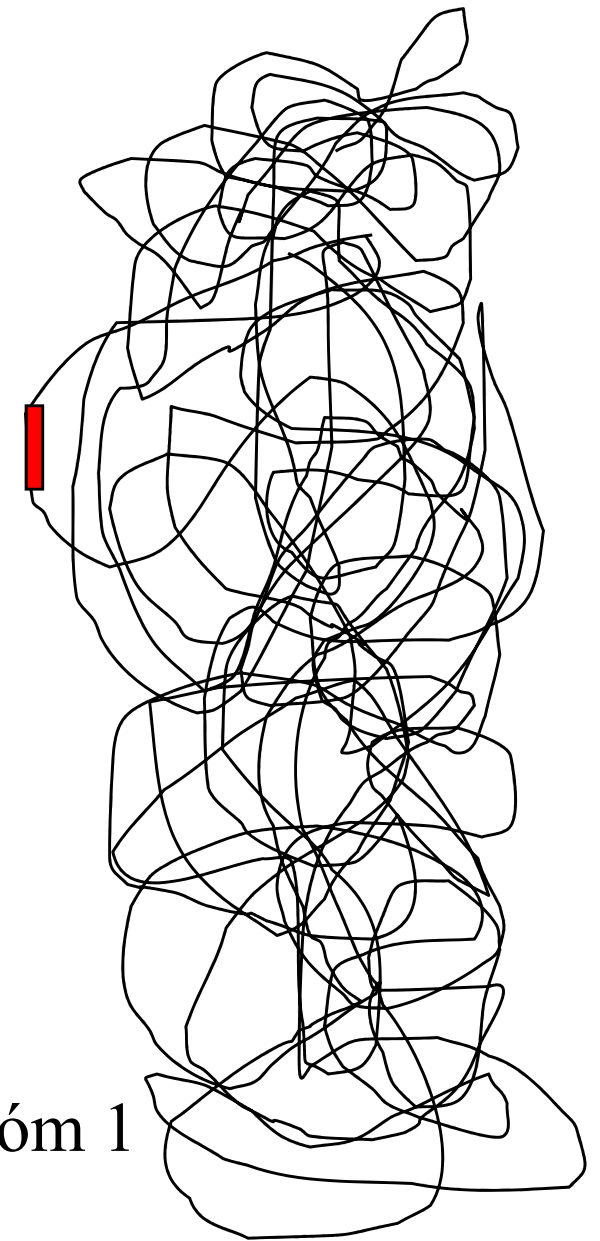


Literatura

- **Microsatellites: Evolution and Applications. Goldstein & Schlötterer (eds.) 1999**
- **single locus markers**



Pr.: chromozóm 1

Mikrosatelity

- VNTR („variable number of tandem repetitions“), SSR („simple sequence repeats“)
- jednotlivé alely se liší délkou

TTCAGGCACACACA**TCTCTAGCTTCGA**

27 bp

TTCAGGCACACA**TCTCTAGCTTTGA**

25 bp

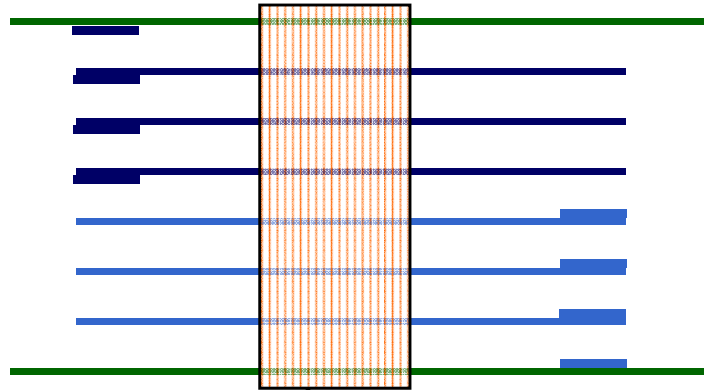
genotyp diploidního jedince: **25/27**

Mikrosatelity

- 1-6 bp motiv
- početné po celém genomu
- vysoká úroveň polymorfismu (běžně 15 alel v populaci)
- Mendelovská dědičnost (autosomy) - kodominance
- ideální pro studium populační struktury a příbuzenských vztahů

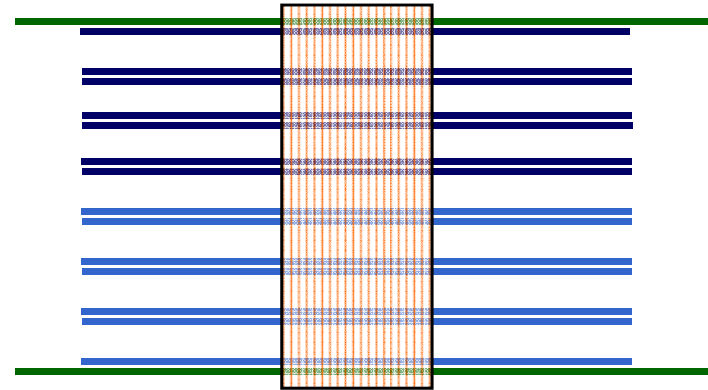
PCR – namnožení úseku DNA určeného primery

