

Генетическое картирование. Методы картирования генов.



СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Севостьянова Наталия Владимировна
доктор медицинских наук,
Профессор кафедры биологии и
генетики

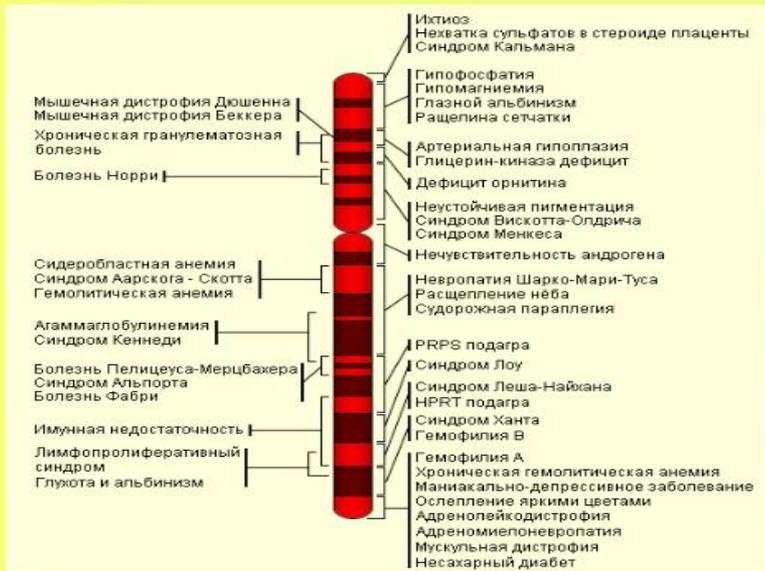
План лекции

1. Картирование генов.
2. Хромосомные карты.
3. Цитологические карты.
4. Методы картирования генов.
5. Тестирование мутаций на аллелизм.
6. Хромосомные мутации.

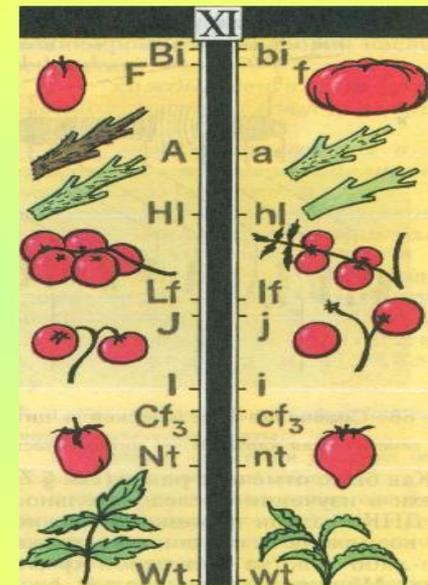
Генетическое картирование - это определение положения картируемого гена относительно других генов данной хромосомы.

Чем больше генов известно у данного вида, тем точнее результаты.

Генетической картой хромосомы называют схему взаимного расположения генов, находящихся в одной группе сцепления.



Карта X-хромосомы человека



Генетическая карта хромосомы томата

- 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.



Альфред Стертевант
(1891-1970)

Генетическая карта хромосомы это схема взаимного расположения генов, находящихся в одной группе сцепления.

Как известно, у *D. melanogaster* в диплоидном наборе четыре пары хромосом.

Составить такую карту можно только для объектов, у которых изучено большое число мутантных генов

Генетические карты (группы сцепления) дрозофилы.



- Номера групп сцепления обозначены римскими цифрами. Цифры на генетических картах обозначают локусы генов, или расстояние между генами и одним из концов хромосом (в процентах кроссинговера). Внизу слева – метафазная пластинка хромосом дрозофилы, где номерам групп сцепления соответствуют номера хромосом. Буквы справа от названия гена обозначают признак, затрагиваемый данным геном: В-тело, Е-глаза, W-крылья, Н-щетки.

Например, у дрозофилы идентифицировано свыше 500 генов, локализованных в 4 группах сцепления. I группа — половые хромосомы (XX — самки, XY — самцы), II, III, IV — аутосомы.

У кукурузы — свыше 400 генов,
распределенных в 10 группах сцепления

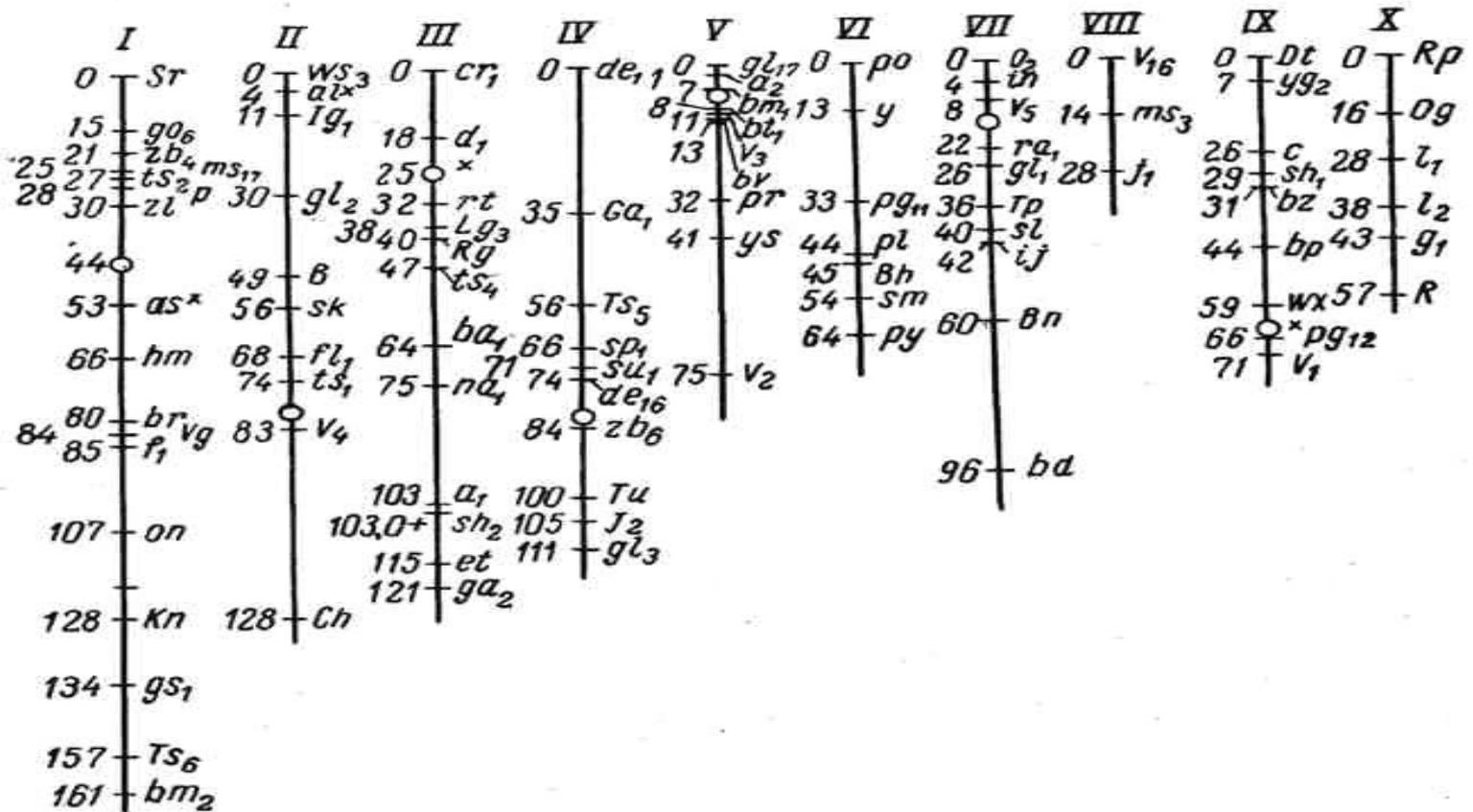


Рис. 45. Генетические карты хромосом кукурузы:

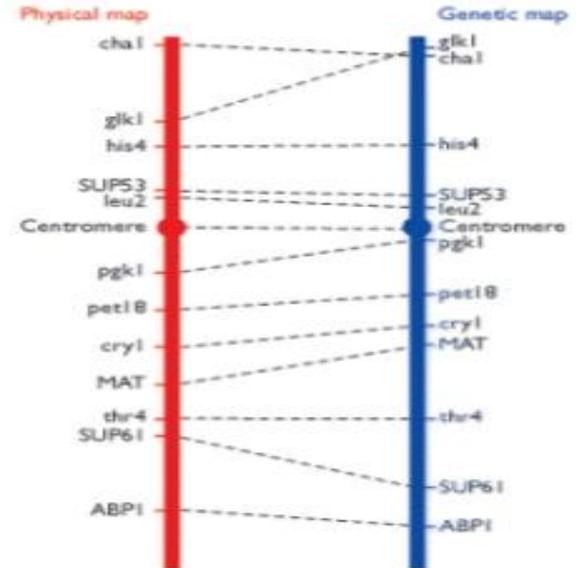
I—X — группы сцепления; центромеры обозначены кружком; цифры указывают расстояния между локусами и одним из концов хромосомы (в единицах перекреста); символами обозначены гены. (По Родсу.)

Для составления генетических карт хромосом необходимо выявление множество мутантных генов и проведения многочисленных скрещиваний.



Генетические карты хромосом составляют для каждой пары гомологичных хромосом.

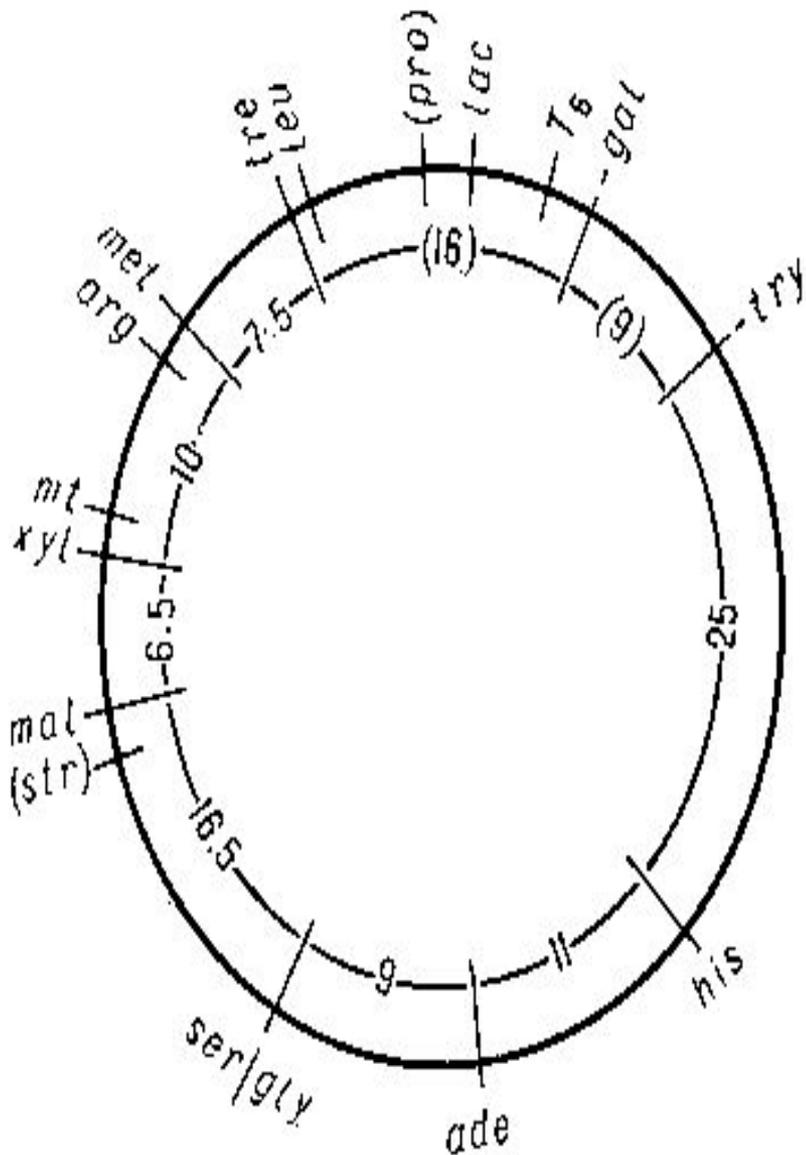
- На генетической карте хромосом указывают: номер группы сцепления, сокращенные названия генов, расстояние между генами
- С помощью генетических карт можно предвидеть характер наследования признаков, определяемых нанесенными генами: теоретически рассчитать вероятность их расщепления у потомков



Физические карты более точны!

65

Группы сцепления нумеруют последовательно, по мере их обнаружения. Также указывают полные или сокращённые названия мутантных генов, их расстояния в морганидах. Обозначают место центромеры.



