

Polymorfizmus ľudskej DNA

- Definícia genetického polymorfizmu
- Typy polymorfizmu DNA (SNP, RFLP, VNTR, STR, indel ...) a rozloženie po genóme
- Metódy detekcie
- Mechanizmy vzniku a mutačné početnosti
- Polymorfizmus mtDNA a Y-chrom. DNA
- Polymorfné haplotypy a haplotypové bloky
- Praktické využitie

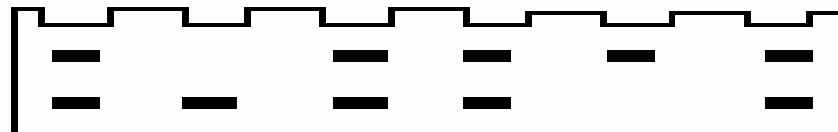
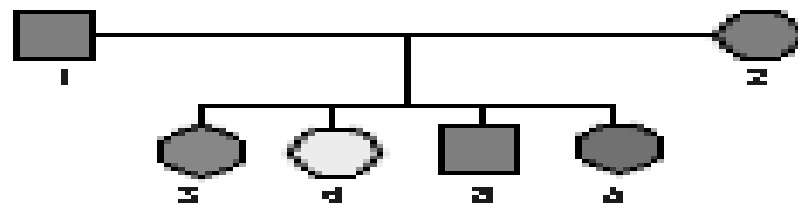
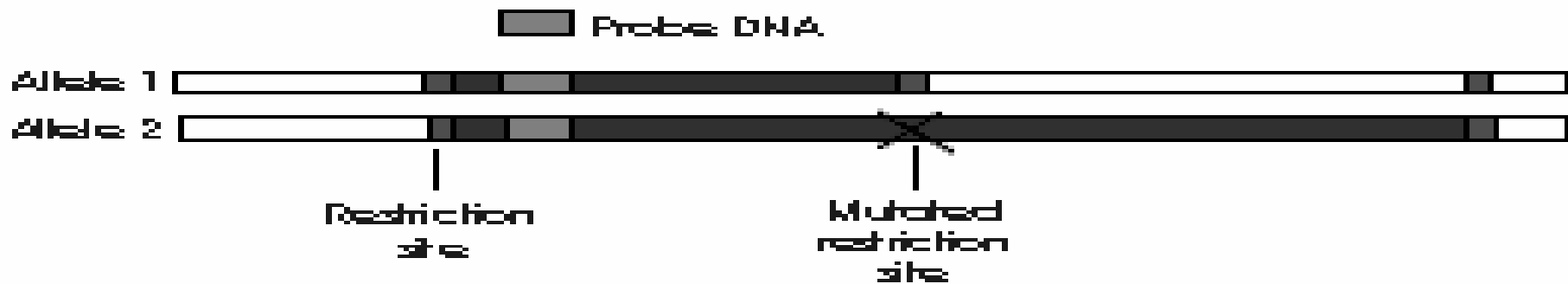
Genetický polymorfizmus

- Definícia (Ford): Geneticky podmienený znak s najmenej dvomi diskontinuitnými variantmi v jednej populácii, pričom početnosť zriedkavejšieho variantu je vyššia ako 1% (arbitrárne číslo)
- Vylučuje: negenetické znaky, kontinuálnu variabilitu, polytypizmy, zriedkavé znaky (dedičné choroby)
- Typy polymorfizmu:
 - morfológický
 - funkčný
 - serologický
 - biochemický
 - DNA: je najčastejší, lebo väčšina polymorfizmov DNA nemá fenotypový prejav

Typy DNA polymorfizmov

- Bodový polymorfizmus (substitúcie jednotlivých báz; SNP)
- Variabilný počet tandem. repetícií
 - mikrosatelity (STR)
 - minisatelity (VNTR)
 - makrosatelity
- Prítomnosť/neprítomnosť sekvencie (Alu, L1 a i.) na špecifickom mieste (indel)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

