

Polymorfizmus ľudskej DNA

Vladimír Ferák

Katedra molekulárnej biológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského
Bratislava

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

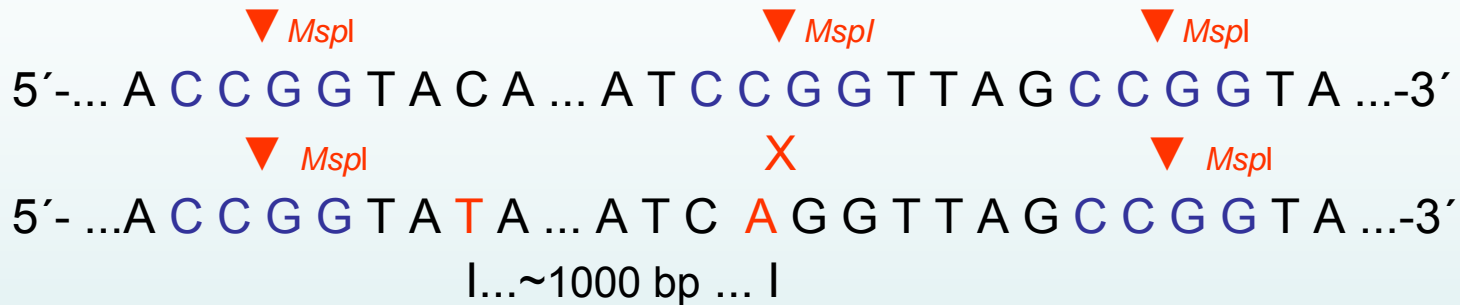
Genetický polymorfizmus

- **Definícia (Ford):** Geneticky podmienený znak s najmenej dvomi diskontinuitnými variantmi v jednej populácii, pričom početnosť zriedkavejšieho variantu je vyššia ako 1% (arbitrálné 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 ₃

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)

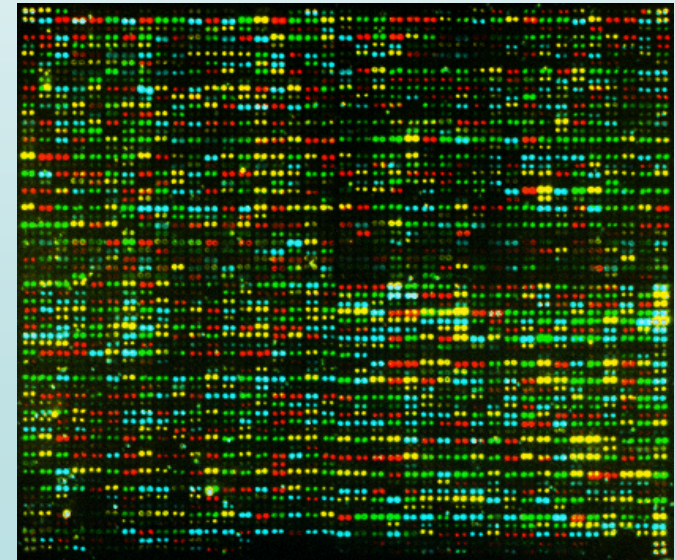
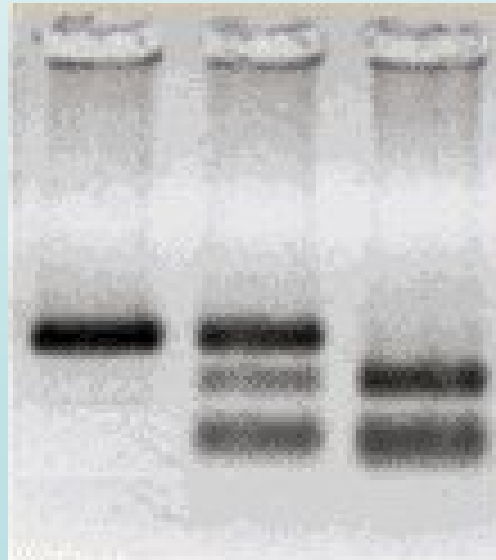
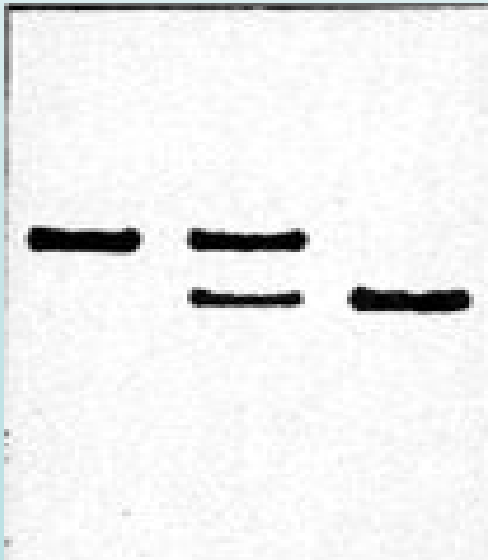
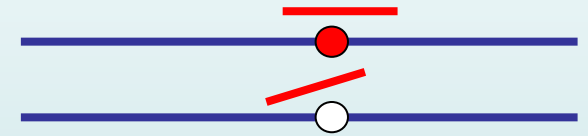
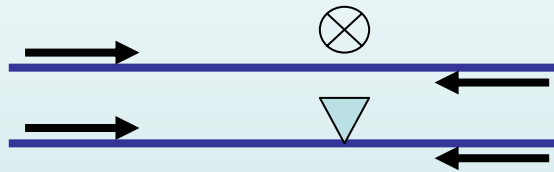
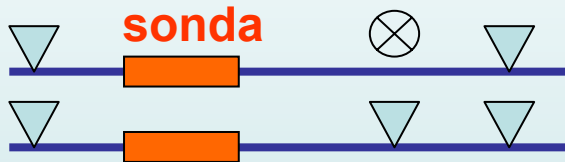
Bodový polymorfizmus (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)



