

# Identifikation von Krankheitsgenen bei monogenen Erkrankungen

Definition eines Kandidatengens



Mutationsanalyse von genomischer- oder  
cDNA bei miteinander nicht verwandten  
Patienten



Identifikation der, zu der entsprechenden  
Erkrankung führenden Mutation

# Identifikation von Krankheitsgenen bei monogenen Erkrankungen

1. Positionsunabhängige Strategien
3. Positionsabhängige Strategien
5. Kombination von positionsunabhängigen- und positionsabhängigen Strategien
7. Mutationsanalyse
9. Weitere Möglichkeiten um eine Verbindung zwischen Gen und Phänotyp zu beweisen

# 1. Positionsunabhängige Strategien

- 1.1. die biochemische Basis und damit das entsprechende Protein sind bekannt
- 1.2. Ein Kandidatengen aufgrund funktioneller Hinweise kann definiert werden
- 1.3. Komplementation spezifischer Defekte durch cDNAs oder genomische Klone in Zellsystemen, Hefe oder Tieren
- 1.4. Subtraktionsklonierung mit genomischer- oder cDNA

# 1. Positionsunabhängige Strategien

## 1.1 die biochemische Basis ist bekannt:

z.B. bei Stoffwechseldefekten kann man aus dem Produkt, das sich anreichert und dem Stoffwechselweg auf das Protein schließen, das wahrscheinlich verändert ist



### Bioinformatik:

- b. Absuchen der Proteindatenbanken anhand spezifischer Proteinmotife
- c. Übersetzen der Proteinsequenzen in cDNA-Sequenzen (Abgleich Proteindatenbanken mit Nukleotiddatenbanken)
- d. Definition der Kandidatengene

### Biochemie:

- b. Isolation des entsprechenden Proteins
- c. Massenspektrometrie bzw. MALDI-TOF oder Aminosäuresequenzieren
- d. Identifikation des Proteins durch Vergleich mit Proteindatenbanken
- e. Übersetzen der Proteinsequenzen in cDNA-Sequenzen (Abgleich Proteindatenbanken mit Nukleotiddatenbanken)
- f. Definition der Kandidatengene



### Biochemie: z.B. Phenylketonurie

- b. Isolation des entsprechenden Proteins
- c. Generieren eines spezifischen Antikörpers
- d. Immunopräzipitation: Präzipitation eines ribosomalen Komplexes, der das Protein und die entsprechende mRNA enthält
- e. cDNA-Synthese und Sequenzierung

# 1. Positionsunabhängige Strategien

## 1.2. Ein Kandidatengen aufgrund funktioneller Hinweise kann definiert werden

Ein transgenes Tier mit einem bekannten Defekt (knock-out oder transgen) hat eine vergleichbaren Phänotypen

Man kann anhand des spezifischen Phänotyps (und Vergleich mit Erkrankungen mit ähnlichen Phänotypen) auf die betroffene Signalkaskade schließen

Man kann anhand des Phänotyps auf die mögliche Proteinfunktion schließen (Vergleich mit Zellkulturdaten oder funktionellen Untersuchungen in Modellorganismen)

Bei Triple-repeat-Erkrankungen kann man das betroffene Gen über eine Erkennung der verlängerten Triple-repeats identifizieren

# 1. Positionsunabhängige Strategien

## 1.3. Komplementation spezifischer Defekte durch cDNAs oder genomische Klone in Zellsystemen, Hefe oder Tieren

Zufälliges Einbringen eines Funktionsverlustes in Säugerzellen, Hefe oder Tieren



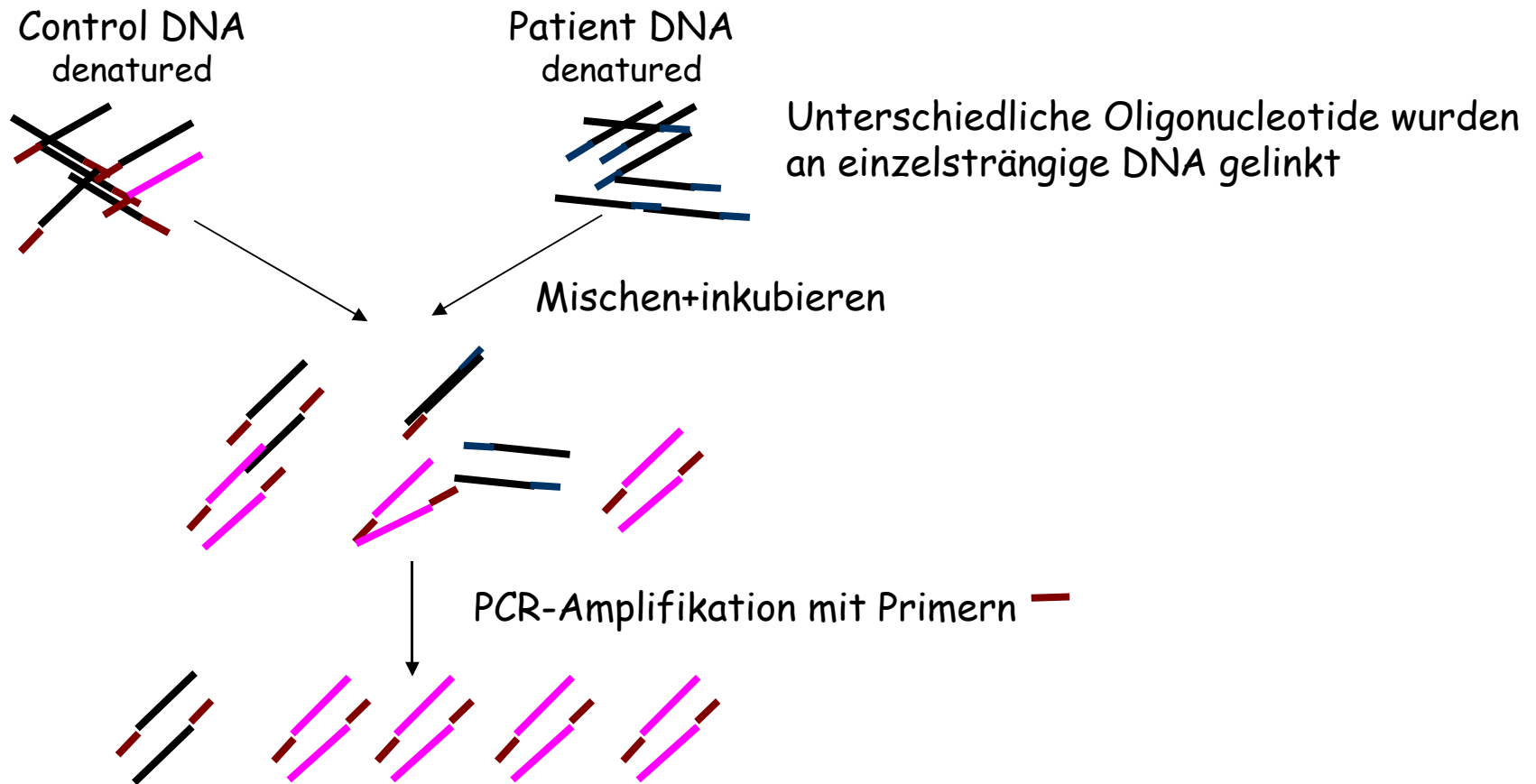
Einbringen verschiedener cDNAs oder genomischer Klone in die entsprechenden Zellen



