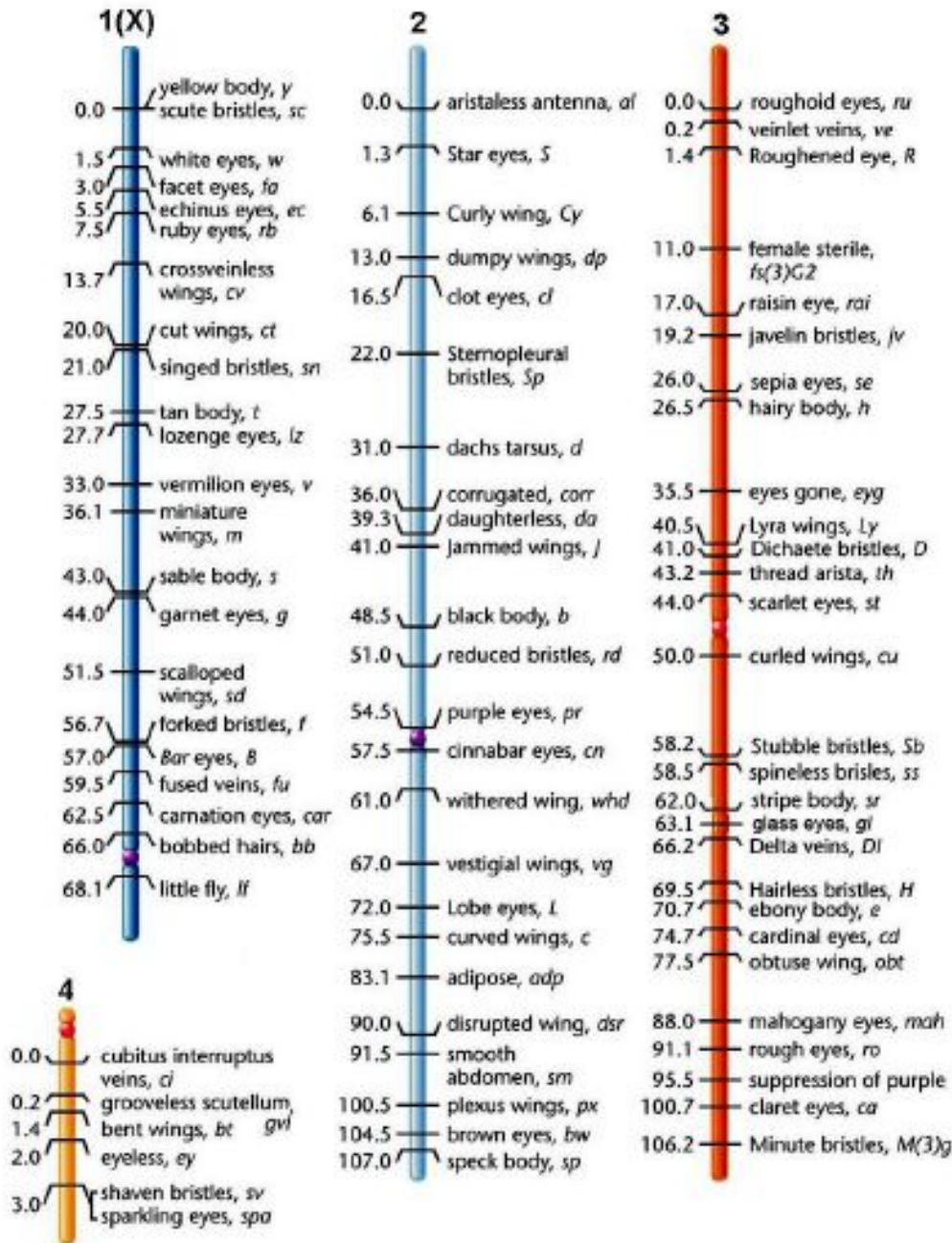
Between w and y = 1.3%

Deduced map positions



- **Построение генетической карты на основании частот рекомбинации.** Пример показывает реальные эксперименты, выполненные Артуром Стуртевантом на плодовой мушке. Все 4 гена находятся в X-хромосоме плодовой мушки. Показаны частоты рекомбинации между генами и относительное разморасположение генов на карте

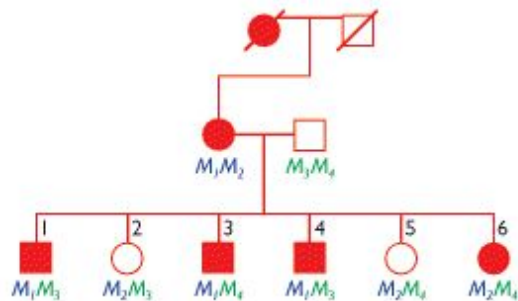
Генетические карты (группы сцепления) дрозофилы.



