

# Polymorfismus lidské DNA



# Genetický polymorfismus

**Definice (Ford):** Geneticky podmíněný znak s nejméně dvěma diskontinuitními variantami v jedné populaci, přičemž četnost zřidkavější varianty je vyšší než 1%

- **Vylučuje:** negenetické znaky, kontinuální variabilitu, polytypismy, zřidkavé znaky (dědičné choroby)
- **Typy polymorfismů:**
  - morfologický
  - funkční
  - serologický
  - biochemický
  - **DNA:** je nejčastější, protože většina polymorfismů DNA nemá fenotypový projev

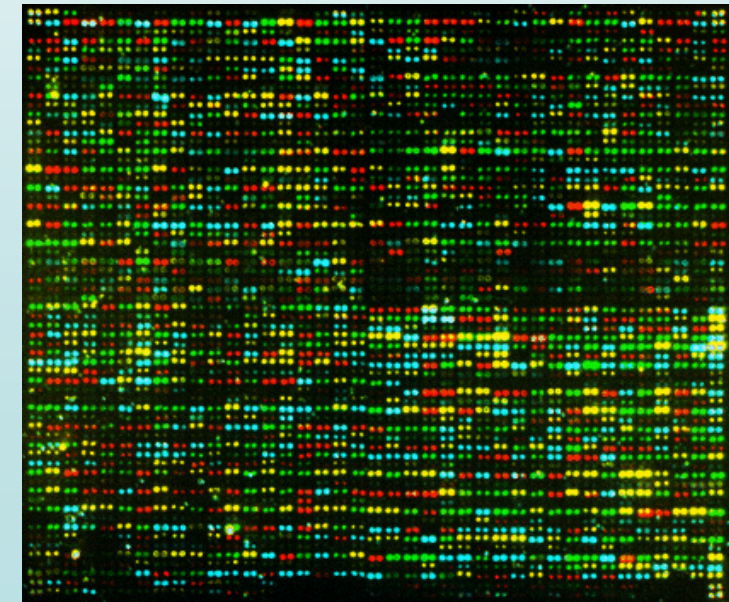
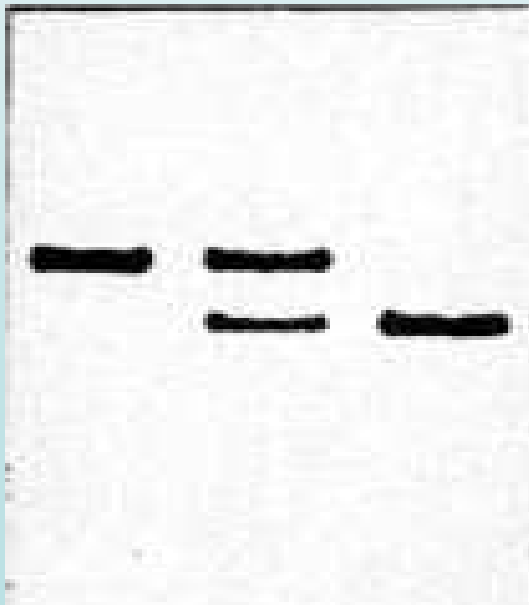
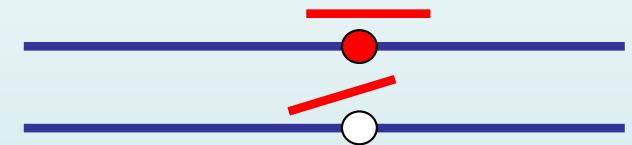
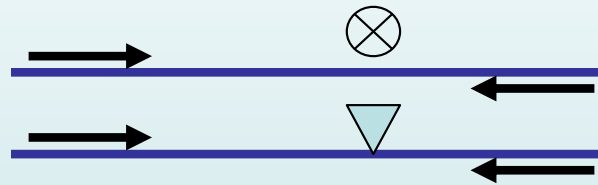
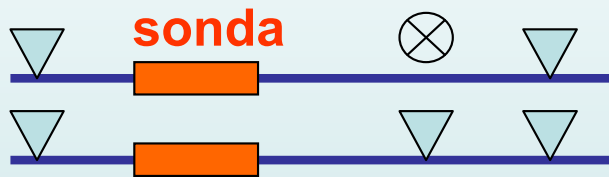
# Typy DNA polymorfismů