Identifikation der Klone, die die Funktion reparieren können (Komplementation)

# 1. Positionsunabhängige Strategien

## 1.4. Subtraktionsklonierung mit genomischer- oder cDNA



Das im Patienten deletierte Stück wird vermehrt amplifiziert

## 2. Positionsabhängige Strategien

### 2.1. Identifikation der chromosomalen Lokalisation

2.1.1. Chromosomale Lokalisation des Gens über Linkage-Analysen und Linkage Disequilibrium

2.1.1. Chromosomale Lokalisation des Gens über chromosomale Aberationen



## 2. Positionsabhängige Strategien

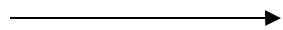
### 2.1. Identifikation der chromosomalen Lokalisation

#### 2.1.1. Chromosomale Lokalisation des Gens über Linkage-Analysen und Linkage Disequilibrium

Stellen der klinischen Diagnose in einer großen Familie, Blutentnahme und DNA-Präparation möglichst vieler Familienangehöriger (betroffen und nicht betroffen)



Genomscan



Eingrenzung des Intervalls auf ca. 10 MB



Identifikation weiterer Marker im Linkage-Intervall



Weitere Eingrenzung des Linkage-Intervalls durch :

- weitere Linkage-Analyse in der selben Familie
- weitere Linkage-Analyse in anderen Familien mit derselben Erkrankung
- Nutzung eines Linkage-Disequilibriums in vielen, nicht verwandten Patienten mit derselben Erkrankung (bei Vorliegen einer Founder Mutation möglich)



Kandidatenintervall möglichst  $< 1\text{MB}$

## 2. Positionsabhängige Strategien

### 2.1. Identifikation der chromosomalen Lokalisation

#### 2.1.2. Chromosomale Lokalisation des Gens über chromosomale Aberrationen

- Zytogenetisch sichtbare Deletionen und Duplikationen: Phänotypen meist komplex und unspezifisch
- Mikrodeletionen und -duplikationen
- Balanzierte Translokationen und Inversionen

## 2. Positionsabhängige Strategien

### 2.1. Identifikation der chromosomalen Lokalisation

#### 2.1.2. Chromosomale Lokalisation des Gens über chromosomale Aberrationen

##### -Identifikation von Mikrodeletionen:

- a) Ein hochpolymorpher Marker wird nicht übertragen
- b) Array-CGH
- c) Dosis-abhängige PCR oder Southern-blots
- d) FISH mit deletierten Yacs, Pacs oder Cosmiden
- e) Restriktionsfragment-Kartierung auf Southernblots: Verdau von Kontroll- und Patienten mit selten schneidenden Restriktionsenzymen; Auftrennung auf Pulsfeld-Gelen; Southernblothybridisierung

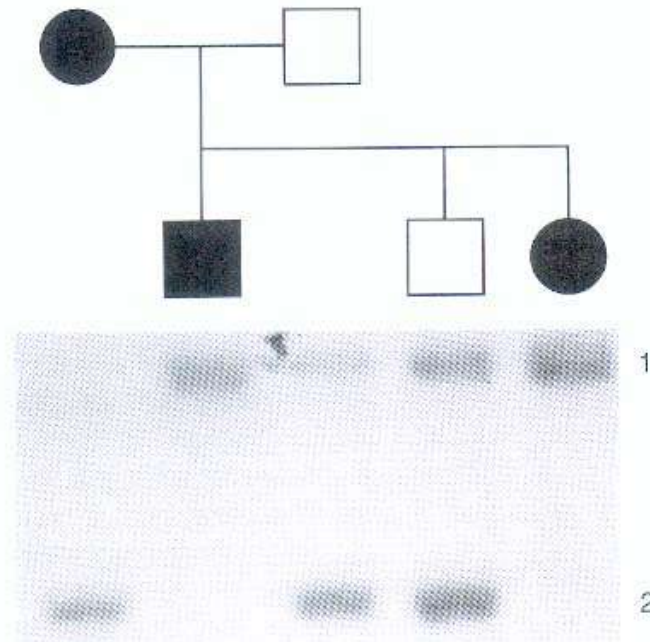
## 2. Positionsabhängige Strategien

### 2.1. Identifikation der chromosomalen Lokalisation

#### 2.1.2. Chromosomale Lokalisation des Gens über chromosomale Aberrationen

-Identifikation von Mikrodeletionen:

