

### Alelos, Recombinación, y Ligamiento

- a). Loci genéticos y alelos
- b). Mitosis y meiosis
- c). Recombinación
  - i). Recombinación Meiótica
  - ii). Efectos de recombinación en cromosomas
  - iii). Modelos Holliday de recombinación
- d). Ligamiento
  - i). Comportamiento de los alelos durante la meiosis
  - ii). Ligamiento depende de la distancia
  - iii). Ligamiento de un marcador cromosómico con NF1

Libro de referencia para Genética Humana

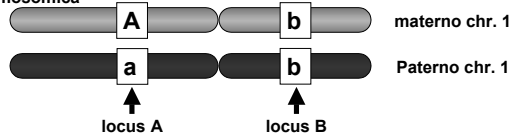
**HUMAN MOLECULAR GENETICS (4ª EDICION).**  
 Tom Strachan & Andrew P. Read. Bios Scientific  
 Publishers. John Wiley & Sons (2004)

### Loci Genéticos y alelos

#### Definiciones

**Locus genético:** una posición o localización específica en un cromosoma

**alelo:** cada una de las versiones alternativas de una secuencia de nucleótidos del DNA que puede estar en una determinada localización cromosómica



**diploide:** que tiene cromosomas homologos uno del padre y otro de la madre

**haploide:** que tiene uno solo de los cromosomas homologos

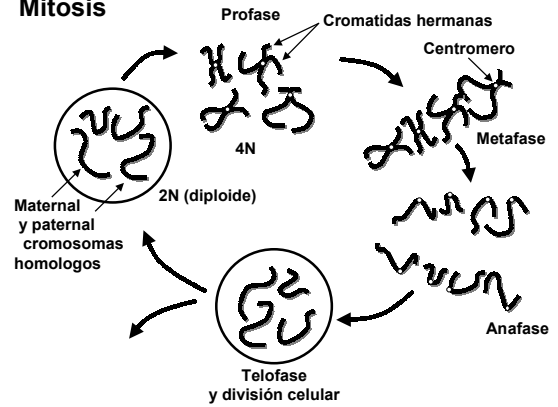
**homocigotos:** tiene los mismos alelos en un determinado locus genético

**heterocigotos:** tiene diferentes alelos en un determinado locus genético

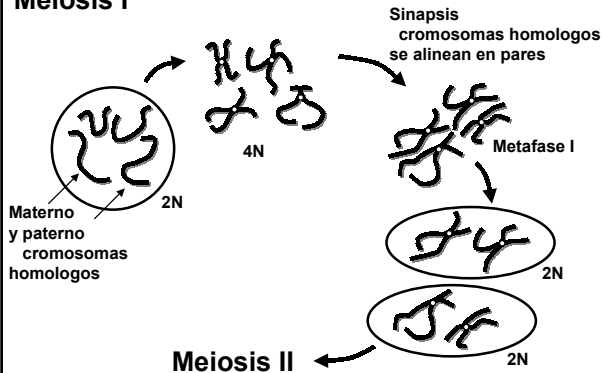
**dominante:** fenotipo que se expresa en heterocigotos

**recesivo:** fenotipo que se expresa solamente en homocigotos (o en heterocigotos compuestos con dos alelos mutados distintos)