- **Početnosť odlišností:** cca 1 : 1000 bp; v genóme cca 30 mil. SNP, t.č. registrovaných vyše 10 mil. (2004), ale len časť je definitívne potvrdených;
- **Výskyt:** intróny, nekódujúce oblasti (väčšinou žiadny fenotyp); len asi 50 000 v kódujúcich sekvenciách génov
- **Vznik:** mutácia + genetický drift (niekedy selekcia); nepoznáme pôvodný stav, len nepriamo (zo sekvencie u primátov);
- $\mu = 10^{-7}$ až 10^{-9} (najčastejšie v dinukl. CpG)
- **Možný dôsledok:** prítomnosť/nepřítomnosť restrič. miesta (ak v rozpozn. sekvencii RE, asi 20%): vznik RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Detekcia SNP polymorfizmu

- RFLP (restriction fragment length polymorphism)
 - restričné štiepenie genomickej DNA s následným Southern blottingom (dni)
 - PCR amplifikácia s následným restričným štiepením (deň)
- DNA array (čipy) analýza až 100 tisíc SNP v jednej analýze

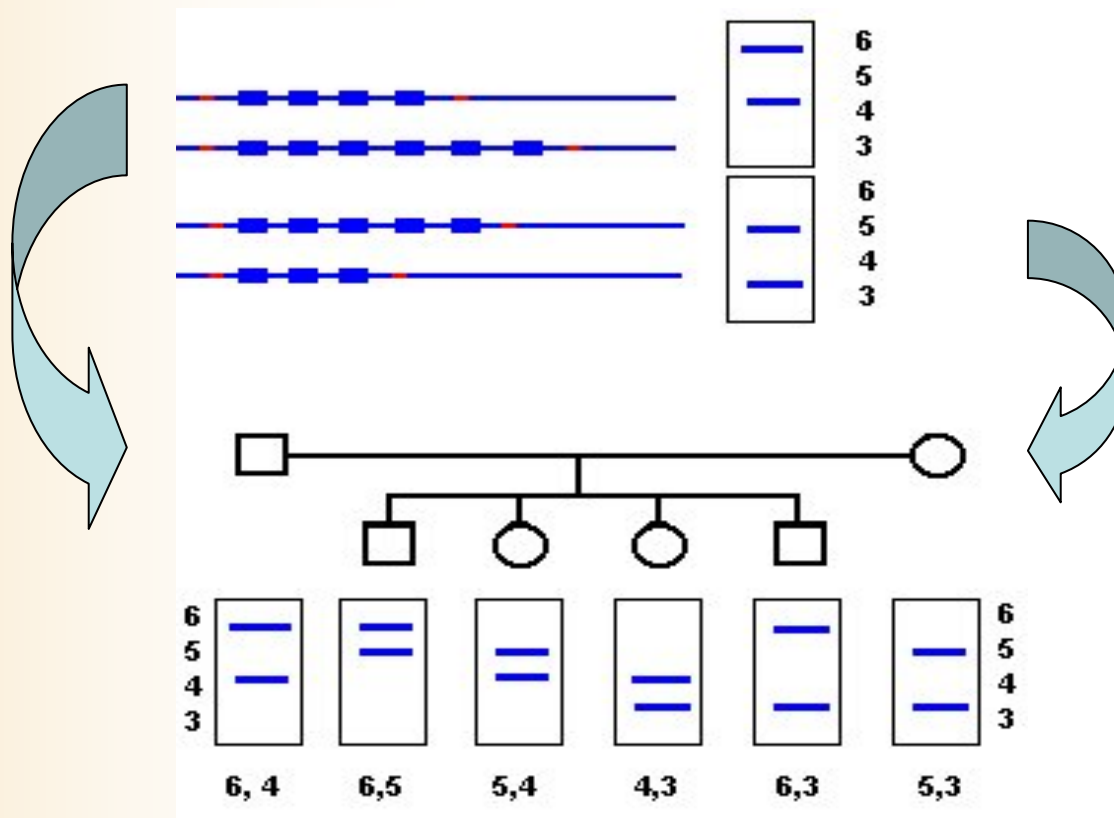


Polymorfizmus variabilného počtu tandemových opakovaní (VNTR, STR)

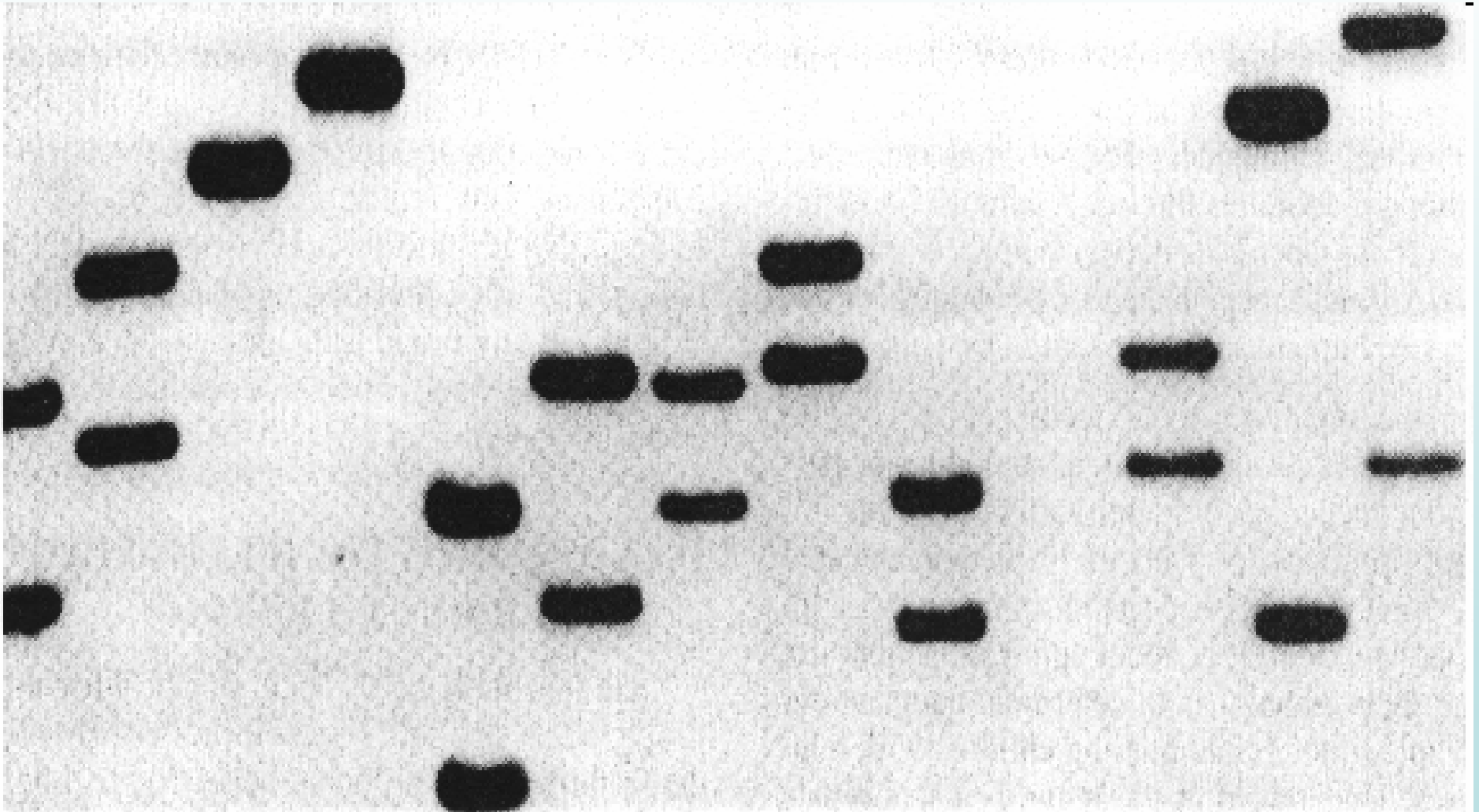
....(TGAC)(TGAC)(TGAC).....

