

TEMA 7

Detecció de lligament en humans

1. Anàlisi de lligament en pedigrís
2. Puntuació LOD
3. Híbrids en cèl·lules somàtiques d'home-ratolí
4. Resolució de problemes

1. Anàlisi de lligament en pedigrís

L'anàlisi de lligament en humans s'enfronta amb el problema que no es poden realitzar encreuaments dirigits. És per això que s'ha utilitzat l'anàlisi de genealogies per determinar si existeix lligament entre gens (co-segregació).

Una de les primeres demostracions es va realitzar per al locus de la síndrome unglaròtula i el que determina el grup sanguini AB0:

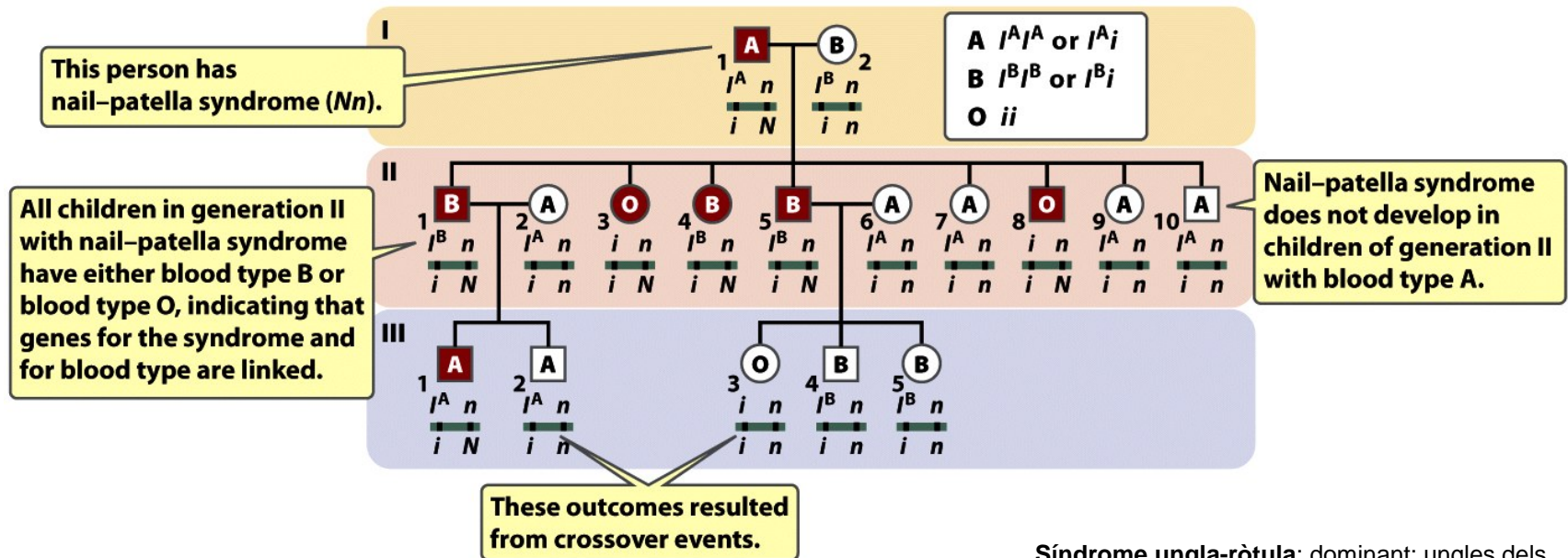


Figure 7-19
 Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition
 © 2009 W. H. Freeman and Company

Síndrome unglaròtula: dominant; unglles dels peus deformades i ròtules absents o rudimentàries

En el cas de la família anterior, podríem fer una primera estimació sobre el lligament entre els dos loci.

