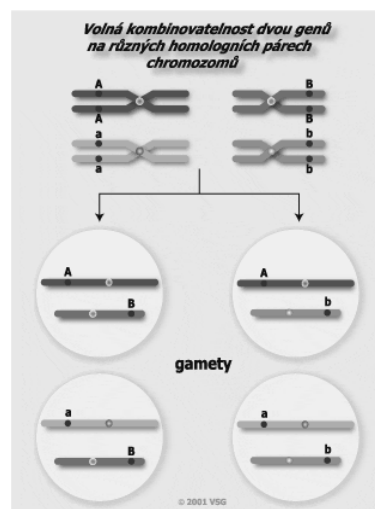


Vazba genů

Chromozomy obsahují mnoho genů a pokud nejsou rozděleny crossing-overem, pak alely přítomné na mnoha lokusech každého homologního chromozomu segregují jako jednotka během gametogeneze. Rekombinantní gamety jsou důsledkem crossing-overu a zvyšují genetickou variabilitu v druhu a slouží také pro konstrukci chromozomových map.

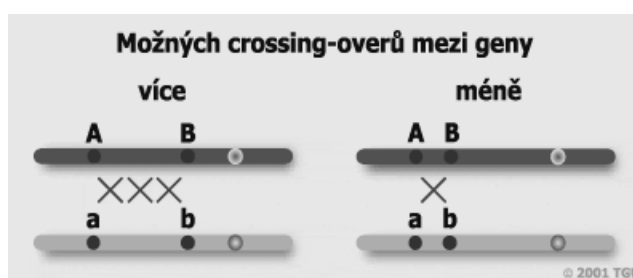
Dosud jsme se zabývali jen **volnou kombinovatelností genů**, tzn. že geny jsou lokalizovány v různých nehomologních chromozomech a při procesu meiózy se náhodně kombinují.



Počet genů jednotlivých organismů je však vždy několikanásobně vyšší, než je počet chromozomů. Proto nemohou být všechny geny volně kombinovatelné. Ty geny, které jsou uloženy v jednom a téže chromozomu (neboli ty páry alel, které jsou nesené jedním a tímž párem homologních chromozomů) jsou **vázané** a jejich soubor tvoří vazbovou skupinu. Vazbou genů tedy rozumíme, že dva nebo více sledovaných genů je složkou téže vazbové skupiny. Dále se rozlišuje syntenní skupina, kdy geny na jednom chromozomu jsou tak vzdáleny, že se chovají jako volně segregující.

T. H. Morgan v roce 1926 na základě svých výzkumů definoval pravidla, která jsou označována jako **Morganovy zákony**:

1. Geny jsou lokalizovány na chromozomech a jsou na nich uspořádány lineárně.
2. Geny jednoho chromozomu tvoří vazbovou skupinu. Organismus má tolik vazbových skupin, kolik má párů homologních chromozomů.
3. Mezi geny homologních párů chromozomů může proběhnout výměna genetického materiálu (crossing-over), jejichž frekvence je přímo úměrná vzdálenosti genů.

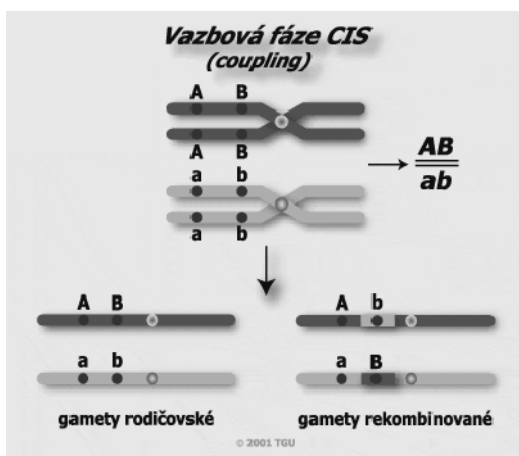


Vzdálenost mezi geny na jednom chromozomu je úměrná počtu rekombinací (crossing-overů) mezi těmito geny. Pokud bude vzdálenost větší, je větší pravděpodobnost vzniku zlomu a crossing-overu než při jejich menší vzdálenosti. **Sílu vazby** mezi dvěma geny rozumíme pravděpodobnost vzniku crossing-overu v oblasti, která je omezena těmito geny. Čímž jsou geny umístěny k sobě blíže, tím je vazba silnější, protože pravděpodobnost vzniku crossing-overu v dané oblasti klesá se zmenšováním její délky.