У менее изученных объектов число обнаруженных групп сцепления меньше гаплоидного числа хромосом.

У бактерий, которые являются гаплоидными организмами, имеется одна, чаще всего непрерывная, кольцевая хромосома и все гены образуют одну группу сцепления.

Генетическая карта хромосомы кишечной палочки.

Методы картирования генов

I. Физические

- определение с помощью рестрикционных карт
- электронной микроскопии
- вариантов электрофореза межгенных расстояний – в нуклеотидах

II. Генетические

- определение частот рекомбинаций между генами, в частности, в семейном анализе и др.

III. Цитогенетические

- гибридизации *in situ*
- получение монохромосомных клеточных гибридов
- делеционный метод и др.

Тестирование мутаций на аллелизм

Функциональный тест на аллелизм, который позволяет определить, принадлежат ли мутантные аллели одному локусу или разным.



Получают гибридов (гетерокарионов), у которых две исследуемые мутации находятся на разных гомологичных хромосомах - Транс-положение.

Если обе мутации действуют на разные независимые функции (затрагивают два разных гена), то такой гибрид имеет дикий фенотип, так как образуется дигетерозигота, в которой нормальные аллели доминируют над мутантными.

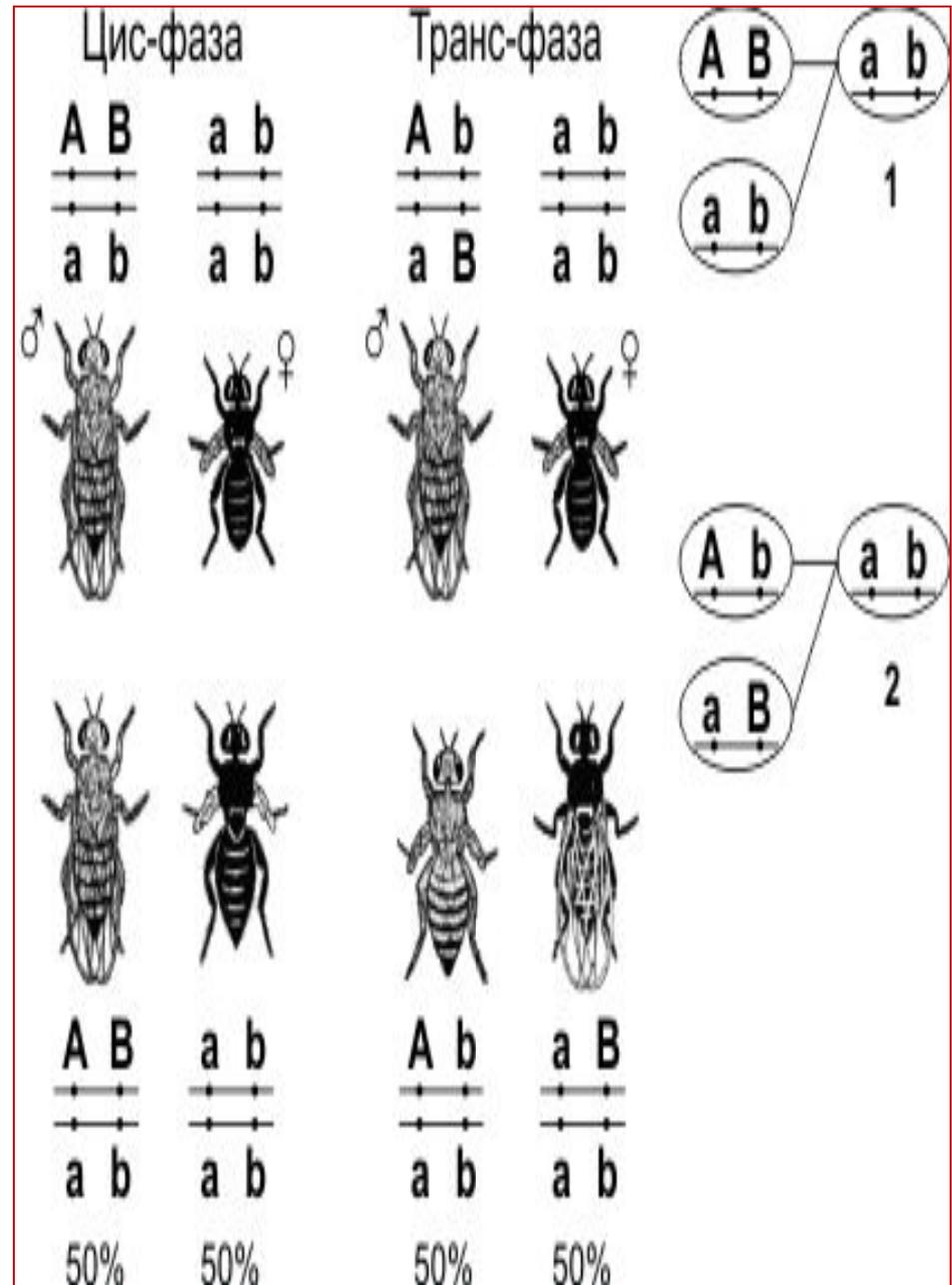
Мутации	Цис-положение	Транс-положение
Аллельные (в одном гене)		
Фенотип гибрида	Дикий тип	Мутант
Неаллельные (в разных генах)		
Фенотип гибрида	Дикий тип	Дикий тип

Если исследуемые мутации действуют на одну и ту же функцию (повреждают один и тот же ген), то гибрид должен иметь мутантный фенотип.

Цис-тест - получают гибридов, у которых обе исследуемые мутации привнесены одним из родителей, тогда как в хромосомах других содержатся нормальные аллели.

Гибриды с цис-положением мутаций должны иметь фенотип дикого типа независимо от того, относятся ли исследуемые мутации к одному или разным генам.

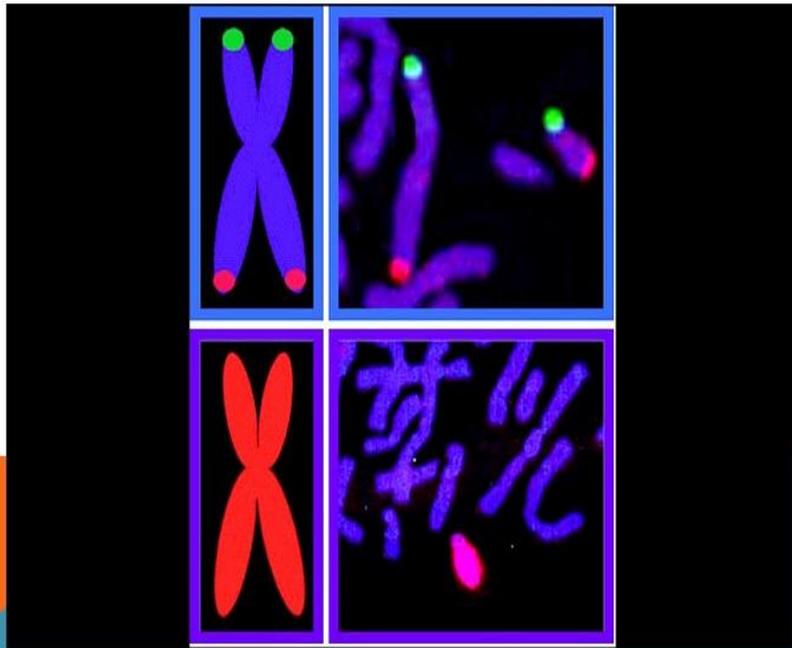
Это причина редкого использования цис-теста.



Для построения генетической карты хромосомы эукариот используют мейотический и митотический кроссинговер.

Некоторые из таких ошибок можно наблюдать, используя цитогенетические методы

ФИЗИЧЕСКАЯ КАРТА ХРОМОСОМ (МЕТОД FISH)



Сравнение генетических карт хромосом, построенных разными методами у одного и того же вида, выявляет одинаковый порядок расположения генов, хотя расстояние между конкретными генами на мейотических и митотических генетических картах хромосом могут различаться.

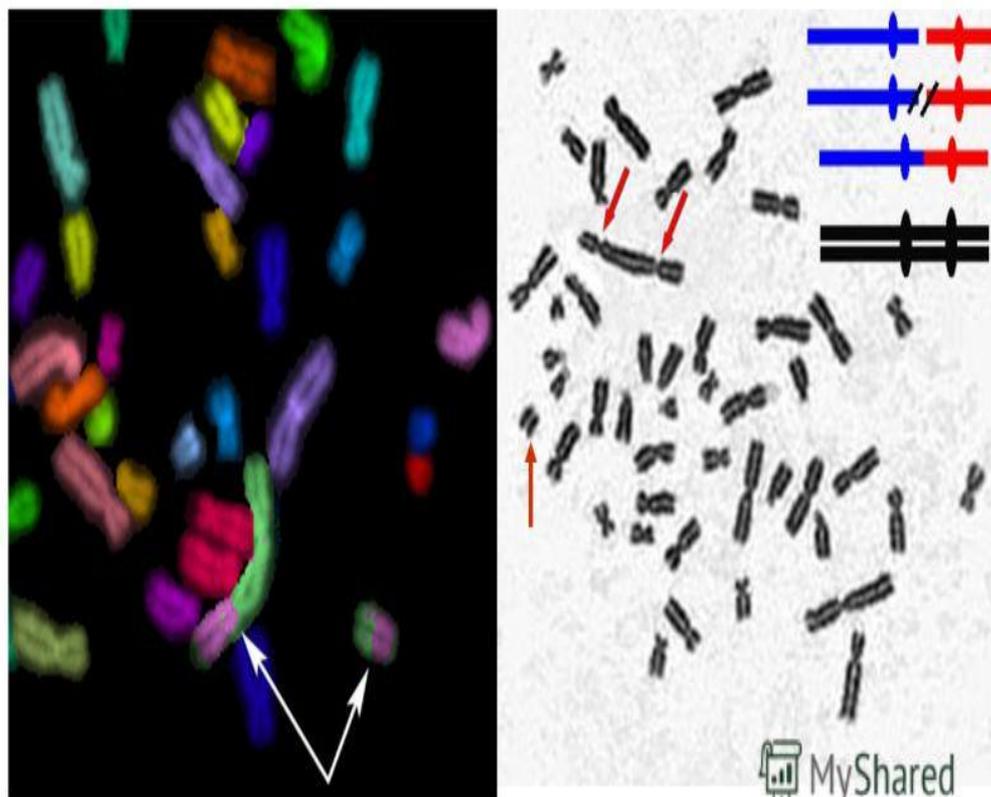
Мейотический кроссинговер - это сложный процесс, в ходе которого возможны ошибки.

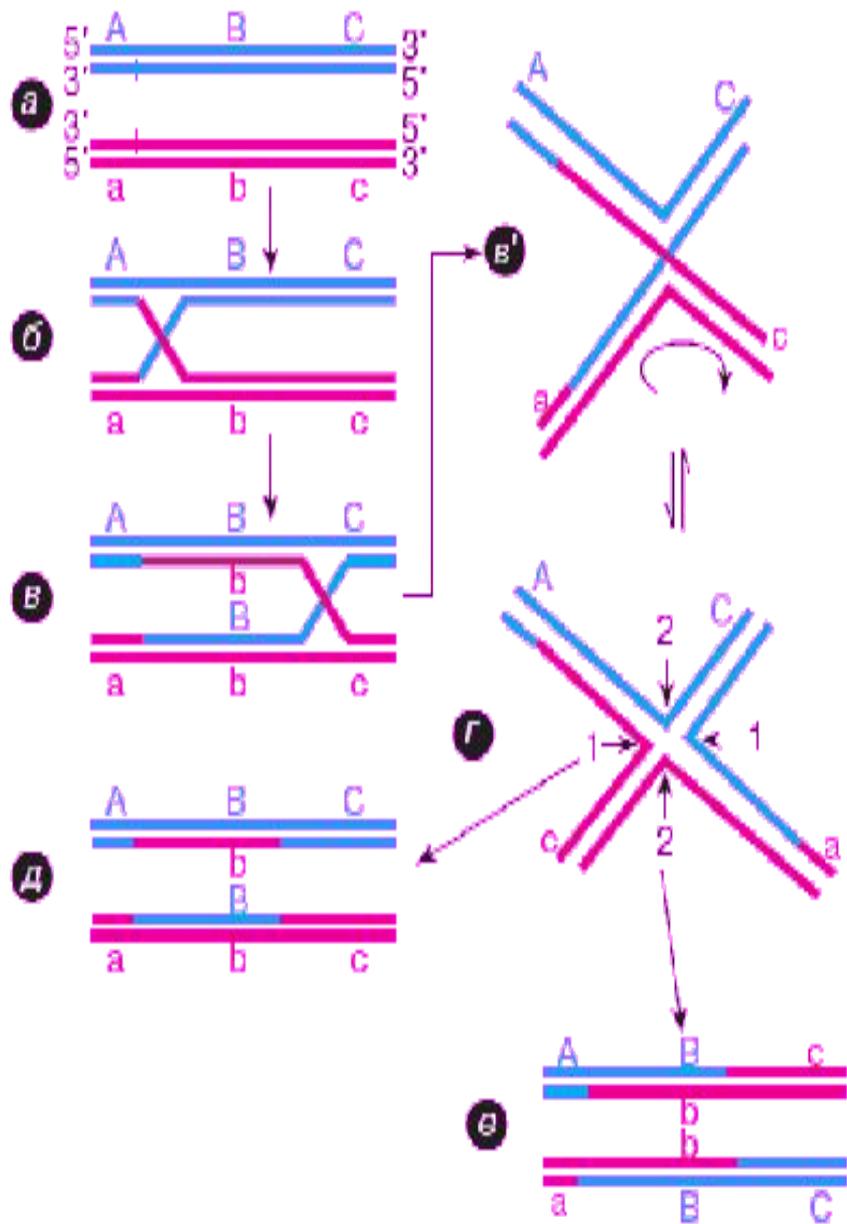
Кроссоверный обмен осуществляется по типу разрыв-воссоединение.

