

Vazba genů



František Liška
frantisek.liska@lf1.cuni.cz



[přednáška je dostupná na el.lf1.cuni.cz/vazba](http://el.lf1.cuni.cz/vazba)

Nezávislá segregace „vloh“ podle Mendela

P: *AABB* x *aabb*
F1: *AaBb*

F2: Fenotyp (genotypy)	POČET F2 HYBRIDŮ	
	Pozorováno:	Očekáváno (štěpný poměr 9:3:3.1):
kulatý, žlutý (<i>A-B-</i>)	315	313
svraštělý, žlutý (<i>aaB-</i>)	101	104
kulatý, zelený (<i>A-bb</i>)	108	104
svraštělý, zelený (<i>aabb</i>)	<u>32</u>	<u>35</u>
	556	556

$$\chi^2 = 0,51$$
$$p = 0,92$$

Výsledek souhlasí s modelem nezávislé segregace

Mendel, JG: Versuche über Pflanzen-Hybriden, Verhandlungen des naturforschenden Vereines, Bd. 4 (Brno), 1866, cit. podle anglického překladu:
<http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/gm-65.pdf>

obrázek: Enc. Britannica

Pisum sativum



Pokus s hrachorem (*Lathyrus odoratus*)

P: *PPLL* x *ppll*
F1: *PpLl*

F2: Fenotyp (genotypy)	POČET F2 HYBRIDŮ	
	Pozorováno:	Očekáváno (štěpný poměr 9:3:3.1):
purpurový, dlouhý (<i>P-L-</i>)	4831	3911
purpurový, kulatý (<i>P-ll</i>)	390	1303
červený, dlouhý (<i>ppL-</i>)	393	1303
červený, kulatý (<i>ppll</i>)	<u>1338</u>	<u>435</u>
	6952	6952

$$\chi^2 = 3366$$
$$p \approx 0$$

pravděpodobnost, že se tento výsledek dá získat za platnosti Mendelova pravidla nezávislé segregace je velice nízká. Rodičovské kombinace jsou častěji děděny spolu

Bateson & Punnett, cit. podle Griffiths et al.: An introduction to genetic analysis, Freeman &co., 2000

obrázek: Gardenstuff 



Pokus s octomilkou (*Drosophila melanogaster*)

P: $pr^{+}/pr^{+} \quad vg^{+}/vg^{+} \times pr/pr \quad vg/vg$
F1: $pr^{+}/pr \quad vg^{+}/vg$

Fenotyp (genotypy)	POČET BC HYBRIDŮ	
	Pozorováno:	Očekáváno (štěpný poměr 1:1:1.1):
červené, normální křídla ($pr^{+}/pr \quad vg^{+}/vg$)	1339	710
nachové, vestigial ($pr/pr \quad vg/vg$)	1195	709
červené, vestigial ($pr^{+}/pr \quad vg/vg$)	151	710
nachové, normální křídla ($pr/pr \quad vg^{+}/vg$)	<u>154</u>	<u>710</u>
	2839	2839

$$\chi^2 = 1766$$
$$p \approx 0$$

na zpětném křížení je ještě lépe vidět, že dominantní alely, které byly spolu v P, stejně jako recesivní alely obou genů, se dědí výrazně častěji společně.



Morgan, Sturtevant, Muller, Bridges: The mechanism of Mendelian heredity. H. Holt and Company, 1926

obrázek: Thomas Horn and Michael Boutros,

<http://b110-wiki.dkfz.de/signaling/wiki/display/nextnai/NEXT-RNAi>

Záleží na charakteru alel nebo na genotypu rodiče?

P: $pr+/pr+ \quad vg/vg \times pr/pr \quad vg+/vg+$
F1: $pr+/pr \quad vg+/vg$

Fenotyp (genotypy)	POČET BC HYBRIDŮ	
	Pozorováno:	Očekáváno (štěpný poměr 1:1:1.1):
červené, normální křídla ($pr+/pr \quad vg+/vg$)	157	584
nachové, vestigial ($pr/pr \quad vg/vg$)	146	583
červené, vestigial ($pr+/pr \quad vg/vg$)	965	584
nachové, normální křídla ($pr/pr \quad vg+/vg$)	<u>1067</u>	<u>584</u>
	2335	2335

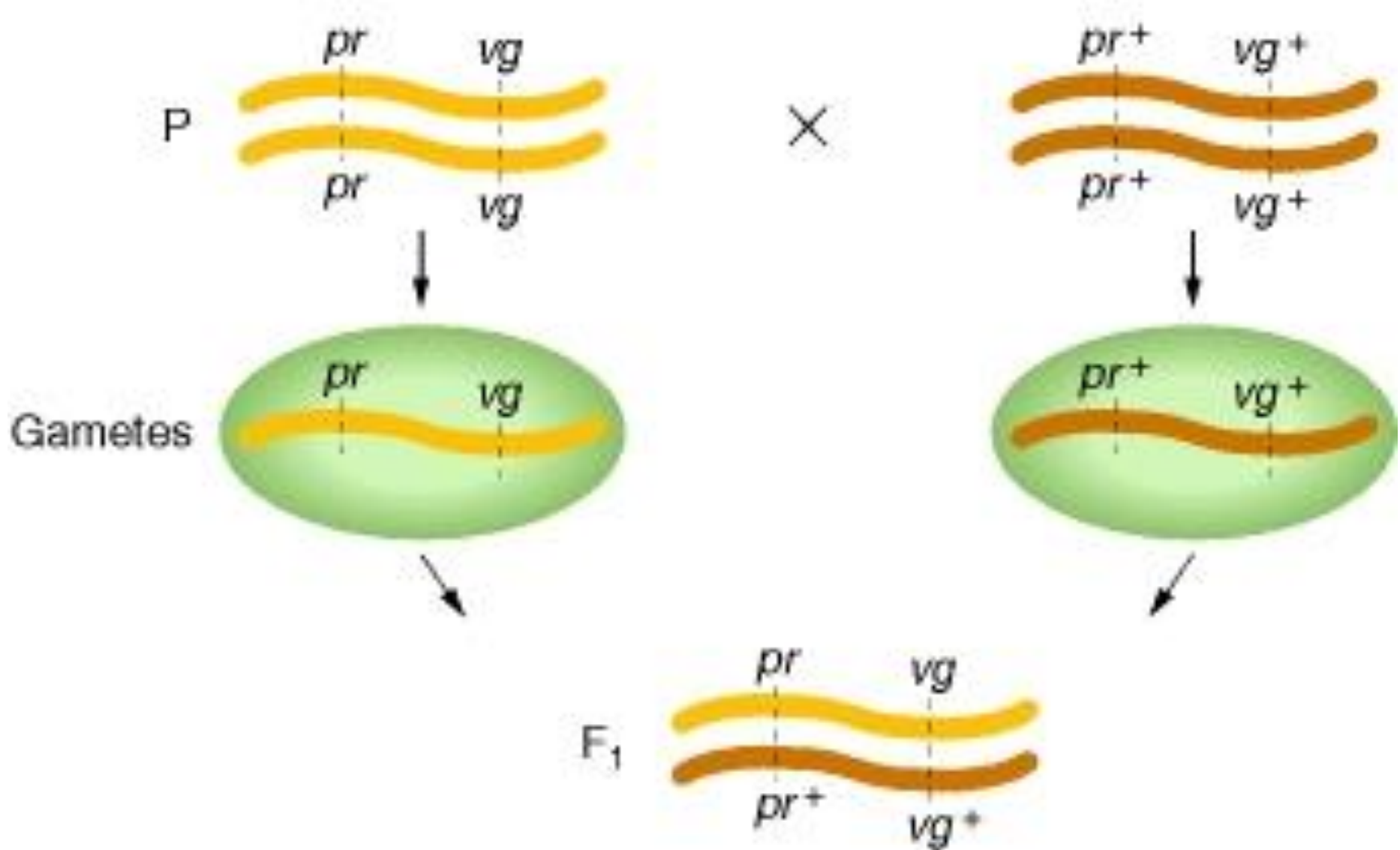
$$\chi^2 = 1287$$
$$p = 6,5 \cdot 10^{-279}$$

B je správně - očividně spolu „drží“ alely podle toho, jaké kombinace byly „spolu“ u rodičů.

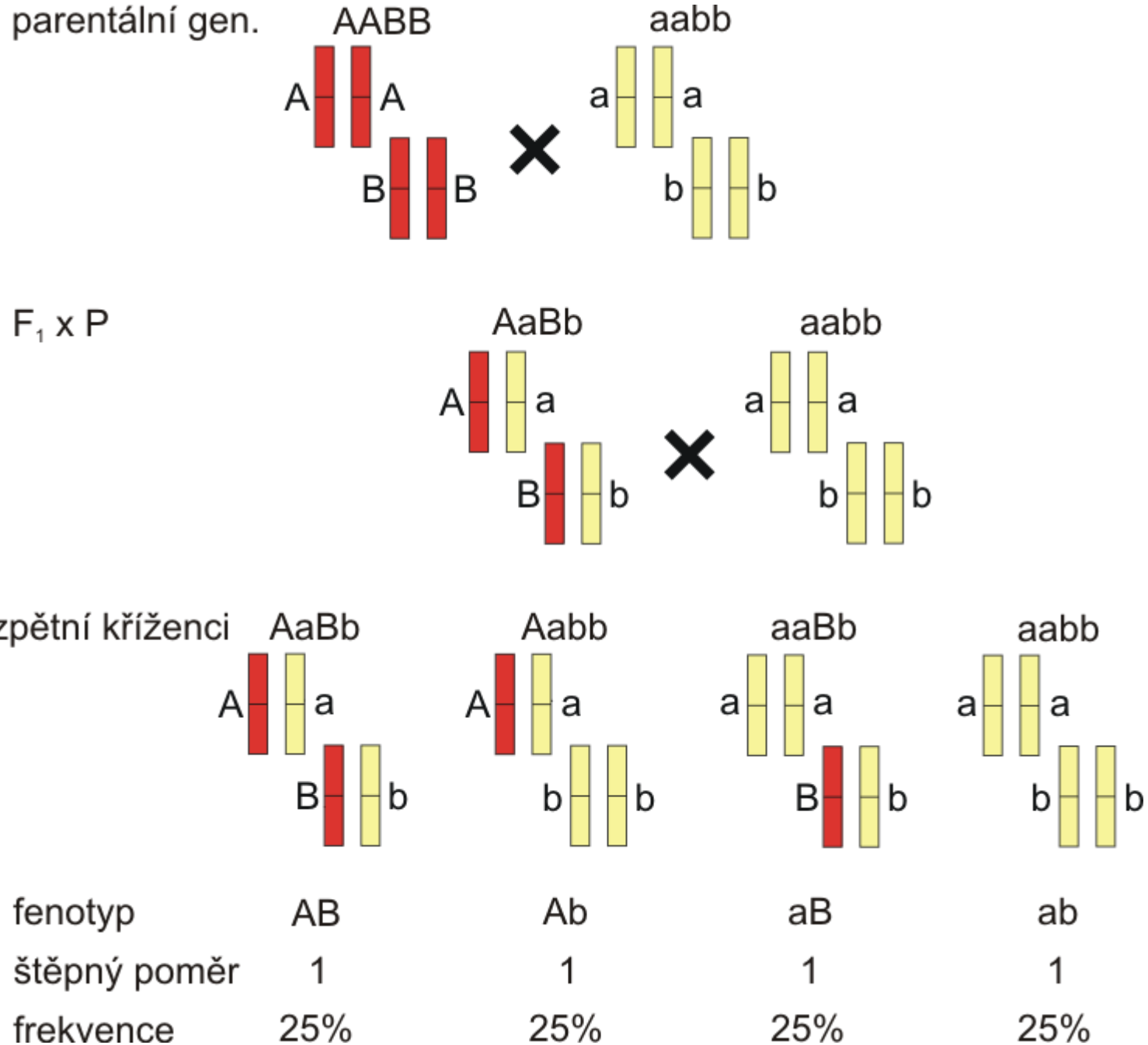


Morgan, Sturtevant, Muller, Bridges: The mechanism of Mendelian heredity. H. Holt and Company, 1926
obrázek: Thomas Horn and Michael Boutros,
<http://b110-wiki.dkfz.de/signaling/wiki/display/nextnai/NEXT-RNAi>

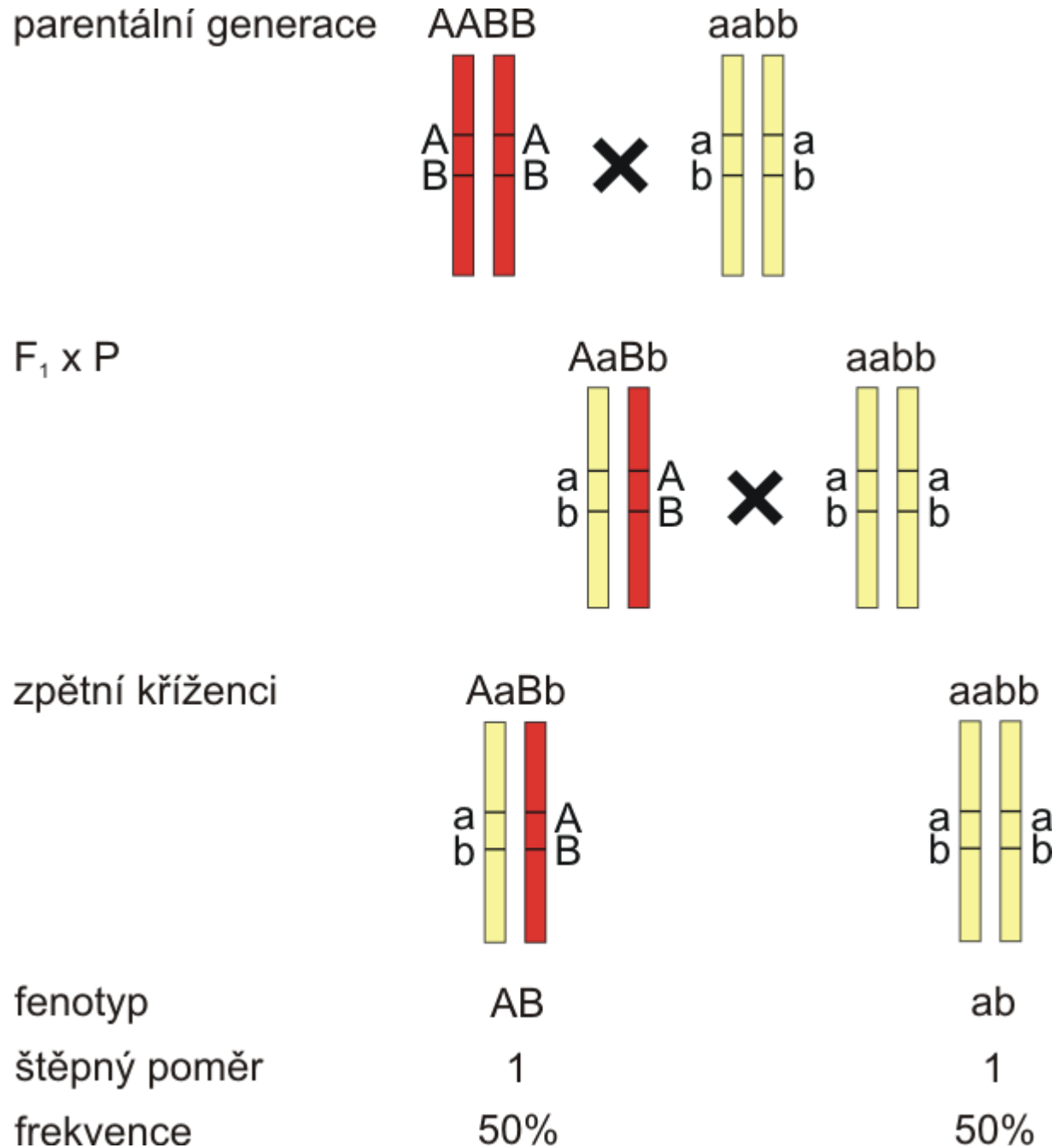
Vysvětlením je výskyt obou genů na stejném chromozomu