Dosis-abhängige PCR oder Southern-blots



## 2. Positionsabhängige Strategien

### 2.1. Identifikation der chromosomalen Lokalisation

#### 2.1.2. Chromosomale Lokalisation des Gens über chromosomale Aberrationen

##### -Balanzierte Translokationen und Inversionen

Kein zuviel oder zu wenig von genetischer Dosis  
Patient hat einen klar definierbaren Phänotypen



Durch einen der Translokations/ Inversionsbruchpunkt könnte ein Gen getroffen sein



Defektes Gen könnte für den Phänotypen verantwortlich sein



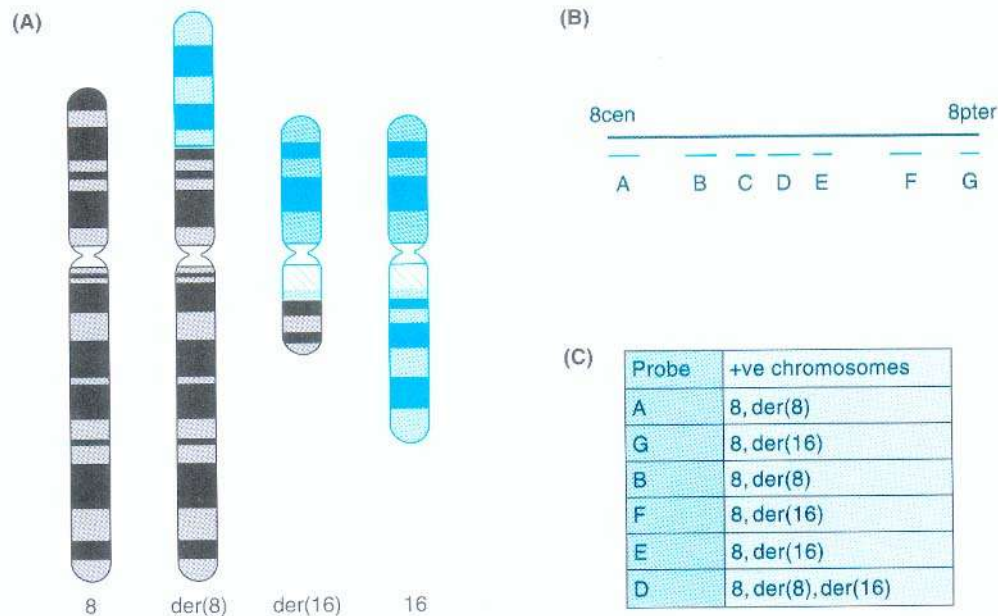
Bruchpunktsklonierung führt zum Gen

## 2. Positionsabhängige Strategien

### 2.1. Identifikation der chromosomalen Lokalisation

#### 2.1.2. Chromosomale Lokalisation des Gens über chromosomale Aberrationen

##### -Balanzierte Translokationen und Inversionen



Identifikation eines  
Bruchpunkt-überspannenden  
Pac- oder Cosmid-Klons

Welche Gene liegen auf dem Pac-Clon?

Weitere Einengung des Bruchpunkts durch Southernblot-analyse

## 2. Positionsabhängige Strategien

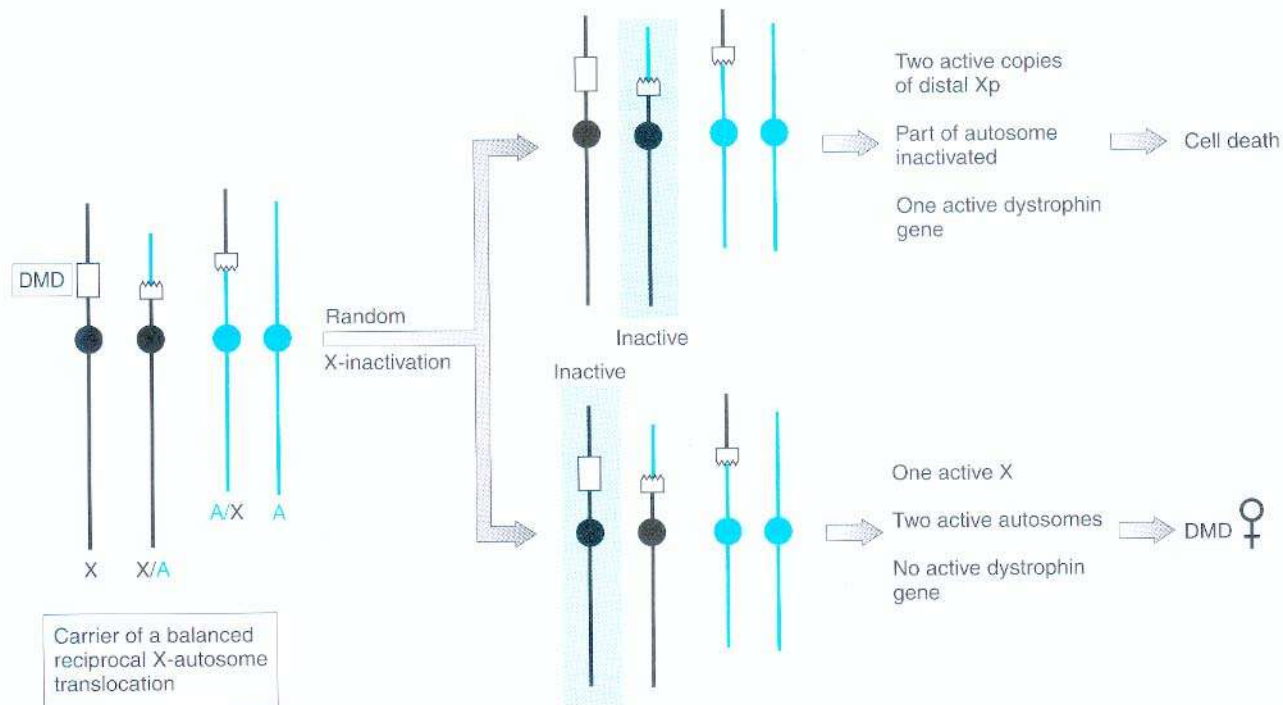
### 2.1. Identifikation der chromosomalen Lokalisation

