

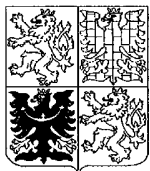
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2282

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.12.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9726804**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/08543**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/32643**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/85

C 07 K 14/47

C 07 K 16/18

C 12 Q 1/68

(71) Přihlašovatel:

VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUUT
VOOR BIOTECHNOLOGIE, Zwijnaarde, BE;

(72) Původce:

Van Broeckhoven Christine, Edegem, BE;
Raeymaekers Peter, Lint, BE;
Del-Favero Jurgen, Tienen, BE;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Gen asociovaný s poruchou nálady, jeho použití a způsob identifikace

(57) Anotace:

Řešení poskytuje použití úseku lidského chromozomu 18q velikosti 8,9 cM, ležícího mezi polymorfními markery D18S68 a D18S79 nebo jeho fragmentu pro identifikaci alespoň jednoho lidského genu, včetně jeho mutovaných nebo polymorfních variant, který je asociován s poruchou nálady nebo příbuznými poruchami. Také poskytuje způsob stanovení náchylnosti jedince k poruše nálady nebo příbuzné poruše, který obsahuje analýzu vzorku DNA na přítomnost úseku trinukleotidových repetit ve výše zmíněné oblasti. Dále poskytuje polynukleotidové sekvence užitečné pro detekci přítomnosti takových úseků trinukleotidových repetit.

18.05.00

PV/1000-282

4458

177 970/KB

1

Gen asociovaný s poruchou nálady, jeho použití a způsob identifikace

Oblast techniky

Vynález se týká určení genetických faktorů sdružených s psychickým zdravím se zvláštním zřetelem na lidský gen nebo geny, které k němu přispívají nebo jsou zodpovědné za projevy poruchy nálady nebo příbuzné poruchy u postižených jedinců.

Hlavně, i když ne výlučně, vynález poskytuje způsob identifikace a charakterizace takového genu nebo genů lidského chromozomu 18, a také genů takto identifikovaných a jejich expresních produktů. Vynález se také týká způsobů určování genetické vnímavosti jedince k poruše nálady nebo příbuzné poruše. Poruchami nálady nebo příbuznými poruchami se míní následující poruchy, jak jsou definovány v knize "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders", verze 4 (DSM-IV) taxonomie (kódy DSM-IV v závorkách): poruchy nálady (296.XX, 300.4, 311, 301.13, 295.70), schizofrenie a příbuzné poruchy (295.XX, 297.1, 298.8, 297.3, 298.9), úzkostné poruchy (300.XX, 309.81, 308.3), poruchy přizpůsobování (309.XX) a poruchy osobnosti (kódy 301.XX).

Způsoby podle vynálezu jsou konkrétně uvedeny ve vztahu ke genetickým faktorům na příkladu rodiny s poruchou nálady známou jako poruchy bipolárního (BP) spektra.

Dosavadní stav techniky

Bipolární porucha (BP) je vážný psychiatrický stav, který je charakterizován poruchami nálady v rozsahu od

naprostého stavu euforie k vážnému stavu dysforie (deprese). Byly popsány dva typy bipolární nemoci: typ I nemoci BP (BPI) je charakterizován hlavními epizodami deprese vystřídányými fázemi mánie a typ II nemoci BP (BPII) je charakterizován hlavními epizodami deprese vystřídányými fázemi hypománie. Příbuzní probandů s BP mají zvýšené riziko BP, unipolární poruchy (pacienti, kteří prožívají pouze epizody deprese, UP), cyklotymie (menší epizody deprese a hypománie, CY), a také schizoafektivní poruchy manického (SAm) a depresivního typu (SAd). Na základě těchto pozorování jsou BP, CY, UP a SA klasifikovány jako poruchy BP spektra. Pro zapojení genetických faktorů do etiologie poruch BP spektra svědčí studie prováděné na rodinách, dvojčatech a adoptivních rodinách (Tsuang and Faraone, *The Genetics of Mood Disorders*, Baltimore, The John Hopkins University Press, 1990). Avšak přesný typ dědičnosti je neznámý. V některých studiích komplexní segreganční analýza podporuje existenci jednoho hlavního lokusu pro BP (Spence et al., *Am. J. Med. Genet., Neuropsych. Genet.*, 60, 370-376, 1995). Jiní vědci navrhují model prahového rizika, ve kterém riziko rozvoje poruchy vyplývá z aditivní kombinace četných genetických faktorů a vlivu životního prostředí (McGuffin et al., *Affective Disorders, Seminars in Psychiatric Genetics*, Gaskell, London, 110-127, 1994).

Díky složitému způsobu dědičnosti jsou aplikovány parametrické a neparametrické vazbové strategie na rodiny, ve kterých se zdá, že porucha BP se dědí mendelovským způsobem. Dřívější nálezy vazby na chromozomech 11p15 (Egeland et al., *Nature*, 325, 783-787, 1987) a Xq27-q28 (Mendlewicz et al., *The Lancet*, 1, 1230-1232, 1987, Baron et al., *Nature*, 326, 289-292, 1987) byly kontroverzní a nemohly být původně reprodukována (Kelsoe et al., *Nature*, 242, 238-243, 1989,

Baron et al., Nature Genet., 3, 49-55). S rozvojem lidské genetické mapy zaplněné vysoce polymorfními markery a ustavičným vývojem technik analýzy dat byly započaty mnohé nové studie na hledání vazby. V několika studiích byl nalezen důkaz nebo náznak důkazu pro vazbu ke konkrétním oblastem na chromozomech 4, 12, 18, 21 a X (Blackwood et al., Nature Genet., 12, 427-430, 1996, Craddock et al., Brit. J. Psychiatry, 164, 355-358, 1994, Berrettini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5918-5921, 1994, Straub et al., Nature Genet., 8, 291-296, 1994 a Pekkarinen et al., Genome Research, 5, 105-115, 1995). Aby se otestovala validita publikovaných vazbových výsledků, musí být tyto nálezy opakovány v jiných nezávislých studiích.

Nedávno byla publikována vazba bipolárních poruch na pericentromerickou oblast chromozomu 18 (Berrettini et al., 1994). Byl také popsán ring-chromozom 18 se zlomy a deletovanými oblastmi v 18pter-p11 a 18q23-qter u tří nepříbuzných pacientů s nemocí BP nebo příbuznými syndromy (Craddock et al., 1994). Vazba chromozomu 18 byla znovu potvrzena autory Stine et al., (Am. J. Hum. Genet., 57, 1384-1394, 1995), kteří také popsali fakta svědčící pro lokus na 18q21.2-q21.32 v téže studii. Je zajímavé, že Stine et al., pozorovali jev parentálního vlivu: důkaz vazby byl nejsilnější v paternálních rodokmenech, ve kterých byl postižen otec probanda nebo jeden ze sourozenců otce probanda.

V nezávislé replikační studii testovali původci vynálezu vazbu s markery chromozomu 18 u 10 belgických rodin s probandem s bipolární poruchou. Pro lokalizaci kauzativních genů se v těchto rodinách používaly analýza vazby nebo metoda pravděpodobnosti. Tato metoda studuje v rodině segregaci

definovaného fenotypu nemoci se segregací polymorfních genetických markerů rozšířených v lidském genomu. Vypočítává se poměr pravděpodobnosti pozorované kosegregace (společné segregace) nemoci a genetického markeru při vazbě proti žádné vazbě a logaritmus tohoto poměru nebo logaritmus rozdílu je tzv. LOD-skóre (Z-statistika). LOD-skóre v hodnotě 3 (nebo-li poměr pravděpodobnosti 1000 nebo vyšší) se bere jako významný statistický důkaz vazby. Ve studii původců vynálezu nebyl nalezen důkaz vazby k pericentromerické oblasti, ale u jedné rodiny, MAD31, belgické rodiny probanda s BP11, byla nalezena přesvědčivá vazba s markery lokalizovanými v 18q21.33-q23 (De bruyn et al., Biol. Psychiatry, 39, 679-688, 1996). Vícebodová vazbová analýza poskytla nejvyšší LOD-skóre v intervalu mezi STR (krátké tandemové repetice) polymorfismy D18S51 a D18S61, s maximem vícebodového LOD-skóre +1,34. Simulační studie ukázaly, že toto LOD-skóre je v rozmezí, které může být očekáváno u vázaného markeru daného informací dostupnou v rodině. Podobně také párová analýza postižených sourozenců zavrhl nulovou hypotézu neexistující vazby u několika z testovaných markerů. Dvě další skupiny také našly důkazy pro vazbu bipolární poruchy na 18q (Freimer et al., Nature Genetics, 12, 436-441, 1996, Coon et al., Biol. Psychiatry, 39, 689-696, 1996). Ačkoliv se kandidátské oblasti v různých studiích nepřekrývají úplně, svědčí všechny pro přítomnost lokusu vnímavosti v 18q21-q23.

Podstata vynálezu

Další zkoumání chromozomové oblasti 18q u rodiny MAD31 bylo provedeno původci předkládaného vynálezu. Analýzou kosegregace bipolární poruchy u MAD31 s dvanácti markery pro

STR polymorfismus, které byly dříve lokalizovány mezi výše uvedenými markery D18S51 a D18S61 a následnou analýzou LOD-skóre, jak je popsána výše, původci vynálezu dále zpřesnili kandidátskou oblast chromozomu 18, ve které může být lokalizován gen asociovaný s poruchami nálady jako jsou poruchy bipolárního spektra, a zkonstruovali fyzikální mapu. Zkoumaná oblast může být tudíž použita k lokalizaci, izolaci a sekvencování genu nebo genů, které ovlivňují psychické zdraví a náladu.

Původci vynálezu také zkonstruovali YAC (kvasinkový umělý chromozom) kontigovou mapu kandidátské oblasti, aby určili relativní pořadí dvanácti STR markeru mapovaných kosegregační analýzou a identifikovali sedm klonů z YAC knihovny, které inkorporovaly kandidátskou oblast.

V procesu identifikace a charakterizace relevantního genu nebo genů může být použito velké množství procedur pro průzkum označených YAC klonů a, kde je to použitelné, DNA jedince postiženého poruchou nálady, jak je zde definována. Například původci vynálezu použili YAC klony obsahující zkoumanou oblast chromozomu 18 pro identifikaci nových genů, které jsou údajně zapojeny do manifestace poruch nálady nebo příbuzných poruch, prostřednictvím fragmentace CAG nebo CTG.

Pro identifikaci kandidátských genů mohou být na uvedené YAC klony také použity další postupy, jak je projednáno níže.

Jakmile jsou jednou identifikovány kandidátské geny, je možné stanovit vnímavost jedince k poruše nálady nebo k příbuzné poruše detekcí výskytu polymorfismu spojeného s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou u těchto genů.

Tudíž prvním aspektem předkládaného vynálezu je použití oblasti lidského chromozomu 18q velikosti 8.9 cM umístěné mezi polymorfními markery D18S68 a D18S979 nebo jejího

fragmentu pro identifikaci alespoň jednoho lidského genu, včetně jeho mutovaných a polymorfních variant, který je asociovaný s poruchami nálady nebo příbuznými poruchami, jak je definováno výše. Jak bude popsáno dále, identifikovali původci vynálezu tuto kandidátskou oblast chromozomu 18q pro tento gen analýzou kosegregace bipolární nemoci u rodiny MAD31 s dvanácti markery STR polymorfismu předem lokalizovanými mezi D18S51 a D18S61 a následnou analýzou LOD-skóre.

Ve druhém aspektu vynález zahrnuje použití YAC klonu obsahujícího část lidského chromozomu 18q umístěnou mezi polymorfními markery D18S60 a D18S61 pro identifikaci alespoň jednoho lidského genu, včetně jeho mutovaných a polymorfních variant, který je sdružený s poruchami nálady nebo příbuznými poruchami, jak je definováno výše. D18S60 je blízko D18S51, takže konkrétní YAC klony, které se mohou použít, jsou ty, které mají umělý chromozom překlenující kandidátskou oblast lidského chromozomu 18q mezi polymorfními markery D18S51 a D18S61, jak bylo určeno původci vynálezu ve jejich dřívějším článku (De bruyn et al., 1996).

Konkrétní YAC klony pokrývající kandidátskou oblast, které mohou být použity podle předkládaného vynálezu, jsou 961_h_9, 942_c_3, 766_f_12, 731_c_7, 907_e_1, 752_g_8 a 717_d_3, výhodné jsou 961_h_9, 766_f_12 a 907_e_1, protože mají minimální překryvy v kandidátské oblasti. Vhodné YAC klony pro použití jsou ty, které obsahují umělý chromozom překlenující zpřesněnou kandidátskou oblast mezi D18S68 a D18S979.

Existuje velké množství metod, které mohou být použity pro kandidátskou oblast chromozomu 18q, jak je definováno výše, ať už je nebo není přítomna v YAC, pro identifikaci kandidátského genu nebo genů sdružených s poruchami nálady

nebo příbuznými poruchami. Například bylo dříve dokázáno, že existuje zřejmá asociace mezi výskytem trinukleotidových repetitivních expanzí (TRE) v lidském genomu a fenoménem očekávaných poruch nálady (Lindblad et al., *Neurobiology of Disease*, 2, 55-62, 1995 a O'Donovan et al., *Nature Genetics*, 10, 380-381, 1995).

Ve třetím aspektu předkládaný vynález tudíž zahrnuje způsob identifikace alespoň jednoho lidského genu, včetně jeho mutovaných a polymorfních variant, který je sdružený s poruchami nálady nebo příbuznými poruchami, jak je zde definováno, a který zahrnuje detekci nukleotidových tripletových repeticí v oblasti lidského chromozomu 18q umístěné mezi polymorfními markery D18S68 a D18S979.

Alternativní způsob identifikace uvedeného genu nebo genu zahrnuje fragmentaci YAC klonu obsahujícího část lidského chromozomu 18q umístěnou mezi polymorfními markery D18S60 a D18S61, například jednoho nebo více ze sedmi výše uvedených YAC klonů, a detekci každé nukleotidové tripletové repetice v uvedených fragmentech. Vhodnými prostředky detekce jsou náležitě značené sondy nukleových kyselin obsahující alespoň 5 a výhodně alespoň 10 CTG a/nebo CAG tripletu. Trinukleotidové repetice mohou být také určovány s použitím systému RED (detekce repetitivní expanze) (Shalling et al., *Nature Genetics*, 4, 135-139, 1993).

Ve čtvrtém provedení vynález zahrnuje způsob identifikace alespoň jednoho genu, včetně jeho mutovaných a polymorfních variant, který je sdružený s poruchami nálady nebo příbuznými poruchami a který se vyskytuje v YAC klonu obsahujícím oblast lidského chromozomu 18q mezi polymorfními markery D18S60 a D18S61, způsob zahrnuje krok detekce expresního produktu genu obsahujícího nukleotidové tripletové repetice při použití protilátky schopné rozpoznat protein

s aminokyselinovou sekvencí zahrnující sled alespoň 8, ale výhodněji alespoň 12, souvislých glutaminových zbytků. Tento způsob může být prováděn subklonováním YAC DNA, například ze sedmi výše uvedených YAC klonů, do lidské DNA expresní knihovny. Výhodným prostředkem detekce relevantního expresního produktu je použití monoklonální protilátky, konkrétně mAB 1C2, jejíž příprava a vlastnosti jsou popsány v mezinárodní patentové přihlášce č. WO 97/17445.

Jak bude detailně popsáno níže, pro identifikaci kandidátských genů obsahujících tripletové repetice prováděli původci vynálezu přímou CAG nebo CTG fragmentaci YAC klonu 961_h_9, 766_f_12 a 907_e_1, zahrnujících část lidského chromozomu 18q umístěnou mezi polymorfními markery D18S60 a D18S61 a identifikovali velký počet sekvencí obsahujících CAG nebo CTG repetice, jejichž abnormální expanze může souviset s genetickou predispozicí k poruše nálady nebo příbuzné poruše.

V pátém aspektu tudíž vynález poskytuje nukleovou kyselinu obsahující sekvenci nukleotidů ukázanou na kterémkoliv z obrázků 15a, 16a, 17a, nebo 18a.

V dalším aspektu vynález poskytuje protein obsahující aminokyselinovou sekvenci kódovanou sekvencí nukleotidů ukázanou na kterémkoliv z obrázků 15a, 16a, 17a, nebo 18a.

V ještě dalším aspektu vynález poskytuje mutovanou nukleovou kyselinu obsahující sekvenci nukleotidů, která se liší od sekvence nukleotidů ukázané na kterémkoliv z obrázků 15a, 16a, 17a, nebo 18a pouze rozsahem trinukleotidových repetit.

Je jasné, že předmětem vynálezu je také nukleotidová sekvence, která je ze 75 % a výhodně alespoň z 80 % homologní k jakékoliv ze sekvencí popsaných výše a která je funkčně totožná s jakoukoliv výše uvedenou sekvencí. Homologie je

vypočítána, jak to popsali autoři Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25, 3389-3402, 1997, Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2264-68, 1990 a Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873-5877, 1993. Jsou také uvažovány aminokyselinové sekvenční, které se od výše popsaných sekvencí liší pouze změnami konzervativních aminokyselin. Vhodné změny jsou odborníkovi dobře známy.