Цитологической иллюстрацией этого механизма может служить мейотический кроссинговер между разноокрашенными сестринскими хроматидами.

Иногда воссоединение хроматид происходит неправильно, и это может приводить к образованию **дицентрических хромосом и ацентрических фрагментов**.

В результате транслокаций могут возникать **дицентрические** (dic) хромосомы и парные **ацентрические** фрагменты



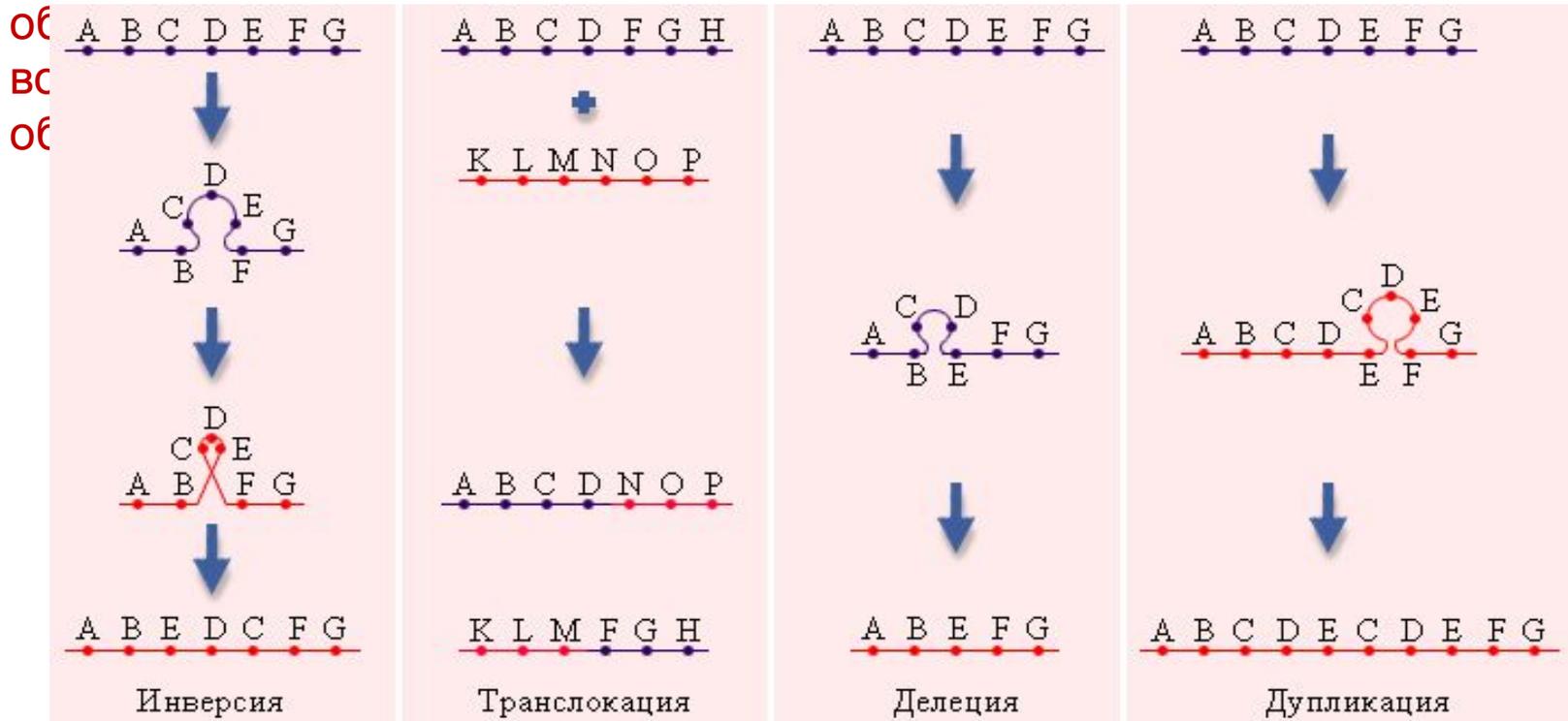


В норме генетические карты хромосом у эукариот линейные.

При построении генетических карт хромосом у гетерозигот по транслокации получается генетическая карта хромосом в виде креста.

Это указывает на то, что форма карт отражает характер конъюгации хромосом.

Кроссоверные обмены с ошибками воссоединения хроматид называются U-обменами. U-обмены обнаружены у многих видов растений и животных. Наиболее подробно они изучены у ржи ([Jones, Brumpton, 1971](#)). Кроссоверные обмены с ошибками воссоединения хроматид называются U-обменами. U-обмены обнаружены у многих видов растений и животных. Наиболее подробно они изучены у ржи (Jones, Brumpton, 1971). Частота U-конфигураций у ржи может достигать 30-40% на клетку, или 4-5% на [бивалент](#). Частота несестринских U-

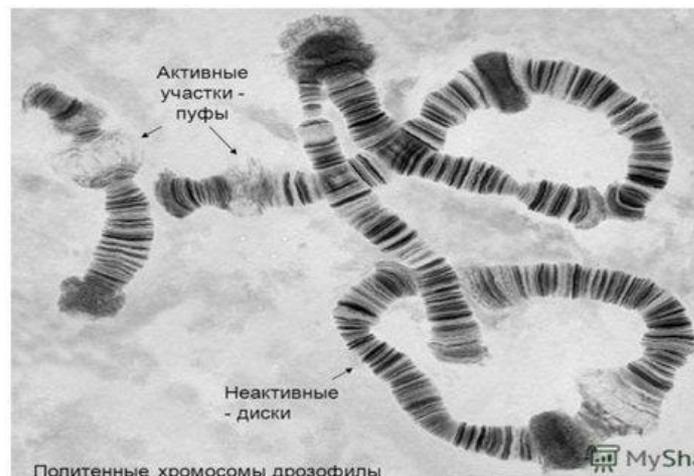


Цитологическая карта составляется на основании изучения политенных хромосом, что позволяет сопоставить структуру синтезируемого белка с определенным участком хромосомы (геном), так как транскрибируемый участок определяется под микроскопом в виде пуфа. Это позволяет определить локализацию гена.

Политенные хромосомы

-увеличенные в длину и ширину хромосомы в клетках некоторых тканей. Состоит такая хромосома из видимых полос - **дисков**. Образуется в результате последовательных актов репликации конъюгировавшей пары гомологов, но полученные реплики при этом не разделяются

Пуфы-характерные вздутия определённых дисков, образующихся в результате локальной декомпактизации в них ДНК



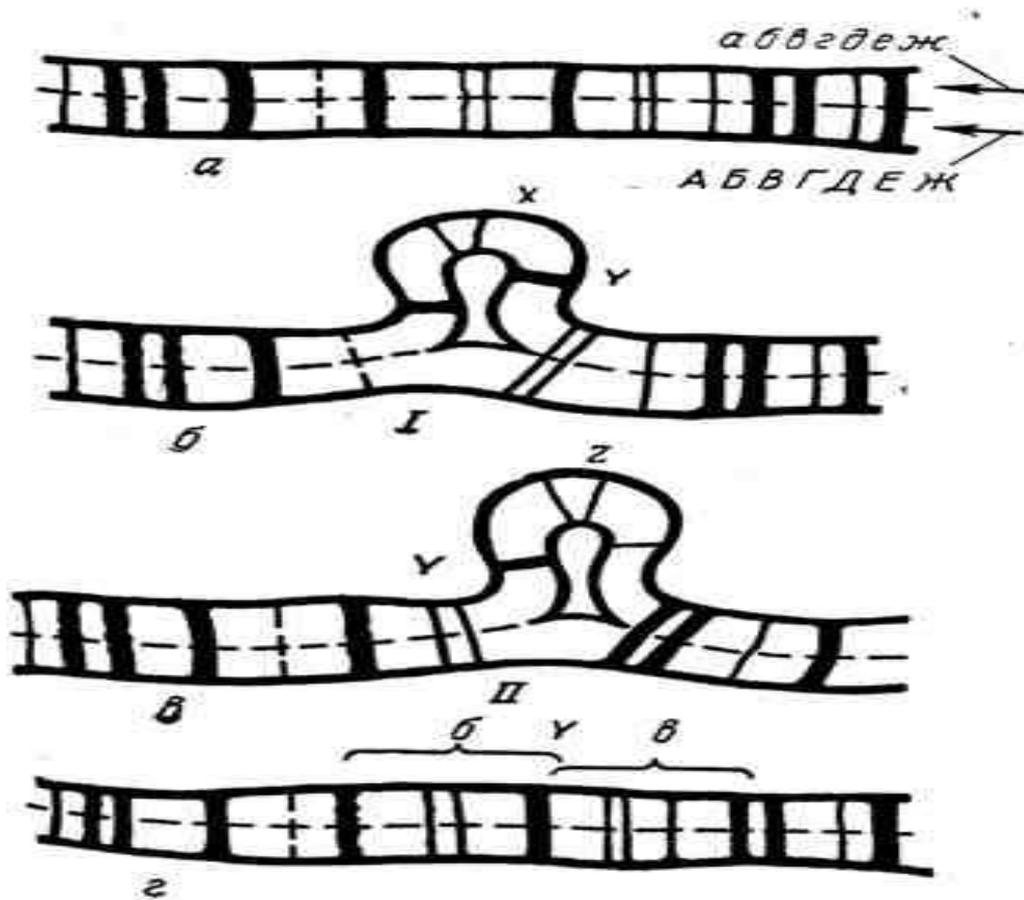


Рис. 86. Метод цитологической локализации гена в хромосоме дрозофилы:

а — конъюгация двух нормальных хромосом; *б* — делеция I в нижней хромосоме, верхняя хромосома в этом месте образует петлю, в которой имеется ген X, потерянный с делецией; *в* — делеция II, в петле локализованы гены *зу*; *г* — карта делеций, имеющих общий диск, поскольку обе петли содержат ген *у*; очевидно, что он локализован в диске, выделенном скобками.

Цитологическая карта

хромосомы представляет собой фотографию или точный рисунок хромосомы, на котором отмечается последовательность расположения генов.

Ее строят на основе сопоставления результатов анализирующего скрещивания и хромосомных перестроек. Например, если хромосома с доминантными генами будет последовательно терять отдельные локусы (при воздействии на нее мутагенов), то в гетерозиготе начнут проявляться рецессивные признаки.

Порядок проявления признаков будет указывать на последовательность расположения генов.

Метод цитологических карт основан на использовании хромосомных перестроек.

При облучении и действии мутагенов в хромосомах часто наблюдаются потери (делеции) или вставки (дупликации) небольших фрагментов, сравнимых по величине с одним или несколькими локусами.

