

# 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, CNV ...) 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 <sub>3</sub>

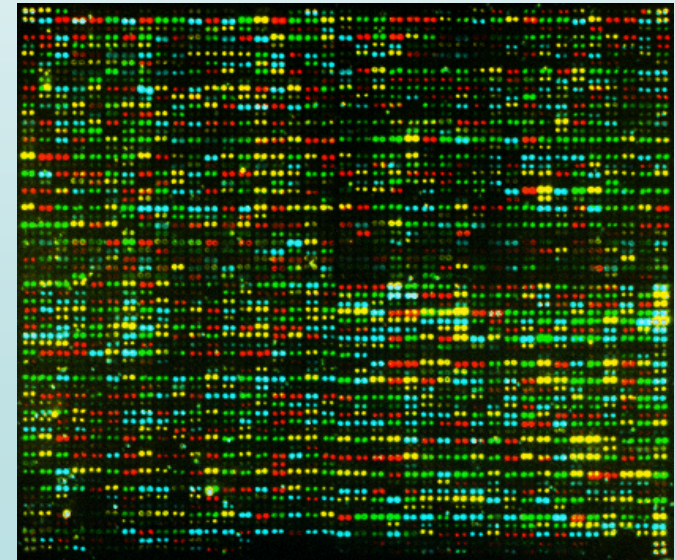
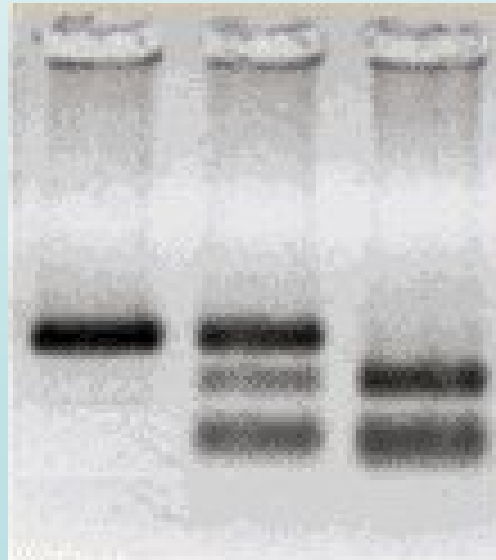
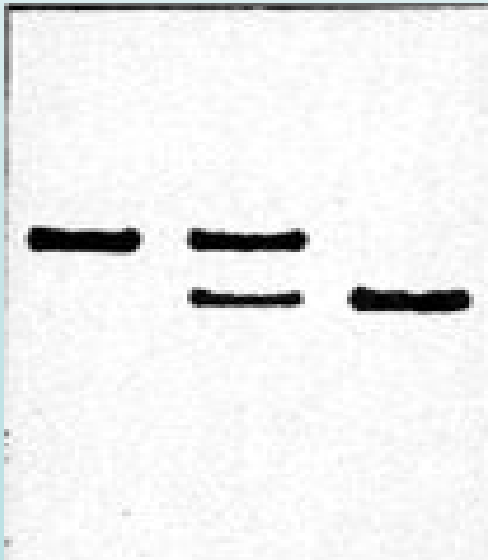
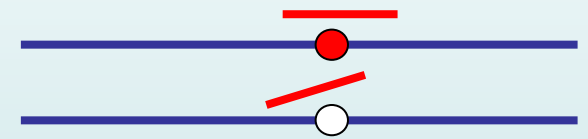
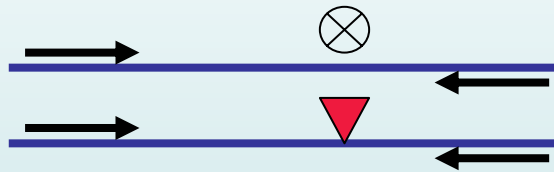
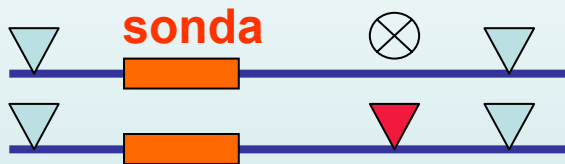
# Typy DNA polymorfizmov

- Bodový polymorfizmus (substitúcie jednotlivých báz; SNP)
- Variabilný počet tandem. repetícií
  - mikrosatelity (STR)
  - minisatelity (VNTR)
  - makrosatelity
- Prítomnosť/nepřítomnosť sekvencie (Alu, L1 a i.) na špecifickom mieste (indel)
- Variabilita počtu kópií (copy number variants, CNV)



