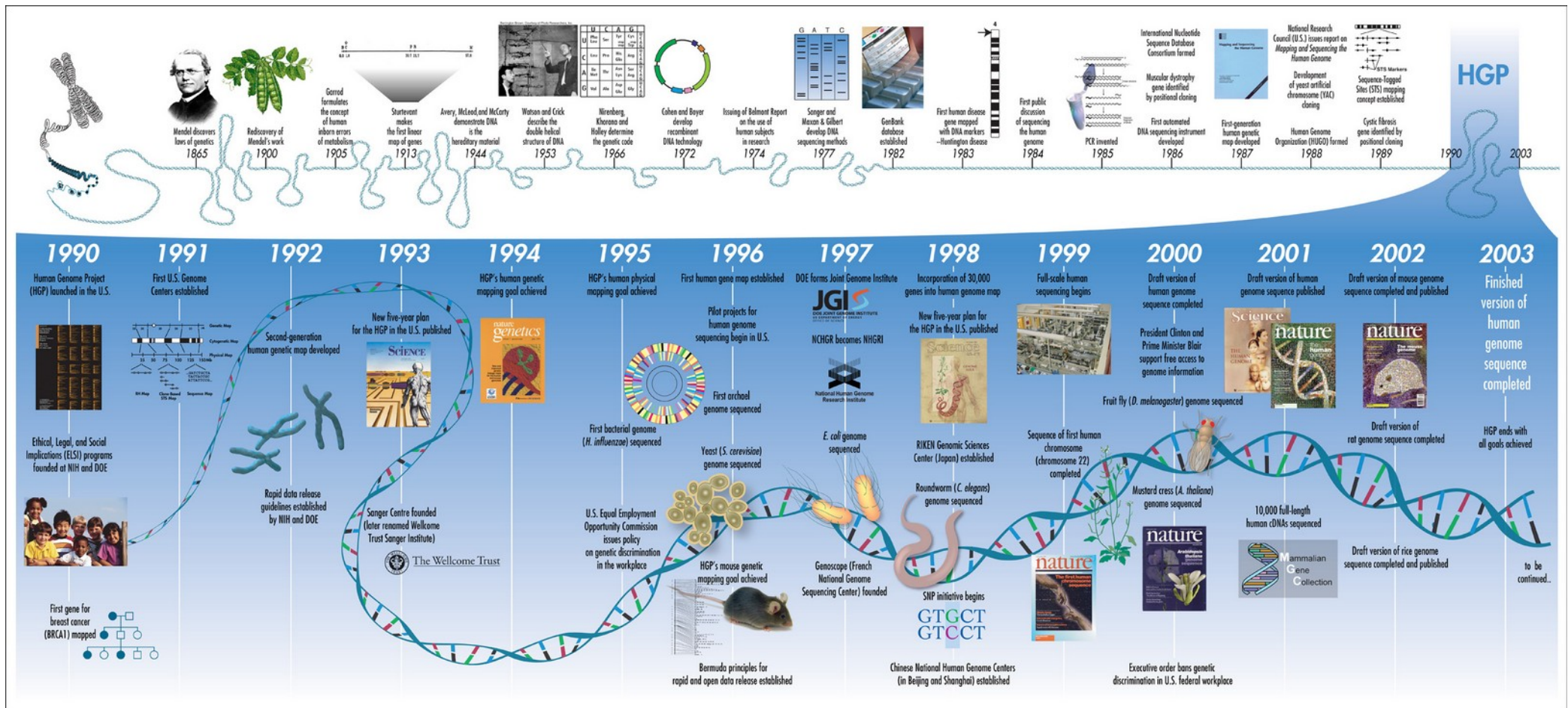


Human Genome Project:



Humán Genom Projekt: teljes emberi genom meghatározása

1953 áprilisában DNS szerkezete: Watson és Crick (*Nature*)

70-es évek közepe: DNS szekvenálás

2003 teljes emberi genom meghatározása

Humán Genom Projekt céljai:

1. A humán DNS összes génjének (a korábbi becslés ~100.000 volt, a mai ismert szám <23.000) azonosítása.
2. A humán DNS nagyjából 3 milliárd bázispárjának meghatározása.
3. A kinyert információmennyiség adatbázisban történő tárolása.
4. Az adatfeldolgozási eljárások korszerűsítése.
5. A projekt során létrehozott illetve korszerűsített technológiák átadása a magánszektornak.
6. A felmerülő etikai, jogi és társadalmi kérdések tisztázása.

A humán genom vázlatos (*draft*) szekvenciája

2000 júniusában a Humán Genom Konzorcium és a Celera együtt mutatta be a humán genom első vázlatos szekvenciáját.

Az eukromatinnak kb 90%-át szekvenálták meg „résekkel” és sok hibával.

A Humán Genom Konzorcium 2001-ben a Nature-ben, publikálta a szekvenciát és teljes mértékben elérhetővé tette azt.

A Celera Genomics szintén 2001-ben a Science-ben, és nem tette teljes mértékben elérhetővé.

Újdonságok:

Ismétlődő szekvenciákról,

a gének genomon belüli elhelyezkedéséről,

gének számáról: az előrejelzett 100 000 helyett csak alig 23000 gén található meg a humán genomban, körülbelül annyi, mint az ecetmuslica genomjában.

Emberi genom:

3,2 gigabázispárnyi(milliárd) DNS 23 kromoszómában (haploid genom).