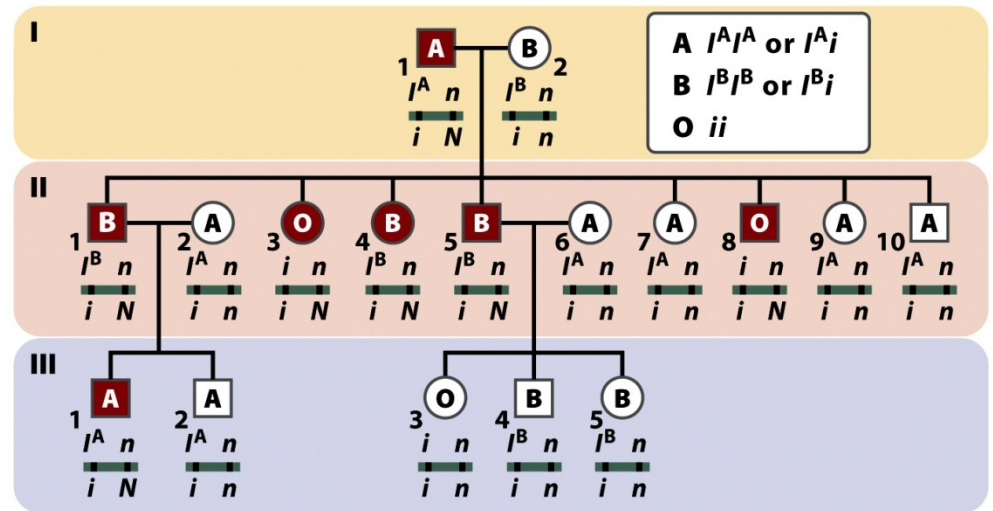


Figure 7-19
 Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition
 © 2009 W. H. Freeman and Company

En el cas de la família anterior, podríem fer una primera estimació sobre el lligament entre els dos loci.

De 13 descendents directes, només 2 serien recombinants. Per tant, $D = 2/13 \times 100 = 15,4$ u.m.

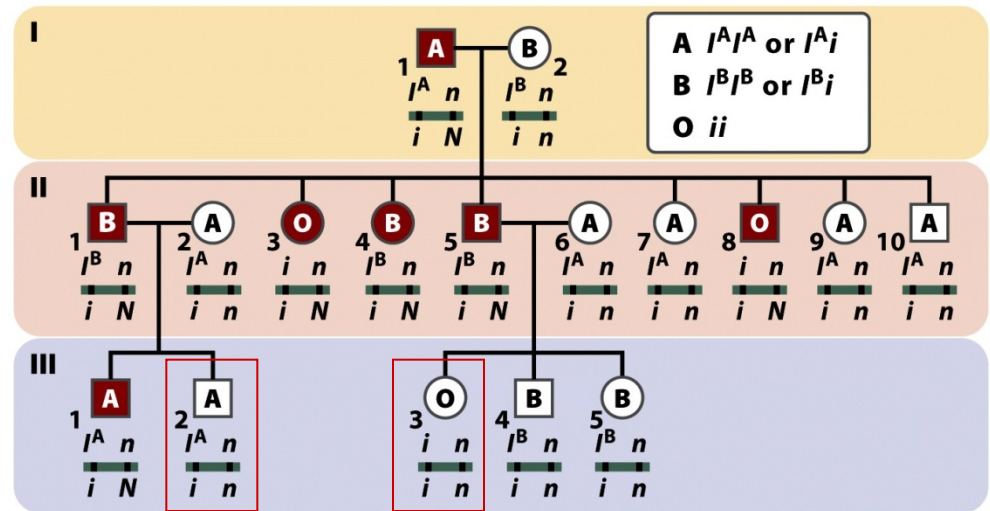


Figure 7-19
 Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition
 © 2009 W. H. Freeman and Company

Però també podria passar que, per mer atzar, tots els individus afectats en una família haguessen heretat el mateix al·lel del marcador (en el nostre cas, del grup sanguini) i tots els no afectats l'altre al·lel, encara que el marcador no estiga lligat al gen responsable.