# 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): detekcia až 500 000 SNP v jednej analýze

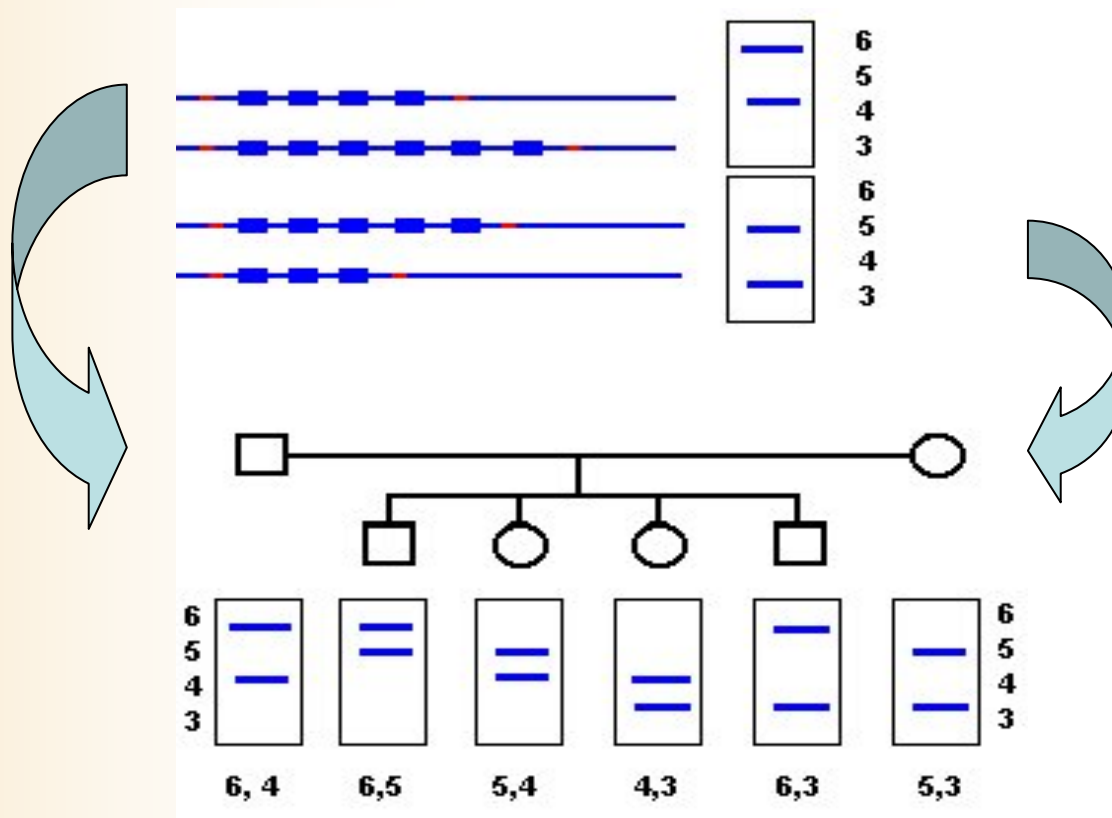


# Polymorfizmus variabilného počtu tandemových opakovaní (VNTR, STR)

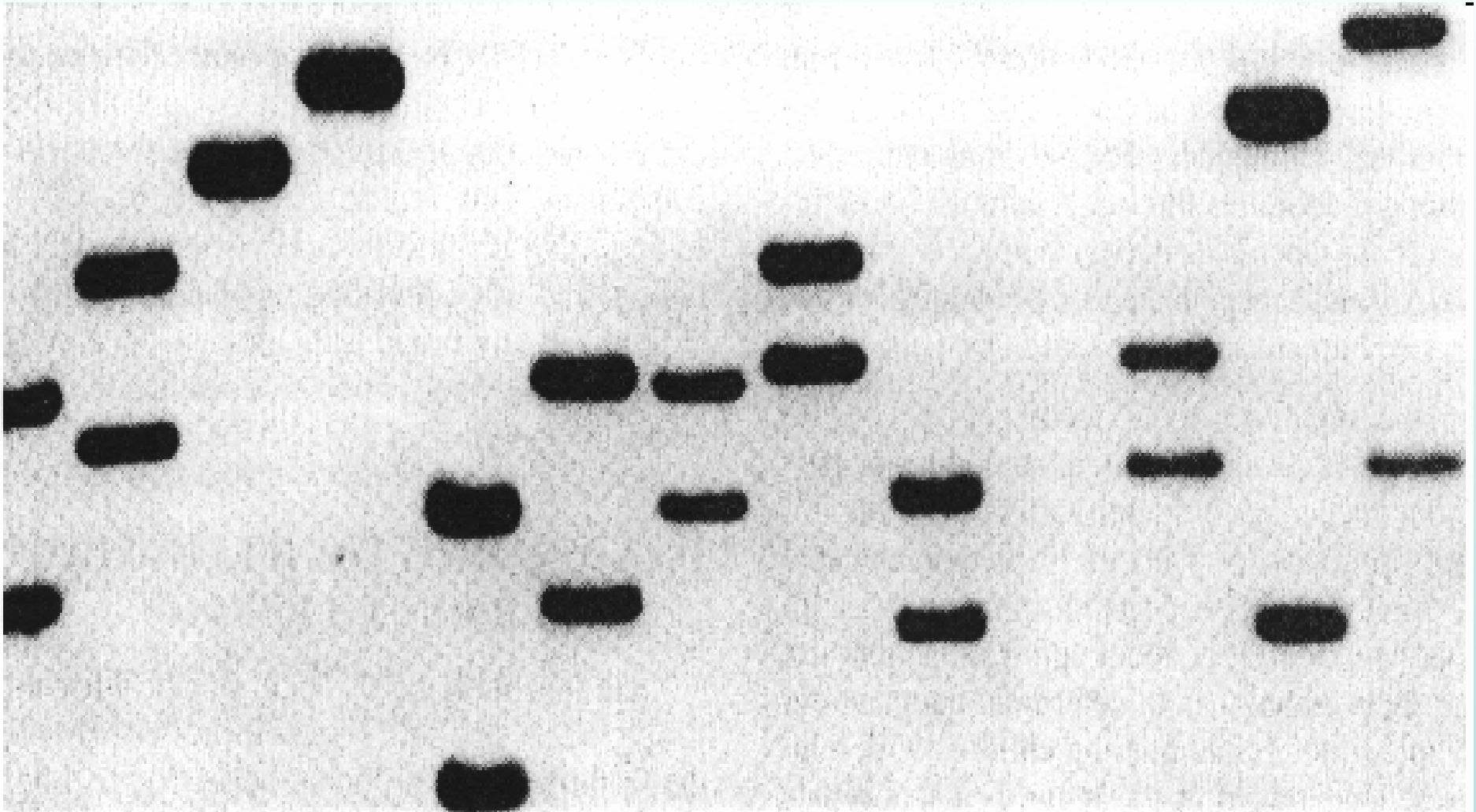
....(TGAC)(TGAC)(TGAC).....