Nagyobbik fele ismétlődő szekvencia: 3% egyszerű ismétlődés, 5% nagy kromoszómális szegmensek megkettőződése, közel fele pedig ún. ugráló gén (transzpozon)

Transzpozonok: 3% DNS transzpozon, ~45% retrotranspozon.

Feltételezik, hogy az emberi DNS legalább 75%-a ugráló géneredetű.

A retrotranszpozonok önállóan képesek mozgásra, a retropozonok csak más mobilis elemek által kódolt enzimek révén. Autonóm retroelemekből rendkívül kevés található az emberi genomban, a többi mobilizációra képes elem ezek enzimjeit használja.

Fehérjéket kódoló exon szekvenciák a genom 1,1%-át teszik ki,

Intronok 26% (legújabb becslések szerint többmint 30%).

Nagyfokú evolúciós konzerváltságot mutató szekvenciák aránya 4%, 1,1%-ot a kódoló szakaszok, a maradékot pedig szabályozó genetikai régiók és számos ún. RNS gén teszi ki.

Etikai kérdések avagy kinek a DNS-ét használták a szekvenáláshoz?

Eredeti cél az volt, hogy a szekvenált DNS anonim legyen, ne lehessen visszakövetni, hogy kié volt.

A HGP során lehet tudni, hogy a minta 70%-a 1 donortól maradék 30% több donortól van. Válogatás véletlenszerűen történt.

A Celera is eredetileg több etnikumból gyűjtött mintát és véletlenszerűen sorsolta ki azokat, de aztán kiderült, hogy a Celera vezetője Craig Venter variált a mintákkal és a saját DNS-ét használta fel a szekvenáláshoz. Azt is bejelentette, hogy szívbetegségre és Alzheimer kórra van hajlama.

1000 dollár ma az exonok és 1500 a teljes eukromatinok szekvenálásának költsége.

Venter a saját genomját elvileg nyilvánosságra hozhatja, de ezzel rokonairól is fontos információt árul el, amihez nincs joga az ő beleegyezésük nélkül.

Ha egy letális mutációt észlelünk az embrióba való beavatkozás az emberi evolúcióba történő mesterséges beavatkozás, előre nem látható géngyakoriság változásokat okozna.

Emberi genom szerkesztése és az ember klónozása nem engedélyezett.

Testi sejteken lehet manipulációkat végezni.

Etikai problémák nemcsak a betegségekre való hajlam kiderítésénél lehetnek, hanem egyéb jellemzők kutatásánál is:

testsúly, testmagasság, intelligencia, tanulási képesség stb genetikai hátterének feltárását is végzik.

Mi lesz a Humán Genom Projekt után?

A DNS bázissorrendjének meghatározása utáni lépések: a gének jelentésének megfejtése, az egyes működések sorrendjének, kapcsolati hálójának megismerése.

A DNS bázissorrendjében ott a múlt:

A macska és az ember kromoszómáinak és génjeinek összevetése sokat elárul az emlősök közös ősről.

A barnamedvék legközelebbi rokonai a jegesmedvék.



A számbárszarvas hasonló a gímszarvashoz, de csak távoli rokona, de a milu evolúciós unokatestvére.



A számbárszarvas. Előfordulás: India, Sri Lanka, Banglades, Nepál, Bhután, Kína, Thaiföld, Laosz