Генеалогический анализ в составлении генетических карт человека

- Для человека невозможно проведение экспериментальных браков с целью создания генетических карт
- Данные для расчета частот рекомбинации могут быть получены исследованием генотипов членов поколений существующих семей
- Это значит, что доступны только ограниченные данные и их интерпретация часто затруднена, так как браки людей редко приводят к нужным «скрещиваниям», а зачастую генотипы одного или более членов семей недоступны из-за их смерти или отказа от сотрудничества

(A) The pedigree



(B) Possible interpretations of the pedigree

	MOTHER'S CHROMOSOMES	
	Hypothesis 1	Hypothesis 2
	<u>Disease M_1</u> <u>Healthy M_2</u>	<u>Healthy M_1</u> <u>Disease M_2</u>
CHILD 1	<u>Disease M_1</u> Parental	Recombinant
CHILD 2	<u>Healthy M_2</u> Parental	Recombinant
CHILD 3	<u>Disease M_1</u> Parental	Recombinant
CHILD 4	<u>Disease M_1</u> Parental	Recombinant
CHILD 5	<u>Healthy M_2</u> Parental	Recombinant
CHILD 6	<u>Disease M_2</u> Recombinant	Parental
Recombination frequency	1/6 = 16.7%	5/6 = 83.3%

(C) Resurrection of the maternal grandmother



Пример анализа родословной людей.

(А) Родословная показывает наследование генетической болезни в семье двух живых родителей и 6 детей, а также при наличии информации о родителях матери. Аллель болезни является доминантным по отношению к аллелю здоровья. Реальным является определение степени сцепления между геном заболевания и микросателлитом М типированием аллелей для этого микросателлита (M_1 , M_2 , и т.д.) у живых членов семьи.

(В) Родословная может быть интерпретирована двумя различными путями: Гипотеза 1 дает низкую частоту рекомбинации и свидетельствует, что ген заболевания сильно сцеплен с микросателлитом М; Гипотеза 2 подтверждает, что ген и микросателлит менее прочно сцеплены

(С) Реконструкция генотипа микросателлита бабушки подтверждает верность Гипотезы 1

KEY

○ Unaffected female ● Affected female □ Unaffected male ■ Affected male / Dead

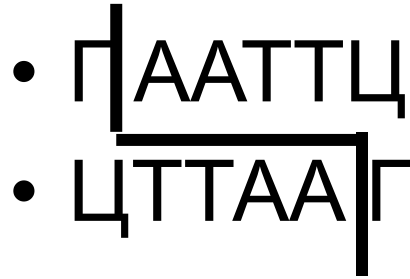
- **Физическое картирование** использует молекулярно-биологические методы для непосредственного исследования молекул ДНК и построения карт, показывающих позиции определенных последовательностей, в том числе генов

Последовательности,
распознаваемые разными
рестриктазами

Построение

рестрикционных карт

• EcoRI



• SmaI



ДНК разрезают рестриктазами и подвергают электрофорезу.

Рестрикционная карта - вид физической карты, на которой указаны расстояния между соседними сайтами расщепления ДНК определенной рестриктазой.

Опорные точки карт хромосом – гены и ДНК-маркеры

- Гены – очень часто используемые маркеры, но они не идеальны. Одна из проблем (особенно для больших геномов позвоночных) состоит в том, что карты, основанные на генах, не очень детальные
- Поэтому нужны другие типы маркеров
- Опорные точки карт, не являющиеся генами, называются **ДНК-маркерами**
- Основные типы ДНК-маркеров:
 - полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (RFLPs)
 - полиморфизм длины простой последовательности (SSLPs)
 - однонуклеотидный полиморфизм (SNPs)

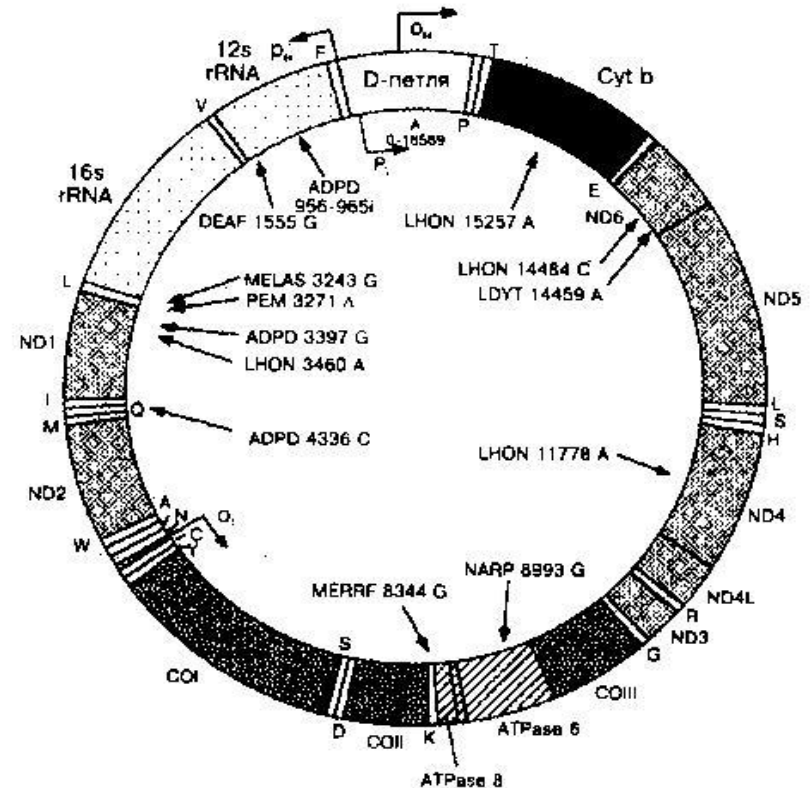
Карта хромосомы 21 и митохондриального генома