....(TGAC)(TGAC)(TGAC)(TGAC)(TGAC).....

Detekcia PCR amplifikáciou repetitívneho úseku a separáciou v géli:



VNTR (minisatelite) – variabilita v populácii



Polymorfizmus variabilného počtu tandemových repetícií



Minisatelity (VNTR)

- Dĺžka základnej repetície >6bp
- Počet opakovaní repetície 10 – 100 (1000)
- Výskyt preferenčne v telomérických oblastiach (najmä bohaté na GC páry)
- Odhadovaný počet: cca 10^4
- Jednoduchá detekcia: Southern, PCR
- Vznik nových alel: nehomologický crossover
- Mutačná frekvencia: vysoká, až 10^{-3}
- Využitie: obmedzené; individuálna identifikácia
- Biologický význam: neznámy, asi selfish DNA
- Špec. prípad: minisatelit (TTAGGG)_n - teloméry

Mikrosatelity (STR)

- Dĺžka základnej repetície 2 - 6bp
- Počet opakovaní repetície 2 – 100
- Výskyt rovnomerne po genóme
- Odhadovaný počet rádovo 10^5
- Jednoduchá detekcia: PCR
- Vznik nových alel: replikačné chyby
- Mutačná frekvencia: cca 10^{-3}
- Využitie: rozsiahle; individuálna identifikácia, nepriama DNA diagnostika, identifikácia génov
- Biologický význam: neznámy, asi selfish DNA
- Výnimka: expanzie trinukleotidov u niektorých ochorení
- Najčastejší: „CA-repeat“ (asi 50 000 x v genóme)

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

Inzerčno-delečný polymorfizmus (indel)

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

inzerčno-delečný polymorfizmus Alu-sekvencie (300 bp) v Y-chrom. DNA:



Využitie polymorfizmov DNA

Ukazovatele variability:

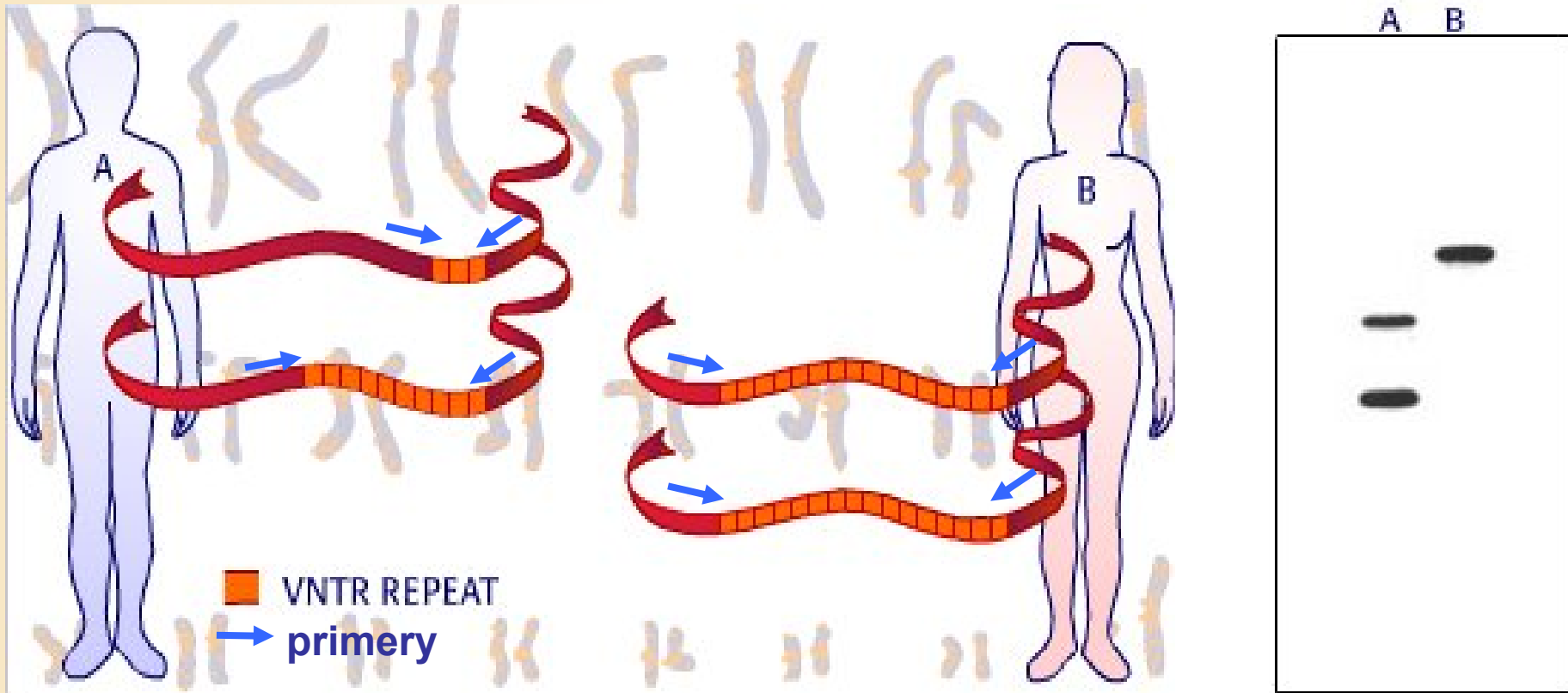
- Počet známych alel (pri SNP dve, pri VNTR až 10^2)
- Index heterozygoty $H = \sum_{i < j} 2 p_i p_j = 1 - \sum p_i^2$
- Pravd. identity $PI = 1 - \sum p_i^4 - \sum_{i < j} 4 p_i^2 p_j^2$
- Polym. information content $PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum_{i < j} 2 p_i^2 p_j^2$

