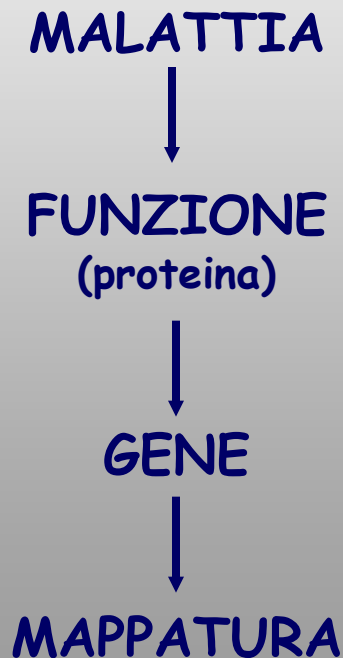


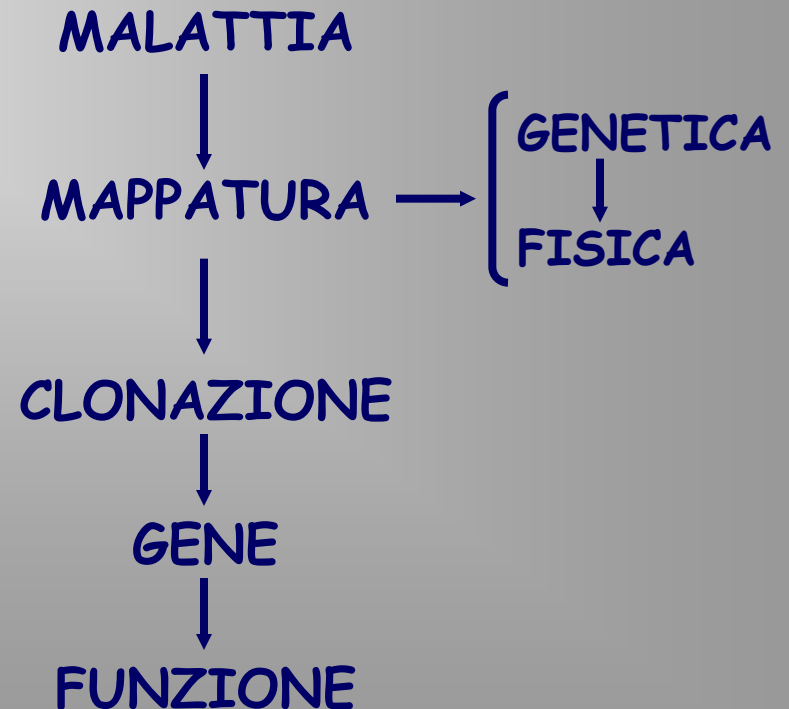
Functional cloning

Identificazione e clonazione di un gene attraverso la sua funzione



Positional cloning

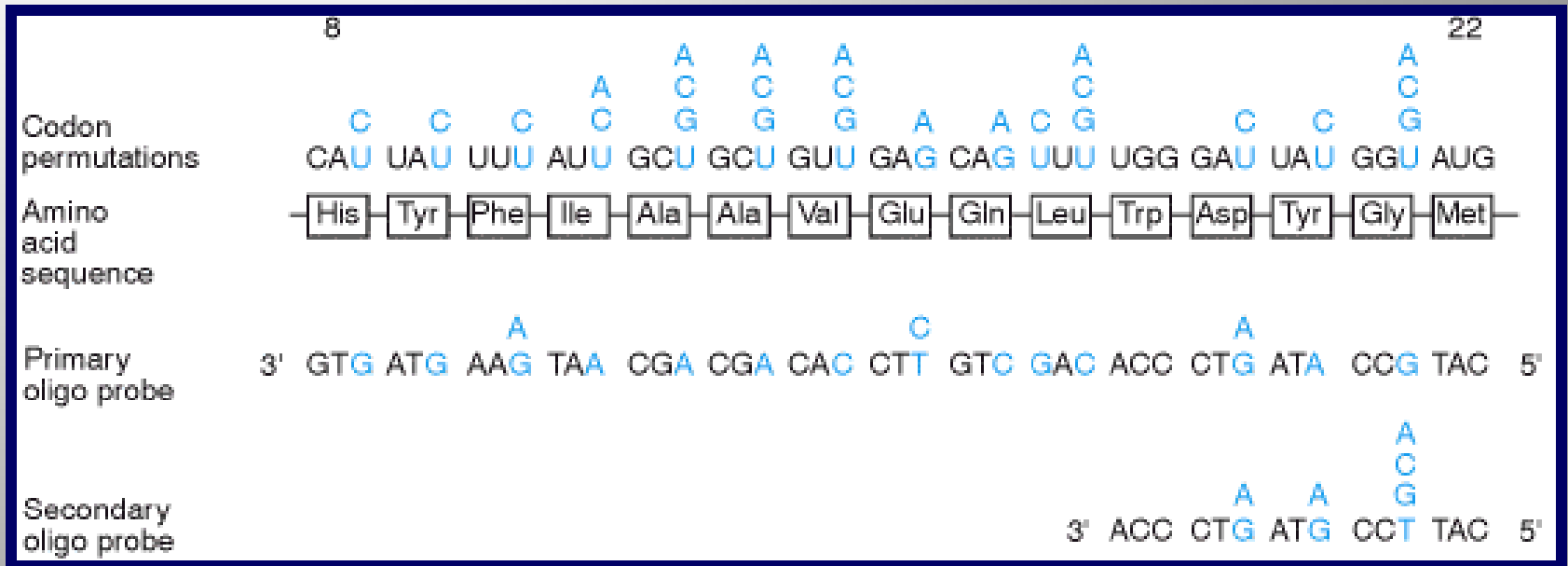
Identificazione e clonazione di un gene attraverso la sua posizione



Functional cloning

L'identificazione avviene indipendentemente dalla conoscenza della posizione sul genoma:

- sulla base del prodotto proteico



strategia utilizzata per la clonazione del gene del fattore VIII della coagulazione, responsabile dell'emofilia A

Pig urate
oxidase
sequence

7	8	9	10	11	12							34	35	36	37	38
Asp	Tyr	Lys	Lys	Asn	Asp	-	-	-	-	-	-	Asp	Gly	Lys	Tyr	His

↓ CORRESPONDING POSSIBLE
TRIPLETS IN DNA

GAT TAT AAA AAA AAT GA C
 GAC TAC AAG AAG AAC GA U

↓
 Design degenerate **sense**
 oligonucleotide with 5'
 add-on containing *Hind*III
 site



*Hind*III

GAC GGA AAA TAC CAC
 GAT GGC AAG TAT CAT
 GGG
 GGT

↓
 Design degenerate
antisense
 oligonucleotide with
 5' add-on containing
*Eco*RI site



*Eco*RI

Functional cloning

L'identificazione avviene indipendentemente dalla conoscenza della posizione sul genoma:

- sulla base del prodotto proteico

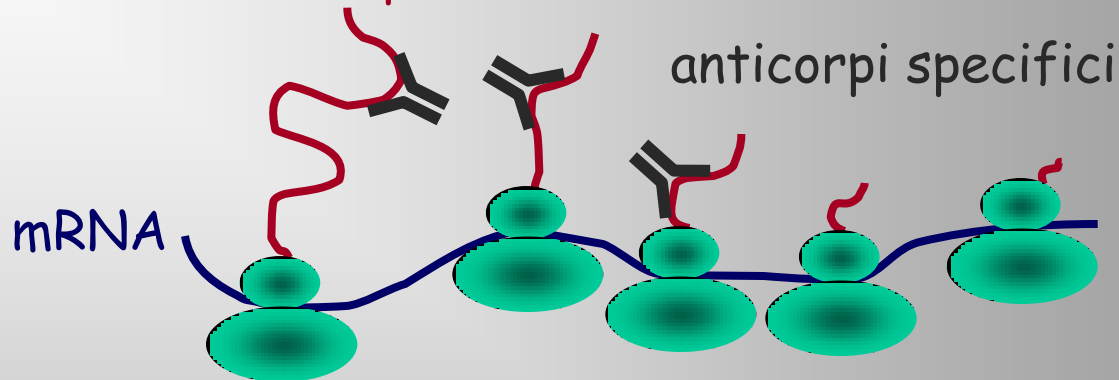
oppure

- mediante l'uso di anticorpi specifici

estrazione mRNA totale

traduzione in vitro

proteine nascenti



immunoprecipitazione del complesso polisomiale



purificazione dell'mRNA specifico



reverse-transcription per produrre il cDNA specifico



utilizzo del cDNA per selezionare cloni specifici da
cDNA libraries

Functional cloning

L'identificazione avviene indipendentemente dalla conoscenza della posizione sul genoma:

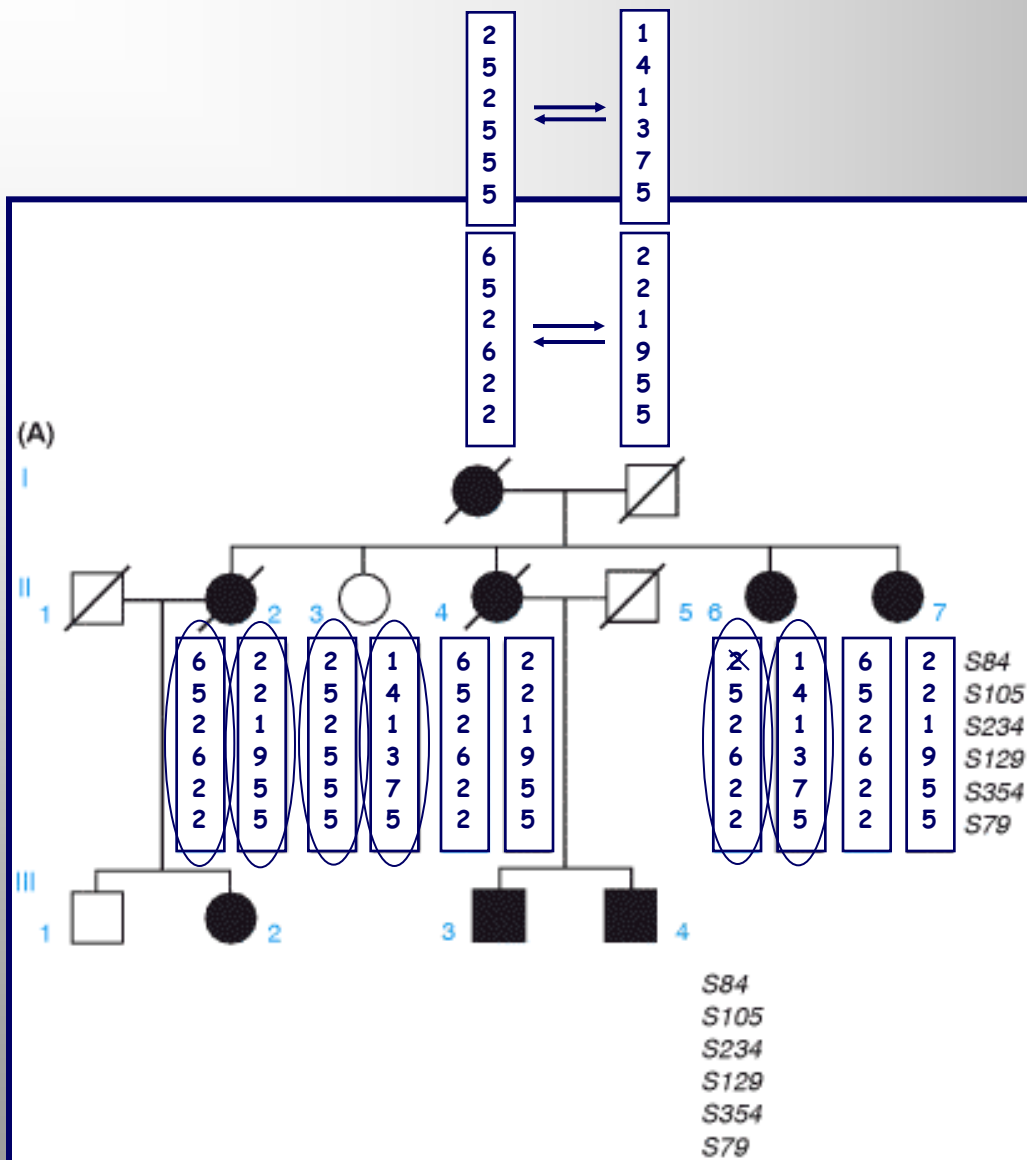
- sulla base del prodotto proteico
oppure
- mediante l'uso di anticorpi specifici
oppure
- mediante la sua similitudine a un gene umano paralogo o un gene ortologo di altre specie