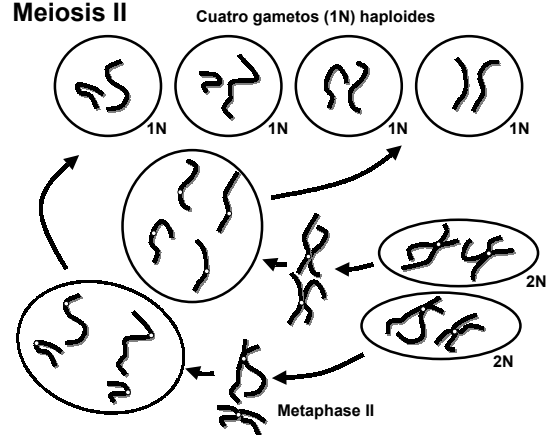
### Mitosis

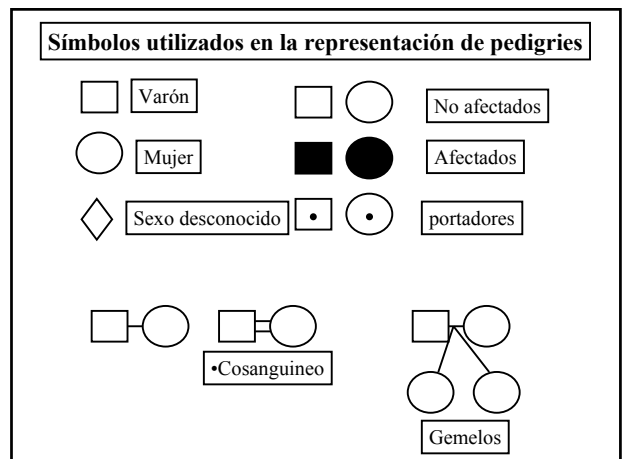
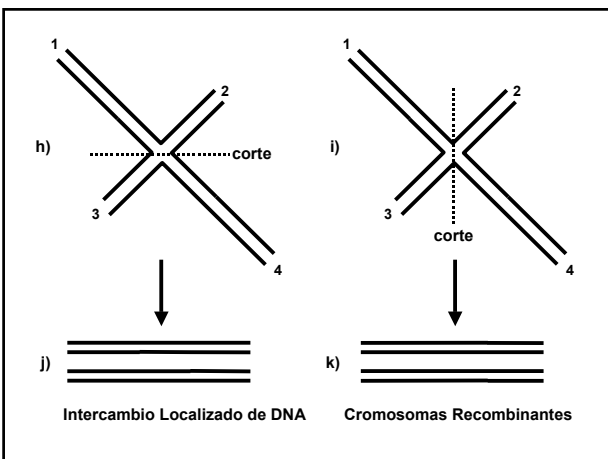
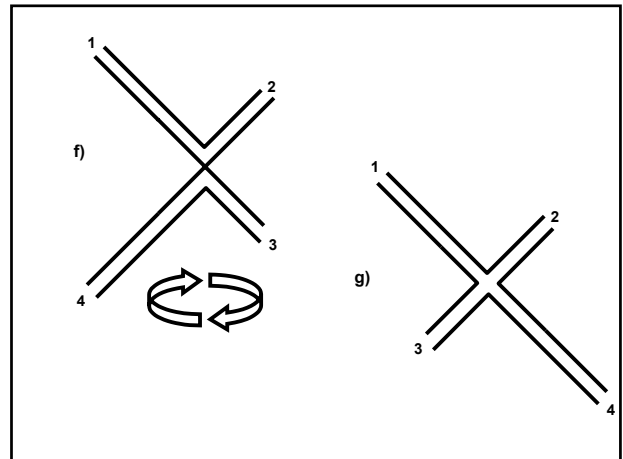
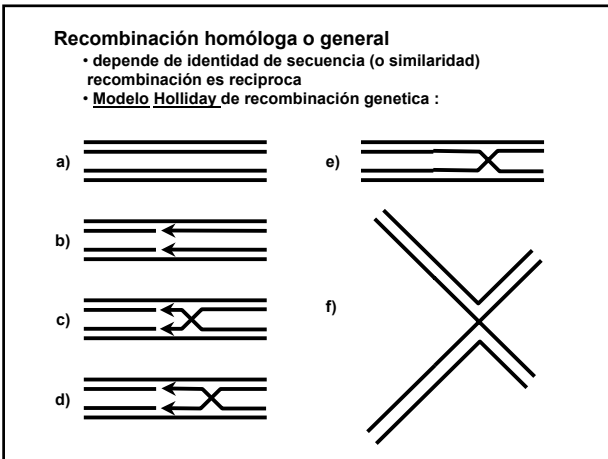
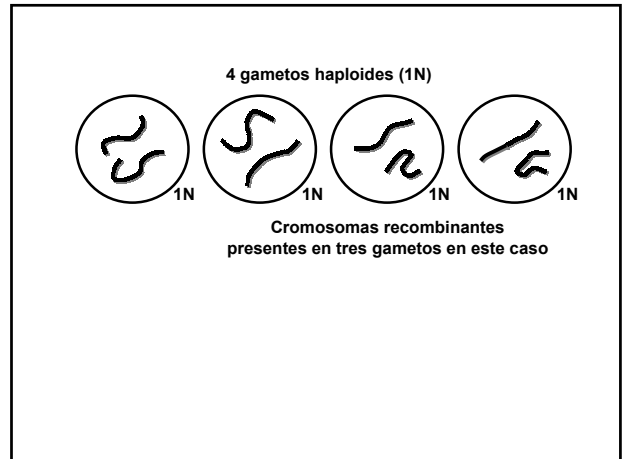
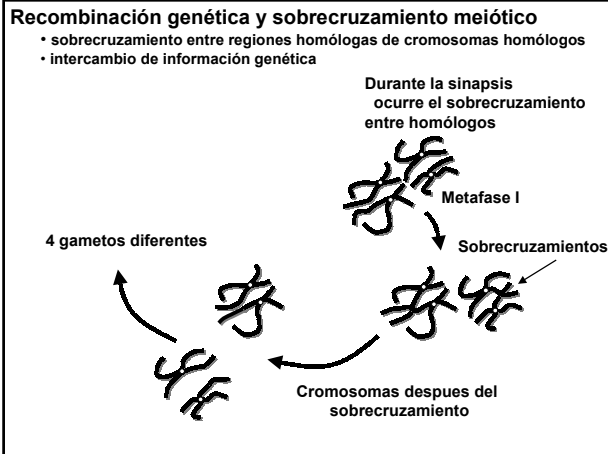