Znalost sekvencí popsaných výše může být využita pro navržení testů pro určení genetické vnímavosti jedince k poruše nálady nebo příbuzné poruše.

V dalším aspektu tedy vynález poskytuje způsob určování vnímavosti jedince k poruše nálady nebo příbuzné poruše, který zahrnuje kroky:

- a) získání vzorku DNA od uvedeného jedince
- b) určení primerů vhodných pro amplifikaci nukleotidové sekvence obsažené v sekvenci ukázané na kterémkoliv z obrázků 15a, 16a, 17a, nebo 18a, primery ohraničují trinukleotidové repetice obsažené v sekvenci,
- c) použití uvedených primerů na uvedený vzorek DNA a provádění amplifikační reakce,
- d) provádění stejné amplifikační reakce na vzorku DNA kontrolního jedince a
- e) srovnání výsledku amplifikační reakce uvedeného jedince a kontrolního jedince,

kde výskyt amplifikovaného fragmentu u uvedeného jedince, který je větší než fragment kontrolního jedince, indikuje přítomnost vnímavosti k poruše nálady nebo příbuzné poruše u uvedeného jedince.

Kontrolním jedincem se míní osoba, která není postižena poruchou nálady nebo příbuznou poruchou a nemá rodinnou anamnézu poruchy nálady nebo příbuzné poruchy.

Primery výhodné pro použití v tomto způsobu jsou ukázané na obrázku 15b, 16b, 17b nebo 18b, ale mohou být použity jiné vhodné primery.

V dalším aspektu vynález poskytuje způsob určování vnímavosti jedince k poruše nálady nebo příbuzné poruše, který zahrnuje kroky:

- a) získání vzorku proteinu od uvedeného jedince a
- b) detekce výskytu proteinu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci kódovanou sekvencí nukleotidů, která se liší od sekvence nukleotidů ukázané na kterémkoliv z obrázků 15a, 16a, 17a, nebo 18a pouze rozsahem trinukleotidových repeticí,

kde výskyt uvedeného proteinu indikuje přítomnost vnímavosti k poruše nálady nebo příbuzné poruše u uvedeného jedince.

Svrchu uvedený protein je výhodně detekován použitím protilátky, která je schopná rozpoznat sled alespoň 8 souvislých glutaminů, jako například protilátka mAB 1C2.

Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být výhodně obsaženy v expresním vektoru, který může být vnesen do hostitelské buňky prokaryotického nebo eukaryotického puvodu. Vhodné expresní vektory zahrnují plazmidy, které mohou být použity k expresi cizorodé DNA v bakteriálních nebo eukaryotických hostitelských buňkách, virových vektorech, kvasinkových umělých chromozomech nebo savčích umělých chromozomech. Vektor může být transfekován nebo transformován do hostitelských buněk při použití vhodných metod v oboru známých, jako je například elektroporace, mikroinjekce, infekce, lipoinfekce a přímé vychytávání. Tyto metody jsou detailněji popsány například autory Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vydání, 1989)

a Ausubel et al., (Current Protocols in Molecular Biology, 1994).

Vynález také poskytuje hostitelskou buňku, tkáň nebo organismus obsahující expresní vektor podle vynálezu. Vynález dále poskytuje transgenní hostitelskou buňku, tkáň nebo organismus obsahující transgen schopný kódovat proteiny podle vynálezu, který může obsahovat genomovou DNA nebo cDNA. Transgen může být přítomný v transgenní hostitelské buňce, tkáni nebo organismu buď trvale integrován nebo mimo chromozom.

Molekula nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci ukázanou na kterémkoliv z obrázku 15a, 16a, 17a, nebo 18a, a také protein jí kódovaný, mohou být terapeuticky použity v léčbě poruch nálady nebo příbuzných poruch u pacientu, kteří mají trinukleotidovou repetitivní expanzi (TRE) v alespoň jedné z výše uvedených sekvencí.

V dalším svém aspektu vynález tedy poskytuje výše popsané molekuly nukleové kyseliny a proteiny pro použití jako léčiva pro léčení jedinců s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou. Výhodně jsou nukleová kyselina nebo protein přítomny v příhodném nosiči nebo ve vhodném podávacím vehikulu. Například nukleová kyselina vložená do vektoru, např. plazmidu nebo virového vektoru může být transfekována do savčí buňky, jako je somatická buňka nebo buňka savčí zárodečné buněčné linie, jak je popsáno výše. Buňka pro transfekci může být přítomna v biologickém vzorku získaném od pacienta, jako je například krev nebo kostní dřeň, nebo může být získána z tkáňové kultury. Po transfekci může být vzorek vrácen nebo znovu podán pacientovi užitím metod odborníkům známých, například podle metod popsaných v publikacích: Kasid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 473, 1990, Rosenberg et al., New Eng. J. Med., 323, 570, 1990, Williams et al.,

Nature, 310, 476, 1994, Dick et al., Cell, 42, 71, 1985, Keller et al., Nature, 318, 149, 1985 a Anderson et al., US Patent č. 5 399 346, 1994.

Existuje velké množství virových vektorů, které jsou odborníkům známy, které mohou být použity pro zavedení nukleových kyselin do savčích buněk, například retroviry, parvoviry, koronaviry, negativní RNA viry, jako pikornaviry nebo alfaviry a dvouvláknové DNA viry včetně adenovirů, herpesvirů, jako viry herpes simplex typu 1 a 2, virus Epstein-Barrové nebo cytomegalovirus a poxviry, jako vakcinie drubeže nebo kanáru. Další viry zahrnují například viry Norwalk, togaviry, flaviviry, reoviry, papovaviry, hepadnaviry a viry hepatitidy.

Výhodný způsob pro zavedení nukleové kyseliny, která kóduje požadovaný protein, do buněk užívá virové vektory upravené metodami genetického inženýrství. Tyto vektory poskytují prostředek pro zanesení nukleových kyselin do klidových buněk a buněk s probíhajícím buněčným cyklem a byly modifikovány tak, aby se snížila cytotoxicita a zlepšila genetická stabilita. Zkušenému odborníkovi je známa příprava a použití těchto upravených vektorů, virus herpes simplex typu 1 (Krisky, D.M., et al., Gene Therapy, 4(10), 1120-1125, 1997), adenovirových vektorů (Amalfitano, A., et al., Journal of Virology, 72(2), 926-933, 1998), oslabených lentivirových vektorů (Zufferey, R., et al., Nature Biotechnology, 15(9), 871-875, 1997) a adenovirových/retrovirových chimérických vektorů (Feng, M. et al., Nature Biotechnology, 15(9), 866-870, 1997).

Protein může být podáván s použitím způsobů v oboru známých. Například způsob podávání je výhodně v místě cílových buněk. Podávání se může provádět prostřednictvím injekce. Další způsoby podávání (parenterální, slizniční,

systémové, implantátem, intraperitoneální apod.) jsou v oboru všeobecně známy. Přípravky mohou být výhodně podávány ve farmaceuticky přijatelném nosiči, jako je fyziologický roztok, sterilní voda, Ringerův roztok a izotonický roztok chloridu sodného.

V ještě dalším ze svých aspektů vynález poskytuje způsob testování vhodný pro identifikaci sloučenin, které jsou schopné zvýšit nebo inhibovat expresi proteinů podle vynálezu. Tyto testy se mohou provádět například transfekcí nukleové kyseliny podle vynálezu do hostitelských buněk a pak srovnáváním hladin transkriptů mRNA nebo hladin proteinu exprimovaného z uvedených nukleových kyselin v přítomnosti nebo chybění sloučeniny.

Pro měření transkripce nebo expresních hladin mohou být použity různé metody, dobře známé odborníkům v oboru.

Alternativně je možné identifikovat sloučeniny, které modulují transkripci, prostřednictvím použití testu s reportérovým genem, v oboru dobře známý typ testu. V tomto textu je konstruován reportérový plazmid, ve kterém je promotor genu, jehož hladiny transkripce se mají monitorovat, umístěn v protisměru od genu schopného exprimovat reportérovou molekulu. Reportérová molekula je molekula, jejíž stupeň exprese může být snadno detekován a může být buď transkript reportérového genu nebo protein s vlastnostmi, které umožní jeho detekci. Například molekula může být fluorescenční protein, jako je zelený fluorescenční protein (GFP).

Testy sloučenin se mohou provádět zavedením reportérového plazmidu popsaného výše do příslušné hostitelské buňky a pak měřením množství reportérové molekuly exprimované v přítomnosti nebo nepřítomnosti testované sloučeniny.

Vynález se také týká sloučenin identifikovaných výše uvedenými metodami.

Další provedení předkládaného vynálezu se týkají způsobů identifikace relevantního genu nebo genů, které zahrnují subklonování YAC DNA, jak je definována výše, do vektorů, jako je BAC (bakteriální umělý chromozom) nebo PAC (P1 nebo fágový umělý chromozom) nebo kosmidových vektorů, jako jsou kosmidové vektory s "exonovou pastí". Výchozím bodem těchto metod je konstrukce kontigové mapy oblasti lidského chromozomu 18q mezi polymorfními markery D18S60 a D18S61. S tímto cílem původci vynálezu sekvencovali koncové oblasti fragmentu lidské DNA v každém ze sedmi výše uvedených YAC klonu a tyto sekvence jsou zde odhaleny. Po subklonování YAC DNA do dalších vektorů, jak je popsáno výše, mohou být použity sondy obsahující tyto koncové sekvence nebo jejich části, obzvláště ty sekvence, které jsou ukázané na obrázcích 1 až 11 v tomto textu, spolu s jakýmkoliv známým místem se sekvenční značkou (STS) v této oblasti, jak je popsáno v kontigu YAC klonu zde ukázaném, pro detekci překryvů mezi uvedenými subklony a může být zkonstruována kontigová mapa. Pro vytvoření kontigové mapy subklonů mohou být také použity známé sekvence v nejnovějším YAC kontigu.

Jeden způsob, kterým gen nebo geny sdružené s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou mohou být identifikovány, je prostřednictvím použití známé techniky „vychytávání exonů“ („exon trapping“).

To je test umělého sestřihu RNA, nejčastěji používaný v současných protokolech pro specializovaný kosmidový vektor s „exonovou pastí“. Vektor obsahuje umělý minigen skládající se ze segmentu genomu SV40, obsahujícího počátek replikace a sekvenci silného promotoru, dva pro sestřih kompetentní

exony oddělené intronem, který obsahuje mnohočetné klonovací místo a polyadenylační místo SV40.

YAC DNA se subklonuje do vektoru s výše popsanou exonovou pastí a rekombinantní DNA je transfekována do kmene savčích buněk. Transkripce z promotoru SV40 má za následek transkript RNA, který je normálně sestřižen tak, aby obsahoval dva exony z minigenu. Jestliže klonovaná DNA sama obsahuje funkční exon, může být připojen k exonům přítomným v minigenu vektoru. Při použití reverzní transkriptázy může být vytvořena kopie cDNA a při použití specifických primerů pro PCR se mohou identifikovat sestřihy týkající se exonů inzertu DNA. Tato procedura umožní identifikovat kódující oblasti v YAC DNA, které mohou být srovnány s ekvivalentními oblastmi DNA od osoby postižené poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, pro identifikaci relevantního genu.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu je tudíž způsob identifikace alespoň jednoho lidského genu, včetně jeho mutované varianty a jeho polymorfismů, který je asociován s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, který spočívá vtom, že s provedou kroky, kdy:

- a) savčí buňky se transfekují kosmidovými vektory s "exonovou pastí" připraveným a mapovanými jak bylo popsáno výše,
- b) savčí buňky se kultivují ve vhodném médiu,
- c) RNA transkripty exprimované z promotoru SV40 se izolují,
- d) z RNA transkriptů se připraví cDNA,
- e) identifikují se sestřihové události zahrnující exony subklonované do kosmidových vektorů s "exonovou pastí", aby se určila poloha kódujících úseků v subklonované DNA,
- f) detekují se rozdíly mezi kódujícími úseky a ekvivalentními úseky v DNA jedince postiženého poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, a

- g) identifikuje se gen nebo jeho mutovaná nebo polymorfni varianta, který je asociován s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou.

Jako alternativa k "exonové pasti" je možné subklonovat YAc DNA do BAC, PAC, kosmidu nebo jiných vektorů a kontigová mapa se pak konstruuje, jak bylo popsáno výše. Je známa celá řada dostupných metod, jejichž pomocí je možné stanovit pozici relevantních genů v subklonované DNA, a sice následující:

- a) Selektce nebo záchyt cDNA (také nazýváno přímá selektce nebo cDNA selektce): tato metoda zahrnuje vytvoření heteroduplexu genomová DNA/cDNA hybridizací klonované DNA (např. inzertu v YAC DNA) s komplexní směsí cDNA, jako jsou např. inzerty všech cDNA klonů z určité (např. z mozku) knihovny cDNA. Příbuzné sekvence hybridizují a v následném kroku jsou "koncentrovány" pomocí biotin-streptavidin záchytu a polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo využitím podobných postupů.
- b) Hybridizace s mRNA/cDNA: genomový klon (tj. inzert specifického kosmidu) hybridizuje northernovým přenosem s mRNA z panelu kultivovaných buněčných linií nebo specifické (např. z mozku) knihovny cDNA. Pozitivní signál může indikovat přítomnost genu v klonovaném fragmentu.
- c) Identifikace ostrůvku CpG: ostrůvky CpG nebo HTF jsou krátké (kolem 1 kb) hypometylované sekvence bohaté na GC (více než 60 %), které se často nalézají na 5'-konci genů. Ostrůvky CpG obsahují často restriční místa pro některé vzácně štěpicí enzymy. Nahromadění vzácných restričních míst je často indikací pro výskyt ostrůvku CpG a tudíž možnou existenci genu. ostrůvky CpG je možné detekovat hybridizací DNA klonu pomocí Southernova přenosu s genomovou DNA naštěpenou vzácně štěpicími enzymy nebo

tzv. PCR objevující ostrůvky (jde o izolaci CpG ostrůvku PCR amplifikací sekvencí YAC mezi ostrůvky a sousedními Alu-repeticemi).

- d) Zoo-blotting: hybridizace DNA klonu (např. inzertu specifického kosmidu) za snížené stringence pomocí Southernova přenosu s genomovou DNA z různých druhů živočichů. detekce hybridizačního signálu může znamenat konzervativní sekvence a indikovat možný gen.

Tudíž dalším aspektem předkládaného vynálezu je způsob identifikace alespoň jednoho lidského genu včetně mutovaných a polymorfních variant, který je asociován s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, kterýžto způsob spočívá v tom, že se provedou kroky:

- a) subklonuje se YAC DNA popsaná výše do kosmidu, BAC, PAC nebo jiného vektoru,
- b) použije se nukleotidová sekvence uvedená na kterémkoliv z obr. 1 až 11 nebo jakékoliv jiné místo se sekvenční značkou (STS) v oblasti YAC kontigu popsaného zde, nebo její části obsahující sekvenci ne méně než 14 souvislých bazí nebo k ní komplementární sekvenci, pro detekci přesahů mezi subklony a konstrukci jejich mapy,
- c) identifikuje se pozice genů v subklonované DNA prostřednictvím identifikace jednoho nebo několika CpG ostrůvku, zoo-přenosem, hybridizací subklonované DNA s cDNA knihovnou nebo northernovým přenosem mRNA z panelu kultivovaných buněčných linií,
- d) detekují se rozdíly mezi uvedenými geny a ekvivalentními úseky DNA jedinců postižených poruchou nálady nebo příbuznou poruchou,
- e) identifikuje se gen, který je asociován s poruchou nálady nebo příbuznými poruchami.

Jestliže se YAC DNA sekvencuje, počítačová analýza se pak použije k vyhodnocení přítomnosti relevantních genu. K tomu se využijí takové techniky jako je vyhledávání homologií a predikce exonů.

Jakmile je jednou kandidátský gen izolován způsobem podle vynálezu, provede se podrobnější srovnání genu z normálního jedince a jedince postiženého poruchou nálady jako je např. bipolární porucha. Např. existují dvě metody, pojmenované "testování mutací", kterými lze identifikovat mutace nebo polymorfismus. V první metodě se vzorek DNA testuje na přítomnost nebo nepřítomnost specifických mutací, ale přitom tato metoda vyžaduje znalost co mutace může být. V druhé metodě se v DNA hledá jakákoliv odchylka od kontrolní (normální) DNA. Tato druhá metoda je užitečnější pro identifikaci kandidátských genů, kde mutace není identifikována předem.