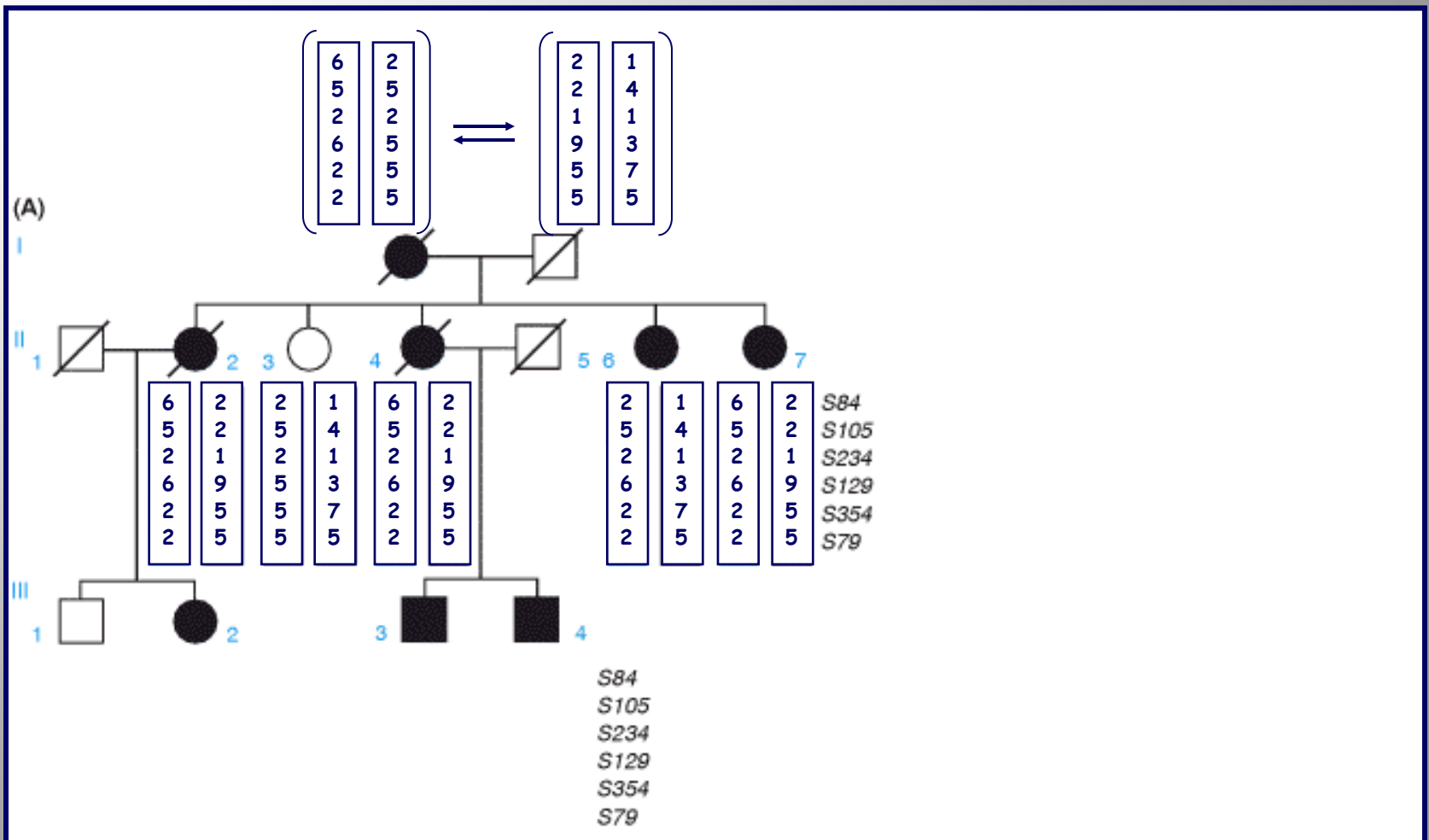
Positional cloning

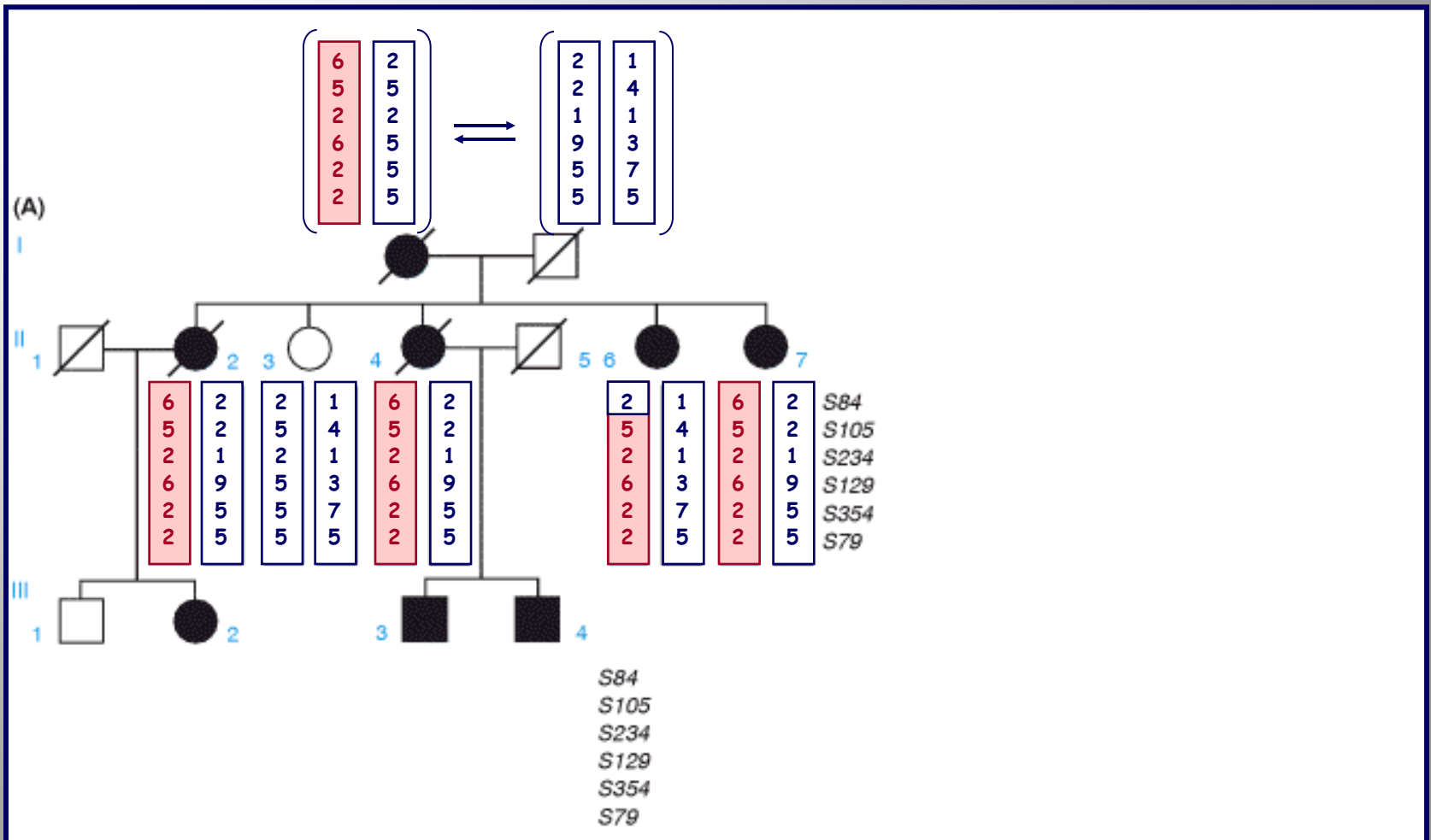
Identificazione e clonazione di un gene attraverso la sua posizione

Il primo stadio consiste nel restringere il più possibile (<2Mb) la regione candidata.