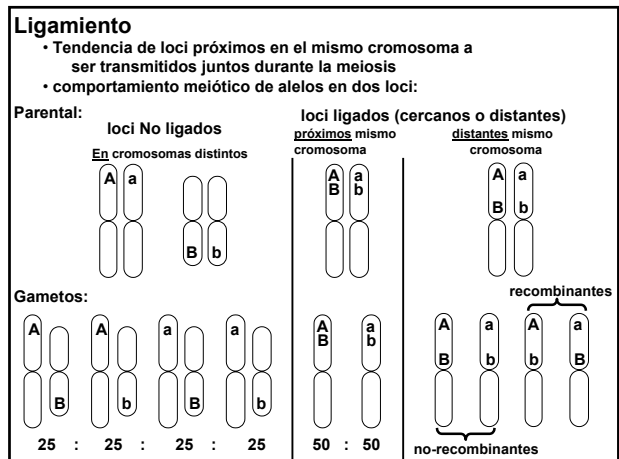
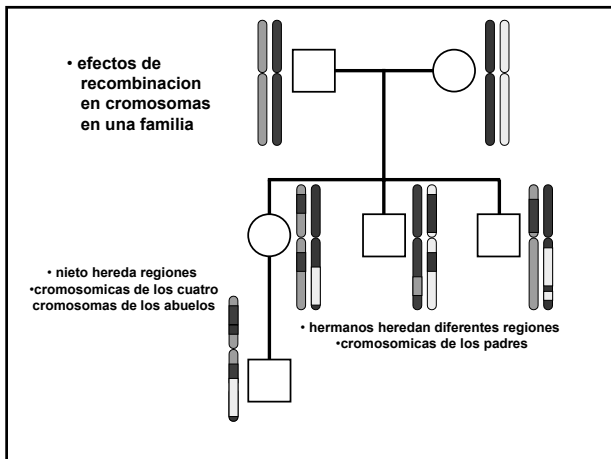
### Meiosis I



### Meiosis II

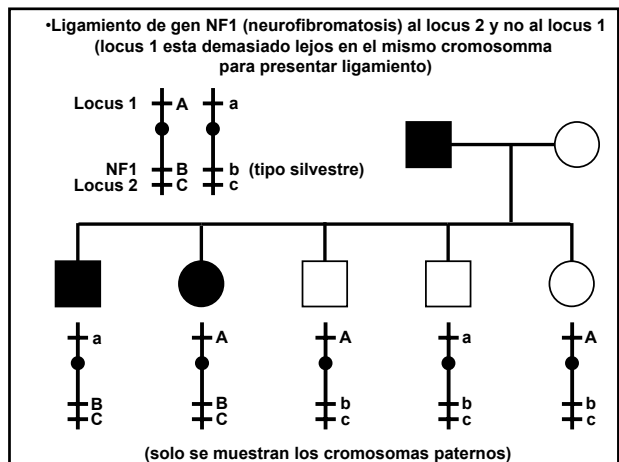






• El grado de ligamiento depende de la distancia

- distancia genética
  - una unidad de recombinación es un "Morgan"
  - Un Morgan es la distancia genética sobre la cual se da un fenómeno recombinatorio por meiosis
  - un centiMorgan (cM) es igual a 1% frecuencia de recombinación
- distancia física
  - un cM =  $\sim 10^8$  pares de bases de DNA (en humanos)
  - Como media se dan 1-3 recombinaciones por cromosoma por meiosis