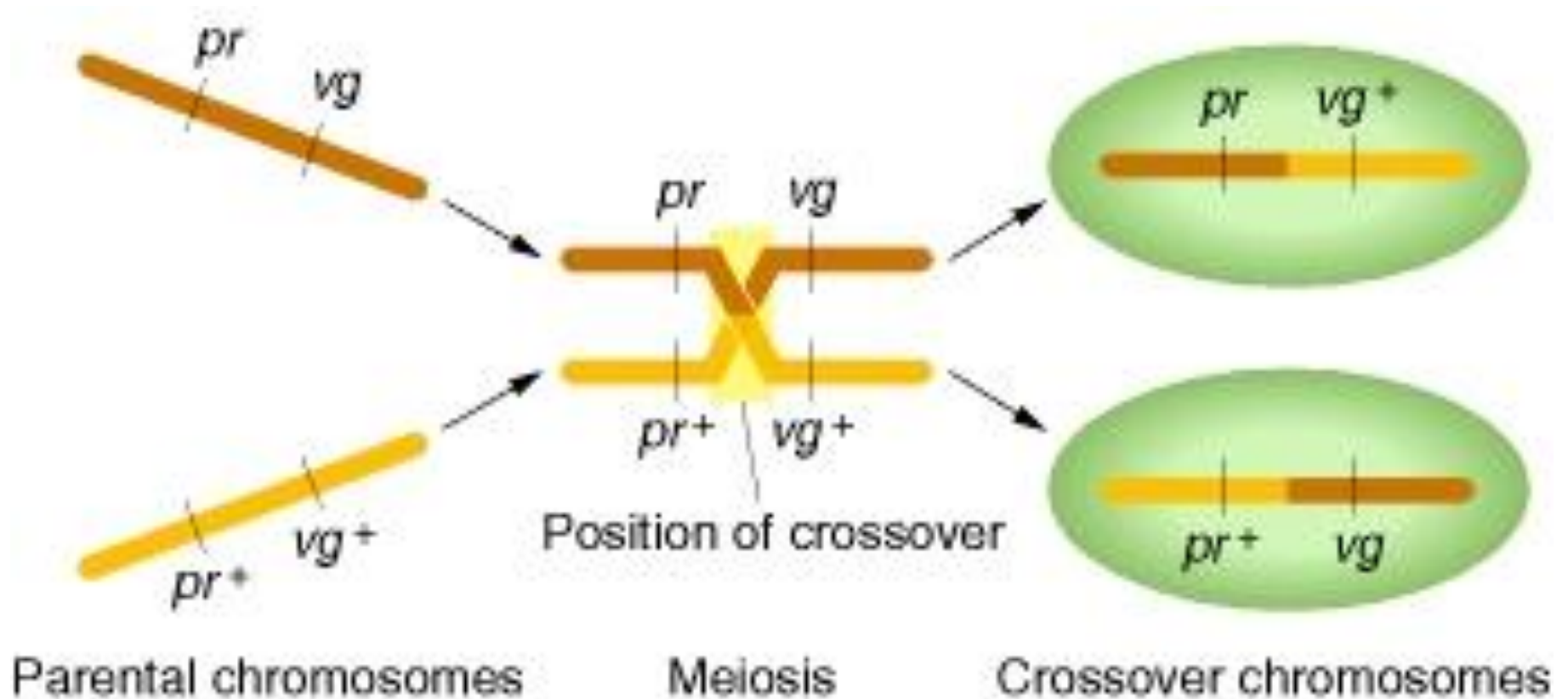
Z „chromozomálního“ hlediska vypadá segregace genů u backcrossu takto:



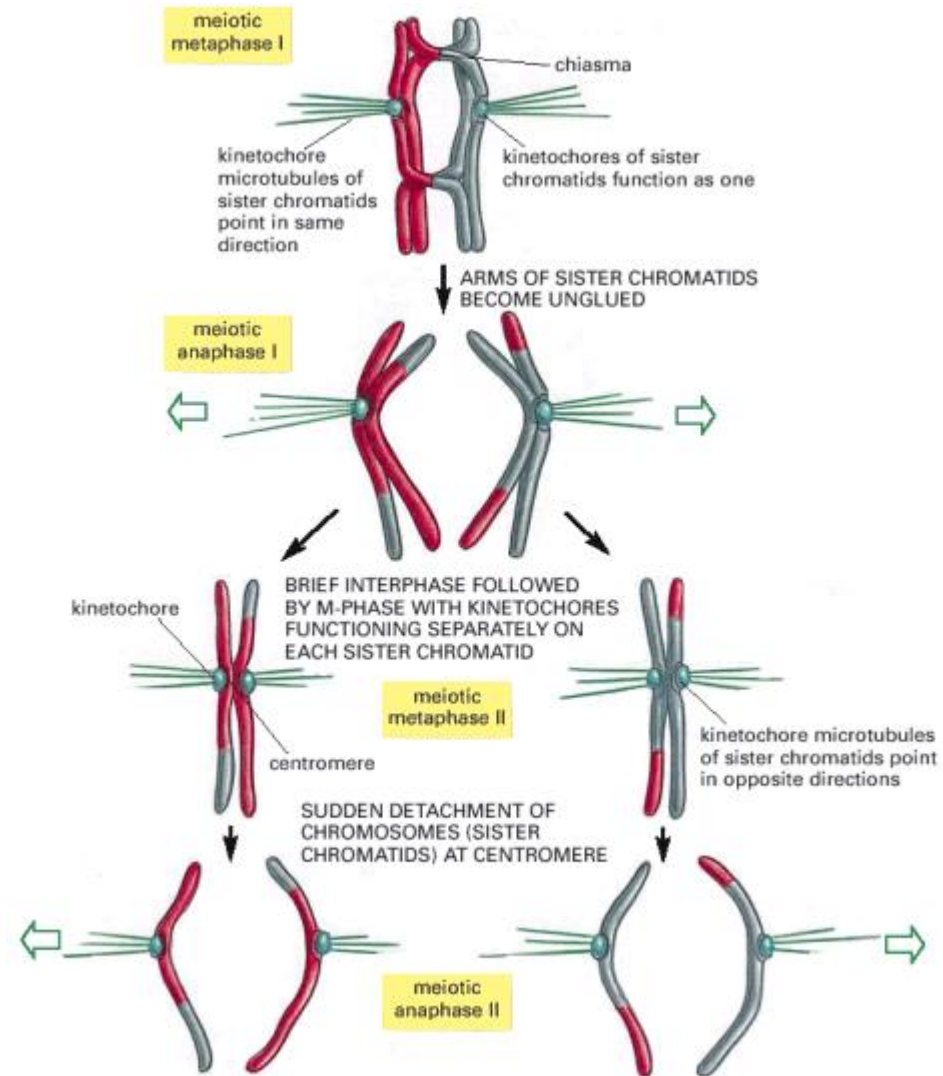
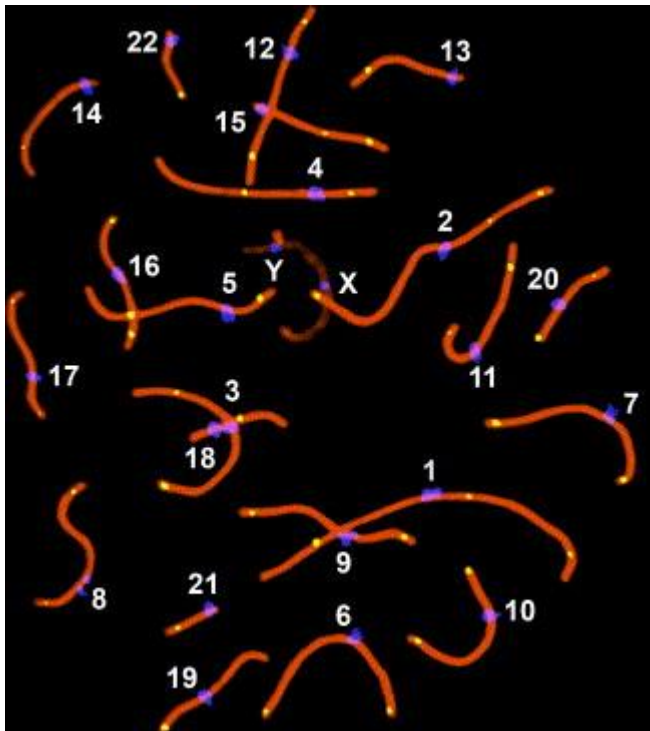
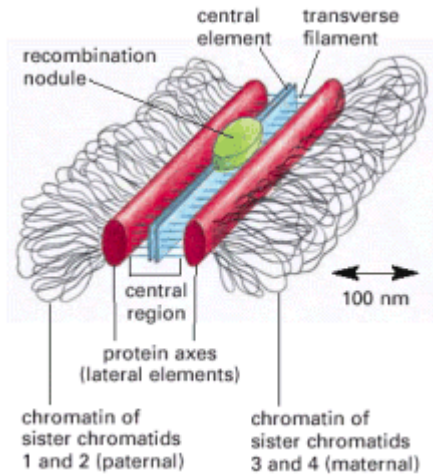
Z „chromozomálního“ hlediska vypadá segregace genů při *vazbě úplné* takto:



Je nutno započítat možnost crossing-overu:



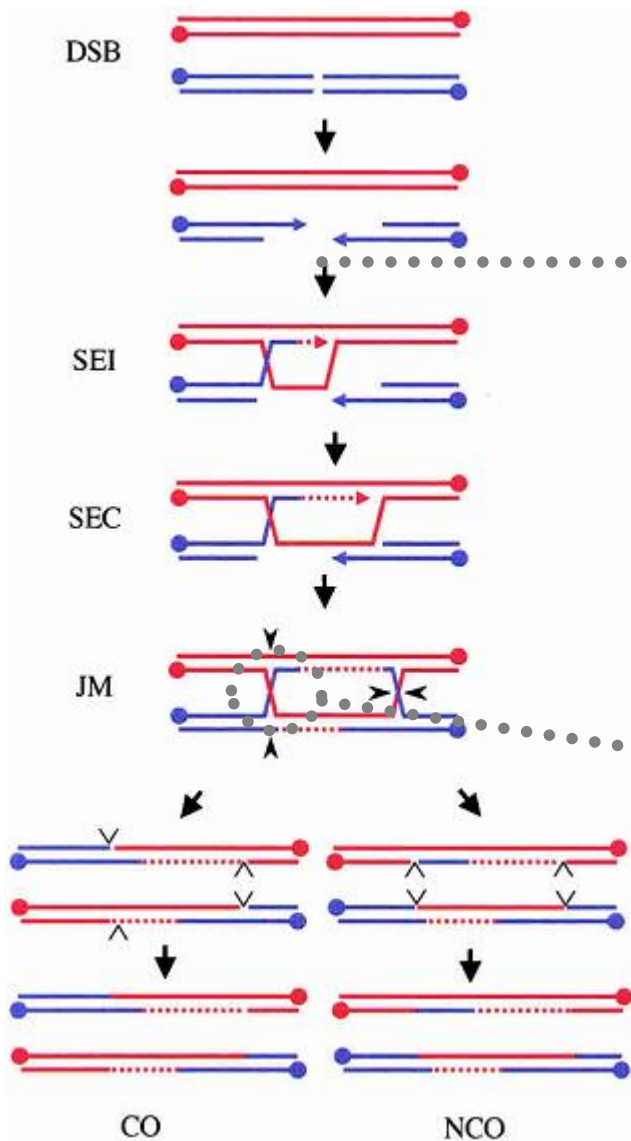
Crossing over - cytogenetika



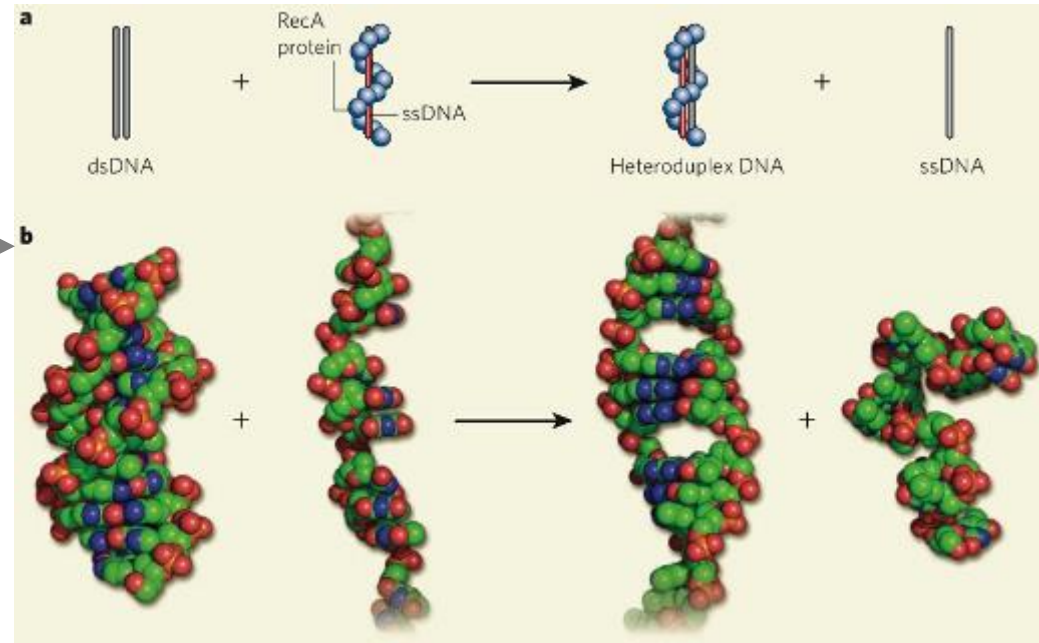
Martin, R.H. 2006. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reproductive Toxicology* 22: 142-147.