Хромосома 21



Эпилепсия, прогрессирующая миоклоническая

- 21q11.2 Миелопролиферативный синдром, транзиторный
- 21q22.3 Глухота, аутосомно-рецессивная 8
- 21q22.3 Синдром Дауна, критический регион



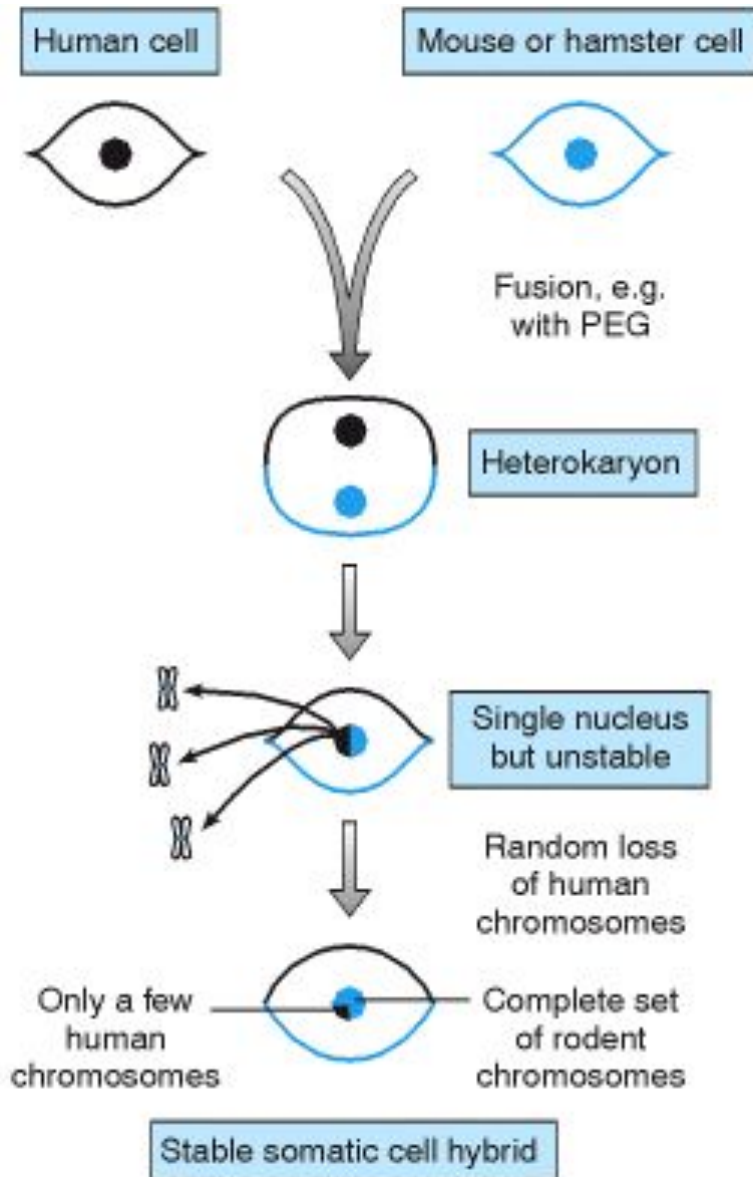
- ADPD - Болезнь Альцгеймера/болезнь Паркинсона
- DEAF - Нейросенсорная потеря слуха
- LHON - Наследственная нейроофтальмопатия Лебера
- LDYT - LHON и дистония
- MELAS - Митохондриальная миопатия, энцефалопатия, молочнокислый ацидоз и приступы судорог
- MERRF - Миоклональная эпилепсия в сочетании с необычно красными мышечными волокнами
- NARP - Нейропатия, атаксия и пигментный ретинит
- PEM - Летальная прогрессирующая энцефаломиопатия

Метод генетики соматических клеток

- При гибридизации соматических клеток двух разных линий образуются гетерокарионы — клетки, которые содержат оба родительских ядра. Затем в результате митоза образуются две одноядерные клетки — синкарионы, имеющие хромосомы обоих родительских клеток.