- **Bodový polymorfismus** (substituce jednotlivých bází; SNP)
- **Variabilní počet tandem. repeticí**
  - mikrosatelity (STR)
  - minisatelity (VNTR)
  - makrosatelity
- **Přítomnost/nepřítomnost sekvence** (Alu, L1 a i.) na specifickém místě (indel)



# Detekce SNP polymorfismu

- RFLP (restriction fragment length polymorphism)
  - restriční štěpení genomické DNA s následným Southern blottingem (dny)
  - PCR amplifikace s následným restričním štěpením (den)
- DNA array (čipy) analýza až 100 tisíc SNP v jedné analýze

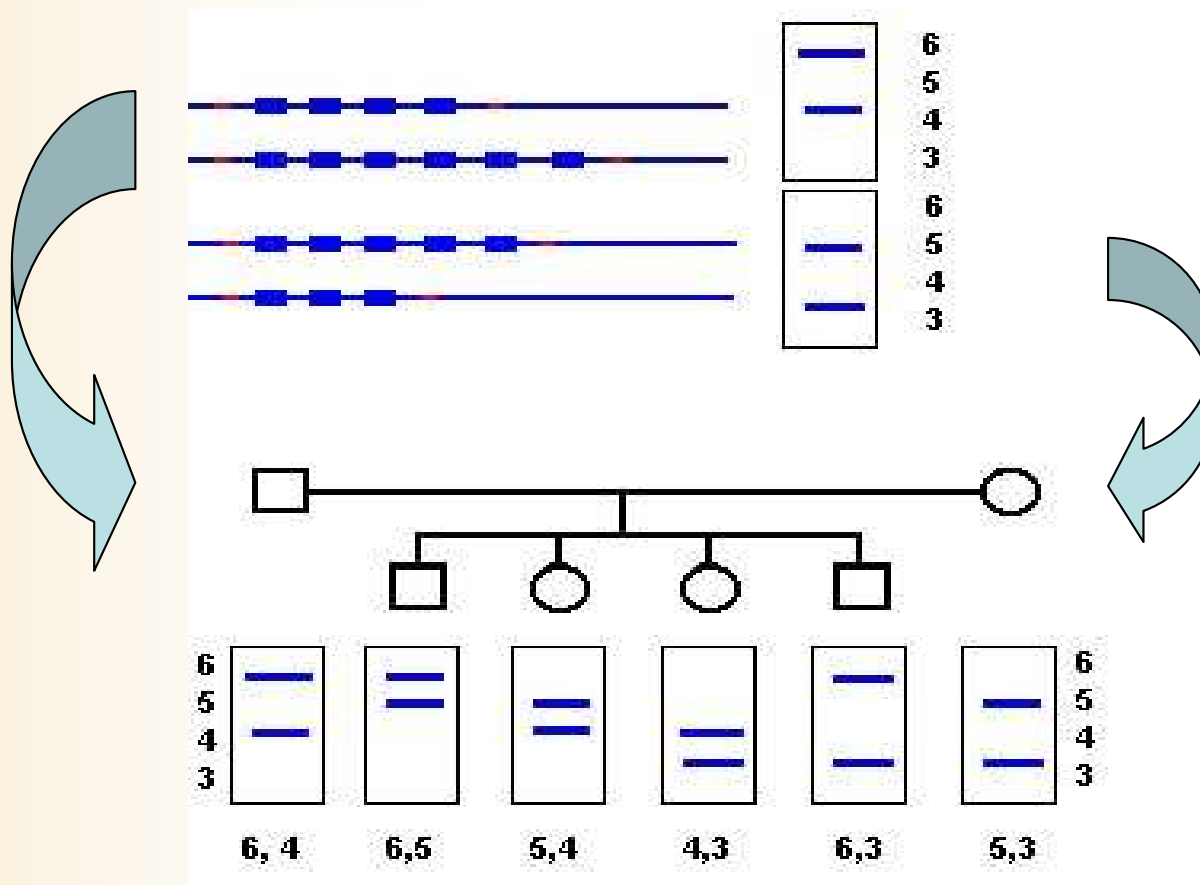


# Polymorfismus variabilního počtu tandemových opakování (VNTR, STR)

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

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

Detekce PCR amplifikací repetitivního úseku a separací na gelu:



# Polymorfismus variabilního počtu tandemových repeticí



## Minisatelity (VNTR)

- Délka základní repetice >6bp
- Počet opakování repetice 10 – 100 (1000)
- Výskyt preferenčně v telomerických oblastech ( bohaté na GC páry)
- Odhadovaný počet: cca  $10^4$
- Jednoduchá detekce: Southern, PCR
- Vznik nových alel: nehomologický crossover
- Mutační frekvence: vysoká, až  $10^{-3}$
- Využití: omezené; individuální identifikace
- Biologický význam: neznámý
- Spec. případ: minisatelit (TTAGGG) $_n$  - telomery

## Mikrosatelity (STR)

- Délka základní repetície 2 - 6bp
- Počet opakování repetice 2 – 100
- Výskyt rovnoměrně v genomu
- Odhadovaný počet řádově  $10^5$
- Jednoduchá detekce: PCR
- Vznik nových alel: replikační chyby
- Mutační frekvence: cca  $10^{-3}$
- Využití: rozsáhlé; individuální identifikace, nepřímá DNA diagnostika, identifikace génů
- Biologický význam: neznámý
- Výjimka: expanze trinukleotidů u některých chorob
- Nejčastější: „CA-repeat“ (asi 50 000 x v genomu)

# Typy mikrosatelitů

## Typy:

- Perfektní (jednoduché)  $(CA)_n$
- Imperfektní  $(CA)_n TTT (CA)_m$
- Složené  $(CA)_n AAA (AT)_m$

**V genomu:**  $(CA)_n$  - 0,5% (nejméně 50 000)

$(TC)_n$  – 0,2%

ostatní dinukl. – skoro 0%

**tri- a tetra:** zřídka, ale  
nejčastěji používané v praxi



# Inzerčno-deleční polymorfismus (indel)

- Indel od 1 bp po několik Mb
- inserce Alu, L1 – retrotranspozice
- Velmi zřídka jev: inserce jsou unikátní události
- Známe původní stav (bez inserce)
- Inserce (Alu, L1) také do kódujících sekvencí → patologie

inzerčně-deleční polymorfismus Alu-sekvence (300 bp) v Y-chrom. DNA:



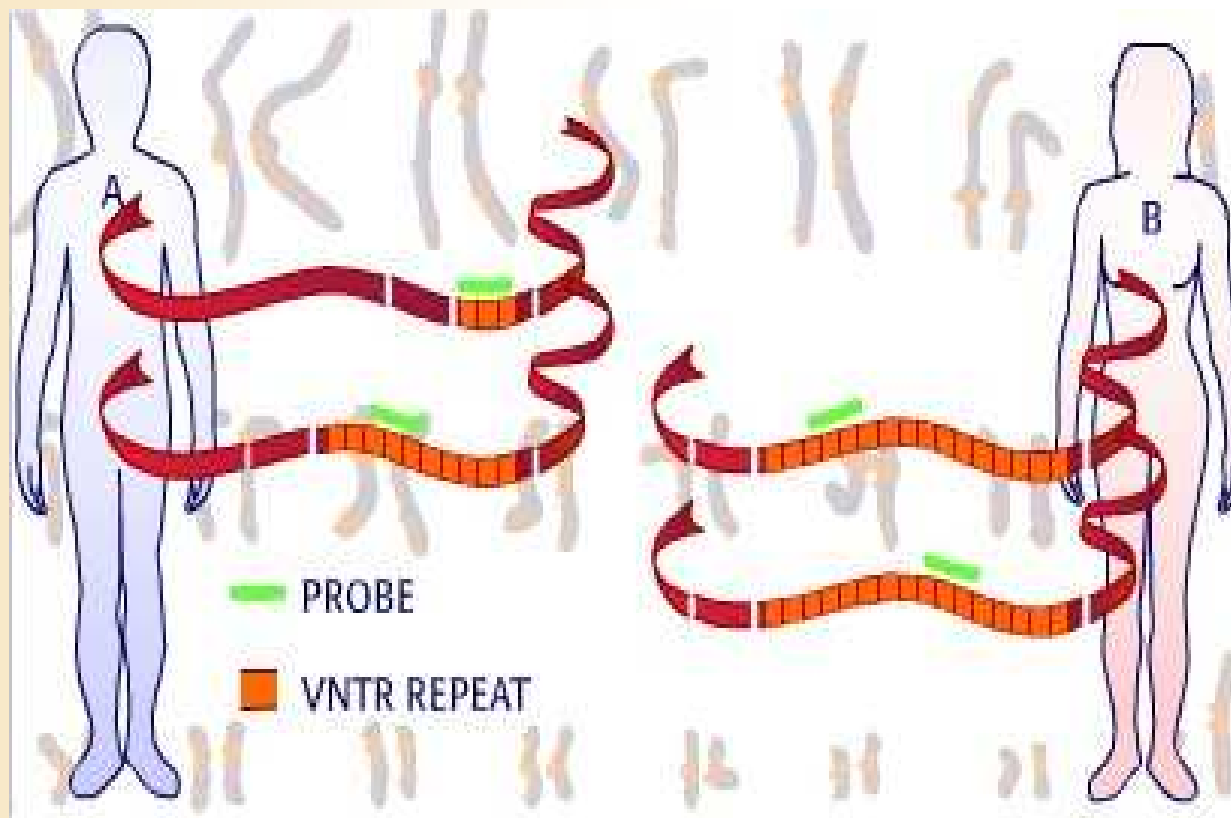
# Využití polymorfismů DNA

- Identifikace osob/vzorek DNA (A. Jeffreys 1985)
- Určování paternity (VNTR, STR)
- Nepřímá dg. monogénních chorob
- Hledání nových genů (poziční klonování genů)