- ◆ Raccogliere numerose famiglie affette dalla stessa malattia (possibilità di errore può essere l'eterogeneità genetica)
- ◆ Analizzare molti marcatori informativi ben mappati sul genoma
- ◆ La penetranza della malattia deve essere ben conosciuta. Se la malattia ha penetranza completa sono informative anche le ricombinazioni trovate negli individui sani, altrimenti sono utili solo quelle trovate negli individui affetti









11

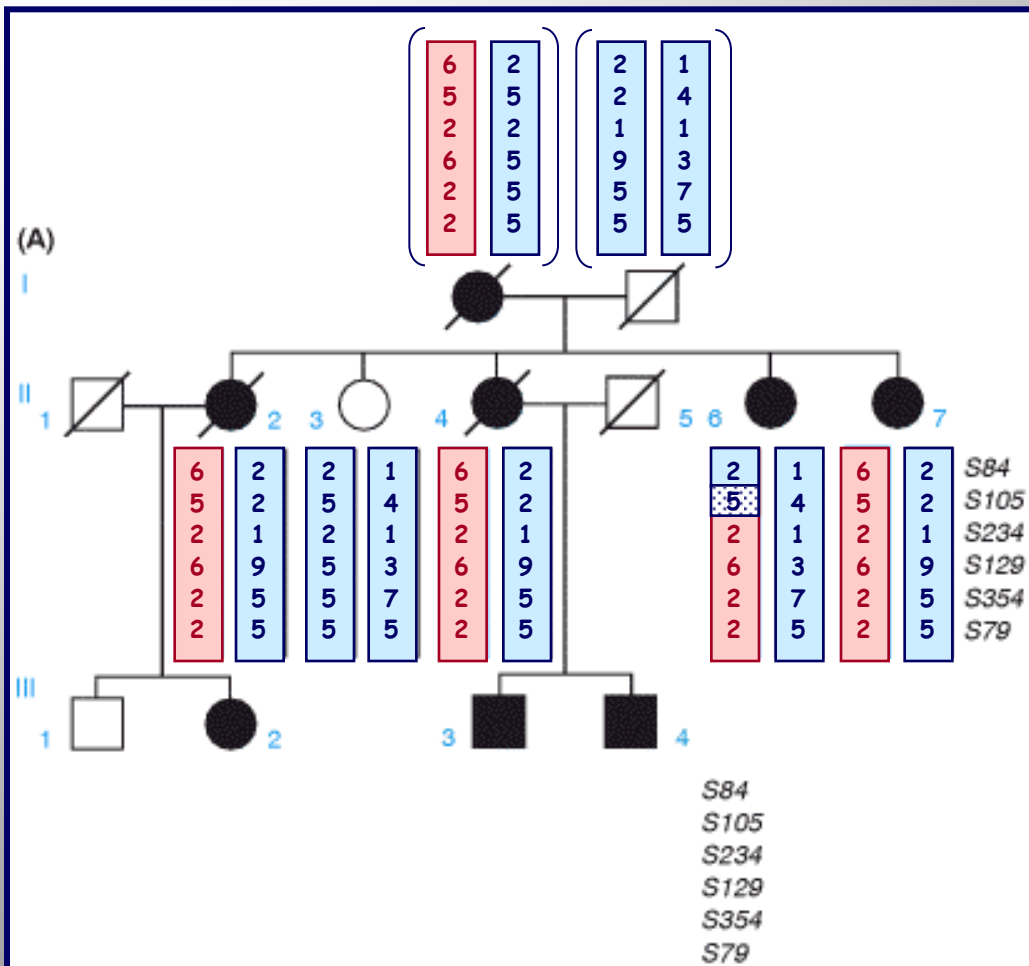
1

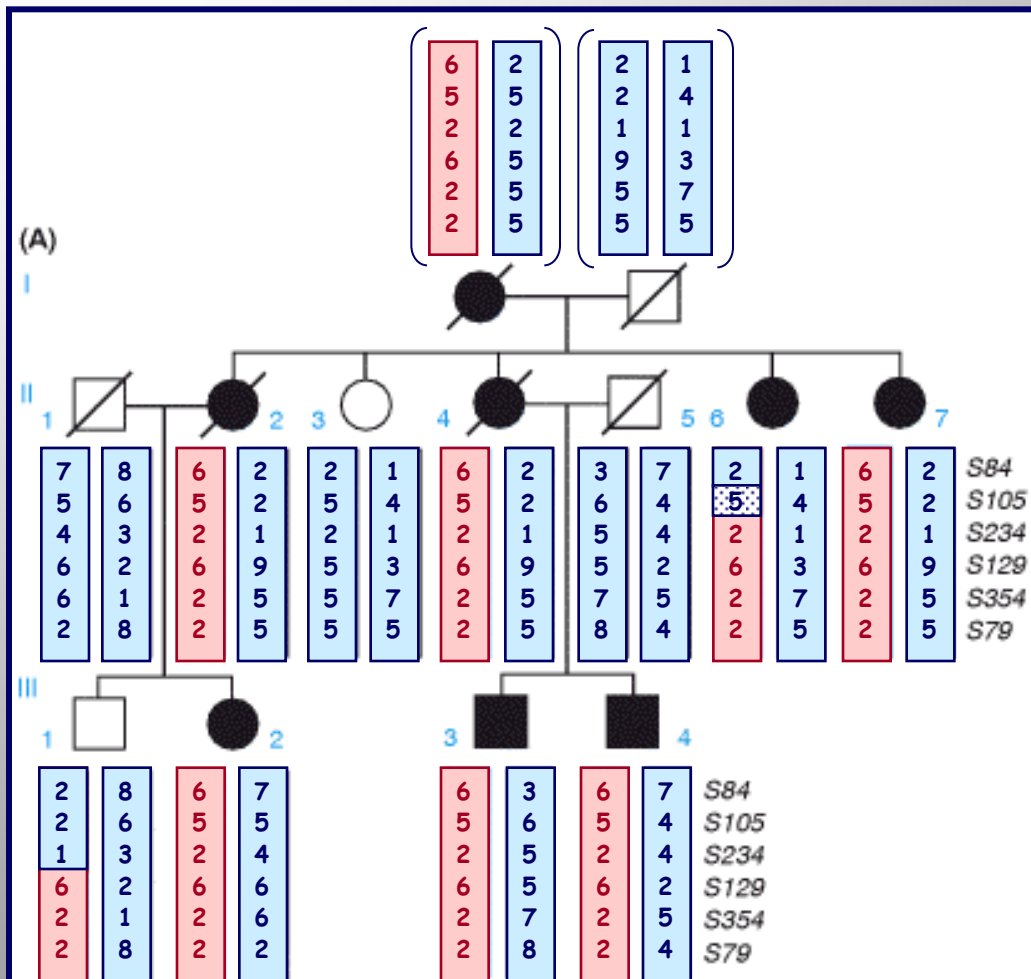
2

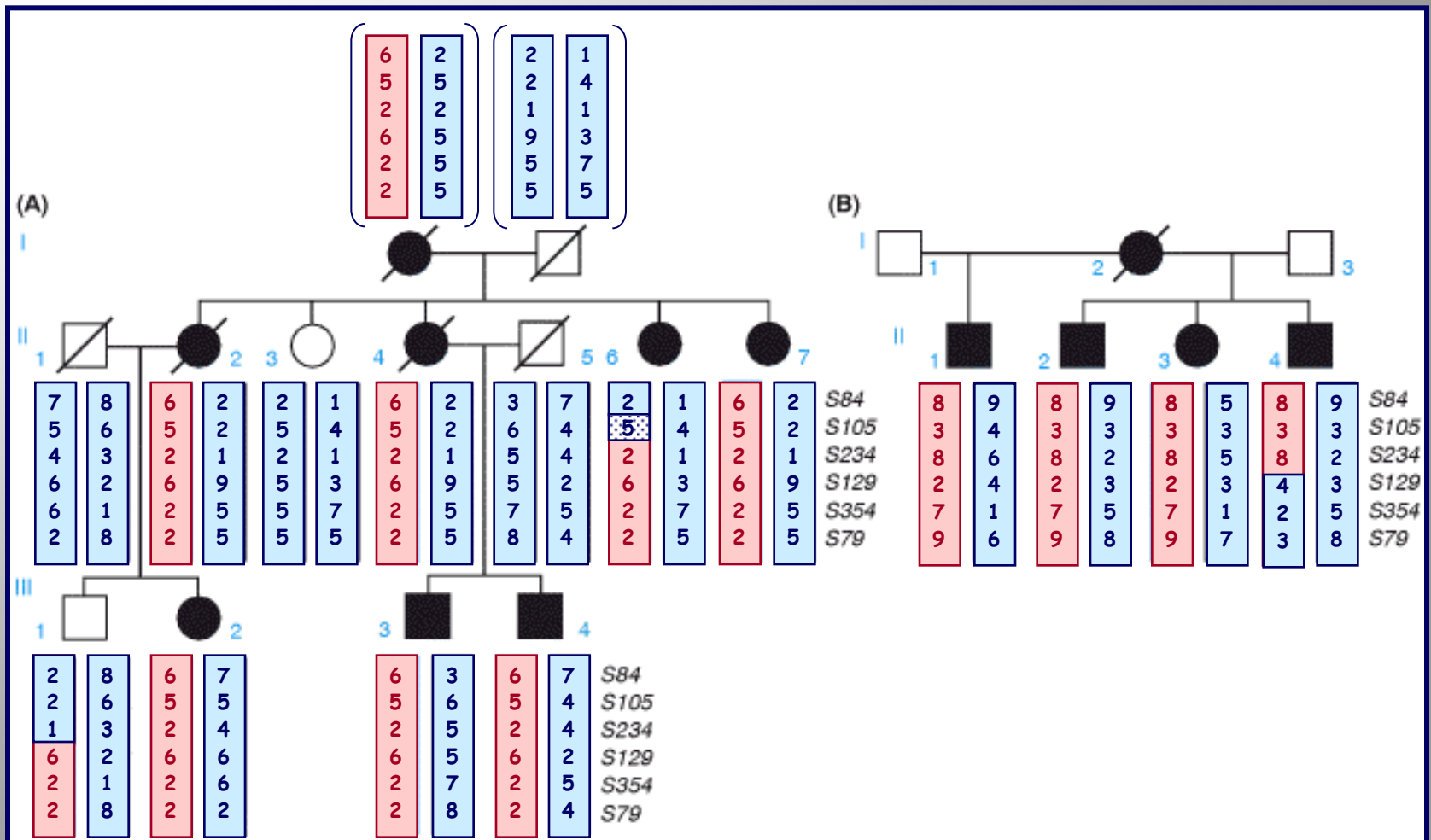
3

4

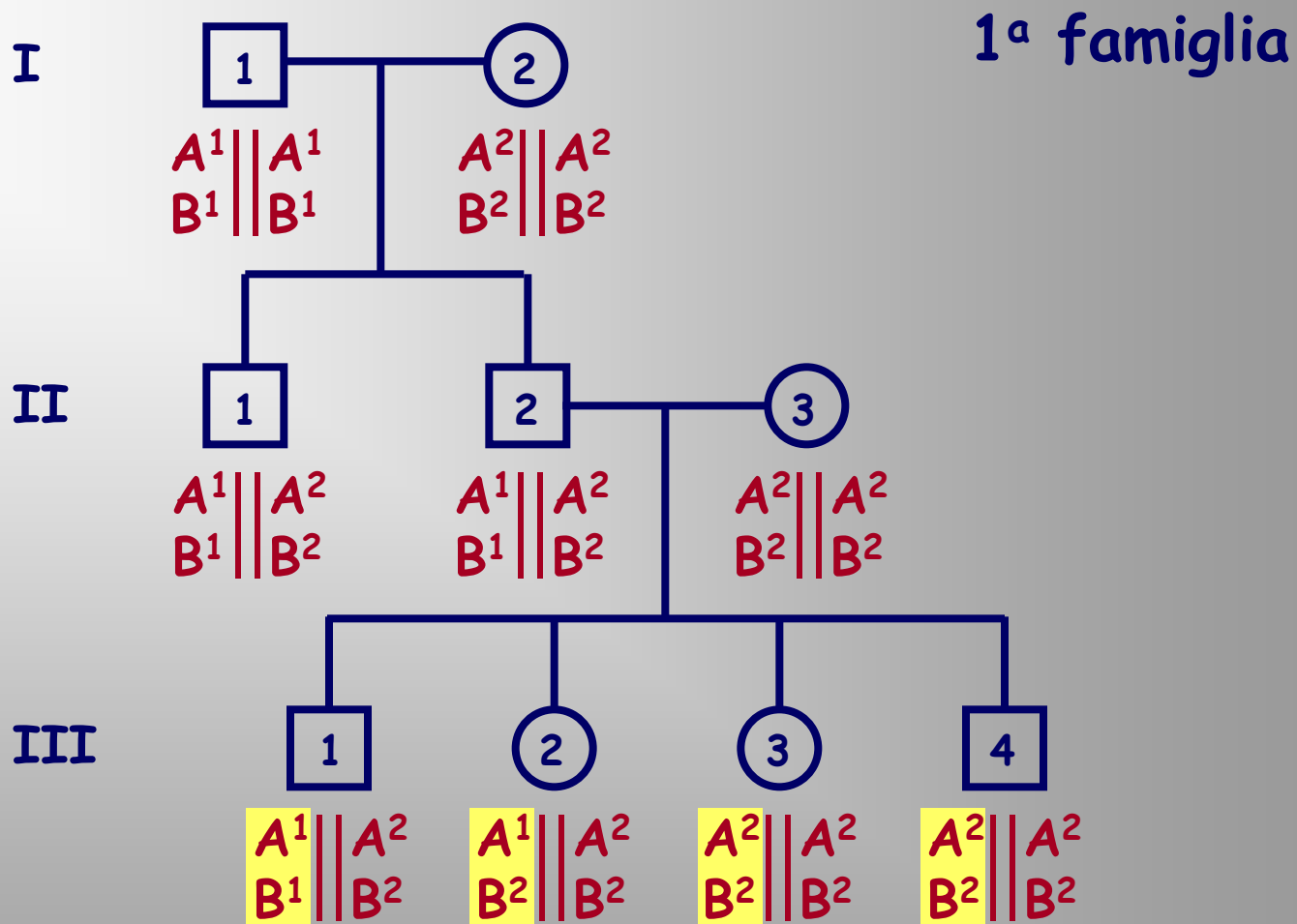