Praktické využitie:

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

PCR amplifikácia VNTR polymorfizmu

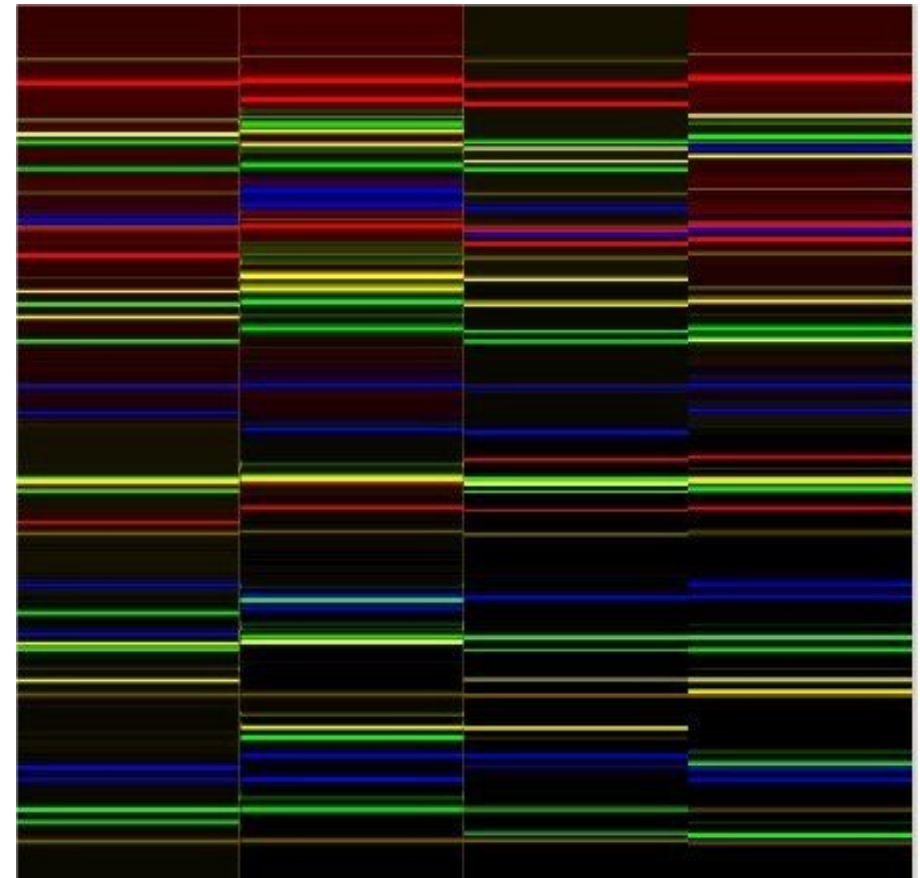
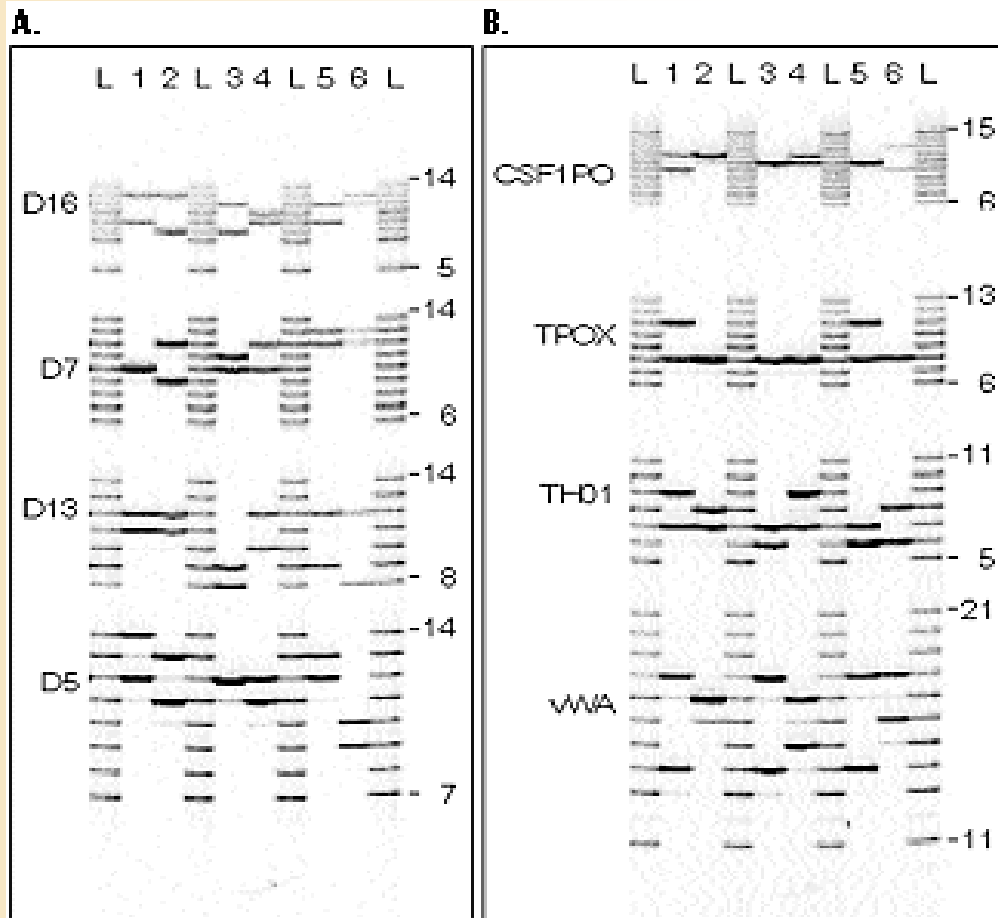
- amplifikácia konkrétneho polymorfizmu/lokusu pomocou špecifických primerov (tie ležia mimo repetície) + elektroforéza