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

Detekcia PCR amplifikáciou repetitívneho úseku a separáciou v géli:

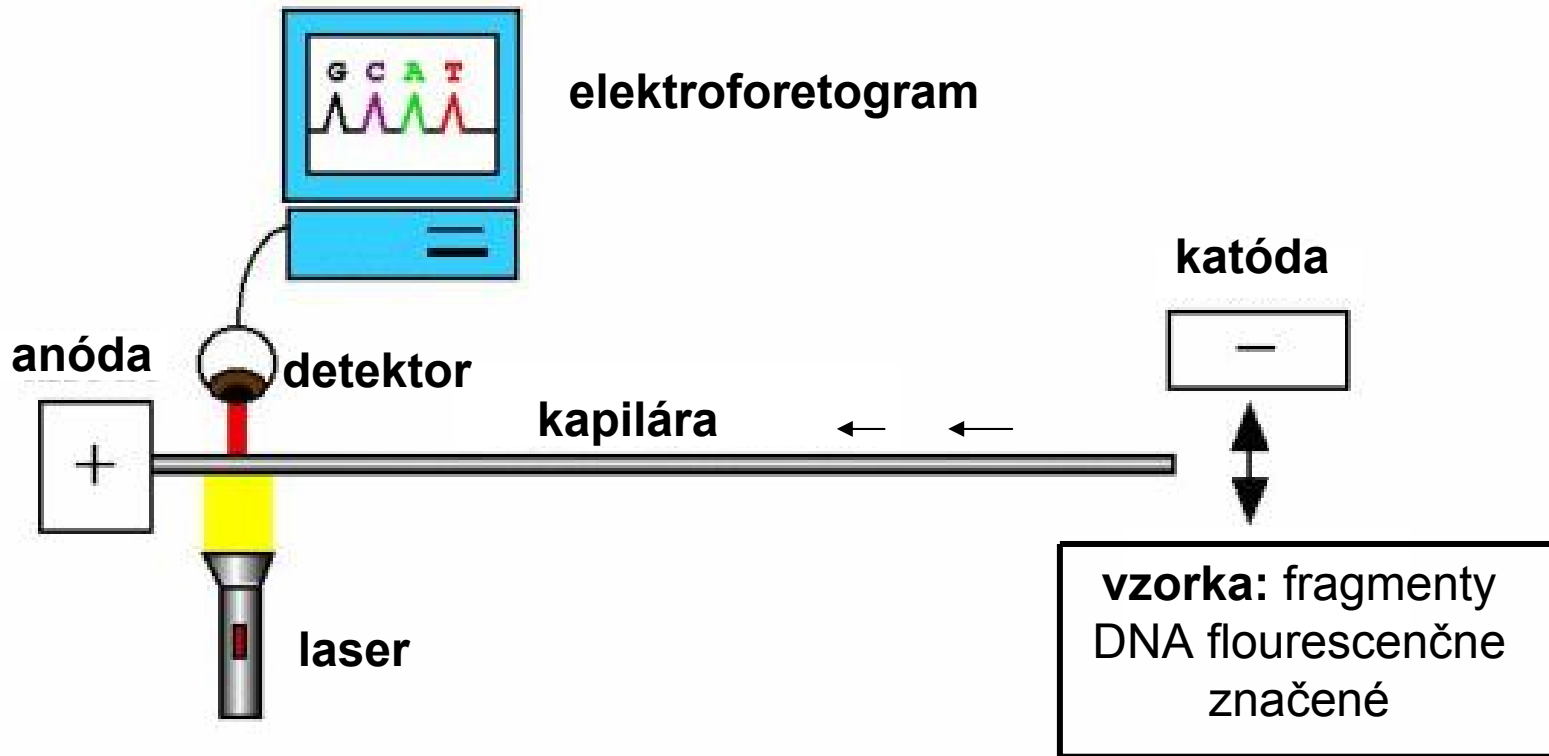
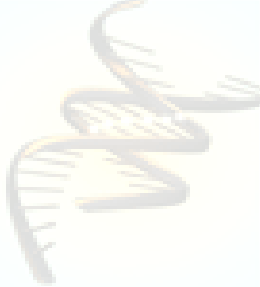


# VNTR (minisatelite) – variabilita v populácii





# Kapilárová elektroforéza fragmentová analýza



# Polymorfizmus variabilného počtu tandemových repetícií



## Minisatelitey (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)<sub>n</sub> - teloméry

## Mikrosatelitey (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 (to je 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  $H = \sum 2 p_i p_j = 1 - \sum p_i^2$
- Pravd. identity  $PI = 1 - \sum p_i^4 - \sum 4 p_i^2 p_j^2$
- Polym. information content  $PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum 2 p_i^2 p_j^2$

## 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 CNV pri multifaktoriálnych ochoreniach

# Polymorfizmus DNA v kriminalistike



## História:

- Alec Jeffreys (UK) – 1987 – identifikácia páchatel'a vraždy (našiel sa medzi 3600 testovanými jedincami)
- ČSFR: PRIF UK: 1990 – identifikácia páchatel'a vraždy v Brne
  - 1992 – DNA usvedčila páchatel'a 9 vrážd