Vazbové fáze

a) Vazbová fáze *cis* (starší označení *coupling*)

Při křížení rodičů o genotypech $AABB$ a $aabb$, kde páry alel A/a a B/b jsou vázány, označujeme za křížení ve vazbové fázi *cis*. V této vazbové fázi je jeden z rodičů homozygotně dominantní v obou párech alel a druhý z rodičů v obou párech alel homozygotně recesivní:

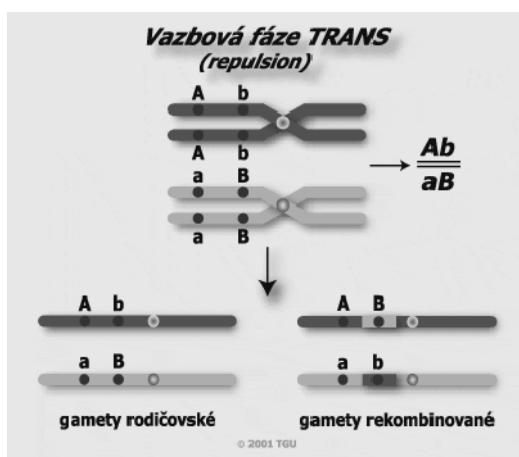


$$\begin{array}{r}
 \text{P} \quad \frac{AB}{AB} \quad \times \quad \frac{ab}{ab} \\
 \\
 \text{F}_1 \quad \frac{AB}{ab}
 \end{array}$$

Dihybrid bude ve větším počtu produkovat gamety s rodičovskou sestavou alel AB a ab , v menším podílu gamety s nerodičovskou, tj. rekombinovanou sestavou alel Ab a aB .

a) Vazbová fáze *trans* (starší označení *repulsion*)

Vazbou fází *trans* rozumíme situaci, kdy jen z rodičů je v jednom páru alel homozygotně dominantní a v druhém homozygotně recesivní ($AAbb$), přičemž druhý je svým genotypem vůči prvému reciproký ($aaBB$):

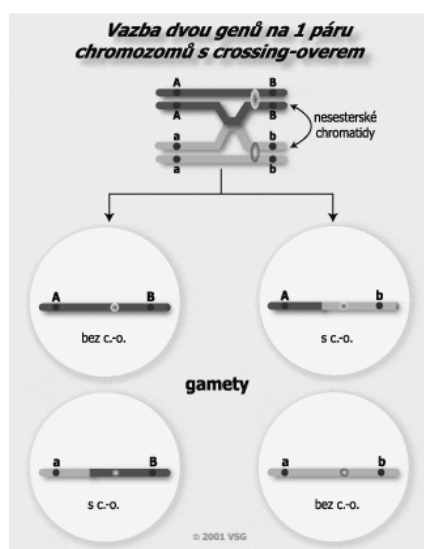
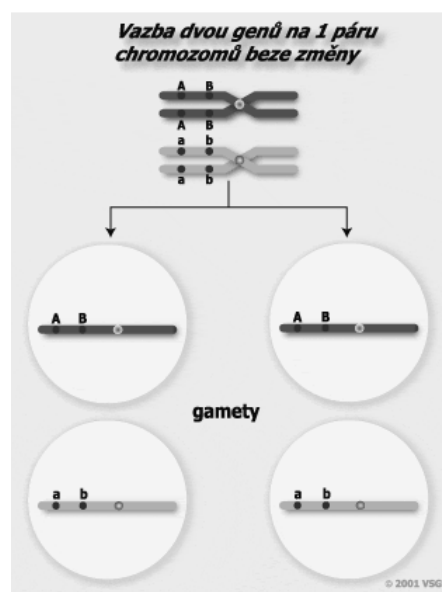


$$\begin{array}{r}
 \text{P} \quad \frac{Ab}{Ab} \quad \times \quad \frac{aB}{aB} \\
 \\
 \text{F}_1 \quad \frac{Ab}{aB}
 \end{array}$$

Dihybrid bude produkovat větší podíl gamet s rodičovskou sestavou Ab a aB a menší podíl gamet s nerodičovskou sestavou (rekombinované) – AB a ab .

Je třeba si uvědomit, že ne mezi všemi geny na jednom chromozomu musí dojít ke crossing-overu. Obrázek níže zaznamenává takovou situaci.

Pokud nedojde ke crossing-overu mezi geny, tvoří se pouze dva typy různých gamet. Každá gameta získala alely, které jsou na jednom nebo na druhém homologu. Lze zde hovořit o **úplné vazbě**. Jejím důsledkem vznikají pouze rodičovské nerekombinované (necrossované) gamety. Oba typy gamet jsou tvořeny ve stejném poměru 1:1.



Zde dochází k překřížením dvou nesesterských chromatid ze čtyř ke crossing-overu. Tato výměna tvoří dvě nové kombinace alel v gametách. Ty se pak nazývají rekombinantní (crossované) gamety.