Multiplex PCR



- Amplifikácia viacerých lokusov v jednej PCR reakcii



vľavo - separácia na akrylamidovom géli a vizualizácia striebrom
vpravo - fluorescenčné značenie primerov a kapilárová elektroforéza

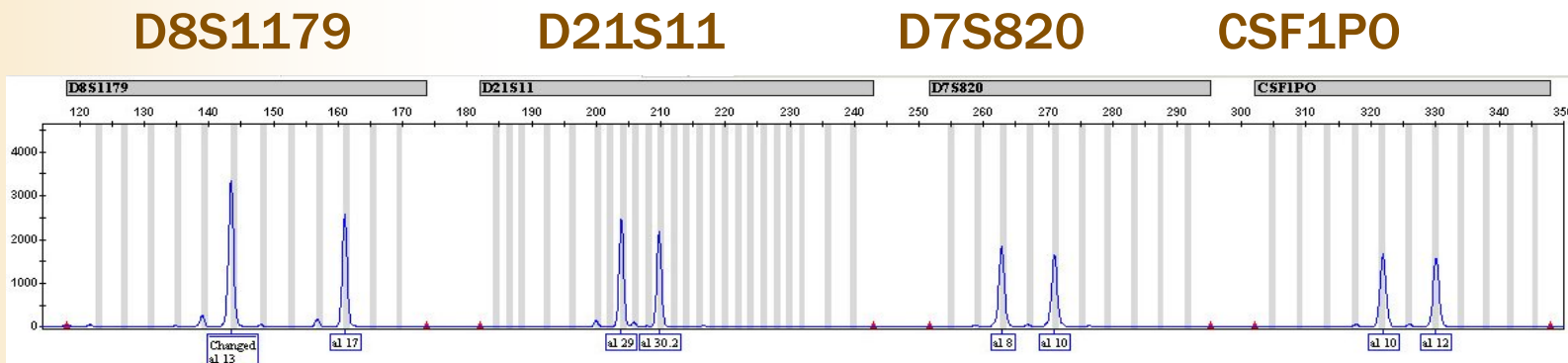
Mikrosatelity: variabilita v populácii



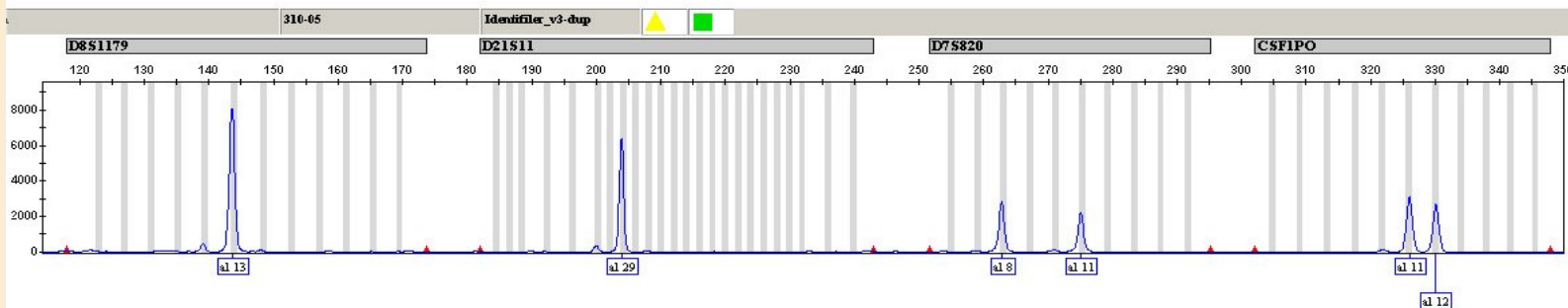
- Genotypy troch ľudí v štyroch STR polymorfizmoch (fluorescenčné značenie a kapilárová elektroforéza)