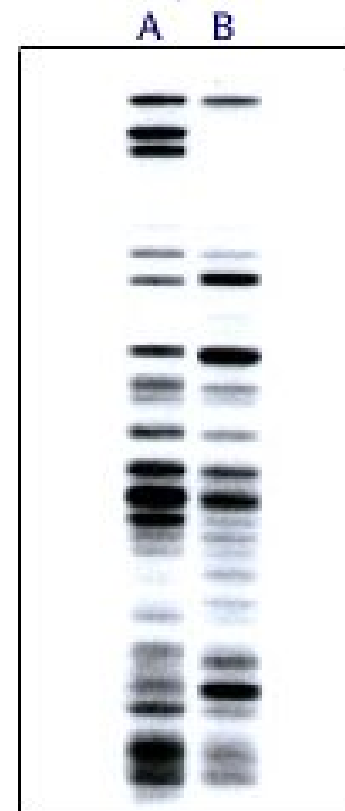
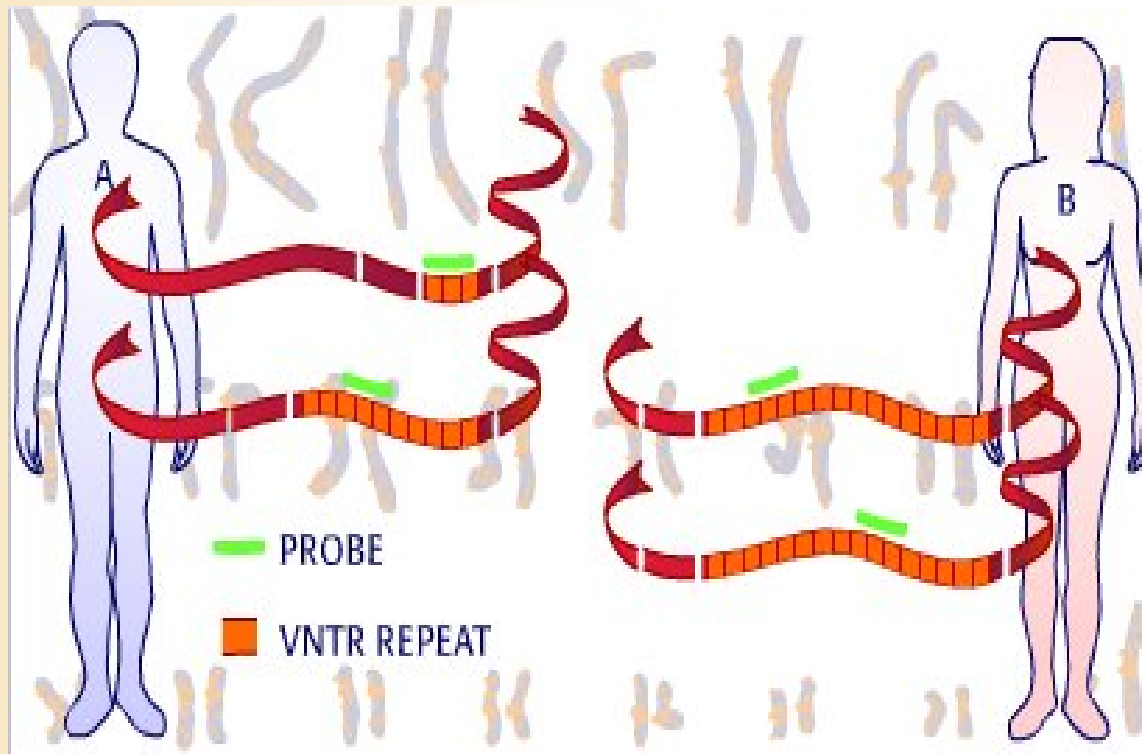
## Súčasnosť:

- všeobecne akceptovaná metóda; diskriminančná schopnosť  $10^{-17}$
- vo svete  $10^6$  DNA testov ročne (vrátane testov otcovstva)
- identifikácia páchatel'ov/obetí trestných činov
- identifikácia obetí hromadných nešťastí
  - N.Y.C. 11.sept.: 850 identifikácií, **115 000 DNA profilov**
  - tsunami 2004: asi 1100 DNA identifikácií (?)
- databázy: - CODIS (USA + 23 krajín): **2,7 mil. DNA profilov**
  - Scotland Yard: **3 mil. DNA profilov**
  - Slovensko (KEÚ PZ): **2600 DNA profilov**

# Individuálna identifikácia „DNA fingerprint“



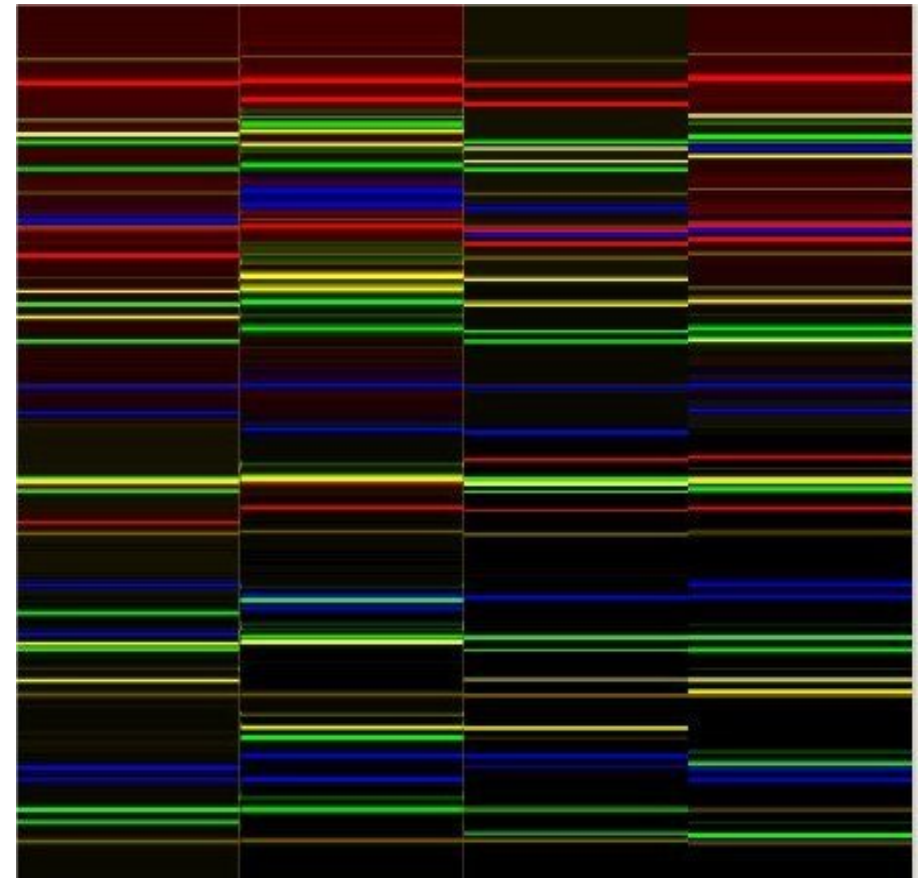
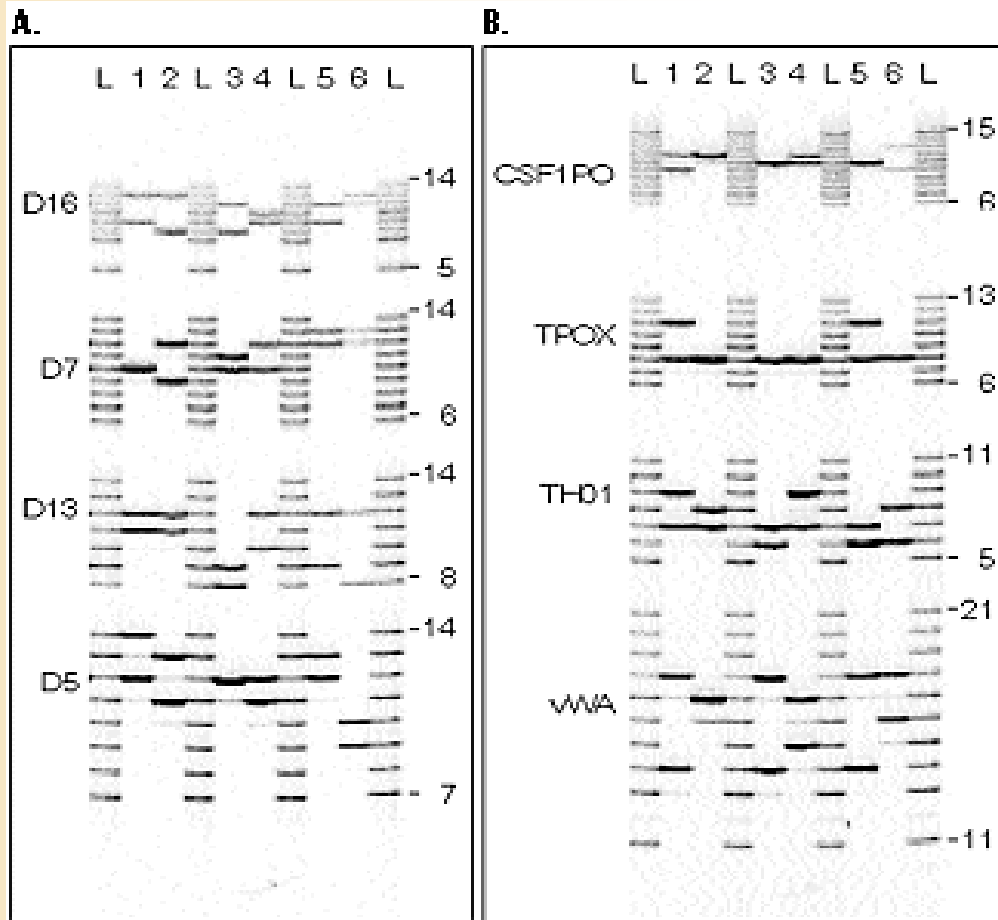
- Alec Jeffreys, 1984
- Restričné štiepenie genomickej DNA → elektroforetická separácia → Southernov blotting s VNTR sondou (GGGCAGGAXG)