Kromě toho následující techniky lze užít k další analýze genů identifikovaných způsobem podle vynálezu, aby se identifikovaly rozdíly mezi normálním nebo zdravým jedincem a jedincem postiženým poruchou nálady nebo příbuznou poruchou:

- a) Southernův přenos: klon se hybridizuje s nylonovou membránou, na kterou byla přenesena genomová DNA ze zdravých a nemocných jedinců naštěpená různými restrikčními enzymy. Velké rozdíly mezi nemocným a zdravým jedincem mohou být vizualizovány pomocí radioaktivního značení,
- b) Mobilita heteroduplexů na polyakrylamidového gelu: tato technika je založena na skutečnosti, že mobilita heteroduplexů v nedenaturujícím polyakrylamidového gelu je menší než mobilita homoduplexů. tato technika je nejúčinnější pro fragmenty menší než 200 bp.

- c) Analýza jednořetězcového konformačního polymorfismu (SSCP nebo SSCA): jednořetězcová DNA se "skládá" a vytváří komplexní struktury, které jsou stabilizované slabými intramolekulárními interakcemi. Elektroforetické mobility těchto struktur v nedenaturujícím polyakrylamidového gelu závisejí na délce řetězce a jeho konformaci,
- d) Chemické štěpení v místech chybného párování (CCM): radioaktivně značená sonda hybridizuje s testovanou DNA a místa chybného párování ("mismatches") se detekují sérií chemických reakcí, které štěpí jeden řetězec DNA v místě, kde došlo k chybnému párování. Je to velmi citlivá metoda a lze ji užít pro vzorky délky kilobází.
- e) Enzymatické štěpení v místech chybného párování: tento test je podobný CCM, až na to, že štěpení se provádí některými enzymy z bakteriofágů.
- f) Elektroforéza na gelu s denaturačním gradientem: při tomto způsobu DNA migruje elektroforetickým gelem, ve kterém je gradient denaturujících podmínek (chemický nebo teplotní). Migrace probíhá dokud DNA duplexy nedosáhnou takové polohy v gelu, kde dvoušroubovice taje a separují se jednotlivé řetězce, a po té již denaturovaná DNA nemigruje dále. Rozdíl v jediné bazi mezi normální a mutovanou DNA je dostatečný k tomu, aby došlo k odlišné migraci a poloze na gelu.
- g) Přímé sekvencování DNA.

Je zřejmé, že vzhledem ke způsobům popsaným ve vynálezu, v kroku detekce rozdílů mezi kódujícími úseky z YAC a DNA, jedincem postiženým poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, tento jedinec je kdokoliv s takovou poruchou a ne pouze člen rodiny MAD31.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je izolovaný lidský gen a jeho varianty, který je asociován s poruchou

nálady a příbuznými poruchami, a který je získatelný kterýmkoliv způsobem popsaným ve vynálezu, a dále izolovaný lidský protein, který je kódován tímto genem, a také cDNA, která kóduje tento protein.

Experimenty uvedené ve vynálezu jsou vysvětleny pomocí následujících obrázků.

Přehled obrázků:

Obr. 1 ukazuje nukleotidovou sekvenci koncové sekvence levého ramene YAC 766_f_12.

Obr. 2 ukazuje nukleotidovou sekvenci koncové sekvence pravého ramene YAC 766_f_12.

Obr. 3 ukazuje nukleotidovou sekvenci koncové sekvence levého ramene YAC 717_d_3.

Obr. 4 ukazuje nukleotidovou sekvenci koncové sekvence pravého ramene YAC 717_d_3.

Obr. 5 ukazuje nukleotidovou sekvenci koncové sekvence pravého ramene YAC 731_c_7.

Obr. 6 ukazuje nukleotidovou sekvenci koncové sekvence levého ramene YAC 752_g_8.

Obr. 7 ukazuje nukleotidovou sekvenci koncové sekvence levého ramene YAC 942_c_3.

Obr. 8 ukazuje nukleotidovou sekvenci koncové sekvence pravého ramene YAC 942_c_3.

Obr. 9 ukazuje nukleotidovou sekvenci koncové sekvence levého ramene YAC 961_h_9.

Obr. 10 ukazuje nukleotidovou sekvenci koncové sekvence pravého ramene YAC 961_h_9.

Obr. 11 ukazuje nukleotidovou sekvenci koncové sekvence levého ramene YAC 907_e_1.

Obr. 12 ukazuje rodokmen rodiny MAD31.

Obr. 13 ukazuje haplotypovou analýzu rodiny MAD31. Postižení jedinci jsou znázorněni plným kosočtvercem, prázdné kosočtverce znázorňují jedince, kteří byli při posledním psychiatrickém vyšetření asymptomatictí. Tmavě šedé sloupce představují markery, o kterých se nedalo usoudit, zda jsou rekombinantní.

Obr. 14 ukazuje YAC kontigovou mapu oblasti lidského chromozomu 18 mezi polymorfními markery D18560 a D18561. černé čáry představují pozitivní místa. YAC nejsou nakresleny v měřítku.

Obr. 15 ukazuje a) CAG repetice (vyznačeny tučně) a sousední nukleotidové sekvence izolované z YAC 961_h_9. Sekvence vyznačená kurzívou byla získána "koncovým vyproštěním" z fragmentovaného YAC. b) Primery pro PCR, které lze užít ke stanovení rozsahu trinukleotidových repetit v sekvenci.

Obr. 16 ukazuje a) CAG repetice (vyznačeny tučně) a sousední nukleotidové sekvence izolované z YAC 766_f_12.

Sekvence vyznačená kurzívou byla získána "koncovým vyproštěním" z fragmentovaného YAC. b) Primery pro PCR, které lze užít ke stanovení rozsahu trinukleotidových repetit v sekvenci.

Obr. 17 ukazuje a) CAG repetice (vyznačeny tučně) a sousední nukleotidové sekvence izolované z YAC 766_f_12. Sekvence vyznačená kurzívou byla získána "koncovým vyproštěním" z fragmentovaného YAC. b) Primery pro PCR, které lze užít ke stanovení rozsahu trinukleotidových repetit v sekvenci.

Obr. 18 ukazuje a) CTG repetice (vyznačeny tučně) a sousední nukleotidové sekvence izolované z YAC 907_e_1. Sekvence vyznačená kurzívou byla získána "koncovým vyproštěním" z fragmentovaného YAC. b) Primery pro PCR, které lze užít ke stanovení rozsahu trinukleotidových repetit v sekvenci.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

a) Údaje o rodině

Klinické diagnózy v rodině MAD31, belgické rodině s probandem s BPII, byly podrobně popsány v práci De bruyna et al., 1996. V této studii pouze 15 členů rodiny, kteří byli informativní pro analýzu vazby, bylo vybráno pro další genotypizaci. V rodině byly následující klinické diagnózy:

1 BPI, 2 BPII, 2 UP, 4 hlavní depresivní porucha (MDD), 1 SAm a 1 SAd.

Rodokmen rodiny MAD31 je uveden na obrázku 12.

b) Genotypizace člena rodiny

Všechny genetické markery představované krátkými tandemovými repeticemi (STR) jsou polymorfismy v dinukleotidových nebo tetranukleotidových repeticích. Informace týkající se genových markerů použité v této studii byly získány z různých zdrojů na Internetu:

Genome Database (GDB, <http://gdbwww.gdb.org/>),

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),

Cooperative Human Linkage Center (CHLC, <http://www.chlc.org/>),

Eccles Institute of Human Genetics (EIHG, <http://genetics.utah.edu/>)

a Généthon (<http://www.genethon.fr/>).

Standardní polymerázová řetězová reakce (PCR) se prováděla v objemu 25 µl a obsahovala 100 ng genomové DNA, 200mM každého z dNTP, 1,25 mM MgCl₂, 30 pmol každého primeru a 0,2 jednotky DNA polymerázy Goldstar (Eurogentec). Jeden primer byl koncově značen před PCR pomocí [gamma-³²P]ATP a T4 polynukleotidylkinázy. Po počátečním denaturačním kroku 2 minuty při 94 °C bylo provedeno 27 cyklů složených z denaturace 1 minutu při 94 °C, nasednutí primerů 1,5 minuty při vhodné teplotě, a syntéza (extenze) 2 minuty při 72 °C. Nakonec byl proveden závěrečný elongační krok 5 minut při 72 °C. Produkty PCR byly detekovány elektroforézou na 6% denaturujícím polyakrylamidovém gelu a exponovány na citlivý rentgenový film. Úspěšně analyzované STS, STR a EST

pokrývající zpřesněnou kandidátskou oblast jsou podrobně popsány v následujícím textu.

c) Analýza lod-skóre

Dvoubodové lod-skóre se počítalo pro 3 různé modely nemoci pomocí programového vybavení Fastlink 2.2. (Cottingham et al., 1993). Pro všechny modely byly užity hodnoty frekvence genu nemoci 1 % a fenotypový poměr 1/1000. Model 1 zahrnoval všechny pacienty i nepostižené jedince, přičemž nepostižení byly přiřazeny do tříd výskytu nemoci v závislosti na věku vyšetření. 9 tříd výskytu nemoci závislých na věku, jak je popsali De bruyn et al. (1996), bylo násobeno faktorem 0,7, který odpovídal snížení maximálního výskytu 99 % na 70% pro jedince starší než 60 let (Cot 1991). Model 2 byl podobný modelu 1, ale pacientům bylo přiřazeno skóre diagnostické stability, vypočtené na základě klinických údajů jako je např. Počet epizod, počet symptomu během nejhorší epizody a průběh předchozího léčení (Rice et al., 1987, De bruyn et al. 1996). Model 3 byl stejný jako model 1, ale zahrnoval pouze pacienty.

D) Konstrukce kontigů YAC - protokoly

Pěstování YAC a extrakce DNA z YAC se prováděly podle standardních protokolů (Silverman, 1995). Pro konstrukci YAC-kontigu zahrnujícího celou kandidátskou oblast chromosomu 18q byla porovnávána data fyzikální mapy založené na místech se sekvenční značkou (STS, „sequence tagged sites“) (Hudson et al., 1995) z internetové stránky Whitehead Institute (WI) (<http://www-genome.wi.mit.edu/>). CEPH mega-YAC byl získán z YAC Screen Centre Leiden (YCSL, Holandsko) a z CEPH (Paříž,

Francie). YAC byly analyzovány na přítomnost STS a STR, předtím lokalizovaných mezi D18S51 a D18S61, a sice amplifikací pomocí modifikované, tzv. „touchdown“ PCR. Informace o STS/STR byly získány z internetových stránek WI, GDB, Généthon, CHLC a GenBank. Bylo provedeno 30 cyklů PCR následující struktury: denaturace 1 minutu při 94 °C, nasednutí (2 cykly při každé teplotě) počínaje teplotou 65 °C a poklesem až na 51 °C po 1,5 minutu a nakonec extenze 2 minuty při 72 °C. Pak následovalo 10 cyklů obsahujících denaturaci 1 minutu při 94 °C, nasednutí 1,5 minuty při 50 °C a extenzi 2 minuty při 72 °C. A nakonec proběhla závěrečná extenze 10 minut při 72 °C. Amplifikované produkty byly vizualizovány elektroforézou na 1% TBE agarózovém gelu a barvením ethidiumbromidem.

E) Uspořádání STR markerů

12 STR markerů, dříve lokalizovaných mezi D18S51 a D18S61 bylo testováno na kosegregaci s bipolární poruchou v rodině MAD31. Rodičovské haplotypy byly konstruovány z genotypových informací od sourozenců v rodině MAD31 a minimalizací všech možných rekombinací. Výsledky této analýzy jsou uvedeny na obr. 13. Otec nebyl informativní pro 3 z uvedených markerů, matka nebyla informativní pro 5 markerů. Haplotypy v rodině MAD31 vedly k následujícímu uspořádání STR markerů:

cen-[S51-S68-S346]-[S55-S969-S1113-S483-S465]-[S876-S477]-S979-[S466-S817-S61]-tel.

Vzájemné pořadí markerů uvnitř závorek nebylo možné odvodit z našich haplotypových dat. Pořadí markerů v rodině MAD31 bylo porovnáno s pořadím markerů získaným odlišnými

mapovacími technikami a výsledky jsou ukázány v následující tabulce 1.

Tabulka 1

Srovnání pořadí markerů v kandidátské oblasti q18 pro bipolární poruchu podle různých map

Tabulka 1

Marker*	Genetické mapy		Radiační hybridní mapa (Giacalone et al., 1996)
	Généthon	Marshfield	
D18S51		(-)3.4cM	(-)27.9 cR
D18S68	0 cM	0 cM	0 cR
D18S346		5.3 cM	52.2 cR
D18S55	0.1 cM	0 cM	72.5 cR
D18S969		0.6 cM	
D18S1113	0.7 cM		
D18S483	2.5 cM	3.2 cM	88 cR
D18S465	4.5 cM	5.3 cM	101.3 cR
D18S876			
D18S477	4.4 cM	5.3 cM	166.4 cR
D18S979		8.9 cM	
D18S466	7.6 cM	11.1 cM	212.4 cR
D18S61	8.4 cM	11.8 cM	249.5 cR
D18S817		5.3 cM	260.6 cR

* Pořadí podle výsledků studia haplotypů v rodině MAD31

(-) marker je lokalizován proximálně od D18S68

D18S68, společný pro všechny 3 mapy, byl vybrán jako výchozí bod mapy, a byla uvedena genetická vzdálenost ostatních markeru v cM nebo cR právě vzhledem k D18S68. Pořadí markeru je v dobré shodě s pořadím markeru na nedávno publikované radiační hybridní mapě chromosomu 18 (Giacalone et al., 1996, Genomics 37: 9-18) a na YAC-kontigové mapě WI (<http://www-genome.wi.mit.edu/>).

Avšak bylo pozorováno několik odlišností. Jedinou odchylkou od mapy Génethonu je obrácené pořadí markerů D18S465 a D18S477. Dvě neshody byly pozorovány na mapě Marshfielda (<http://www.marshmed.org/genetics/>). Původci vynálezu umístili na mapě na základě maternálního haplotypu D18S346 nad D18S55, zatímco na Marshfieldově mapě je tento marker umístěn mezi D18S465 a D18S477. Avšak poloha D18S346 a D18S817 je v souladu s radiační hybridní mapou chromosomu 18 (Giacalone et al., 1996). Jedna odlišnost byla pozorována také na radiační hybridní mapě WI (<http://www-genome.wi.mit.edu/>), kde D18S68 je umístěn pod D18S465, avšak původci, stejně jako i jiné mapy, umístili tento marker nad D18S55.

F) Analýza lod-skóre a upřesnění kandidátské oblasti

Analýza lod-skóre poskytla pozitivní výsledky se všemi markery, což potvrdilo předchozí pozorování, že 18q21.33-q23 je asociován s BP poruchou, přinejmenším v rodině MAD31 (De bruyn et al., 1996). Výsledná statistika analýzy lod-skóre u všech modelů je uvedena v následující tabulce 2.

Tabulka 2

Souhrnná statistika dvoubodového lod-skóre v rodině MAD31

Marker	Model 1			Model 2			Model 3		
	Z at $\theta=0.0$	Zmax	$\theta_{\max}$	Z at $\theta=0.0$	Zmax	$\theta_{\max}$	Z at $\theta=0.0$	Zmax	$\theta_{\max}$
D18S51	-0.19	0.73	0.1	0.94	0.94	0.01	0.08	0.54	0.1
D18S68	-0.19	0.73	0.1	0.94	0.94	0.01	0.07	0.55	0.1
D18S346	-0.19	0.73	0.1	0.94	0.94	0.01	0.07	0.55	0.1
D18969	1.40	1.40	0.0	1.27	1.27	0.0	1.20	1.20	0.0
D18S1113	2.01	2.01	0.0	1.87	1.87	0.0	1.77	1.77	0.0
D18S876	2.01	2.01	0.0	1.87	1.87	0.0	1.77	1.77	0.0
D18S477	2.01	2.01	0.0	1.87	1.87	0.0	1.77	1.77	0.0
D18S979	-0.18	0.77	0.1	1.08	1.08	0.0	0.08	0.54	0.0
D18S817	-0.19	0.73	0.1	1.08	1.08	0.0	0.07	0.55	0.1
D18S61	-0.21	0.73	0.1	1.08	1.08	0.0	0.07	0.54	0.1

D18S55, D18S483, D18S465 a D18S466 nebyly informativní

18.08.00

Nejvyšší hodnota dvoubodového lod-skóre byla získána pro markery D18S1113, D18S876 a D18S477 podle modelu 1 bez rekombinací (viz tabulka 2). V modelu 1 všichni jedinci se spektrem BP byly považováni za postižené a přispěli tak plně k analýze vazby.