Alberts et al.: Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing
 © 2002 by Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter.

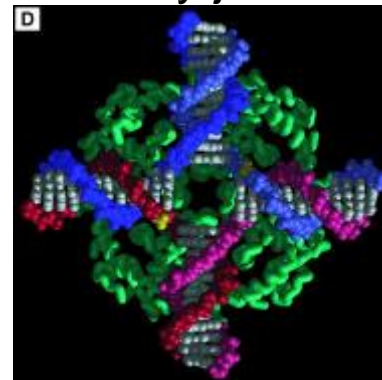
Crossing over a rekombinace - mechanismus



RecA (Rad51) protein – výměna řetězců



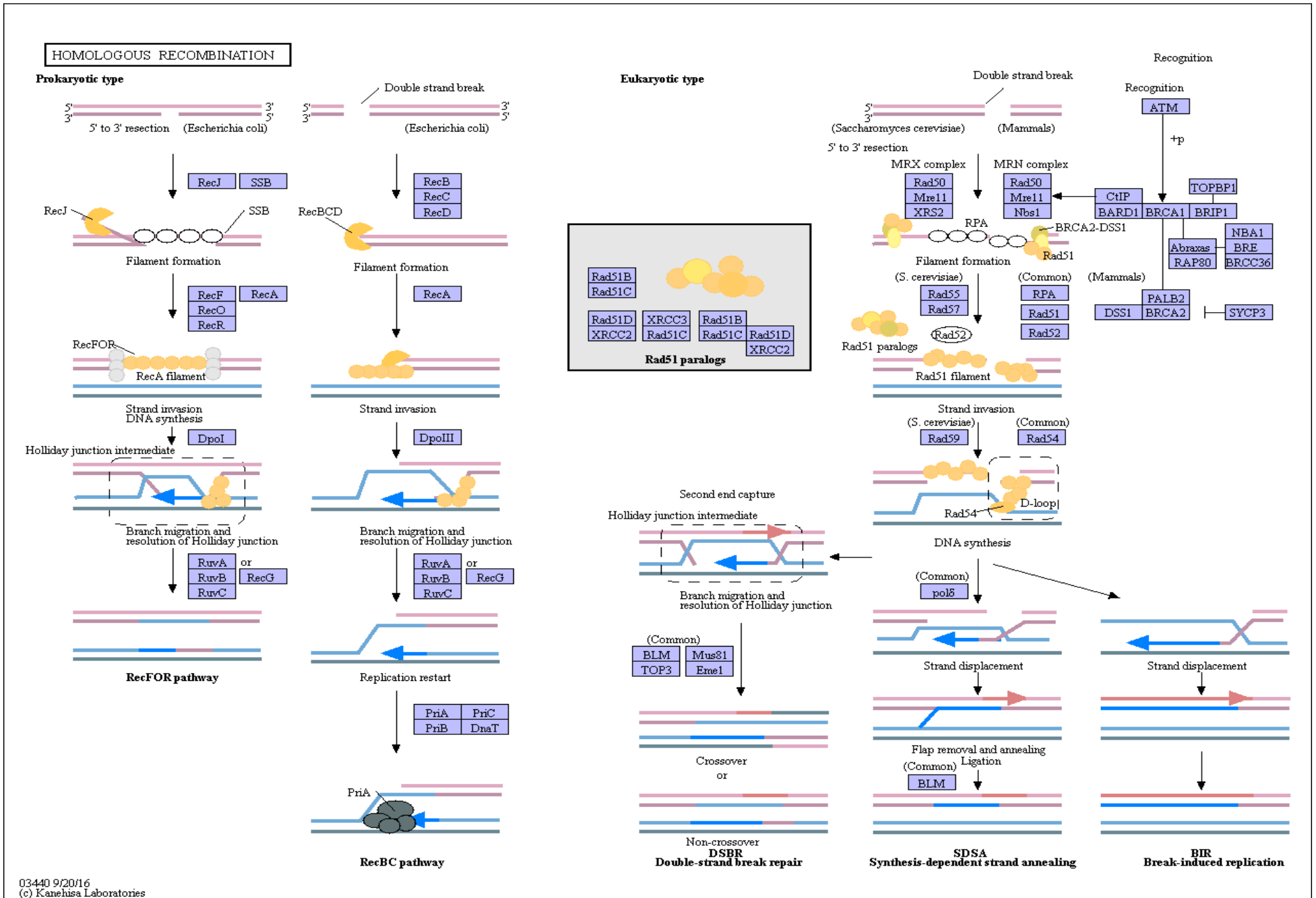
Holliday junction



Stephen C. Kowalczykowski, Nature Vol. 453(7194), 2008, p 463, 465-466

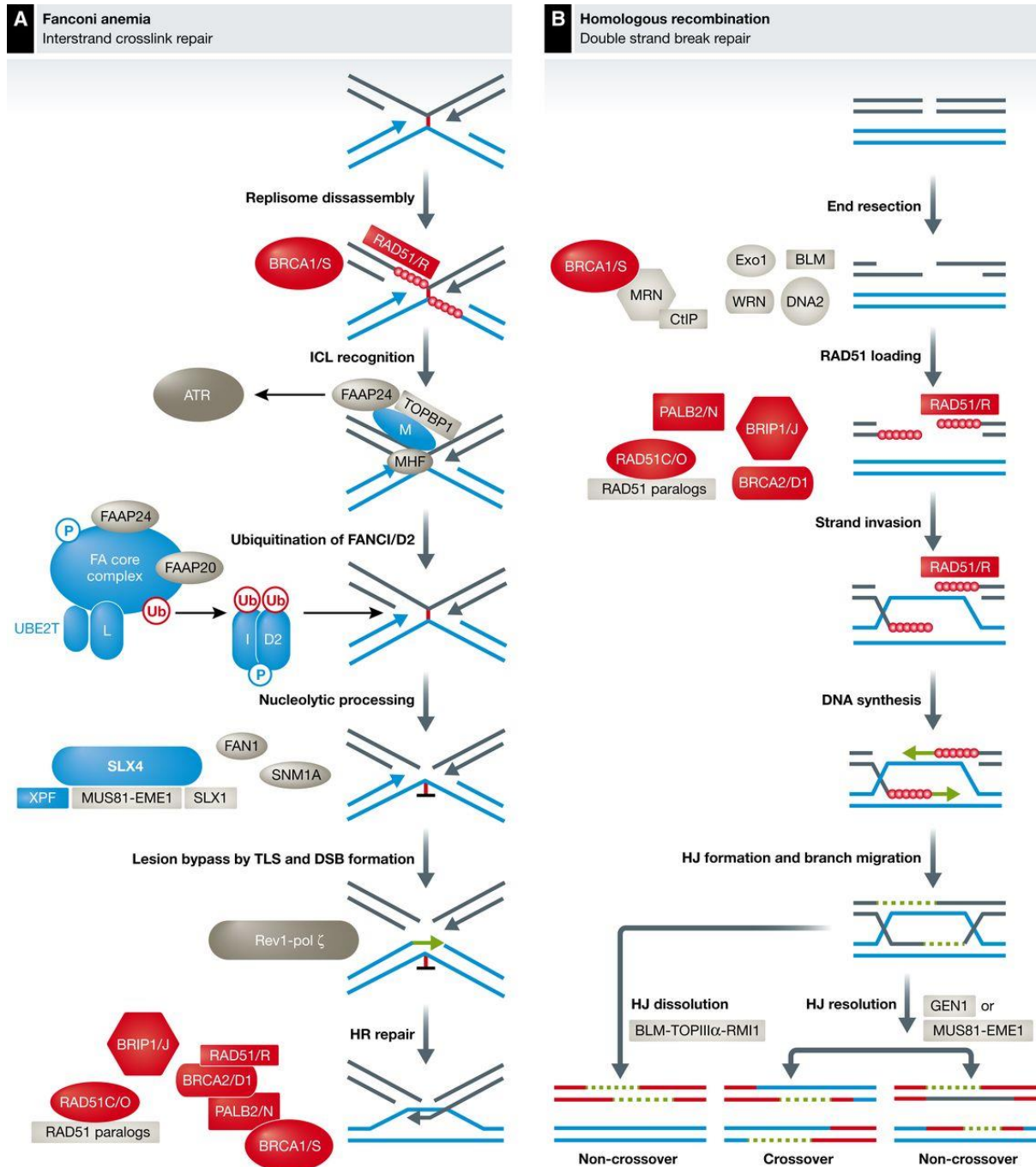
Rafferty et al., Science 1996, Vol. 274, p.415-21

Crossing over a rekombinace – mechanizmus



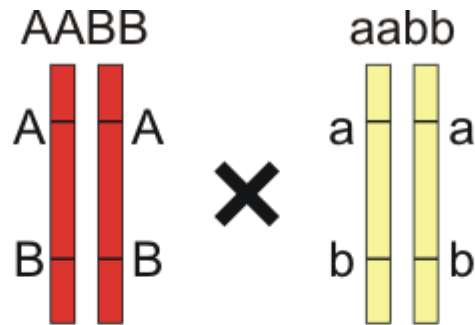
Rekombinace a Fancohiho anemie

Interstrand crosslink (ICL) and double strand break (DSB) repair pathways

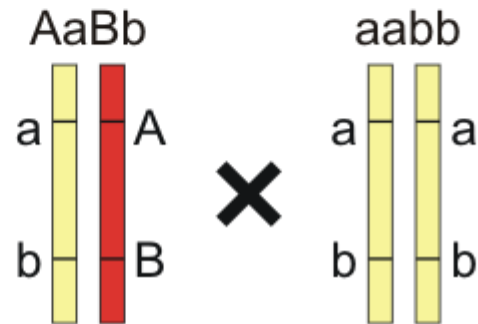


„Neúplná“ vazba v cis (coupling)

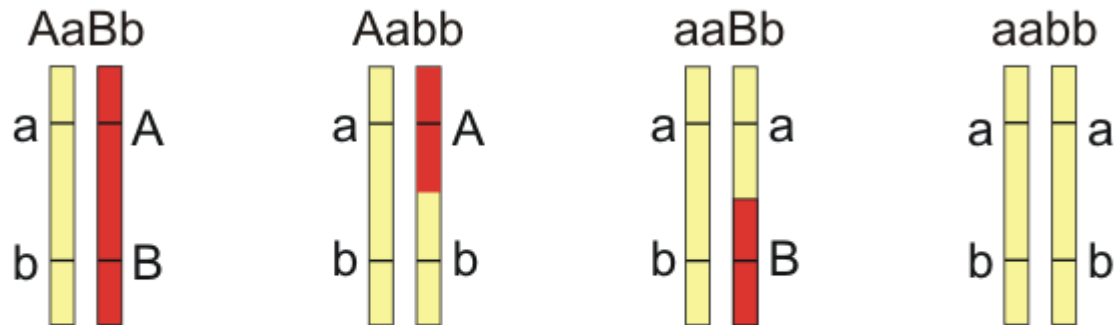
parentální generace



F₁ x P



zpětní kříženci



fenotyp

AB

Ab

aB

ab

štěpný poměr

>1

1

1

>1

frekvence

(25%;50%)

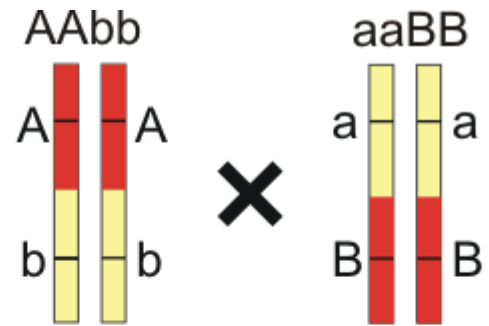
<25%

<25%

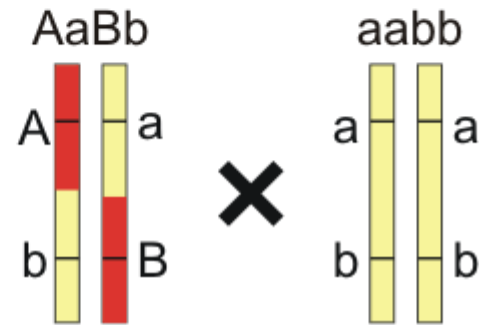
(25%;50%)

„Neúplná“ vazba v trans (repulsion)

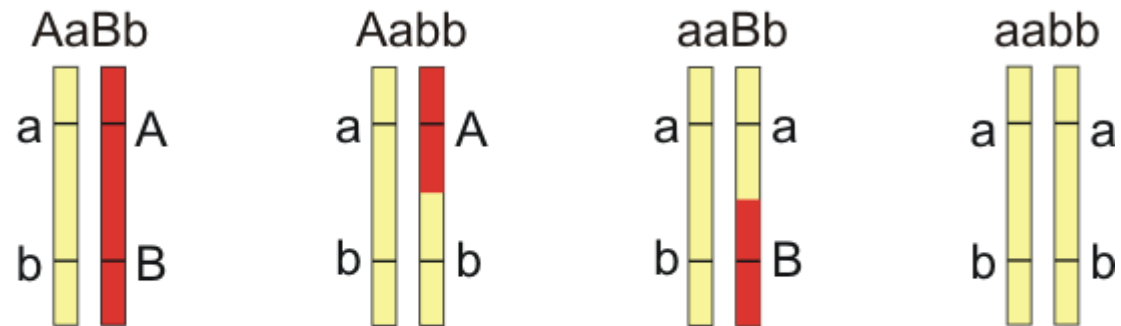
parentální generace



F₁ x P



zpětní kříženci



fenotyp

AB

Ab

aB

ab

štěpný poměr

1

$(1-\theta)/\theta$

$(1-\theta)/\theta$

1

frekvence

$\theta/2$

$(1-\theta)/2$

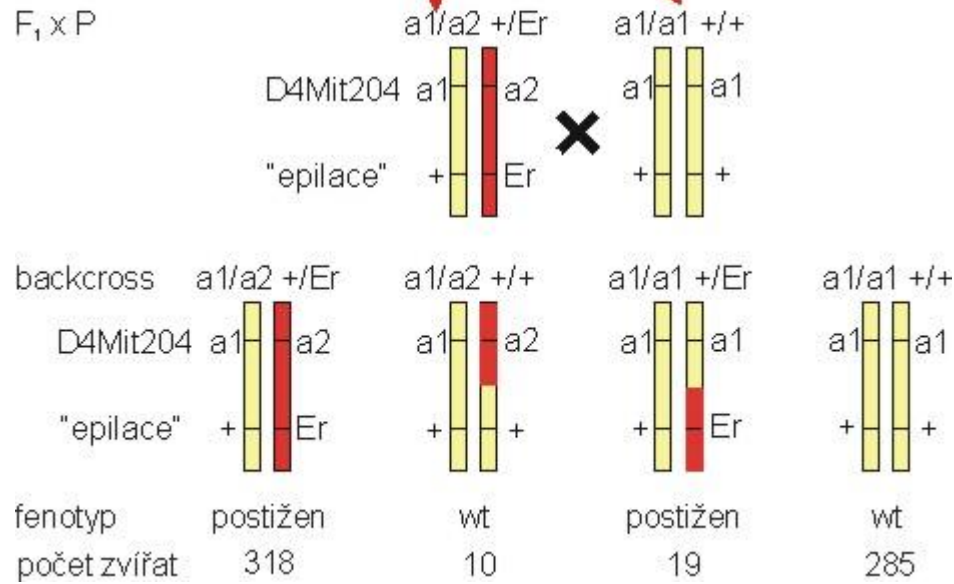
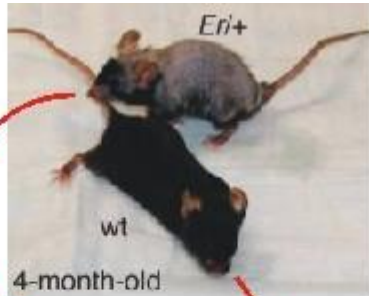
$(1-\theta)/2$