Методы картирования хромосом человека

- *метод гибридизации соматических клеток грызунов и человека в культуре ткани*
- Если изолировать из тела и смешать клетки мыши и человека в культуре, то в результате их слияния можно получить *гибридные клетки, содержащие хромосомы одного и другого вида.*
- Клетки мыши имеют 40 хромосом, а клетки человека - 46. Суммарное число хромосом гибридных клеток должно быть 86, но обычно этого не происходит и чаще всего гибридные клетки содержат обычно от 40 до 50 хромосом.



- Пример показывает как стабильные человек-мышь гибридные соматические клетки могут получаться применением ПЭГ
- По непонятным причинам хромосомы человека избирательно утрачиваются первичным продуктом слияния
- Происходящая случайно утрата человеческих хромосом приводит к образованию большого разнообразия гибридных клеток по набору хромосом человека
- Эти клетки могут быть клонированными для получения отдельных клеточных линий со специфическим набором хромосом человека
- Идентификация хромосом человека может проводиться методами, базирующимися на ПЦР с использованием хромосом-специфических маркеров

- В гибридных клетках человек-мышь, полученных в результате слияния анеуплоидных клеток мыши и диплоидных эмбриональных фибробластов человека, 75-95% человеческих хромосом утрачиваются в процессе культивирования, причем их утрата носит случайный характер
- Среди множества разнообразных гибридов всегда найдется клетка, сохранившая ту или иную хромосому человека
- В гибридных клетках хромосомы функционируют, регулируя синтез соответствующих белков

- После размножения этой клетки можно провести **анализ ферментов**, активность которых связана с наличием именно данной хромосомы
- Использование **методов дифференциального окрашивания** хромосом позволяет связать гены с определенными локусами хромосом, так как в гибридных клетках довольно часты хромосомные разрывы, перестройки, присутствие не целых хромосом, а отдельных фрагментов

- В настоящее время для картирования генов хромосом человека используются также другие методы:
 - *Биохимические методы* — сравнение аминокислотных последовательностей белков и нуклеотидной последовательности ДНК отдельных хромосом
 - *Цитологические методы* — сопоставление изменения морфологии хромосомного участка с характерным фенотипом, анализ «ломких» участков хромосом
 - *Молекулярно-генетические методы* и др.

FISH

FISH – fluorescence in situ hybridization –

цитогенетический метод, используемый для детекции и локализации специфических последовательностей ДНК на хромосомах, мРНК и др. В основе методики лежит гибридизация флюоресцентно меченого ДНК/РНК зонда с комплементарной последовательностью ДНК/РНК. Выявление метки происходит с помощью флюоресцентного микроскопа.

Метод FISH был введен более 30 лет назад (в 1980-х гг.). Он широко распространился как метод физического картирования генов на хромосомах.

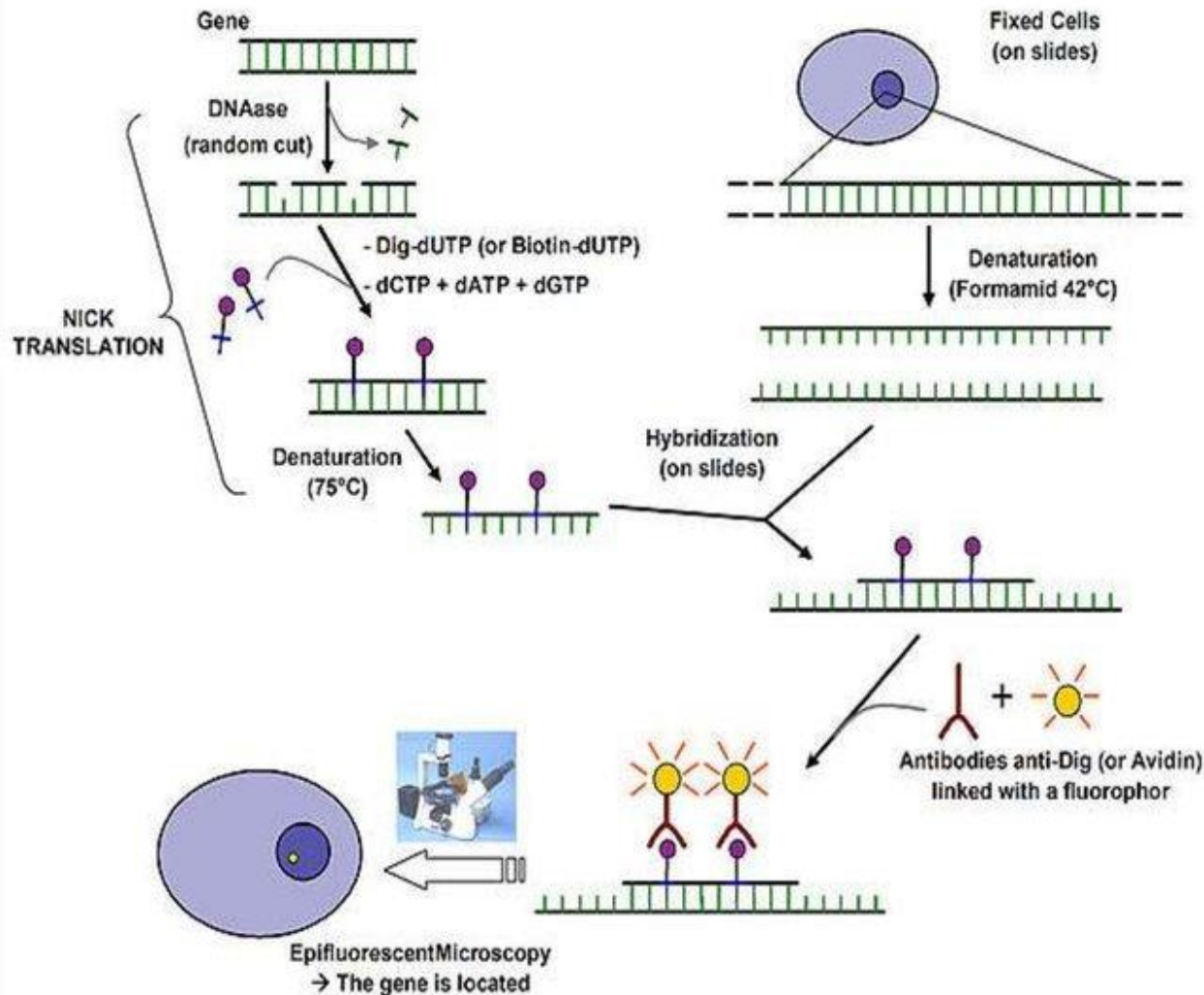
Позднее он стал применяться в других областях исследований (в областях клинической генетики, нейронауки, репродуктивной медицины, токсикологии, микробной экологии, эволюционной биологии, сравнительной геномики, клеточной геномики и хромосомной биологии).