### Polimorfismos y RFLPs

a). Alelos polimorficos

- Definiciones
  - alelo
  - polimorfismo
- Genes Polimorficos
  - antigenos Hematies
  - galactosa-1-phosfato uridil transferasa

b). Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs)

- Polimorfismos detectados cambios en sitios de corte
- Variable numbers of tandem repeats (VNTRs)
  - Número variable de repeticiones en tandem

c) Significado de los polimorfismos

### Alelos Polimorficos

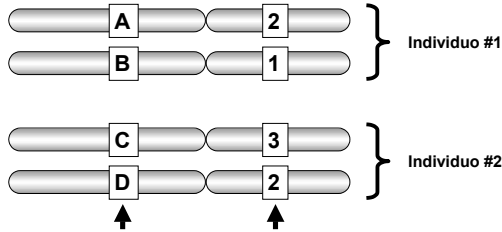
- definiciones
  - alelo cada una de las versiones alternativas de una secuencia de nucleótidos del DNA que puede estar en una determinada localización cromosómica
  - polimorfismo variación de la secuencia nucleótidos en sitios alélicos causado por **mutación puntual, delección, o inserción**

Decimos que un locus es polimorfismo cuando existe en la población **dos o más** genotipos alternativos -- un sitio es polimorfico si hay **dos o mas alelos** en al menos el 2% de la población

- Hay un **polimorfismo** en este cromosoma en el mismo locus alelos A y B

- puede haber mas de dos alelos por locus en la población, i.e.,
- A,B,C,D or A,B,O or G,g,C,D,LA or 1,2,3,4,5,6, etc., etc.

• **haplotipo** es la constitución alélica de múltiples loci en un cromosoma, i.e., A2, B1, C3, etc. Para los loci A,B,C,D y 1,2,3,4,5,6 alelos



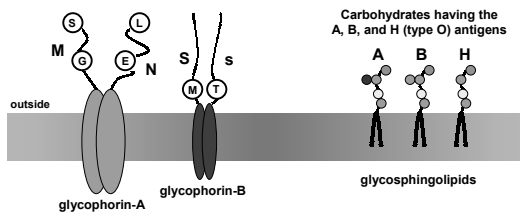
Loci cromosómicos con múltiples alelos

#### • Genes Polimórficos

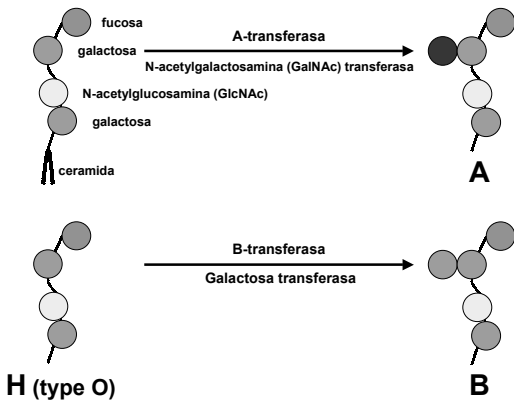
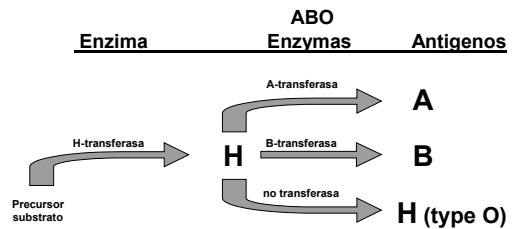
- frecuencia en el genoma humano
  - el número de polimorfismos existentes es de ~ 1 por cada 500 bp
  - $3 \times 10^9$  bp genoma haploide  $\rightarrow$  ~5.8 millones de diferencias
- alelos mutantes son los polimorfismos mas obvios: normal vs. anormal
- **variantes raras** son alelos que estan presentes en la población con una frecuencia <1% - la mayor parte de las mutaciones deletereas
- que dan lugar a enfermedades genéticas son variantes raras
- **heterogeneidad alélica**
  - son alelos mutantes en el mismo locus, cada uno capaz de producir un fenotipo anormal
- **mutaciones silentes** son polimorfismos que no dan fenotipo

#### Antígenos de hematias

Sistemas	Antígenos	Substratos
• ABO	oligosaccharides	glycosphingolipids
• Lewis	oligosaccharides	
• MN	amino acid sequences	glycophorin A
• Ss	amino acid sequences	glycophorin B
• Rh	amino acid sequences	