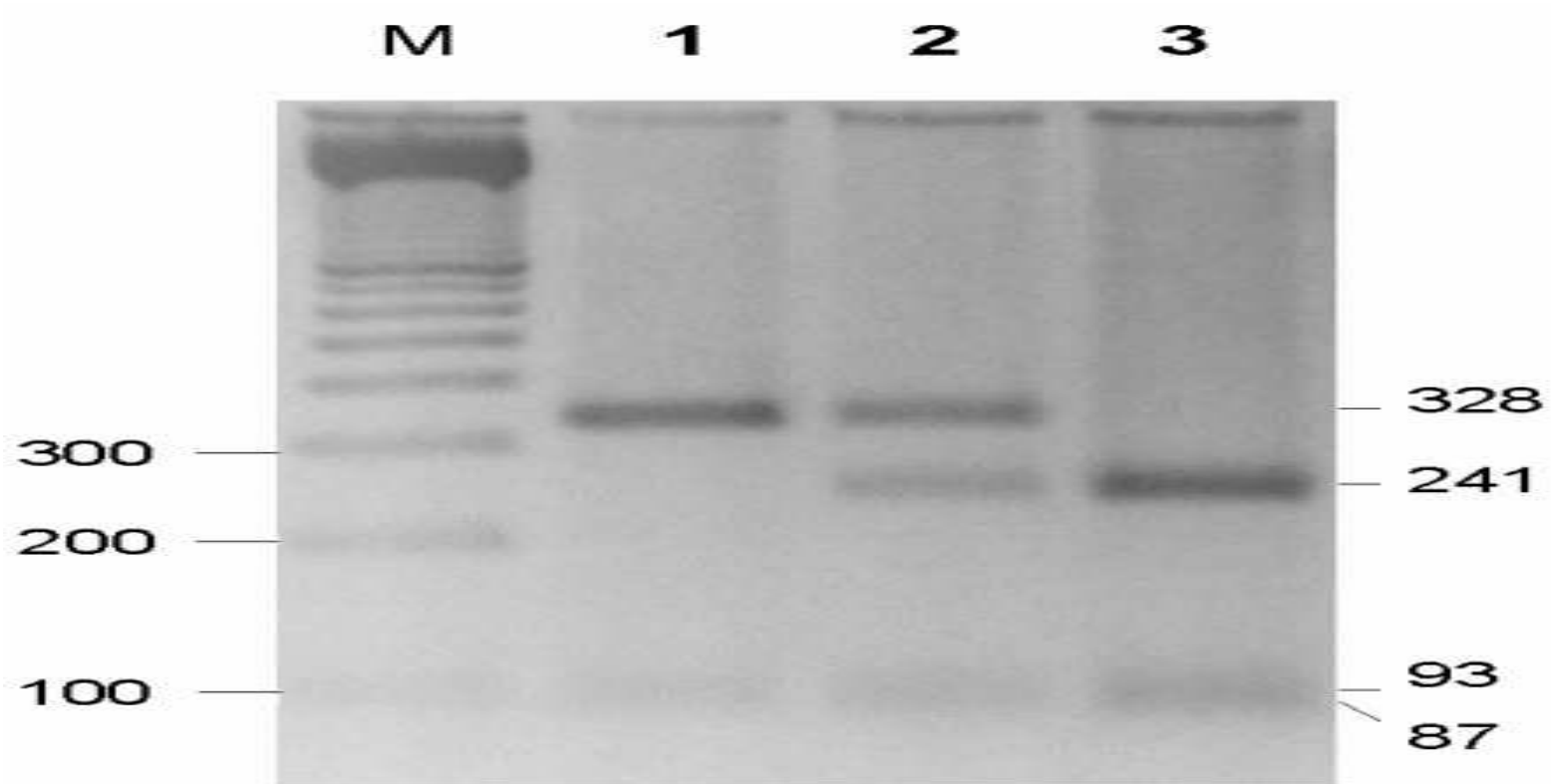


Individual

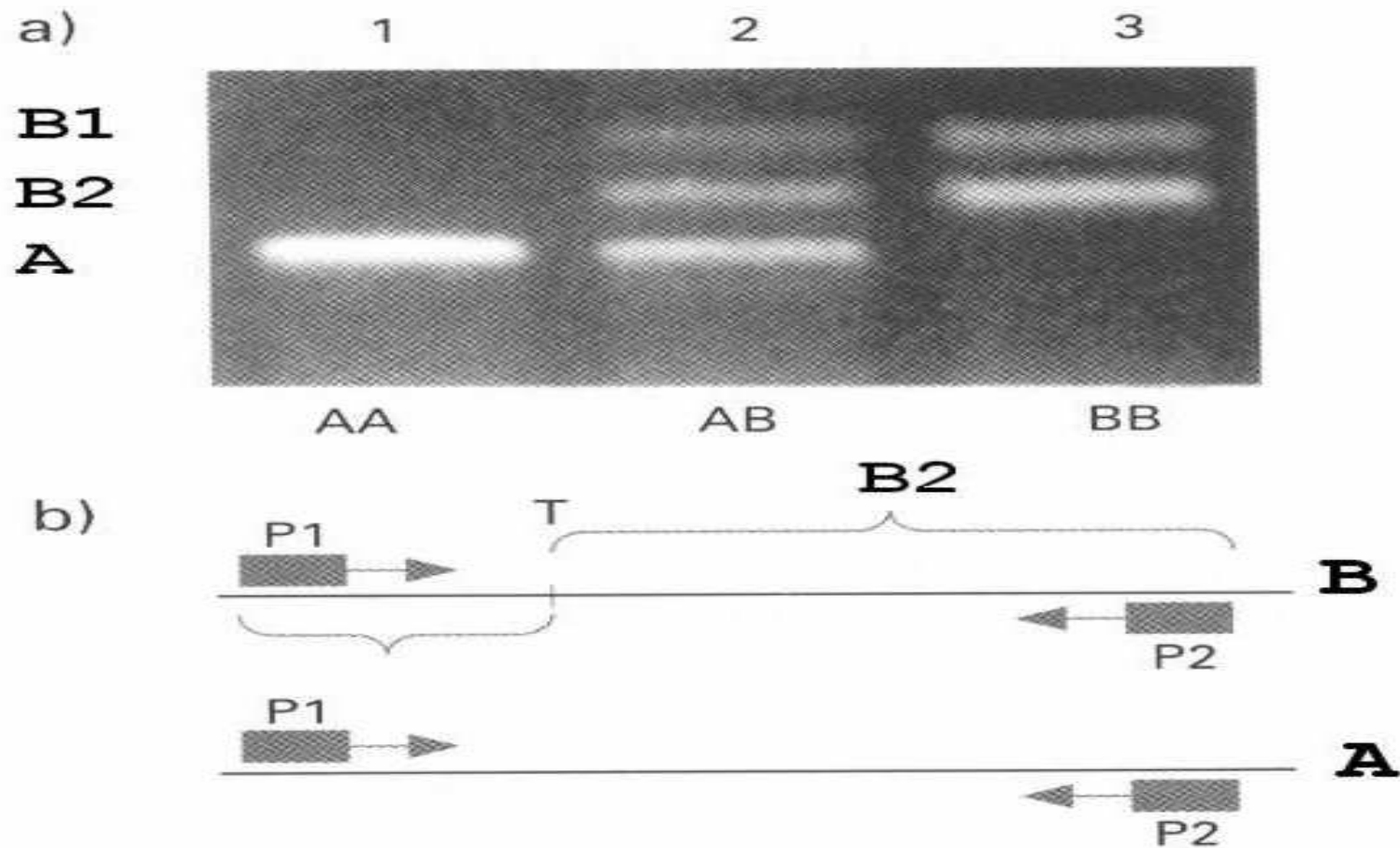
Genotype

1	3	4	5	6	2
$\frac{A1}{A2}$	$\frac{A1}{A1}$	$\frac{A1}{A2}$	$\frac{A1}{A2}$	$\frac{A2}{A2}$	$\frac{A1}{A2}$