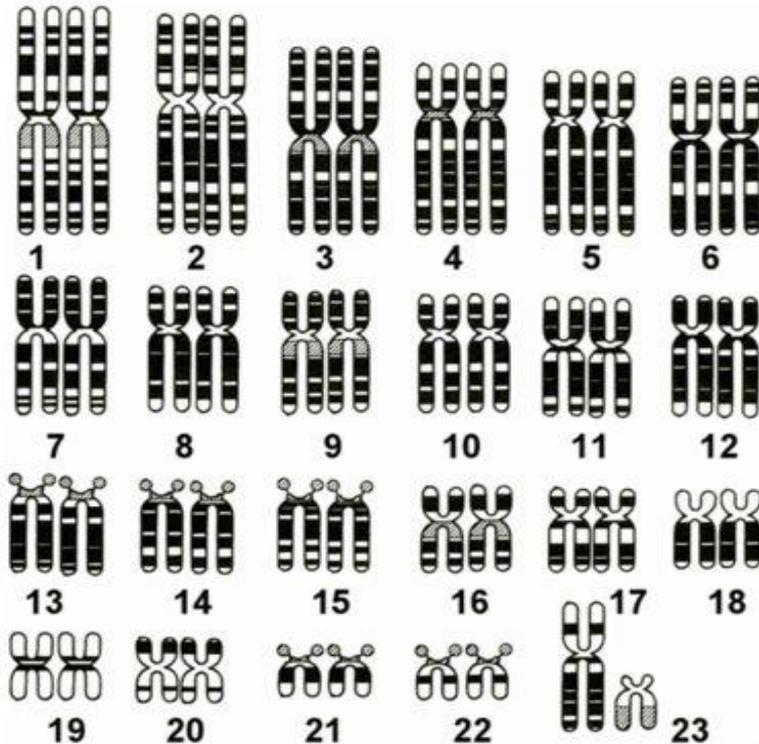
Например, можно использовать гетерозиготы по хромосомам, одна из которых будет нести группу следующих друг за другом доминантных аллелей, а гомологичная ей — группу рецессивных аллелей тех же генов **ABCDE/abcde**.

Если в хромосоме с доминантными генами произошла утрата отдельных генов, например DE, то у гетерозиготы ABC/abcde будут проявляться рецессивные признаки de.

На этом принципе основан метод перекрывающихся делеции, используемый при построении цитологических карт!!!

Цитогенетические карты хромосом составляются на основе дифференциальной окраски (темные и светлые полосы) и картирования генов в отдельных локусах хромосом.

Цитогенетический метод

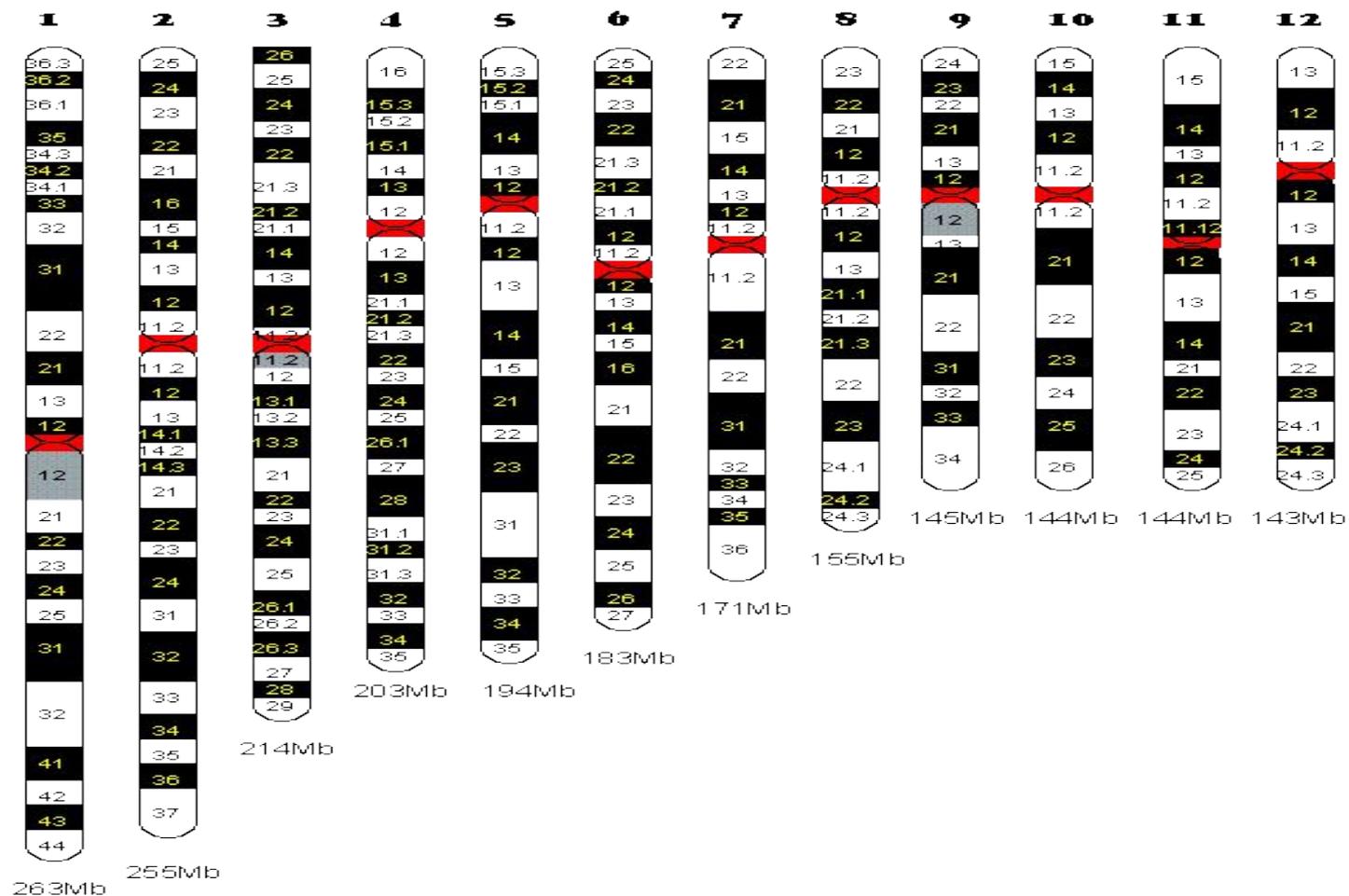


Цитогенетический метод

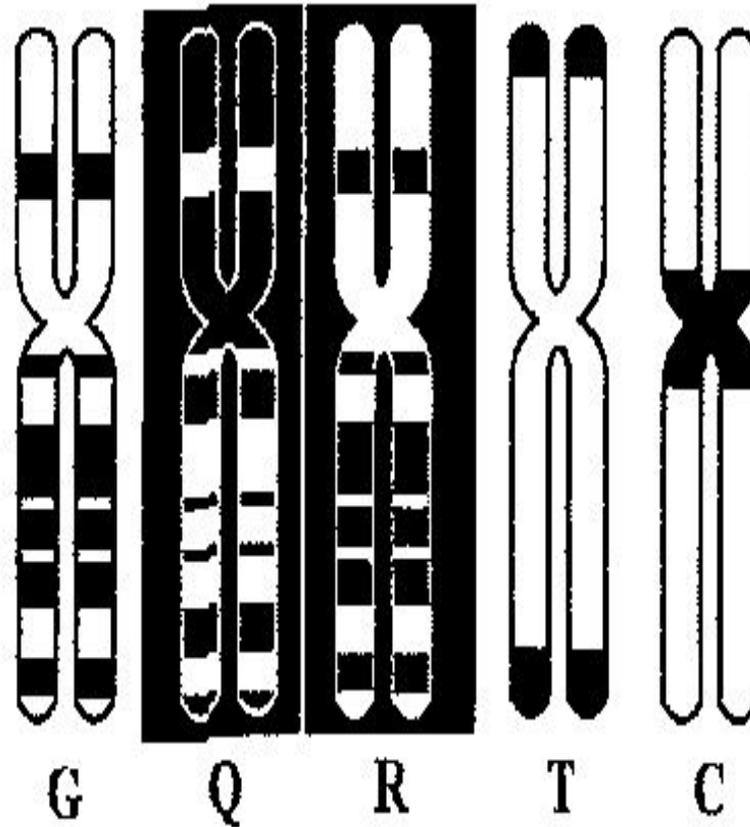
основан на изучении хромосом человека в норме и при патологии. В норме кариотип человека включает 46 хромосом — 22 пары аутомом и две половые хромосомы.

Использование данного метода позволило выявить группу болезней, связанных либо с изменением числа хромосом, либо с изменениями их структуры.

Цитогенетические карты дают информацию о расположении гена на хромосоме относительно ее участков, идентифицируемых методами дифференциального окрашивания. Благодаря такому окрашиванию хромосома в поле зрения микроскопа выглядит «поперечно исчерченной».



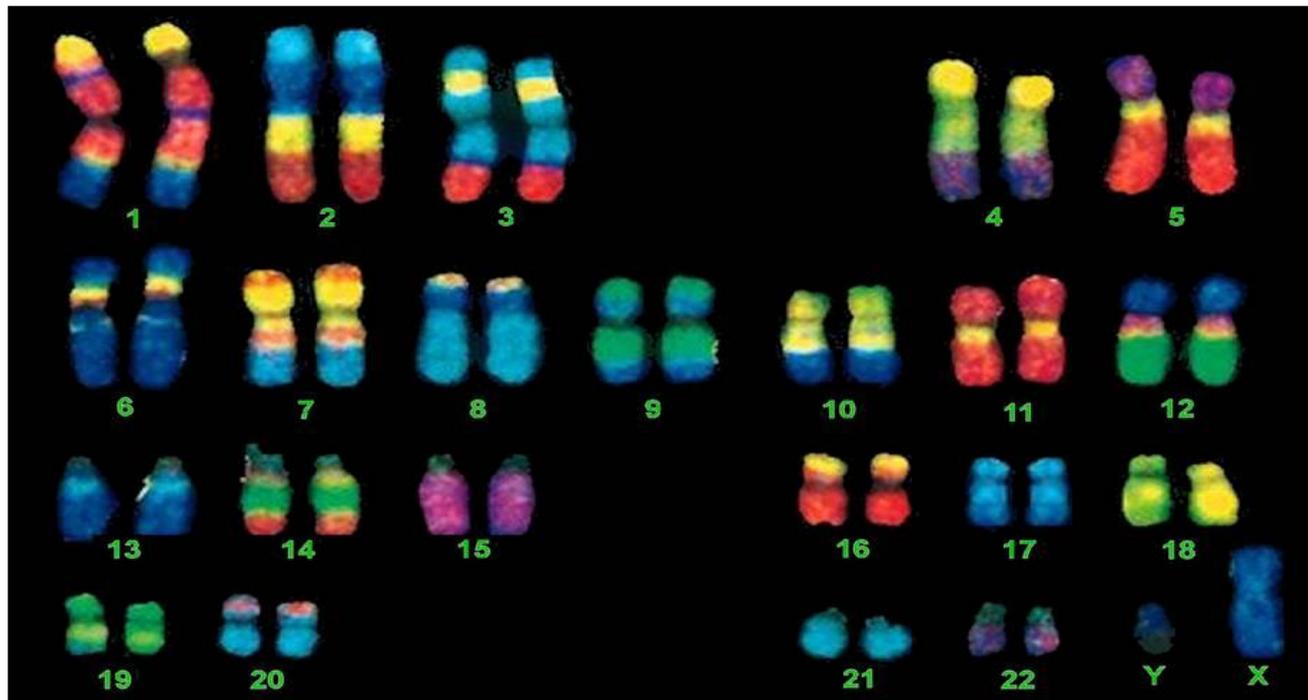
Расположение окрашенных участков (бэндов)
специфично для каждой хромосомы.



Чередование бэндов в хромосоме X, полученное разными методами
дифференциальной окраски.

Использование FISH-метода позволяет построить цитогенетические карты с разрешением 2-5 Мб, а его модификации для интерфазных хромосом - 0,1 Мб. Таким образом, локализация картированного с помощью FISH-метода гена может быть установлена с точностью до субсегмента и локуса бэнда.

FISH -метод – Fluorescent in situ hybridization дал еще больше
ВОЗМОЖНОСТЕЙ



Картирование генов с помощью хромосомных мутаций

Хромосомные мутации – это изменения в структуре хромосом

Внутрихромосомные мутации – преобразование генетического материала в пределах одной хромосомы.

Межхромосомные – перестройки, в результате которых две негомологичные хромосомы обмениваются своими участками.

Инверсии

Инверсии - хромосомные перестройки, связанные с поворотом отдельных участков хромосомы на 180° , были открыты А. Стёртевантом в 1926 г.