#### • biosíntesis de los antígenos ABO



#### • genética de los antígenos ABO

- los antígenos ABO resultan de tres alelos en un único locus
- El gen codifica dos variantes de glicosiltransferasas, y un tercer alelo del mismo gen produce una proteína no funcional
- alelos A y B difieren en cuatro pares de bases
  - A utiliza N-acetylgalactosamina
  - B utiliza galactosa
- alelo O se deriva de alelo A en una deleción de un par de bases:

ABO "A" alelo ...Leu-Val-Val-Thr-Pro...  
 ...CTC CTG GTG ACC CCT T...  
 un par de bases ↓ deleción  
 ...CTC GTG GT- ACC CCT T...

Deleción de un par de bases en el locus ABO, que codifica una glicosyltransferas, convierte 'A' en 'O'

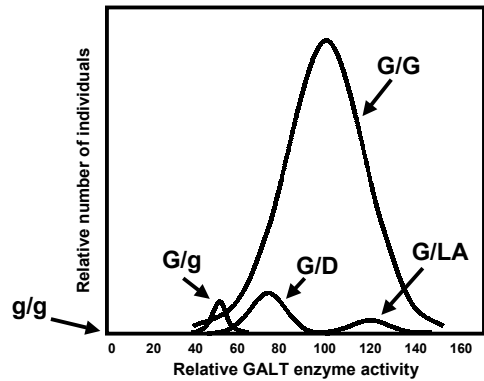
ABO "O" alelo ...CTC GTG GTA CCC CTT...  
 ...Leu-Val-Val-Pro-Leu...  
 cambio pauta de lectura  $\rightarrow$  no funciona proteína

### Genetic variation at the galactosemia locus

- gene encodes galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT)
- recessive mutation results in inability to metabolize galactose
- causes mental retardation and death
- some protection afforded by complete removal of milk from the diet
- variant alleles exist in addition to several galactosemia (g) alleles
- spectrum of enzymatic activities indicates that "normal" individuals do not all have the same enzymatic activity levels

Genotipo	Frecuencia	Enzima Actividad	Fenotipo
G/G	87.4%	100	Normal
G/D	7.5	75	Normal
G/LA	3.7	120	Normal
G/g	0.9	50	Normal
D/D	0.16	50	Normal
D/LA	0.16	95	Normal
LA/LA	0.04	140	Normal
D/g	0.04	25	Borderline
LA/g	0.02	70	Normal
g/g	0.0025	<5	Galactosemia

### Population distribution of "normal" GALT activities

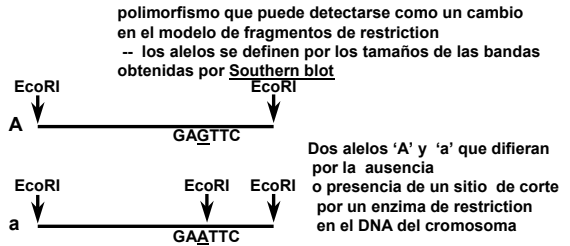


### Restriction fragment length polymorphism (RFLP) Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

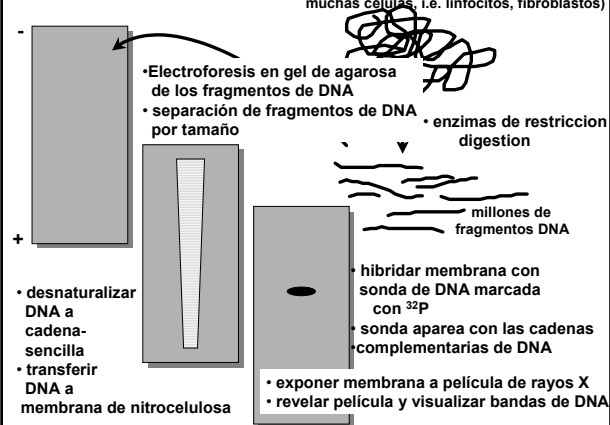
- un tipo de polimorfismo útil para:
  - mapeo de genes (marcadores genéticos)
  - predicción de riesgo de padecer una enfermedad
  - aislamiento de genes por clonaje posicional

### Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs)