#### 2.1.2. Chromosomale Lokalisation des Gens über chromosomale Aberrationen

##### - Balanzierte Translokationen und Inversionen

Besonderheit bei X-chromosomal-rezessivenden Erkrankungen mit X-

Autosom Translokation:



Auch Frauen mit nur einem translokierten X-Chromosom haben einen Phänotypen:  
Nicht translokiertes, normales X-Chromosom wird **IMMER** inaktiviert, da der autosomale Anteil des translokierten Chromosoms die Inaktivierung des translokierten Chromosoms verhindert.

## 2. Positionsabhängige Strategien

### 2.2. Identifikation von Kandidatengen

2.2.1. Datenbankanalysen: Identifikation von bekannten Genen und ESTs (expressed sequence tags) in der Kandidatenregion

2.2.2. Sequenz-Analysen: Existenz weiterer, bisher nicht weiter lokalisierter ESTs in der Kandidatenregion

2.2.3. Sequenzanalysen der Kandidatenregion: Identifikation noch unbekannter Exons durch Exonvorhersage-Programme und Sequenzvergleich mit anderen Spezies

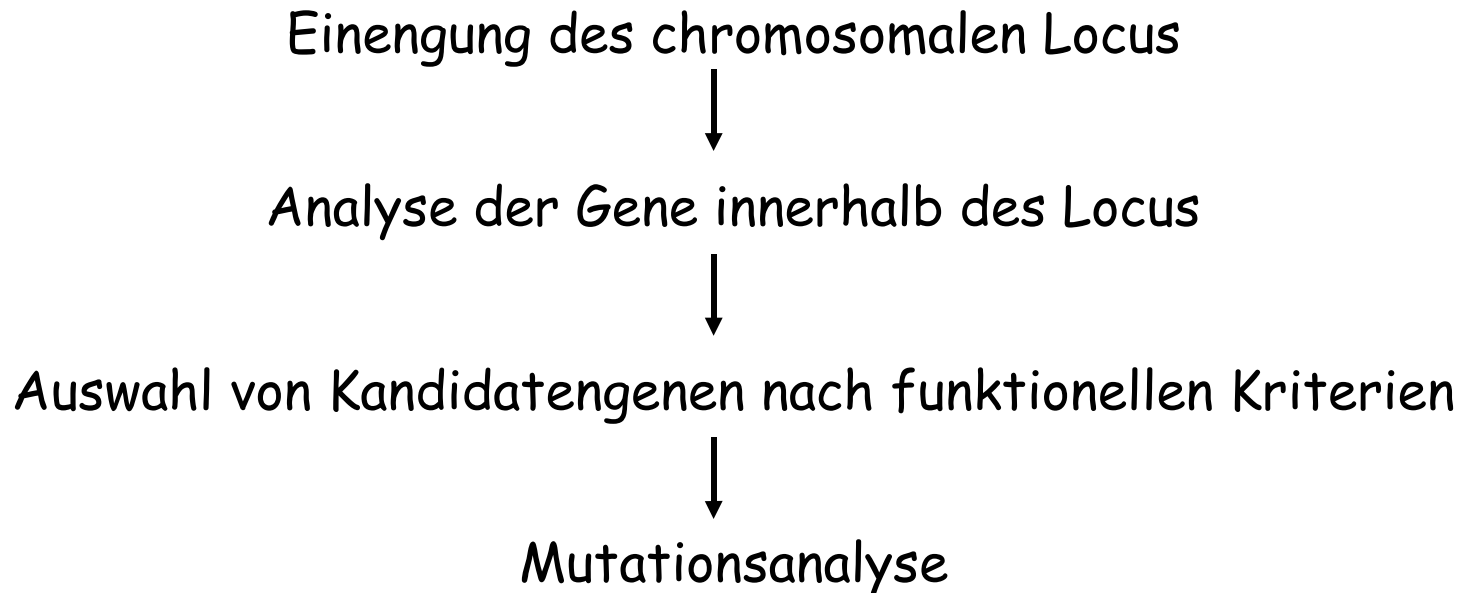
2.2.4. Sequenzanalysen der Kandidatenregion: Identifikation von Promotorbereichen und CpG-Inseln