Restriction Fragment Length Polymorphism



Detekcia RFLP pomocou PCR + RE



Polymorfizmus typu VNTR - minisatelity

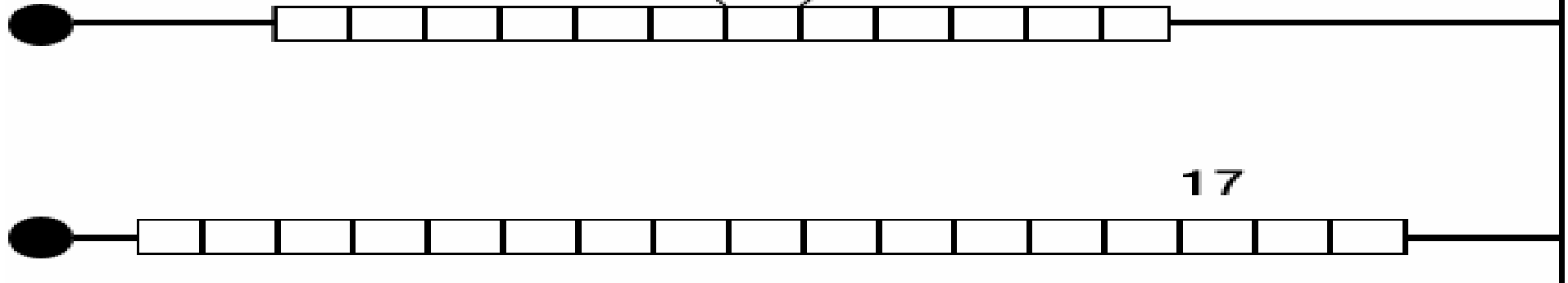
VNTR

Repeat Length
17-40 bases

... ACAGGGGTGTGGGG ...