На данный момент FISH преимущественно используется для построения физических и генетических карт хромосом, для выявления структурных перестроек, транслокаций, микроделеций, генных амплификаций в интерфазных и метафазных хромосомах.

В результате развития науки (лучшего понимания химических и физических свойств нуклеиновых кислот и хроматина), а также развития флюоресцентной микроскопии и цифровой визуализации, метод постоянно совершенствовался (произведено улучшение чувствительности, специфичности, разрешения), и было разработано много вариаций данного метода.

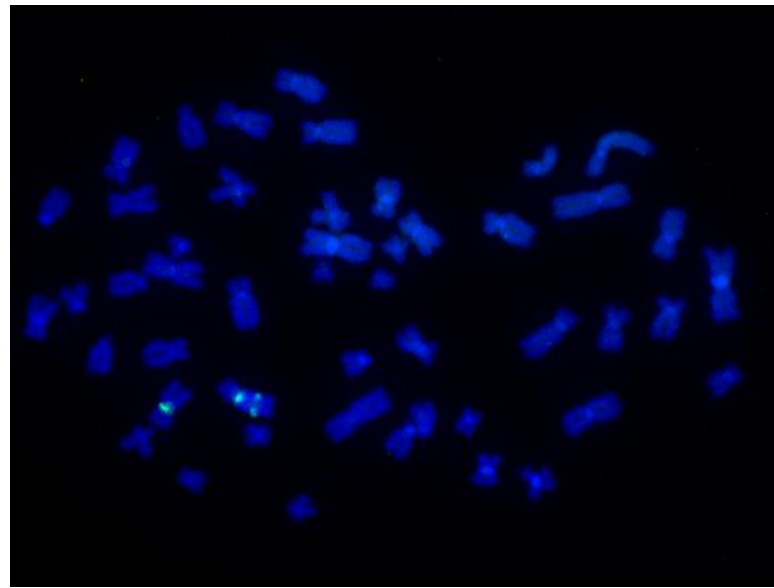
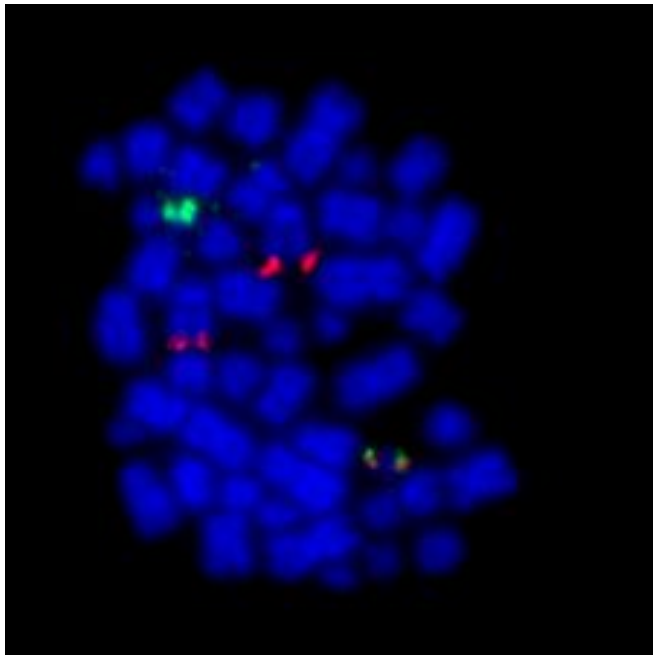
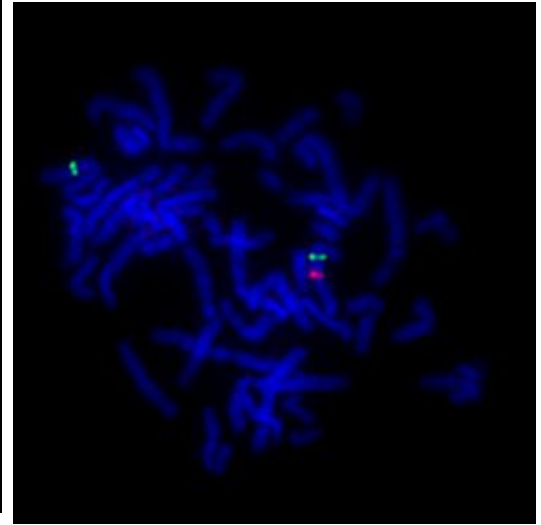
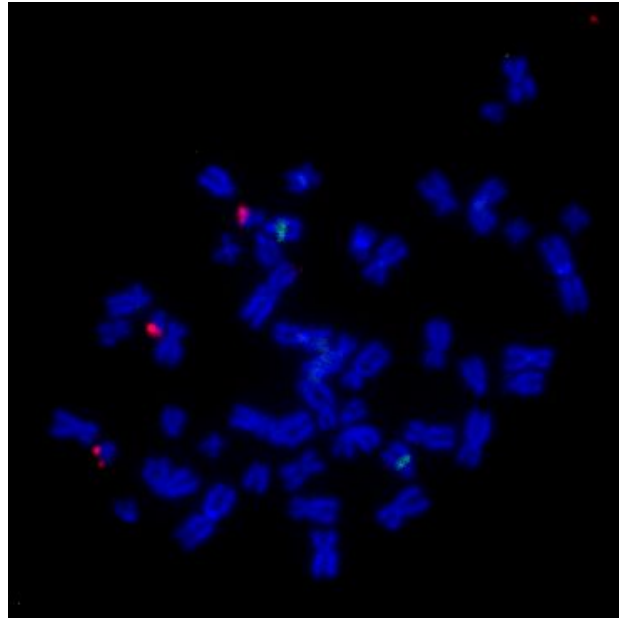
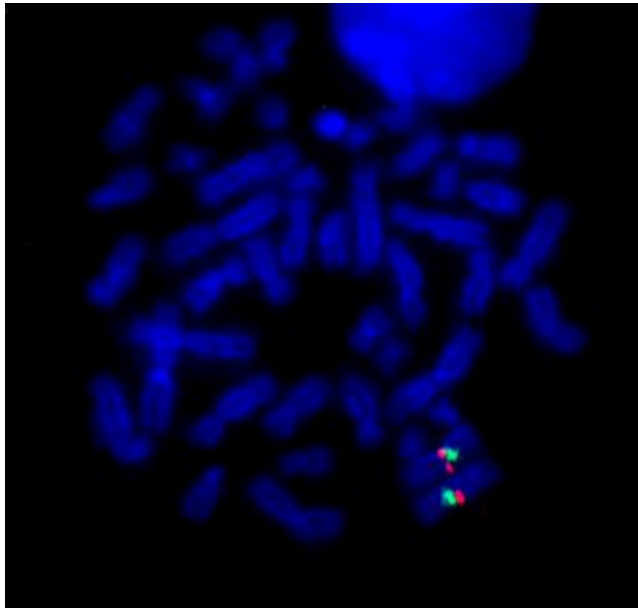
Этапы FISH - метода

FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



Суть метода заключается в приготовлении коротких последовательностей ДНК, называемых **зондами**, которые являются комплементарными по отношению к последовательностям ДНК, представляющим объект изучения.

Зонды гибридизуются (связываются) с комплементарными участками ДНК и благодаря тому, что они помечены **флуоресцентной меткой**, позволяют видеть локализацию интересующих генов в составе ДНК или хромосом.



Секвенирование ДНК

- определение первичной нуклеотидной последовательности (от англ. sequence — последовательность).
- В результате секвенирования получается линейное символьное описание, которое сжато резюмирует атомную структуру молекулы ДНК.

Секвенирование ДНК

- Для секвенирования применяются методы Эдмана, Сэнжера и другие;
- в настоящее время для секвенирования нуклеиновых кислот обычно применяется метод Сэнжера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP).
- Обычно до начала секвенирования при помощи ПЦР производят амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить.