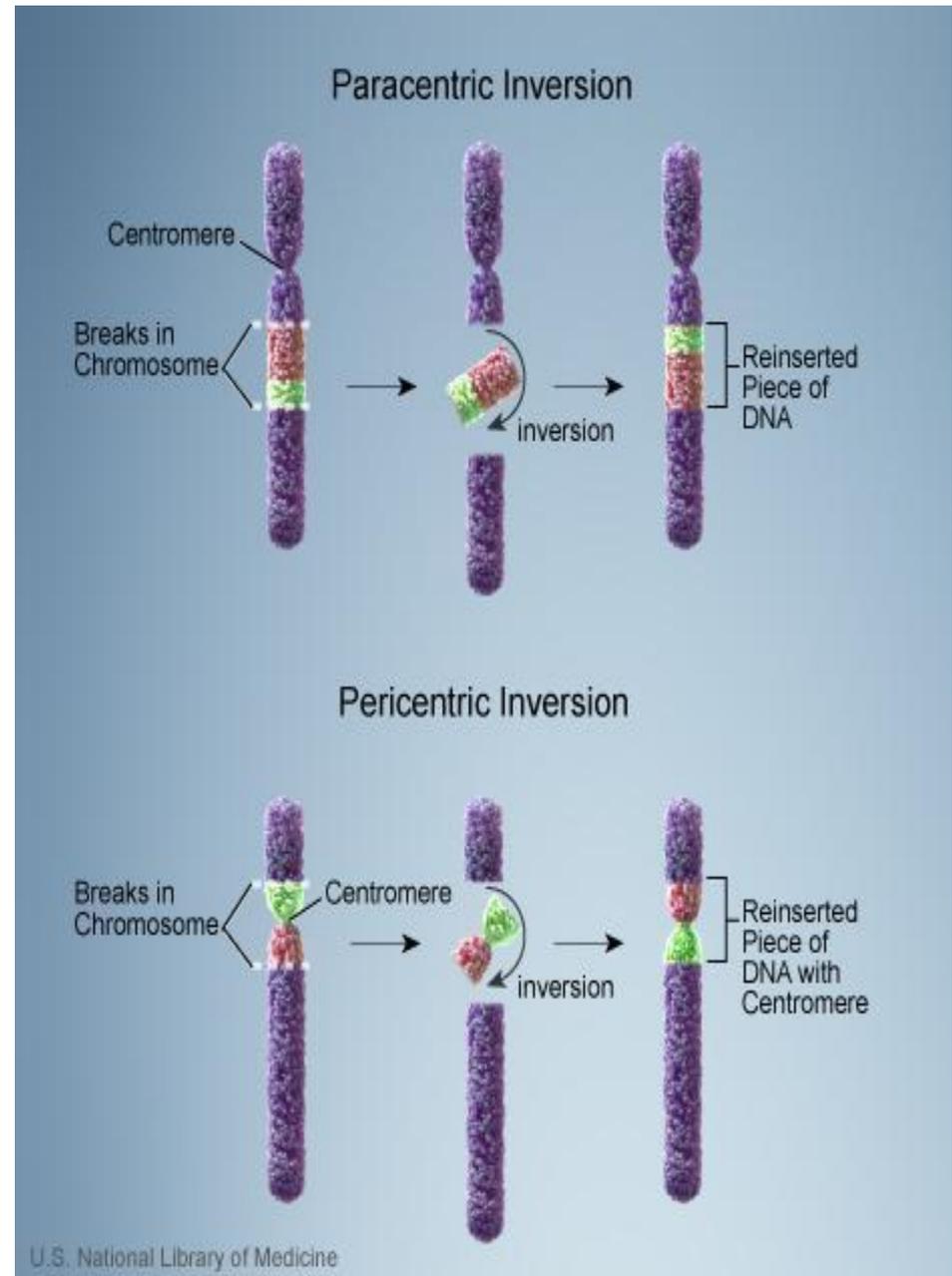


Парацентрическая инверсия

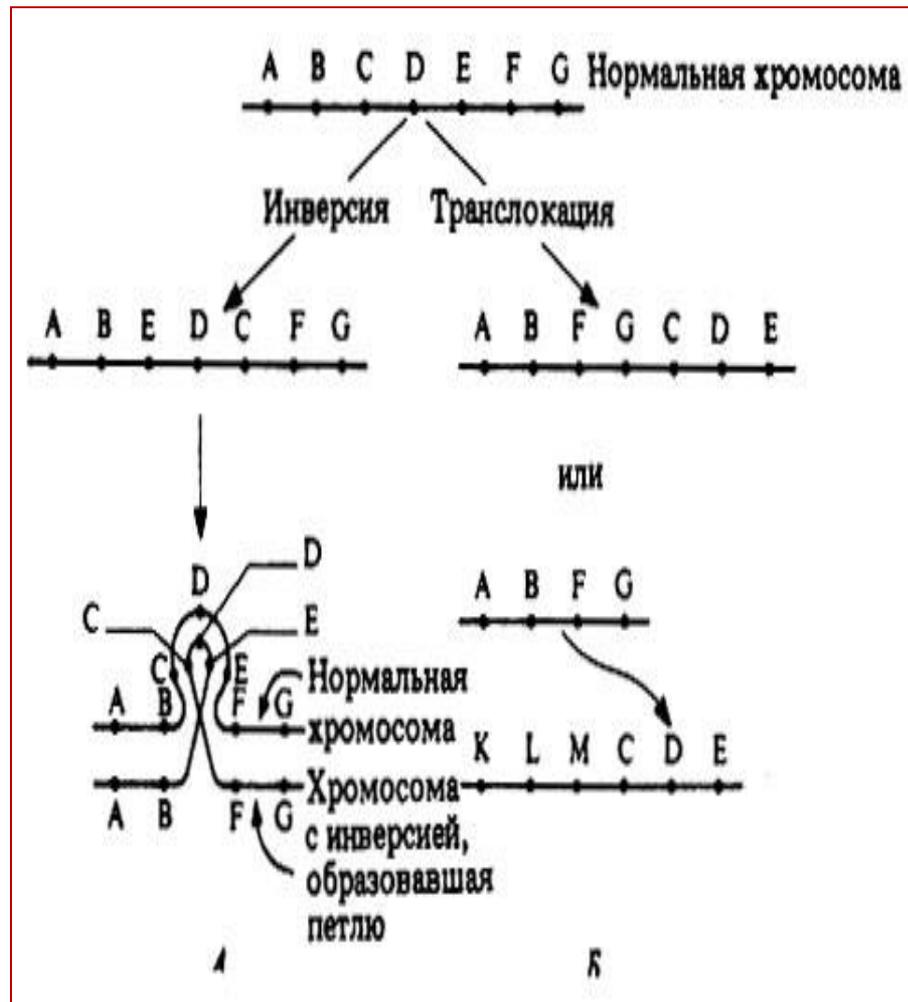
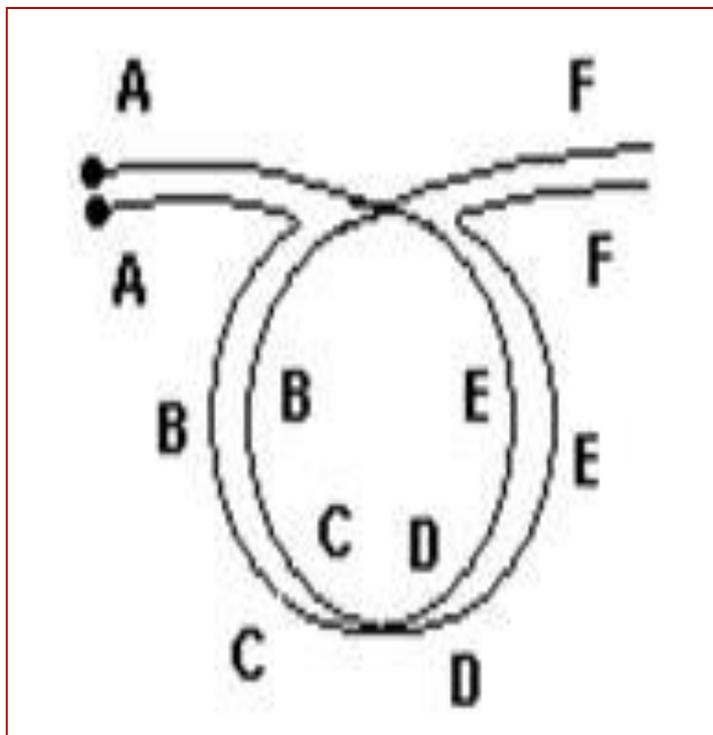
– происходят два разрыва хромосом, оба по одну сторону от центromеры.

На участке между точками разрыва происходит поворот 180.

Перицентрическая инверсия
– точки разрывов расположены по обе стороны от центromеры.



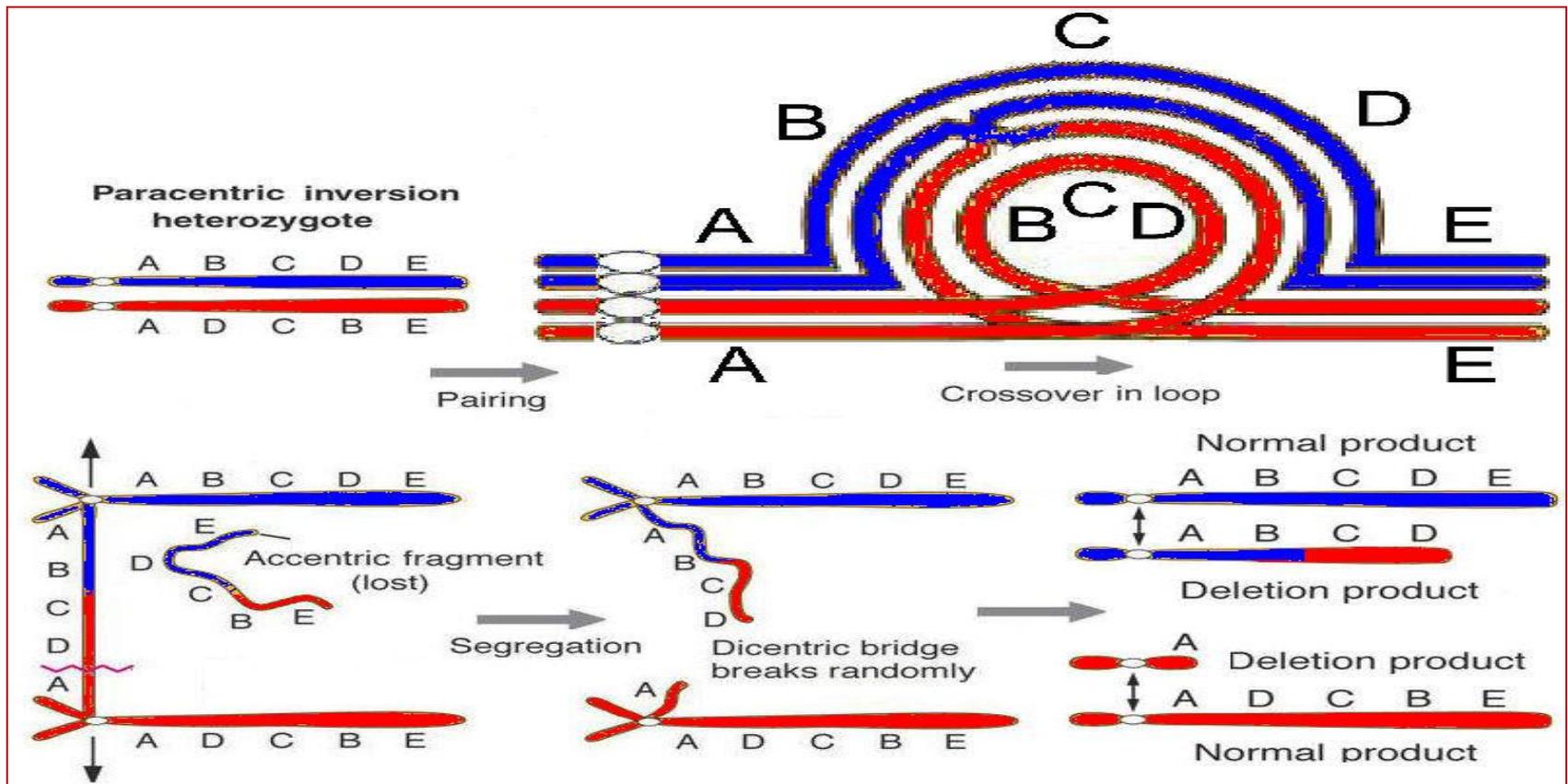
У особей, гетерозиготных по инверсии, в хромосомах образуется петля.



У гомозиготных особей по инверсиям кроссинговер происходит без изменений.

У гетерозиготных особей по парацентрической инверсии происходит **«запирание»** кроссинговера следующим образом: в случае перекреста между генами **C** и **D** образуются два продукта: **ацентрические хромосомы** и **дицентрические хромосомы**, т. е. без центромеры и с двумя центромерами соответственно.

Обе комбинации летальны.



Дицентрик образует «хромосомный мост» в анафазе 1 мейоза, который виден под микроскопом. **Обе комбинации летальны.**

Таким образом, в результате кроссинговера образуются нежизнеспособные гаметы, и потомства нет.