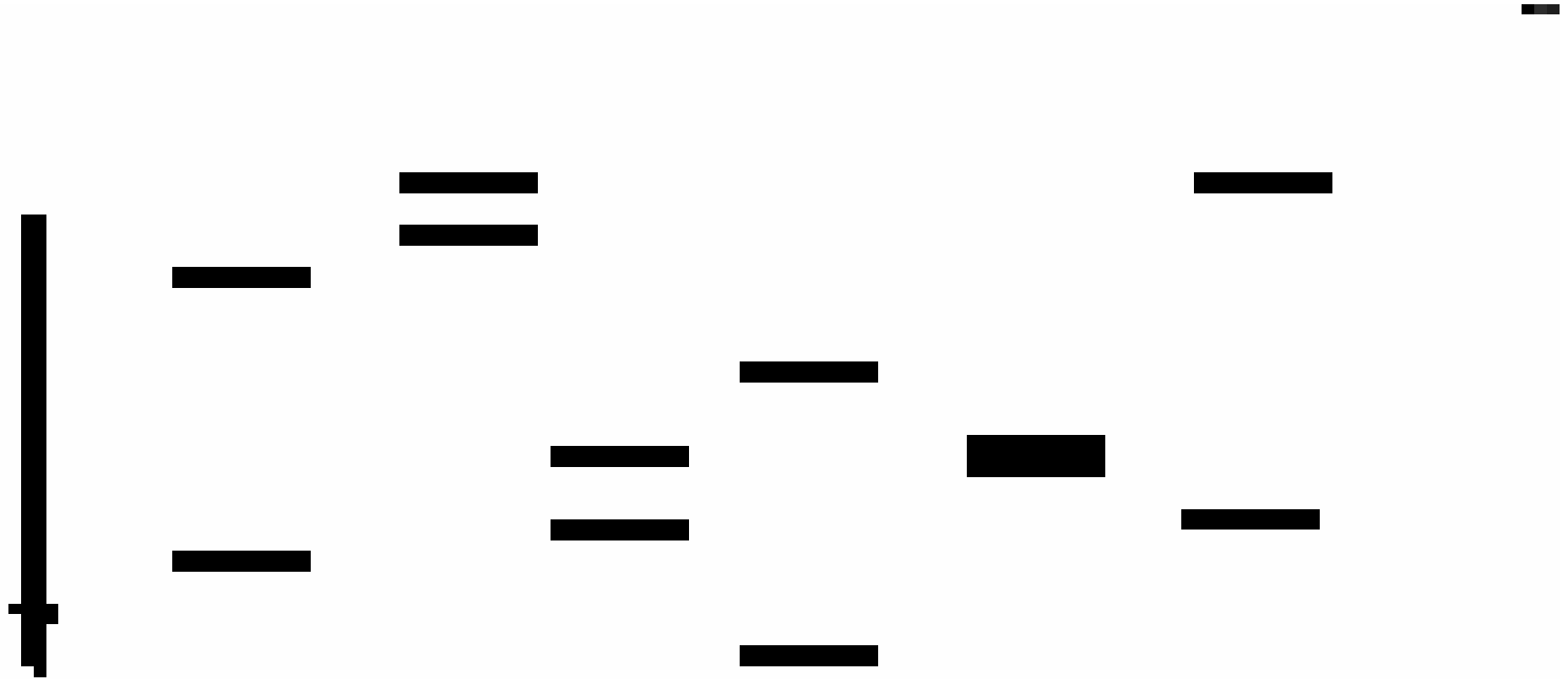
12

17

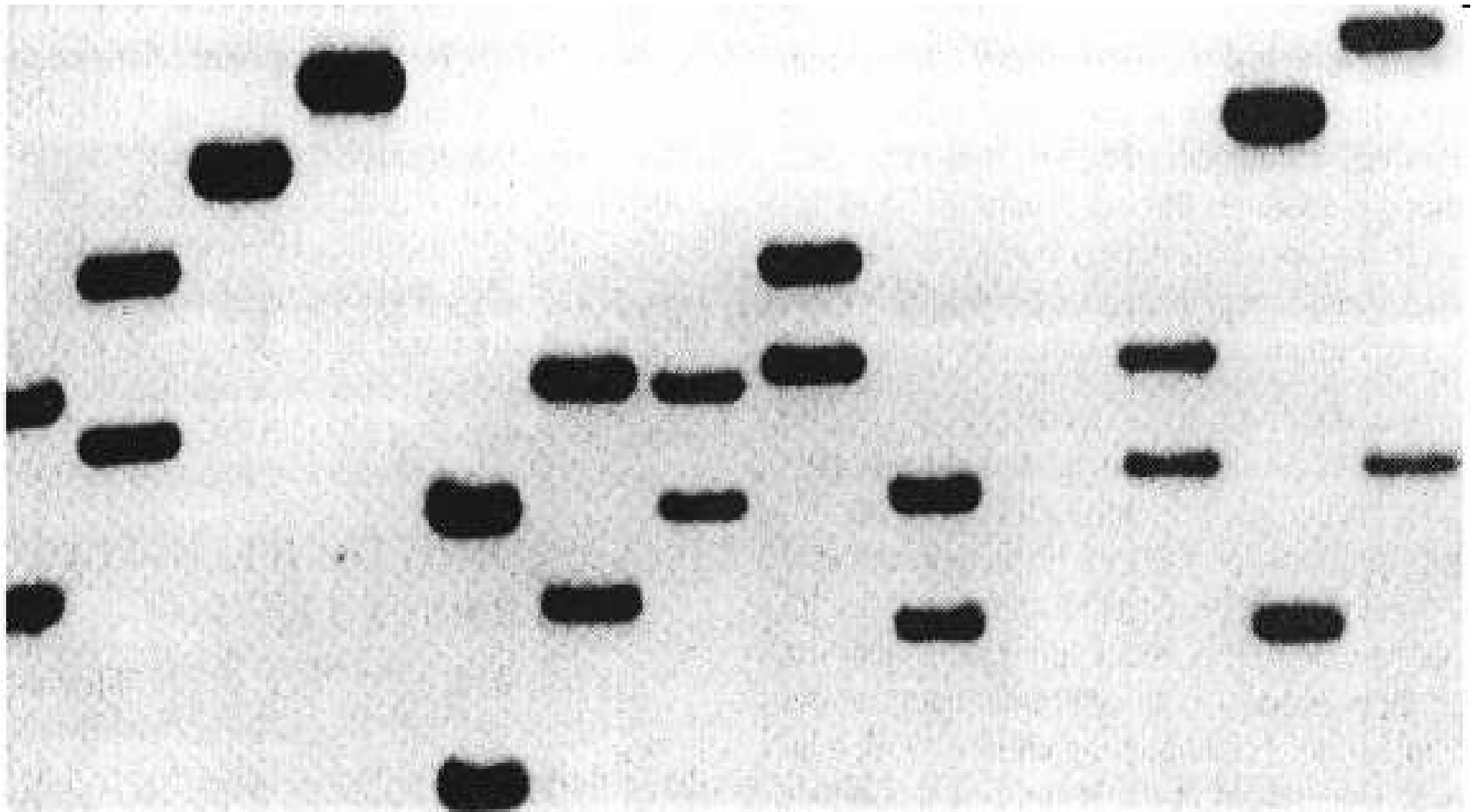


VNTR – minisatelity

variabilita v populácii



VNTR (minisatelite) – variabilita v populácii



Minisatelite

- Dĺžka základnej repetície >6bp
- Počet opakovaní repetície 10 – 100 (1000)
- Výskyt preferenčne v telomérických oblastiach (najmä bohaté na GC páry)
- Odhadovaný počet: rádovo 10^3
- Jednoduchá detekcia: Southern, PCR
- Vznik nových alel: nehomologický c-o
- Mutačná frekvencia: vysoká, až 10^{-2}
- Využitie: obmedzené; individuálna identifikácia
- Biologický význam: neznámy, asi selfish DNA
- Špec. prípad: minisatelit (TTAGGG)_n - teloméry

Mikrosatelity

STR: Short Tandem Repeats

SSR: Short Simple Repeats

- Dĺžka základnej repetície <6bp
- Počet opakovaní repetície 1 – 100
- Výskyt rovnomerne po genóme
- Odhadovaný počet rádovo 10^5
- Jednoduchá detekcia: PCR
- Vznik nových alel: nehomologický c-o
- Mutačná frekvencia: nižšia ako u minisatelitov, cca 10^{-3}
- Využitie: rozsiahle; individuálna identifikácia, nepriama DNA diagnostika, triangulácia génovej mapy
- Biologický význam: neznámy, asi selfish DNA
- Výnimka: expanzie trinukleotidov u niektorých ochorení
- Najčastejší: „CA-repeat“ (asi 50 000 x v genóme)

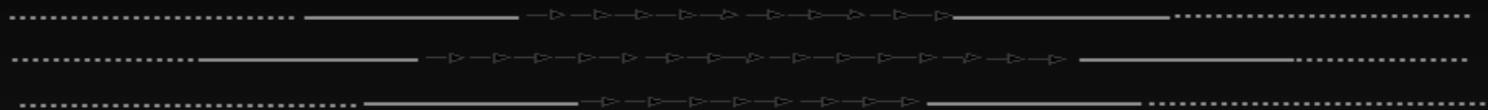
Mikrosatelity (STR, SSR)