Ochlazení – nasednutí primerů

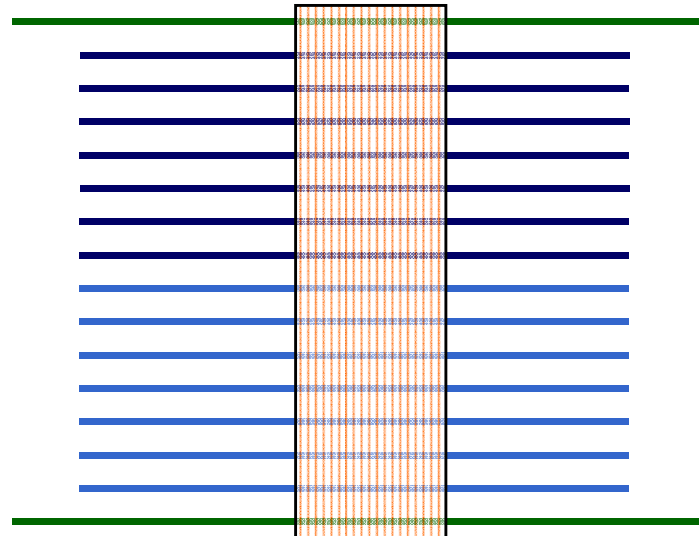


repetitivní
DNA

72°C vznik nových fragmentů

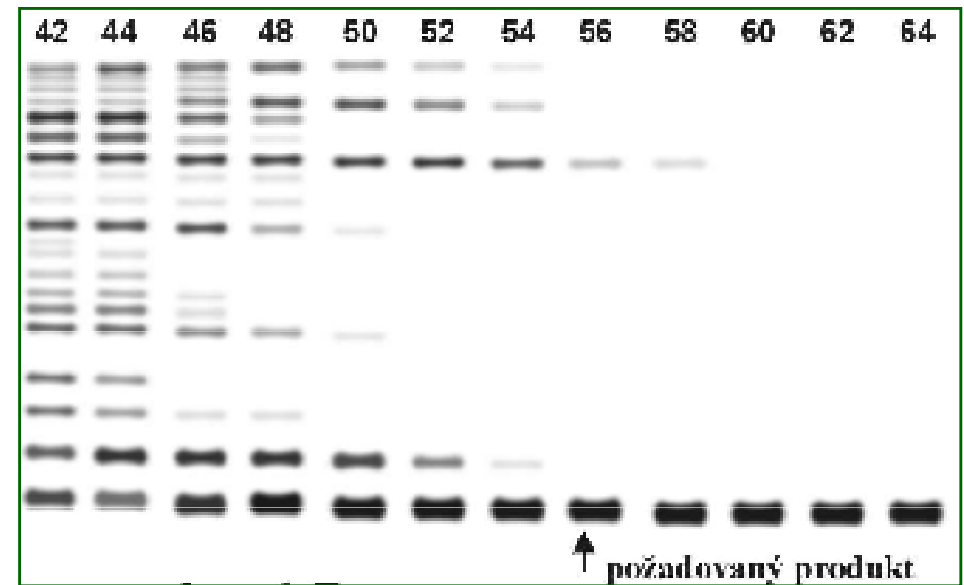
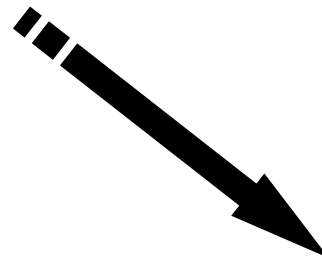
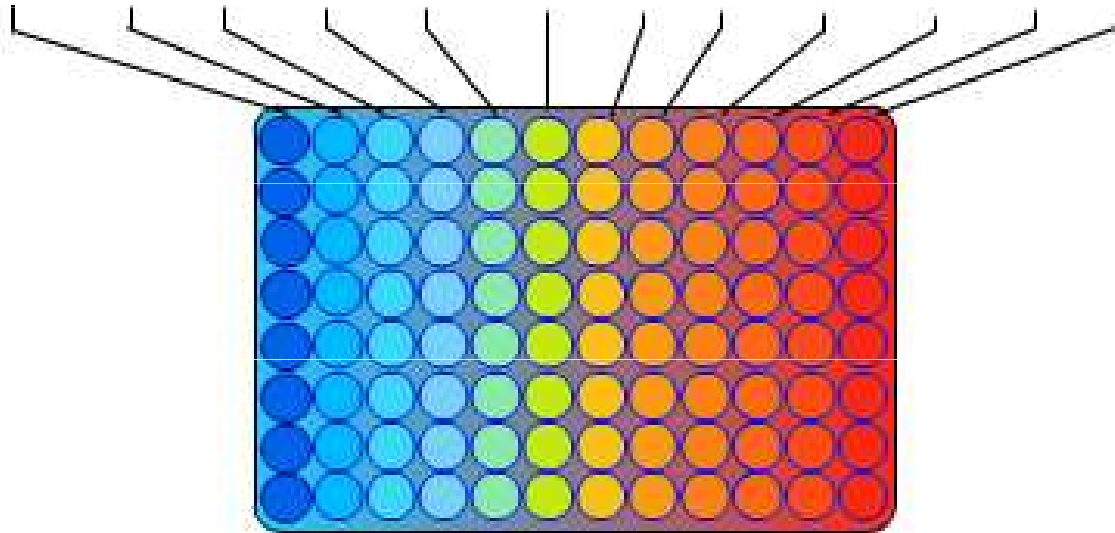