- SNP a multifaktoriální choroby?

# Individuální identifikace „DNA fingerprint“

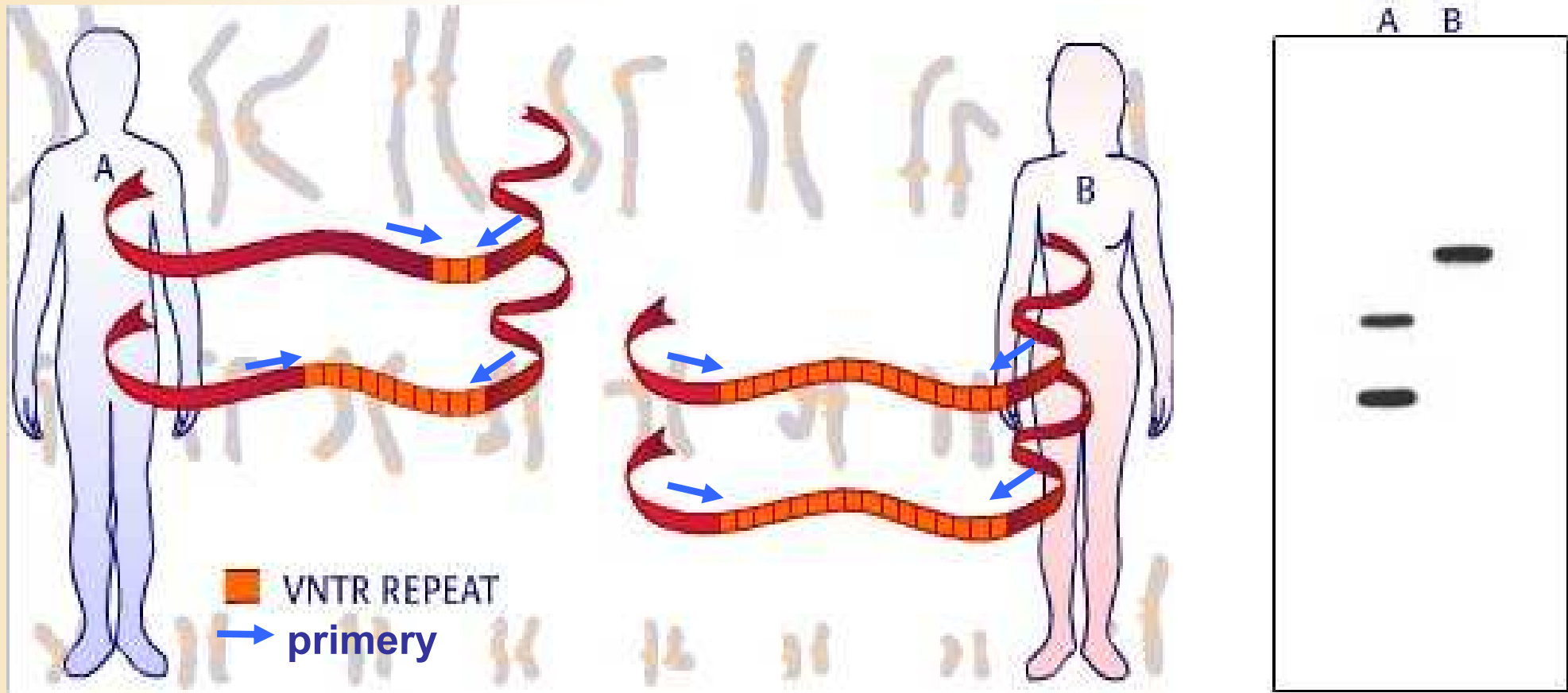


- Alec Jeffreys, 1984
- Restrikční štěpení genomické DNA → elektroforetická separace → Southern blotting s VNTR sondou (GGGCAGGAXG)