# Multiplex PCR



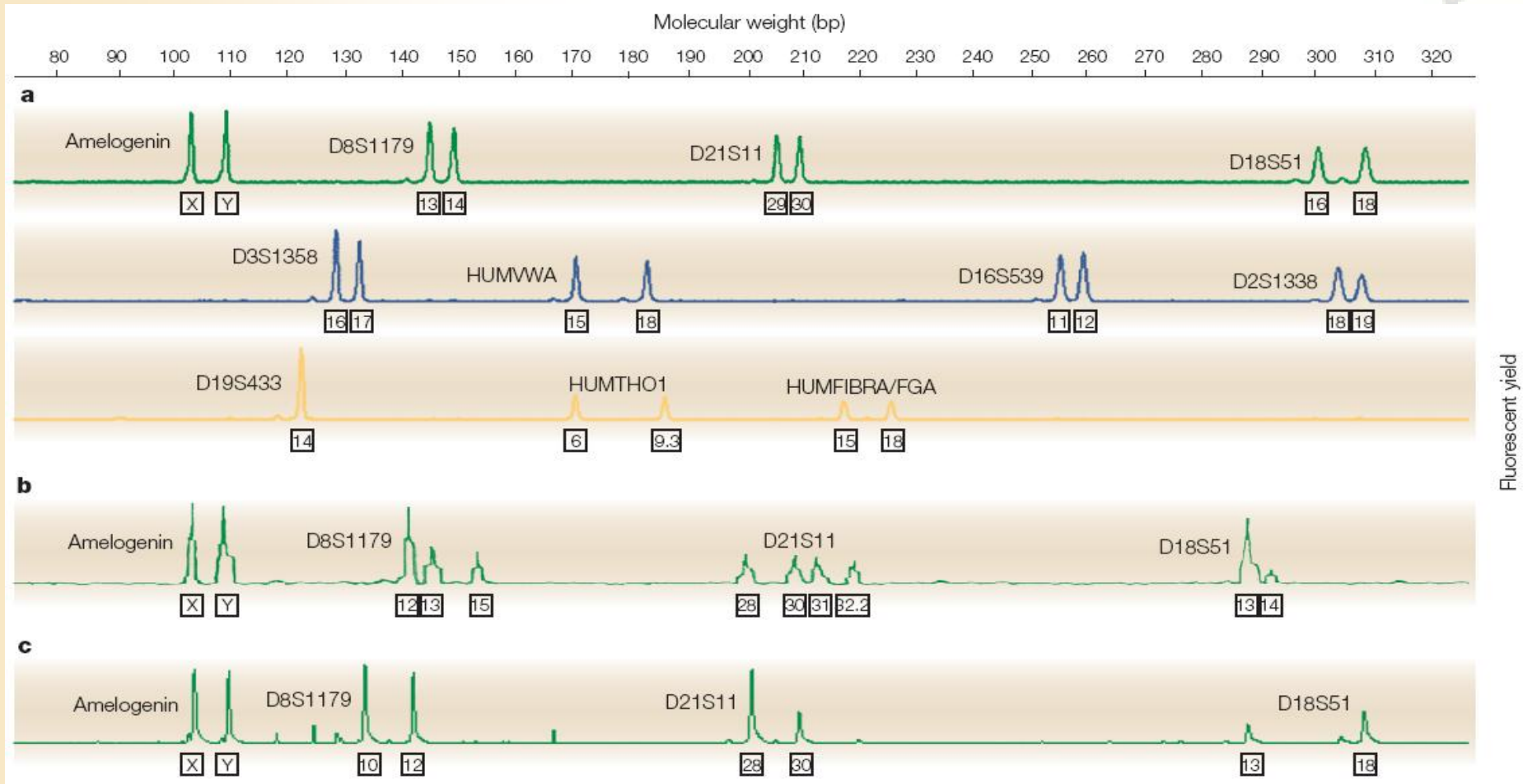
- Amplifikácia viacerých lokusov v jednej PCR reakcii