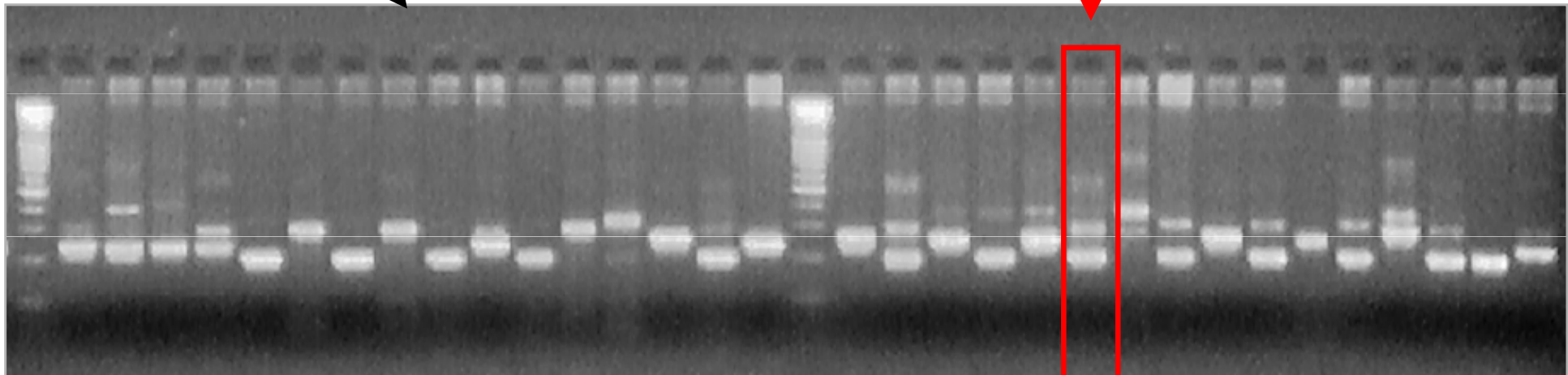
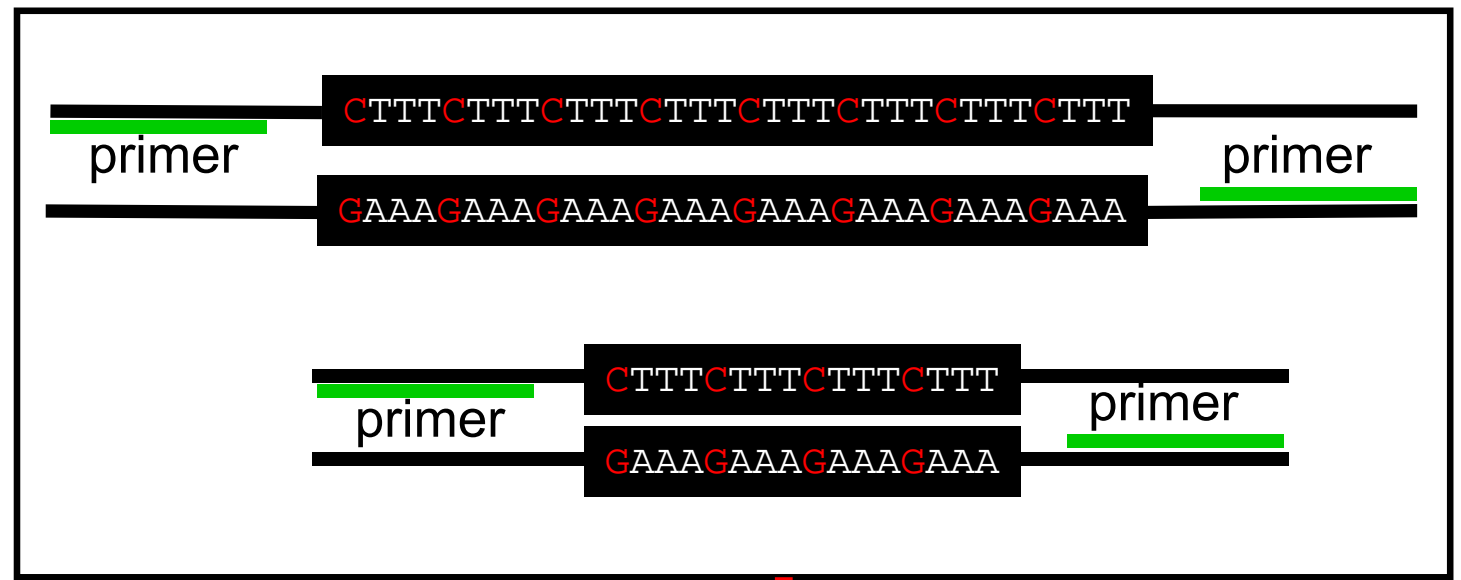
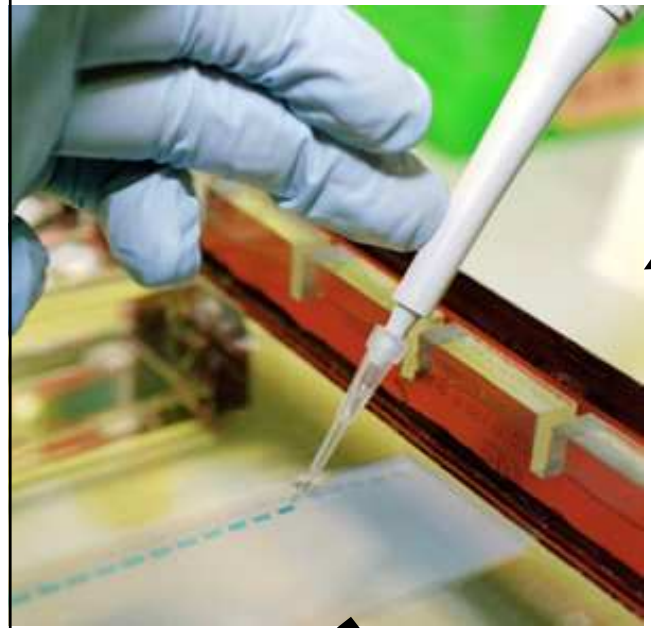
95°C denaturace