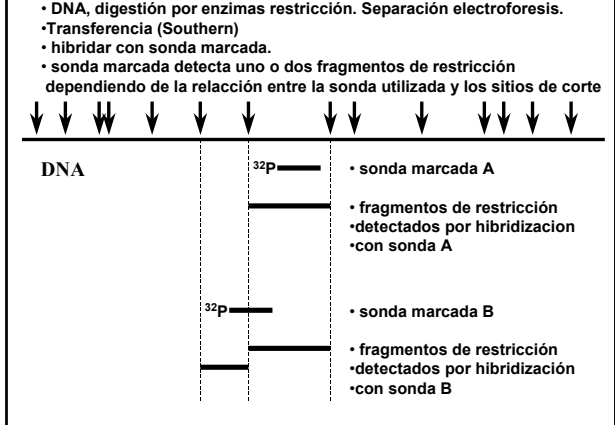
- Definiciones
  - polimorfismo variación de la secuencia nucleotidos en sitios alelicos causado por mutación puntual, delección, o inserción



### Southern blotting procedure



### Fragmentos detectados por Southern blotting



### Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs)

- RFLP
  - polimorfismo que puede detectarse como un cambio en el modelo de fragmentos de restricción
  - los alelos se definen por los tamaños de las bandas obtenidas por **Southern blot**
- Polimorfismo debido a la ausencia o presencia de un **único sitio de corte**:
  - “A” y “a” son los dos alelos en este polimorfismo

sitio polimorfico causado por creación / eliminación de un sitio de corte por un enzima de restricción

Polimorfismo detectado por Southern con la sonda marcada

- Polimorfismo debido a **variable number of tandem repeats (VNTR)**:
  - ‘A’, ‘B’, y ‘C’ son los alelos

Polimorfismo causado por delección / inserción de un número variable de repeticiones entre dos sitios de corte por un enzima de restricción

Polimorfismo detectado por Southern con la sonda marcada

- VNTRs son útiles porque frecuentemente son altamente polimorficos -- hay mas de dos alelos, i.e., A,B,C,D,E...

### Herencia de polimorfismos hipervariables

Southern blot usando una sonda para VNTR hipervariablese  
Cada individuo de este pedigree es heterocigoto en este locus

De Thompson & Thompson, "Genetics in Medicine"

### Significación de los polimorfismos

- Variación considerable en la población general
- Miles de polimorfismos existentes que se heredan independientemente
- Son posibles un enorme número de combinaciones de genotipos
- Cada individuo tiene una única composición química, secuencia única de bases de su genoma, determinada genéticamente.

### Significación médica de los polimorfismos

- Cada persona responderá de forma diferente al medio, a la dieta, y a los tratamientos farmacológicos

### Clonaje Posicional y Mapeo de genes

- Estrategias generales de mapeo
  - Mapeo genético
  - Mapeo físico
- Análisis de ligamiento por RFLPs
  - RFLPs ligados a genes enfermos
  - Valor predictivo de los RFLPs ligados
- Aislamiento de gen responsable por RFLPs ligados
  - Paseo Cromosómico
  - Criterios de identificación del gen enfermo
- Mapa físico de un gen
  - Análisis Citogenético
  - Fluorescence in situ hybridization (FISH)
  - Secuenciación completa del genoma

### Estrategias generales de mapeo

- Mapeo genético
  - definición: ordenamiento de genes en cromosomas de acuerdo a la frecuencia de recombinación
  - el mapeo genético puede requerirse antes de que se encuentren sondas útiles para mapeo físico
- Mapeo físico
  - definición: determinación de las distancias físicas entre genes (en pares bases de DNA) utilizando técnicas citogenéticas y moleculares
  - El mapeo físico se usa en último término para aislar el gen de interés

### RFLP análisis de ligamiento

- RFLPs proporcionan marcadores para todos los cromosomas humanos
- Genes de enfermedades pueden ser mapeados buscando ligamiento entre un RFLP determinado y el fenotipo enfermo

el polimorfismo A/a está ligado al gen causante de la enfermedad

AA	AA	homocigoto para 'A'
Aa	Aa	heterocigoto
aa	aa	homocigoto para 'a'

- En enfermedades dominantes, AA and Aa, estarán afectados
- En enfermedades recesivas, AA estarían afectados y Aa sería un portador

- Si se conoce en que cromosoma (y donde se encuentra en ese cromosoma) el RFLP, el gen enfermo puede ser determinado
- Este proceso mapea el gen
- Además establecer ligamiento ente un RFLP y el fenotipo enfermo permitirá
  - predicción de aquellos individuos con riesgo para enfermar
  - aislamiento del gen responsable por clonaje posicional