$\theta/2$

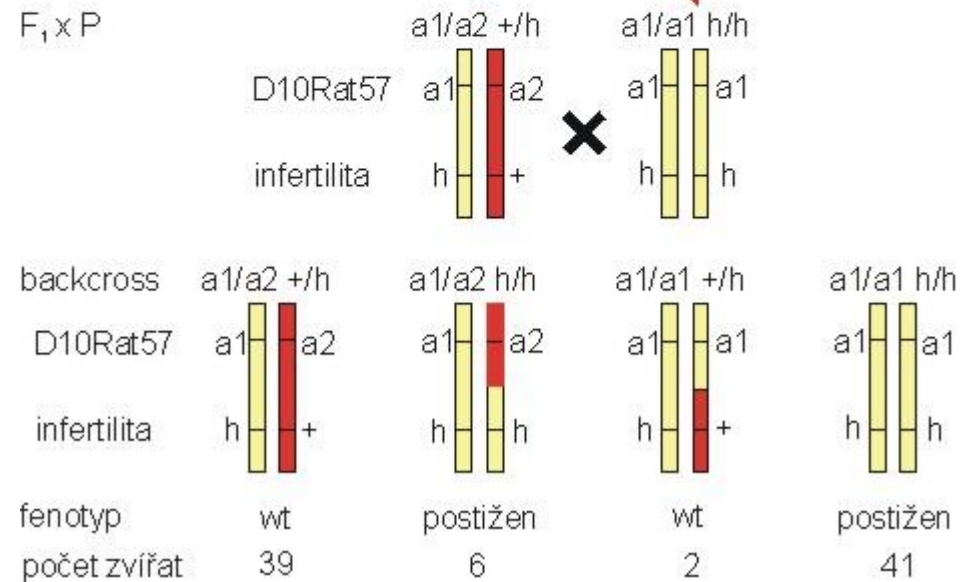
Síla vazby

$$\theta = \frac{\text{počet rekombinantů}}{\text{počet všech jedinců}}$$

Herron et al.: A mutation in stratifin is responsible for the repeated epilation (Er) phenotype in mice. Nat Genet. 37, 2005, 1210-2



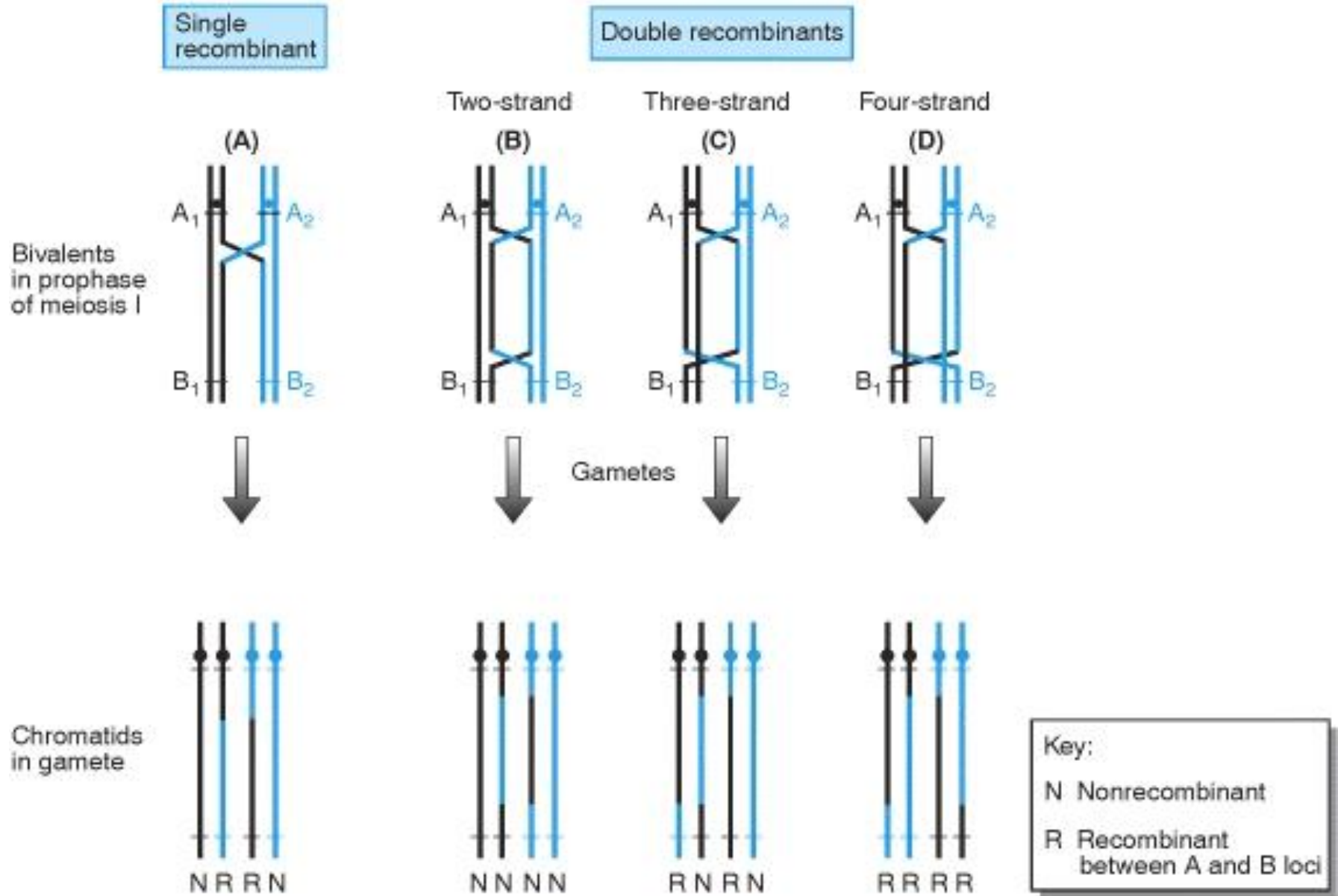
$$\theta = \frac{10 + 19}{10 + 19 + 285 + 318} = \frac{29}{632} \approx 0,046$$



$$\theta = \frac{2 + 6}{2 + 6 + 39 + 41} = \frac{8}{88} = \frac{1}{11} \approx 0,091$$

Morganův pokus s geny pr a vg $\theta = \frac{151 + 154}{151 + 154 + 1195 + 1339} = \frac{305}{2839} \approx 0,107$

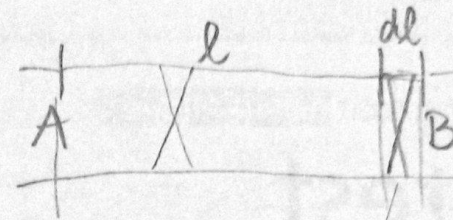
Proč nemůže být rekombinantů více než 50%?



Proč nemůže být rekombinantů více než 50%?

$$dX = \alpha dL$$

pravděpodobnost rekombinace "X" je přímo úměrná fyzické vzdálenosti L jen pro malé vzdálenosti alfa je konstanta



k výpočtu X mezi A and B je třeba si uvědomit, že je možné odhalit pouze případy jednoduchého crossing overu

$$\int_0^x \frac{dx}{1-2x} = \int_0^l \alpha dl$$

subst.

$$\left| \begin{array}{l} 1-2x = z \\ -2dx = dz \\ dx = -\frac{dz}{2} \end{array} \right|$$

$$dX_{AB} = (1-X_{AB}) \cdot \alpha dl - X_{AB} \cdot \alpha dl$$

bez c.o. mezi A a B,
c.o. v segmentu dL

c.o. mezi A a B
a zároveň v
segmentu dL

$$dX_{AB} = (1-2X_{AB}) \alpha dl$$

$$\int \frac{-dz}{2z} = -\frac{1}{2} \int_0^{z-1} \frac{dz}{z} = -\frac{1}{2} \left| \ln z \right|_0^{z-1} = -\frac{1}{2} \left| \ln(1-2x) \right|_0^x$$

$$-\frac{1}{2} \ln(1-2\theta) = \alpha \cdot l \quad 2\theta < 1 \Rightarrow \theta < \frac{1}{2}$$

volně podle: Haldane JBS (1919) The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. J Genet 8:299–309

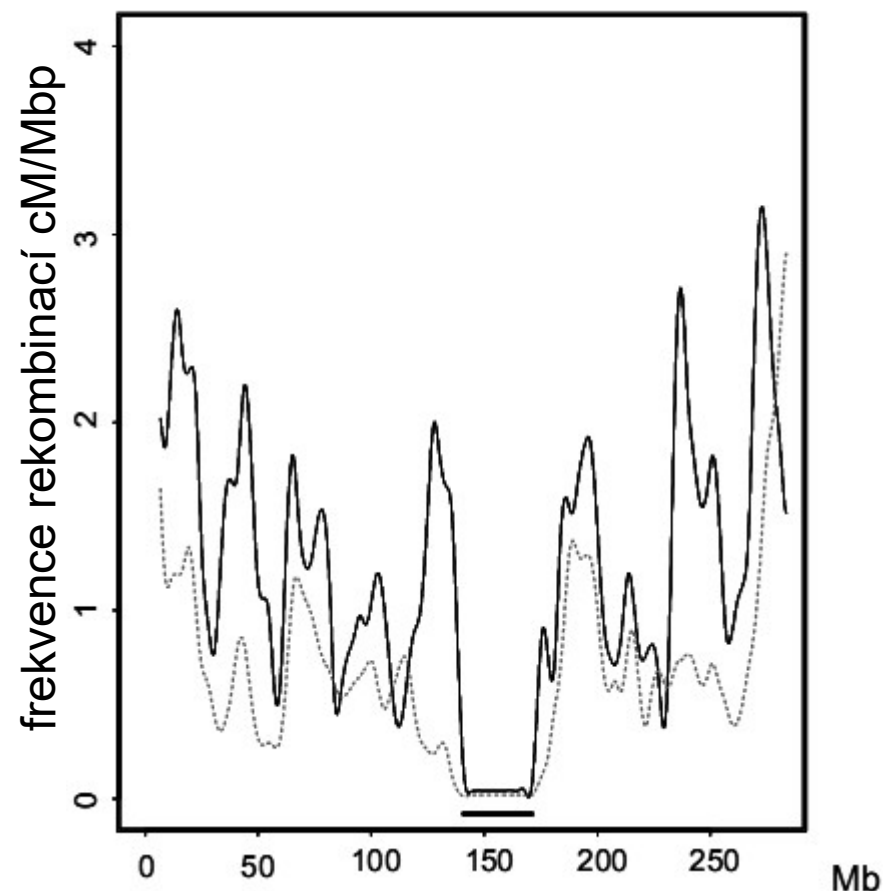
Síla vazby je monotónní funkcí fyzické vzdálenosti genů

$$\theta = \frac{\text{počet rekombinantů}}{\text{počet všech jedinců}}$$

$$W = -\frac{1}{2} \ln(1 - 2\theta) \text{ Haldane}$$

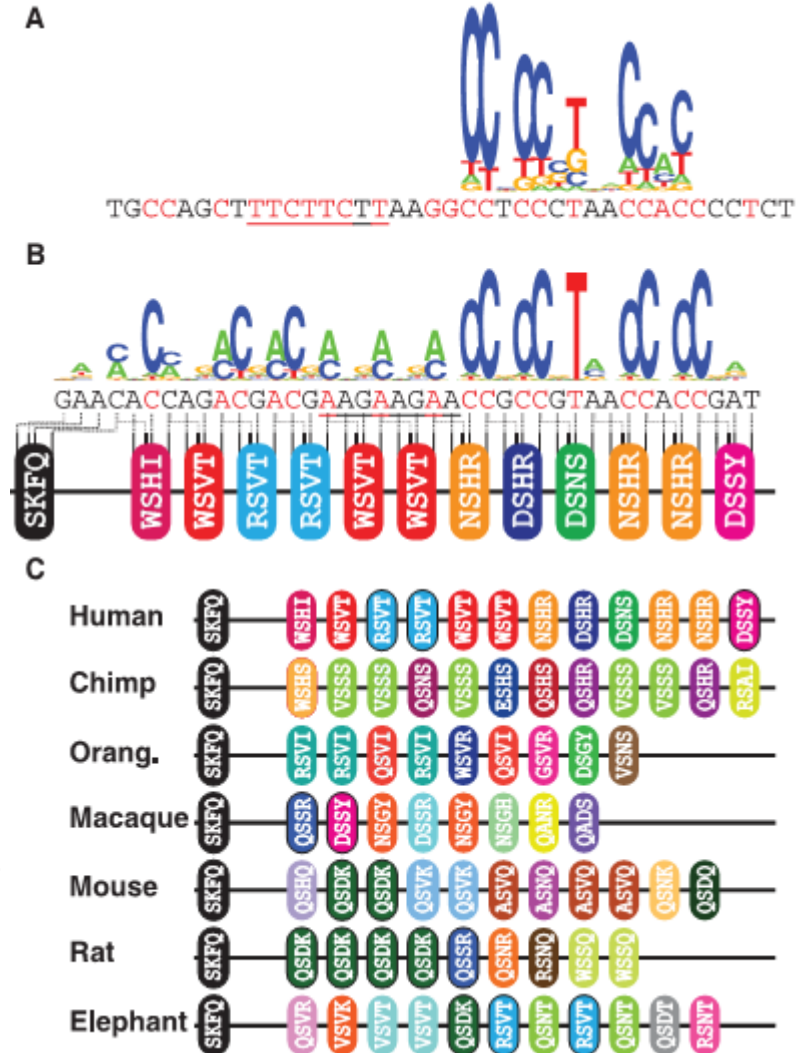
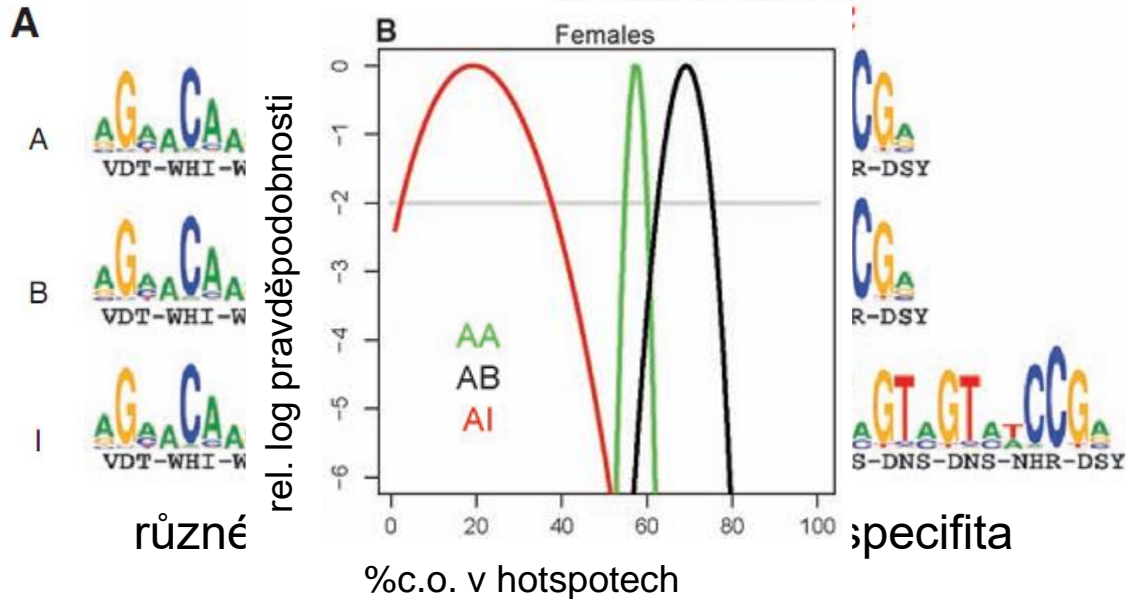
$$\text{Kosambi } W = \frac{1}{4} \ln\left(\frac{1 + 2\theta}{1 - 2\theta}\right)$$