Jedinci

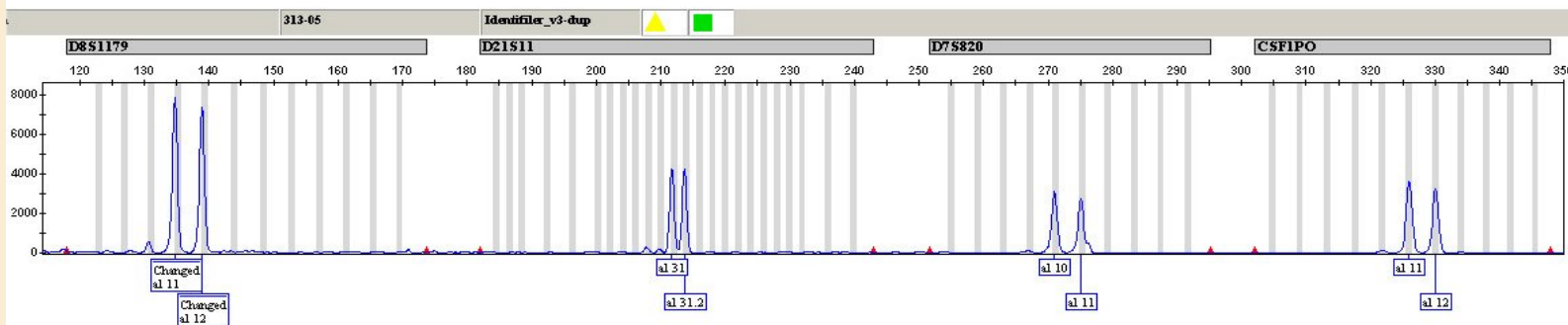
1.



2.



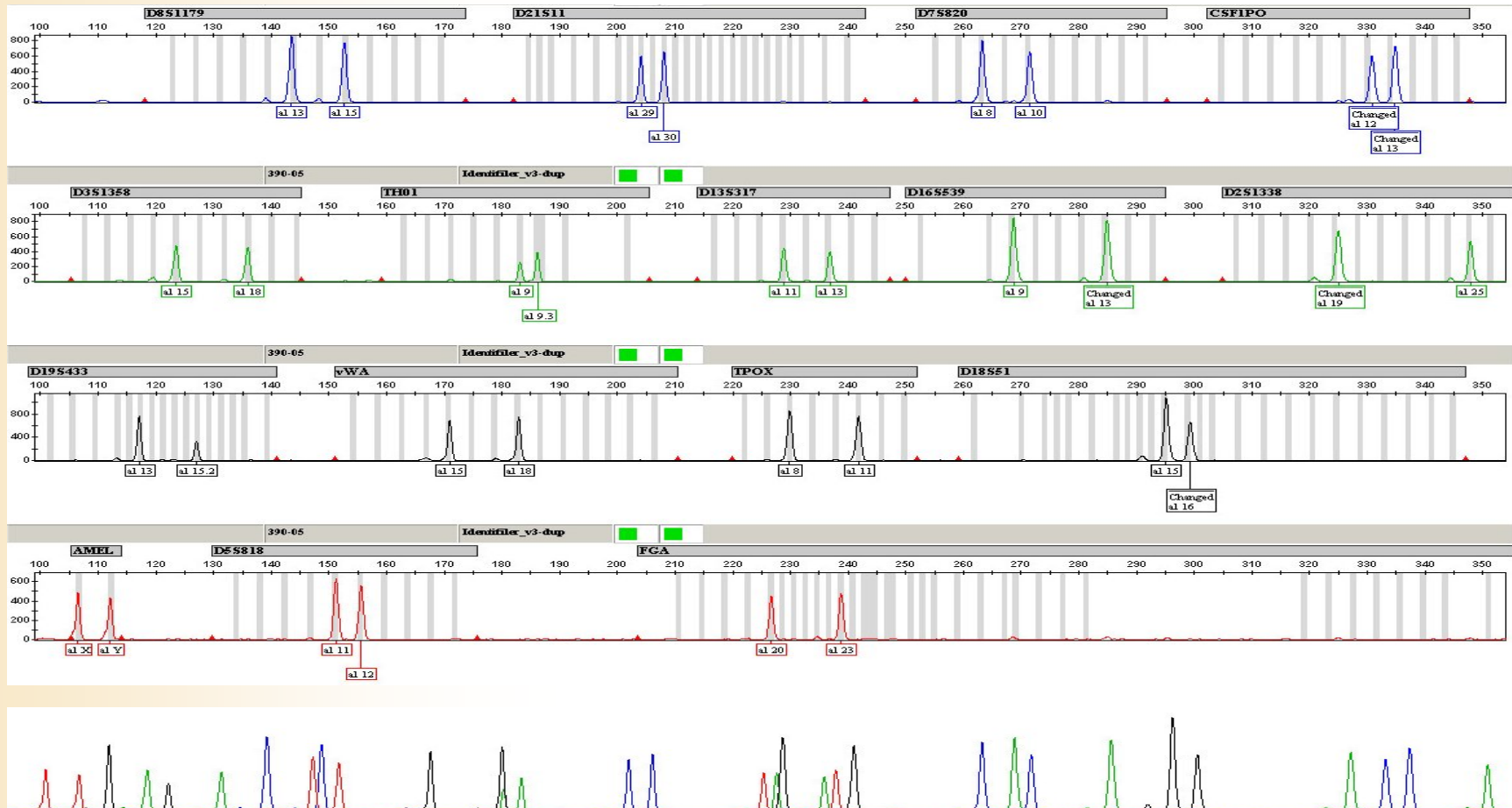
3.