2.2.5. Identifizierung von Splice-Varianten bekannter Gene: in-silico Sequenzanalyse, RT- und Race-PCR-Experimente

2.2.6. Weitere Experimente: screening von cDNA-Banken, Exon-trapping



### 3. Kombination von positionsabhängigen- und positionsunabhängigen Strategien



### 3. Kombination von positionsabhängigen- und positionsunabhängigen Strategien

Auswahl von Kandidatengenen nach funktionellen Kriterien:

Vergleich des Phänotypen mit dem Expressionsprofil der in Frage kommenden Gene

Gibt es transgene Tiere (knock-out oder overexpressing; Maus, Drosophila, C.elegans etc.) der in Frage kommenden Gene; Vergleich der Phänotypen

Was ist über die Funktion der in Frage kommenden Gene bekannt?

gibt es homologe Gene, die bereits für ähnliche humane Phänotypen verantwortlich gemacht werden konnten?

welchen Pathways gehören die in Frage kommenden Gene an? konnten andere Gene aus diesem Pathway für ähnliche Phänotypen verantwortlich gemacht werden? Kann der entsprechende Pathway mit dem Phänotypen in Verbindung gebracht werden?

kann die biochemische Funktion der entsprechenden Gene mit dem Phänotypen in Verbindung gebracht werden?

## 4. Mutationsanalyse

4.1. Mutationsanalyse von genomischer DNA

4.2. Mutationsanalyse auf RNA- (cDNA-) Ebene

4.3. Mutationsanalyse auf Proteinebene

## 4. Mutationsanalyse

möglichst viele, nicht miteinander verwandte Patienten werden untersucht

### 4.1. Mutationsanalyse von genomischer DNA:

SSCP-Analyse

WAVE-Analyse

direkte Sequenzierung

### 4.2. Mutationsanalyse auf RNA-Ebene:

RNA



cDNA



SSCP, WAVE, direkte Sequenzierung

### 4.3. Mutationsanalyse auf Proteinebene:

Proteintrunkationstest (PTT)

Westernblot-Analyse von Proteinextrakt

## 5. Weitere Möglichkeiten um eine Verbindung zwischen Gen und Phänotyp zu beweisen

Komplementation eines Funktionsverlustes in Zellkultur, Hefe, Maus etc.

Herstellung einer transgenen Maus (knock-out, Überexpression von wild-typ oder mutiertem Protein und Analyse des Phänotypen