Microsatellites (Simple Sequence Repeats, SSR)

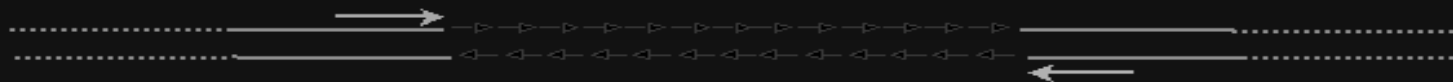
➤ Structure



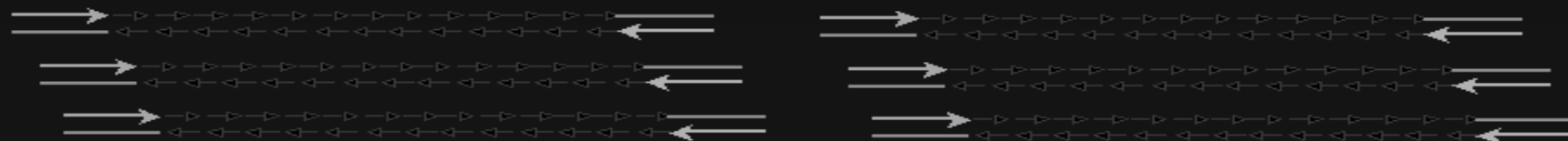
➤ Number of repeats is highly variable among individuals



Design primers (↔) complementary to flanking regions



Amplify repeat region by polymerase chain reaction



Analyze PCR products by polyacrylamide gel electrophoresis

Marker is codominant and highly genetically informative

Typy mikrosatelitov

Typy:

- Perfektné (jednoduché) $(CA)_n$
- Imperfektné $(CA)_n TTT (CA)_m$
- Zložené $(CA)_n AAA (AT)_m$

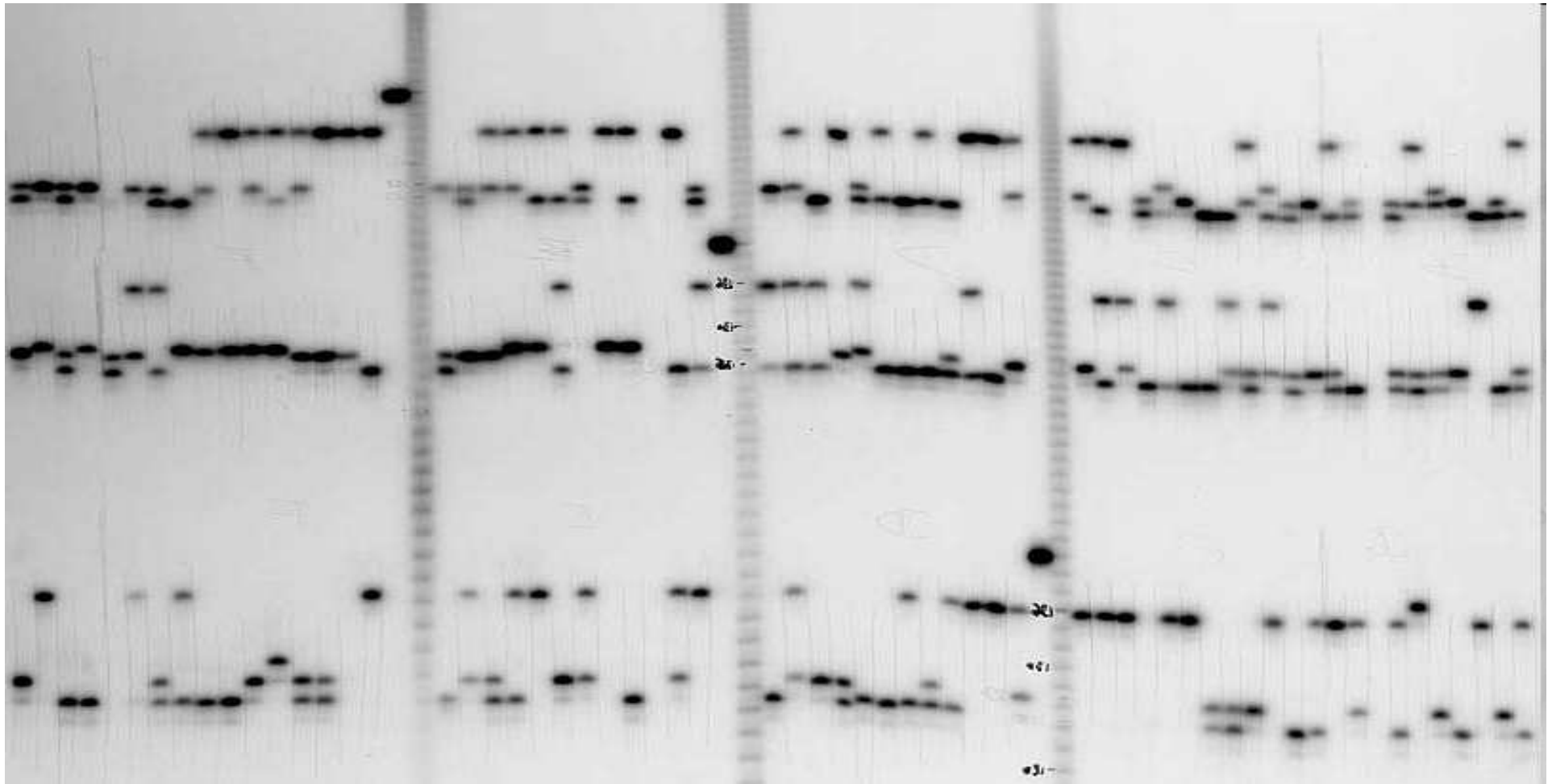
V genóme: $(CA)_n$ - 0,5% (najmenej 50 000)