Před podrobným mapováním byla vybraná kandidátská oblast ohraničena D18S51 a D18S61, mezi kterými je genetická vzdálenost 15,2 cM na mapě podle Marshfielda nebo 13,1 cM na mapě dle Généthonu. Informativní rekombinanty s D18S51 a D18S61 byly pozorovány u dvou postižených jedinců (II.10 a II.11 na obr. 13). Avšak vzhledem k tomu, že nebyly testovány jiné markery uvnitř kandidátské oblasti, nebylo jasné, zda tito dva jedinci skutečně sdílejí oblast identickou v rodové linii (IBD). Další údaje genového mapování ukazují, že všichni postižení jedinci sdílejí alely D18S969, D18S1113, D18S876 a D18S477 (viz obr. 13, haplotyp v rámečku). také alela z markeru D18S483 a D18S465 jsou pravděpodobně IBD, ale tyto markery nebyly informativní u postiženého rodiče I.1. Obligátní rekombinanty byly pozorovány s STR markery D18S68, D18S979 a D18S817 (viz tabulka 2, obrázek 13). Jelikož byly pozorovány neshody mezi různými mapami pro lokalizaci D18S346 a D18S817, původci vynálezu užili D18S68 a D18S979 k tomu, aby nově definovali kandidátskou oblast pro BP poruchy. Genetická vzdálenost těchto dvou markeru je 8,9 cM podle Marshfieldovy genetické mapy (<http://www.marshmed.org/genetics/>).

g) Konstrukce YAC kontigu

Podle integrované mapy WI jsou 56 CEPH megaYAC umístěny v počáteční kandidátské oblasti ležící mezi D18S51 a D18S61 (Chumakov et al., 1995, Nature 377, Suppl., De bruyn et al.,

1996). Z těchto YAC byly vybrány takové, které byly lokalizovány mezi D18S60 a D18S61. D18S51 není přítomen na WI mapě, ale byl lokalizován do blízkosti D18S60 na základě Marshfieldovy genetické mapy (<http://www.marshmed.org./genetics/>). Aby se omezil počet potenciálních chimérických YAC, byly eliminovány YAC, které byly také pozitivní na mimochromozomální 18 STS. Takže bylo vybráno 25 YAC (viz obr. 14) a umístěno do kontigu technikou kontigového mapování YAC, tzn. sekvence z míst se sekvenční značkou (STS), jednoduchých tandemových repetit (STR) a exprimovaných sekvenčních značek (EST), které jsou známe tím, že leží mezi D18S60 a D18S61, byly amplifikovány pomocí PCR na DNA z YAC klonu. Použité sekvence STS, STR a EST jsou popsány na dalších stranách. Pozitivní YAC klony byly shromážděny do kontigové mapy (obr. 14).

V YAC kontigu zůstaly tři mezery, z nichž jedna, mezi D18S876 a GCT3G01, byla lokalizovaná v upřesněné kandidátské oblasti. Aby byla mezera mezi D18S876 a GCT3G01 doplněna, bylo analyzováno 14 dalších YAC klonů (viz tabulka 3). Byly získány koncové fragmenty z YAC klonů 766.f.12 (SV11R), 752.g.8 (SV31L) a 942.c.3 (SV10R) a sekvencovány (viz dále). Byly vybrány oligonukleotidové primery pro tyto tři sekvence a DNA každého z těchto 14 klonů byla amplifikována pomocí PCR. Jak je uvedeno v tabulce 3, byly získány překryvy mezi 7 YAC klony na straně centromery a 2 YAC klony na straně telomery (717.d.3 a 907.e.1).

Výsledný YAC kontig je uveden na obr. 14. Na tomto obrázku jsou ukázány jen takové YAC klony, které nepochybně „zasáhly“ STS, STR a EST chromosomu 18. V několika málo případech byly také získány slabé pozitivní signály pro některé YAC klony, což jsou pravděpodobně falešně pozitivní výsledky. Avšak tyto signály nijak neovlivnily přiřazení YAC

klonů v kontigu. I přesto, že byly testovány všechny YAC pokrývající vybranou oblast stejně tak jako všechny dostupné STS/STR, na počátku nebyla mezera v kontigové mapě zaplněna. Toho bylo dosaženo až stanovením koncových sekvencí 8 vybraných YAC (viz níže). Pořadí markerů na základě YAC kontigové mapy bylo v úplné shodě s pořadím podle WI mapy, která integruje informace z genetické mapy, radiační hybridní mapy a STS YAC kontigové mapy (Hudson et al., 1995). YAC kontigová mapa také potvrdila pořadí STR markerů jak bylo navrženo na základě haplotypové analýzy v rodině MAD31. Kromě toho YAC kontigová mapa poskytuje další informace o relativním uspořádání STR markerů. Tak např. D18S55 je přítomen v YAC 931_g_10, ale není v 931_f_1 (obr. 14), který odděluje D18S55 od jeho klastru [S55-S969-S1113-S465] získaného haplotypovou analýzou v rodině MAD31. Centromerová lokalizace D18S55 byla definována obsahem STS/STR okolních YAC (obr. 14). Pokud se zkombinují haplotypové údaje a YAC kontigová mapa, lze získat následující pořadí STR markeru: cen-[S51-S68-S346]-S55-[S969-S1113]-[S483-S465)-S876-S477-S979-S466-[S817-S61]-tel.

Z 25 YAC klonů pokrývajících celý kontig bylo vybráno 7 klonů, aby se identifikovala minimální překrývající oblast (tabulka 4). Těchto 7 YAC klonů pokrývá celou upřesněnou oblast chromosomu 18. Dále YAC klony by výhodně neměly být chimérické, tj. měly by obsahovat pouze fragmenty z lidského chromosomu 18. Aby bylo možné testovat na přítomnost chimér, oba konce YAC byly subklonovány a sekvencovány (viz dále). Pro každou sekvenci byly připraveny oligonukleotidové primery a DNA z monochromozomálního mapovacího panelu byla amplifikována pomocí PCR užitím těchto primerů. Jak je ukázáno ještě dále, některé z YAC klonů obsahovaly fragmenty jiných chromosomů, odlišných od lidského chromosomu 18.

YAC klony pak byly selektovány, aby obsahovaly co nejkratší překrývající se úseky (tabulka 5). Tyto 3 YAC klony byly stabilní, jak bylo zjištěno gelovou elektroforézou v pulzním elektrickém poli, a jejich velikosti odpovídaly publikovaným hodnotám. Tyto YAC klon byly přeneseny na jiný hostitelský kvasinkový kmen pro restriční mapování a byly předmětem dalšího subklonování.

Popis úspěšně analyzovaných STS, STR a EST pokrývajících upřesněnou kandidátskou oblast

Vysvětlení termínu:

STS: místa se sekvenční značkou

STR: jednoduchá tandemová repetice

EST: exprimovaná sekvenční značka

Tyto markery byly uspořádány od centroméry k teloméře. Jsou uvedeny pouze takové markery, které byly účinně testovány a které fungovaly na YAC.

SEZNAM

1. D18S60:

Identifikátor v databázi: AFM178XE3 (také známé označení 178xe3, Z16781, D18S60)

Zdroj: J Weissenbach, Genethon: geneticky mapovaná polymorfni STS

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = CCTGGCTCACCTGGCA

Pravý = TTGTAGCATCGTTGTAATGTTCC

Délka produktu = 157

Přehled úplné sekvence:

AGCTATCCTGGCTCACCTGGCAAAAATACAGTGTATACACACACACACAC
ACACACACACACACACAGAGTGTNTTANTNATTCCAGCAAATAATATTA
CATATAAAAGATCTAATTGGTTCATCATGTAAATTTAGTAGGAACATTACA
ACGATGCTACAAGANTTTATCCAAAACCTGAGATTTCTTAGAATATCTGTT
AAAAGTAATTTTATTTCAGTTAATAGAAATTCTATTGAAAACATCAAACCTTAT
AAAGCT

Identifikátor v Genbank: Z16781

Popis: *H. sapiens* (D18S60) DNA segment obsahující repetice (CA), klon

Hledání v GDB

2. WI-9222:

Identifikátor v databázi: UTR-03540 (také známé označení G06101, D18S1033, 9222, X63657)

Zdroj: WICGR: Primery odvozené ze sekvencí uvedených v Genbank

Chromozom: Chr18

Primery:

Levý = GATCCCATAAAGCTACGAGGG

Pravý = GAGTCTAAAGACAAGAAAGCATTGC

Délka produktu = 99

Přehled úplné sekvence:

TCTTCTTACCCCTTGGGAAGAAGACTGTTTCCAAATAATTTGAACAGCTTG
CTGCTAAATGGGACCCAATTTTTGGCCTATAGACACTTATGTATTGTTTT
GAATACGTCAGATTGGACCAAGTGCTCTTCAGGAATGTGGCTGCAAGCAA
GGGGCTAGAAGTTCACCTCCTGACAGTATTATTAATACTATGCAAATATG
GAATAGGAGACCATTTGATTTTCTAGGCTTTGTGGTAGAGAGGTGAAGG
TATGAGAATTAATAGCGTGTGAACAAAGTAAAGAACAGGATTCCAGAATG
ATCATTAATTTGTTTCTATTTATTCTTTTTTGGCCCCCTAGAGATTAAGTC
CAGAAATGTACTTTCTGGCACATAAAGAAATCTTGAGGACTTTGTTTAAAC
CTTCCATAAAAAACAATTTTCGGTTTCTCGGGTNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNT
TCTTTCTTTGTGTATTTTATTCAAGATGAGTTGGACCCATTGCCAGTGAGT
CTGAATGTCACTGACAGCCCTGTGTTGTGCTCAGGACTCACTCTGCTGC
TGGTGGAAGTCAATGGCTTCTCTCTCTCTTTGATCCCATAAAGCTACGAG
GGGGACGGGAGAGGGCAGTGCAATGGGAAGTAAAGAGATATTTTCCAG
TAGGAAAAGCAATGCTTTCTTGTCTTTAGACTCAAATGCTTAGGGAACGT
TTCATTTCTCATTCATGGGGAAAGGCAGCCTCCTTAAATGTTTTCTGAAG
AGCGGTAAATCTAGAAGCTTAAGAATTTACAGTTCCTTCAATAACCATGA
TGACCTGAAGTTCACCTATCCCATTTTAGCATCTACTTGTTTTTCCCATCT
CTTCCTTTCCAATTTTGCTTATACTGCTGTAATATTTTTGTNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNGACCAGCTAAAATTTTC GACTTGACTTTTTAACTT
AACTCATGAATTAATTAAGCAAATGAAAAAATTAAGAGTGTGACTTTTT
CTCGGAGCATATATGTAGCTTTTAGGAAAGGCTGATGATGGTATAAAGTT
TGCTCATTAAGAAAAAAGACAAGGCTGATTTTGAAGAGAGTTGCTTTTG
AAATAAATGATCA

Identifikátor v Genbank: X63657

Popis: H.sapiens fvt1 mRNA

Hledání v GDB

3. WI-7336:

Identifikátor v databázi: UTR-04664 (také známé označení PI5, G00-679-135, G06527, 7336, U04313)

Zdroj: WICGR: Primery odvozené ze sekvencí uvedených v Genbank

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = AGACATTCTCGCTTCCCTGA

Pravý = AATTTTGACCCCTTATGGGC

Délka produktu = 332

Přehled úplné sekvence:

TAAGTGGCATAGCCCATGTAAAGTCCTCCCTGACTTTTCTGTGGATGCCG
 ATTTCTGTAAACTCTGCATCCAGAGATTCATTTTCTAGATACAATAAATTG
 CTAATGTTGCTGGATCAGGAAGCCGCCAGTACTTGTCATATGTAGCCTTC
 ACACAGATAGACCNNNNNNNNNNCCAATTCTATCTTTTGTTTCCTTTTTT
 CCCATAAGACAATGACATACGCTTTTAATGAAAAGGAATCACGTTAGAGG
 AAAAATATTTATTTCATTATTTGTCAAATTGTCCGGGGTAGTTGGCAGAAAT
 ACAGTCTTCCACAAAGAAAATTCCTATAAGGAAGATTTGGAAGCTCTTCT
 TCCCAGCACTATGCTTTCCTTCTTTGGGATAGAGAATGTTCCAGACATTC
TCGCTTCCCTGAAAGACTGAAGAAAGTGTAGTGCATGGGACCCACGAAA
 CTGCCCTGGCTCCAGTGAACTTGGGCACATGCTCAGGCTACTATAGGT
 CCAGAAGTCCTTATGTAAAGCCCTGGCAGGCAGGTGTTTATTAAATTTCT
 GAATTTTGGGGATTTTCAAAAGATAATATTTTACATACACTGTATGTTATA
 GAACTTCATGGATCAGATCTGGGGCAGCAACCTATAAATCAACACCTTAA
 TATGCTGCAACAAAATGTAGAATATTCAGACAAAATGGATACATAAAGACT
 AAGTAGCCCATAGAGGGGTCAAATTTGCTGCCAAATGCGTATGCCACCA
 ACTTACAAAAACACTTCGTTTCGCAGAGCTTTTCAGATTGTGGAATGTTGG
 ATAAGGAATTATAGACCTCTAGTAGCTGAAATGCAAGACCCCAAGAGGAA
 GTTCAGATCTTAATATAAATTCACCTTC ATTTTGATAG CTGTCCCATCTG
 GTCATGTGGTTGGCACTAGACTGGTGGCAGGGGCTTCTAGCTGACTCG
 CACAGGGATTCTCACAATAGCCGATATCAGAATTTGTGTTGAAGGAACTT
 GTCTCTTCATCTAATATGATAGCGGGAAAAGGAGAGGAACTACTGCCTT
 TAGAAAATATAAGTAAAGTGATTAAAGTGCTCACGTTACCTTGACACATAG
 TTTTTCAGTCTATGGGTTTAGTTACTTTAGATGGCAAGCATGTAACCTATA
 TTAATAGTAATTTGTAAAGTTGGGTGGATAAGCTATCCCTGTTGCCGGTT
 CATGGATTACTTCTCTATAAAAAATATATTTACCAAAAAATTTTGTGACA
 TTCCTTCTCCCATCTCTTCCTTGACATGCATTGTAAATAGGTTCTTCTTGT
 TCTGAGATTCAATATTGAATTTCTCCTATGCTATTGACAATAAAATATTATT
 GAACTACC

Identifikátor v Genbank: G06527

Popis: WICGR: náhodná STS v genomu

4. WI-8145:

Identifikátor v databázi: EST102441 (také známé označení
 D18S1234, G00-677-827, G06845, 8145, T49159)

Zdroj: WICGR: STS pocházející ze sekvencí dbEST

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = GAAATGCACATAACATATATTTGCC

Pravý = TGCTCACTGCCTATTTAATGTAGC

Délka produktu = 184

Přehled úplné sekvence:

GTTGTTTGGAN GCAG GTTTATTTATTATATACTTGCAATTGAATATAAGAT
 ACAGACATATATATGTGTTATGTATTTCTAGAAATGCACATAACATATATTT
GCCTATTGTTTAATGTTTTTCCAGANATTTATTACAGAAGGGCATGGAG
 GGATACCTACTTATTCTTCATTATGAGAACAAATTAAGGCATTTATTAGAT
 AGGAAATTAACAGANCATCTGC TTCTATAACTTTATTAGCTACATTAAATA
GGCAGTGAGCANTAATTTAAANCTCACCATTATATAAANTANTAAATACC
 AAAGTAAAAG

_____: levý a pravý primer

Podmínky PCR

Identifikátor v Genbank: T49159

Popis: yb09e07.s1 Homo sapiens cDNA klon 70692 3' podobný gb: J02685

Popis UniGene Cluster: lidská mRNA pro Arg-Serpin (inhibitor aktivátoru plazminogenu - 2, PAI-2)

Hledání v GDB

5. WI-7061 :

Identifikátor v databázi: UTR-02902 (také známé označení PAI2, G00-678-979, G06377, 7061, M18082)

Zdroj: WICGR: Primery odvozené ze sekvencí uvedených v Genbank

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = TGCTCTTCTGAACAACTTCTGC

Pravý = ATAGAAGGGCATGGAGGGAT

Délka produktu = 338

Přehled úplné sekvence:

AACTAAGCGTGCTGCTTCTGCAAAAGATTTTTGTAGATGAGCTGTGTGCC
 TCAGAATTGCTATTTCAAATTGCCAAAAATTTAGAGATGTTTTCTACATAT
TTCTGCTCTTCTGAACAACTTCTGCTACCCACTAAATAAAAACACAGAAAT
 AATTAGACAATTGTCTATTATAACATGACAACCCTATTAATCATTTGGTCT
 TCTAAAATG GGATCATGCCCATTTAGATTTTCCTTACTATCAGTTTATTTT
 TATAACATTAACTTTTACTTTGTTATTTATTATTTTATATAATGGTGAGTTT
 AAATTATTGCTCACTGCCTATTTAATGTAGCTAATAAAGTTATAGAAGCAG
 ATGATCTGTTAATTTCTATCTAATAAATGCCTTTAATTGTTCTCATAATGA
 AGAATAAGTAGGTATCCCTCCATGCCCTTCTATAATAAATATCTGGAAAAA
 ACATTAAACAATAGGCAAATATATGTTATGTGCATTTCTAGAAATACATAA
 CACATATATATGTCTGTATCTTATATTCAATTGCAAGTATATAATAAATAAA
 CCTGCTTCCAAACAACNNNNNNNNNNNNNNNGGAATTC