Hodnocení síly vazby genů

Pravděpodobnost, že dva geny v dané kombinaci se nepřenesou do další generace se rovná pravděpodobnosti výskytu crossing-overu. Tato pravděpodobnost se označuje θ (theta):

- úplná vazba $\theta = 0,00$
- těsná vazba $\theta = 0,01 - 0,20$
- středně těsná vazba $\theta = 0,21 - 0,35$
- volná vazba $\theta = 0,36 - 0,49$
- volná kombinovatelnost $\theta = 0,50$



Vzdálenost mezi geny se vyjadřuje v **centimorganech** (cM), které vycházejí z rekombinačních frekvencí: 1 cM = 1 % pravděpodobnosti vzniku crossing-overů. Tato hodnota představuje mapovou vzdálenost dvou genů na chromozomu. Lze ji použít i k určení velikosti genomu nebo délky chromozomu.

Poměrnou četnost gamet rozdílných genotypů zjišťujeme hybridologickou analýzou za pomoci zpětného křížení dihybrida s recesivně homozygotním rodičem:

Gamety rodičů				
$AaBb \longrightarrow$	AB	Ab	aB	ab
$aabb \longrightarrow$	ab	ab	ab	ab
Genotypy zygot	$AaBb$	$Aabb$	$aaBb$	$aabb$
Četnosti	a_1	a_2	a_3	a_4

Symbole a_1 až a_4 označují počet zygot a tím i jedinců jednotlivých fenotypových tříd (AB , Ab , aB , ab), zároveň i počet gamet příslušných čtyř různých genotypů. Při křížení rodičů ve vazbové fázi *cis* mají větší četnost třídy a_1 a a_4 , při křížení rodičů ve vazbové fázi *trans* třídy a_2 a a_3 .

Vazbu můžeme charakterizovat pomocí:

Batesonovo číslo (c) – udává, kolikrát častěji vznikají gamety s nerekombinovaným uspořádáním alel oproti rekombinantním. Toto číslo však nevyjadřuje vzdálenost genů a neumožňuje jejich detekci. Proto se v současné době *nepoužívá*. Hodnotu c vypočítáme podle vzorce:

$$\text{fáze cis } C = \frac{a_1 + a_4}{a_2 + a_3} \quad \text{fáze trans } C = \frac{a_2 + a_3}{a_1 + a_4}$$

Morganovo číslo (p) – je mnohem vhodnější pro kvantifikaci síly vazby. Udává se v rekombinačních jednotkách nazvaných **morgany** - **M** (po T.H. Morganovi). Hodnota 1 centimorgan vyjadřuje, že dihybrid tvoří 1 % gamet s rekombinovanou sestavou alel; jinými slovy tzn., že v dané oblasti, vymezené sledovanými geny, je pravděpodobnost vzniku crossing-overu 1 % (0,01). Morganovo číslo lze rovněž stanovit zpětným křížením a vypočítat ve vztahu k vazbovým fázím takto:

$$\text{fáze cis } p = \frac{a_2 + a_3}{a_1 + a_2 + a_3 + a_4} \quad \text{fáze trans } p = \frac{a_1 + a_4}{a_1 + a_2 + a_3 + a_4}$$

Při volné kombinovatelnosti bude hodnota p rovna 50 % (0,50). Nebudou-li vznikat gamety s rekombinovanou sestavou alel, bude p rovno 0.

Vztahy mezi Batesonovým a Morganovým číslem lze zapsat:

$$C = \frac{1-p}{p} \quad \text{nebo} \quad p = \frac{1}{C+1}$$

Pomocí χ^2 testu lze zase jen zjistit, zda štěpné poměry odpovídají hypotéze volné kombinovatelnosti.

V posledních desetiletích se k vyjádření vzdálenosti genů (síly vazby) používá metoda **Lod skóre**. ($L \sim$ logaritmus; $od \sim$ odds, *angl.* šance, pro převahu pravděpodobnosti; skóre \sim poměru rekombinant ku nerekombinantám). Vyjadřuje logaritmus poměru pravděpodobnosti rekombinant ku nerekombinantám.

$$\sum Z = \log \frac{P_\theta}{P_{0,5}} \quad \begin{array}{l} P_\theta - \text{pravděpodobnost existence vazby} \\ P_{0,5} - \text{pravděpodobnost neexistence vazby} \end{array}$$

Skóre z potomstev se vypočítává v sérii rekombinačních frakcí a výsledky jednotlivých pravděpodobností θ se převedou na dekadický logaritmus, což je vlastní Lod skóre - **Z**. Z různých potomstev se pak počítá jejich součet ΣZ . Je-li $\Sigma Z \geq +3$ pak je pravděpodobnost 1000:1 pro přítomnost vazby a naopak $\Sigma Z \leq -2$ svědčí o volné kombinovatelnosti genů.