$(TC)_n$ - 0,2%

ostatné dinukl. – takmer 0%

tri- a tetra: zriedkavé, ale
najčastejšie používané v praxi

Mikrosatelity: súčasné vyšetrenie viacerých systémov na jednom géli (multiplex)



Mikrosatelity: princíp detekcie pomocou kapilárrovej elektroforézy

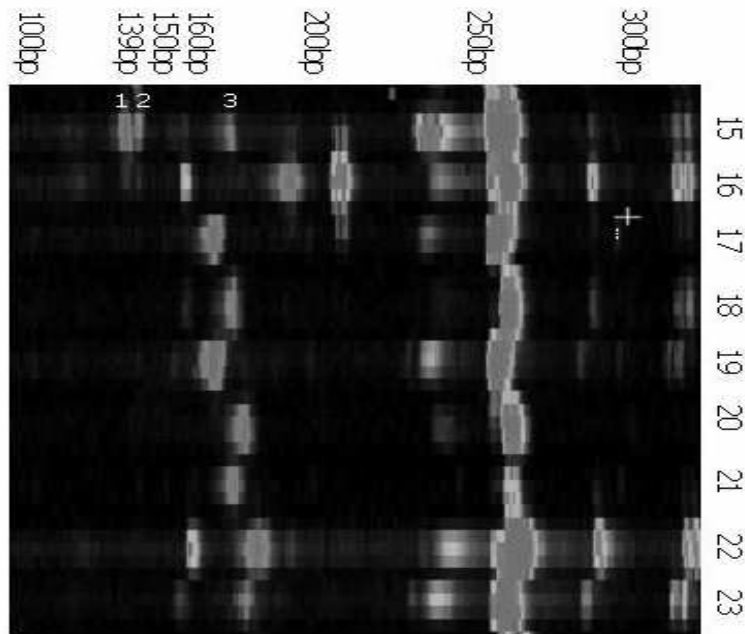
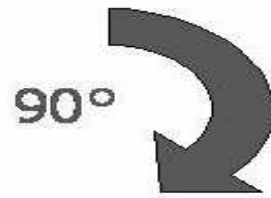
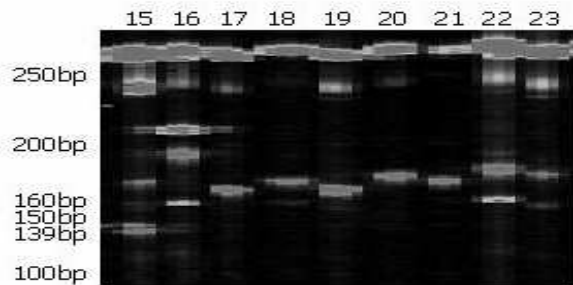
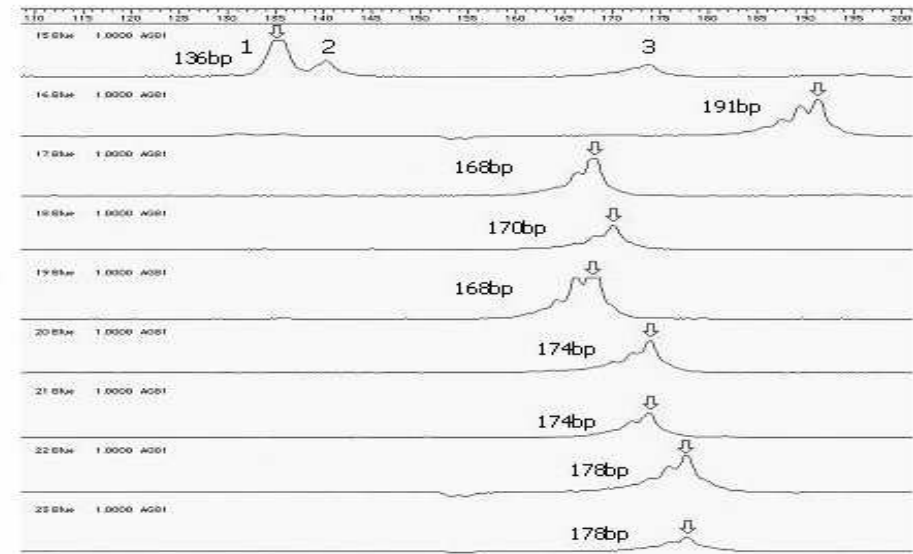
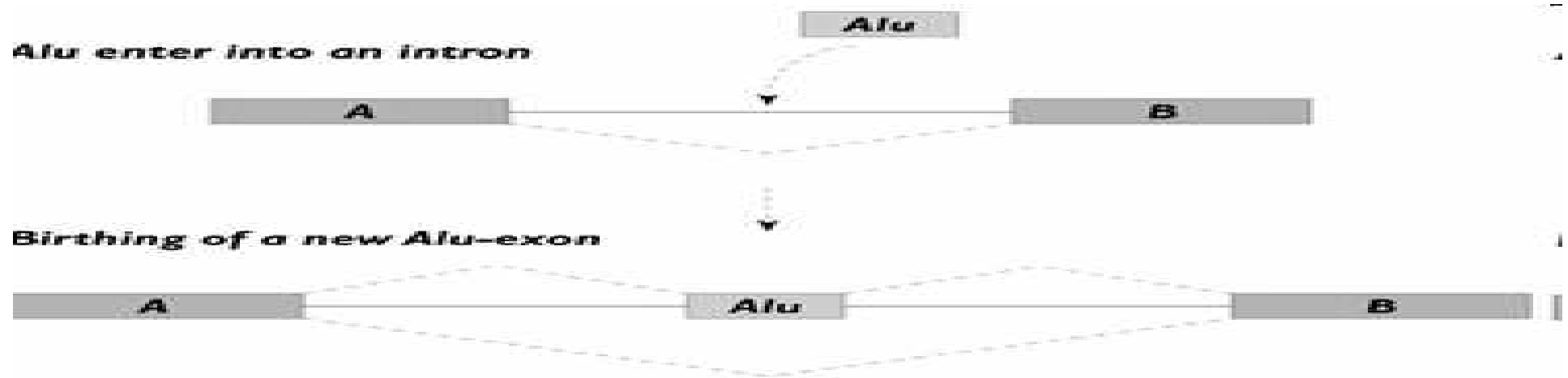