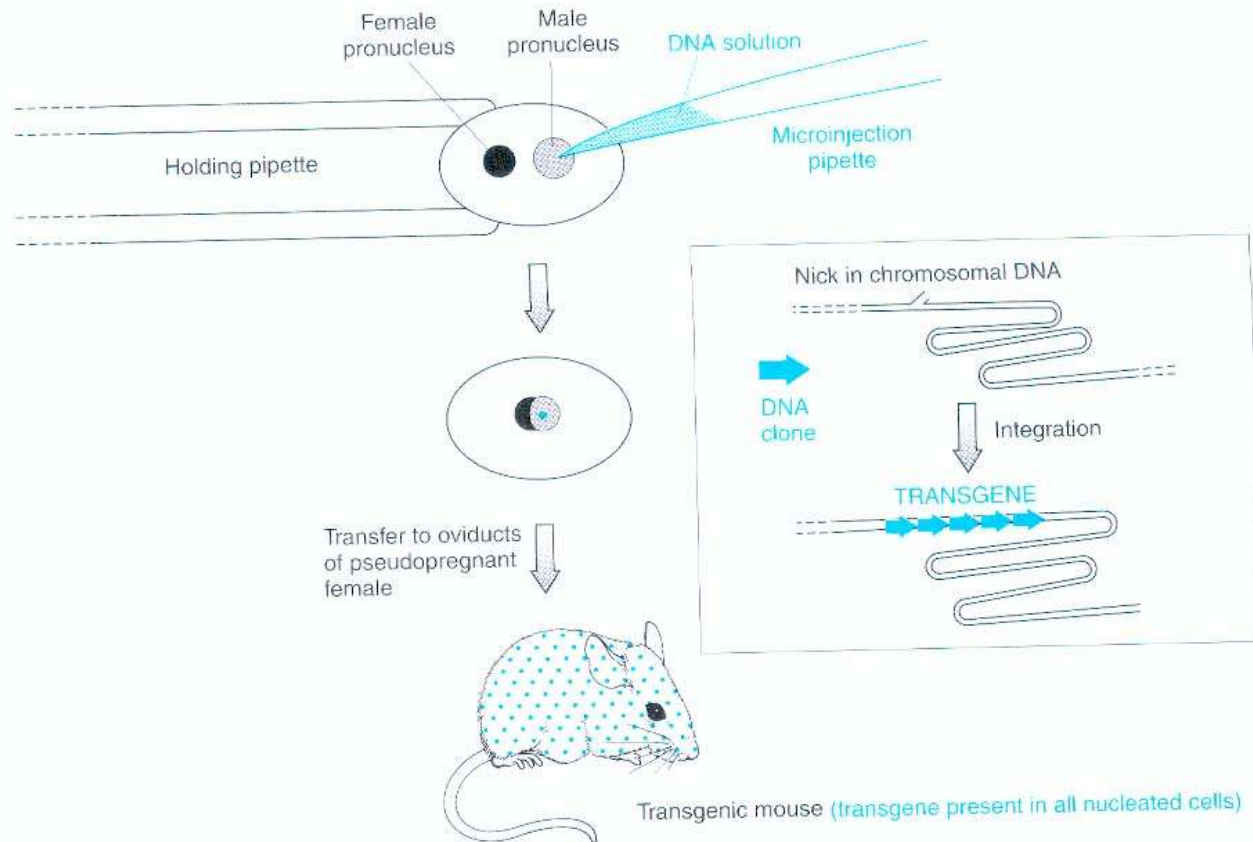
# Transgene Tiere

Fremde DNA wird in Zellen eines Tieres eingebracht

1. Einbringen eines Gens mit eigenem Promotor; Expression unabhängig aller anderer Gene des Tiers
3. Gene-targeting: Einbringen einer Mutation in ein bestimmtes Gen
4. Yac- und Pac-Transgene
6. Zufälliges Einbringen von Mutationen in Gene:
  - chemisch
  - Strahlung
  - gene-trapping

# Transgene Tiere

1. Einbringen eines Gens mit eigenem Promotor und poly A+-Schwanz;  
Expression unabhängig aller anderen Gene des Tiers



# Transgene Tiere

## 2. Gene-targeting: Einbringen einer Mutation in ein bestimmtes Gen

Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)



Konstruktion eines Vektors: bestimmter Genabschnitt mit entsprechender Mutation  
Antibiotikaresistenz zur Selektion



Einbringen des Vektors in die ES-Zellen (Elektroporation)



Homologe Rekombination

Zellen selektionieren mit Medium mit entsprechendem Antibiotikum



Zellen untersuchen nach eingebrachter Mutation (Southernblot, PCR)



Zellen mit Mutation in Blastozyste einbringen



Aussortieren von chimären Tieren; hoffen auf Keimbahnbeteiligung



Chimäre verpaaren



Keimbahnbeteiligung

Transgenes Tier



# Transgene Tiere

## 2. Gene-targeting: Einbringen einer Mutation in ein bestimmtes Gen

### Embryonale Stammzellen:

werden aus der Blastocyste (erstes Differenzierungsstadium nach dem 32 Zell-Stadium) gewonnen

pluripotent: alle Gewebe können sich aus ES-Zellen entwickeln

(nicht totipotent, es kann sich also nicht durch Einbringen einer ES-Zelle in den Uterus ein Embryo entwickeln)

Konnten bisher nur vom Mausstamm 129 kultiviert werden

### Einbringen der Mutation in das entsprechende Gen

a.) einfache Recombination; Einführen eines Markergens in das entsprechende Gen

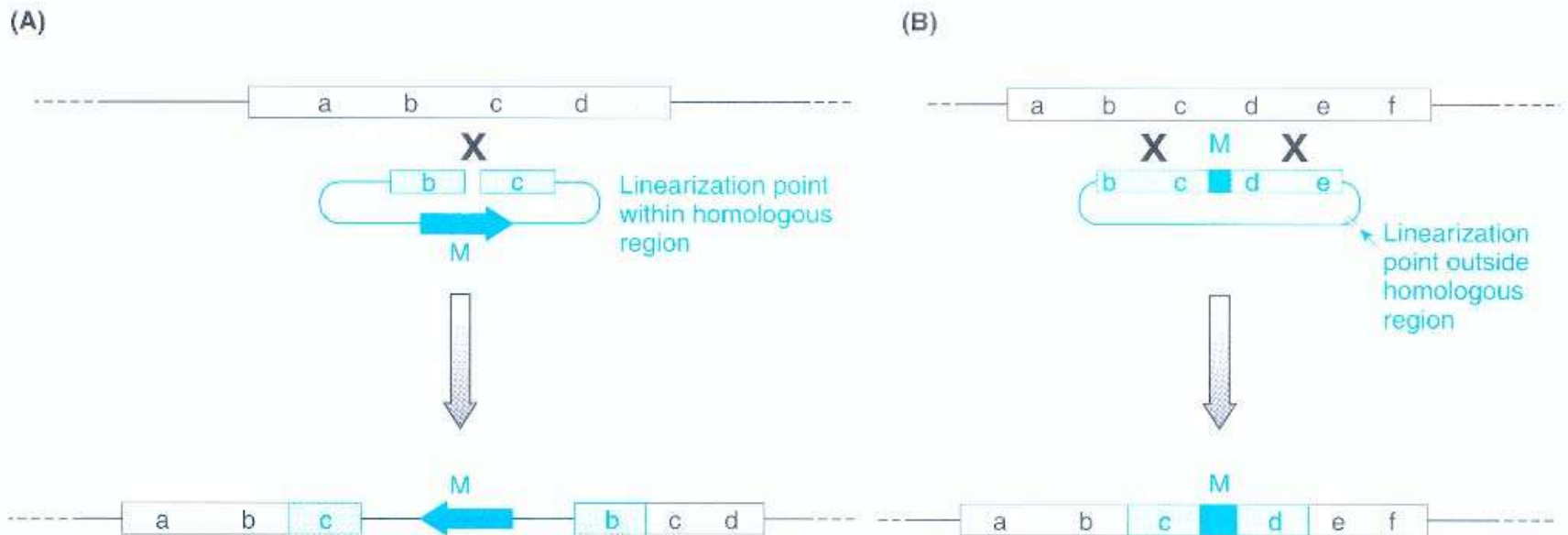
b.) Einführen einer Punktmutation durch eine Doppelstrategie