chromosome 1



- lze vyjádřit v % (x 100%)
- může se pohybovat od 0 do 50% (volná kombinovatelnost)
- 1% rekombinantů odpovídá průměrně vzdálenosti cca 1 milión párů bazí
- procenta rekombinantů nejsou aditivní (je-li A-B 30% a B-C 40%, A-C nemůže být 70% ale nejvýš 50%, proto se zavádí „mapová funkce“ (W), 1% = 1cM (centimorgan), %rek < cM
- cM/Mbp = frekvence rekombinací je vyšší u žen a směrem k telomeře chromosomu
- frekvence rekombinací závisí na sekvenci tzv. „rekomb. hotspotů“, c.o. je iniciován v motivech, na které se váže PRDM9

PRDM9 a rekombinační „hotspots“



PR domain containing 9, histone-lysine N-methyltransferase H3 lysine 4 trimethylation

Baudat, F. et al. (2010). PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* 327, 836-840.

Myers, S. et al. (2010). Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination. *Science* 327, 876-879.

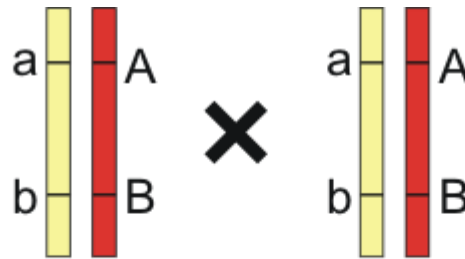
Parvanov, E.D. et al. (2010). Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science* 327, 835.

Berg, I.L. et al. (2010). PRDM9 variation strongly influences recombination hot-spot activity and meiotic instability in humans. *Nat Genet* 42, 859-863.

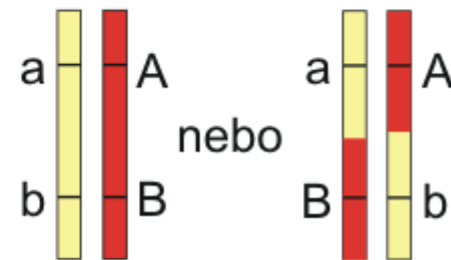
Ubeda, F., and Wilkins, J.F. (2011). *The Red Queen theory of recombination hotspots*. *J Evol Biol* 24, 541-553.

PRDM9 u člověka a jiných savců

Měřit sílu vazby u interkrosu je možné spolehlivě pouze u kodominantních znaků



lokus A \ lokus B	AA	aa	Aa
BB	nr	2 x c.o.	c.o.
bb	2 x c.o.	nr	c.o.
Bb	c.o.	c.o.	???



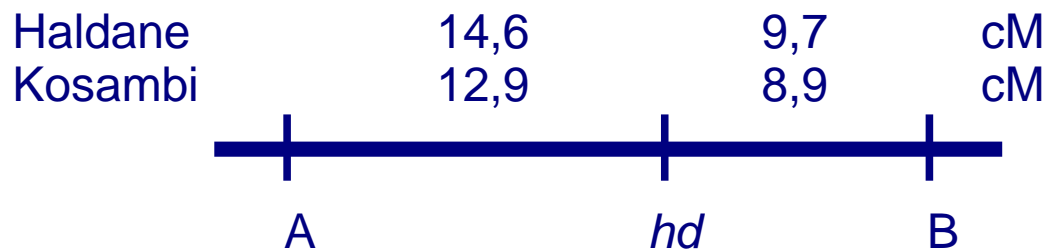
~~$$\theta = \frac{\text{počet rekombinantů}}{\text{počet všech jedinců}}$$~~

$$\theta = \frac{\text{počet rekombinantů}}{\text{počet meióz}} \approx \frac{2(aaBB + AAbb) + AABb + AaBB + aaBb + Aabb}{2 (\text{počet jedinců})}$$

Tříbodový pokus – pořadí genů, základ genetických map

D10Rat34 = A, D10Rat57 = B, *hd* = H

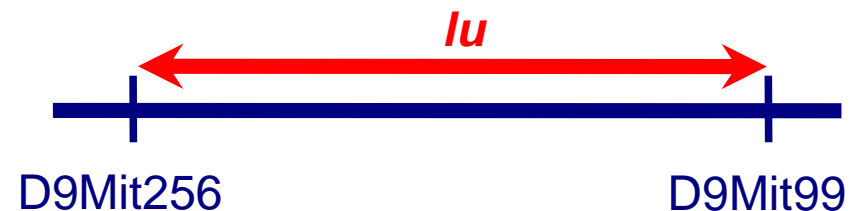
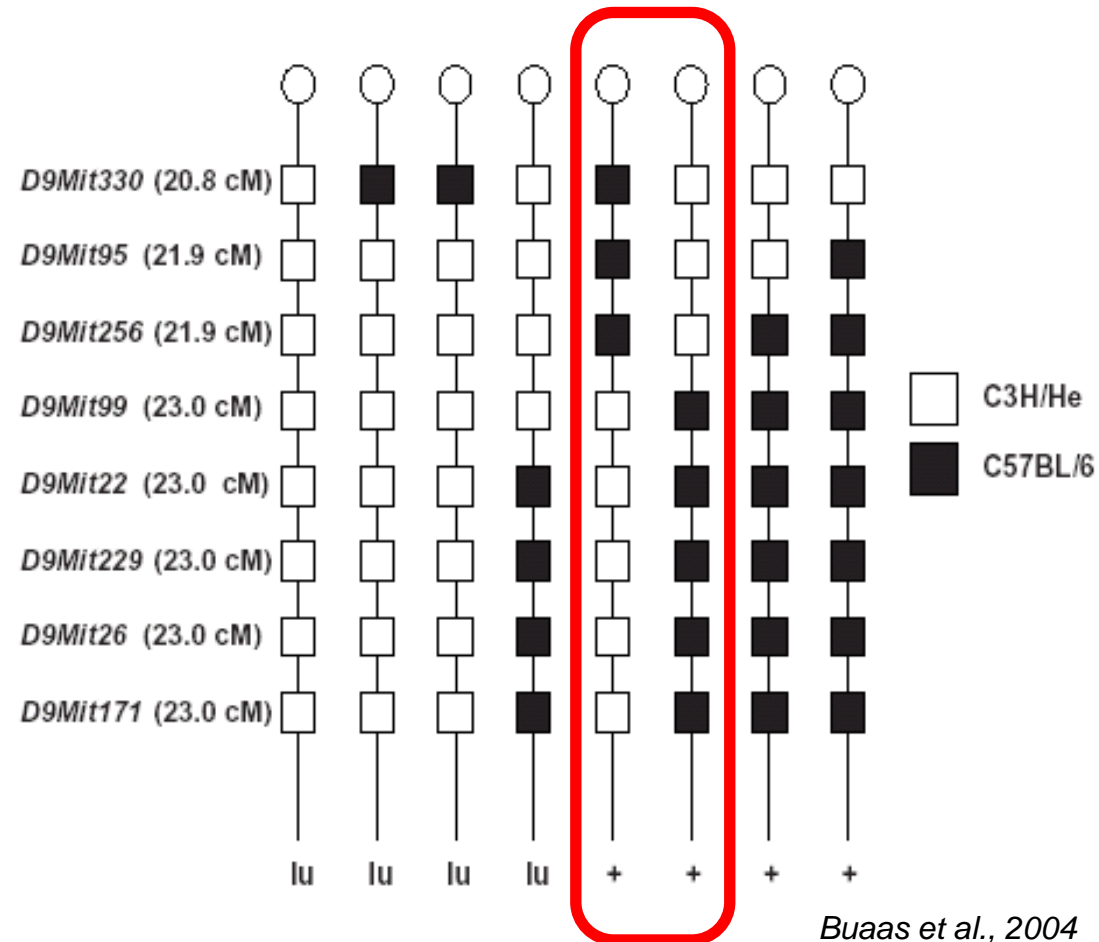
genotyp	počet	%
ABH <i>abh</i>	266	78,24
AB <i>h</i> <i>ab</i> H	1	0,29
<i>a</i> BH A <i>b</i> <i>h</i>	43	12,65
<i>a</i> B <i>h</i> A <i>b</i> H	30	8,82
	340	100,00



$$i = 1 - \frac{0,0029}{0,127 \times 0,088} = 0,74$$

Vícebodový pokus – opět genetické mapy

- ✓ pořadí na chromosomu – minimalizace počtu dvojitých crossing overů, ekvivalentní minimalizaci genetické délky - permutace
- ✓ díky interferenci jsou krátké úseky dvojité rekombinace (1 marker) obvykle artefakty => lepší jsou haplotypy
- ✓ dostupnost markerů a snadná tvorba nových polymorfismů díky znalosti sekvence genomu vede k vytěžení veškeré informace z vazebné mapy



Které znaky mohou být v genetické mapě?

Polymorfní fenotypy

- ✓ monogenně podmíněná onemocnění n. fyziol. znaky
- ✓ krevní skupiny
- ✓ varianty krevních bílkovin
- ✓ MHC haplotypy

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

- ✗ omezené použití

Polymorfismy DNA umožňují zakotvit „vazebně skupiny“ na chromozomy

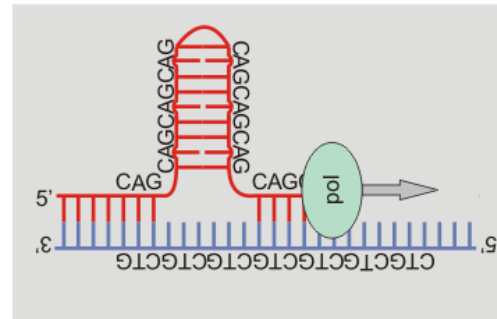
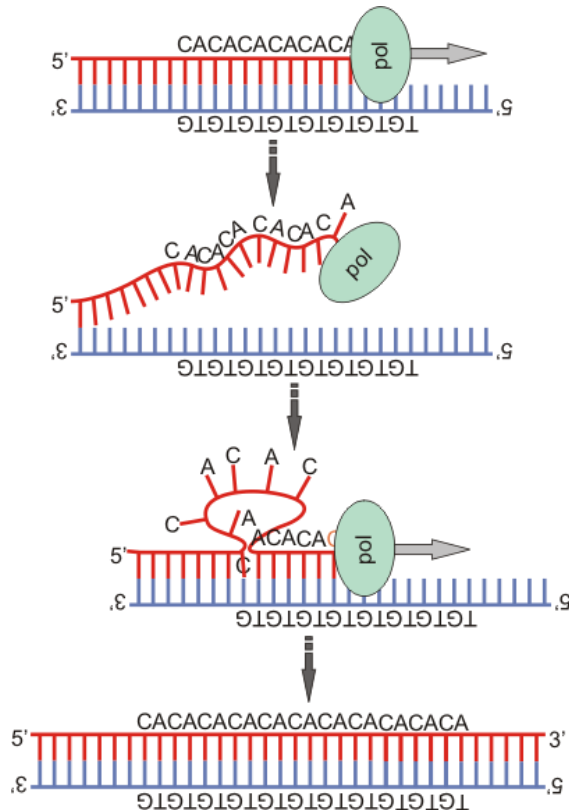
- ✓ polymorfismy tandemových repetitivních sekvencí – minisatelity, mikrosatelity (STR, SSLP)
 - ✓ hypervariabilní
 - ✓ snadný design nových markerů
 - ✗ nízká rychlost genotypizace
- ✓ polymorfismy jednoho nukleotidu (SNP), s podmnožinou analyzovatelnou restrikčními endonukleázami jako RFLP
 - ✓ analýza pomocí mikročipů - rychlost
 - ✗ pouze 2 alely, nízká pravděpodobnost polymorfismu v rodině (člověk)

Mikrosatelite

(STR = short tandem repeats, SLP = simple sequence length polymorphisms...)