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



# Multiplex: viac STR systémov súčasne (DNA profil)



**Dnes používaných 13 - 16 STR systémov: až  $10^{15}$  –  $10^{20}$  rozličných možných typov DNA profilov (ale ľudí je len  $10^9$ )**

# Známe prípady identifikácie pomocou DNA

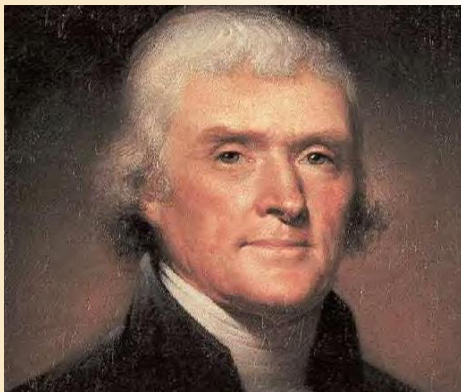


The Romanovs - a family portrait

**Romanovci:** identifikácia kostrových pozostatkov zavraždeného posledného ruského cára a jeho rodiny



**Joseph Mengele:** DNA pomohla identifikovať pozostatky najmasovejšieho vraha v histórii



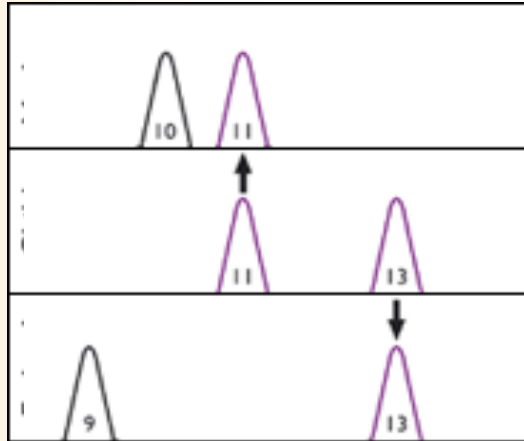
**Thomas Jefferson:** DNA potvrdila, že mal syna so svojou čiernou otrokyňou Sally Hemingsovou: **DNA chromozómu Y**

-----  
... B.Clinton – M. Lewinská ...

# Polymorfizmus STR pri určovaní paternity



matka

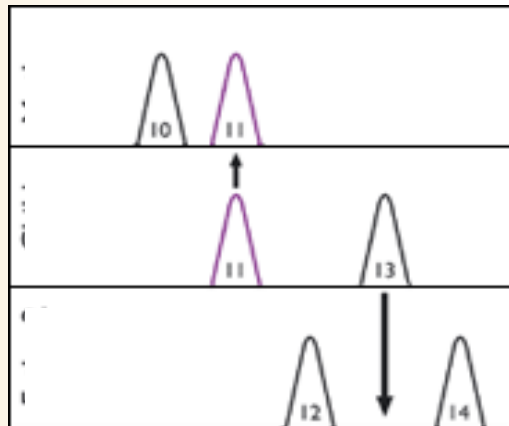


dieťa  
testovaný  
muž

**nevyúčený:** dieťa **má** spoločnú alelu s označeným mužom

Pravdepodobnosť jeho otcovstva je tým vyššia, čím je zriedkavejšia táto alela

matka



dieťa

testovaný  
muž

**vyúčený:** dieťa **nemá** spoločnú alelu s označeným mužom

**Pozor:** možnosť mutácie!

# Mikrosatelity pri určovaní paternity



- Genotypy matky, dieťaťa a označeného muža v štyroch STR polymorfizmoch (kapilárová elektroforéza)