Podmínky PCR

Identifikátor v Genbank: G06377

Popis: WICGR: Náhodná STS v genomu

6. D18S68:

Identifikátor v databázi: AFM248YB9 (také známé označení 248yb9, Z17122, D18S68)

Zdroj: J WeissenCach, Genethon: geneticky mapovaná polymorfni STS

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = ATGGGAGACGTAATACACCC

Pravý = ATGCTGCTGGTCTGAGG

Délka produktu = 285

Přehled úplné sekvence:

AAAGAGTTGGGGTTGTGAATTCCCACACCCAGTCAACTATTGGCTATGGG
CTTACCATGGGAGACGTAATACACCCGGNACTTCCAACCTCACATACCAG
AGACATGGCTCTAGCACCCAATGGAAATATGCTGAATGTTGCAGGTGCA
AGACAGCAACAAAGCAGACAGAGGCACATAGACAAGGCACCAACAGTGT
CCACTATACCCTGACAGTGTGGAAAGTTGTAGATAGGATGAAGAGAAAG
AATACA
CGGTAGANACTTACTACNCAAAGTGTGANCCTCAGACCAGCAGCATCTG
GCNAAATGGTGATCTATCACCTTCCAG

Identifikátor v Genbank: Z17122

Popis: *H. sapiens* (D18S68) DNA segment obsahující repetice (CA), klon

7. WI-3170:

Identifikátor v databázi: MR3726 (také známé označení D18S1037, G04207, HALd22f2, 3170)

Zdroj: WICGR: Náhodná STS v genomu

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = TGTGCTACTGATTAAGGTAAAGGC

Pravý = TGCTTCTTCAATTTGTAGAGTTGG

Délka produktu = 156

Přehled úplné sekvence:

CTGAGACAAGGCAGGCAAACAACCTCTAAAAATCTACAATTGGTGATTGG
TGTGCTACTGATTAAGGTAAAGGCACAGAATTATACATCCAGGTTNCTAT
TACTTATGGCAGACTCAGGACCCAGGTTNAGAGACCACTGGCCTTAAGA
A,AAAAAATGGGGTTCCTGATTTCTGGATAATAATCCAACTCTACAAATTGA
AGAAGCAACATACCCTCTTTGTTA

Identifikátor v Genbank: G04207

Popis: WICGR: Náhodná STS v genomu

8. WI-5654:

Identifikátor v databázi: MR10908 (také známé označení D18S1259, G00-678-695, G05278, 5654)

Zdroj: WICGR: Náhodná STS v genomu

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = CTTAATGAAAACAATGCCAGAGC

Pravý = TGCAAATGTGGAATAATCTGG

Délka produktu = 149

Přehled úplné sekvence:

CTACAAAATGCATGTGGCTTIGGCTTTGAAATAGTACACCCTATCAAAGA
CTAAATTTTCTTAATGAAAACAATGCCAGAGCTTTTTTCATGATATTTTGT
TTTAGAGATGGGGAACAATCTGGACGTTGTTTCCTTATCTGGGTGGTAAT
CGAGGCTTAGCAATTTCCACAGCGTTACACAAATCCAGATTATTCCACA
TTTTGCAAATA

Identifikátor v Genbank: G05278

Popis: WICGR: Náhodná STS v genomu

9. D18S55:

Identifikátor v databázi: AFM122XC1 (také známé označení 122xc1, Z16621, D18S55, GC378-D18S55)

Zdroj: J Weissenbach, Genethon: geneticky mapovaná polymorfni STS

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = GGGAAGTCAAATGCAAATC

Pravý = AGCTTCTGAGTAATCTTATGCTGTG

Délka produktu = 143

Přehled úplné sekvence:

AGCTGAACATGCCTTTTCATGGAGCAGTTTCNAAATACACTTTTGGTACA
ATCTGCAGGTGGATATTTGGAGCTCAGGAGTTfGAGACCAGCCTGGGCA
ACATGGTGAATCCCGTCTCTACTAAAATACAAAAAATTAGCCAGGTGTG
GCGGCATGTGCCTGTAGNCCCAGGATGGATTGAGTGGGTGAGATATGG
AATAAGTGGTGGGAAGTCAAATGCAAATCAATTGAGTTTGTCAATATTG
ATTCTCTATTCTAGCCTGGCGTGGTTTTTCCTCGTCACACACACACACAC
ACACACACACACACACACACACACACACACAGCATAAGATTACTCAGA
AGCT

Identifikátor v Genbank: Z16621

Popis: *H. sapiens* (D18S55) DNA segment obsahující repetice (CA), klon

10. D18S969:

Identifikátor v databázi: GATA-P18099 (také známé označení G08003, CHLC.GATA69F01, CHLC.GATA69F01, P18099)

Zdroj: CHLC: geneticky mapované polymorfní tetranukleotidové repetice

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = AACAAAGTGTGTATGGGGGTG

Pravý = CATATTCACCCAGTTTGTGTC

Délka produktu = 365

Přehled úplné sekvence:

CAGGGAAATGCAAATCAAAACCACAATGAGTTATCTCCTCATACCTTTAAT
GATGGCTAATATTAAACAAGAGATAACAAGTGTGTATGGGGGTGTGGAG
AAAAGAGAATGTNCGAACACTCTTGGTTGAAATATAAGTTGGTAGANCCA
TTATGCAAAACAGTATGAATCTTTATCAGTATAANATTAGGACCTNGCATA
TGATCNCAGCAATCNCCACNTCTGNGNGATCNCACNCNCTATCTCTCTAT
ATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT
ATCTGTCTGTCTATCATCTATCTATCTTCTATCTATCTATCTATCTTCTAT
CTATCTATCTGTCTATCTATNCCGGAATATTTTTCAGCCATNNAATAAGG
AAGTCCTGCTATTTGCAACAACTGGGTGAATATGGAGAACGTTATGCTA
AATGCAATATGCTAAAGACAGACACAGAAAGACAAGTATGACCTCACTTA
TATGTGGAACTGAAAAAGCCATACTCATTACAGCAAAGAGTAGAATGTT
GGTTACCAGGGGGCAAAGAGGGGTAGAAATGAGGGGAGTGAGAAAATGTC
AATCAAAGTGTAAGAATGTTATAACATAAATAAATTCATAGAG

Identifikátor v Genbank: G08003

Popis: lidský STS CHLC.GATA69F01.P18099 klon GATA69F01.

11. D18S1113:

Identifikátor v databázi: AFM200VG9 (také známé označení D18S1113, 200vg9, w2403)

Zdroj: J Weissenbach, Genethon: geneticky mapovaná polymorfní STS

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = GTTGAAGTCAAGTCCAAACCTG

Pravý = CAAAGACATTGTAGACGTTCTCTG

Délka produktu = 207

Přehled úplné sekvence:

AGCTGCATATAAACTATTCCATTTTACATTTTTGAAGACATTTGTAGCCA
TGATACTTTGCTGTTGTCTGTGGGCCACCTCTTTTTGAAGTGTGTAGTTA
ACTGTGCTCCTGTAATCTGTTGTCTGTTGAAGTCAAGTCCAAACCTGTTCT
GCGTGGCATGTTTCTNCAACTTGATGTGATGCTATTTATCACTTTCTTTGA
AGTTAAGTCTCTATGTCTTTGTATTCTTTCTGTGTACCCAGGGATATGTTT
GTGCATGCACACGCATAAACACACACACACACACACACACAGAGA
CAGAGACAGAGAACGTCTACAATGTCTTTGTGAG

12. D18S868:

Identifikátor v databázi: GATA-D18S868 (také známé označení G09150, CHLC.GATA3E12, CHLC.GATA3E12.496, CHLC.496, D18S868)

Zdroj: CHLC: geneticky mapované polymorfní tetranukleotidové repetice

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = AGCCAATACCTTGTAGTAAATATCC

Pravý = GATTCTCCAGACAAATAATCCC

Délka produktu = 189

Přehled úplné sekvence:

GAGTGAGCCAATACCTTGTAGTAAATATCCATCTATCTTTGATGTATCTAT
GTATCTATCTTTGTATCTATATGTCTATGTATCTATGTATGTATGTATCTAT
CTATCATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT
ATCTATCTATATCCNTTTTGGGATTATTTGTCTGGAGAATCCTGATTAAACAT
AGTCTGCTAACTTTTATCTGTATCTCCTATGTGTATGCTTCTCCTTCTTCC
TGTCTCTCTCTCTTTGTCCTCATTTAANCTCCTTTCCTGGGNATATTG
GNAATTTTGATTGGANTCTGGACANTGTAGGAGTAAAAATTT

Identifikátor v Genbank: G09150

Popis: lidský STS CHLC.GATA3E12.P6553 klon GATA3E12.

13. WI-9959:

Identifikátor v databázi: MR12816 (také známé označení D18S1251, G00-678-524, G05488, 9959)

Zdroj: WICGR: Náhodná STS v genomu

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = TGCCAACAGCAGTCAAGC

Pravý = AGCACCTGCAGCAGTAATAGC

Délka produktu = 110

Přehled úplné sekvence:

ctgttttatttgaaaaaaaaaatctgtctccaagaagaaaagttcattctACCTGTTGCCAACAGC
AGTCAAGCGGACATGTTTAAATTTTTTAAAAAAGTA CCAACT
GGNGTTTAATAGCCTCATTTGGCTTTTGCTATTACTGCTGCAGGTGCTT
TNATTTTTTTCCTCTGCATTATAATTAC

Identifikátor v Genbank: G05488

Description: WICGR: Náhodná STS v genomu

Hledání v GDB

14. D18S537:

Identifikátor v databázi: CHLC.GATA2E06.13 (také známé označení CHLC.13, GATA2E06, D18S537, GATA-D18S537)

Zdroj: CHLC: geneticky mapované polymorfní tetranukleotidové repetice

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = TCCATCTATCTTTGATGTATCTATG

Pravý = AGTTAGCAGACTATGTTAATCAGGA

Délka produktu = 191

Přehled úplné sekvence:

AAAGCTGAGTGAGCCAATACCTTGTAGTAAATATCCATCTATCTTTGATGT
ATCTATGTATCTATCTTTGTATCTATATGTCTATGTATCTATGTATGTATGT
ATCTATCTATCATCTATCTATCTATCATCTATCTATCTATCTATCTATCTAT
CTATCTATCTATCTATATCCNTTNGGTATTATTNGTCTGGNGAATCCTGAT
TAACATAGTCTGCTAACTTNTATCTGTATCTNCTATGTGTATGCTTCTNCT
TCTTCCTGTCTCTCTCTCTGCTTTGTCCTCAATTNAAATCTCC

Identifikátor v Genbank: G07990

Popis: lidský STS CHLC.GATA2E06.P6006 klon GATA2E06.

Hledání v GDB

15. D18S483:

Identifikátor v databázi: AFM324WC9 (také známé označení 324wc9, Z24399, D18S483)

Zdroj: J Weissenbach, Genethon: geneticky mapovaná polymorfní STS

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = TTCTGCACAATTTCAATAGATTCC

Pravý = GAACTGAGCAAACGAGTATGA

Délka produktu = 214

Přehled úplné sekvence:

AGCTCTGCTGGAAGAGCAGGGCTGTTTTCTGCACAATTTCAATAGATTCC
CCTACCCTGGGTTTTTCAGTAGATAGATAGATAGATGATAGATAGGTTAGA
TAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATGATAGATAGATTTT
ATATATAGTATATAAAATCTACACACACACACACACACACACACACATA
TTTGCCTTTCCTTGACTATCATACTCGTTTGCTCAGTTCTTTTTTTTTTTAA
ATTTTTGTTTGTAATCCAAAATGCTT

Identifikátor v Genbank: Z24399

Popis: *H. sapiens* (D18S483) DNA segment obsahující repetice (CA), klon

Hledání v GDB

16. D18S465:

Identifikátor v databázi: AFM250YH1 (také známé označení 260yh1, Z23850, D18S465)

Zdroj: J Weissenbach, Genethon: geneticky mapovaná polymorfni STS

Chromozom: Chr1B

Primery: Levý = ATATTCCCCTATGGAAGTACAG

Pravý = AAAGTTAATTTTCAGGCACTCT

Délka produktu = 232

Přehled úplné sekvence:

AGCTCTGTCCCTCTAGAGAACGCTGACTAATATATTCCCCTATGGAAGTA
CAGATGGTTTTNTAAaATAAATTTATCTGATTGTGATGAGATAATCATCA
TTTTATGTTTCAGTGTTTTCTAAATTTTTATTGTTATTGTTTTTATACTCT
AAATGGTTTTTAAATATGCACATATGTGCATATTTTACACACACACACA
CACACACACACTCTCTTTATTTAGAAGCATTATAGATAGAGTGCCTGAAAA
TTAACTTTTAACCNAAGAAAAGACAATAAGGAACAATAGGGAAGTTATCC
TTTGCTAAGGGTATGGAAAATATTCACATATTATTTATAACANGTTAAACC
AAGTCATGCTTGANTATAATAGCT

Identifikátor v Genbank: Z23850

Popis: *H. sapiens* (D18S465) DNA segment obsahující repetice (CA), klon

Hledání v GDB

17. D18S968:

Identifikátor v databázi: GATA-P34272 (také známé označení G10262, CHLC.GATA117C05, CHLC.GATA117C05.P34272)

Zdroj: CHLC: geneticky mapované polymorfni tetranukleotidové repetice

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = GAAATTAACCAGACACTCCTAACC

Pravý = CTTAGAATTGCCTTTGCTGC

Délka produktu = 147

Přehled úplné sekvence:

GAATAAAAATATGAGGTATTAGAAATTTACAGATAGGAAGAAATTAACCAG
ACACTCCTAACCACCGATNAGTTTAAAGAGGAGATAGATAGATAGATGAT
AGATAGATAGATAGATAGATAGATACCACTGAAAATGCAANCACAAATTA
GCAGATTATATGTGATGCAGCAAAGGCAATTCTAAGTAGATTCTAACTGC
TACATTGATAGCAGTACCCACTGACATTACCGGAAAGGATGGTATCCATA
ACCACCTACCTATATACCTCCGCAGCTGGANATTAGGNTTAAGCTTCTTN
GGGCNCCTGGCGGCCCCNNTTGTGGTCCCCGGTNGGNCCCCGNNTTN
GNNTNGCTNNGNTTNCNTTGGNGNCCCCCNNTNGGTTTNGGNNNNT
NNNNNTNGNNNNNTTNCNNNNNNNNNTNTNNNNNCNNNNNNNNNTNNN
NNNNNNNNNGGNNNNNGGGN

Identifikátor v Genbank: G10262

Popis: lidský STS CHLC.GATA117C05.P34272 klon GATA117C05.

18. GATA-P6051:

Identifikátor v databázi: GATA-P6051 (také známé označení CHLC.GATA3E08, CHLC.GATA3E08.P6051)

Zdroj: CHLC: geneticky mapované polymorfní tetranukleotidové repetice

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = GCAACAACCCTAATGAGTATACG

Pravý = GAGTCTCACCAGGGCTTACA

Délka produktu = 149

Přehled úplné sekvence:

AAAGCTGTCTCCTTTTGTAAAGTGTGCTCAGAGGAATCTTTTTCAGTAAAT
AAAGTCTGCACCCAGACATCTCACTTTGTATACCGGAGAATTTACCAT
GACTCTTCTCAGTGATAAACGTCAATATAGAATAATCAGGAGAAAAAGAG
AAATCCAGTAAAGAAATAAGTCTGTAGAAAGCAACAACCCTAATGAGTAT
ACGATATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATG
NATCTATCTATCTAACATTATATAAAATATATATTTTCCTCCTGTATTGGGG
CCCTGTGTGTAAGCCCTGGTGAGACTCAAAAAATTTGANTATTCCTNTTTN
T

Identifikátor v Genbank: G09104

Popis: lidský STS CHLC.GATA3E08.P6051 klon GATA3E08.

