

Genetyka molekularna - zmiennność materiału genetycznego

Monika Gos

Zakład Genetyki Medycznej

Instytut Matki i Dziecka

Kurs: Genetyka i genomika w codziennej praktyce lekarskiej.



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

Zmienność

występowanie różnic – dziedzicznych lub niedziedzicznych pomiędzy:

- komórkami danego organizmu – **zmienność wewnątrzosobnicza**
- osobnikami z tej samej populacji – **zmienność osobnicza**
- populacjami – **zmienność grupowa**

Zmienność fenotypowa – osobnicza

- fluktuacyjna – opisywana przez cechy ciągłe
- alternatywna – cechy jakościowe (jest/nie ma)



CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE
CZYNNIKI GENETYCZNE (polimorfizmy, mutacje)

Czynniki genetyczne warunkujące zmienność

Rekombinacja

- każdy proces, w którym dochodzi do pęknięcia nici DNA i następującej po tym wymiany fragmentów DNA pomiędzy chromosomami homologicznymi lub pojedynczymi cząsteczkami DNA
- procesy: mejoza (replikacja DNA), mitoza, koniugacja
- nie prowadzi do powstania nowych alleli, tylko do ciągłego tasowania kombinacji genotypów

Mutacje

- mutacja - zmiana w sekwencji DNA
- prowadzi do powstania nowych alleli (efekt obojętny lub zmiana)

Mutacja – 1909 Henri de Vries

Poziom mutacji	• <i>mutacje genowe</i> – zmiana sekwencji nukleotydowej w obrębie genu • <i>mutacje chromosomowe</i> – zmiany liczby i struktury chromosomów; aberracje chromosomowe • <i>mutacje genomowe</i> – dotyczące całego genomu; poliploidia (autopoliploidia lub allopoliplidia)
Sposób powstania	• <i>mutacje spontaniczne</i> – powstające w wyniku błędów polimerazy (replikacja) 1×10^7 nt (1×10^{10}-10^{11}nt) • <i>mutacje indukowane</i> – oddziaływanie mutagenu na komórkę
Dziedziczenie	• <i>mutacje germinalne</i> – mutacje przekazywane potomstwu; mogą być przyczyną chorób dziedzicznych (mutacje letalne) • <i>mutacje somatyczne</i> – eliminacja wraz ze śmiercią komórki lub organizmu; niedziedziczne (NOWOTWORY)

Aberracje chromosomowe

- nieprawidłowości chromosomów
- aberracje liczbowe
 - poliploidia (69,XXY)
 - aneuploidia (47,XY,+21; 47,XXY)
- aberracje strukturalne (zrównoważone / niezrównoważone)
 - translokacje
 - inwersje
 - delecje
 - insercje/duplikacje
 - izochromosomy
 - chromosomy pierścieniowe
 - chromosomy dicentryczne
 - chromosomy markerowe