# PCR amplifikace VNTR polymorfismu

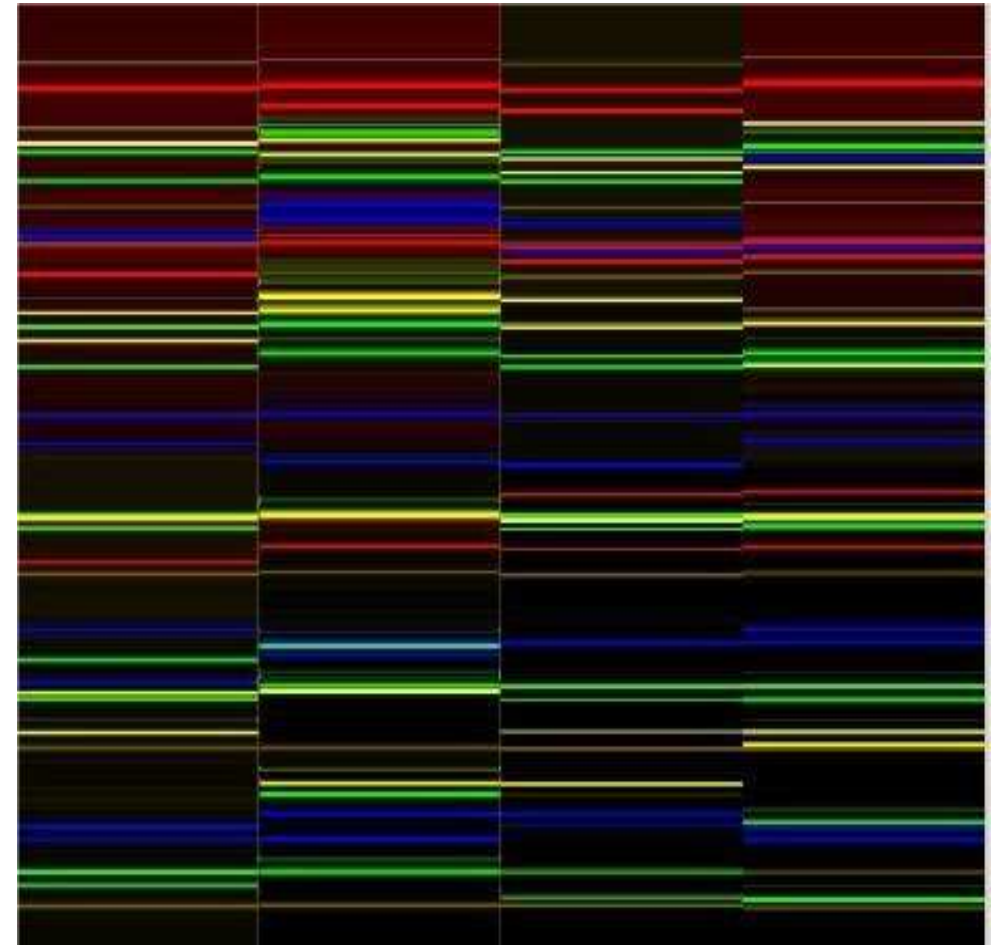
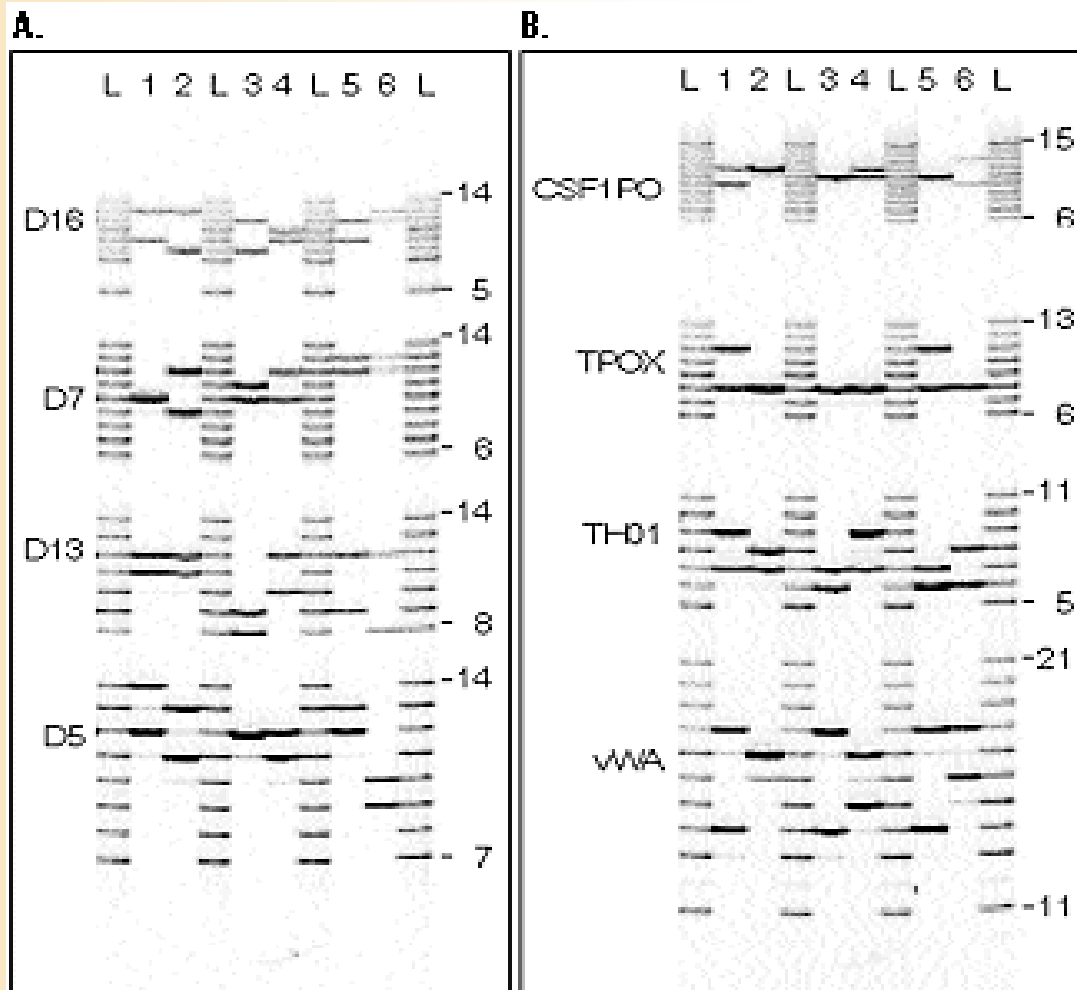
- amplifikace konkrétního polymorfismu/lokusu pomocí specifických primerů ( leží mimo repetice) + elektroforéza