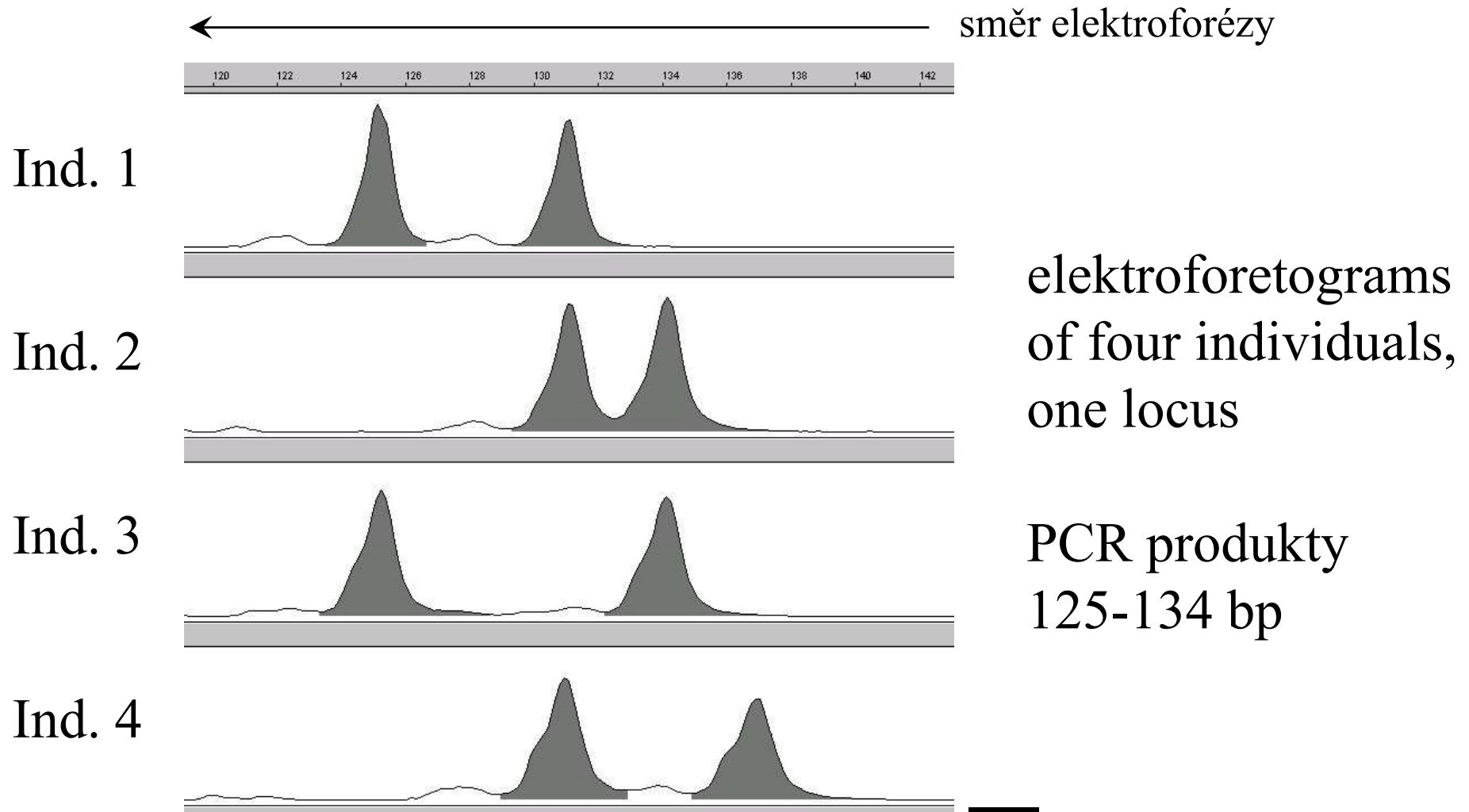
Gradient teplot pro nasednutí primerů

42	42.7	43.8	45.7	48.2	51.4	55.2	58.3	60.7	62.2	63.6	64
col 1	col 2	col 3	col 4	col 5	col 6	col 7	col 8	col 9	col 10	col 11	col 12





Kapilární elektroforéza ~ Fragmentační analýza



elektroforéza:



agaróza (20 bp) → PAGE (4 bp) → kapilára (1 bp)