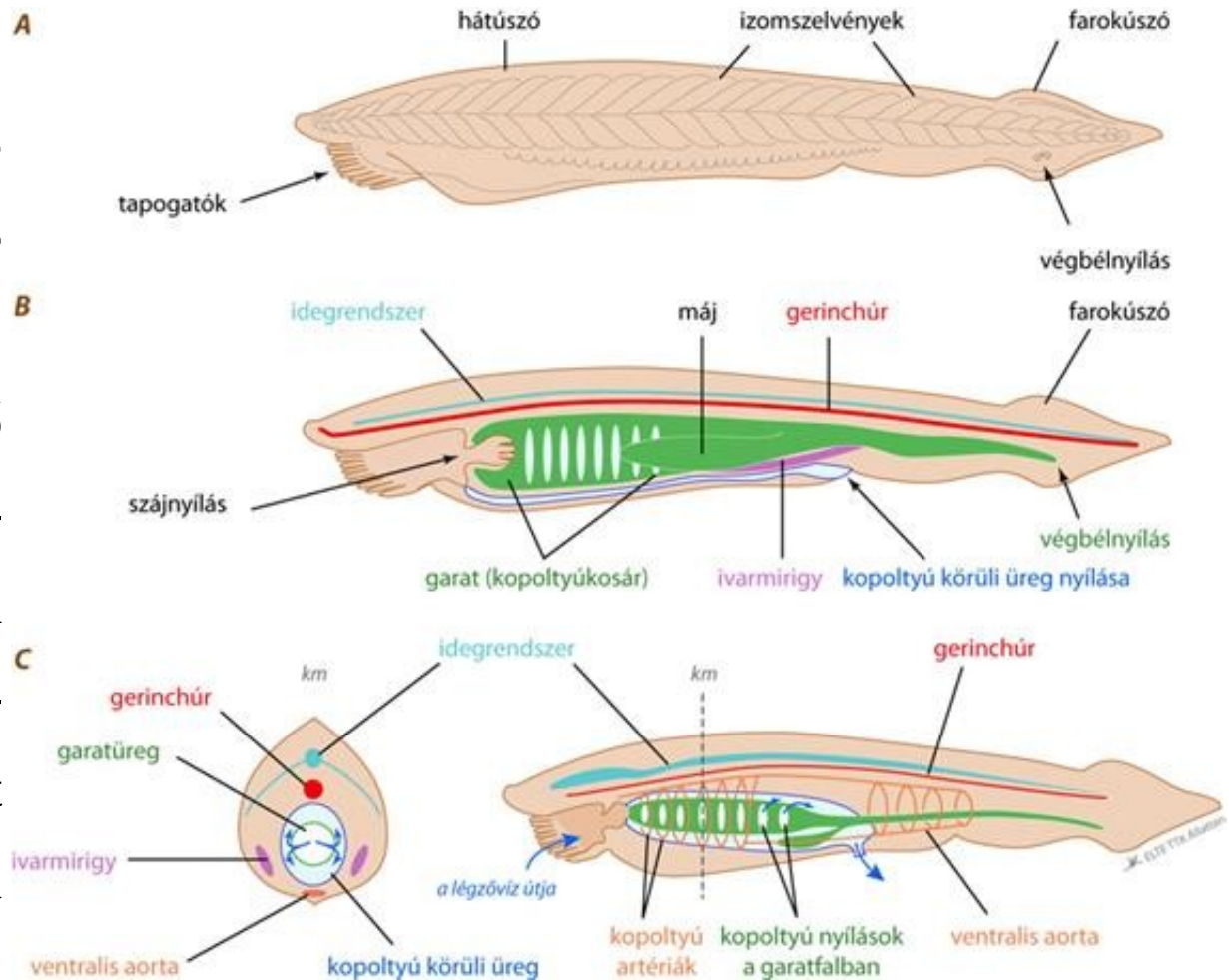
Gímszarva: Európa, Kaukázus

Dávid-szarvas, Milu: eredetileg Kínában élt, vadon már kipusztult

Lánczsahal idegrendszerének vizsgálata sokat elárul a gerinces idegrendszer kialakulásáról.

A lánczsahal idegrendszere kb 20000 neuronból áll (emlőssöké több millióból).

Csőidegrendszer: dorzális cső képviseli a központi idegrendszert, agy nem különül el, a környéki rész szenzoros neuronok hálózata, dúcléc sem alakult ki. Genetikai vizsgálatokkal ebben az egységes csőben elkülöníthetők a későbbi agy területei, és a dúclécrendszer neuronjai is.



Ritka és jellegzetes báziskülönbségek árulkodnak az egyes embercsoportok vándorlásáról. 350,000 évvel ezelőtt egy hominidae csoport elhagyta Afrikát, és Euráziába vándorolt.

Belőlük alakultak ki a Neandervölgyi és a Gyeniszovai emberek.

Kb 60-70,000 évvel ezelőtt a mai ember elődei is elhagyják Afrikát és Euráziába vándorolnak, ahol keverednek a Neandervölgyi, illetve a Gyeniszovai emberrel.



Géndiagnosztika és génterápia létrejötte:

HGP egyik legfontosabb eredménye, orvoslás forradalma, egyéni orvoslási eljárások kidolgozásának lehetősége.

Géndiagnosztika:

Betegségekre hajlamosító gének feltárása, életmódbeli tanácsokkal, leghatékonyabb kezelés kiválasztásával segíti az egészség megőrzését

Onkogének kimutatása, presenilin gének jelenléte

Génterápia:

Testi sejtek génjeinek megváltoztatásával gyógyítja vagy mérsékli a betegséget.

Genetikai variációk a humán genomban:

Kromoszóma-rendellenességek

Numerikus kromoszómaaberráció: a kromoszómák száma eltér a normál genomtól.

Euploiditás: a genom a haploid kromoszóma szám egész számú többszöröse. Mindegyik kromoszómából egyforma számú példány fordul elő.

A kromoszómaszerelvény megsokszorozódása, a sejtciklus M fázisában, az osztódási apparátus (mikrotubulusok) hibájának következtében alakul ki.

Növényekben a normális értéktől való eltérés az élettel összeegyeztethető, sőt gazdasági szempontból kifejezetten előnyös.

Állatokban, illetve az emberben már méhen belül halálhoz vezet. Kivételt képeznek a csontvelői megakariociták, és a regenerálódó májsejtek, ezek egy része poliploid.

A spontán abortumok 10%-ában fordul elő triploidia. 90%-a apai eredetű, diploid spermium vagy 2 spermium általi megtermékenyítésből származnak. 10% diploid petesejt megtermékenyítéséből.

Aneuploiditás: egy kromoszóma számbeli eltérése.

Nulliszómia: nincs valamelyik kromoszómából, letális.

Monoszómia: 1 darab van valamelyik kromoszómából. Autoszómális vagy X hiánya letális. Csak a Turner szindróma (X0) eredményez élve születést.

Triszómiája: valamelyik kromoszómából 3. Általánosságban elmondható, hogy az emberi/ állati szervezet a kromoszóma többletet jobban tolerálja, mint a kromoszóma hiányt. Több testi és főleg nemi kromoszóma aneuploid mutáció – triszómia – fordul elő élveszületettekben. Down kór (21-es) Edward szindróma (18-as), Patau szindróma (13-as). Klinefelter szindróma (XXY) Vetéléskor 1-es kivételével mindegyik kromoszóma triszómiáját megtalálták, leggyakoribb a 16-osé.