S84
S105
S234
S129
S354
S79

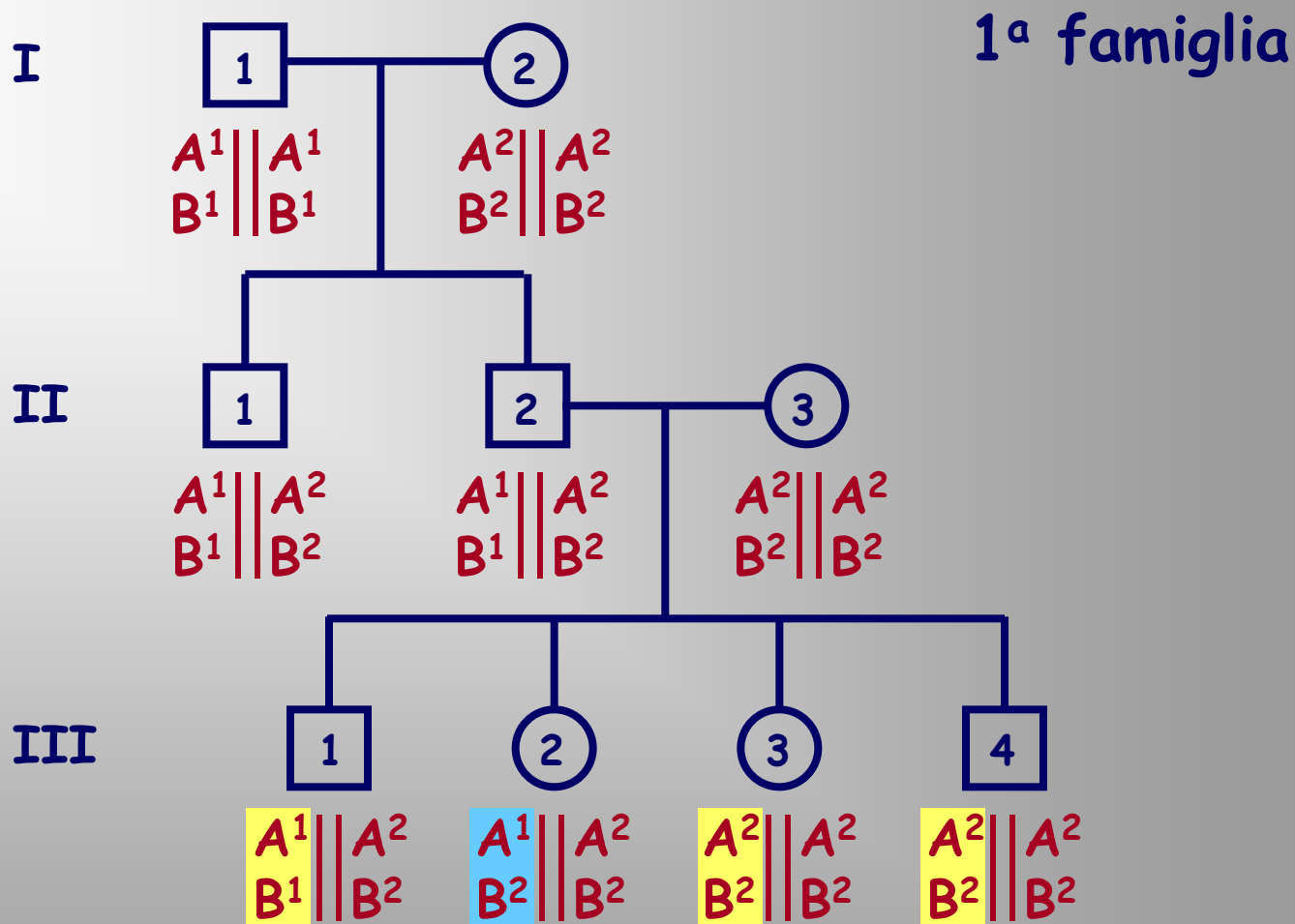






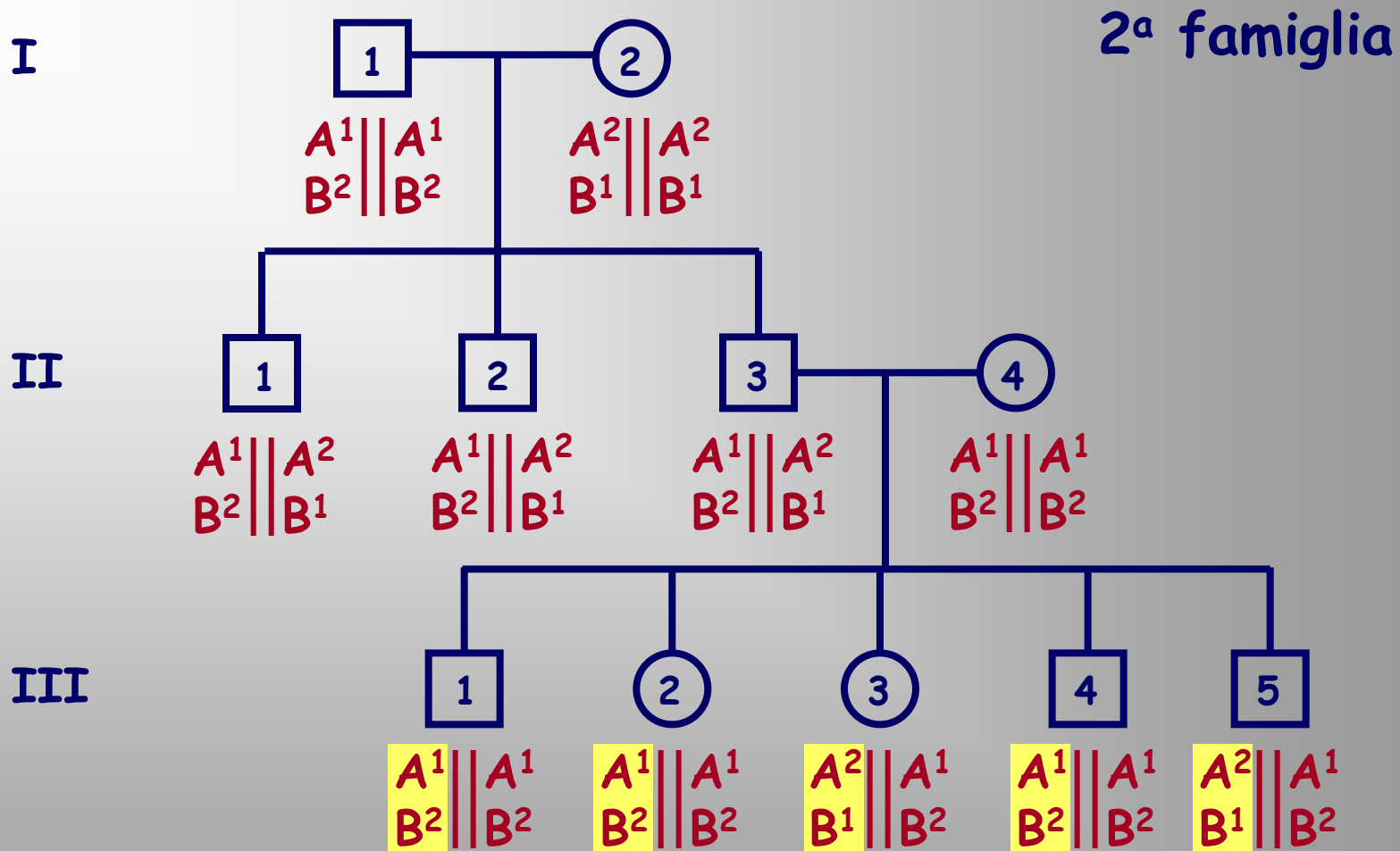
Raccolte numerose famiglie si stima la verosimiglianza della mappatura mediante il calcolo del *LOD SCORE* (logaritmo della probabilità relativa di linkage)