19. D18S875:

Identifikátor v databázi: GATA-D18S875 (také známé označení G08001, CHLC.GATA52H04, D18S875)

Zdroj: CHLC: geneticky mapované polymorfní tetranukleotidové repetice

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = TCCTCTCATCTCGGATATGG

Pravý = AAGGCTTTCAGACTTACACTGG

Délka produktu = 394

Přehled úplné sekvence:

TTATTTATTCACCTCATTCAATAAATATTTATGAATTTCTTTAATGGCNANG
AAAGTATGTTTGGTACTGAATATGGTGAGCAAGATTTTCCTCTCATCTCG
GATATGGAAAGATCTTGGAATCATTATACNTCATACTTACAATANGAAAG
AAGCTGAGCAATTTGAAATCAACAATTTCTTTTGTACNTGTCAGAAAAGT
GAAGATATATTAATCAGGGTTCTTCAGAGAAACATAACCAATAGGNCACA
GNTCTATATGNCCNCNTTTATCTATCTATCTATCTATCTATCNCCTATCTAT
CNCANACCNGGNGAANTNATNTTTGNGAGATTNATGCAAGNCTGAGAAA
NACCNAAGAANCTGCTCCCTGTNAAACTNGAGATNCAAGAANCTGAANA
GTATAGNTCCAGTCCNAAGTCTANAGACCTTAGAATTAGGAAAAGTGA

CTATAAATACCAGTGTAAGTCTGAAAGCCTTAAANACCANATAGTGCCAT
TGAAAGGGCAGAAGACTGATGTCCCAGTTCAAGCAGGCAAAGTTAGAGA
AGCCTTATTTTCTGCAACATTGTTCTATTTCAGACCCTTNANANGATTGACN
ATGTCCACCCA

Identifikátor v Genbank: G08001

Popis: lidský STS CHLC.GATA52H04.P16177 klon GATA52H04.

Hledání v GDB

20. WI-2620:

Identifikátor v databázi: MR1436 (také známé označení G03602,
D18S890, HHAal2h3, 2620)

Zdroj: WICGR: náhodná STS v genomu

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = TCTCCAAGCTATTGATTGGATAA

Pravý = TTAAGAGCCAATTTATATAAAAGCAGC

Délka produktu = 177

Přehled úplné sekvence:

CCCCTTTTGCCAACGCCATGCTTCACGTAGGGAGCCTGACATGCAGAAA
ACTCTCCAAGCTATTGATTGGATAAAGAGCCAGAGCTGACTGAATTCAT
TCTTCTTGAGCCTCTCATTCTGTGTTTCTCGAATTTTACCAAAGCATCTT
GACACACAAATATCTGACTCAAGGAAAAGGAAAAACAACCTGCTTTTTCTC
CAGCTGCTTTTATATAAATTGGCTCTTAAACTTTCTAAGTTTATTATGGAT
A

Identifikátor v Genbank: G03602

Popis: WICGR: Náhodná STS v genomu

Hledání v GDB

21. WI-4211:

Identifikátor v databázi: MR6638 (také známé označení G03617,
D18S980, 4211)

Zdroj: WICGR: Náhodná STS v genomu

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = ATGCTTCAGGATGACGTAATACA

Pravý = AAATTCTCGCTGATTGGAGG

Délka produktu = 113

Přehled úplné sekvence:

CTAGTACCATAATCCCTTTTGAATAAACCATCCCACCTTTAGTCAGANC
AGATGCTTCAGGATGACGTAATACATAATAAGCCTACTCAGTTCTACTCT
GGCTTTGTATGTCTTCAAAGTGATATTTTTTAAGTATTACTTGTCCCTCC
AATCAGCGAGAATTT

Identifikátor v Genbank: G03617

Popis: WICGR: Náhodná STS v genomu
Hledání v GDB

22. D18S876:

Identifikátor v databázi: GATA-D18S876 (také známé označení G09963, CHLC.GATA61E10, D18S876)
Zdroj: CHLC: geneticky mapované polymorfní tetranukleotidové repetice
Chromozom: Chr18
Primery: Levý = TCAAACCTTATAACTGCAGAGAACG
 Pravý = ATGGTAAACCCTCCCCATTA
 Délka produktu = 171
Přehled úplné sekvence:

AAGACTGCAATTACATTTGCATCAAACCTTATAACTGCAGAGAACGTTGCC
CACTATTTTATACACACAACAGTATTCTTAGCCAGATTACATCTATCTAT
CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTAGC
TAGCTATCTATCTATAGAACTAATGGGGAGGGTTTACCATGTTTGGGTGA
ACCCAAACATTTTATGGNCAAGGGNTTGGAAAATTACCCTTATCTACAAC
TNTTNAACCTTGTGTTTGGTAGGNGTGNTAATTCCNTGGGNTTGAANAAC
TTTGNAATTTCTCCTNTTGTGTTTNTNATTNNNNATTNNTNNNCATTATTNTGG
GGTNTTCNGGGTGGAGGGCTNANTTTGGCCNCCCGGGTCCNNGGNGC
NAGTNGGNNNGGNTNNTNGGGTTTNCCTTGGGAANCNTNCCNCCTNCNG
GGGNTTCANGGGNTTTTTNTTTNNTTG

Identifikátor v Genbank: G09963
Popis: lidský STS CHLC.GATA61E10.P17745 klon GATA61E10.
Hledání v GDB

23. GCT3G01:

Identifikátor v databázi: GCT-P10825 (také známé označení G09484, CHLC.GCT3G01, CHLC.GCT3G01.P10825)
Zdroj: CHLC: geneticky mapované polymorfní tetranukleotidové repetice
Chromozom: Chr18
Primery: Levý = CTTTGCAATCTTAGTTAATTGGC
 Pravý = GAACTATGATATGGAGTAACAGCG
 Délka produktu = 128
Přehled úplné sekvence:

AGATGTTTAACTTTGCAATCTTAGTTAATTGGCAGAAATGAAATTTAGTTT
CCACAACCTTTATTCGATATTAACACACCACCATCAGCAGCAGCAGC
AGCAGCAGCAGCATCGCTGTTACTCCATATCATAGTTCAGAGCATTATAA
GNGGTCAAAATATACTAGGCTGACACCNGNATAAGGTTTAATTTTAA
ACCNNGGTCTNCCCTCTAAGGNGGNTTTTTTTTTCTTGNCNTGGCTTCT
TTTTCCNTTTGCTTTTGTAATATCAAGGNATTTTGGGTTNTTCNTGGN

ANTTNNCNNANTNNTNNTTNNNNCNCNCCCCCNCNTTTGNGGCGGGGGGTC
CCCNNTTGGCCCGGGGTTGNGTGACGTAGGGGGGTCNCGGGTNNNG
NAAGTTTNGGGGCCCT

Identifikátor v Genbank: G09484

Popis: lidský STS CHLC.GCT3G01.P10825 klon GCT3G01.

24. WI-528:

Identifikátor v databázi: MH232 (také známé označení G03589, 528, D18S828)

Zdroj: WICGR: náhodná STS v genomu

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = TTCTGCCTTTCCTGACTGTC

Pravý = TGTTTCCCATGTCTTGATGA

Délka produktu = 211

Přehled úplné sekvence:

CTACTAAGCAAATTCTGCTCAGCCTTCTGCCTTTCCTGACTGTCTTGTTG
GCCCTTCCCACTTTAAGGATGCCTGTTTAAGTAGCCACCTCTAATTAGGA
ATCTTCCCTTGTTCTTCTCAGGAGGCTTAGACACTGTCAGTTTCCTGAA
GACAGAAAATAAGCCTGCATTATCCTAGTAGTGGATTCAAACTAATTGT
GTCCTGAGTCTTTCAATCATCAAGACATGGGAAACACTCAACAG

Identifikátor v Genbank: G03589

Popis: WICGR: Náhodná STS v genomu

Hledání v GDB

25. WI-1783:

Identifikátor v databázi: MR432 (také známé označení G03587, _shu_31.Seq, 1783, D18S824)

Zdroj: WICGR: Náhodná STS v genomu

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = CCAGTAATTAGACATTGACAGGTTC

Pravý = TTTTACTAGACAGGCTTGATAAACAA

Délka produktu = 305

Přehled úplné sekvence:

CCAGTAATTAGACATTGACAGGTTCATACTAGTAATGTAGGGAATAGGG
CTGCTGCTTTTTGGGTTTCCTTGAGTATACTTTGTGCTGCATAAATATGG
CAATGGATAGTAAATAATTTGTATGCAGACCTTTAGTGTGCGATTAACTGT
GAATAAGGGAACAACAATCAAGGACAAAAATCAAAAGACTAATTCTCTAT
ACATTTTGAGCTTTTGTAAGAAAGTAAGATTAGCTGAATATATCTGAAAAA
TTTCTAATCTCCTTTACAATTTTTTAAATTGTTTATCAAGCCTGTCTAGTAA
AAATAATTCAGTTTCGGAATGTGG

Genbank 1D: G03587

Identifikátor v Genbank: G08015

Hledání v GDB

30. D18S1092:

Identifikátor v databázi: AFM112WE9 (také známé označení D18S1092, w5374, all2we9)

Zdroj: J Weissenbach, Genethon: geneticky mapovaná polymorfni STS

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = CTCTCAAAGTAAGAGCGATGTTGTA

Pravý = CCGAAGTAGAAAATCTTGGCA

Délka produktu = 163

Přehled úplné sekvence:

agctctcaaagtaagagcgatgttga actgactgagttgtttgtgaantttgntttggagtcagtggagcat
gttattagatgtaaatttaaacacacacacacacacacacacacacacagagaagtaag tgccaag
atttctactcggcgccatatttctatatactgatttctgtattcccagactgaatatagattgtctttctgntttat
catagacaatctcataataanttaggcataataaggtaatgaggnttttctgggcttctttcatcatccctgca
atttgagtctcntttatagntgaantcttctctgtaataacntctgttttagct

Hledání v GDB

31. D18S61

Identifikátor v databázi: AFM193YF8 (také známé označení 193yf8, Z16834, D18S61)

Zdroj: J Weissenbach, Genethon: geneticky mapovaná polymorfni STS

Chromozom: Chr18

Primery: Levý = ATTTCTAAGAGGACTCCCAAAC

Pravý = ATATTTTGAAACTCAGGAGCAT

Délka produktu = 174

Přehled úplné sekvence:

CGTCTTACCAAACCAACATAATATAGCAATGGNAACCAAAAATTTCTAAGA
GGACTCCCAAACACATTCTTCTNCCTGAATTAAATACAGGCATTCAANA
NAAACANACGCACA
CCCTTCAAATCNTAGCATAAATTCNCTTATATAAACATAACCATGCTCCT
GAGTTTCAAATATTGGGTGGTTCGAAGTTCGAAGCAACAAATTTCCAGT
TAGTGTCTATTANTTGTGGACAGCT

Identifikátor v Genbank: Z16834

Popis: *H. sapiens* (D18S61) DNA segment obsahující repetice (CA), klon

Hledání v GDB

Markery (STR) použité k upřesnění kandidátské oblasti

Následně jsou uvedeny markery, které byly užity u rodiny MAD31 k upřesnění kandidátské oblasti. Většina těchto markerů již byla popsána výše a je proto uveden již jen jejich název. Podrobná informace a dalších markerech je uvedena dále.

Data již byla uvedena pro: D18S68, D18S55, D18S969, D18S1113, D18S483, D18S465, D18S876, D18S477, D18S979, D18S466 and D18S61.

Nová data

1. D18S51:

Jiné názvy: UT574, (D18S379)

Sekvence primerů:

UT574a GAGCCATGTTTCATGCCACTG

UT574b CAAACCCGACTACCAGCAAC

Sekvence DNA:

AATTGAGCNCAGGAGTTTAAGACCAGCCTGGGTAACACAGTGAGACCCC
TGTCTCTACAAAAAATACAAAAATNAGTTGGGCATGGTGGCACGTGCCT
GTAGTCTCAGCTACTTGCAGGGCTGAGGCAGGAGGAGTTCTTGAGCCCA
GAAGGTTAAGGCTGCAGTGAGCCATGTTTCATGCCACTGCACTTCACTCT
GAGTGACAAATTGAGACCTTGTCTCAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAA
GAAAGAAAGAAAGAANGAAAGAAAGAAAGTAAGAAAAAGAGAGGGAAAG
AAAGAGAAANAGNAAANAAATAGTAGCAACTGTTATTGTAAGACATCTCC
ACACACCAGAGAAGTTAATTTTAATTTTAACATGTTAAGAACAGAGAGAAG
CCAACATGTCCACCTTAGGCTGACGGTTTGTGTTATTTGTGTTGTTGCTGG
TAGTCGGGTTTGTGTTATTTTTAAAGTAGCTTATCCAATACTTCATTAACAAT
TTCAGTAAGTTATTTTCATCTTTCAACATAAATACGNACAAGGATTTCTTCT
GGTCAAGACCAAATAATATTAGTCCATAGTAGGAGCTAATACTATCACA
TTTACTAAGTATTCTATTTGCAATTTGACTGTAGCCCATAGCCTTTTGTCTG
GCTAAAGTGAGCTTAATGCTGATCGACTCTAGAG

Identifikátor v Genbank: L18333

2. D18S346:

Jiný název: UT575

Páry primerů:

Primer A: TGGAGGTTGCAATGAGCTG

Primer B: CATGCACACCTAATTGGCG

Sekvence DNA:

ACGAGGACAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAACCCCGTT
TNTACTAAAANTAC $\square$ AAANTTGGTCGGGAGGCTGGGGCAGGNGACATGC
TTGACCCCAGGAGGTGGAGGTTGCAATGAGCTGAGATTGCACCACTGCA
CTNCAGCNTGG.....AAGAAAGAGAAAGGANAGNNAGGNAGNNANNAAC
TACATNTGAAGTCAACACTAGTATTGGTGGGAGAGGAATTTTATGCTGCA
TTCCCCNACAACCACTAGATACGCCAATTAGGTGTGCATGGTCCATGCTA
T

Identifikátor v Genbank: L26588

3. D18S817:

Jiný název: UT6365

Páry primerů:

Primer A: GCAAAGCAGAAGTGAGCATG

Primer B: TAGGACTACAGGCGTGTGC

Sekvence DNA:

CATATGGGTCCACAAGCAACCTCAGTCCTTGTCTCTTCAGAAGAAAGAAT
TCTACTGAGGGNCATAAGGCAGAAGGAGAGACCTAGGCAAGTTGCAAAG
CAGAAGTGAGCATGTATTAAAAAAGCTTTAGAACAGTAAGGAAAGGAAGAA
AAGAAAAGAAGGAAAGTTCAACTTGGAAGAGGGCCAAGCCGGCAACTTG
GCAGAAGGATTGCTTGAGCCCAGGAGTTAAGACCAGTCTGGGCAATATA
GTGAGACTCCATCTCTGCATACATACATACATACATACATACATACA
TACATACATATTGCAGGGTATGATGGCACACGCCTGTAGTCCTAGCTACT
CTGGAGGTTGAGATGGGAGGGTCACTGAGCCTGGGAANTTGAGGCTGC
NNTGAGCCATGATC

Identifikátor v Genbank: L30552

Charakterizace YAC

8 YAC bylo vybráno, které pokrývají kandidátskou oblast a ohraničují mezeru. Tyto YAC byly dále charakterizovány stanovením koncových sekvencí pomocí inverzní PCR.

Vybrané YAC byly 961_h_9, 942_c_3, 766_f_12, 731_c_7, 907_e_1, 752_g_8, 717_d_3, 745_d_2.

Nové STS založené na koncových sekvencích (pokud není uvedeno jinak, STS byly testovány na monochromosomálním mapovacím panelu pro identifikaci chimérismu YAC, pokud STS nezasáhl chromosom 18-chimérický YAC, pak je to uvedeno níže v textu).

1. SV32L:

Pochází z koncové sekvence levého raménka YAC 745_d_2.

Primer A: GTTATTACAATGTCACCCTCATT

Primer B: ACATCTGTAAGAGCTTCACAAACA

Sekvence DNA:

ATTCCTTNGTTATTACAATGTCACCCTCATTTAAAAAGTGGAAGATAAAG
AGGAAGCAATCTATTTTTTTCCTTTTTTCTGATAGCACTTGTTTGTGAAG
CTCTTACAGATGTTCTTAAGTAAATCAACTCCTCCATTTTTTTGTAGCA
ACTACACATATTTATCAATAATAGTTCACAAATACATTTTCAAATT

Délka amplifikované sekvence: 107 párů bazí (bp)

Toto STS se nevyskytuje na monochromozomovém mapovacím panelu.

2. SV32R:

Pochází z koncové sekvence pravého raménka YAC 745_d_2.

Primer A: ACGTTTCTCAATTGTTTAGTC

Primer B: TGTCTTGGCATTATTTTAC

Sekvence DNA:

AGACAATGGGAGAAATTGCACTGCCCTGAGTCAGAAATCAGATCTGTTG
CCATACAGCTGCCGTTATGTGATCATTTGCAAGTCAACGTTTCTCAATTG
TTTAGTCATTTGTRAGACAAAAAGACTGGTTGGATTTAGAGAATTTGGA

ATCCTCCTTCAGGTTTAACAAGCAATAAATGATACTCTTCAGTGTA AAAAT
AATGCCAAGACATNATTTGACTTTAAATTAATCCAAACAAGATATC

Délka amplifikované sekvence: 127 bp
 Toto STS se nevyskytuje na monochromozomovém mapovacím panelu.