TAGCCATCGGTA CACACACACACACAGTGCTTCAGTAGC

TAGCCATCGGTA CACACACACACAGTGCTTCAGTAGCGTAG

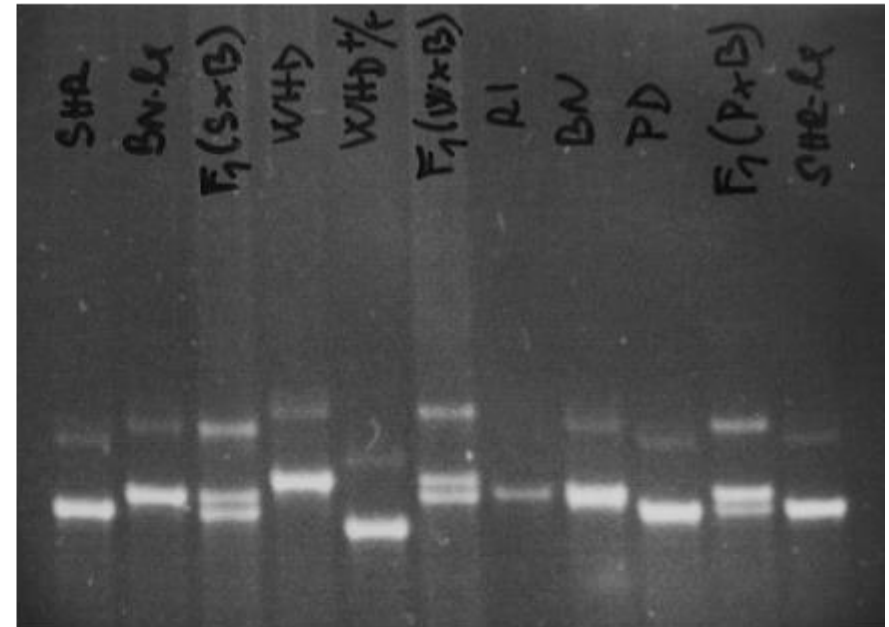


nestabilita mikrosatelitů
díky skluzu polymerázy

Mikrosatelite

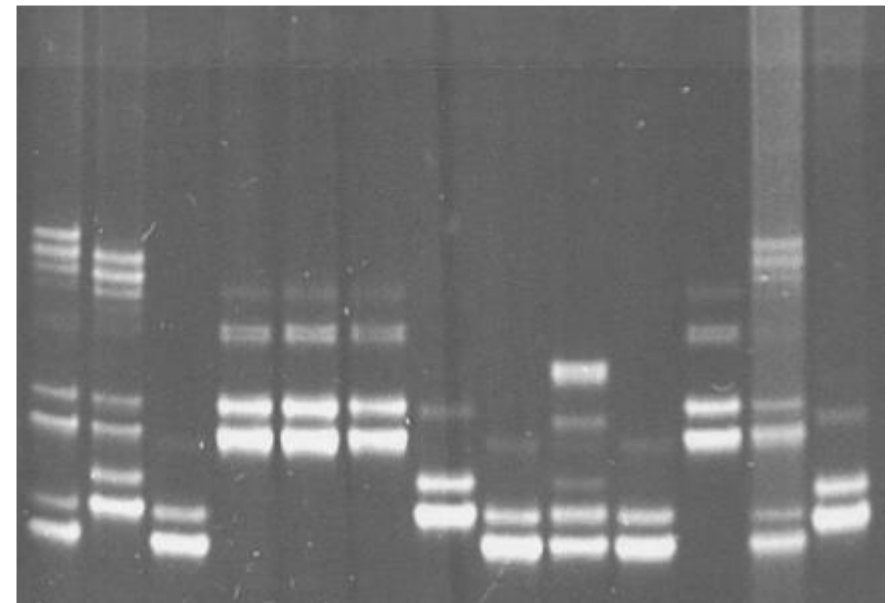
>chr10:55163679-55163791 113bp

GTGCCTGTAGGCTGACGAGT AGCCAGGGTTGCATAGAAAG
 agtgttccttttctaagagggtttttggtgtttcacaaactgg
 taattttatcaatgccttctcagcatccagtcagataattac
 aagggtgtttttcctttcacacgggtataatgaatgacaactgt
 ggacttttaattacccttgtattcctggggtaaactggagtg
 gtcatagtgtGCCTTCACTTCTGTTAGTGTGCGGTGCCTGTAG
 GCTGACGAGTAAGCCTGCTATttattattattattattatta
 ttattattattattattattattCctttcttttaaagacaggggtc
 tttctatgcaaccctggcttgcctggaactctctgtgtagac
 caggctggcctcaacttatagcctcctgagtgctgggtgcta
 ccataccagcCCTTCCATTatcttgatctacttttagatatt
 aaggctgtaatgagctgggggtgacttgggtgtggttacacac
 atttgcttttaatcccagtatattggggaggcaggaatagacag
 atctttgag

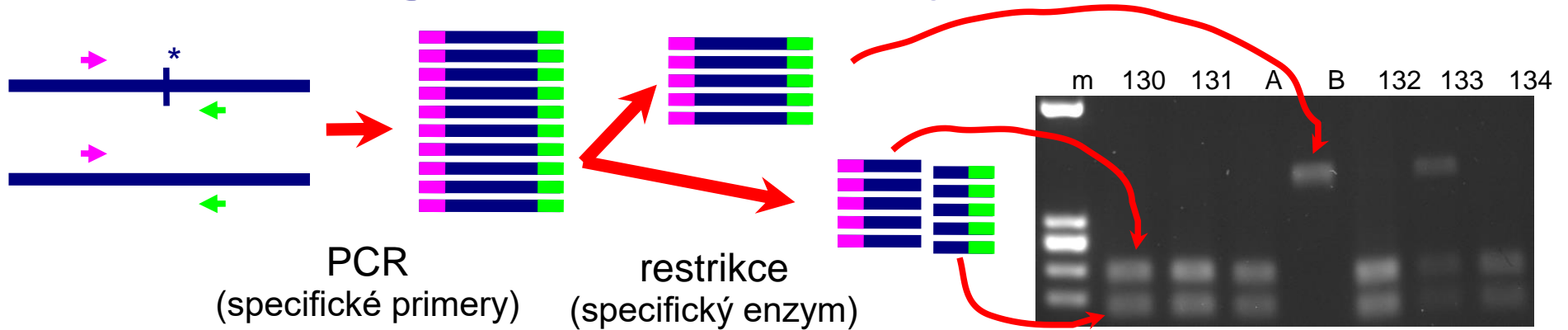


>chr18:74577320-74577450 131bp

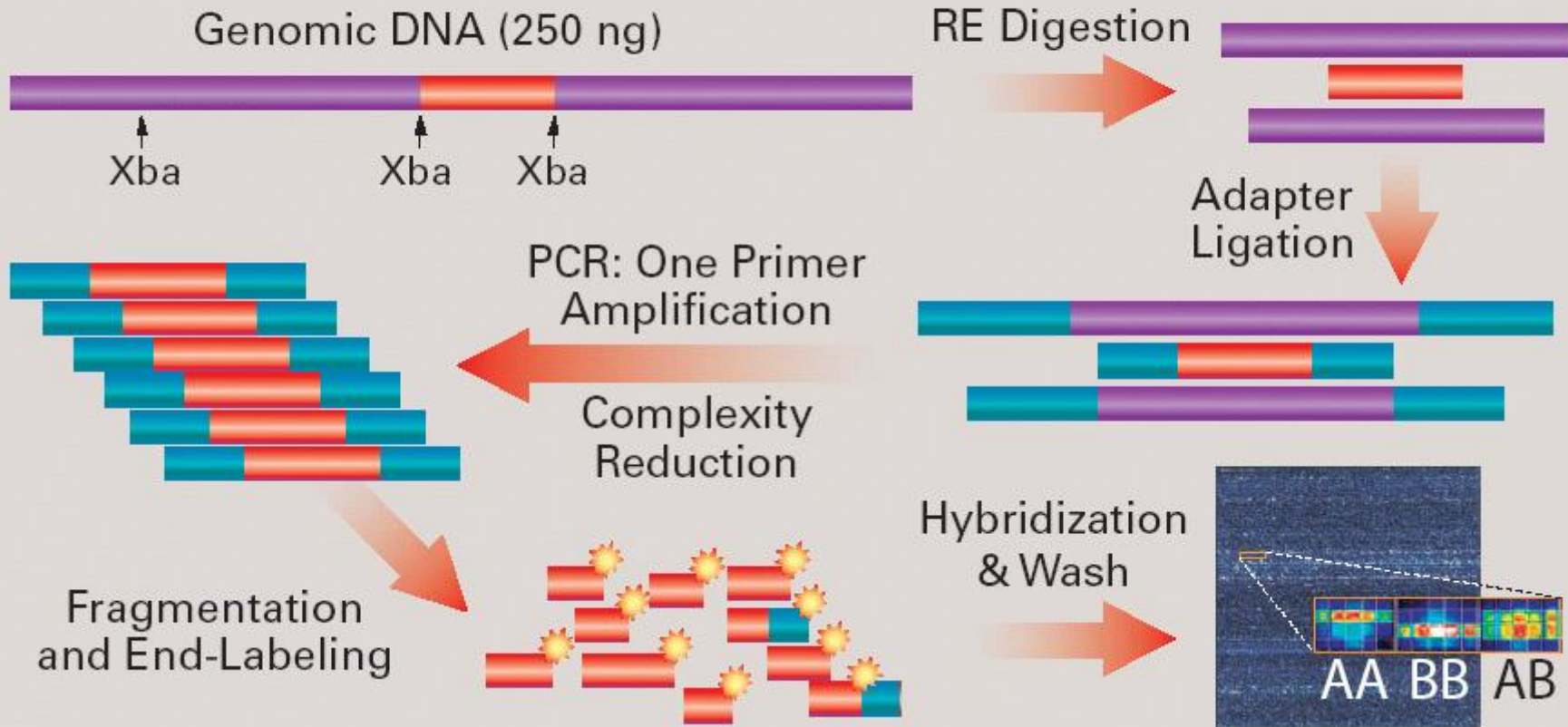
GAGGGACAGACGTGCACAC AGATTGAACCCAAGACTTCTGC
 ATGGCTGCCGGAGAGCAGGGCTGCCATGTAAGAGAGGTCGCA
 Gacaaagaactgcgggtaaccaaggagctgagagtgggagaa
 atggccttcccaggagagcacacggcttgggttggttaacc
 agtacccaaagggcagccctgaaaacatagggcataggtgtaa
 cacacaggatgagcacattgtatttacatactgagggacaga
 cgtgcacaCGTGCGTGCGAacacacacacacacacacacaca
 cacacacacacacacacacacacacagatggctctgttaaac
 aacttgttgatcttgcagaagtcttgggttcaatctccagc
 acacacacagggttgctcacaactgtctgtaactctggttct
 catggatctgatgccctcttctggcctctgagggcactgcat
 gcacacgATGCATCTGTCTGTCTGTctatctacctacctacc
 tacctacctacctacctacctacctatctaTCATATACATGT
 GTGTATGTATACATGTACTGGAAACAC



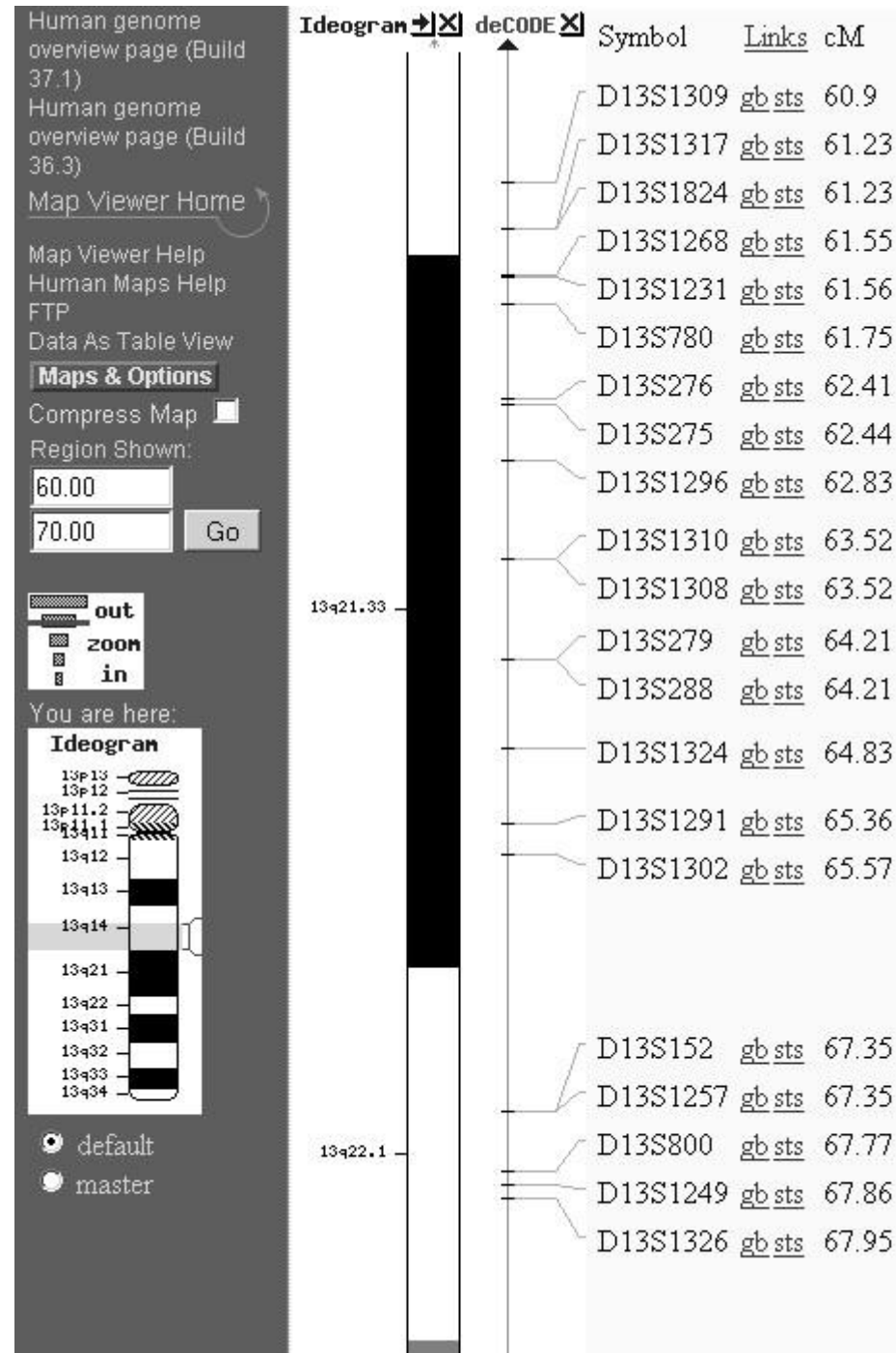
Single Nucleotide Polymorphisms



GeneChip® Mapping Assay Overview.

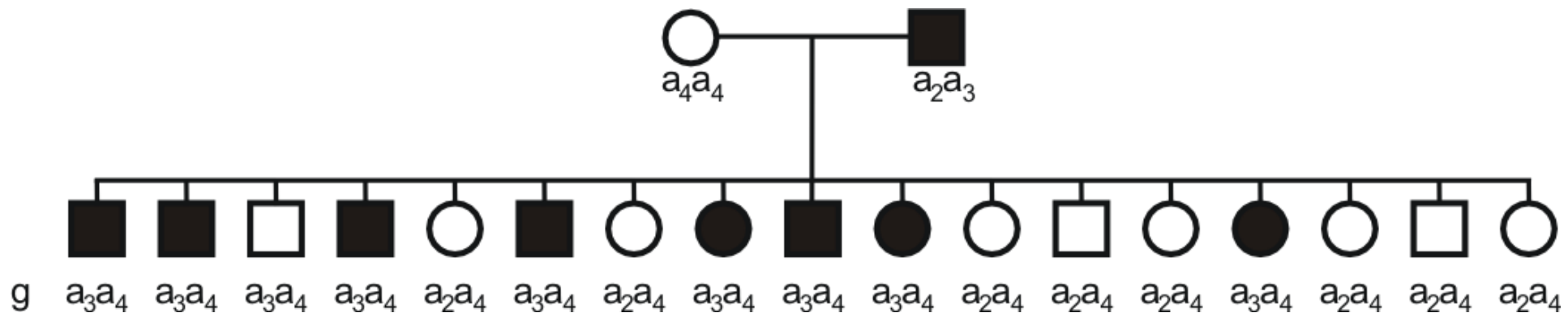


Genetické mapy člověka



Jak se provádí vazebná analýza u člověka

Jak se rozhoduje, že je vazba signifikantní?