# Transgene Tiere

2. **Gene-targeting:** Einbringen einer Mutation in ein bestimmtes Gen

## Einbringen der Mutation in das entsprechende Gen

a.) einfache Recombination; Einführen eines Markergens in das entsprechende Gen

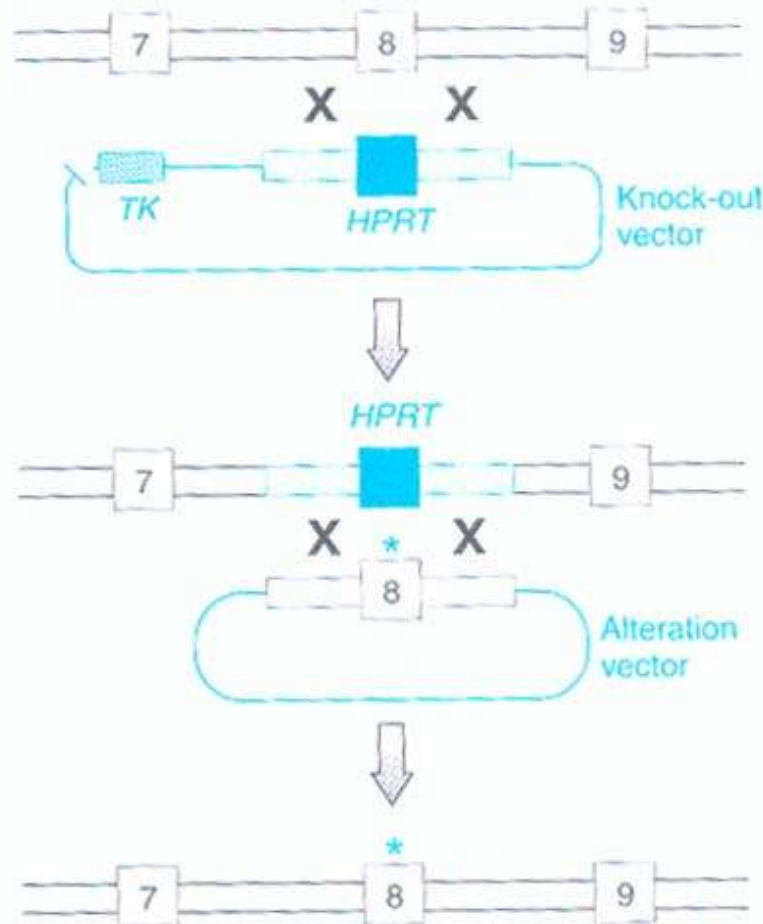


# Transgene Tiere

2. Gene-targeting: Einbringen einer Mutation in ein bestimmtes Gen

Einbringen der Mutation in das entsprechende Gen

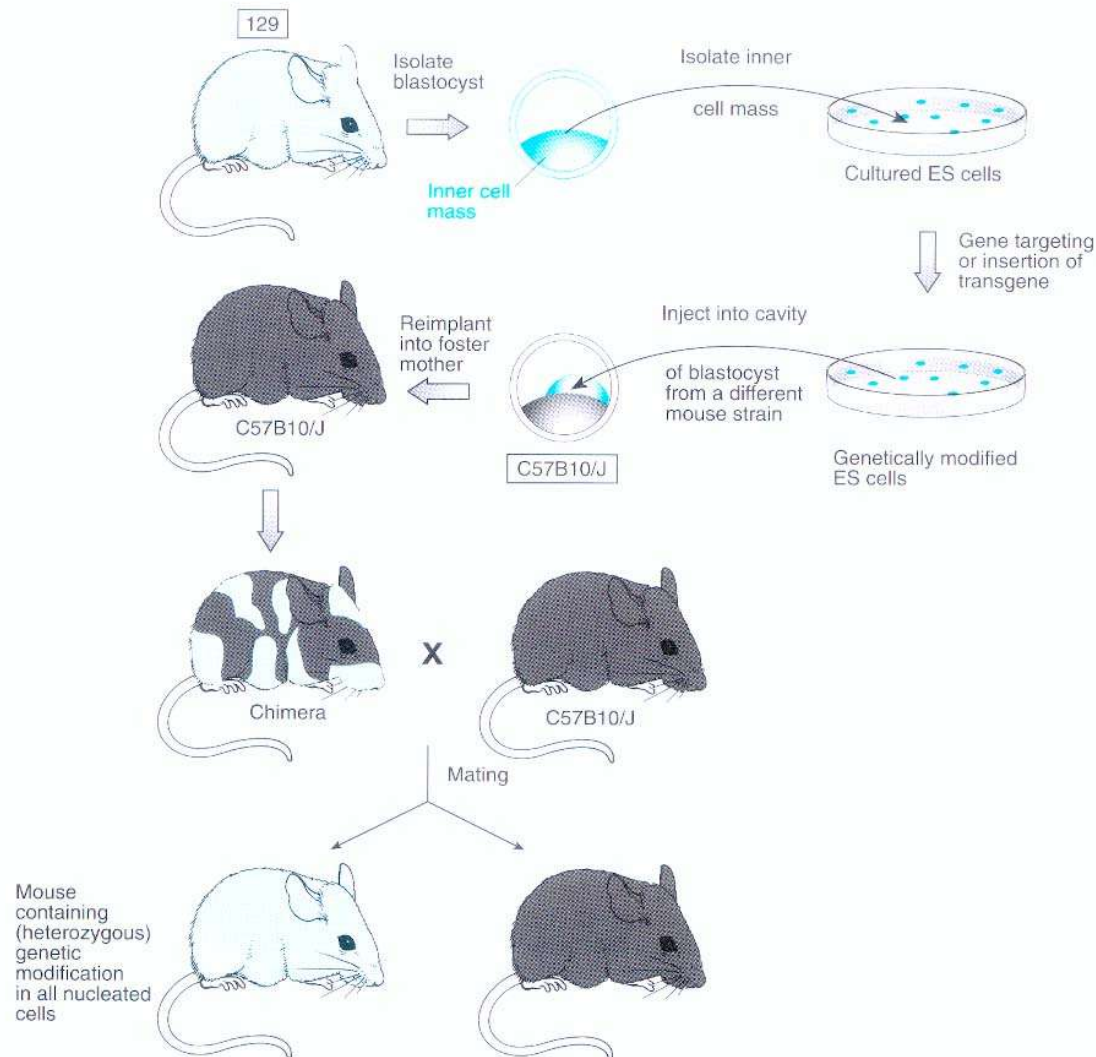
b.) Einführen einer Punktmutation durch eine Doppelstrategie