3. SV11L:

Pochází z koncové sekvence levého raménka YAC 766_f_12.
 Primer A: CTATGCTCTGATCTTTGTTACTTT
 Primer B: ATTAACGGGAAAGAATGGTAT

Sekvence DNA:
GTCTTTATTTTCATATAACTATGCTCTGATCTTTGTTACTTTCTCCTTTTAAC
TCAGTTTAAGCTTTATTCTTATTTTCCAGCTGCTGAAGGTATATAGTTAGG
TTGTTTATTGGATACCATTCTTTCCCGTTAATGTCAGTGGTTACTGCTATC
AATGTAGCAGTTA

Délka amplifikované sekvence: 118 bp
 Toto STS se vyskytuje na chromozomu 18 a musí být lokalizováno mezi CHLC.GATA-p6051 a D18S968.

4. SV11R:

Pochází z koncové sekvence pravého raménka YAC 766_f_12.
 Primer A: AAGGTATATTATTTGTGTCG
 Primer B: AAACCTTTCTTAACCTCATA

Sekvence DNA:
ATAAGGTATATTATTTGTGTCGTGAGTTAAGAAATCATTAACTATTTT
CAGAATGACAAATGTCATTATATGTTGTAAAAAAGATAAATACGTGAAAT
ATGAGGTTAAGAAAAGTTTA

Délka amplifikované sekvence: 119 bp.
 Toto STS se vyskytuje na chromozomu 18 a musí být lokalizováno mezi D18S876 a GCT3G01.

5. SV34L:

Pochází z koncové sekvence levého raménka YAC 717_d_3.
 Primer A: TCTACACATATGGGAAAGCAGGAA
 Primer B: GCTGGTGGTTTTGGAGGTAGG

Sekvence DNA:
ACATAAAATGTCGCTCAAAAACAATTATGTGTGTCTACACATATGGGAAA
GCAGGAAACAAATTTGTTTACAACATACATTCTTTTGTTTTTTAGGCAAG
ATAAAATNTCCTACCTCCAAAACCACCAGCACNGTCCGCAATAACTATAC

ATC

Délka amplifikované sekvence: 98 bp
Toto STS se vyskytuje na chromozomu 18.

6. SV34R:

Pochází z koncové sekvence pravého raménka YAC 717_d_3.
Primer A: ATAAGAGACCAGAATGTGATA
Primer B: TCTTTGGAGGAGGGTAGTC

Sekvence DNA:

AATATCATTCTTCACCCACGTTATACATAAGAGACCAGAATGTGATATTGT
CATCTCACATGGAAAAATCTGCTGTGATCAGTTCCTGAAGCTTGCTGTGA
TCCTCCCTTAGGAAAGTAGAAAAATCTTTTGAACACTTTATTCTACAAT
CAATGAAAATTAGGTGAAGCTACAGAAGCCAGAAATTACTCTAAGATTAG
ACAATTATTTAAGANGACCAATTGTCTTTGGTCTTCTTCTGAAGGGTCTG
ACTACCCTCCTCCAAAGAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCNTGA

Délka amplifikované sekvence: 244 bp
Toto STS se vyskytuje na chromozomu 1, tudíž YAC 717_d_3 je
chimérický.

7. SV25L:

Pochází z koncové sekvence levého raménka YAC 731_c_7.
Primer A: AAATCTCTTAAGCTCATGCTAGTG
Primer B: CCTGCCTACCAGCCTGTC

Sekvence DNA:

AGTGGAGAGATAGAAAGAGAGGAAGATTTTTTTTTTAAATCTCTTAAGCT
CATGCTAGTGTAGGTGCTGGCAGGTCTGAACACTCTGTAGGACAGGCTG
GTAGGCAGGAA

Délka amplifikované sekvence: 72 bp
Toto STS se nevyskytuje na monochromozomovém mapovacím panelu

8. SV25R:

Pochází z koncové sekvence pravého raménka YAC 731_c_7.
Primer A: TGGGGTGCGCTGTGTTGT
Primer B: GAGATTTCATGCATTCCTGTAAGA

Sekvence DNA:

GGAGGGTGTTNTCACANAAGTCTGGGGTGCGCTGTGTTGTTTCATTGTAA
AAACCCTTTGGANCATCTGGGAATGTGCTGCCCCACATGTCCAGGTAAC
GTTCTCAGGAAGGGGAGGCTGGAAATCTCTGTGTGTCTTACAGGAATG
CATGAAATCTCCCANCCCCTCTTGTTGGA,AATTTCCCTCACTTT

Délka amplifikované sekvence: 136 bp
Toto STS se vyskytuje na chromozomu 7, tudíž YAC 731_c_7 je chimérický.

9. SV31L:

Pochází z koncové sekvence levého raménka YAC 752_g_8.
Primer A: GAGGCACAGCTTACCAGTTCA
Primer B: ATTCATTTTCTCATTTTATCC

Sekvence DNA:

CTTCTCNATGANTGGACAAATGTCATTGGGTCAGCATGAGGCACAGCTT
ACCAGTTTCAGATTCCAGTAGCTGAGGAACAAATCTTAACTCCAAAAATAA
GTAATTGCGTCACTTTGGAGGAATTATTTGACCTTTTCATAACTTTGACAT
CACAACAATGAGGGTGAAGTTAGTAAATAAATGATTATTATGAGGATAA
AATGAGAAAATGAATTNAGTGCTTAAGACAATGCTTGGTAACTAGTTAAN
CCG

Délka amplifikované sekvence: 178 bp
Toto STS se vyskytuje na chromozomu 18 a musí být lokalizováno mezi D18S876 and GCT3G01.

10. SV31R:

Pochází z koncové sekvence pravého raménka YAC 752_g_8.
Primer A: CAAGATTATGCCTCAACT
Primer B: TAAGCTCATAATCTCTGGA

Sekvence DNA:

AACTTTAACCAATTTAACTCC CTAACAGTTCTATAAAATAAGCAAGATT
ATGCCTCAACITTATGGATAAAGAAATGGAGGCATTAAGAGATAACTAAC
TTGCCAAGGCCACACAAGTGACTGAGTAAGAATTGCAAAGCCAATGAG
TCTGGCTCCAGAGATTATGAGCTTAATCACCACACTGTGCCACCTCCTGT
GTTTCCTGG

Délka amplifikované sekvence: 131 bp
Toto STS se nevyskytuje na monochromozomovém mapovacím panelu a není informativní, co se týče chiméričnosti YAC.

11. SV10L:

Pochází z koncové sekvence levého raménka YAC 942_c_3.
Primer A: TCACTTGTTGGTTAACATTACT
Primer B: TAGAAAAACAGTTGCATTTGATAT

Sekvence DNA:

GGTNTTTCACCTTGGTTGGTTAACATTACTTCTAAGTTTTTTATTGTTTTTTA
TGCTATTGCTAATGGGATTGCTTTCTTAATTTATTTTTTCCAATAGCTTGT
TGTTAGTTTATATCAAATGCAACTGTTTTCTATGCAAATTATGTTTCCT

Délka amplifikované sekvence: 130 bp

Toto STS se vyskytuje na chromozomu 18 a musí být lokalizováno mezi CHLC.GATA-p6051 and D18S968.

12. SV10R:

Pochází z koncové sekvence pravého raménka YAC 942_c_3.

Primer A: AACCCAAGGGAGCACAACTG

Primer B: GGCAATAGGCTTTCCAACAT

Sekvence DNA:

TTGGTGGTGGCCCTAGGTTTGGCAATTATAAATAAAGCTGCTACAAACATT
CATGTGCAGGTCTCC GTGTGGACATAATTTTCCAGTTCATTTGGGTAAAA
CCCAAGGGAGCACAACTGTTGGATCCTATNATAAAAATATNTCTCGTTTC
ATTTAAAAAACCTGGGAACTATCTNCCCACAGTGGCTGTCCCTTTTTGT
ATCCCCACCAACAATGTTGGAAAGCCTATTGCCANCAT

Délka amplifikované sekvence: 135 bp

Toto STS se vyskytuje na chromozomu 18 a musí být lokalizováno mezi D18S876 a GCT3G01.

13. SV6L:

Pochází z koncové sekvence levého raménka YAC 961_h_9.

Nebyl navržen žádný primer, protože tato sekvence je totožná se známým STR markerem D18S42, který tuto oblast opravdu mapuje.

Primer A:

Primer B:

Sekvence DNA:

CATGNCTCACAGTGTTCTGAGGCTGCTCTGGACATGCAATCTTGCATGC
TTTTGTCATGACAGGTCTTAAANAGTTTATCAGCTTNCTCAAATAGCTGAA
TGACANAACACTGGATTTTTGTTCAAATANCCTATCAACTTGGCNTCTGT
GTTGCGGTTGTCACTTGGTAACAAAATAAGTC

Délka amplifikované sekvence:

SV6L rozpoznává D18S42, který musí být tudíž lokalizován mezi WI-7336 a WI-8145.

14. SV6R:

Pochází z koncové sekvence pravého raménka YAC 961_h_9.

Primer A: TTGTGGAATGGCTAAGT

Primer B: GAAAGTATCAAGGCAGTG

Sekvence DNA:

TAATTGACAAATAAAAATTGTATATTTTNCATATTTAACATGTTATGCTAAC
 ATATATATGGATTGTGGAATGGCTAAGTCAGAAATTCTTTTACATTCATAT
 TTCCATATTATTTACTTTNNGCTTTAAAAAATATGTAAATGANAATACTTAT
 TTTTTTCAGTGTCACTGCCTTGATACTTTCACATTTNNGTTACATATTATTT
 CCCTTNCATCTAACAAATATATATTGAGTTTCTATAATGTGTCTGACACTG
 A

Délka amplifikované sekvence: 122 bp

SV6R amplifikuje segment na chromozomu 18. Tento segment musí být lokalizován mezi WI-2620 and WI-4211.

15. SV26L:

Pochází z koncové sekvence levého raménka YAC 907_e_1.

Primer A: TATTTGGTTTGTGTTGCTGAGGT

Primer B: CAAGAAGGATGGATACAAACAAG

Sekvence DNA:

TGGTCACTGGTGCCTTATTTGGTTTGTGTTGCTGAGGTCATATTTCTGTG
 GCCTTCATGCTTGATTTGTTGGAGTCTAGCCATGTAAAANTCTGTTGGAG
 TCTAGGCATTTAAAAAATAGGTATTATTGTAATCTTTGCCATTTGCTTGT
 TTGTATCCATCCTTCTTGGGAAGGCTTTACAGGCATTCAAAGG

Délka amplifikované sekvence: 154 bp

Toto STS se vyskytuje na chromozomu 13, tudíž YAC 907_e_1 je chimérický.

16. SV26R:

Pochází z koncové sekvence pravého raménka YAC 907_e_1.

Primer A: CGCTATGCATGGATTTA

Primer B: GCTGAATTfAGGATGTAA

Sekvence DNA:

CGCTATGCATGGATTTAAACTGAGTGTAGTGCACTCACTATGTTGCAGTC
 TCTTATTCTAGGTTCCCTAATATTTACATCCTAAATTCAGCT

Délka amplifikované sekvence: 90 bp

Není jasný výskyt na monochromozomovém mapovacím panelu: žádná informace, co se týče chiméričnosti na této straně YAC.

Testování 3 koncových sekvencí obklopujících mezeru v dalších YAC: STS-markery WI-4211, D18S876 a GCT3G01 byly také ukázány v pořadí , aby bylo možné jasněji identifikovat YAC na opačných stranách mezery v následující tabulce 3.

Tabulka 3

YACs	STSs					
	WI-4211	D18S876	SV31L	SV11R	SV10R	GCT3G01
940_b_1	+	+	+	-	-	-
766_f_12	+	+	+	+	-	-
846_a_5	+	-?	+	+	-	-
752_g_8	+	+	+	+	-	-
745_d_2	+	+	+	+	-	-
961_c_1	+	+	-	-	-	-
942_c_3	+	+	+	+	+	-
717_d_3	-	-	+	+	-?	+
972_e_11	-	-	-	-	-	+
940_h_10	-	-	-	-	+	+
821_e_7	-	-	-	-	+	+
731_c_7	-	-	-	-	-	+
889_c_4	-	-	-	-	+	+
907_e_1	-	-	-	+	+	+

+ pozitivní zásah, -: není zásah, ve dvou případech, kdy se očekával pozitivní zásah (za předpokládaného uspořádání markerů), ale nebyl pozorován, přičemž důvod není jasný.

YAC 745_d_2 byl vyloučen z další analýzy, neboť zde nebyl jasný zásah v chromzomu 18. Ze 7 zbývajících z monochromsomalního mapovacího panelu bylo zjištěno, že 3 byly chimérické a 4 nechimérické, jak ukazuje následující tabulka 4.

Tabulka 4

YAC	chimérický	chromozom
961_h_9 (6)	ne	
942_c_3 (10)	ne	
766_f_12 (11)	ne	
731_c_7 (25)	ano	chromozom 7
907_e_1 (26)	ano	chromozom 13
752_g_8 (31)	ne	
717_d_3 (34)	ano	chromozom 1

Pro nechimérické YAC byly STS založené na koncových sekvencích obklopujících mezeru (10R, 11R a 31L) byly testovány na 14 YAC obklopujících mezeru. Překryvy mezi YAC na opačných stranách mezery byly prokázány, tj. koncová sekvence "11R" (766_f_12) detekuje YAC 766_f_12 a YAC 907_E_1.

YAC pak byly selektovány, aby obsahovaly minimální možné překrývající se části

Tabulka 5

YAC	velikost	chimérický
961_h_9	1180 kb	není
766_f_12	1620 kb	není
907_e_1	1690 kb	je (chr. 13)

Tyto tři YAC jsou stabilní jak bylo určeno PFGE a jejich velikost zhruba odpovídá publikovaným velikostem. Tyto YAC byly přeneseny do jiných hostitelských kmenů kvasinek kvůli restričnímu mapování.

Příklad 2

Konstrukce frgmentačního vektoru

Fragment EcoRI/SalI velikosti 4,5 kb z pBLC8.1 (Lewis et al., 1992) nesoucí lysin-2 a telomerovou sekvenci byl směrově klonován do plazmidu GEM3zf(-) naštěpeného EcoRI/SalI. Poté bylo „koncové vyproštovací místo“ ligováno k EcoRI místu. K tomu byly dva oligonukleotidy:

řetězec 1: 5'- TTCGGATCCGGTACCATCGAT-3' a

řetězec 2: 3'- GCCTAGGCCATGGTAGCTATT-5',

ligovány do částečně (dATP) zaplněného místa EcoRI, čímž byl vytvořen vektor pDF1. Tripletové repetice obsahující fragmentační vektory byly konstruovány klonováním adapterů 21 bp a 30 bp CAG/CTG do Klenowem zaplněného místa PstI v pDF1. Transformace a selekce poskytla fragmentační vektory (CAG) a (CTG): s orientací repetice ve směru 5' ke 3' vzhledem k telomeru.

Transformace kvasinek

Linearizovaný (naštěpený SalI) vektor byl použit k transformaci YAC klonů 961_h_9, 766_f_12 nebo 907_e_1 užitím metody s LiAc. Po transformaci byly YAC klony vysety na SDlys⁻ plotny pro selekci na přítomnost fragmentačních vektorů. Po 2 až 3 dnech byly pořízeny repliky kolonií na SDlys⁻-Trp⁻-Ura⁻ a SDlys⁻-Trp⁻-Ura⁻ plotny. Kolonie rostoucí na pudě SDlys⁻-Trp⁻-Ura⁻ ale nikoliv na SDlys⁻-Trp⁻-Ura⁻ obsahovaly fragmentované YAC.

Analýza fragmentovaných YAC

Kvasinková DNA izolovaná z klonů se správným fenotypem byly analyzovány gelovou elektroforézou v pulzním poli (PFGE), po které následoval kapilární přenos a hybridizace s genem *Lys2* a byly stanoveny velikosti fragmentovaných YAC srovnáním se standardem DNA známé velikosti.

Konečné vyproštění

Fragmentované YAC charakterizované velikostí společnou pro ostatní fragmentované YAC, nasvědčující přítomnosti hlavních CAG nebo CTG tripletových repetice, byly naštěpeny jedním z enzymů štěpících v koncovém vyprošťovacím místě, pak byly ligovány a užity k transformaci *E. Coli*. Po namnožení transformovaných bakterií byla izolována plazmidová DNA a konce fragmentovaných YAC, odpovídající jedné ze sekvencí obklopujících izolované trnucleotidové repetice, byly sekvencovány.

Pomocí sekvencování bylo zjištěno, že fragmentované YAC stejné délky byly všechny fragmentovány ve stejném místě. Bylo provedeno prohledávání databáze Genbank programem BLAST s nově identifikovanou sekvencí, aby se zjistila homologie s dosud známými sekvencemi. Úplná sekvence zahrnující CAG nebo CTG repetice fragmentovaných YAC byla získána kosmidovým sekvencováním, užitím primerů specifických pro sekvenci a sestřihových primerů, jak bylo již dříve publikováno (Fuentes et al., 1992, Hum. Genet. 101: 346-350) nebo pomocí soupravy pro „procházení po chromosomu“ (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA) jak popsali Siebert et al., Nucl. Acid. Res., 1995, 23(6): 1087-1088 a Siebert et al., 1995, CLONTECHniques X(II):1-3.