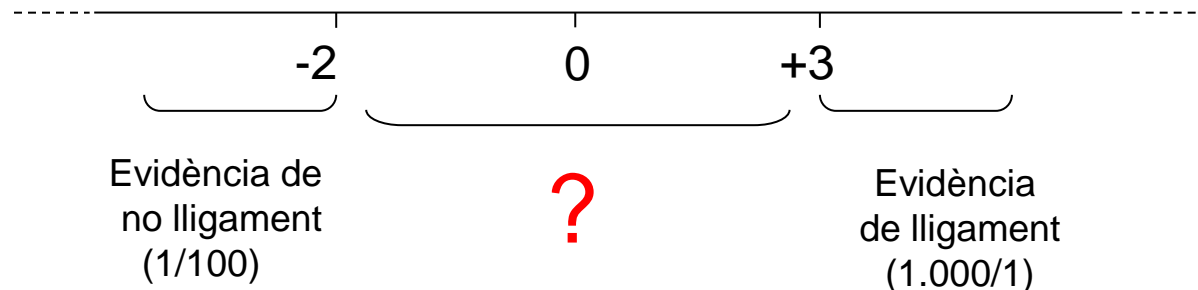
Per discenir entre les dues possibilitats es requereix una anàlisi estadística (càlcul de la puntuació LOD) que ens diga com de més probable és el lligament respecte de la segregació independent.

2. Puntuació LOD

La puntuació LOD (de l'anglès *Log of Odds*, LOD, score) és un estadístic que ens indica quantes vegades és més probable que el resultat obtingut en el pedigrí es dega a lligament que al mer atzar.

$$z = \text{puntuació LOD} = \log_{10} \frac{\text{Probabilitat del resultat observat per a una FR} = \theta}{\text{Probabilitat del resultat observat per a una FR} = 0,5}$$

Qualsevol $z > 0$ suggereix que hi ha lligament. Si $z < 0$ indica que θ s'ha subestimat. En general, es considera una evidència ferma de lligament si $z \geq 3$, i que no n'hi ha si $z \leq -2$



Vejam com s'aplicaria a la família amb la síndrome unglà-ròtula, per a la qual hem proposat que hi havia dos recombinants d'un total de 13 descendents.

$$z = \log_{10} \frac{P \text{ per a una FR} = \theta}{P \text{ per a una FR} = 0,5}$$

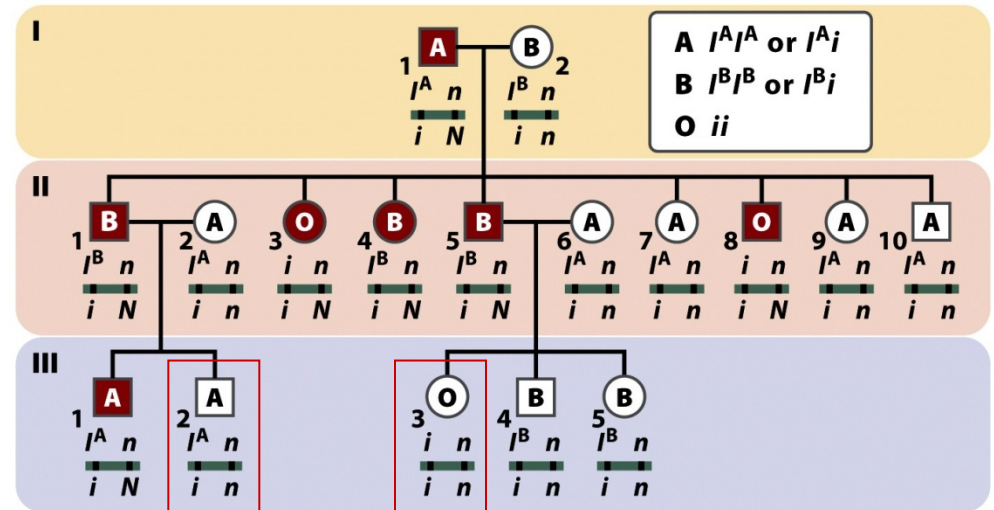


Figure 7-19
 Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition
 © 2009 W. H. Freeman and Company

Per calcular la puntuació LOD necessitem partir d'un valor de θ . Com que no ho sabem a priori, haurem de fer els càlculs suposant diferents valors per θ i buscar el que proporciona una z més alta (la màxima probabilitat que hi hagi lligament).