Egynél több szám feletti kromoszóma a nemi kromoszómákra jellemző (pl. 47,XXX, 48,XXXY kariotípusok).

Érintett kromoszómák alapján autoszomális vagy a nemi kromoszómák numerikus aberrációi fordulnak elő.

Az aneuploid rendellenességek *mitotikus* vagy *meiotikus non-diszjunkció* (szét-nem-válás) következtében jönnek létre. *Ritkábban* (uniparentális diszómial) *egyes kromatidák/kromoszómák az anafázis során lemaradnak* a többitől nem jutnak el a megfelelő pólusra.

Mitotikus non-diszjunkciók: magzati sejtek osztódásakor, döntő, hogy mikor és milyen sejtípus osztódásakor következtek be. A korai, tehát végül sok sejtet/szövetet érintő non-diszjunkció súlyosabb következményekkel jár (mozaicizmus).

A meiotikus non-diszjunkciók:

Első meiotikus non-diszjunkcióban a homológ kromoszómapárok némelyike nem válik szét. Mind a 4 utódsejt érintett: kettőben kromoszómatöbblet ($n+1$), kettőben -hiány ($n-1$) alakul ki.

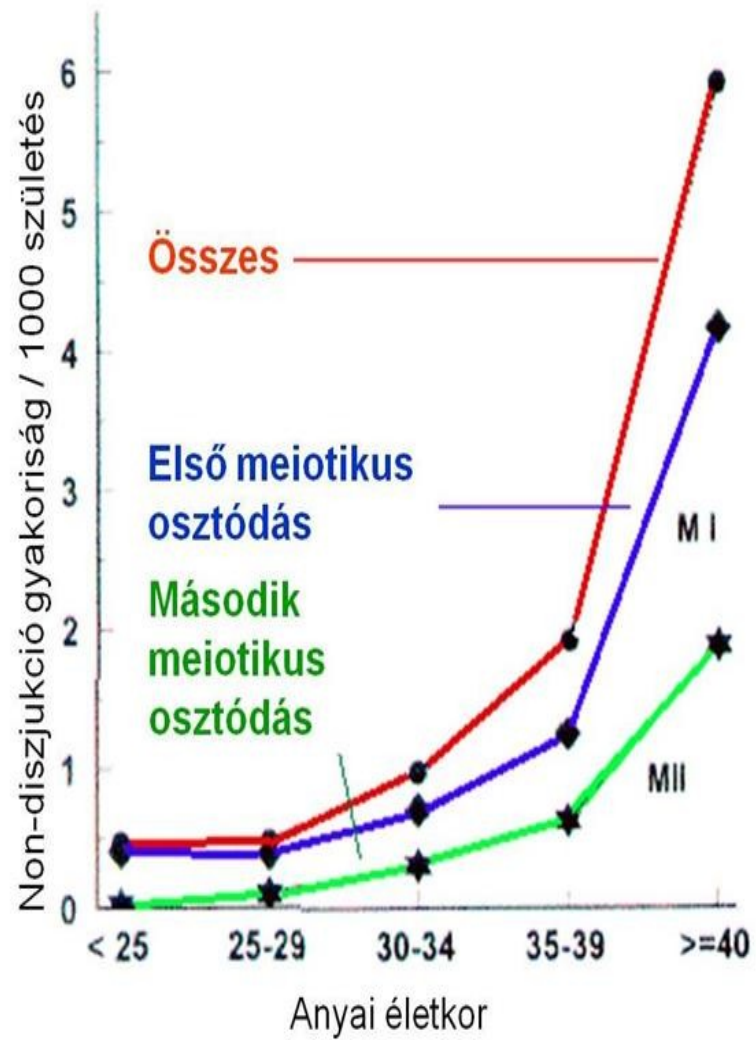
Második meiotikus non-diszjunkcióban: a testvérkromatidák szét nem válásáról van szó. *az utódsejtek fele* érintett. Egy-egyben lesz hiány, illetve többlet.

A triszómiás esetekben a három homológ eredetében különbség van, attól függően, hogy melyik meiotikus osztódásban volt a mutáció. Az első meiotikus osztódásból származó triszómiákban *mindhárom homológ eltérő eredetű* (pl. egy az anyai nagyanyától, egy az anyai nagyapától, a harmadik pedig az apától öröklött). Ugyanakkor a második meiotikus non-diszjunkciós triszómiákban *két homológ azonos* (pl. anyai nagyanyai vagy nagyapai eredetű) lesz, míg *a harmadik a másik szülőtől, az apától ered. Az emberi aneuploid kromoszóma mutációk 70%-a az első, 30%-a a második meiotikus non-diszjunkcióból származik.*

Következmény: elsősorban spontán vetélés, értelmi és testi fejlődés elmaradásával járó kórkép és fejlődési rendellenesség.