cr. parentali $\Rightarrow 3$

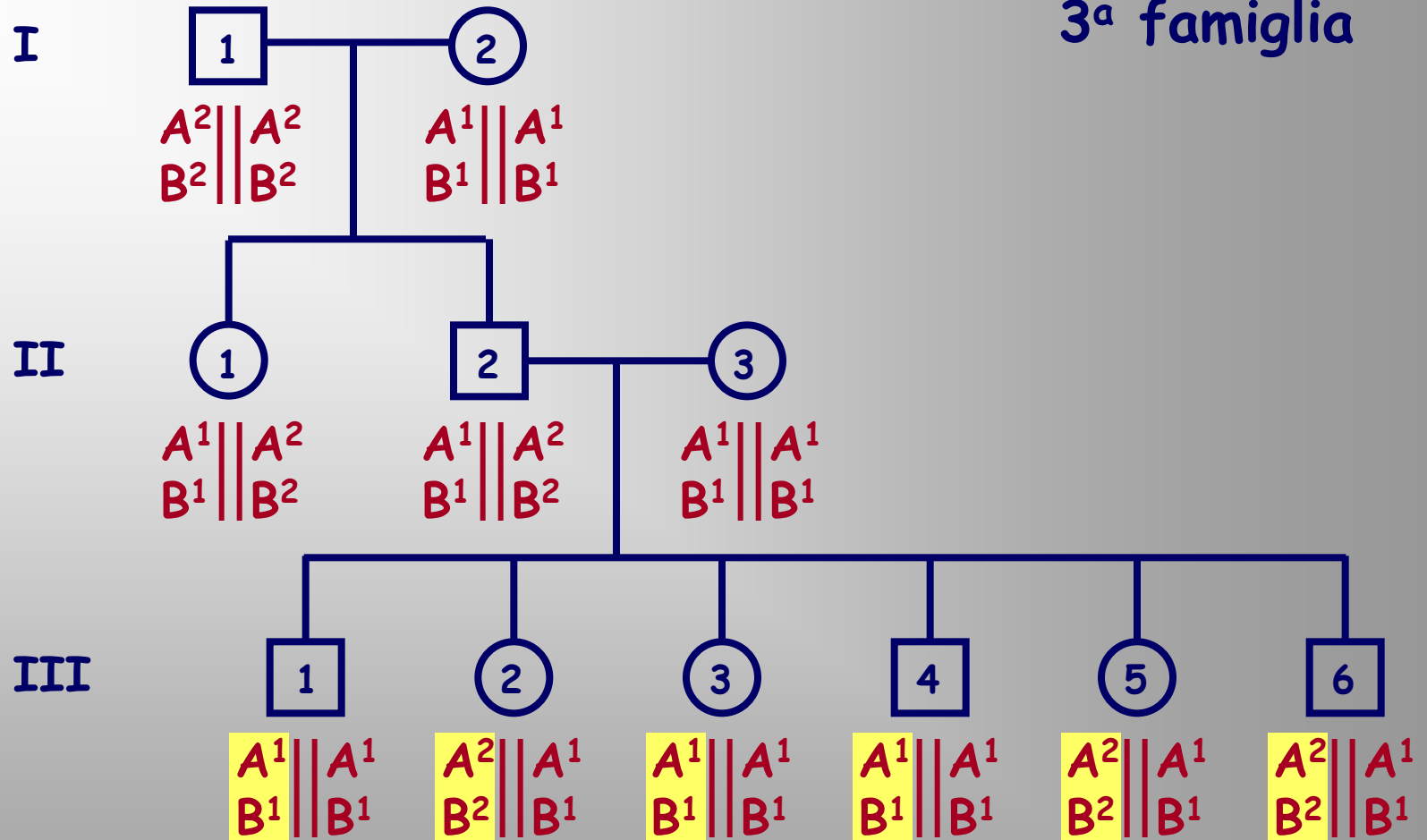
cr. ricombinanti $\Rightarrow 1$



cr. parentali $\Rightarrow$ 5

cr. ricombinanti $\Rightarrow$ 0

3^a famiglia

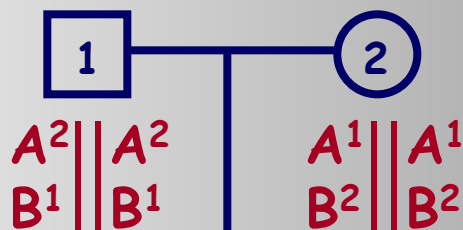


cr. parentali $\Rightarrow 6$

cr. ricombinanti $\Rightarrow 0$

I

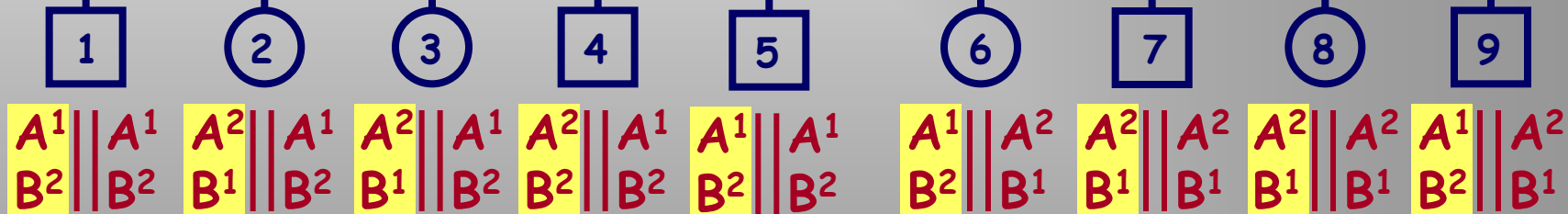
4^a e 5^a famiglia



II

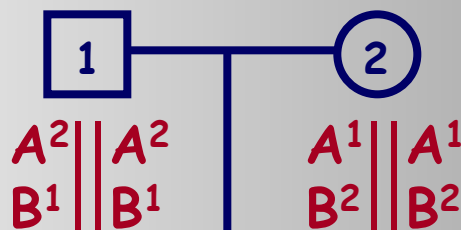


III

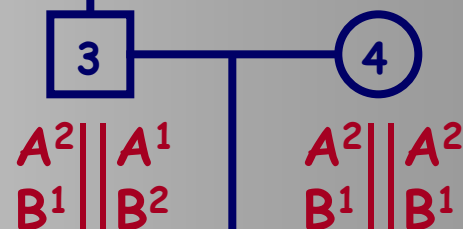
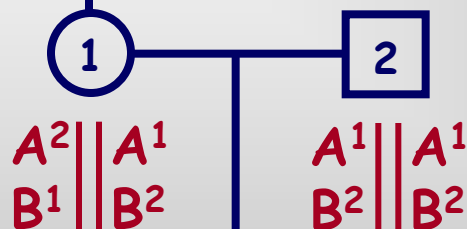


I

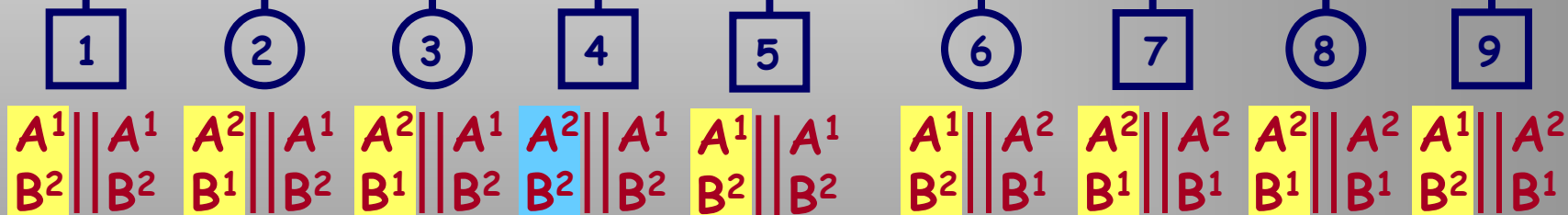
4^a e 5^a famiglia



II



III



cr. parentali $\Rightarrow 4+4 = 8$

cr. ricombinanti $\Rightarrow 1+0 = 1$

Riassumendo

1^a famiglia → 4 meiosi = 3 cr. parentali + 1 cr. ricombinante
 2^a famiglia → 5 meiosi = 5 cr. parentali + 0 cr. ricombinanti
 3^a famiglia → 6 meiosi = 6 cr. parentali + 0 cr. ricombinanti
 4^a famiglia → 5 meiosi = 4 cr. parentali + 1 cr. ricombinante
 5^a famiglia → 4 meiosi = 4 cr. parentali + 0 cr. ricombinanti

IN TOTALE

5 famiglie - 24 meiosi $\left\{ \begin{array}{l} \text{parentali} \quad 22 \\ \text{ricombinanti} \quad 2 \end{array} \right.$

invece

secondo l'ipotesi
 dell'indipendenza $\left\{ \begin{array}{l} \text{parentali} \quad 12 \\ \text{ricombinanti} \quad 12 \end{array} \right.$

Calcolo del LOD score

definiamo

L = verosimiglianza (probabilità con cui si otterrebbe una famiglia come quella in esame studiandone una a caso, con lo stesso numero di meiosi informative, se fosse vero che la distanza di mappa dei due marcatori sia quella data)