Mikrosatelity - omezení

- nalezení lokusů (navržení primerů) je pracné a nákladné u volně žijících druhů (genomová knihovna, klonování, screening, sekvencování)

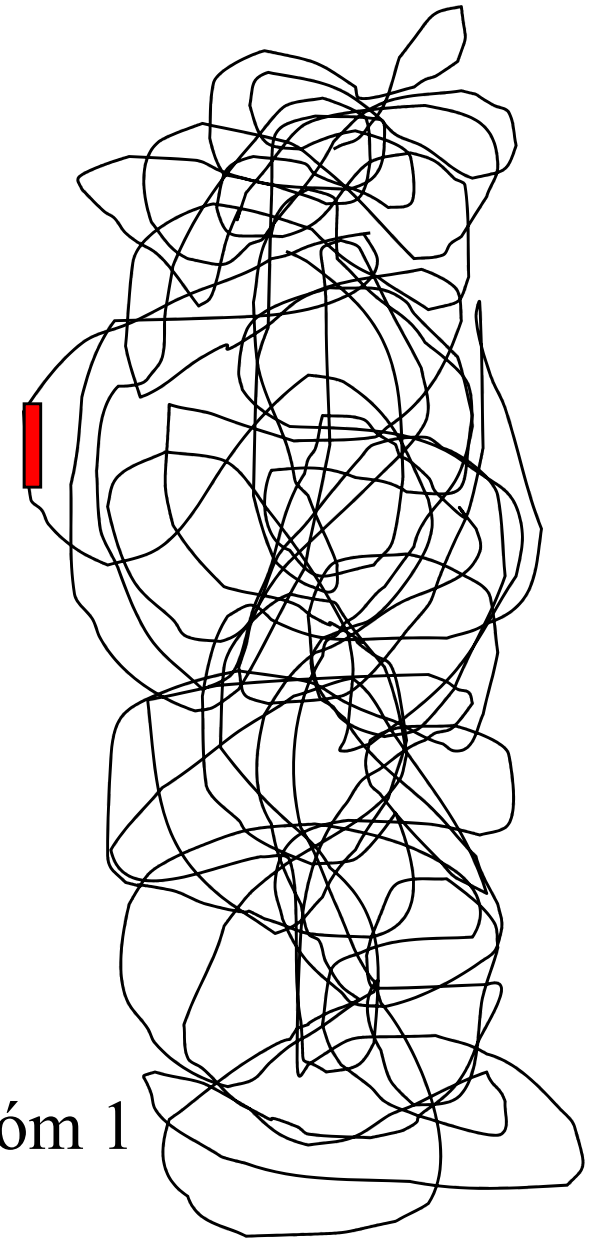


TTCAGGCACACACAATCTCTAGCTTCGA

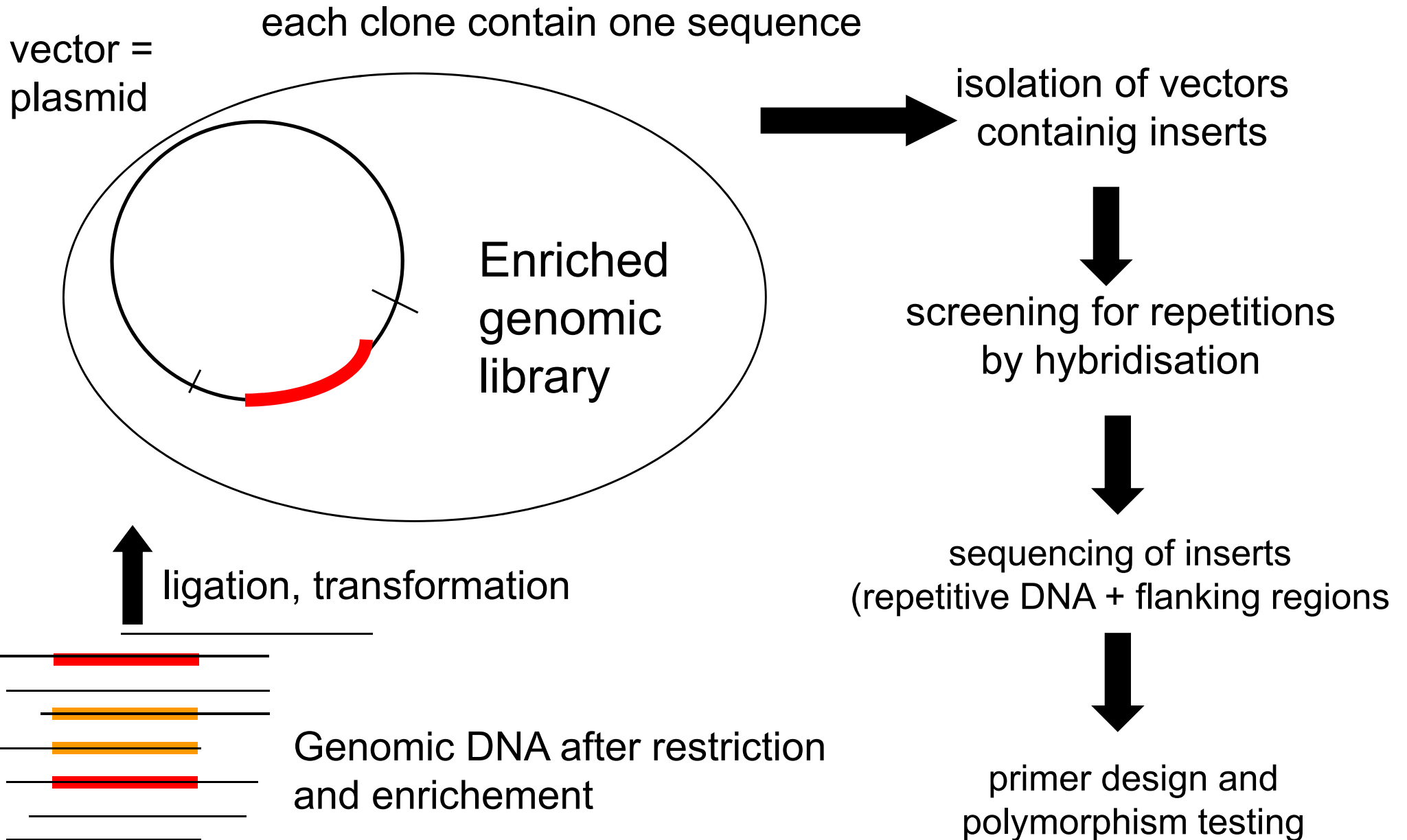


„flanking regions“ – ohraničují repetici a zde musí být navrženy primery pro PCR

Př.: chromozóm 1

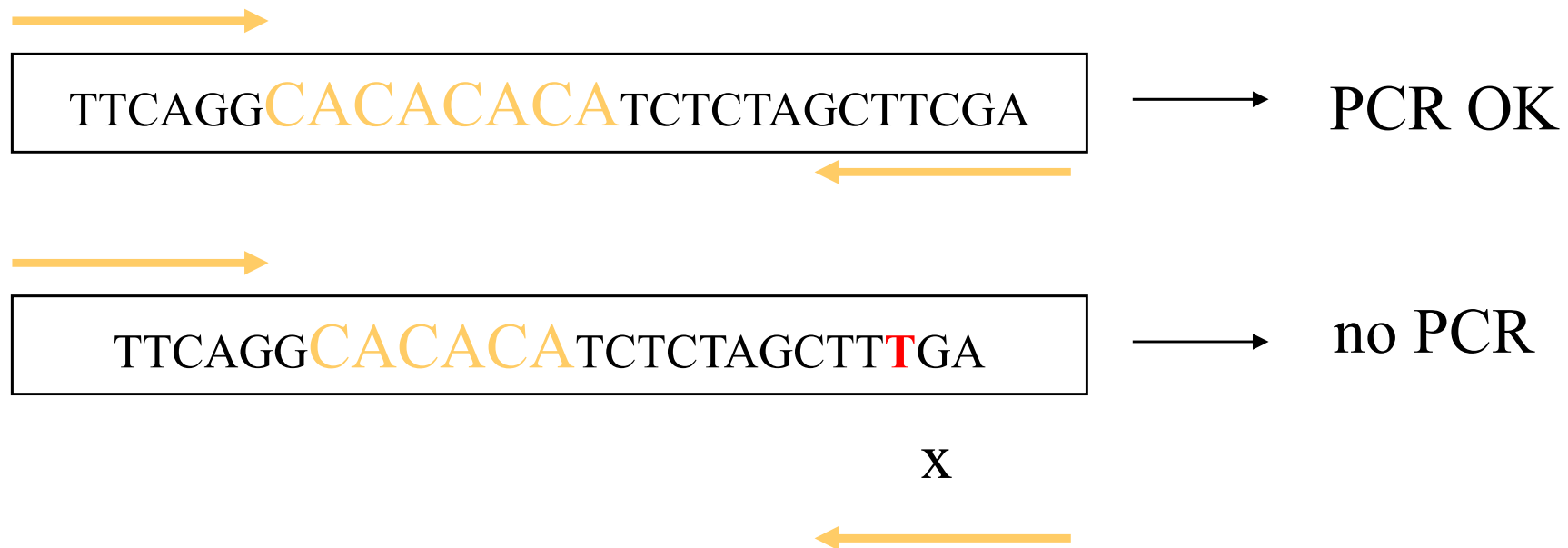


Restriction, enrichment, cloning, and sequencing



Mikrosatelity - omezení

- „cross-amplification“ – úspěšnost klesá s fylogenetickou vzdáleností
- nulové alely (mutace v primerových sekvencích) → vyšší proporce „homozygotů“



Velikost alel a evoluce mikrosatelitů

- identita alel (stejně x různé) vs. rozdíl délek alel (tj. počet opakování)?
- Indikují podobně dlouhé alely na jednom lokusu bližšího společného předka než alely rozdílných délek?