Jedinci

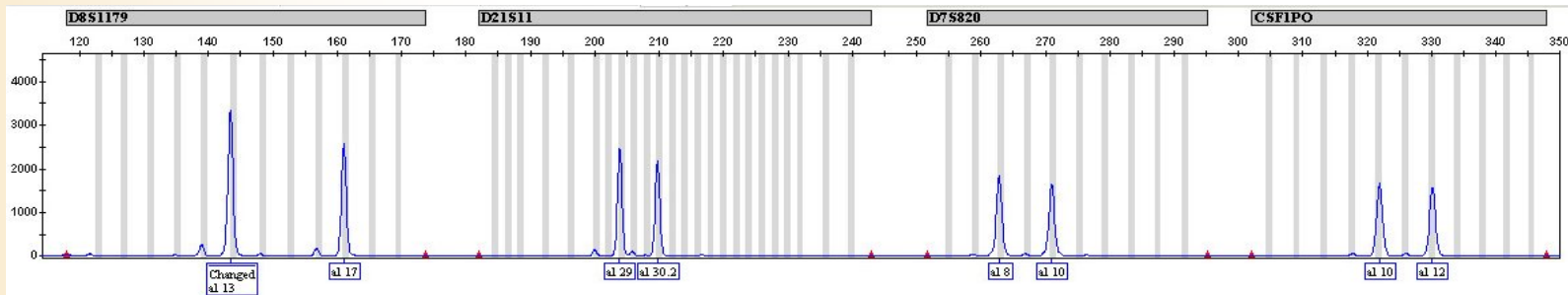
M

D8S1179

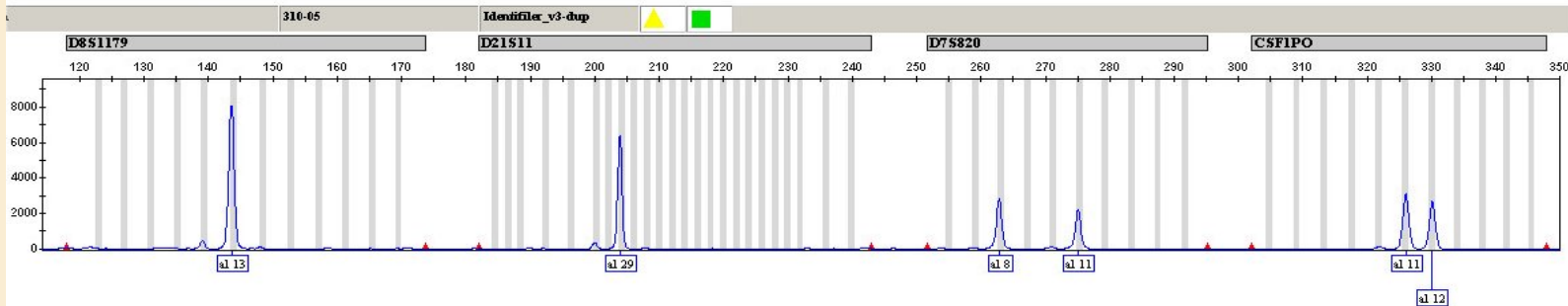
D21S11

D7S820

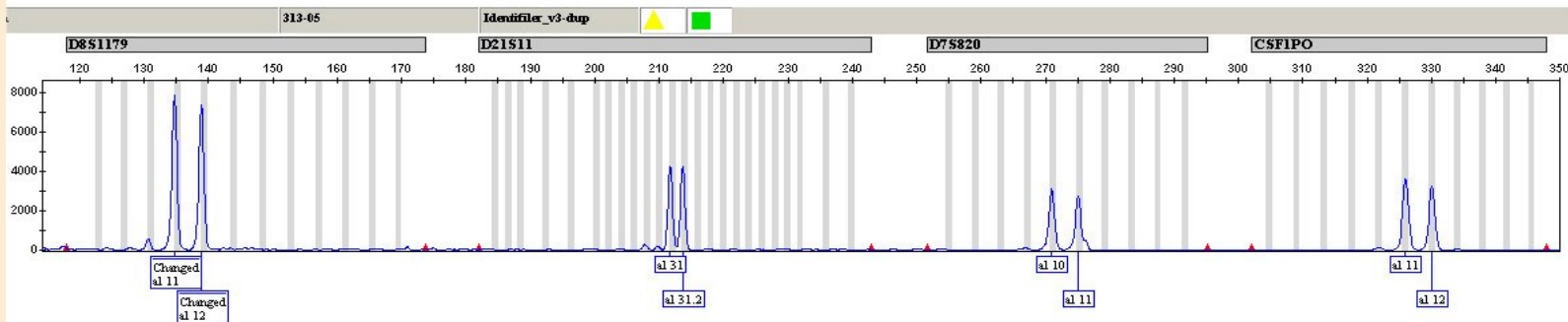
CSF1PO



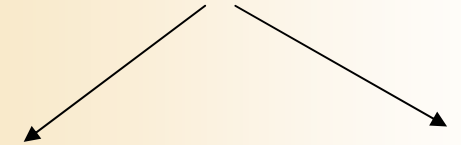
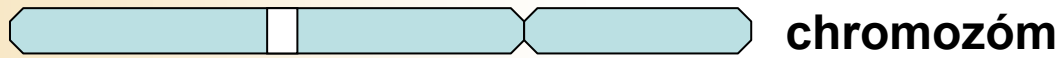
D



O



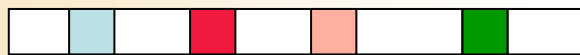
# Copy-number polymorphism (CNP, CNV)



referenčná DNA



delécia



inzercia



inverzia

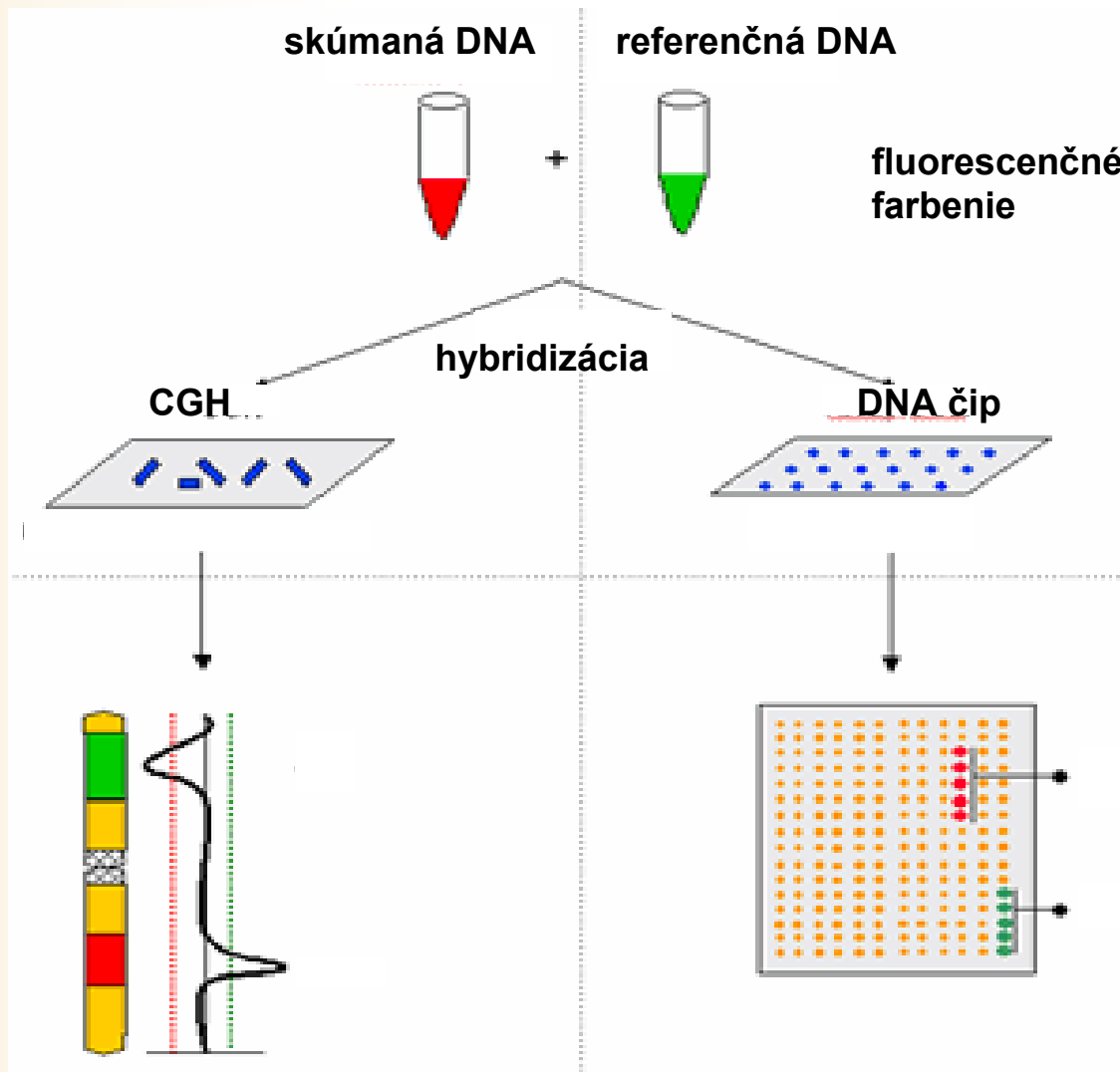


duplikácia (CNV)