Анеуплоидии возникают при нарушениях расхождения хромосом

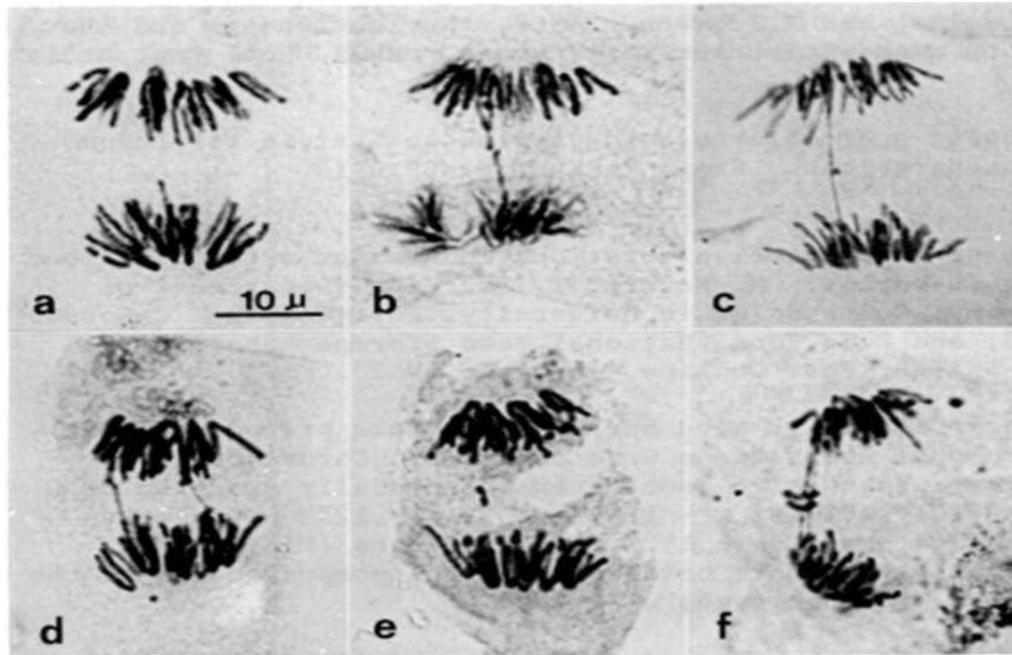


Figure 1. Chromosomal aberrations induced by artificial seed aging: a) normal; b, c) single bridge; d) double bridge; e) single fragment; f) double bridge and double fragment.

Конъюгация и кроссинговер при перичентрической инверсии



При перичентрической инверсии, в случае перекреста между генами **C** и **D**, также получаются два продукта.

Дупликация A и делеция F.

Каждая из полученных хромосом несет дупликацию одного неинвертированного района хромосом и делецию другого. В результате такие гаметы **нежизнеспособны** и кроссоверы не выявляются.

Так же как и парацентрические, перичентрические инверсии **«запирают»** кроссинговер.

Поскольку кроссинговер в инвертированном участке хромосомы «заперт», в нем могут формироваться **блоки мутаций**, отличные от тех, которые локализованы в гомологичном фрагменте хромосомы, но не инвертированном. **Это явление называют инверсионный полиморфизм популяций.**



Хромосомы с множественными инверсиями используют при создании балансеров, т. е. линий, позволяющих поддерживать летальные мутации и мутации по плодовитости. Один из примеров — линия *CLB*.

Более надежными балансерами, т. е. содержащими несколько инверсий, являются линии *Base*, *Binsn*. Конструирование балансерных хромосом по существу представляет собой первый пример генетической инженерии.

Другой пример балансеров — линия *Su* (загнутые крылья, летальность), в которой доминантная мутация сопряжена с длинной инверсией, захватывающей почти всю вторую хромосому.

В потомстве от скрещивания гетерозигот по *Su* выживают только мухи родительских классов, т. е. линия сбалансирована, и исследуемая летальность $/$, постоянно в ней поддерживается в гетерозиготном состоянии.

Использование делеций для локализации генов было названо методом делеционного картирования.

Делеции

Делеция – утрата участка хромосомы.

Делеции были открыты в 1917 г. К.

Бриджемсом генетическими методами.

В нормальной хромосоме гены расположены в определенном порядке:

tABCDEF

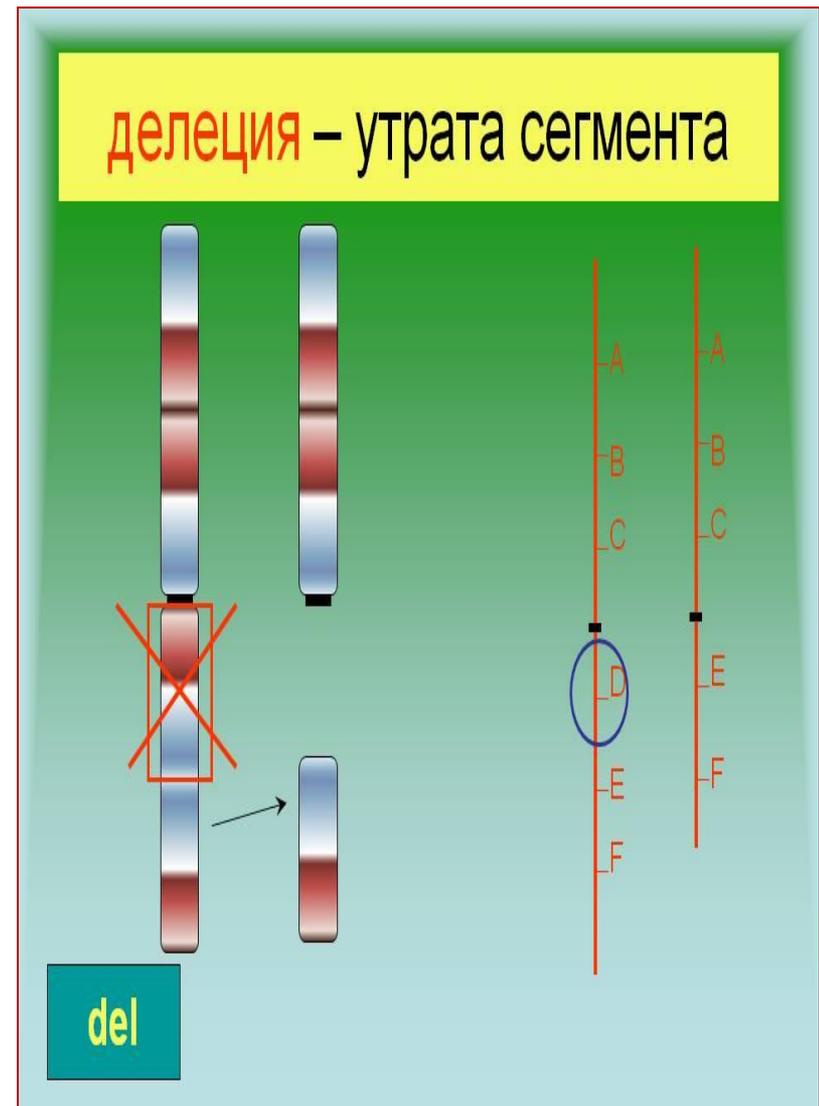
При потере фрагмента хромосомы возможны два принципиальных варианта:

ABEF

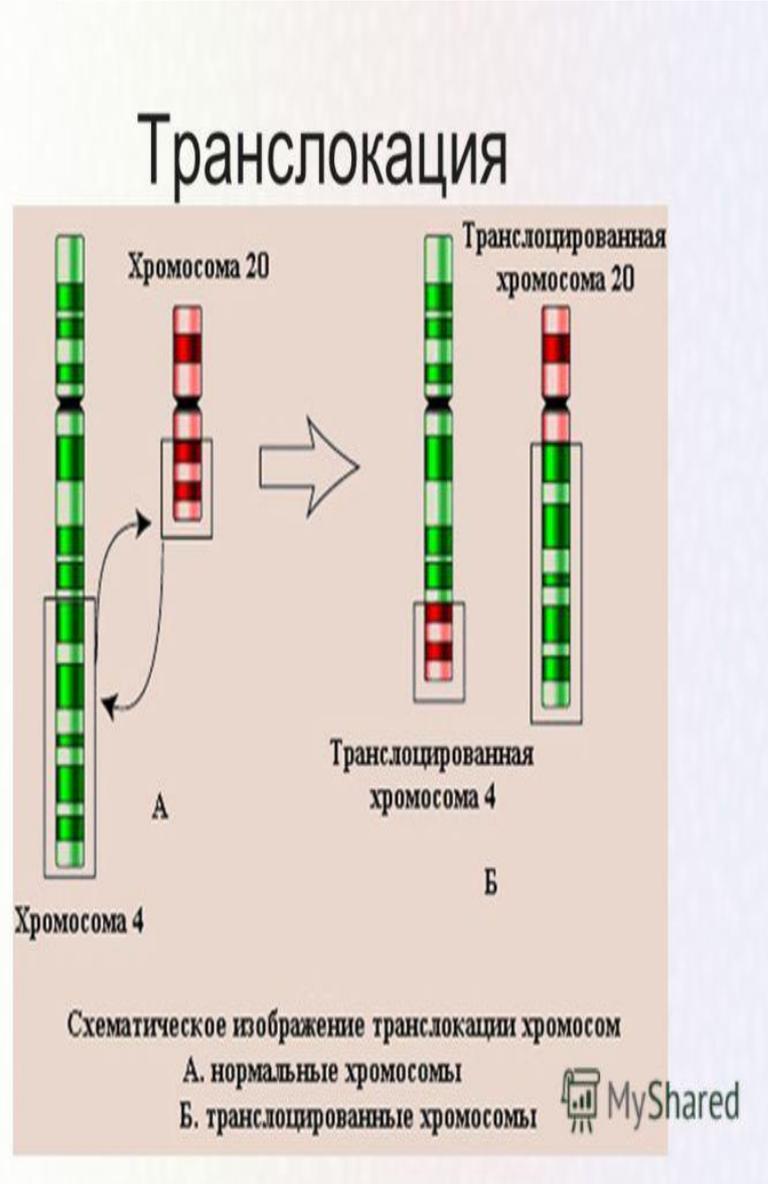
или

ABC

т. е. может быть потеряна средняя или концевая часть хромосомы.



Транслокации



Хромосомные перестройки, в результате которых часть хромосомы переносится в другое место этой же хромосомы или на другую хромосому.

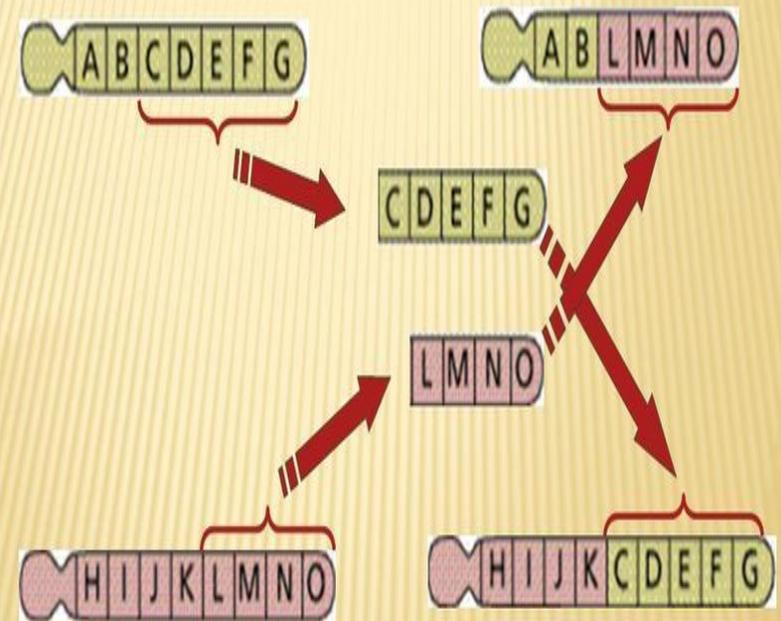
Но общее число генов не меняется!!!

Транслокации были открыты К. Бриджесом в 1923 г. у дрозофилы.

Внутрихромосомные транслокации возникают в результате образования трех разрывов и перенесения хромосомного сегмента в другой район той же хромосомы.

Межхромосомные реципрокные транслокации возникают в результате образования двух разрывов и обмена участками негомологичных хромосом.