Výhody Lod skóre jsou: není nutná znalost vazbové fáze; pravděpodobnost je vyjádřena v logaritmech, lze je sčítat; rekombinační frakce, v které se vypočítá maximální hodnota Z představuje vzdálenost genů.



Nejmenší lidský chromozom č. 21 je veliký 0,5 M (~50 cM) a nejdelší č. 1 má 2 M (~200 cM). Haploidní genom člověka má asi 30 M (~3000 cM) a 1 cM obsahuje kolem 1 - 2 milióny bp a představuje informační kapacitu stovek až tisíců genů.

Porovnání vazby genů a volné kombinovatelnosti:

1. pokud jsou geny na jednom chromozomu vzdáleny od sebe 50 cM, mluvíme o volné kombinovatelnosti; při 50 % hranici rekombinace buď nastane nebo ne, na základě hybridologické analýzy nelze tuto vazbu odlišit od volné kombinovatelnosti,
2. jsou-li geny umístěny na jednom chromozomu ve vzdálenosti menší než 50 cM, jsou předány potomstvu společně, dědí se pak společně, jako blok, tzn. jsou na sebe vázány. Společné dědění genů uložených na jednom chromozomu ve vzdálenosti menší jak 50 cM způsobuje v potomstvu společnou expresi vlastností determinovaných na sebe vázaných genů. Dochází tak k omezení nebo vyloučení volné kombinovatelnosti.

Neúplná vazba a crossing-over

Jestliže vybereme náhodně dva geny vázané na jednom chromozomu, je vysoce pravděpodobné, že budou tak blízko jeden druhému podél chromozomu, že představují úplnou vazbu. Při úplné vazbě nedochází při meióze mezi geny ke crossing-overu. Pokud budeme křížit dva náhodně vybrané geny vázané na jednom chromozomu, budou téměř vždy produkovat určitý podíl potomstva, vzniklého z rekombinantních gamet. Jejich podíl je proměnlivý a závisí na vzdálenosti mezi dvěma geny na chromozomu. Pokud jsou genové páry jednoho chromozomu umístěny dále jeden od druhého, pak hovoříme o neúplné (částečné) vazbě. Při neúplné vazbě dochází při meióze k výměně genetického materiálu mezi nesesterskými chromatidami homologů. Obecně se tento proces nazývá **genetická rekombinace**.

Meiotický základ rekombinací

Ve stádiu pachytene může dojít ke zlomu chromatid s následnou fúzí sesterských nebo nesesterských chromatid. Při recipročních výměnách mezi sesterskými chromatidami nedochází ke genetické variabilitě a výměna není detekovatelná. Klíčová je výměna u nesesterských chromatid.

1. Při crossing-overu nedochází ke ztrátě nebo k přidání chromatinu.
2. Překříží se vždy pouze dvě chromatidy.
3. Může se vyskytnout i vícenásobný crossing-over mezi nesesterskými chromatidami.
4. Může nastat jakákoliv crossoverová konfigurace a výsledek může být velmi odlišný od původní kombinace alel na chromatidě.
5. Ke crossing-overu dochází až po replikaci chromozomu.

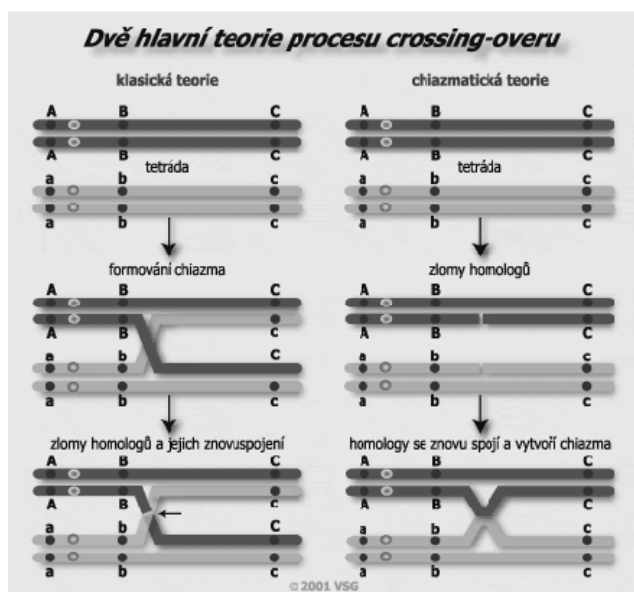
Mechanismus crossing-overu

Při crossing-overu dochází k fyzické výměně mezi molekulami DNA dvou homologních chromozomů. Zásadní význam má chiazma pozorované během profáze I meiózy a zlom s opětovným sjednocením. Sledují se dvě teorie založené na tvorbě chiazmy, ale zcela různými způsoby.