### Ligamiento permite hacer predicciones

- El polimorfismo A/a está ligado al gen que causa la enfermedad genética
- Aunque el gen no haya sido identificado o aislado, el ligamiento establecido puede tener valor predictivo
- 1º, determinar que alelo cosegrega con el fenotipo enfermo **dentro de la familia en estudio** -- puesto que puede haber recombinación es posible que el alelo "A" o el "a" esté ligado al gen enfermo. Admás puede haber familias en que sea el alelo A esté ligado al gen enfermo, y en otras familias esté ligado al alelo a.
- 2º, testar al probando (e.g., prenatal o presintomático) para determinar su genotipo. La predicción solo sirve para la familia concreta en estudio

- El probando tiene el mismo genotipo que su hermano y por tanto puede predicirse que padecerá la enfermedad
- la predicción tiene que ser cualificada, sin embargo, existe la posibilidad de recombinación entre los marcadores polimórficos y el gen enfermo
- la frecuencia de recombinación y por tanto la fiabilidad del marcador depende de la distancia entre el RFLP y el gen enfermo

### Análisis de ligamiento para neurofibromatosis (NF1)

■ = NF1 Banda superior en Southern blot está ligada al gen NF1

Southern blot

Banda superior es diagnóstica Banda inferior es diagnóstica

\* = recombinante

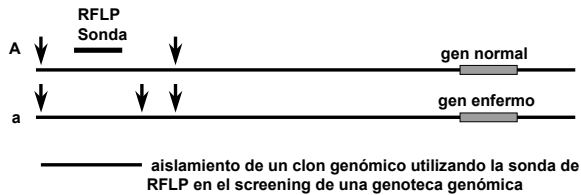
### Como se aísla un gen de una enfermedad hereditaria?

Hay tres opciones:

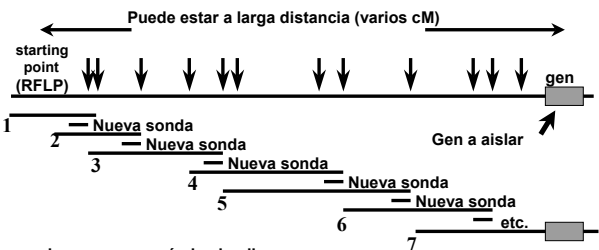
- Empezar con una proteína candidata  
DNA ← proteína
- Empezar con un mRNA candidato  
DNA ← mRNA
- Clonaje posicional directo  
DNA

### Aislamiento de genes con sondas RFLP ligadas (clonaje posicional)

- 1º aislamiento de un clon genómico usando como sonda el fragmento de DNA que detecta el RFLP.
- 2º aislamiento del gen que se encuentra más abajo en el cromosoma por paseo cromosómico



- digestiones parciales con enzimas de restricción permiten aislar
- clones solapantes



- el paseo cromosómico implica
  - aislamiento de un clon genómico
  - aislamiento del fragmento extremo del clon genómico
  - usar este fragmento para screening de una genoteca genómica
  - aislamiento de clones solapantes que vayan hacia abajo
  - repetir el proceso varias veces hasta encontrar el gen buscado
- el paseo cromosómico se acelera utilizando genotecas clonadas en cosmidos o YAC que contienen insertos grandes de DNA

### Criterios para la identificación positiva de un gen enfermo

- Presencia de una mutación
  - comparación de individuos normales y afectados
  - múltiples miembros normales y afectados deben ser examinados
  - la mutación candidata solo debe encontrarse en los afectados
- La mutación interrumpe la función del gen
  - mutación detectada debe ser capaz de impedir la expresión génica
  - debe distinguir entre polimorfismos benignos y mutaciones
  - este tipo de mutaciones pueden incluir: grandes deleciones, mutaciones en la pauta de lectura, mutaciones en los sitios de splicing, mutaciones sin sentido (aparición de codones de parada)
- La función anómala del gen candidato explica la patogénesis
  - el gen debe expresarse en los tejidos afectados en la enfermedad
  - Expresión analizada por:
    - Northern blot - mRNA
    - Western blot - proteína
  - la función del gen es consistente con la patología que se observa en la enfermedad (e.g., CFTR, distrofina)