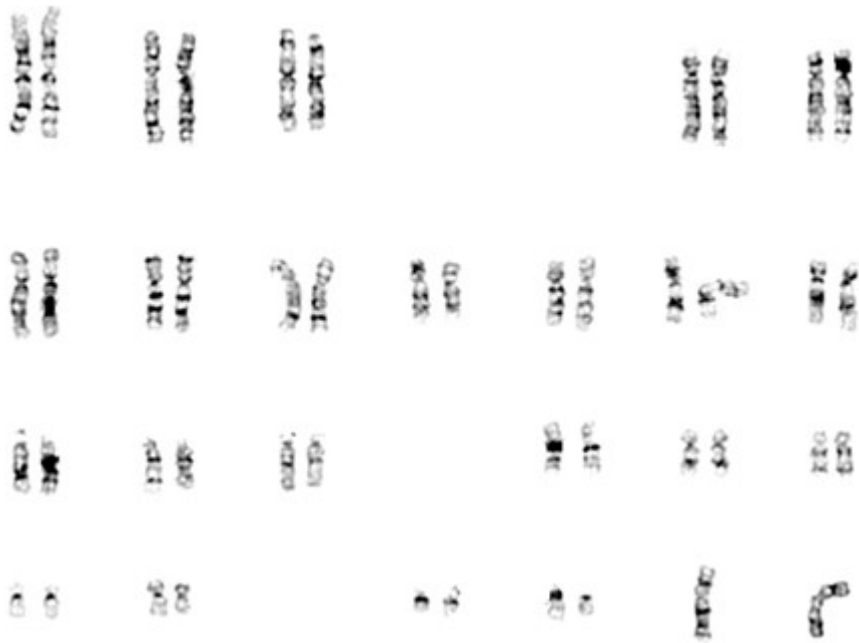
Feltételezhetően a terhességek 10–20%-ában fordulnak elő, nagy részük az élettel nem összeegyeztethető súlyos hibákat eredményez, és magzati veszteséget okoz.

3.7.



ábra - A non-diszjúkciók gyakoriságának változása az anyai életkor függvényében – <http://9e.devbio.com/article.php?id=189>: figure 2. nyomán; 2013. 07. 03.

2.7. ábra. Az egyik 13-as és az egyik 14-es kromoszóma között létrejött áthelyeződést tartalmazó kariotípus [45,XY, der(13;14) (q10;q10)]. (Dr. Dobos Matild anyagából, SE II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika)



2.8. ábra. Szám feletti Y-kromoszómát tartalmazó kariotípus, a két Y-kromoszóma áthelyeződésével [46,X,der(Y),t(Y;Y) (q12; q12)]. (Dr. Dobos Matild anyagából, SE II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika)



2.9. ábra. 21-es triszómia kariotípusa (47,XY,+21). (Dr. Dobos Matild anyagából, SE II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika)

Kissejtes tüdőrák: epidermális növekedési faktor receptor (*EGFR*) génből fölös kópia

Mellrák: HER2 gén (human epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa) túlműködik.

Fiatalkori Alzheimer kór kialakulása:

Amiloid prekursor protein génjének pontmutációihoz köthető típus: 21 kromoszómán (Down kórosakban is korai Alzheimer kór tapasztalható)

Preszenilin 1-es és 2-es enzimek génjeinek pontmutációi: 14-es és 1-es kromoszóma hosszú karján helyezkednek el, és ötvennél több pontmutációjuk ismert.

Az apoE4 allél, genetikai rizikótényező: A 19-es kromoszóma hosszú karján, az apoE molekula E4-es alléljának öröklése rizikótényező mind a korai, mind a késői AK formák esetében.

Egy nukleotidot érintő polimorfizmusok (SNPs: „snips”)

Leggyakoribb genetikai variáció.

A HGP része volt a humán genom variációinak a vizsgálata is.

Különbség egy bázispárban van. 1000 nukleotidonként 1 különbség fordul elő, 4-5 millió a genomban. Tipikusan gének közötti szakaszokban. Általában SNP-ről beszélünk akkor, ha a variáció populációs gyakorisága meghaladja az 1%-ot, bár manapság minden különbség lehet SNP.

Egy részük biológiai markerként viselkedik, egyes betegségekre utalhatnak, környezeti faktorokra, gyógyszerekre adott választ határozhatják meg.

Az összes SNP-nek 0,1%-a változtat meg aminosavkódot, ennek 40%-a non-konzervatív.

A többi SNP első ránézésre semleges, fenotípusos megjelenés szempontjából (betegségekre való hajlam, környezeti tényezőkre, gyógyszerekre való reagálás is) nem meghatározó, hogy az SNP változtat-e meg aminosavkódot vagy nem. Az utóbbi időben felfedezett betegségekhez kapcsolható SNP-k túlnyomó többsége nem változtat meg aminosavkódot.

Szekvenciavariációk (CNV: copy number variation)

2006 végén, ahogy egyre javultak a genom vizsgálati módszerei, rájöttek, hogy a genomban rengeteg kisebb-nagyobb méretű kópiaszám-variáció fordul elő.

Vannak olyan, 1000-től akár több megabázis nagyságú nukleotid szekvenciák, amelyek, ha a genomokat összehasonlítjuk, különböző kópiaszámban fordulnak elő.

Nincs olyan sok, mint az SNP-kből, azonban mivel nagyobb genomterületeket érintenek, összességében két ember között nagyobb variációért felelnek, mint az SNP-k.

A teljes genom kb 12%-át érintik ezek a variációk, és eddig 2900 gént találtak, amely érintett.

Ez azt jelenti, hogy egyes emberek különbözhetnek abban, hogy egy génből hány kópia található meg bennük. Az esetek többségében ez semmilyen látható tünetet nem okoz.

DE: skizofrénia, a HIV/AIDS hajlam, a Crohn-betegség, vesebetegségek, Alzheimer-kór vagy az obezitás CNV szerepe bizonyított.