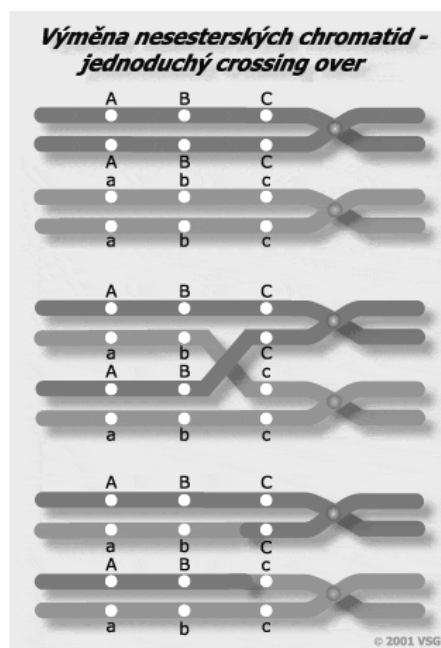


Klasická teorie

Crossing-over je výsledkem nahodilé fyzické výměny v chiazma. Překřížení v chiazma je zodpovědné za crossing-over a zcela jasně jej předchází. Tato teorie předpokládá, že ke crossing-overu dochází po stádiu diplotene, ale před oddělením chromozomů v anafázi I.

**Chiazmatická teorie**

předpokládá, že crossing-over předchází formování chiazma a dochází k němu v raném stádiu pachytene profáze I. Jako výsledek je, že chiazmata jsou tvořena místy genetické výměny, takže jsou důsledkem crossing-overu a ve stádiu diplotene dochází k projevu chromozomové výměny.

Typy crossing-overů

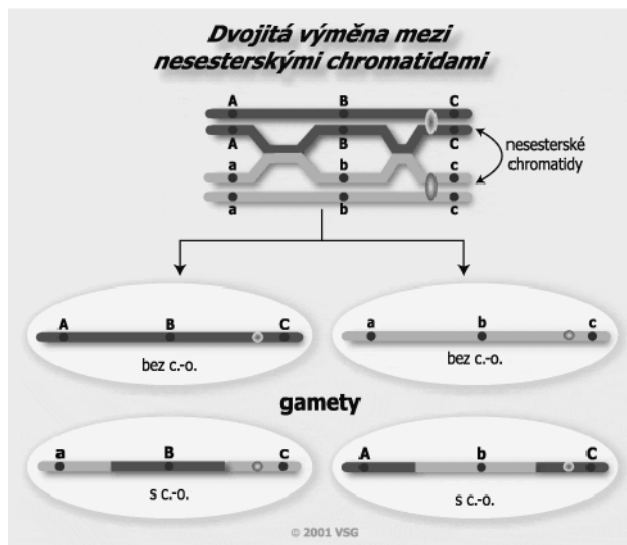
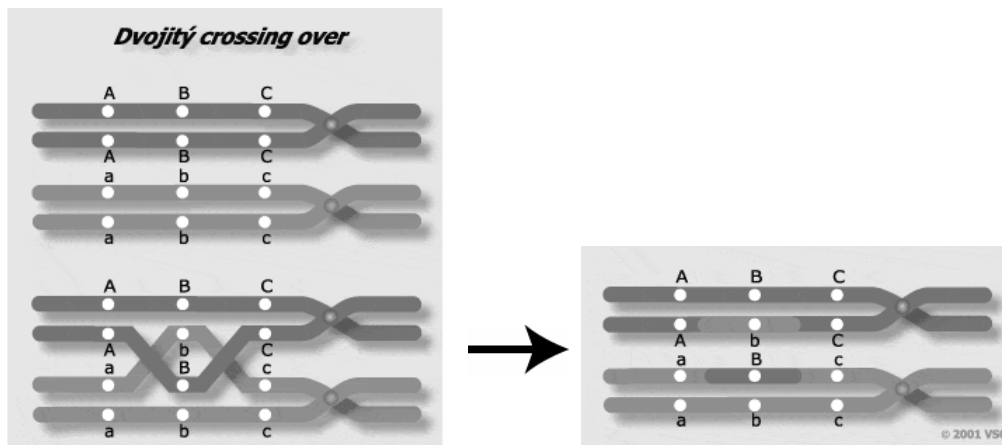
Rekombinační procesy se dějí náhodně po celé délce tetrády. Čím blíže jsou umístěné lokusy podél chromozomu, tím méně pravděpodobné je, že mezi nimi proběhne jednoduchý crossing-over. Naopak čím vzdálenější lokusy, tím větší pravděpodobnost crossing-overu.