Comencem per $\theta = 0,15$, el valor obtingut mitjançant l'estimació grollera de dividir el nombre de recombinants entre el total (2/13).

La probabilitat d'aparició de cadascun dels genotips dels descendents serà:

En el cas de lligament:

$$P_{\text{rec}} = 0,15 / 2 = 0,075$$

$$P_{\text{no rec}} = (1 - 0,15) / 2 = 0,425$$

Si no hi ha lligament: $P = 1/4 = 0,25$

$$z = \log_{10} \frac{P \text{ per a una FR} = \theta}{P \text{ per a una FR} = 0,5} = \log_{10} \frac{(0,075)^2 \cdot (0,425)^{11}}{(0,25)^{13}} = \log_{10} 30,84 = 1,49$$

evidència baixa de lligament

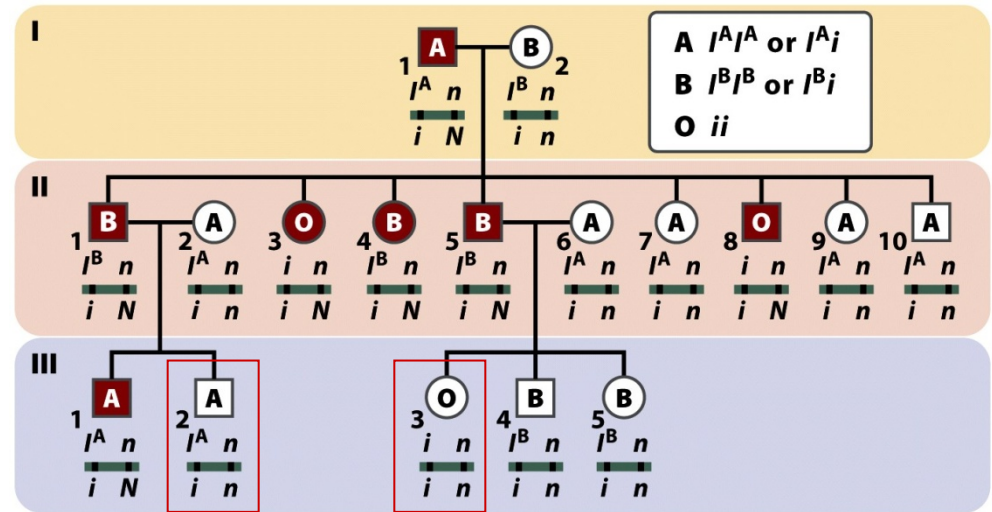
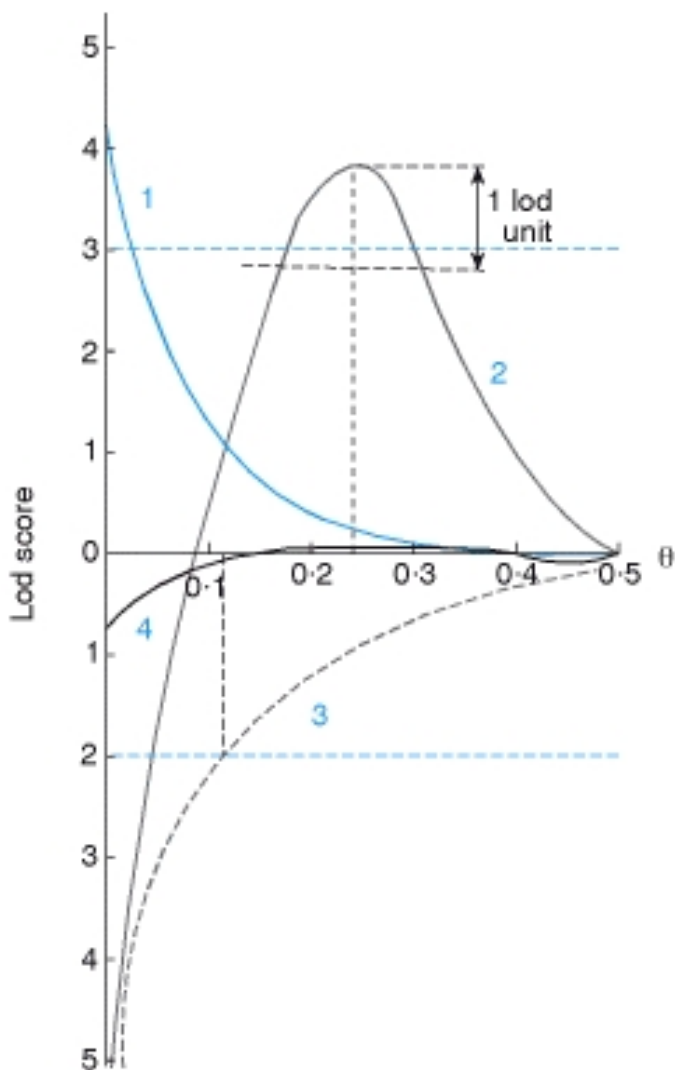