Výsledky

Klon YAC 961_h_9 byl transformován fragmentačním vektorem (CAG)- nebo (CTG)₁. Vektor CTG neodhalil přítomnost žádných repetitivních CTG. Analýza dvanácti (CAG)₇ fragmentovaných YAC ukázala, že pět z nich mělo stejnou velikost přibližně 100 kb. Koncové vyproštění bylo provedeno s EcoRI a sekvencování třech z těchto fragmentů odhalilo, že všechny sdílely koncové sekvence vyznačené kurzívou na obr. 15a. Prohledávání GenBank programem BLAST ukázalo přítomnost sekvencí homologické s genem CAP2 (GenBank přístup. Číslo L40377). Sekvence zahrnující CAG repetice ukázaná na obr. 15a byla získána jak kosmidovým sekvencováním tak i procházením po chromosomu. Poloha sekvence v mapě byla určena mezi markery D18S68 a WI-3170 pomocí mapování obsahu STS.

YAC 766_f_12 byl fragmentován užitím fragmentačního vektoru (CAG)- nebo (CTG)₁. A opět vektor(CTG)₁ neodhalil žádné CTG repetice. Analýza dvaceti (CAG)- fragmentovaných YAC ukázala na existenci dvou skupin fragmentů stejné velikosti: pět s přibližnou velikostí 650 kb a dva přibližné velikosti 50 kb.

Koncové vyproštění bylo provedeno pomocí EcoRI u čtyřech fragmentovaných YAC velikosti 650 kb. Sekvencování potvrdilo, že všechny sdílejí identické 3'-konce, charakteristické sekvencí, která je zvýrazněna kurzívou na obr. 16a. Prohledávání pomocí programu BLAST ukázalo homologii této sekvence s rodinu Alu repetitivních sekvencí. Sekvence obsahující repetice CAG uvedená na obr. 16a byla získána kosmidovým sekvencováním. Sekvence byla lokalizována mezi markery WI-2620 a WI-4211 mapováním podle obsahu STS YAC kontigové mapy.

Koncové vyproštění bylo provedeno také u dvou fragmentů velikosti 50 kb. Sekvencování odhalilo sekvenci uvedenou kurzívou na obr. 17a. Prohledávání pomocí programu BLAST ukázalo, že zde není žádná homologie se známými sekvencemi. Kosmidové sekvencování umožnilo identifikovat úplnou sekvenci obsahující CAG repetice, uvedenou na obr. 17a. Sekvence byla lokalizována mezi markery D18S968 a D18S875 mapováním podle obsahu STS YAC kontigové mapy.

YAC klon 907_e_1 byl transformován fragmentačním vektorem (CAG)₇ nebo (CTG)₁₀. Vektor (CAG)₇ neodhalil přítomnost žádných repetitivních CAG. Analýza dvacetišesti (CTG)₁₀ fragmentovaných YAC ukázala, že jedenadvacet z nich mělo stejnou velikost přibližně 900 kb. Koncové vyproštění bylo provedeno s KpnI u třech z těchto YAC fragmentů. Sekvencování odhalilo sekvenci, vyznačenou kurzívou na obr. 18a. Prohledávání programem BLAST ukázalo přítomnost homologie s markerem GCT3G0I (GenBank přístup. Číslo G09484). Sekvence zahrnující CTG repetice byla získána z databáze Genbank. Poloha sekvence v mapě byla lokalizována mezi markery 10R a WI-528.

15.08.00

65

PV2000-2282

4417

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití úseku lidského chromozomu 18q velikosti 8,9 cM ležícího mezi polymorfními markery D18S68 a D18S979 nebo jeho fragmentu pro identifikaci alespoň jednoho lidského genu, včetně jeho mutovaných nebo polymorfních variant, který je asociován s poruchou nálady nebo příbuznými poruchami.

2. Použití YAC klonu obsahujícího část lidského chromozomu 18q ležícího mezi polymorfními markery D18S60 a D18S61 pro identifikaci alespoň jednoho lidského genu, včetně jeho mutovaných nebo polymorfních variant, který je asociován s poruchou nálady nebo příbuznými poruchami.

3. Použití podle nároku 2, kdy část chromozomu obsahuje úsek chromozomu 18q mezi polymorfními markery D18S68 a D18S979 nebo fragment tohoto úseku.

4. Použití podle nároku 2 nebo 3, kdy YAC klon je 961_h_9, 942_c_3, 766_f_12, 731_c_7, 907_e_1, 752_g_8 nebo 717_d_3.

5. Použití podle nároku 4, kdy YAC klon je 961_h_9, 766_f_12 nebo 907_e_1.

6. Použití podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 5, kdy porucha nálady nebo příbuzná porucha je vybrána ze skupiny, která podle taxonomie „Diagnostického a statického manuálu mentálních poruch“, verze 4 (DSM-IV) obsahuje poruchy (296.XX, 300.4, 311, 301, 13, 295.70), schizofrenii a příbuzné poruchy (295.XX, 297.1, 298.9, 297.3, 298.9),

úzkostné poruchy (300.XX, 309.81, 308.3), poruchy přizpůsobování (309.XX) a poruchy osobnosti (kódy 301.XX).

7. Způsob identifikace alespoň jednoho lidského genu, včetně jeho mutovaných a polymorfních variant, který je asociovaný s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje detekci nukleotidových tripletových repetit v úseku lidského chromozomu 18q mezi polymorfními markery D18S68 a D18S979.

8. Způsob identifikace alespoň jednoho lidského genu, včetně jeho mutovaných a polymorfních variant, který je asociovaný s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje fragmentaci YAC klonu definovaného v kterémkoliv z nároku 2 až 4 a detekci nukleotidových tripletových repetit.

9. Způsob podle nároku 7 nebo 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že opakovaný triplet je CAG nebo CTG.

10. Způsob podle nároku 9 v y z n a č u j í c í s e t í m, že opakovaný triplet se detekuje pomocí sondy obsahující alespoň 5 CTG a/nebo CAG repetit.

11. Způsob identifikace alespoň jednoho lidského genu, včetně jeho mutovaných a polymorfních variant, který je asociovaný s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, přičemž gen je přítomen v DNA obsažené v YAC klonech definovaných v kterémkoliv z nároků 2 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento způsob obsahuje kroky, kdy se detekuje exprimovaný produkt tohoto genu pomocí protilátky schopné

rozpoznat tento protein s aminokyselinovou sekvencí obsahující souvislou sekvenci alespoň 8 glutaminových zbytků.

12. Způsob podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že DNA tvoří část lidské cDNA expresní knihovny.

13. Způsob podle nároku 11 nebo 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že protilátka je monoklonální protilátka (mAB) 1C2.

14. Způsob přípravy kontigové mapy YAC klonů úseku lidského chromozomu 18q mezi polymorfními markery D18S60 a D18S61, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy se

a) YAC klony podle kteréhokoliv z nároků 2 až 5 subklonují do vektoru s „exonovou pastí“,

b) kterákoliv z nukleotidových sekvencí uvedených na obrázcích 1 až 11 nebo kterákoliv jiná známá sekvence se sekvenční značkou ze zde popsaného YAC kontigu, nebo jejich část obsahující souvislou sekvenci ne méně než 14 bazí nebo sekvenci komplementární, se užije k detekci překryvů mezi kosmidovými vektory, a

c) zkonstruuje se kosmidová kontigová mapa YAC klonu daného úseku.

15. Způsob identifikace alespoň jednoho lidského genu, nebo jakékoliv jeho mutované nebo polymorfní varianty, kterýžto gen je asociován s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že způsob obsahuje kroky, kdy se:

a) savčí buňky transfekují kosmidovými vektory s "exonovou pastí" připraveným podle nároku 14,

- b) savčí buňky kultivují ve vhodném médiu,
- c) RNA transkripty exprimované z promotoru SV40 se izolují,
- d) z RNA transkriptu se připraví cDNA,
- e) identifikují se sestřihové události zahrnující exony subklonované do kosmidových vektorů s "exonovou pastí" podle nároku 14, aby se určila poloha kódujících úseků v subklonované DNA,
- f) detekují rozdíly mezi kódujícími úseky a ekvivalentními úseky v DNA jedince postiženého poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, a
- g) identifikuje se gen nebo jeho mutovaná nebo polymorfní varianta, který je asociován s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou.

16. Způsob identifikace alespoň jednoho lidského genu nebo jeho mutovaných nebo polymorfních variant, kterýžto gen je asociován s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že způsob obsahuje kroky, kdy se :

- a) subklonují YAC klony podle kteréhokoliv z nároků 2 až 5 do kosmidu, BAC, PAC nebo jiného vektoru,
- b) použije se kterákoliv nukleotidová sekvence uvedená na obr. 1 až 11 nebo jakékoliv jiné známé místo se sekvenční značkou z YAC kontigu popsaneho zde, nebo její část obsahující souvislou sekvenci ne méně než 14 bází nebo k ní komplementární sekvenci, pro detekci překryvů mezi subklony a ke konstrukci jejich mapy,
- c) identifikuje se pozice genů v subklonované DNA prostřednictvím identifikace jednoho nebo několika CpG ostrůvků, zoo-přenosem, hybridizací subklonované DNA s cDNA

knihovnou nebo northernovým přenosem mRNA z panelu kultivovaných buněčných linií,

d) detekují se rozdíly mezi geny a ekvivalentními úseky DNA jedincu postižených poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, a

f) identifikuje se gen, který když je defektní, je asociován s poruchou nálady nebo příbuznými poruchami.

17. Izolovaný lidský gen, včetně jeho mutovaných nebo polymorfních variant, kterýžto gen je asociován s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, a který lze získat způsobem podle kteréhokoliv z nároků 7 až 13, 15 nebo 16.

18. Lidský protein, který, když je defektní, je asociován s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, a který je produktem exprese genu podle nároku 17.

19. cDNA kódující protein podle nároku 18, kterou lze získat způsobem podle kteréhokoliv z nároku 7 až 13, 15 nebo 16.

20. Použití sondy obsahující souvislou sekvenci alespoň 14 nukleotidů z cDNA podle nároku 19 nebo sekvenci k ní komplementární ve způsobu detekce u pacienta patologické mutace nebo genetické variace asociované s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou, přičemž způsob obsahuje hybridizaci sondy se vzorkem z pacienta a z kontrolního jedince.

21. Molekula nukleové kyseliny, která obsahuje kteroukoliv nukleotidovou sekvenci ze sekvencí uvedených na obr. 15a, 16a, 17a nebo 18a.

22. Molekula nukleové kyseliny, která obsahuje nukleotidovou sekvenci, která se liší kterékoliv ze sekvencí uvedených na obr. 15a, 16a, 17a nebo 18a pouze rozsahem trinukletidových repetit.

23. Protein kódovaný molekulou nukleové kyseliny podle nároku 21.

24. Protein kódovaný molekulou nukleové kyseliny podle nároku 22.

25. Způsob stanovení náchylnosti k poruše nálady nebo příbuzné poruše u jedince, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje analýzu vzorku DNA z jedince na přítomnost DNA polymorfismu asociovaného s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou v úseku chromozomu 18q ležícím mezi polymorfními markery D18S68 a D18S979.

26. Způsob podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že DNA polymorfismus je rozsah trinukleotidových repetit.

27. Způsob podle nároku 26 v y z n a č u j í c í s e t í m, že rozsah trinukleotidových repetit je obsažen v nukleotidové sekvenci, která se liší od kterékoliv ze sekvencí uvedených na obr. 15a, 16a, 17a nebo 18a pouze rozsahem trinukletidových repetit.

28. Způsob podle nároku 26 nebo 27 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy se:

a) získá vzorek DNA od jedince

b) poskytnou primery vhodné pro amplifikaci nukleotidové sekvence obsažené v sekvenci ukázané na kterémkoliv z obrázků 15a, 16a, 17a, nebo 18a, přičemž primery ohraničují trinukleotidové repetice obsažené v sekvenci,

c) primery se použijí na uvedený vzorek DNA k provedení amplifikační reakce,

d) stejná amplifikační reakce se provede na vzorku DNA kontrolního jedince, a

e) srovnají se výsledky amplifikační reakce testovaného jedince a kontrolního jedince,

přičemž výskyt amplifikovaného fragmentu u testovaného jedince, který je větší než fragment kontrolního jedince, indikuje přítomnost náchylnosti k poruše nálady nebo příbuzné poruše u testovaného jedince.

29. Způsob podle nároku 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nukleotidová sekvence, která má být amplifikována, je obsažena v sekvenci uvedené na obr. 15a, přičemž primery mají sekvenci uvedenou na obr. 15b.

30. Způsob podle nároku 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nukleotidová sekvence, která má být amplifikována, je obsažena v sekvenci uvedené na obr. 16a, přičemž primery mají sekvenci uvedenou na obr. 16b.

31. Způsob podle nároku 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nukleotidová sekvence, která má být amplifikována, je obsažena v sekvenci uvedené na obr. 17a, přičemž primery mají sekvenci uvedenou na obr. 17b.

32. Způsob podle nároku 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nukleotidová sekvence, která má být amplifikována,

je obsažena v sekvenci uvedené na obr. 18a, přičemž primery mají sekvenci uvedenou na obr. 18b.

33. Způsob detekce náchylnosti jedince k poruše nálady nebo příbuzné poruše, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kroky, kdy se:

- a) získá vzorek proteinů od jedince a
 - b) detekuje se přítomnost proteinu podle nároku 24,
- přičemž výskyt tohoto proteinu u testovaného jedince indikuje přítomnost náchylnosti k poruše nálady nebo příbuzné poruše.

34. Způsob podle nároku 34 v y z n a č u j í c í s e t í m, že protein se detekuje protilátkou, která je schopná rozpoznat souvislý řetězec alespoň 3 glutaminu.

35. Způsob podle nároku 34 v y z n a č u j í c í s e t í m, že protilátka je monoklonální protilátka 1C2.

36. Nukleová kyselina podle nároku 21 pro použití jako léčivo k léčení poruchy nálady nebo příbuzné poruchy.

37. Protein podle nároku 23 pro použití jako léčivo k léčení poruchy nálady nebo příbuzné poruchy.

38. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje nukleovou kyselinu podle nároku 21 a farmaceuticky přijatelný nosič.

39. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje protein podle nároku 23 a farmaceuticky přijatelný nosič.

40. Expresní vektor, který obsahuje nukleotidovou sekvenci podle nároku 21 nebo 22.

41. Reportérový plazmid, který obsahuje promotorový úsek molekuly nukleové kyseliny podle nároku 21 nebo 22 umístěný proti směru od reportérového genu, který kóduje reportérovou molekulu, takže exprese reportérového genu je řízena tímto promotorovým úsekem.

42. Buněčná linie transfekovaná expresním vektorem podle nároku 40.

43. Eukaryotická buňka nebo mnohobuněčná tkáň nebo organismus obsahující transgen kódující protein podle nároku 23 nebo 24.

44. Způsob určení, zda sloučenina je zesilovač nebo inhibitor exprese genu asociovaného s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy se:

a) buňka podle nároku 42 přivede do kontaktu s testovanou sloučeninou,

b) detekuje a/nebo kvantitativně vyhodnotí přítomnost jakéhokoliv transkriptu mRNA odpovídajícího nukleové kyselině podle nároku 21 nebo 22, a

c) srovná hladina transkripce této nukleové kyseliny s hladinou transkripce téže nukleové kyseliny v buňce podle nároku 42, která nebyla vystavena testované sloučenině.

45. Způsob určení, zda sloučenina je zesilovač nebo inhibitor exprese genu asociovaného s poruchou nálady nebo

příbuznou poruchou v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy se:

a) buňka podle nároku 42 přivede do kontaktu s testovanou sloučeninou,

b) detekuje a/nebo kvantitativně vyhodnotí exprese proteinu podle nároku 23 nebo 24, a

c) srovná se hladina exprese tohoto proteinu s expresí téhož proteinu v buňce podle nároku 42, která nebyla vystavena testované sloučenině.

46. Způsob určení, zda sloučenina je zesilovač nebo inhibitor exprese genu asociovaného s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy se:

a) buňka transfekovaná reportérovým plazmidem podle nároku 41 se přivede do kontaktu s testovanou sloučeninou,

b) detekuje nebo kvantitativně vyhodnotí množství exprimované reportérové molekuly, a

c) srovná se toto množství s exprimovaným množstvím v buňce obsahující reportérový plazmid, která nebyla vystavena testované sloučenině.

47. Sloučenina, která byla identifikována jako zesilovač nebo inhibitor exprese genu asociovaného s poruchou nálady nebo příbuznou poruchou způsobem podle kteréhokoliv z nároků 44 až 46.