Fig. 3: Converting labelled SSR fragments into peaks

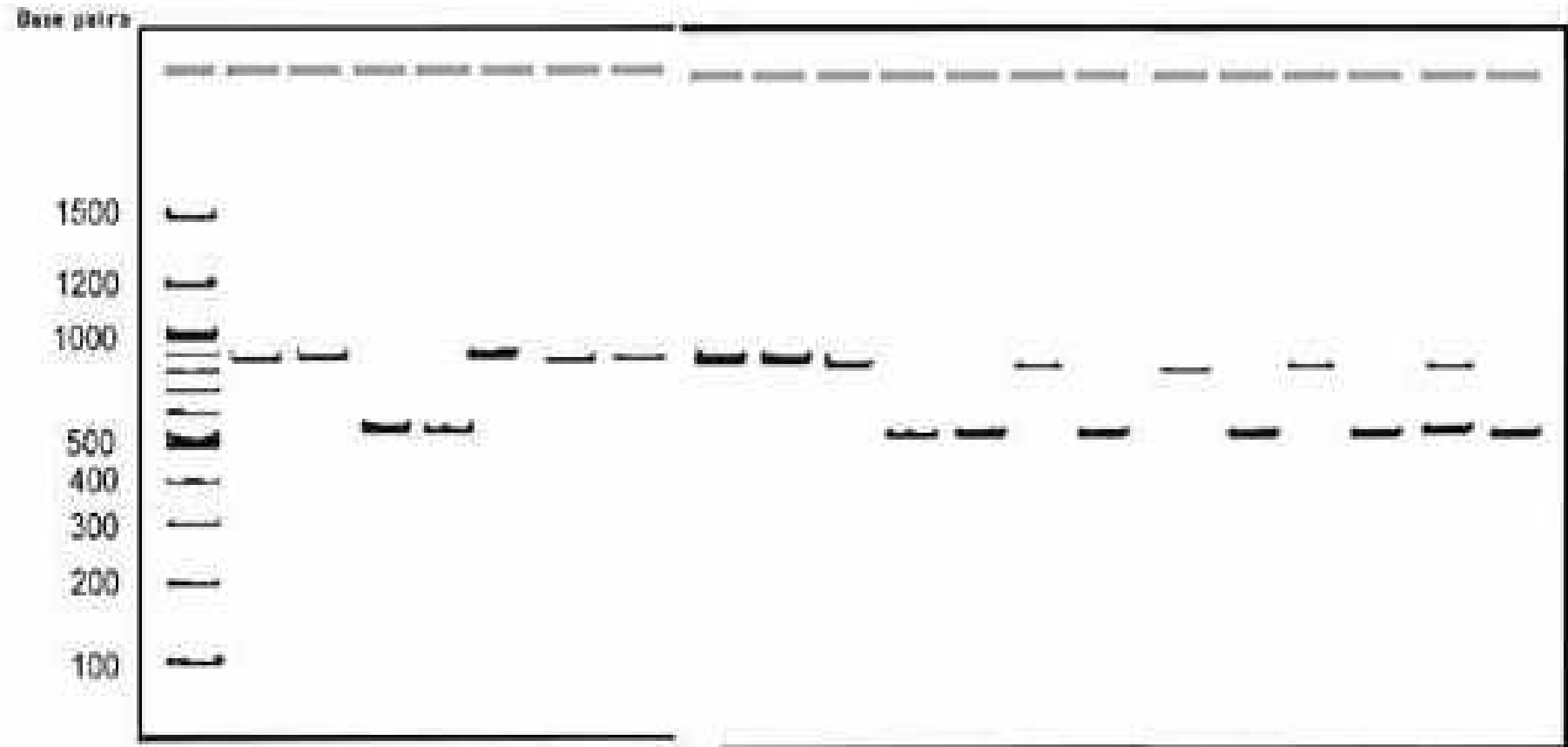


Inzerčno-delečný polymorfizmus (indel)