A betegségek mellett pl. a transzplantációban is szerepet játszhatnak a CNV-k. Például, vannak populációs szinten is gyakori, egész géneket érintő deléciók. Ha a beültetést kapó szervezetből hiányzik egy gén, (expresszáló fehérje is), akkor a donorszervben megtalálható fehérje ellen immunválasz alakul ki.

Egypetájú ikrek:

Általánosan elfogadott, hogy az egypetájú ikrek genetikailag teljesen egyformák. Ezt a dogmát változtathatja meg az a felfedezés, hogy különbséget találtak a CNV-k tekintetében egypetájú ikrek között. Ez utóbbi azt is mutatja, hogy szomatikusan is keletkezhetnek, pl. a magzati fejlődés során.

A CNV-k kimutatása szempontjából fontos, hogy a CNV-k egy részénél található olyan SNP, amely kapcsoltnan öröklődik, azaz ezeknek a CNV-knek a kimutatásához elégséges a sokkal egyszerűbben kimutatható SNP-ket detektálni.

A CNV-ket is figyelembe véve egy ember két genomja (itt a két szülőtől kapott kromoszómakészlete) **átlagosan 0,5%-ban különbözik egymástól**, azaz a CNV-k körülbelül 4x akkora különbségért felelnek, mint az SNP-k. A különbség történelmileg régen elvált embercsoportok között akár a 3%-ot is elérheti. Ezek a különbségek egy része véletlenszerű mutációk révén alakult ki, a véletlen sodródás során halmozódhat fel lokálisan, másik részük kialakulásában viszont a **természetes szelekció** játszott szerepet. Ide tartoznak pl. a bőrszín, vagy az immunválaszt befolyásoló (baktériumok, vírusok által formált) genetikai variációk.

Genetikai variációk aránya különböző humán genomokban

	SNP-k száma	
J. Craig Venter genomja	3 213 401	
James Watson genomja	3 322 093	
Ázsiai genom	3 074 097	
Yoruban (afrikai) genom	4 139 196	
	Szerkezeti variánsok	Venter genomjában
	Darab	Hossz (bp)
CNV	62	8 855–1 925 949
Inzerció/delécio	851 575	1–82 711
Blokkszubsztitúció	53 823	2–206
Inverzió	90	7–670 345

A HGP után a HapMap projektek és az 1000 genom projekt járultak hozzá jelentős mértékben az emberi genom variációinak feltérképezéséhez.

Modern emberi genom fejlődése:

Neandervölgyi gének:

Közel-Keleten részben keveredett a neandervölgyi emberrel (1–4% gén)

A legtöbb neandervölgyi gén a modern emberek kb 2%-ban fordul elő. Néhány gén ennél jelentősebb százalékban, ezek gének valószínűleg elősegítették az alkalmazkodást az eurázsiai viszonyokhoz: bőrben a keratinocyták fejlődését sok neandervölgyi gén szabályozza. Ezek a gének a humán populáció 50%-ban is benne lehetnek. A neandervölgyi gének általában nem proteinekot kódoló gének, hanem szabályozó régiók.

Immunrendszerrel, autoimmun betegségeknél, bőr pigmentáció alakulásánál találtak leginkább neandervölgyi géneket. Metabolizmus kontrolljára utaló jelek is vannak.

Gyenyiszovai gének:

Pápua új-guineai és egyes szigeteken élők, ausztrál őslakosok, óceániaiak stb. a gyenyiszovai) emberrel keveredtek (4-6%)

Mintázatfelismerő receptorok (toll-like receptors) és egyéb immunfunkcióban szereplő géneknél találtak Gyenyiszovai géneket.

Speciális életkörülményekhez alkalmazkodott embercsoportok:

Gyenyiszovai gének segítik a hideghez és a magaslati levegőhöz történő alkalmazkodást: eszkimókban a zsírszövet elhelyezkedését kontrolláló géneknél találtak gyenyiszovai géneket, a tibetiek közül mindenki aki nagy magasságban él hordoz egy speciális gyenyiszovai gént.