Figure 7-19
Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition
© 2009 W. H. Freeman and Company

Es divideix per 2 perquè per a cada entrecreuant hi ha dos gàmetes recombinants diferents. El mateix passa amb els gàmetes no recombinants.

Per veure si podríem obtenir el valor més alt de z , deuríem provar diferents valors de θ :

θ	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
z	1,07	1,41	1,49	1,45	1,33	1,16



valor més alt

En general, quan es poden identificar els recombinants, la freqüència de recombinants observada és la que ens donarà la z màxima.

La figura mostra diferents casos hipotètics:

Corba 1: evidència de lligament ($Z > 3$) sense recombinants.

Corba 2: evidència de lligament ($Z > 3$) amb una FR més probable de 0,23 (interval de confiança = valor Lod màx. -1).

Corba 3: exclusió de lligament ($Z < -2$) per a FR per sota de 0,12; ambigua per a FR majors.

Corba 4: ambigua per a totes les FR.

Per al nostre exemple, encara que se suggereix lligament, no podríem acceptar els resultats ($z = 1,49$) com una evidència ferma.

No obstant això, sí que podríem afegir més famílies que segreguen per a aquest mateix caràcter i sumar els valors z per veure si es poguera arribar a un valor >3 .

En el supòsit de famílies amb les mateixes característiques:

Per a una $z = 1,5$ necessitaríem dues famílies.

Per a una $z = 1$ necessitaríem tres famílies.

Per a una $z = 0,5$ necessitaríem sis famílies.

Hi ha malalties molt rares per a les quals no es pot trobar el nombre suficient de famílies per determinar amb certesa si hi ha o no lligament.

3. Híbrids en cèl·lules somàtiques d'home-ratolí

És una tècnica que s'ha fet servir des de 1970 per assignar gens humans als seus respectius autosomes.

Consisteix en hibridar cèl·lules humanes amb cèl·lules de ratolí o hámster.

Únicament els cromosomes humans es perden fins que la línia cel·lular s'estabilitza.

Les diferents línies cel·lulars es fan servir en conjunt per veure quines proteïnes humanes s'expressen i relacionar el resultat amb els cromosomes humans presents.