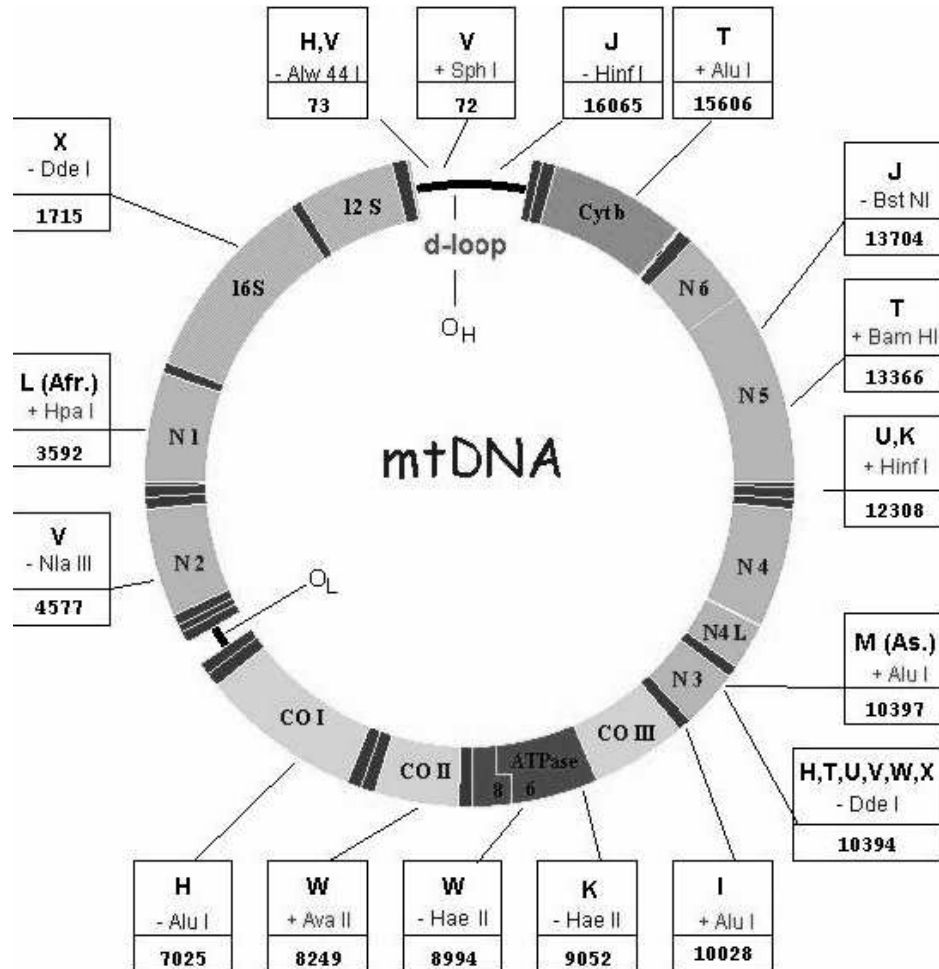


- Indel od 1 bp po niekoľko Mb
- Časté: inzercie Alu, L1 – retrotranspozícia
- Veľmi zriedkavý jav: unikátne udalosti
- Poznáme pôvodný stav (bez inzercie)
- Inzercie (Alu, L1) aj do kódujúcich sekvencií: patológia

Typizácia Alu-inzerčného polymorfizmu na Y-chromozóme



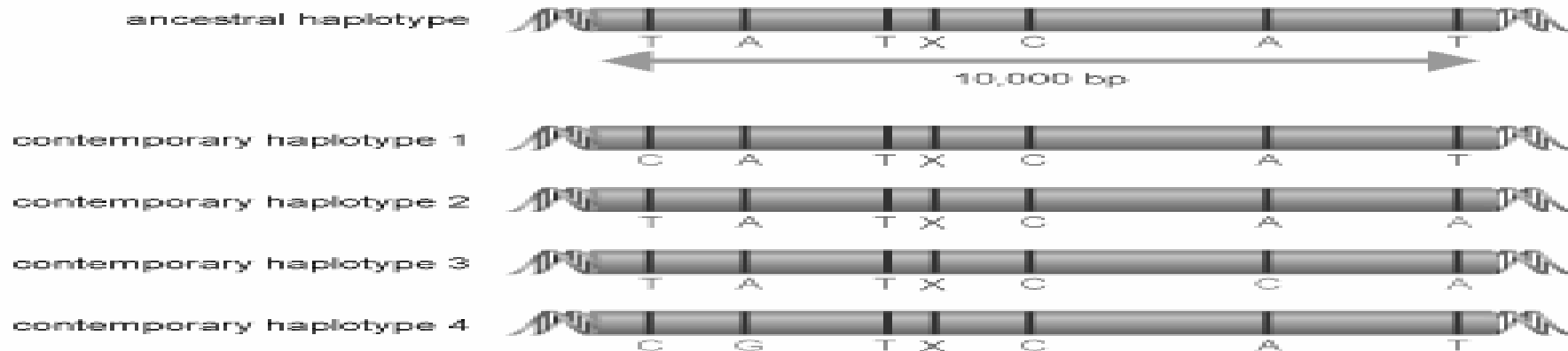
Polymorfizmus mtDNA



Polymorfizmy mtDNA:

- Mimo D-kľučky 10x častejšie ako v gDNA
- V rámci D-kľučky až 100x častejšie ako v gDNA
- Žiadna rekombinácia: haplotypy; haploskupiny
- Matrilinéarna dedičnosť
- Heteroplazmia
- Využitie: štúdium evolúcie ľudských populácií

Polymorfné haplotypy



- Haplotyp: súbor alel na jednom chromozóme, ktoré sa len zriedka oddelia rekombináciou
- Haplotypové bloky v ľudskom genóme: rekombinačné „cold spots“
- Využitie: štúdium „veku“ mutácií

Využitie polymorfizmov DNA

Ukazovatele variability:

- Počet známych alel (pri RFLP dve, pri VNTR až 10^2)
- Index heterozygoty $H = \sum_{i < j} 2 p_i p_j = 1 - \sum p_i^2$
- Pravd. identity $PI = 1 - \sum p_i^4 - \sum_{i < j} 4 p_i^2 p_j^2$
- Polym. information content $PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum_{i < j} 2 p_i^2 p_j^2$

Praktické využitie:

- Identifikácia osôb/vzoriek DNA (A. Jeffreys 1985)
- Nepriama dg. monogénnych ochorení (vysoký PIC)
- Určovanie paternity (VNTR, STR)
- Triangulácia génovej mapy (od RFLP až k STR)
- SNP a multifaktoriálne ochorenia?

Prenos mtDNA, Y-chromozálnej DNA a autozomálnej DNA

Pred 5 generáciami mal každý jedinec $2^5 = 32$
predkov, z nich len od jedného zdedil Y, od jedného
mtDNA, ale od všetkých čast' autozomálnej DNA