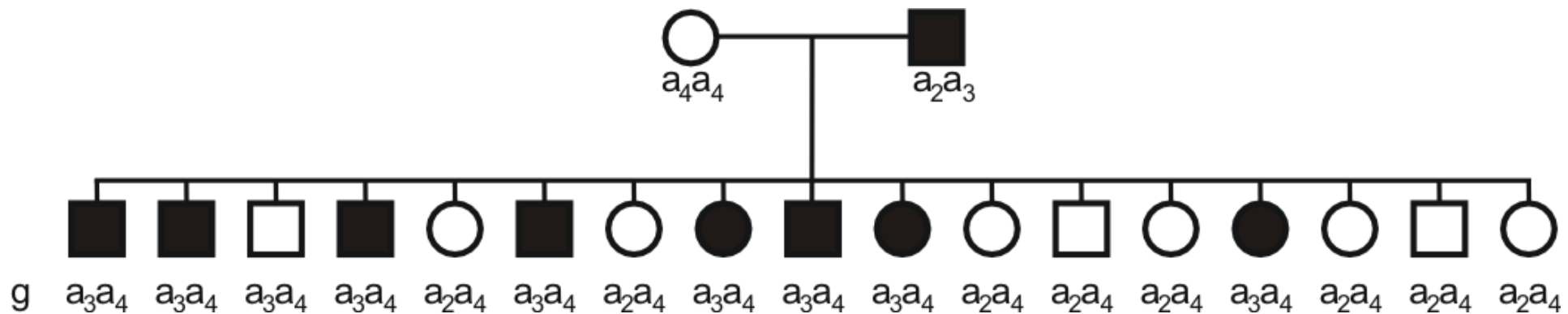


Vazba mezi barvou očí a markerem (g) D15S1533 na chromosomu 15

- U AD dědičnosti většina rodokmenů odpovídá backcrossu, takové rodokmeny jsou pro stanovení vazby vhodné
- U AR dědičnosti se nejčastěji jedná o IC, informativní genotyp je jen u postižených a jejich rodičů
- problém fáze vazby
- je možno kumulovat rodiny se stejným typem genotypu rodičů

Jak se provádí vazebná analýza u člověka

Jak se rozhoduje, že je vazba signifikantní?



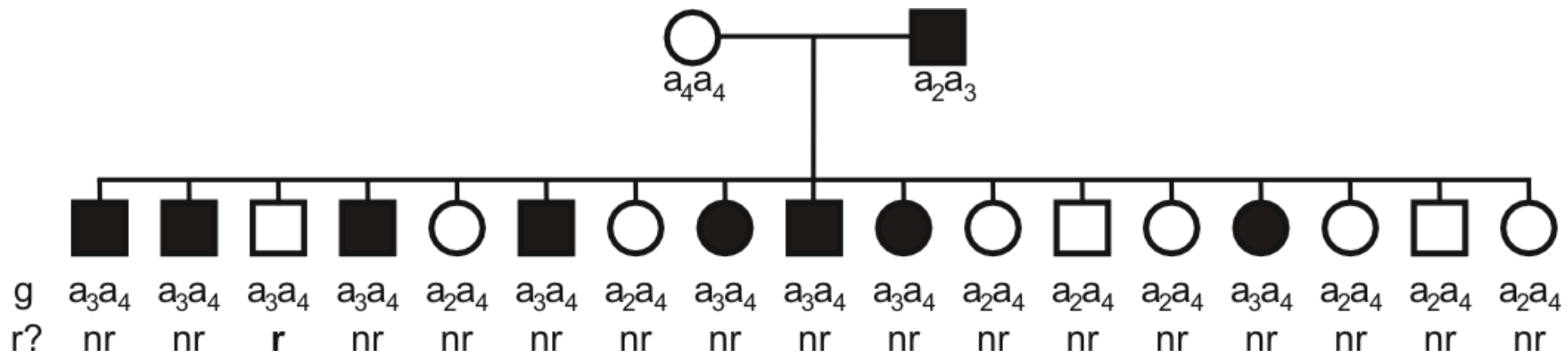
Vazba mezi barvou očí a markerem (g) D15S1533 na chromosomu 15

Statistické testování hypotéz

- H_0 : (např. ca plic se vyskytuje stejně často u kuřáků jako u nekuřáků, nový lék není o nic lepší než léčba stávající, **mezi sledovanými lokusy není vazba**)
- H_1 : neplatí H_0
- Jestliže $P(\text{pozorovaná data} | H_0 \text{ platí}) < \text{dohodnutá hodnota}$ (např. 0,05), *zamítáme* H_0

Jak se provádí vazebná analýza u člověka

Jak se rozhoduje, že je vazba signifikantní?



Vazba mezi barvou očí a markerem (g) D15S1533 na chromosomu 15

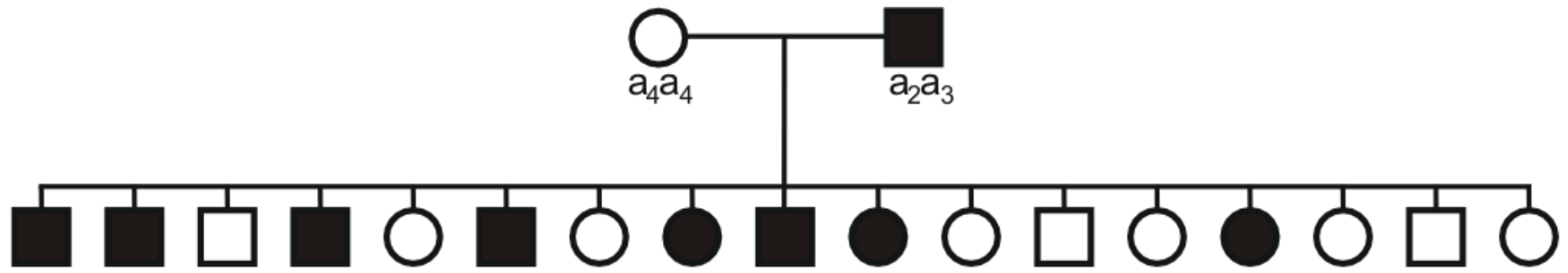
U testování vazby je dohodnuto, že „kurs“ na vazbu by měl být nejméně 1000:1

$$LOD = \log_{10} \frac{P(\text{pozorovaná data} \mid \theta; \theta < \frac{1}{2})}{P(\text{pozorovaná data} \mid \theta = \frac{1}{2})} > 3$$

$$\theta = \frac{\text{počet rekombinantů}}{\text{počet všech jedinců}} = \frac{1}{17}$$

Jak se provádí vazebná analýza u člověka

Jak se rozhoduje, že je vazba signifikantní?



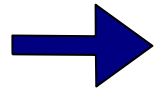
g	a ₃ a ₄	a ₃ a ₄	a ₃ a ₄	a ₃ a ₄	a ₂ a ₄	a ₃ a ₄	a ₂ a ₄	a ₃ a ₄	a ₃ a ₄	a ₃ a ₄	a ₂ a ₄	a ₂ a ₄	a ₂ a ₄	a ₃ a ₄	a ₂ a ₄	a ₂ a ₄	a ₂ a ₄
r?	nr	nr	r	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P(g θ)	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{1}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$	$\frac{16}{17}$
P(g θ=1/2)	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$

Vazba mezi barvou očí a markerem (g) D15S1533 na chromosomu 15

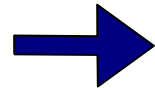
$$LOD = \log_{10} \frac{\theta^r (1 - \theta)^{N-r}}{(\frac{1}{2})^N} = \log_{10} \frac{\left(\frac{1}{17}\right)^1 \left(\frac{16}{17}\right)^{16}}{\left(\frac{1}{2}\right)^{17}} = 3,47$$