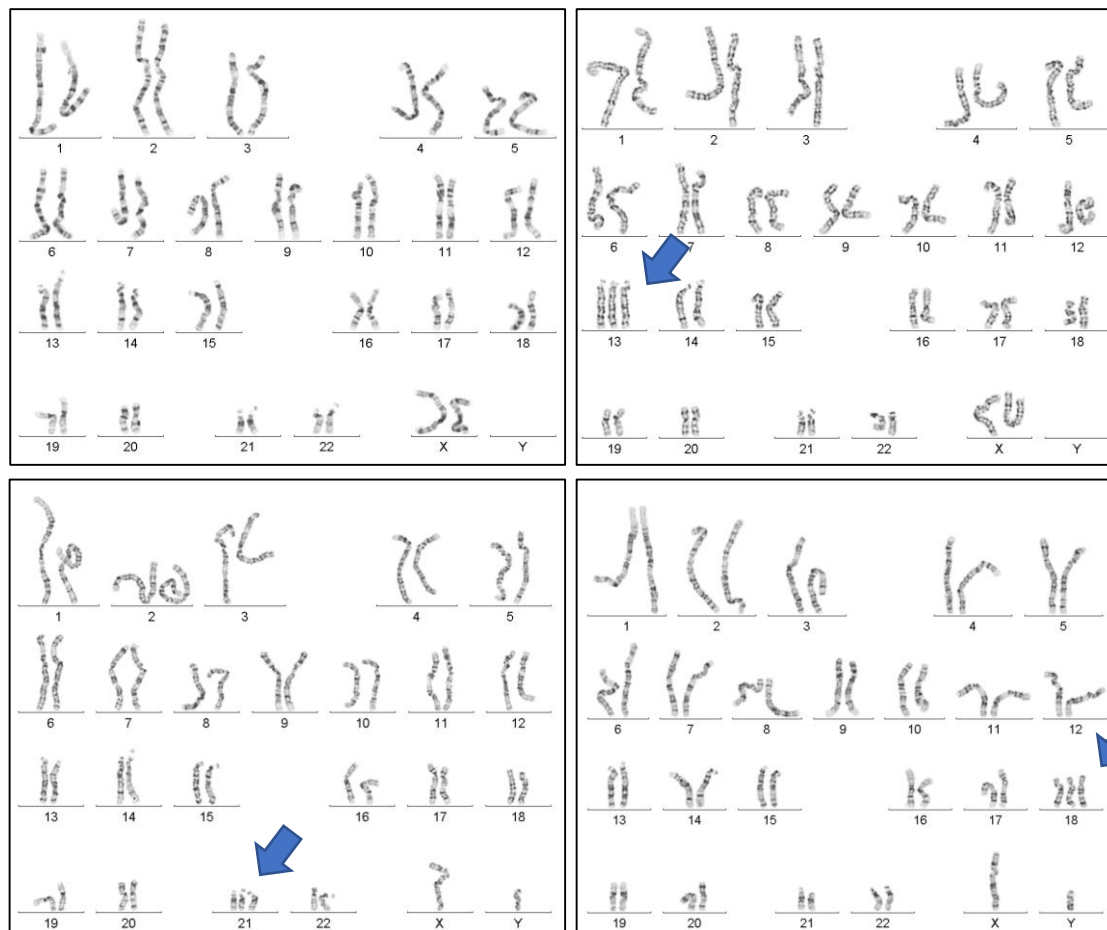
Analiza kariotypu



Rozdzielczość:

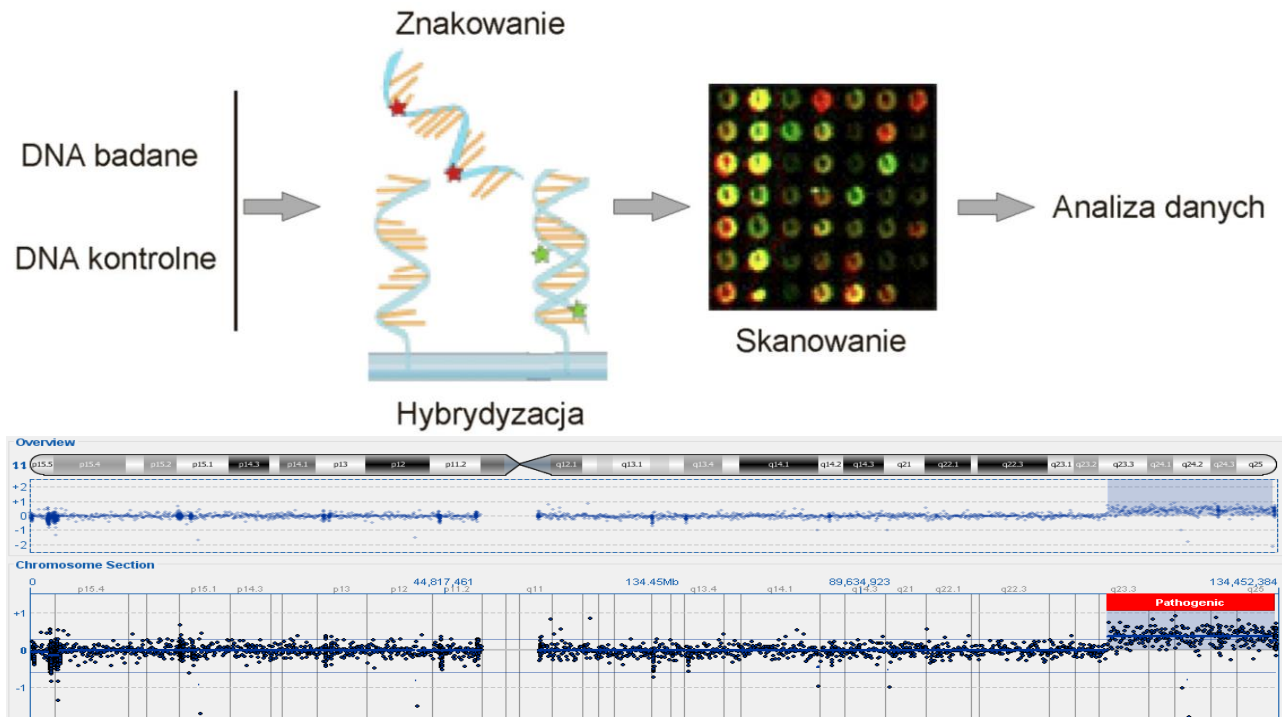
400 prążków – $7-10 \times 10^6$

850 prążków – $3-5 \times 10^6$



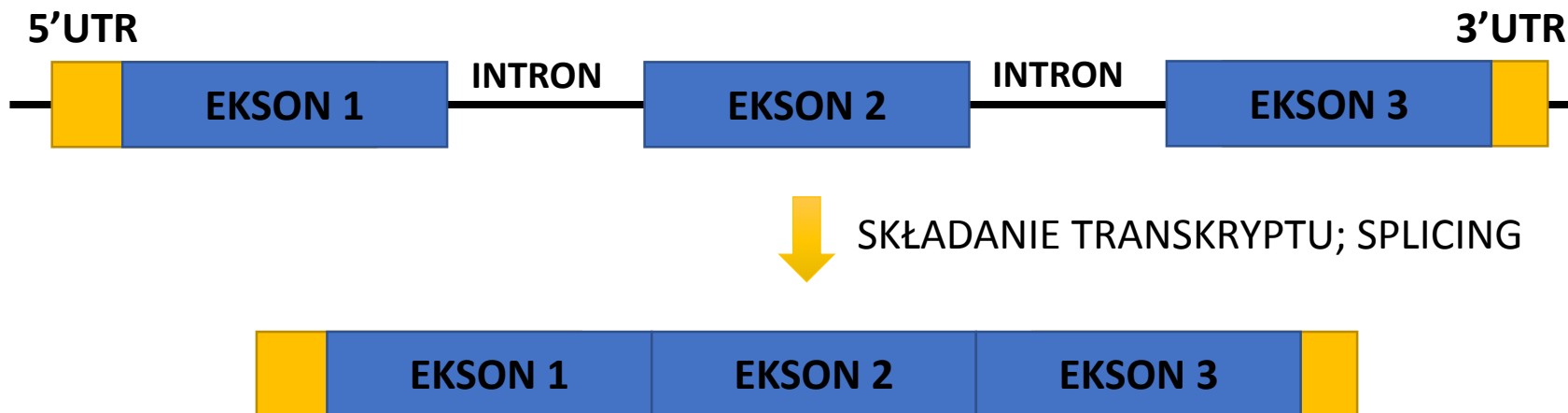
Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (aCGH)

- badanie niezrównoważenia genomu (mikrodelecje/mikroduplikacje)
- rozdzielczość: < 100kpz



Mutacje genowe (choroby monogenowe)

- zmiany w obrębie genów – zazwyczaj w sekwencji kodującej (eksonach) lub w regulatorowych sekwencjach intronowych
- głównie mutacje punktowe – do 10nt
- rzadziej większe delecje / duplikacje obejmujące jeden lub kilka eksonów



Typy mutacji w sekwencji kodującej

sekwencja referencyjna

GGG GAG AAC TAC ...
G E N Y
Gly Glu Asn Tyr ...

duplikacja/insercja

GGG GGA GAA CTA C..
G G E L
Gly Gly Glu Leu ...

delecja

GGG  AGA ACT ACG ...
G R T T
Gly Arg Thr Thr ...

mutacja typu missens

GGG GAG TAC TAC ...
G E Y Y
Gly Glu Tyr Tyr ...

mutacja typu nonsense

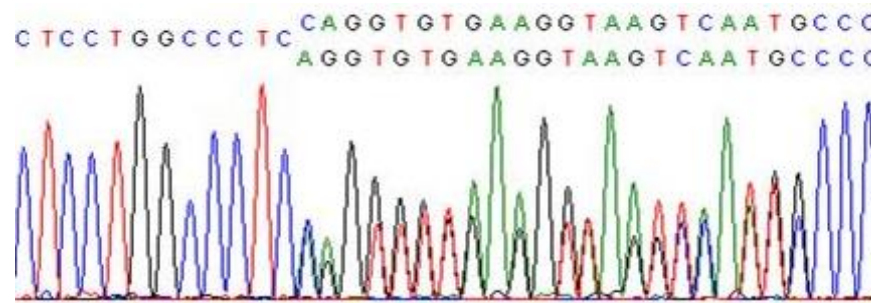
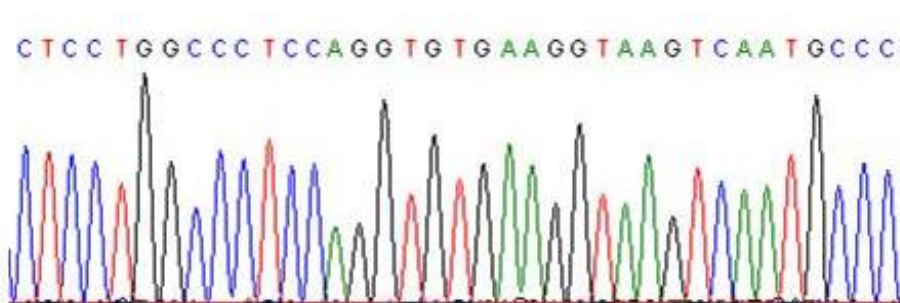
GGG GAG AAC TAG ...
G E N *
Gly Glu Asn STOP