Секвенирование ДНК по Сэнжеру

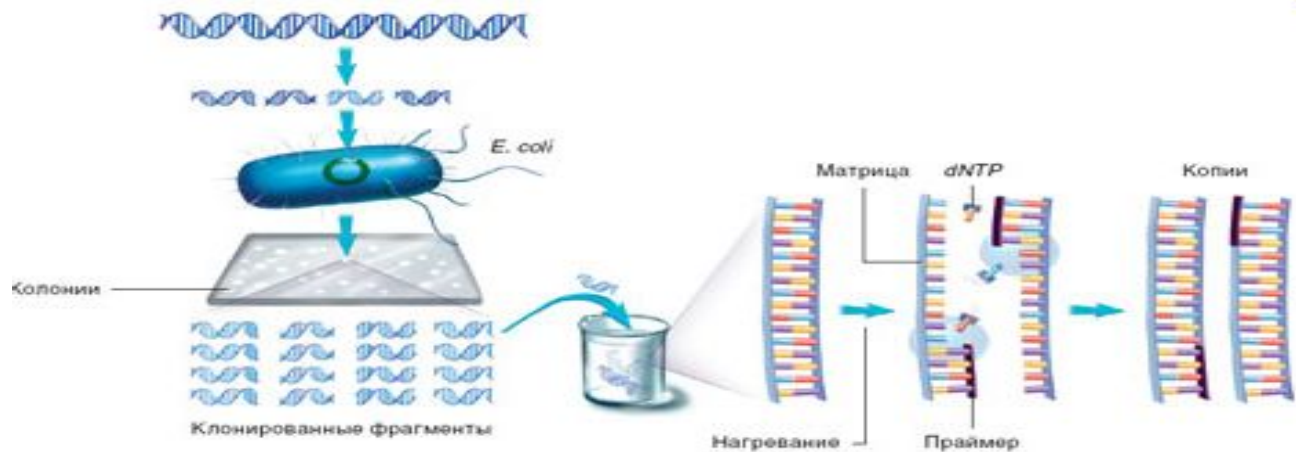
- Методология секвенирования была разработана в конце 1970-х гг. английским биохимиком Фредериком Сэнжером.



(из <http://www.internet-school.ru>)

Секвенирование ДНК по Сэнжеру

- Перед секвенированием молекулу ДНК разрезают на фрагменты и клонируют в *Escherichia coli*. Выделенные из бактериальных клеток фрагменты многократно амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)



(из <http://wsyachina.narod.ru>)

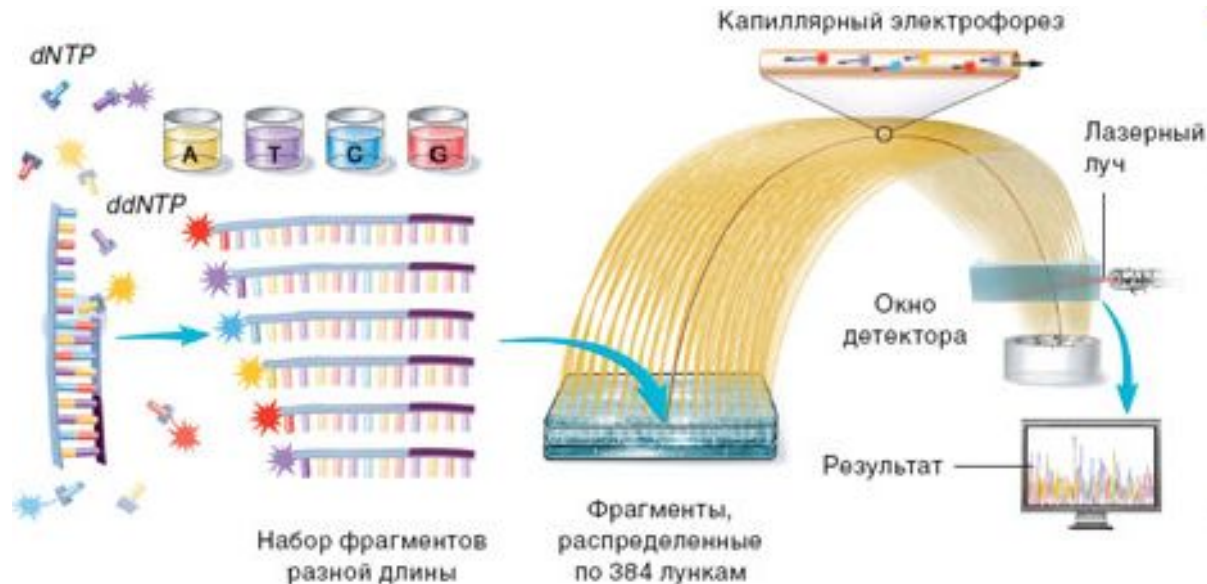
Секвенирование ДНК по Сэнжеру

- Раствор с одноцепочечными фрагментами и праймерами распределяют по четырём пробиркам, в каждую из которых добавлены четыре разные dNTP и один из флуоресцентно меченных дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTP). Удлинение гибридизовавшегося с ДНК-фрагментом праймера происходит до тех пор, пока в цепь не включится ddNTP. В этом месте синтез останавливается, и в результате в каждой из пробирок образуется уникальный набор отрицательно заряженных фрагментов разной длины, оканчивающихся одним из меченых ddNTP.