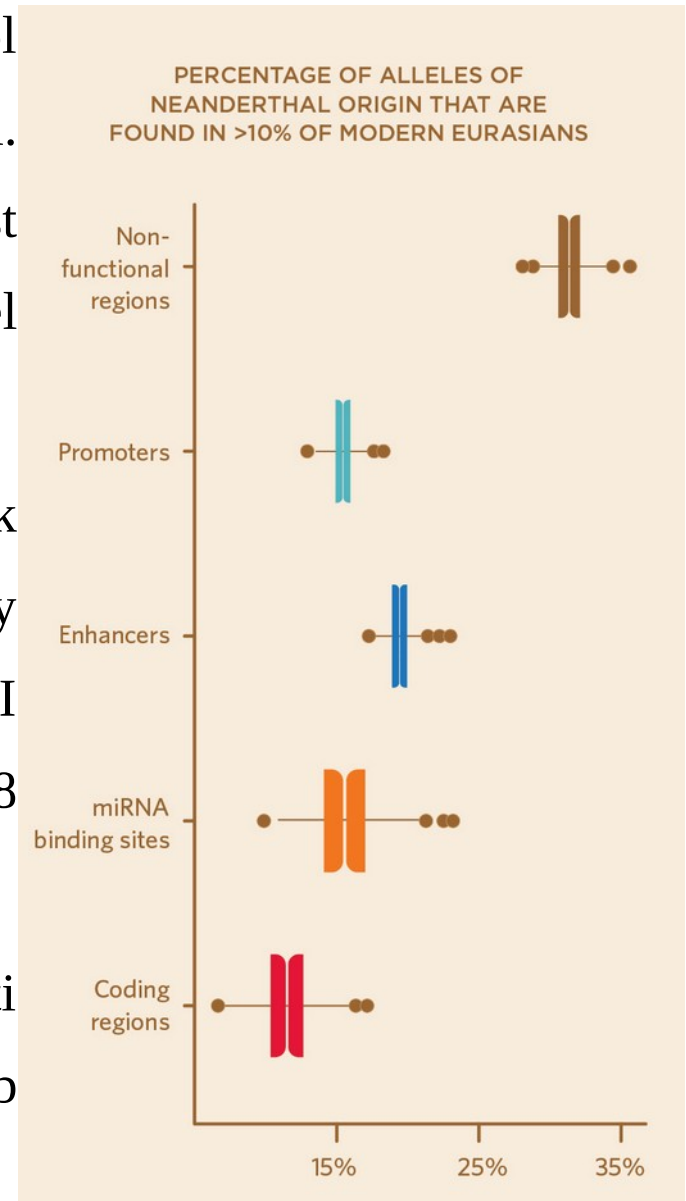
melanézok, mindkét populációtól hordoznak genomnyomokat, genomjuk kb. 8%-ában.

Afriakaiak egy részében is találtak Neandervölgyi géneket: egy csoport Eurázsiaából visszavándorolt Afrikába.

Jelentőség: HLA allélek 50%-a archaikus embertől származik, patogének felismerésének esélyét növeli. (Patogének egy generáció alatt jelentős mértékű pusztítást végezhetnek, nemmeglepő, hogy az immunrendszerrel kapcsolatban találtak leginkább archaikus géneket.

A variációk és a gének száma szempontjából kiemelkedik az emberi genom 6p21.3 régiójában található MHC (vagy HLA) régió. Ennek a genomterületnek az ún. class III régiójában található a legnagyobb génsűrűség (58 expresszálandó gén), és nagyfokú diverzitás.

4 Mb-nyi régiójában 37 ezer SNP-t és 7 ezer szerkezeti variánst találtak, ami kb. egy nagyságrenddel nagyobb variációsűrűség, mint a genom többi részén.



A Humán Variom Projekt

A különböző egyénekből származó változékony DNS szekvenciák összegyűjtése az orvostudomány számára, a személyre-szabott orvostudomány (personalized medicine) segítésére.

Ennek koncepciója, hogy az emberek közötti különbségek miatt hatékony gyógyítás egyéni gyógymódokkal lehet.

Ehhez ismerni kell a gyógyítás szempontjából fontos genetikai variációkat, gyógyszert kell rá fejleszteni. (Ehhez alapvetően át kell alakítani a gyógyszerkifejlesztés és engedélyezés jelenlegi gyakorlatát, klinikai tesztelési fázisát).

Az 1000 genom projekt

nagyszámú egyén DNS-ének szekvenálása, deklaráltan az ember genetikai változékonyságának megismerése céljából. A projektet 2010-ben fejezték be.

Ma már a nagyobb volumenű genom projektek futnak: Nagy-Britannia százezer, az USA és Kína 1-1 millió emberi DNS megszekvenálásba kezdett bele.

A gének szerkezetének ismerete – a betegségek felismerése és gyógyítása

Molekuláris medicina:

Egyénre szabott terápia biztosítása

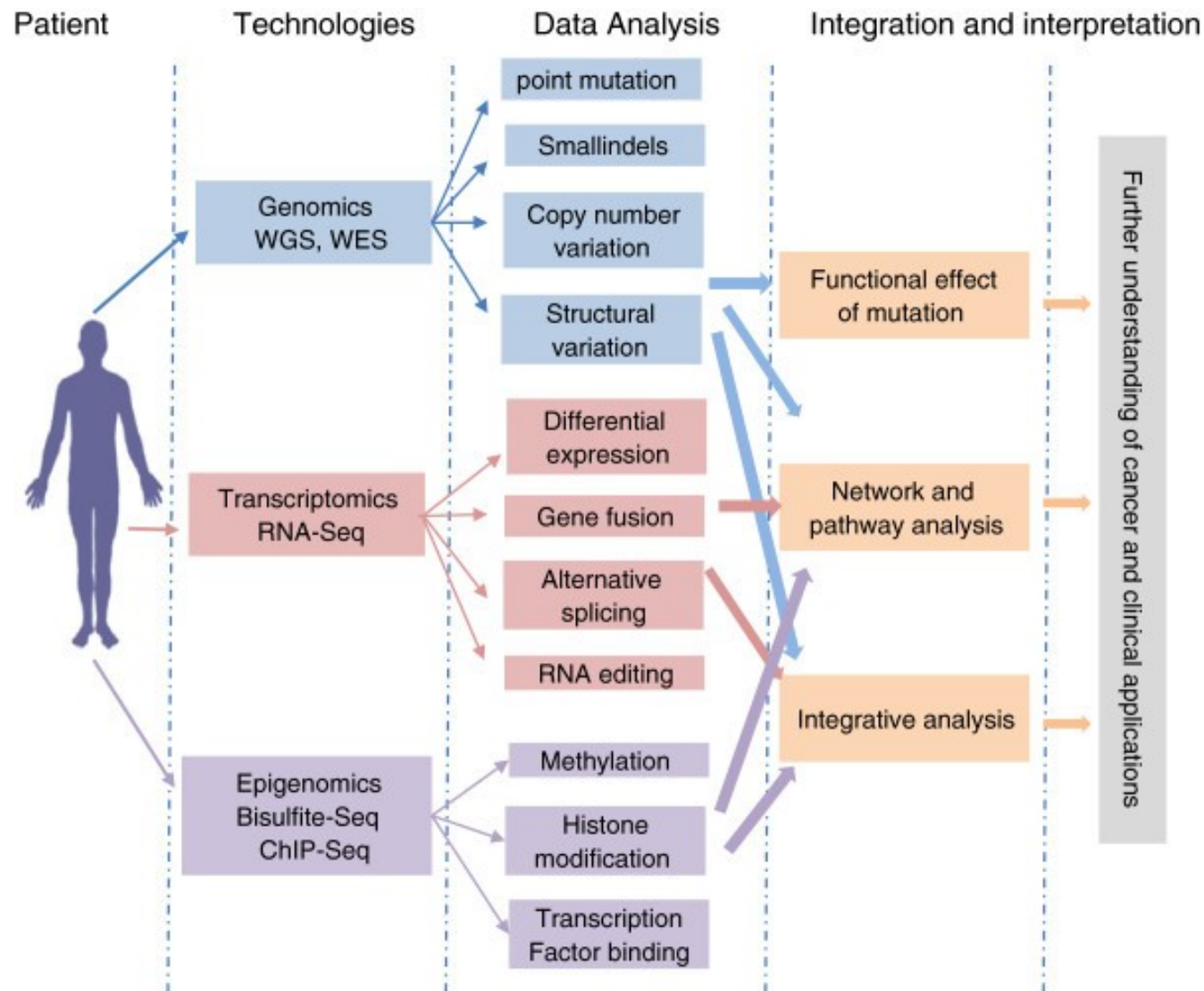
Megelőzés előtérbe kerülhet: hajlamok feltárása

Pontos diagnózis: betegségekben létrejött mutációk kimutatása

Korlátok:

1. A gén szerkezetéből nem vezethető le a gén működése, csupán a kódolt fehérje elsődleges szerkezete. A gének szerkezetében alig van különbség az emlősfajok között. A fenotípusbeli különbségekért elsősorban gének működésbeli különbségei felelősek.
2. Nem minden betegség genetikai betegség.
3. Genetikai betegségeknel lehet néhány vagy nagyon sok mutációtípus is. Az utóbbi térképezése elég nehéz.

4. A gének szabályozó régióiban történő változékonyság jelentőségét jelenleg alig ismerjük, azt sem tudjuk, hogy egy adott szekvencia részt vesz-e a génkifejeződés szabályozásában. Nem elegendő a bázissorrend ismerete, tudnunk kell, hogy egy-egy változás a DNS-ben milyen szerepet játszhat egy adott betegség kialakításában. Jelenleg génexpressziós vizsgálatok folynak (nem szekvenálás), az érintett szövetek (mRNS és/vagy fehérje tartalmát) vizsgálják.
5. Nem egyértelmű a gének és a környezet kapcsolata: a környezet a gének kifejeződésére hat, ez az információ azonban nincs benne a DNS bázis sorrendjében. A környezeti hatások sok esetben a DNS metilációra és a hisztonok kémiai mintázataira hatnak, ezzel a génkifejeződést szabályozzák.



WGS: whole genome sequencing

WES: whole exome sequencing

Small indels: small insertions and deletions

ChIP Seq: method for identification of regulatory elements in the genome. It combines chromatin immunoprecipitation (ChIP) with parallel DNA sequencing to identify the binding sites of DNA-associated proteins.

Bisulfite-Seq: determination of DNA methylation

Valójában betegségekben a fehérjék összekapcsolt hálózata változik egyszerre, a sejt áthangolódik, és másképp kezd működni – ezeket a funkcionális interakciós hálózatokat vizsgálja a proteomika.

Hamar kiderült, nem az az igazán érdekes, hogy milyen fehérjék vannak egy sejtben, hanem az, hogy ezek mennyisége, aránya hogyan változik egy adott behatásra, egy adott állapotváltozás, öregedés, betegség, gyógyszeres kezelés kapcsán.

Ma egy 2 mm³-es szövetmintából 4–5 ezer fehérjét tudunk kimutatni, és a '90-es évek második felében kifejlesztett differenciál-gélelektroforézis révén a változásokat is nyomon tudjuk követni.

Irodalom:

Neanderthal DNA in Modern Human Genomes Is Not Silent<https://www.the-scientist.com/features/neanderthal-dna-in-modern-human-genomes-is-not-silent-66299>

The nervous system of amphioxus: structure, development, and evolutionary significance. <https://doi.org/10.1139/z04-163>

Origin and evolution of the chordate central nervous system: insights from amphioxus genoarchitecture. *Int. J. Dev. Biol.* 61: 655 - 664 (2017)
doi: 10.1387/ijdb.170258jg

Chial, H. (2008) DNA sequencing technologies key to the Human Genome Project. *Nature Education* 1(1):219

Collins, F. S., & Fink, L. (1995). The Human Genome Project. Alcohol health and research world, 19(3), 190–195.