mutacja synonimiczna / cicha

GGC GAG AAC TAC ...
G E N Y
Gly Glu Asn Tyr ...

Sekwencjonowanie I generacji

- proces odczytu dokładnej sekwencji nukleotydowej fragmentu DNA
- I sekwencje – początek lat 70-tych (chromatografia dwuwymiarowa)
- technika sekwencjonowania metodą Sangera
- sekwencjonowanie pierwszej generacji
- matryca: produkt reakcji PCR (powielenia badanego fragmentu DNA)
- opis mutacji zgodny z wytycznymi Human Genome Variation Society (HGVS)



Sekwencjonowanie następnej generacji

- wysokoprzepustowe sekwencjonowanie równoległe (NGS)
- sekwencjonowanie genomów *de novo*, resekwencjonowanie (WGS, WES, T-NGS)

Parametr	Genom	Eksom	Eksom kliniczny	Celowane NGS
koszt	++	++	++	+
pokrycie	+	++	+++	++++
wpływ wzbogacania sekwencji	-	+	+	+
praca w laboratorium	1 biblioteka/ wiele chorób	1 biblioteka/ wiele chorób	1 biblioteka/ wiele chorób	1 biblioteka/ 1 lub kilka chorób
Ilość danych	++++	+++	++	+
CNV	+ (strukturalne)	+/-	+/-	+/-
nowe geny ?	+	+	-	-

Analiza bioinformatyczna

pliki *.bcl → plik *.fastq (CASAVA, bcl2fastq, basespace)

dopasowanie wygenerowanych przez sekwenator sekwencji do genomu referencyjnego (hg19,hg38)

plik *.bam (BWA)

analiza sekwencji pod kątem obecności zmian – podstawień pojedynczych nukleotydów lub insercji / delecji + anotacja

plik *.vcf (m.in. GATK, SAMTools)

analiza funkcjonalna – odniesienie do populacyjnych baz danych (1000Genomes, EVS/NHLBI, ExAC, ClinVar), analiza predykcyjna

plik Excel (*.tsv, *.txt, *.csv) lub oprogramowanie komercyjne

wybór wariantu związanego z patogenezą choroby

Bazy danych przydatne w analizie NGS

- Bazy populacyjne: in-house, gnomAD

<https://gnomad.broadinstitute.org/>

- Bazy kliniczne

ClinVar - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

HGMD - <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

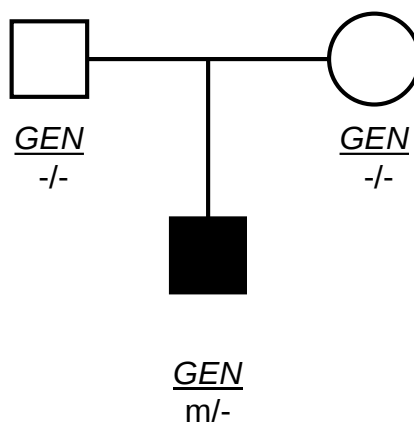
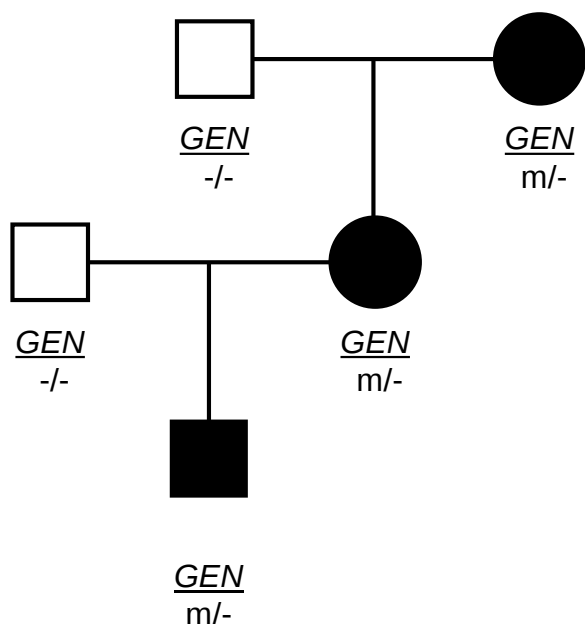
OMIM - <http://www.omim.org/>