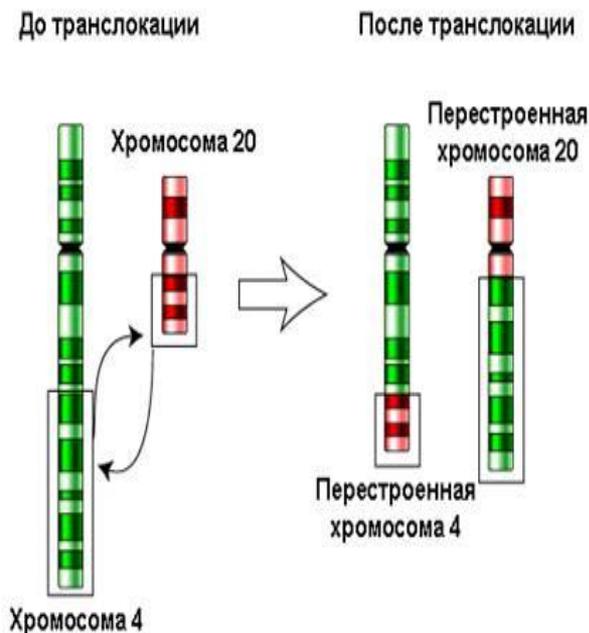
Транслокация – изменение структуры двух хромосом



Две хромосомы в результате реципрокного обмена фрагментами образуют гетерозиготную транслокацию.

Транслокация

- Взаимный обмен концевыми участками между негомологичными хромосомами.



Если образуются три разрыва и фрагмент хромосомы удаляется из одной хромосомы и встраивается в другую — это **инсерционная транслокация**.

Самым ярким примером, когда с помощью транслокации был картирован ген, является **миопатия Дюшенна**. Ген миопатии Дюшенна локализован в **X хромосоме** и обычно проявляется тяжелой миопатией у мальчиков.

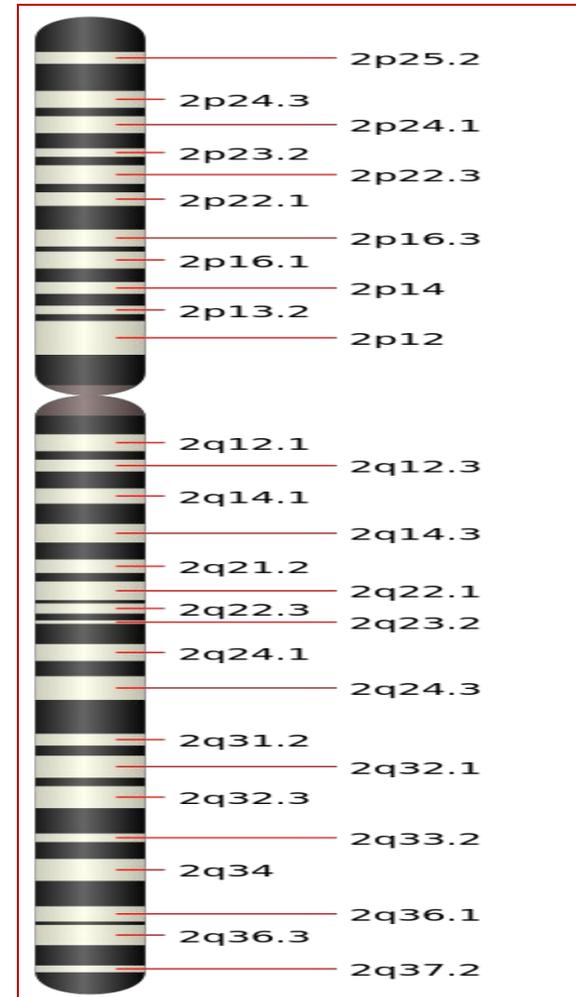
Однако обнаружили несколько случаев типичной клинической картины миопатии у женщин. Они оказались связанными с транслокациями между хромосомой X и аутосомами, причем в хромосоме X разрыв всегда локализовался в районе Xp21.



Картирование гена иногда может быть достигнуто за счет использования эффекта дозы гена.

В случае делеции следует ожидать уменьшение на 50 % продукта гена (это прежде всего может быть фермент).

Именно таким способом был картирован ген кислой фосфатазы эритроцитов в хромосоме 2.



При дупликации, наоборот, можно ожидать увеличение на 50 % активности ферментов, гены которых вовлечены в дупликацию.

Самым известным примером картирования гена с помощью дупликации является супероксиддисмутаза, которая была картирована на хромосоме 21, так как ее уровень был постоянно повышен у больных с болезнью Дауна.

Исследованы гены

APP: предшественник протеина бета-амилоида (A4) (пептидаза нексин-II, болезнь Альцгеймера)

CBS: цистатионин бета-синтаза

CLDN14: Клаудина 14

HLCS: голокарбоксилаза синтетазы (биотин-проприонил-кофактор А-карбоксилаза (АТФ-гидролитических) лигаза)

KCNE1: потенциал управляемый калиевый канал, член 1, семья Isk-связанных (англ. *Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1*)

KCNE2: потенциал управляемый Калиевый канал, член 2, семья Isk-связанных (англ. *Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2*)

LAD: дефицит адгезии лейкоцитов (возможно также обозначения ITGB2, CD18, LCAMB)

SOD1: супероксиддисмутаза 1,

растворимый (амиотрофический боковой склероз 1 (у взрослых))

TMPRSS3: трансмембранным протеазы, серин 3

PCNT: центросомный перичентрин

DSCR1: критическая участок 1 синдромом Дауна

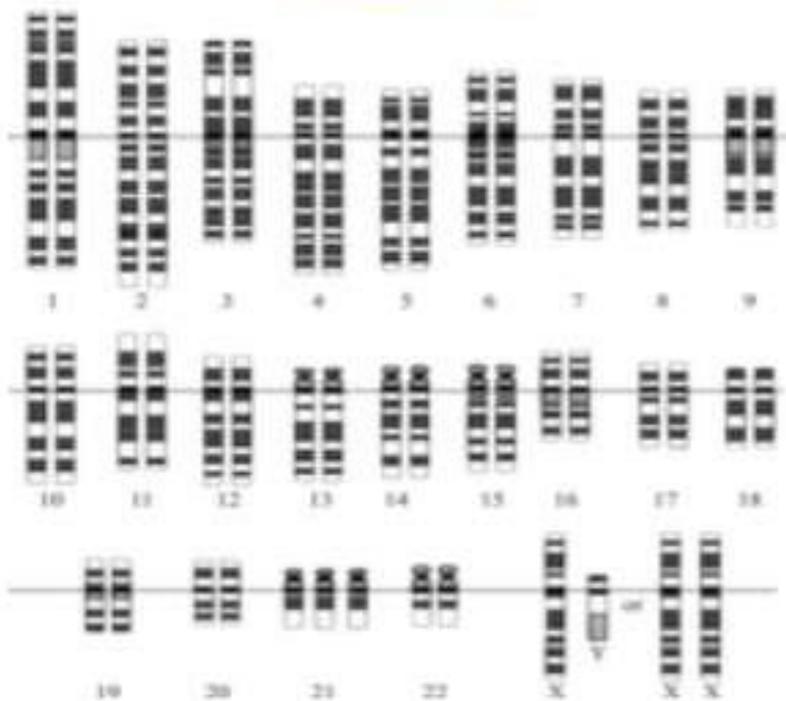
DYRK1A: киназа 1A, регулирующего тирозин- (Y) - фосфорилизацию с двойной специфичностью

RRP1B: Рибосомальные процессинг РНК 1 гомолог В

S100B: кальций-связывающий белок из семейства S100

СИНДРОМ ДАУНА

Трисомия
по 21-ой
хромосоме

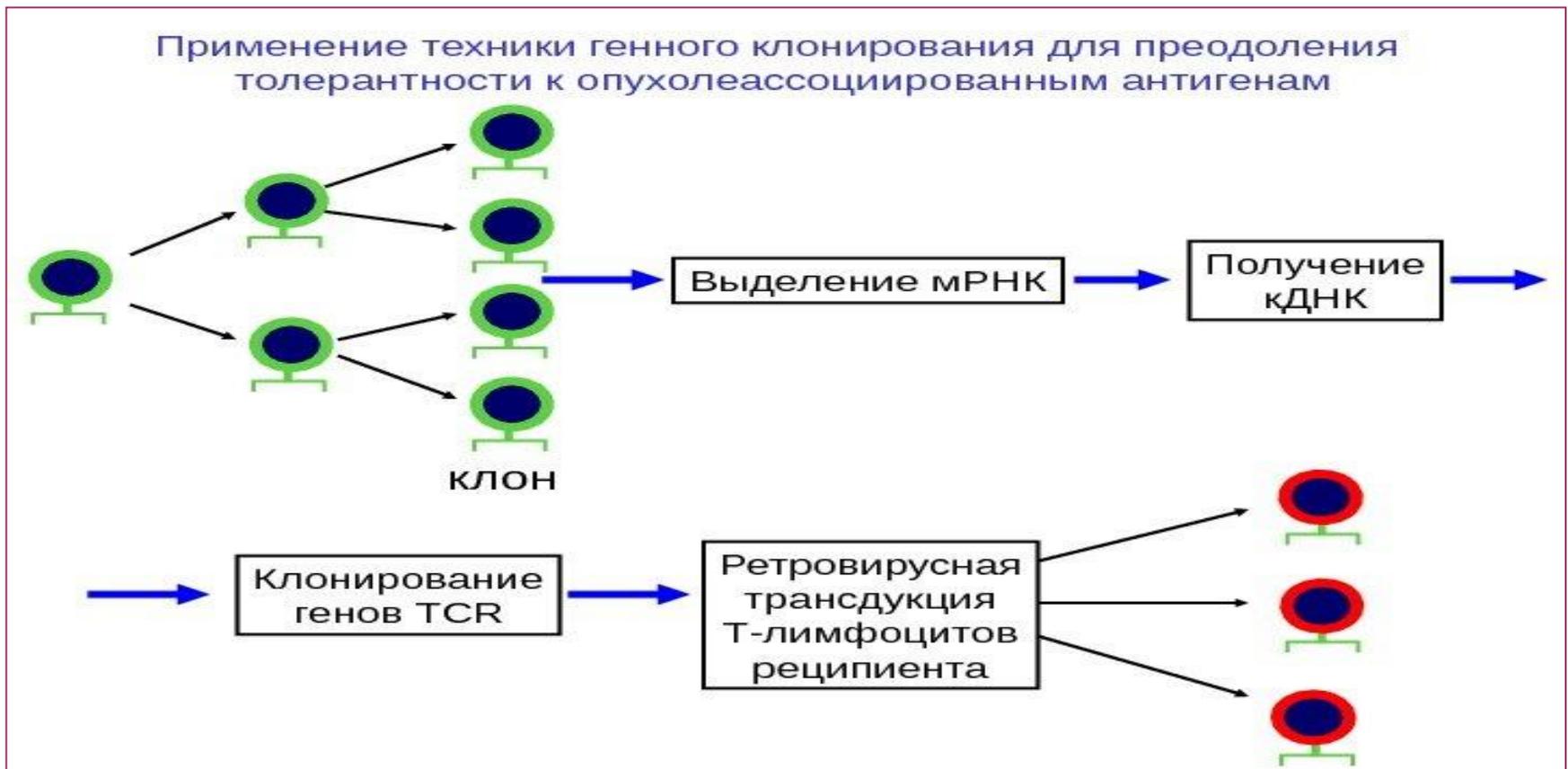


Картирование генов с помощью гибридизации *in situ*

Гибридизация *in situ* представляет собой молекулярный метод, при котором специфический меченый зонд может гибридизоваться прямо на цитологическом препарате, выявляя:

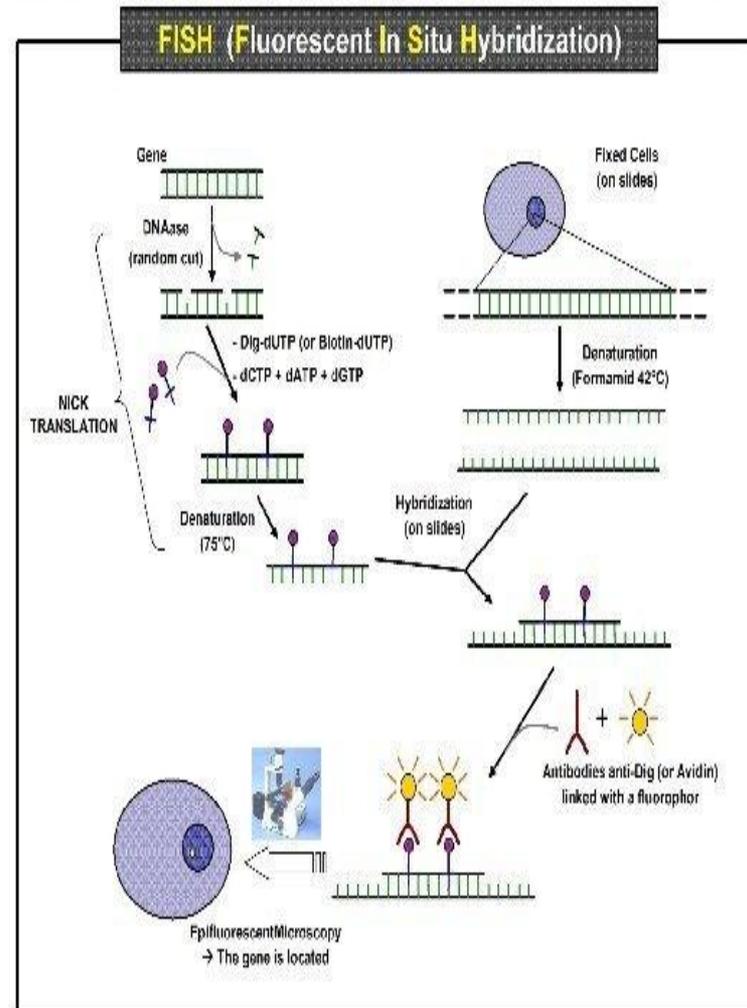
- определенный тип мРНК в какой-то клетке или ткани;
- ген на хромосоме или фрагменты хромосомы;
- изменение количества мРНК (а значит и активности гена) в зависимости от периода онтогенеза или типа ткани.
- наличие в клетке вирусной ДНК;
- субмикроскопические делеции;
- наличие генов, отвечающих за развитие рака, их локализацию и уровень их экспрессии.