Když dochází k **jednoduchému crossing-overu** mezi dvěma nesesterskými chromatidami, druhé dvě chromatidy tetrády jsou neovlivněny a vstupují do gamet nezměněny. I kdyby vždy (u 100 %) došlo k jednoduchému crossing-overu mezi dvěma vázanými geny, mohou být rekombinace pozorovány postupně u 50 procent potenciálně tvořených gamet.

Vícenásobné crossing-overu

Dochází také k tomu, že v jedné tetradě se vymění genetický materiál mezi dvěma, třemi i více místy nesesterských chromatid, jako důsledek více crossing-overů.

Dvojitě výměny genetického materiálu vyplývají z dvojitých crossing-overů. Pro jejich studium je třeba sledovat tři vázané geny.

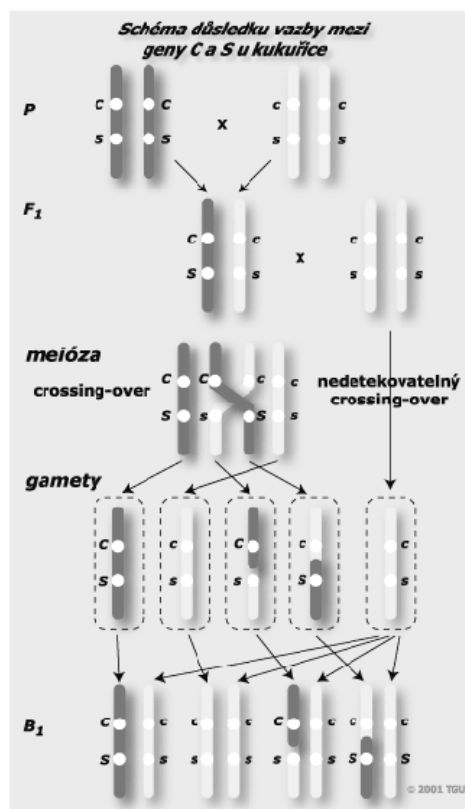


Výsledek dvojité výměny probíhající mezi nesesterskými chromatidami. Protože k výměně došlo pouze mezi dvěma chromatidami, tvoří se dvě necrossoverové gamety (rodičovské) a dvě dvojitě crossoverové (rekombinantní).



Síla vazby genů a mapování

Příklad výpočtu c a p



U kukuřice (*Zea mays*) je pár alel C/c řídící zbarvení aleuronové vrstvy obilek ve vazbě s párem alel S/s , řídící tvar obilek. Mezi alelami jednotlivých genů platí vztah dominance.

C – fialové zbarvení aleuronu, c – nezbarvený aleuron

S – hladké obilky, s – svrasklé obilky

Provede-li se klasický genetický pokus pro vznik hybridní generace a její testování zpětným křížením získáme všechny možné kombinace alel a fenotypů, jako by šlo o volnou kombinovatelnost. Oba geny jsou však na jednom chromozomu. Podíl jednotlivých fenotypů není roven poměru 1:1:1:1, jako při volné kombinovatelnosti.

Křížené rodičovské komponenty jsou ve fázi **cis**. Dihybrid F_1 generace tvoří nerekombinované gamety CS a cs s větším podílem a s menším podílem gamety rekombinované Cs a cS . Po zpětném křížení s recesivním homozygotem $ccss$ byly zjištěny tyto hodnoty:

Genotypy gamet F_1 generace ($CcSs$)	CS	Cs	cS	cs
Genotypy gamet rodiče ($ccss$)	cs	cs	cs	cs
Genotypy obilek BC_1	$CcSs$	$Ccss$	$ccSs$	$ccss$
Fenotypy obilek BC_1	CS	Cs	cS	cs
Počet	4032	149	152	4035
Označení fenotypové třídy	a_1	a_2	a_3	a_4

Batesonovo číslo:

$$c = (a_1 + a_4)/(a_2 + a_3) = (4\,032 + 4\,035)/(149 + 152) = 8\,067/301 = \mathbf{26,8}$$

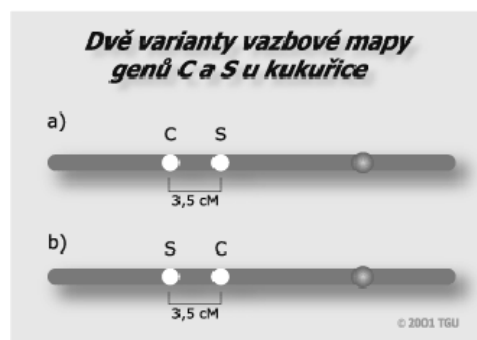
Gamety s rodičovskou sestavou vznikají 26,8krát častěji než rekombinované gamety.