- Programy predykcyjne – nie zastąpią analizy funkcjonalnej i analizy kosegregacji (dostępne także online)

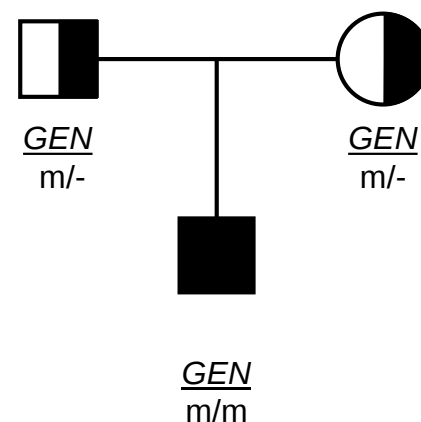
Jak sprawdzić czy wariant jest patogenny?

Analiza dziedziczenia wariantu w rodzinie

Dziedziczenie
autosomalne
dominujące

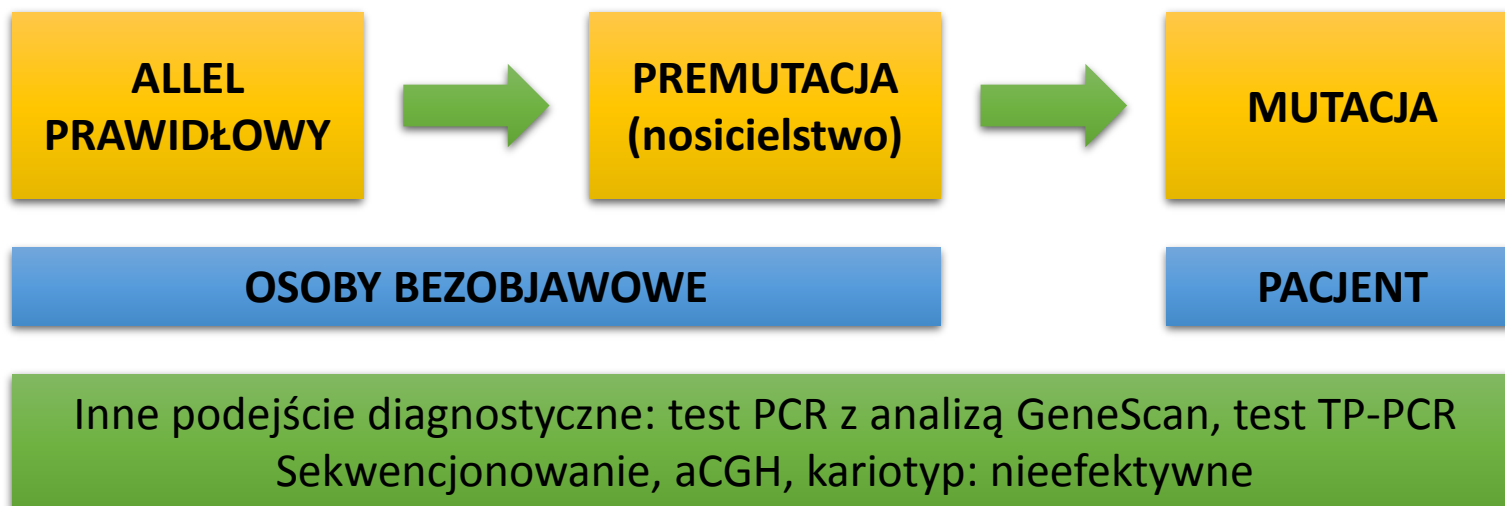


Dziedziczenie
autosomalne
recesywne



Mutacje dynamiczne

- zwielokrotnienie ciągu nukleotydowego w określonym genie, związane z wystąpieniem objawów klinicznych



Zaburzenia piętna genomowego

Piętno genomowe (imprinting) – ekspresja określonych genów jest zależna od ich pochodzenia rodzicielskiego i zachodzi wyłącznie z kopii genu pochodzącej od matki lub od ojca.

Zaburzenia piętna genomowego – nieprawidłowa ekspresja genów (brak lub ++)
Zaburzenia wzrastania / zaburzenia neurologiczne