segmentová duplikácia

# Detekcia CNV pomocou komparatívnej genómovej hybridizácie (CGH)



na  
chromozómoch

na DNA čipe

# Distribúcia CNP (CNV) na chromozóмоch



**zelené: delécie**

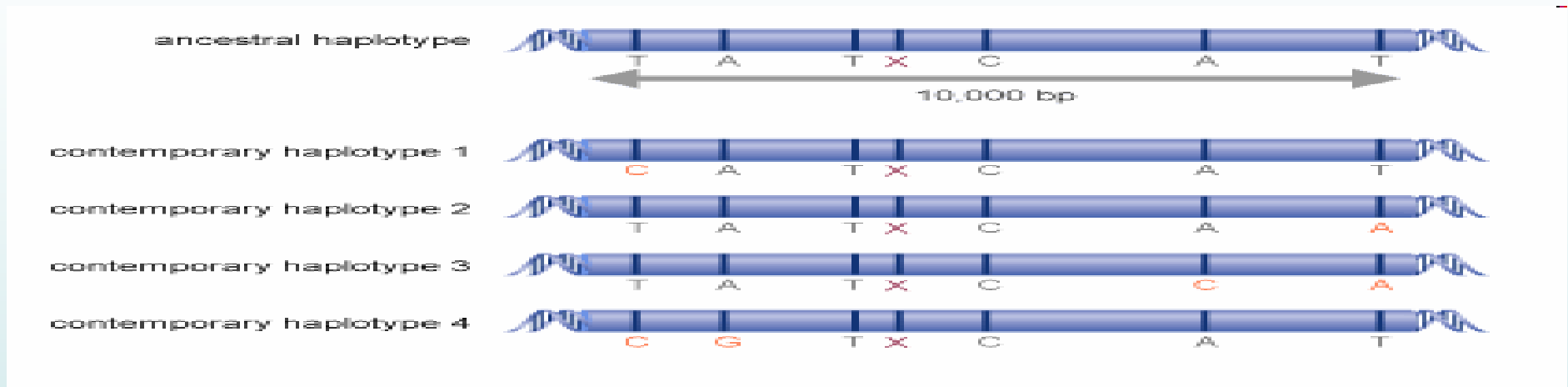
**modré: duplikácie**

**CNV pokrývajú asi 12% ľudského genómu**

**Až 50 génov je u každého jedinca duplikovaných!**

**Choroby: CMT, autizmus ...**

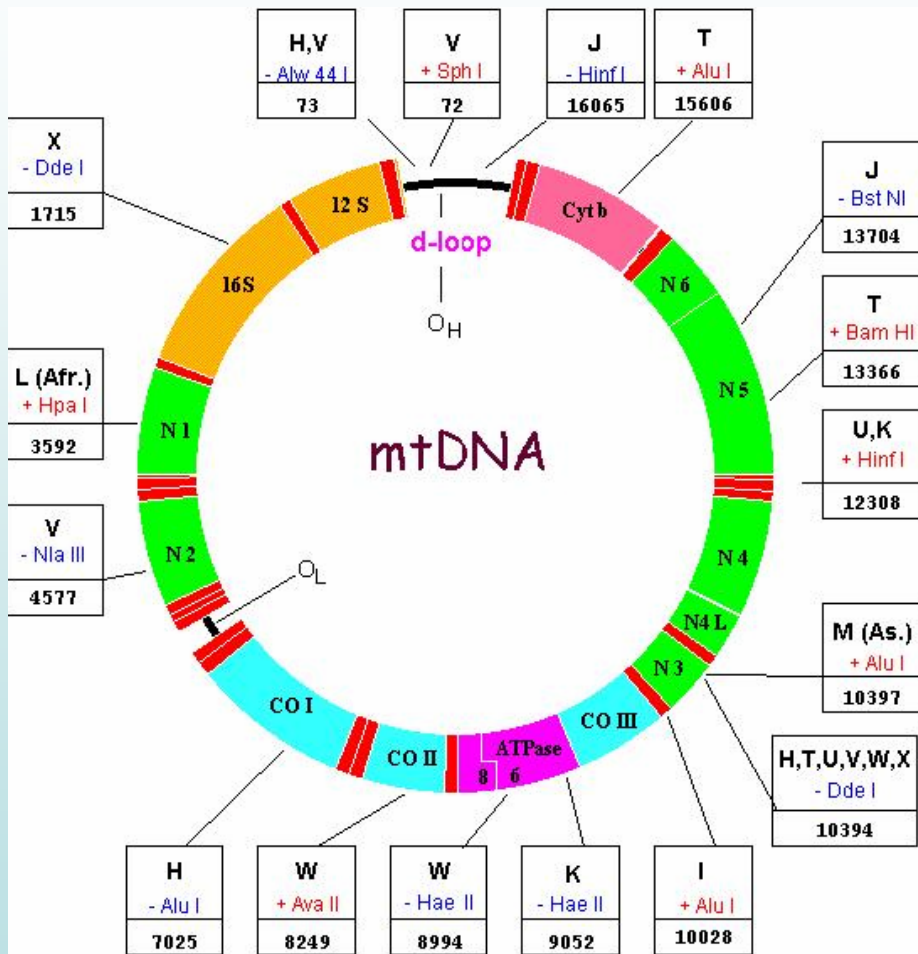
# Polymorfné haplotypy



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



# 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-chromozomálnej 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