Poziční klonování

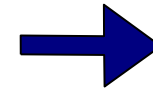
genetická mapa



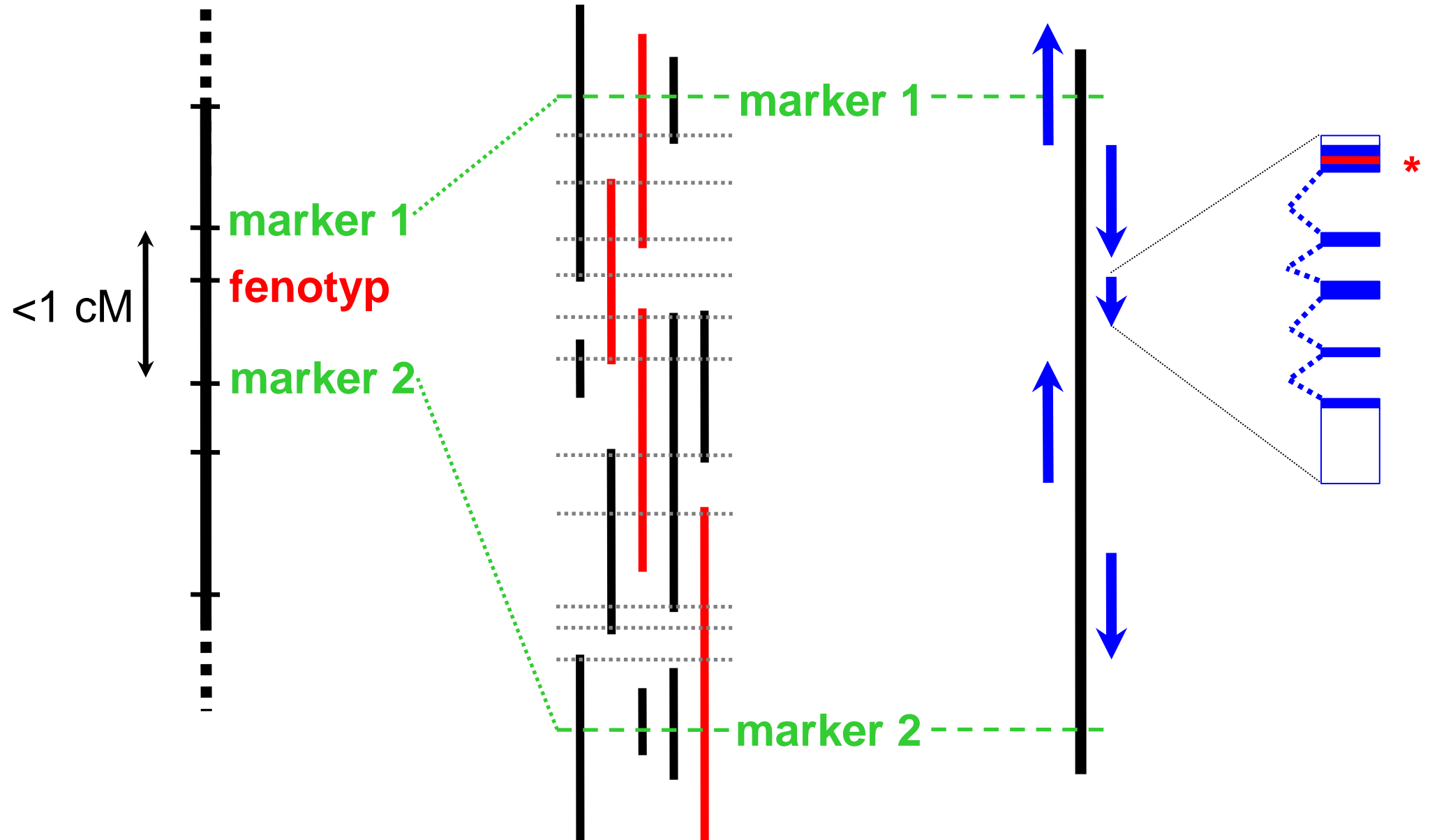
kontig



geny

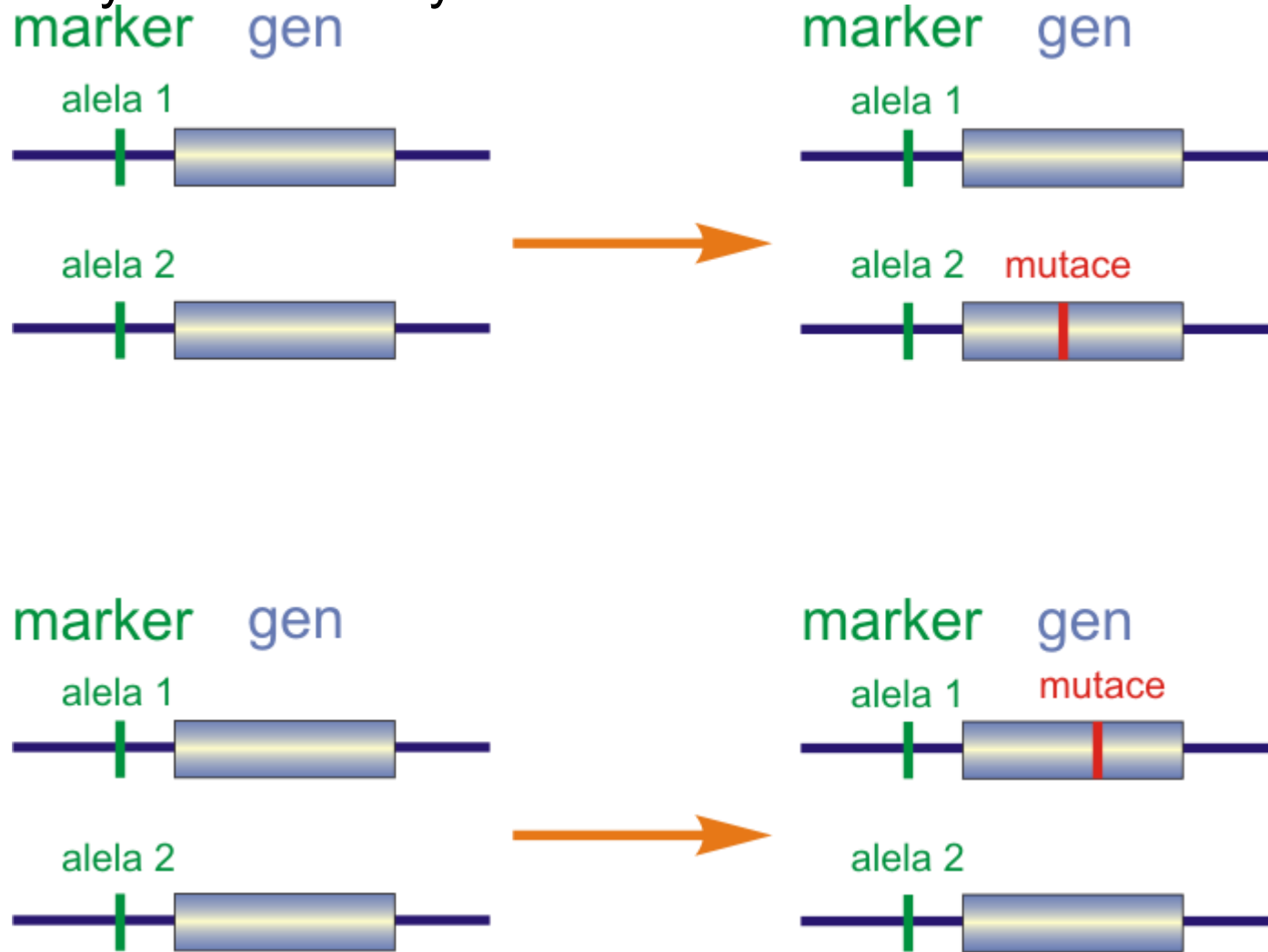


mutace



nepřímá DNA diagnostika

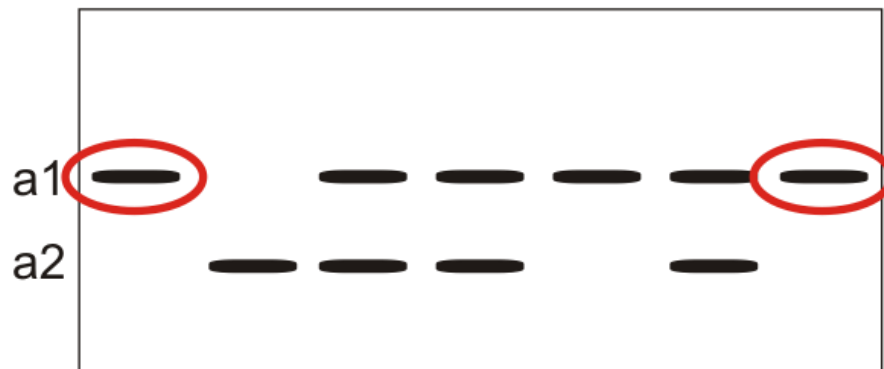
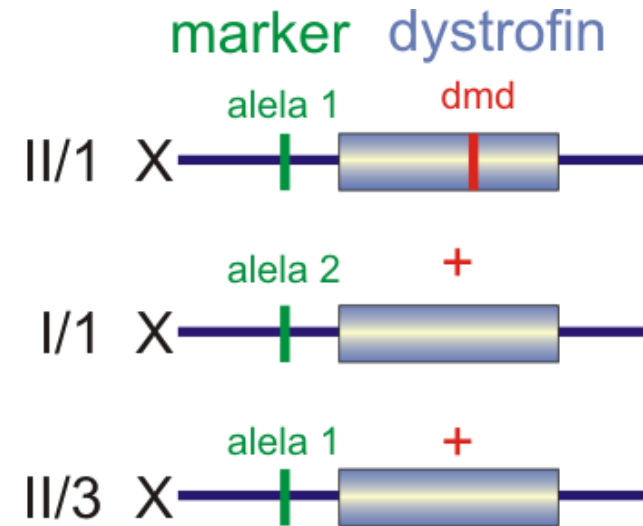
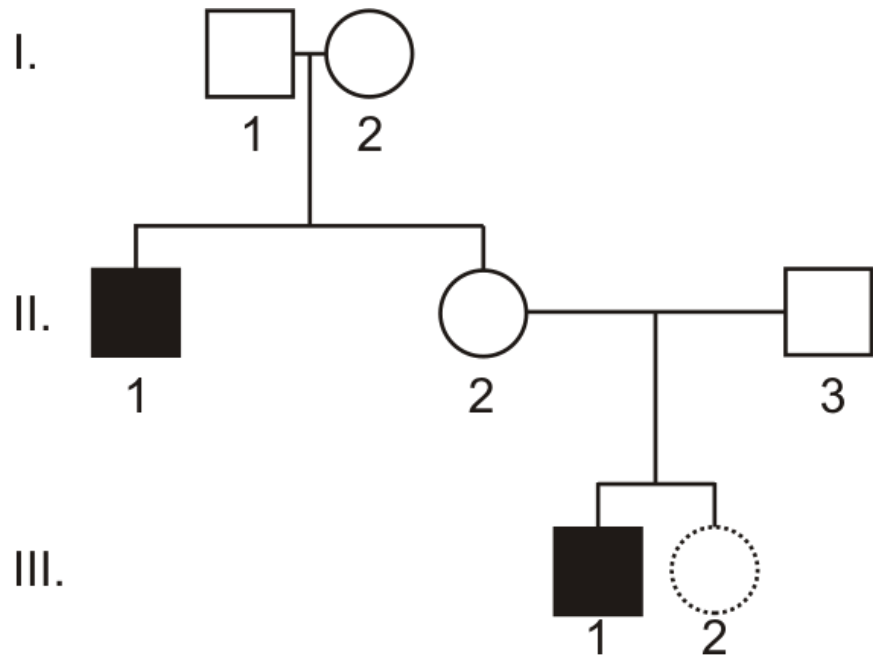
Nezjišťujeme mutaci, která způsobuje onemocnění, ale lokus v těsné vazbě,
Je nutná analýza celé rodiny



U různých jedinců je mutace ve vazbě s různou alelou „markeru“
Naopak stejná alela markeru je jednou ve vazbě se standardní a
jindy s mutantní alelou sledovaného genu

nepřímá DNA diagnostika

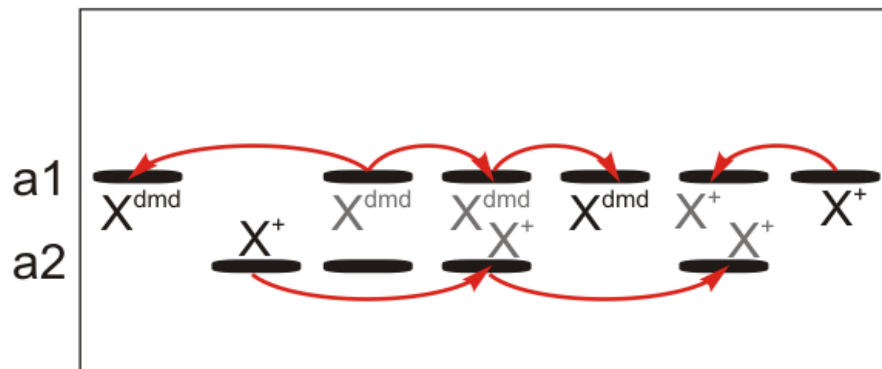
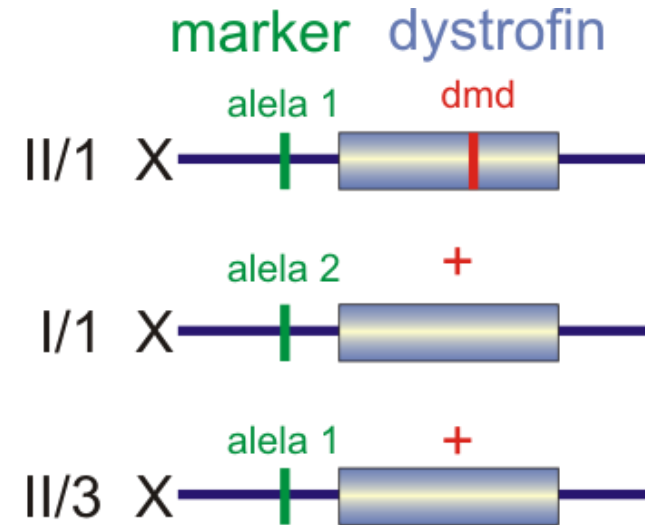
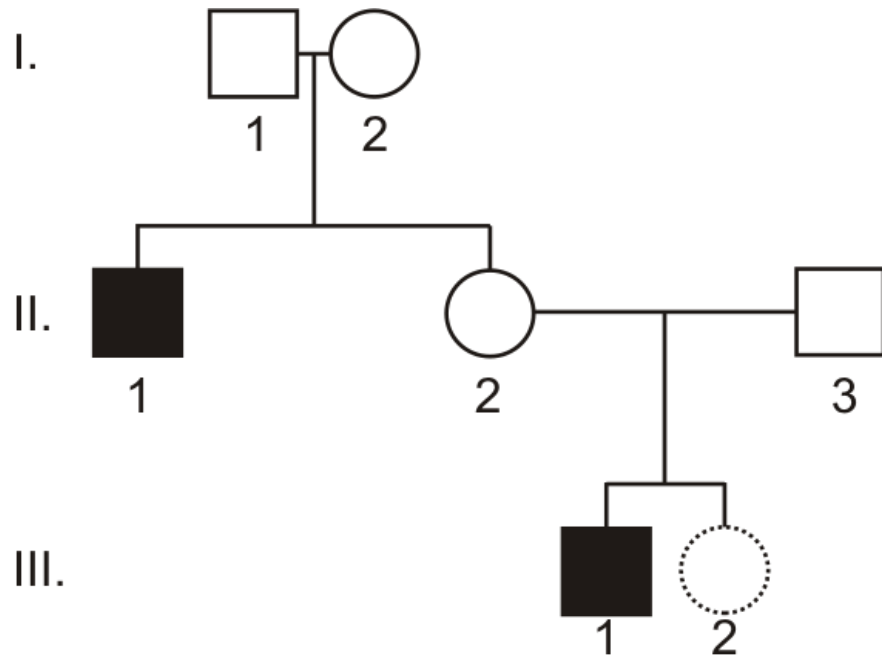
U různých jedinců je stejná alela polymorfního markeru ve vazbě s různou alelou genu (standardní nebo mutovanou)



Duchennova svalová dystrofie
X-vázaná recesivní
dystrofin spojuje sarkomery s
plazmatickou membránou
chybění d. vede k svalovým
vláknům. která jsou při zátěži
nestabilní
typ. na vozíku j. teenager, smrt
v mladém dospělém věku

nepřímá DNA diagnostika

Stejně ale lze mnohdy zjistit – díky vazbě – genotyp ostatních členů rodiny

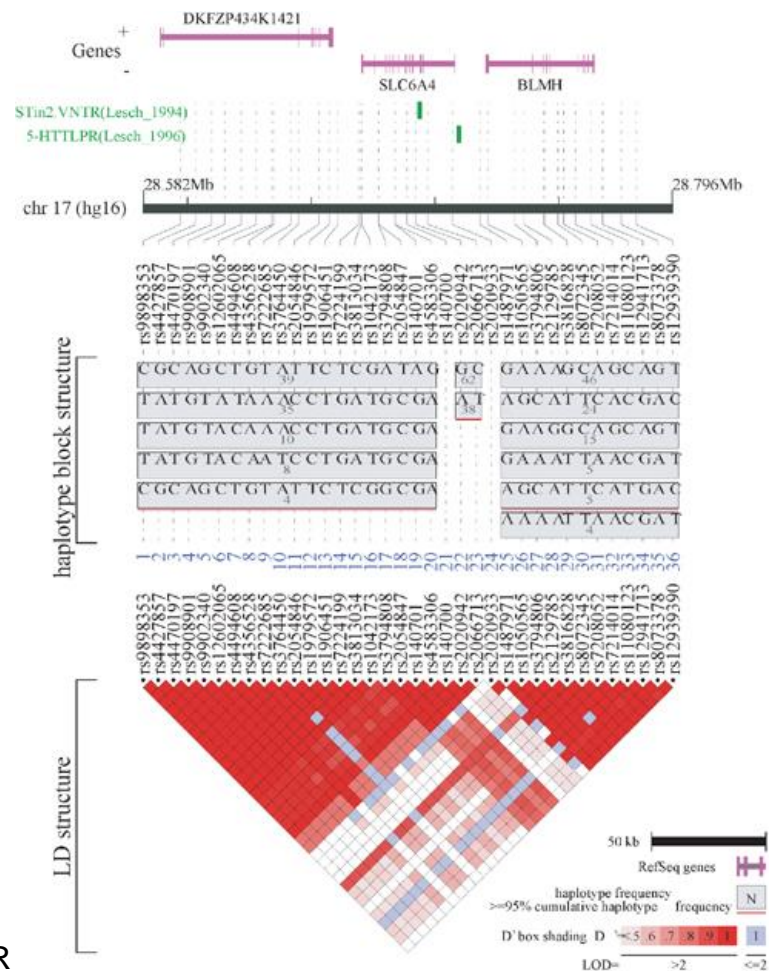
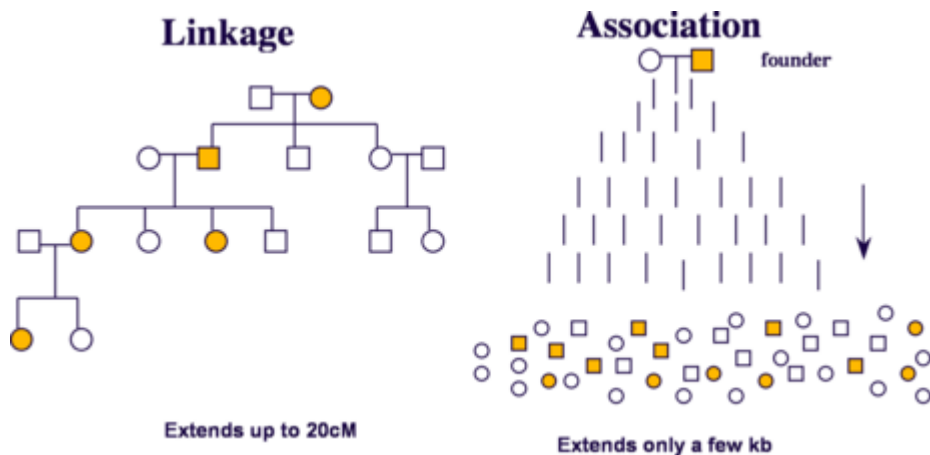


Dcera III/2 není přenašečka
(genotyp X^+X^+)

Vazebná nerovnováha

Dva lokusy jsou tak blízko sebe, že drží spolu nejen v rodině, ale i v populaci (během historie určité populace došlo jen k omezenému množství crossing-overů)

Vazebná nerovnováha *haplotypu* AB: Je-li frekvence AB = x , fr. alely A = p a fr. alely B = q , pak $D = x - pq$, $D' = D/D_{max}$. D_{max} je $\min(p, q)$



Fan & Sklar.: Meta-analysis reveals association between serotonin transporter gene STin2 VNTR polymorphism and schizophrenia. Mol Psych 10, 2005, 891

Poděkování

Číslo výzvy:	02_16_015
Název projektu:	Zvýšení kvality vzdělávání na UK a jeho relevance pro potřeby trhu práce
Číslo projektu:	CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_015/0002362
Příjemce:	Univerzita Karlova
Řídící orgán:	Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání