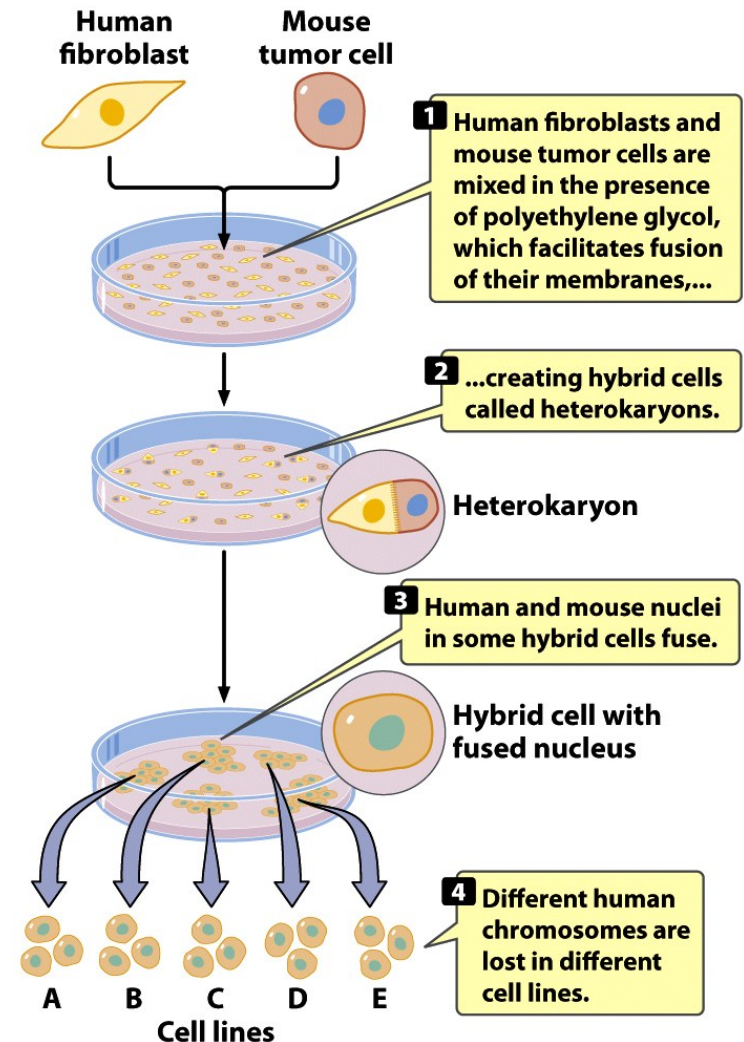


Figure 7-21
Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition
© 2009 W. H. Freeman and Company

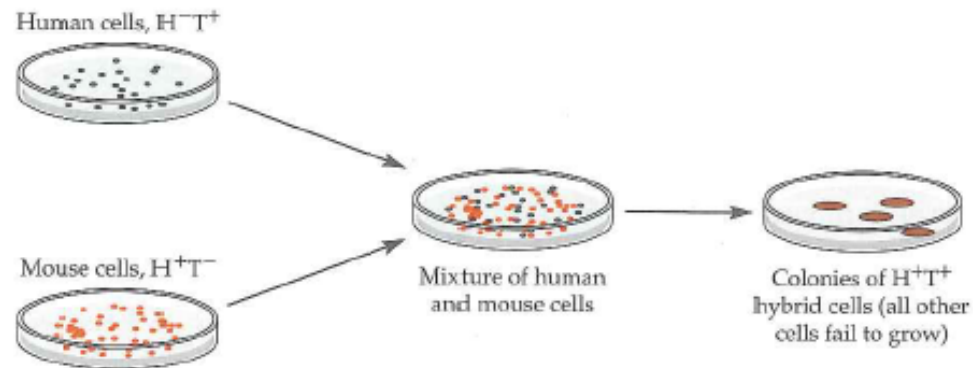
Per fer servir aquesta tècnica es requereix:

1. Poder seleccionar únicament les cèl·lules híbrides.
2. Identificar els cromosomes humans de cada línia cel·lular.
3. Ser capaços d'identificar el gen a través del seu producte proteic.

Per fer servir aquesta tècnica es requereix:

1. Poder seleccionar únicament les cèl·lules híbrides.
2. Identificar els cromosomes humans de cada línia cel·lular.
3. Ser capaços d'identificar el gen a través del seu producte proteic.