Rodiče nepříbuzní



Rodiče příbuzní



- → k zodpovězení je nutno znát něco o evoluci mikrosatelitů (tedy jak vznikají nové alely)

Teoretické mutační modely

Dva extrémy

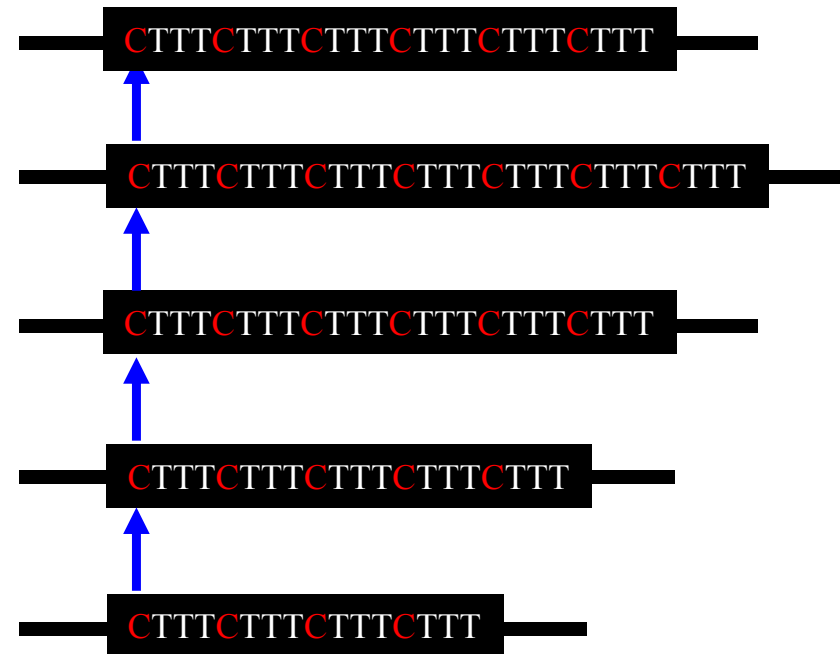
- **IAM – infinitive allele model**

(Při mutaci ztráta nebo získání libovolného počtu opakování. Vzniká nová alela, která doposud v populaci nebyla)



- **SMM – stepwise mutation model**

(Mutace způsobeny pouze ztrátou nebo získáním jediného opakování motivu. Mutací může vzniknout alela, která je již v populaci přítomna)



Další modely

- **TPM – two phase model**

(ztráta nebo zisk X opakování, při $X=1$ získáme SMM)

- **K-allele model**

(V populaci je přesně K myslitelných alel. Alela s konstantní pravděpodobností mutuje ke stavu jedné z $K-1$ dalších alel.)

- A další...

Indels

- inzerce nebo delece 1bp či delších úseků – použití pouze pro modely vyžadující „identity“

TTCAGGCACACACA TCTCTAGCTTCGA

27 bp

SMM model – možno kvantifikovat podobnost alel

TTCAGGCACACACA CA TCTCTAGCTTCGA

29 bp

TTCAGGCACACACA TCTC G TAGCTTCGA

28 bp

TTCAGGCACAC GACA TCTCTAGCTTCGA

28 bp

„Indels“ – pouze pro analýzy, kde je vyžadována „identity“ a nikoliv podobnost

TTCAGGCACACCA TCTCTAGCTTCGA

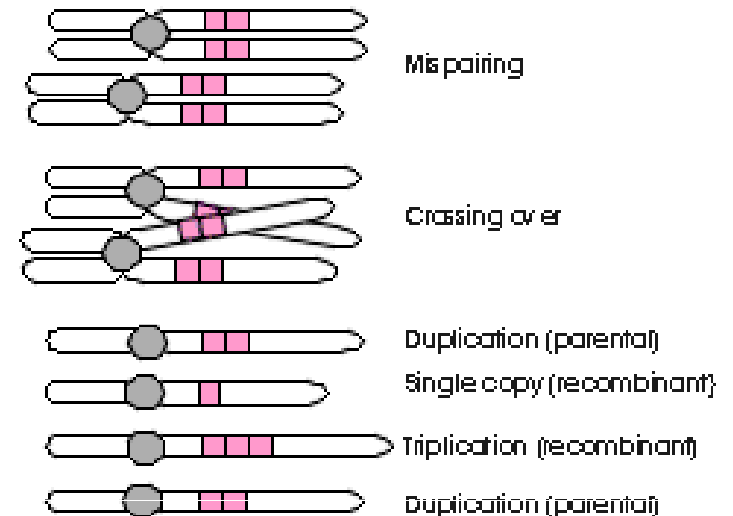
26 bp

TTCAGGCACACACA TCTCTAGTTCGA

26 bp

Proč je tolik alel? (microsatellite instability)

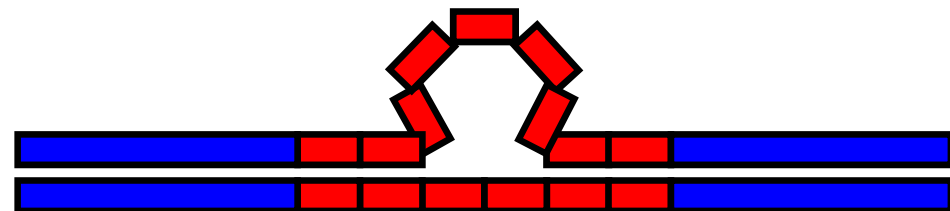
- **Nerovnoměrný (Unequal) crossing-over**
(díky špatnému alignmentu)



- **Sklouznutí polymerázy při replikaci**

Slip-strand mispairing

(při replikaci nejprve polymeráza sklouzne a vyrobí odlišný počet opakujícího se motivu mikrosatelitu, při alignmentu je pak část opakování vykloněna mimo dvoušroubovici, flanking regions tedy párují)