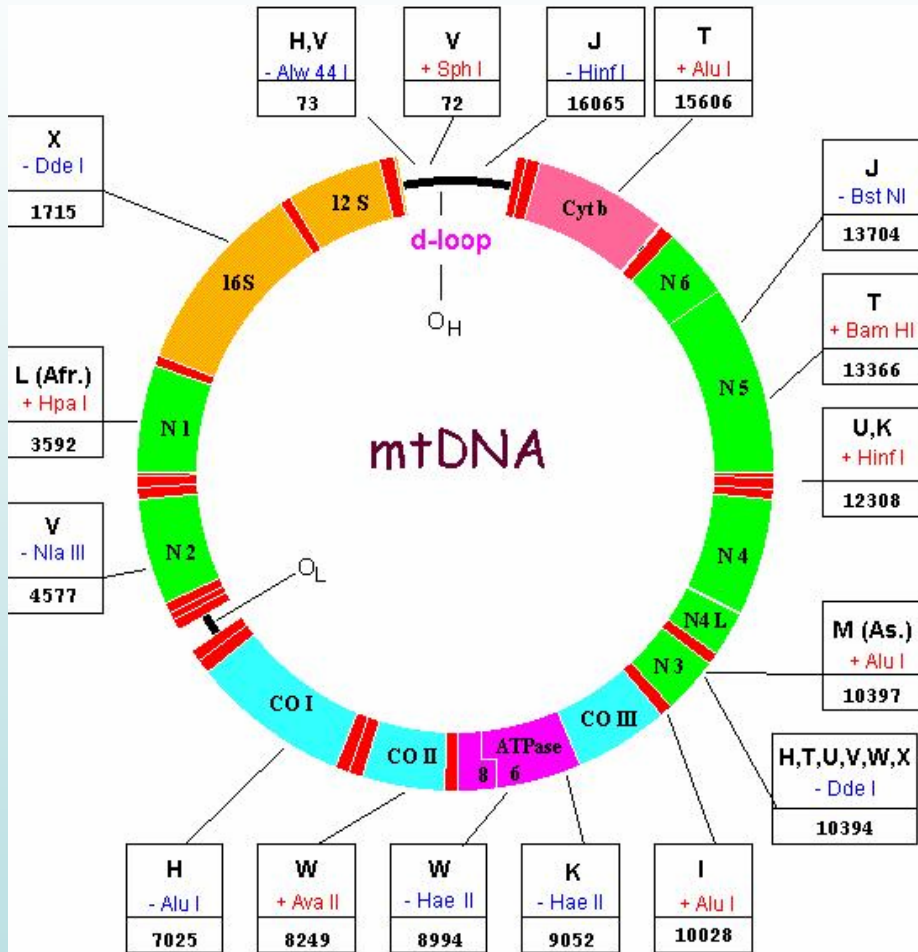
Identifikácia osôb



- Multiplex PCR 16 fluorescenčne značných mikrosatelitových polymorfizmov
- Pravdepodobnosť identity dvoch náhodných jedincov 10^{-17}



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
- Matrilinéárna dedičnosť
- Heteroplazmia
- Využitie: štúdium evolúcie ľudských populácií

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 každého časť autozomálnej DNA