# Transgene Tiere

## 2. Gene-targeting: Einbringen einer Mutation in ein bestimmtes Gen

Einbringen der Mutation in das entsprechende Gen

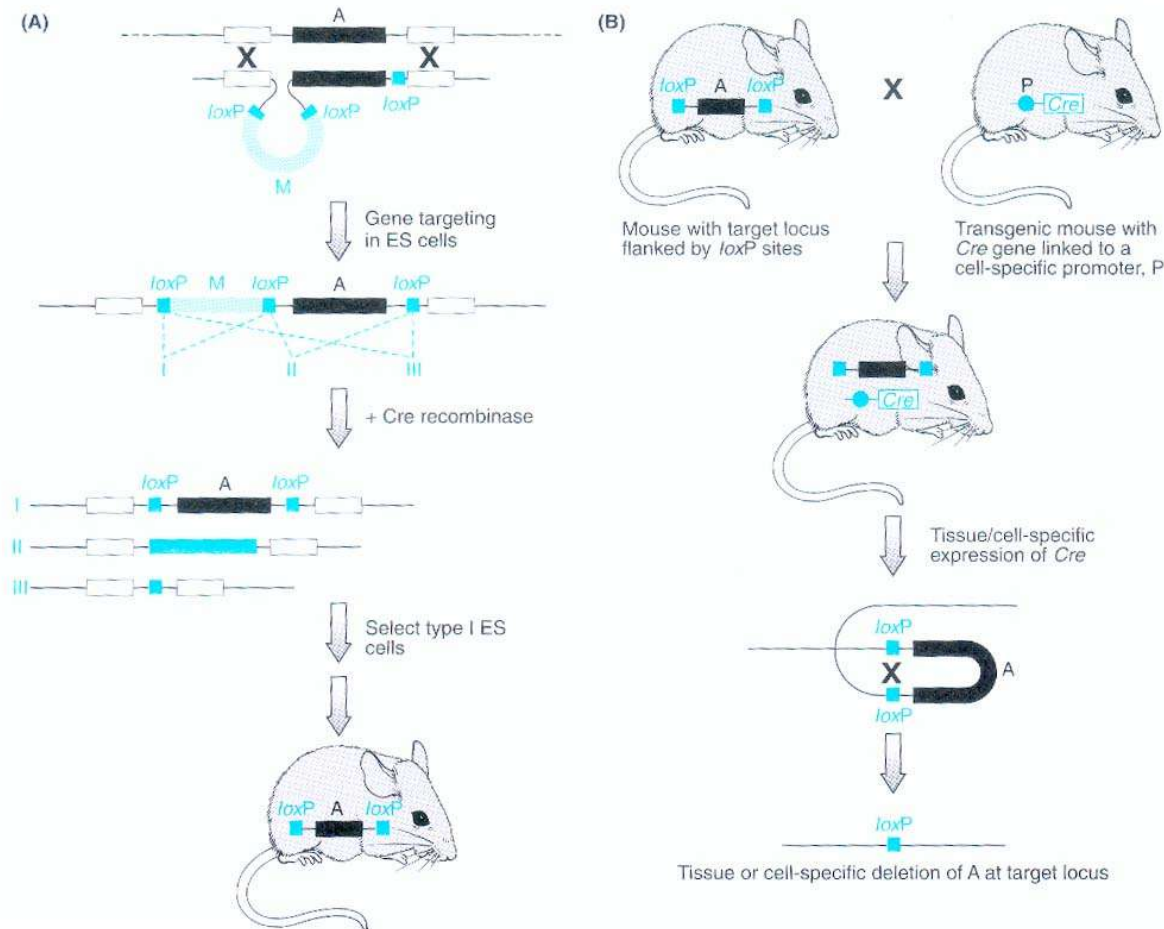


# Transgene Tiere

## 2. Gene-targeting: Einbringen einer Mutation in ein bestimmtes Gen

### Konditionierte Tiere

Mutation kann gewebsspezifische aktiviert werden



# Transgene Tiere

## 3. Yac-transgene Tiere

Yacs werden

a.) durch Fusion der Yac-enthaltenden Hefezellen mit ES-Zellen

b.) durch Injektion isolierter Yacs in die Oozyte  
in die Tiere eingebracht

# Transgene Tiere

3. Gene-trapping: zufällige Zerstörung eines Gens mit Hilfe eines Gen-trap-Vektors; getroffenes Gen wird in ES-Zellen identifiziert; anschließend werden die charakterisierten ES-Zellen in Blastozysten eingebracht.....