P = no. di cromosomi parentali

R = no. di cromosomi ricombinati

N = no. di cromosomi totali

Θ = frequenza di ricombinazione

$$L = \frac{N!}{R! (N - R)!} \Theta^R \times (1 - \Theta)^P$$

allora, per ogni famiglia

$$LOD \Theta = \log \text{ odd } \Theta = \log \frac{L_{\Theta}}{L_{0,5}} = \log \frac{\frac{N!}{\cancel{R!}(N-R)!} \Theta^R \times (1-\Theta)^P}{\frac{N!}{\cancel{R!}(N-R)!} 0,5^R \times 0,5^P} =$$

$$= \log \frac{\Theta^R \times (1-\Theta)^P}{0,5^{R+P}} = \log \frac{\Theta^R \times (1-\Theta)^P}{0,5^N}$$

Z 1ª famiglia

Θ	L_{Θ}	$\text{odd } \Theta = \frac{L_{\Theta}}{L_{0,5}}$	$\text{LOD } \Theta = \log \text{ odd } \Theta$
0	escluso perchè c'è un ricombinante		$-\infty$
0,05	$4 \cdot 0,05^1 \cdot 0,95^3 = 0,171$	0,684	-0,1649
0,1	$4 \cdot 0,10^1 \cdot 0,90^3 = 0,292$	1,168	0,0674
0,2	$4 \cdot 0,20^1 \cdot 0,80^3 = 0,410$	1,64	0,2148
0,3	$4 \cdot 0,30^1 \cdot 0,70^3 = 0,412$	1,648	0,2170
0,4	$4 \cdot 0,40^1 \cdot 0,60^3 = 0,346$	1,384	0,1649
0,5	$4 \cdot 0,50^1 \cdot 0,50^3 = 0,250$	1	0

Θ	Z 1 ^a fam.	Z 2 ^a fam.	Z 3 ^a fam.	Z 4 ^a fam.	Z 5 ^a fam.	totale Σ LOD Θ
0	escluso perchè ci sono ricombinanti					- ∞
0,025	-0,4215	1,4503	1,7412	-0,1427	1,1614	+3,789
0,05	-0,1649	1,3945	1,6730	-0,1173	1,1139	+4,464
0,1	0,0674	1,2765	1,5315	0,3222	1,0212	+4,219
0,2	0,2148	1,0212	1,2253	0,4200	0,8169	+3,698
0,3	0,2170	0,7308	0,5785	0,3636	0,5843	+2,775
0,4	0,1649	0,3979	0,4786	0,2201	0,3181	+1,556
0,5	0	0	0	0	0	0