1 этап выделение мРНК из какого-либо органа или ткани для характеристики функциональной дифференциальной активности генов в соответствующем органе. На основе этих мРНК с помощью обратной транскриптазы получают кДНК.



Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH)

Принцип *in situ* гибридизации крайне прост: денатурированная меченая нуклеиновая кислота наносится на цитологический препарат, прошедший необходимую предобработку, создаются условия для формирования дуплекса меченой ДНК и ДНК цитологического препарата, несвязанная меченая ДНК отмывается, а затем проводится детекция гибридизованного ДНК-зонда.



Такие кДНК представляют собой экзоны тех генов, которые проявляют активность в исследуемом органе. Эти кДНК можно использовать как основу для создания ДНК-зондов.

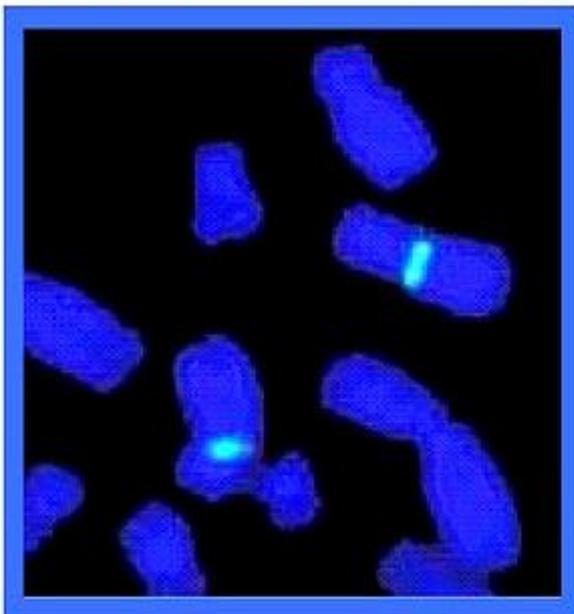
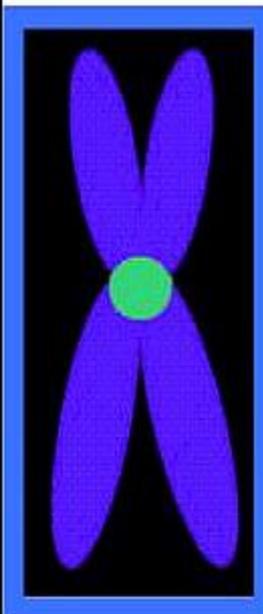
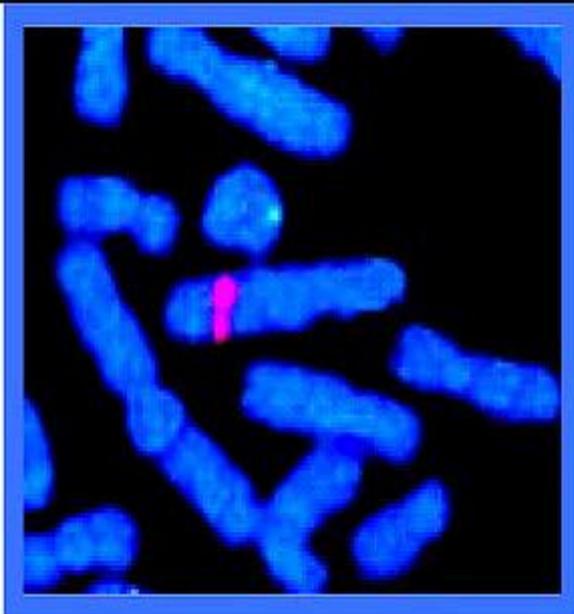
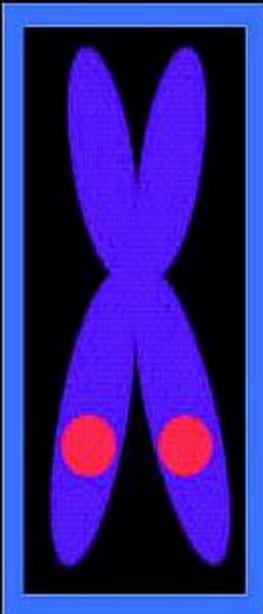
Их можно метить флюоресцентными красителями, применять для флюоресцентной гибридизации с препаратами прометафазных хромосом, которые обработаны соответствующим образом для того, чтобы добиться денатурации нитей ДНК (FISH-анализ).

В этом случае ДНК-зонд гибридизуется с комплементарной последовательностью на хромосомах, и по флюоресцентному свечению выявляется и локализуется ген, с которого транскрибировалась мРНК, послужившая исходным звеном всего анализа.

Метод FISH-диагностики

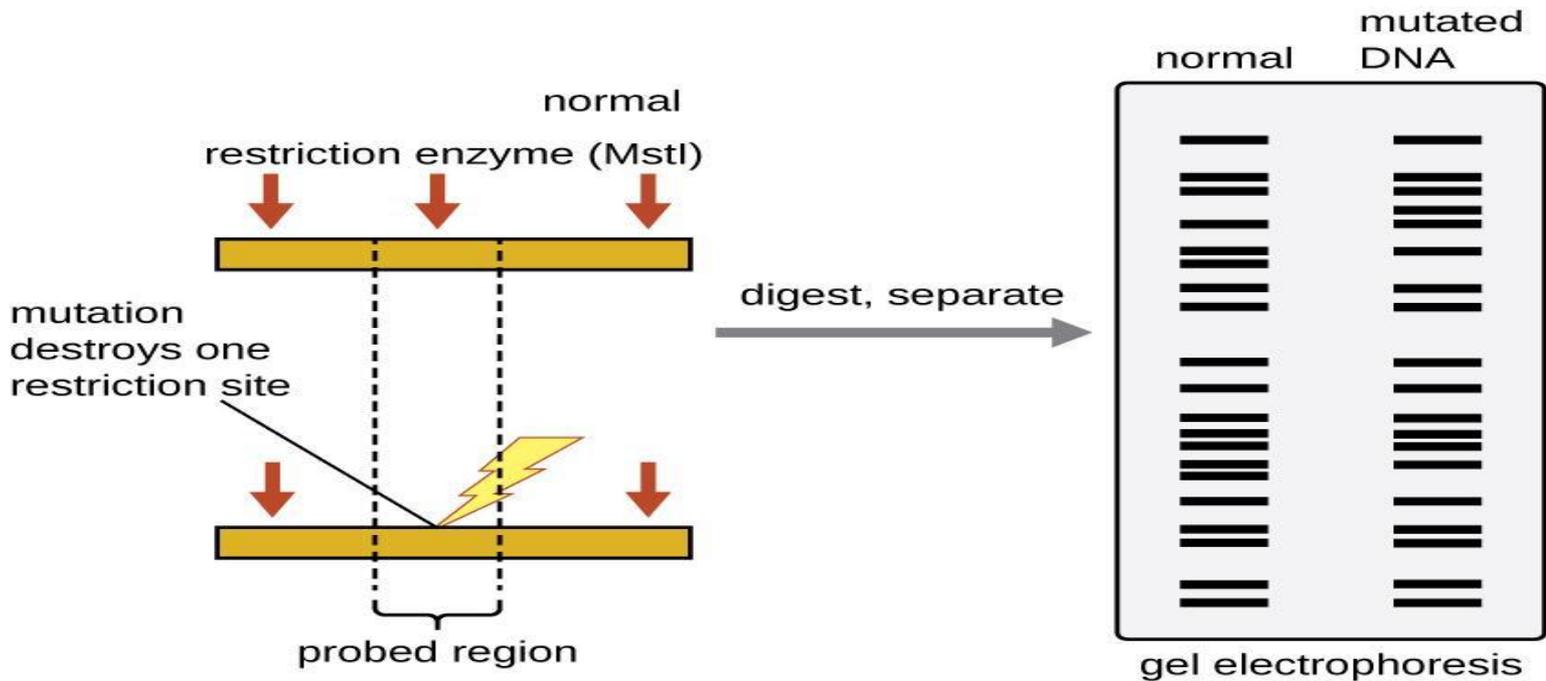
FISH анализ осуществляется в несколько этапов:

- получение препаратов и их пред подготовка;
- мечение ДНК-пробы;
- -гибридизация с ДНК-пробой, то есть собственно технология FISH:
 - денатурация препаратов;
 - денатурация ДНК-проб;
 - процедура гибридизации;
 - окраска препаратов;
- детекция ДНК-зонда при микроскопическом анализе



Рестрикционный анализ.

Сущность метода заключается в обработке ДНК рестрикционными ферментами (специфическими эндонуклеазами), разрезающими молекулу ДНК по определенным последовательностям нуклеотидов. После этого анализируют полученные фрагменты, специфические для каждого вида или варианта микроорганизма.

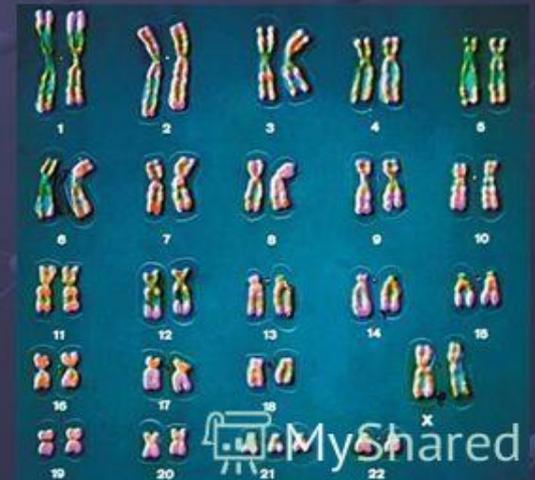


РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

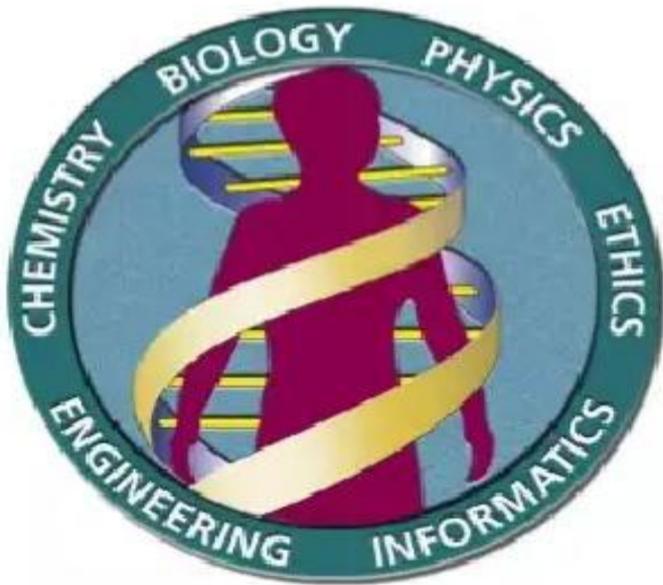
- Рестрикционный анализ-метод анализа двухцепочечных молекул ДНК, образованных после обработки ферментами - рестриктазами.
- *Этапы:*
- **Выделение ДНК;**
- **Рестрикция ДНК;**
- **Электрофорез.**

Проект «Геном человека»

В 1990 году в США был начат проект "Геном человека", целью которого было определить весь генетический код человека. Проект, в котором важную роль сыграли и российские генетики, был завершён в 2003 году. В результате проекта 99% генома было определено с точностью 99,99%.



Проект «Геном человека» 1990-2003



Джеймс Уотсон и Крейг Вентер – первые люди с индивидуальными прочитанными геномами

Спасибо за внимание!