Секвенирование ДНК по Сэнжеру

- Фрагменты разделяют по размеру с помощью капиллярного электрофореза. Когда фрагменты определённой длины проходят через окно детектора, освещаемое лазерным лучом, ddNTP начинают флуоресцировать. Длина волны флуоресценции зависит от того, какой именно ddNTP находится у них на конце, так что на выходе получается цветная картинка, которую можно трансформировать в нуклеотидную последовательность.

(из
<http://wsyachina.narod.ru>)



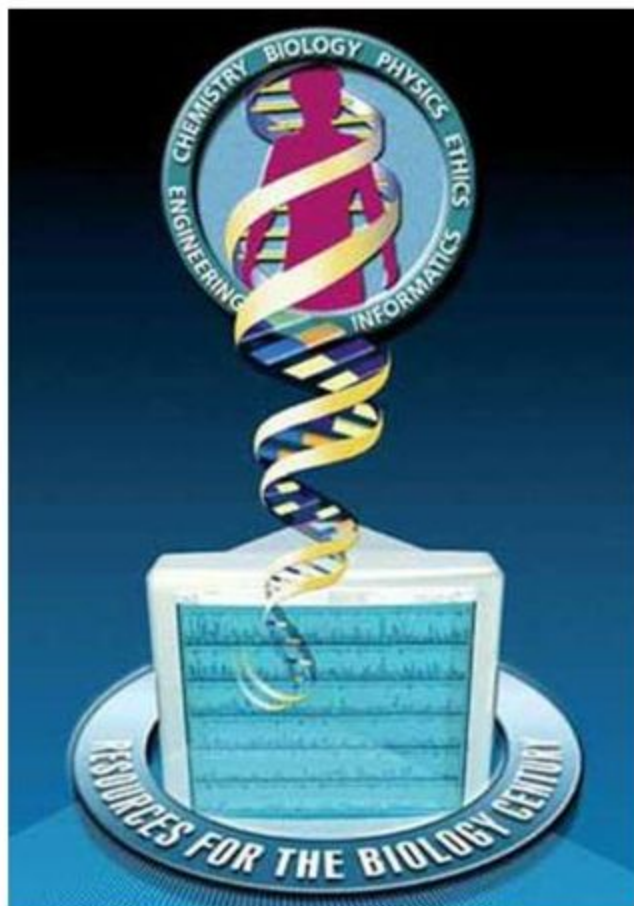
Автоматическое секвенирование ДНК

- Особенно перспективным для массового секвенирования в автоматическом режиме оказалось применение меченых различными флуорохромами дидезоксинуклеотидов. В этом варианте секвенирования каждому из нуклеотидов соответствует свой цвет полосы в геле, что хорошо распознается в автоматическом режиме.
- Этот метод нашел широкое применение в реализации программы «Геном человека».

Расшифровка генома человека

Основной метод расшифровки геномов – секвенирование (определение нуклеотидных последовательностей ДНК)

Метод был разработан в 1977 году, а сегодня - это уже технологичная рутина.



В 1990 г. при поддержке США, а также ряда других стран, был запущен 3 млрд. проект **«Геном человека»**. Возглавил его Фрэнсис Коллинз, глава International Human Genome Sequencing Consortium

Целями проекта являлись:

- определение последовательности 3 млрд пар оснований, составляющих ДНК гаплоидного набора хромосом человека – 22 аутосом + X-хромосомы + Y-хромосомы), и сохранение этой информации в базе данных;

- идентификация генов человека;

- усовершенствование приборов для анализа данных;

- исследование этических, правовых и социальных вопросов, возникающих при расшифровке генома.

Проект «Геном человека» (Human Genome Project)

1988 г.	Появился Национальный институт исследования генома человека (National Human Genome Research Institute, NHGRI)
1995 г.	NHGRI публикует первую полную последовательность ДНК живого организма — бактерии <i>Haemophilus influenzae</i>
1996 г.	Определен первый геном эукариотической клетки клетки дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1998 г.	Опубликована первая последовательность ДНК многоклеточного организма — плоского червя <i>Caenorhabditis elegans</i>
июнь 2000 г.	Проведена первая реконструкция полного генома человека
2003г.	Осуществлена полная расшифровка ДНК, оставалась только первая хромосома человека — последняя из нерасшифрованных хромосом.
17 мая 2006 г.	Секвенирована самая большая, первая хромосома.

Число генов у человека оценено в 20 - 25 тысяч