### Criterios de identificación positiva

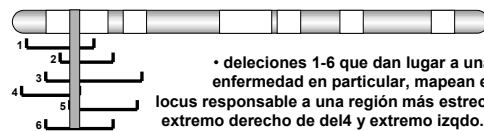
- Correlación de genotipo con fenotipo
    - diferentes mutaciones dan lugar a diferente severidad en síntomas
    - comparación entre diferentes familias (mutación-severidad)
  - Complementación génica y Reproducción de la enfermedad en animales
    - Células aisladas de los pacientes recuperan la función al transferir el gen normal.
    - Modelo en ratón de la enfermedad: interrupción de la función del gen homólogo de ratón reproduce la enfermedad en ratones
  - Corrección del defecto, cura la enfermedad:
    - Terapia génica
- Este es el último criterio de que el gen responsable ha sido identificado

### ¿Qué otras cosas se puede hacer con un gen aislado por clonaje posicional?

- Mapear el gen a su región cromosómica y determinar si se correlaciona con un sitio donde se conozca que exista una anomalía citogenética
  - Análisis citogenéticos
  - Hibridación in situ contra cromosomas (FISH)
- Estudiar las anomalías del gen en diferentes casos de la misma enfermedad y diseñar estrategia diagnóstica para detección de mutaciones en otros individuos, mediante las siguientes técnicas
  - digestión con enzimas de restricción y Southern blot
  - Secuenciación directa
  - Análisis con oligonucleótidos específicos de alelo (ASO)
  - Análisis por PCR

### Análisis citogenético

- mapeo de deleción: varias deleciones dan el mismo fenotipo



- análisis de los puntos de ruptura y translocaciones





**Fluorescence in situ hybridization (FISH)**

- sonda de DNA marcada con fluorescencia se hibrida con cromosomas metafásicos (resolución 1-2 million bases)
- se usa para determinar
  - si hay material génico que falta (delección) o duplicación

• la sonda hibrida con el cromosoma normal, pero no con los cromosomas delecionados, indicando que el gen se localiza en la pequeña región común entre las deleciones 4 & 5

- localización cromosómica de genes

• la sonda hibrida a ambos puntos de ruptura de los cromosomas indicando que el punto de ruptura está dentro del gen

**FISH**      STS      translocación tras ruptura

Sonda del punto de ruptura del Chr. 19

Derivado Chr.11      Chr. 19 normal

Derivado Chr 19

**Detección de  $\Delta$  F508 en fibrosis quística por ASO**

Normal alelo

CF alelo

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

- Cebadores diseñados para flanquear la region a amplificar
- Cebadores (primers) se anillan con el DNA desnaturalizado
- DNA se sintetiza con Taq polimerasa (de *Thermus aquaticus*)
- Cebadores anillan de nuevo y el proceso se repite 20 o 30 ciclos, amplificándose la secuencia diana de interés
- DNA resultante se analiza por electroforesis en gel

1).

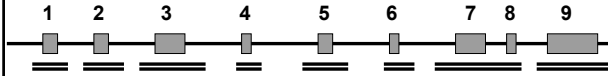
2).

3).

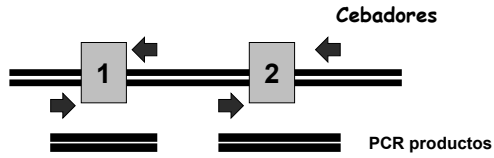
4).

**Detección de deleciones en Lesch-Nyhan por multiplex PCR**

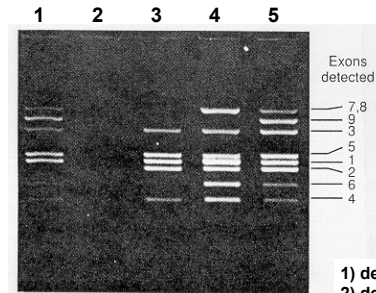
• exones en el gen HGPRT (HPRT)



- productos PCR resultantes del uso de cebadores múltiples -- cada producto está flanquado por sus correspondientes cebadores de izda. y derecha
- ejemplos para exones 1 y 2:



**Detección de Lesch-Nyhan deleciones por Multiplex PCR**



- Exons detected
- 7,8
  - 9
  - 3
  - 5
  - 1
  - 2
  - 6
  - 4
- 1) deleción de exon 2
  - 2) deleción total del gen
  - 3) deleción de exones 6-9
  - 4) deleción de exon 9
  - 5) normal