Opravné mechanismy

■ 1. Proofreading

(Kontroluje se párování bazí těsně za replikační vidlicí, klíčky vytvořené při SSM nejsou ve větší vzdálenosti rozpoznány)

- Zřejmě má jen malý vliv
- Má šanci ovlivnit jen mikrosatelity s krátkým motivem (1-2 bp) a s malým počtem opakování

■ 2. Mismatch repair

- Větší efekt
- Klíčová role při udržování stability mikrosatelitů
- Opět záleží na délce motivu (delší změny jsou hůř rozpoznány)

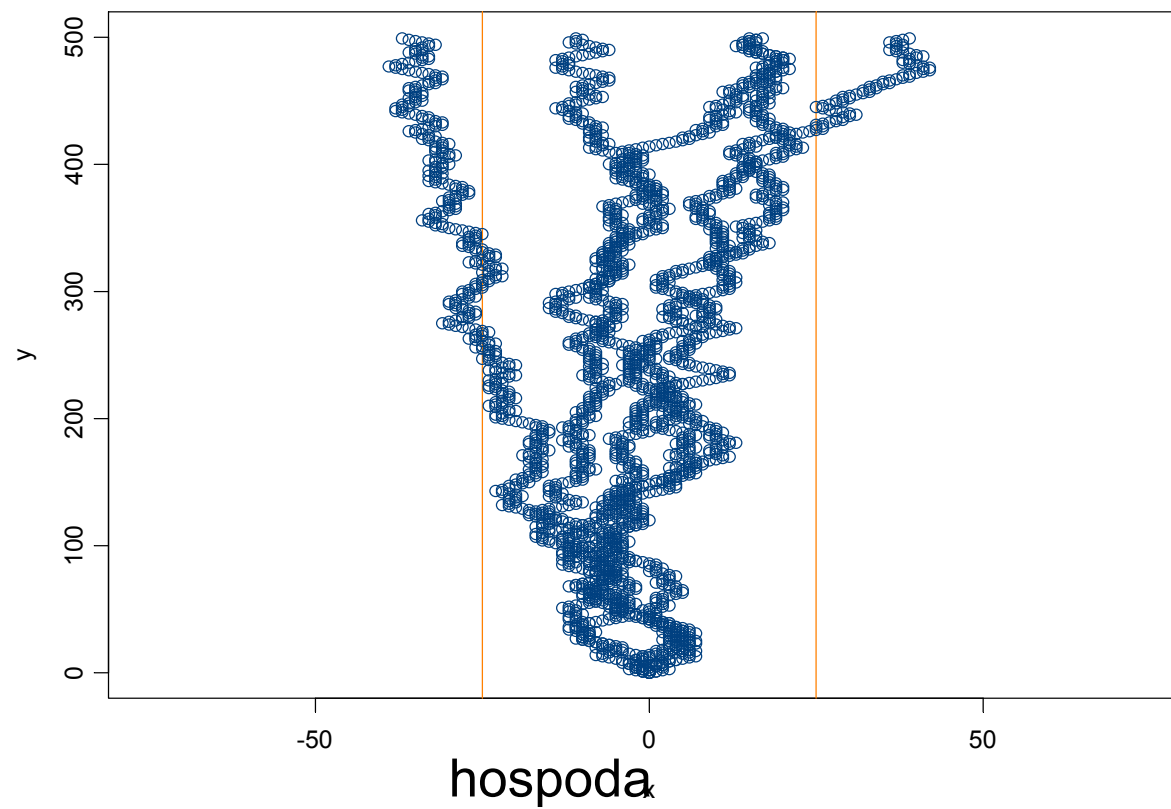
Brownův pohyb

- Simulace náhodné evoluce mikrosatelitů
- Pohyb opilého námořníka Browna po molu
- 1 krok vpřed
- 1 krok náhodně vlevo nebo vpravo
- Výchyvky od rovného směru se postupně zvětšují
- Dlouhé molo → pravděpodobný pád do moře



Výsledek 5ti pokusů opilého Browna dojít od hospody k majáku.

maják



Aplikace na evoluci mikrosatelitů

- Krok **vlevo** – **ztráta** jedné repeat unit
Krok **vpravo** – **nabytí** jedné repeat unit
- Náhoda → Random walking (Brownův pohyb)
Náhodné přidávání a odebrání jednotek opakování
- → vede k neúměrnému prodloužení či zkrácení
- Proti tomu svědčí častý výskyt stejných mikrosatelitových lokusů u příbuzných druhů
- → **proces prodlužování a zkracování asi není zcela náhodný**

Bias (skutečná data)

- **Kratší mikrosatelity** (s malým počtem opakování motivu) mají zřejmě tendenci se spíše prodlužovat (slabě převládají adice nad delecemi)
- **Delší mikrosatelity se spíše zkracují** (náchylnější k velkým delecím)
- **Delší mikrosatelity rychleji mutují** (díky více opakováním je vyšší pravděpodobnost pro SSM – mají více alel)

Závěr

- Mechanismy evoluce mikrosatelitů stále nepříliš objasněny
- Stepwise mutation model SMM platí jen omezeně
- = nevýhoda v populační genetice
- = tolik nevádí při identifikaci jedinců a analýzy příbuznosti (paternity)