Morganovo číslo:

$$p = (a_2 + a_3)/(a_1 + a_2 + a_3 + a_4) = (149 + 152)/(4\,032 + 149 + 152 + 4\,035) = 301/8\,368 = 0,035 \text{ M} = \mathbf{3,5 \text{ cM}}$$

Podíl rekombinovaných gamet je 3,5 % a vzdálenost mezi lokusy C a S je tedy 3,5 cM.

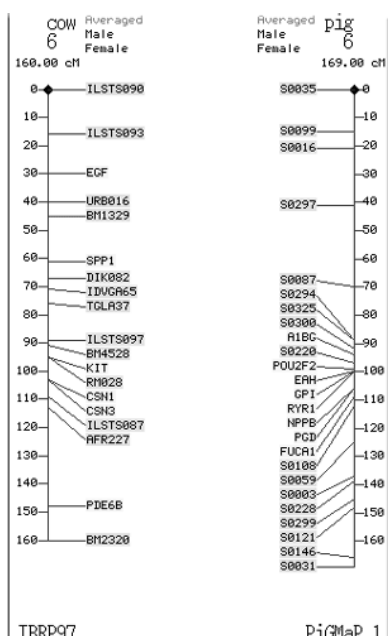
Při mapování dvou genů můžeme zjistit jejich vzájemnou vzdálenost, jako v tomto příkladě (3,5 cM mezi geny C a S). Nelze však určit v jakém pořadí se geny vyskytují od centromery. Nevíme tedy, zda jejich pořadí je **S-C (a)** nebo **C-S (b)**.



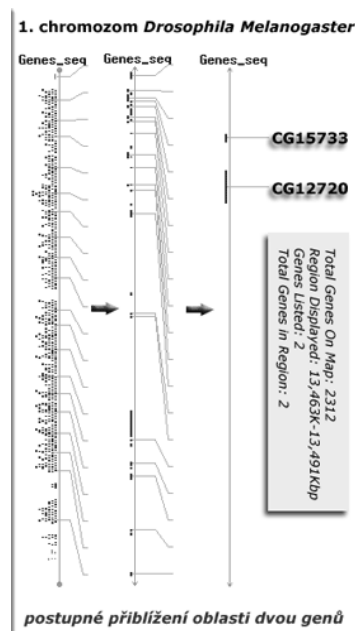
Konstrukce genetických map

Genetická mapa vyjadřuje:

- vazbou skupinu,
- symboly mutantních genů,
- vzdálenost genů v centimorganech z jednoho konce chromozomu, který je považovaný za nulový bod,
- označení centromery.



Genetická mapa 6. chromozomu u skotu a prasete.



Genetická mapa 1. chromozomu octomilka.

Cílem genetického mapování je určit pořadí genů a jejich vzdálenosti na chromozomech. Kromě **genetických (rekombinačních) map**, využívající rekombinační frekvence a popisující vzdálenosti genů v cM, se konstruují i **fyzické mapy** založené na sekvencování a jednotkami jsou přímo nukleotidy (lidský genom byl osekvencován na jaře roku 2001). Jejich informace se sjednocují v nejpřesnějším mapování genů ve spojení s cytogenetickými technikami.

Pro genetické mapování je výhodnější použít **tříbodový test**, kdy současně sledujeme dílčí vazbové vztahy (rekombinační frekvence) 3 různých genů, např. A, B, C.

$$\frac{ABC}{abc} \times \frac{abc}{abc}$$

Gamety F ₁	Genotypy zygot	Počet jedinců	Počet jedinců v %
<i>ABC</i> nerekombinované (rodičovské) <i>abc</i>	$\frac{ABC}{abc}$ $\frac{abc}{abc}$	580 592 celkem 1172	80,94
$\frac{AB}{c}$ jednoduchý c.-o. mezi <i>B</i> a <i>C</i> $\frac{ab}{C}$	$\frac{ABc}{abc}$ $\frac{abC}{abc}$	45 40 celkem 85	5,87
$\frac{A}{bc}$ jednoduchý c.-o. mezi <i>A</i> a <i>B</i> $\frac{a}{BC}$	$\frac{Abc}{abc}$ $\frac{aBC}{abc}$	89 94 celkem 183	12,64
$\frac{A}{b/C}$ dvojitý c.-o. $\frac{a}{B/c}$	$\frac{AbC}{abc}$ $\frac{aBc}{abc}$	3 5 celkem 8	0,55
Celkem		1448	100 %

Postup:

- Určíme rodičovské genotypy.** Jsou to vždy ty, s největší frekvencí. Zde se jedná o genotypy *ABC* a *abc*.
- Určíme pořadí genů.** Vycházíme ze znalosti dvojitého crossing-overu, který určíme z nejnižší frekvence genotypů - zde *AbC* a *aBc*. Je nutné si uvědomit, že dvojitý crossing-over přesune prostřední alelu mezi nesesterskými chromatidami. Můžeme vidět, že gen *B* musí být uprostřed, protože recesivní alela *b* je nyní na stejném chromozomu jako alely *A* a *C* a dominantní alela *B* je na stejném chromozomu jako recesivní alely *a* a *c*. Pořadí genů na chromozomu je **ABC**.
- Určíme vazbové vzdálenosti mezi geny.** Určíme vazbové vzdálenosti mezi geny *A-C* a *C-B*. Vazba se vypočítá jako podíl celkového počtu rekombinantních gamet k celkovému počtu gamet (\sim Morganovo číslo *p*). Je třeba vzít v úvahu dvojitý crossing-over. Do obou výpočtů vzdálenosti se proto začlení jeho hodnota.
 - A-B* vzdálenost: $(89+94+3+5)/1448 = 0,1319 \sim 13,19$ cM
 - B-C* vzdálenost: $(45+40+3+5)/1448 = 0,0642 \sim 6,42$ cM
 - Jestliže je správné konstatování, že překřížení je funkcí vzdálenosti mezi geny, pak můžeme stanovit mezi geny *A* a *C*, jako součet dvou frekvencí jednoduchých c.-o.: $13,19 + 6,42 = 19,61$ cM. V daném případě však celkový počet jednotlivých c.o. mezi geny *A* a *C* činí $(89+94+45+40)/1448 = 0,1851 \sim 18,51$ cM. Vzdálenost mezi geny *A* a *C* vyjádřena součtem jednotlivých c.o. je větší o 1,1 cM než celá vzdálenost *A-C*.
 - Určení vzdálenosti mezi geny *A* a *C*: $18,51 + 2 \times 0,55 = 19,61$ cM. Zdvojení procenta dvojitých c.o. je nutné proto, že každý dvojitý c.o. vzniká na základě dvou nezávislých jednoduchých zlomů ve dvou bodech.



4. Nakreslení mapy.



Proč se hodnota celého úseku AC nerovná součtu dílčích úseků AB a BC ?

Interference a koeficient koincidence

Mapování genů je tím přesnější, čím jsou vzájemně v silnější vazbě a čím méně se uplatňuje tzv. interference. Do asi 20 - 25 cM je mapová vzdálenost shodná s rekombinační frekvencí. Nad 20 - 25 cM se vzdálenosti "prodlužují" (vzrůstá počet vícenásobných rekombinací) a sčítání dílčích mapových vzdáleností je více nepřesné a nad 0,35 cM nespolehlivé.

Interference (I) se měří mezi crossing-overů v dané oblasti chromozomu. Vyskytnou-li se dvojitý crossing-over, lze uvažovat o interferenci. Dané specifické rekombinační poměry ve dvou sousedních chromozomových vzdálenostech, pak poměr dvojitých crossing-overů je v této oblasti roven součinu jednoduchých crossing-overů: $(0,1319 \times 0,0642) \times 100 = 0,847 \%$ dvojitých rekombinací. V našem případě by se jednalo o 12,3 dvojitých rekombinantů ($1448 \times 0,00847$). Ve skutečnosti jich bylo odhaleno jen 8.

K měření interference je nutné nejdříve vypočítat **koeficient koincidence (c.o.c.)**, který je dán poměrem pozorovaných k očekávaným dvojitým crossing-overům (2c.o.). Interference je pak rovna $1 - \text{c.o.c.}$

$$I = 1 - \text{c.o.c.} = 1 - \left(\frac{\text{pozorovaný 2 c.o.}}{\text{očekávaný 2 c.o.}} \right)$$

Pro náš případ je hodnota interference 33 % $[(1 - 8/12) \times 100]$.

Vazbová nerovnováha

Při neúplné vazbě dvou genů na homologních chromozomech se předpokládá jejich rovnoměrné rozložení v populaci - frekvence všech 4 kombinací ve stejném poměru (AB, Ab, aB, ab). Často dochází k odchylkám a nerovnoměrnému rozložení - určité kombinace se vyskytují častěji než jiné. Tomuto stavu nerovnoměrné frekvenci alel vázaných genů se říká vazbová nerovnováha. Vysvětlení možných příčin:

- populace se vyvíjí v izolaci s Inbridingem a náhodným genetickým driftem
- asociace více alel je dána jejich evoluční výhodností
- od vzniku alel neuplynula delší doba, aby dosáhly rovnováhy

Využití vazbové nerovnováhy se v současné době hledá v mapování lokusů kvantitativních vlastností (QTL) pomocí genetických markerů a její možné využití ve šlechtění.