Per establir un panell d'híbrids somàtics que porten, en conjunt, tots els cromosomes humans, primer haurem d'haver eliminat les cèl·lules de ratolí i les cèl·lules humanes que no hagen hibridat. Per a això s'utilitza un medi selectiu que només permet créixer les cèl·lules híbrides:



- Les cèl·lules humanes són deficitàries en l'enzim hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (H^{-}).
- Les cèl·lules de ratolí són deficitàries en l'enzim timidina kinasa (T^{-}).

Per fer servir aquesta tècnica es requereix:

1. Poder seleccionar únicament les cèl·lules híbrides.
2. Identificar els cromosomes humans de cada línia cel·lular.
3. Ser capaços d'identificar el gen a través del seu producte proteic.

La identitat dels cromosomes humans es pot determinar de diferents maneres:

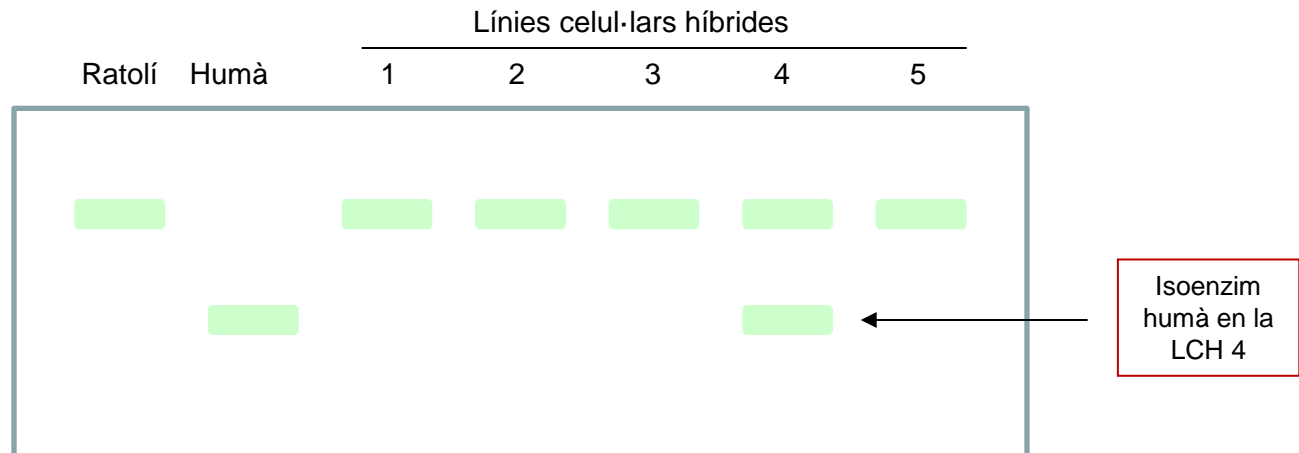
- bandeig cromosòmic
- anàlisi de marcadors específics de cromosomes per PCR

Per fer servir aquesta tècnica es requereix:

1. Poder seleccionar únicament les cèl·lules híbrides.
2. Identificar els cromosomes humans de cada línia cel·lular.
3. Ser capaços d'identificar el gen a través del seu producte proteic.

La identificació de la presència d'un gen concret en una de les línies cel·lulars híbrides es realitza normalment mitjançant la identificació de la proteïna humana en un patró d'isoenzims separats per electroforesi.

Per obtenir el patró d'isoenzims a partir d'un extracte cel·lular, el gel es revela amb un substrat específic per a aquest enzim.



Exemple: d'acord amb els resultats obtinguts en la taula, assignar el gen en qüestió a algun cromosoma.

Human chromosomes present

Cell line	Gene product present	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X		
A	+		+		+			+	+																	
B	+	+	+		+				+	+	+	+	+	+												
C	-															+		+		+				+		
D	+		+		+		+	+	+																	
E	-												+												+	
F	+				+																+	+				

Figure 7-22

Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition

© 2009 W. H. Freeman and Company

Solució: El gen es troba en el cromosoma 4.