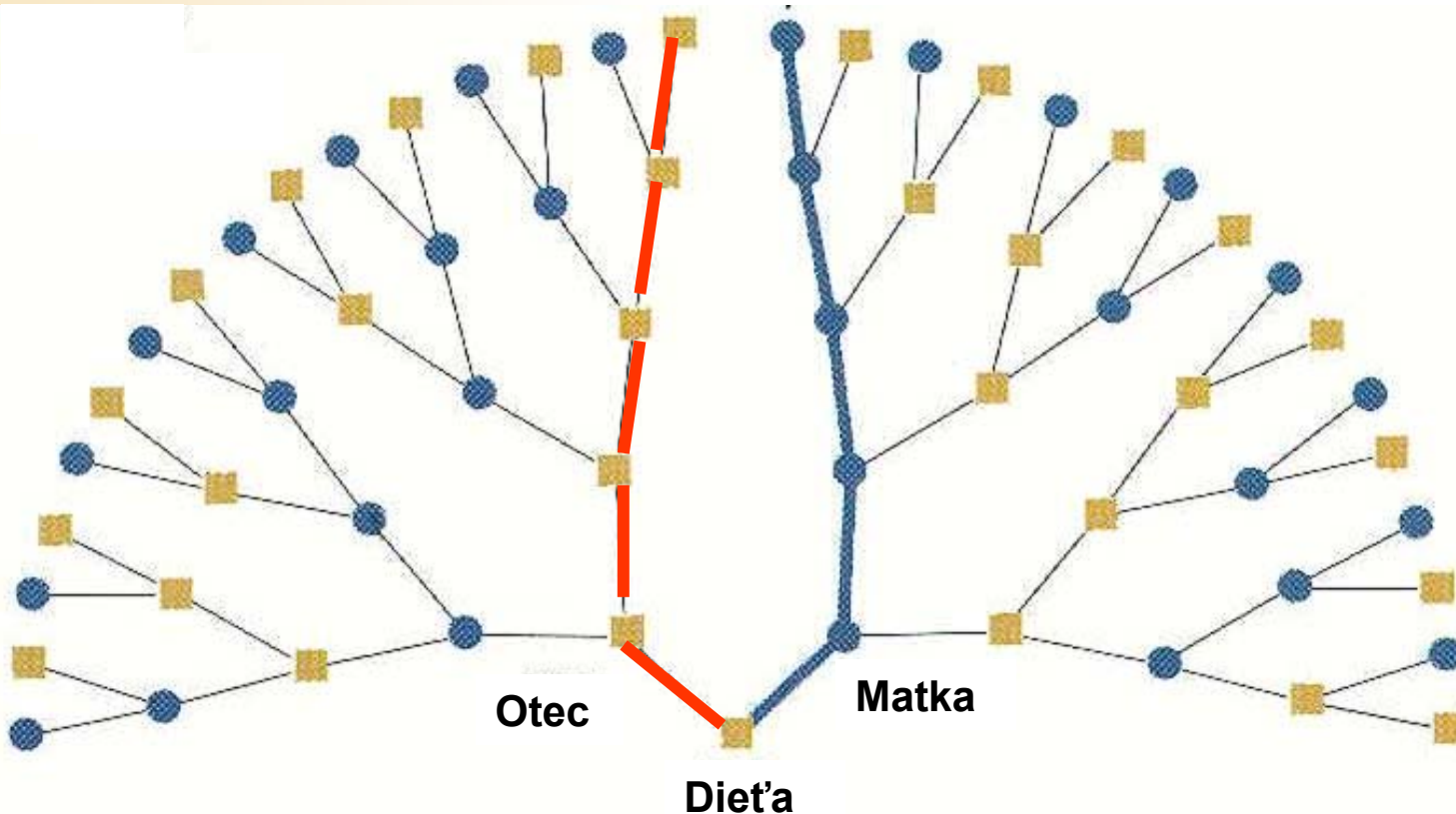
mtDNA a Y-DNA: žiadna rekombinácia



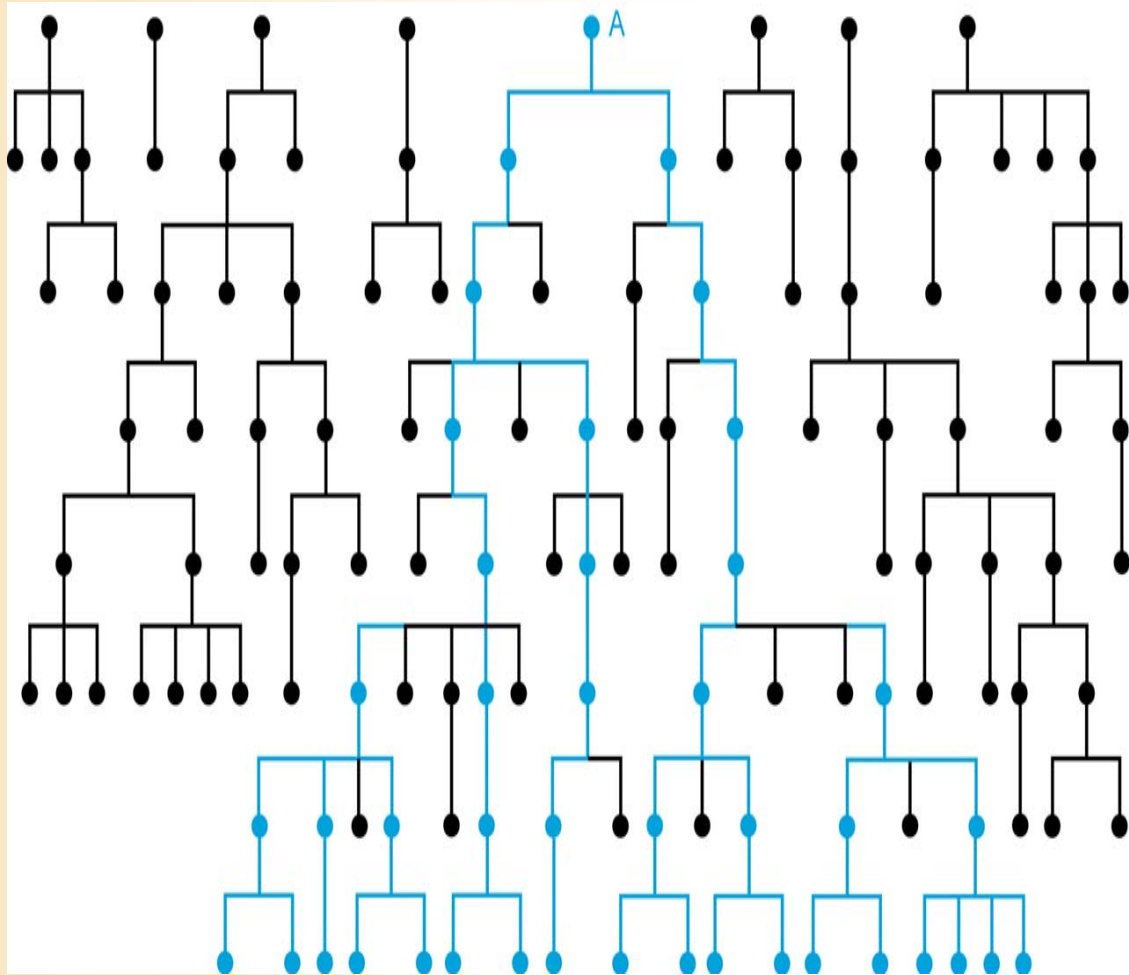
prenos „*en bloc*“ cez generácie



Každý má práve jedného Y-predka a jedného mt predka v ktorejkoľvek predošlej generácii

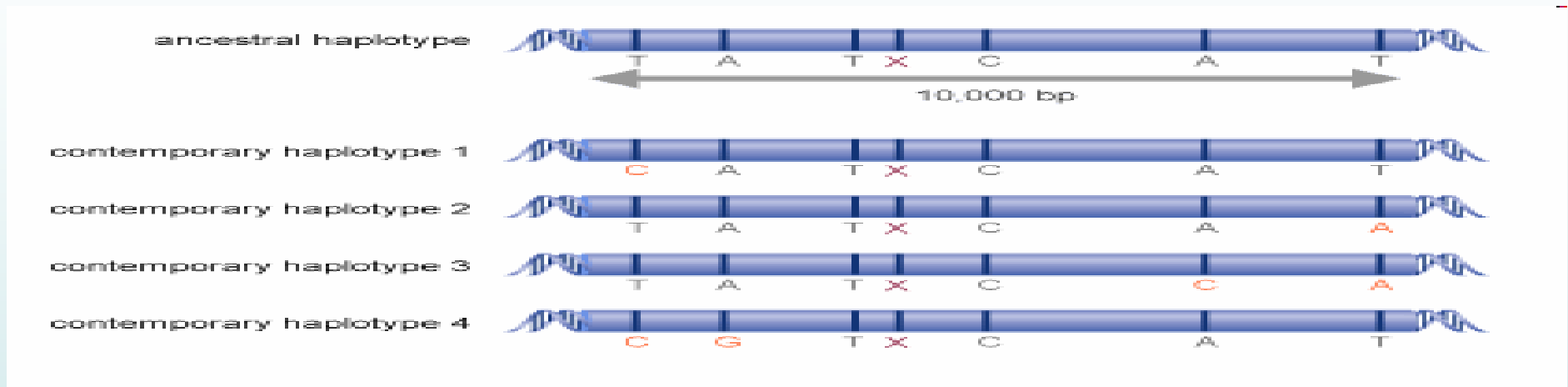


Koalescencia línií mtDNA a Y-DNA „mitochondriálna Eva“



- **Možno nájsť spoločného predka pre členov populácie, pretože**
- **v každej generácii dôjde k zániku a naopak k zmnoženiu niektorých línií,**
- **a po čase v rovnovážnej populácii prevládne mt/Y DNA odvodené od jedného spoločného predka**

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