# Multiplex PCR



- Amplifikace více lokusů v jedné PCR reakci



- vlevo - separace na akrylamidovém gelu a vizualizace stříbrem
- vpravo - fluorescenční značení primerů a kapilárová elektroforéza

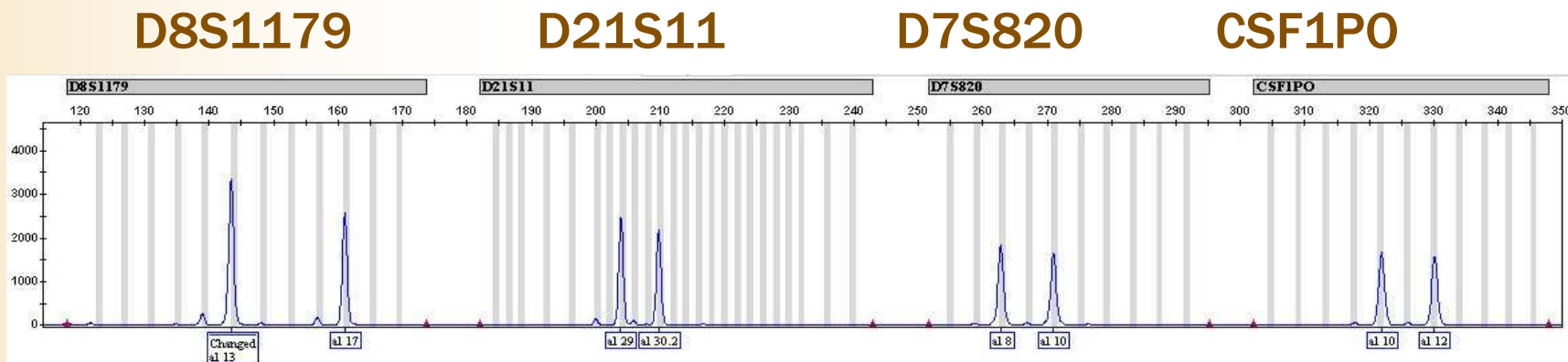
# Mikrosatelity: variabilita v populaci



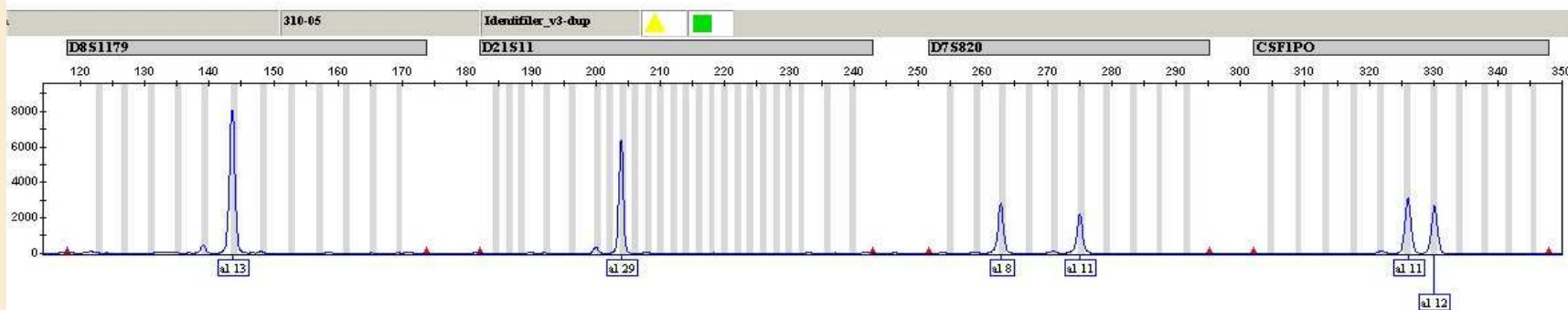
- Genotypy třech lidí v čtyřech STR polymorfismech (fluorescenční značení a kapilárová elektroforéza)

Jedinci

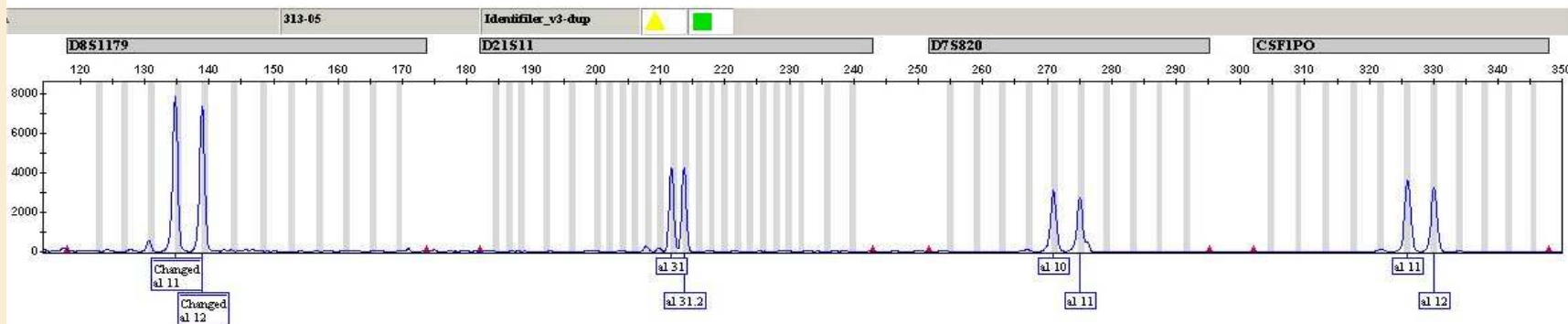
1.



2.



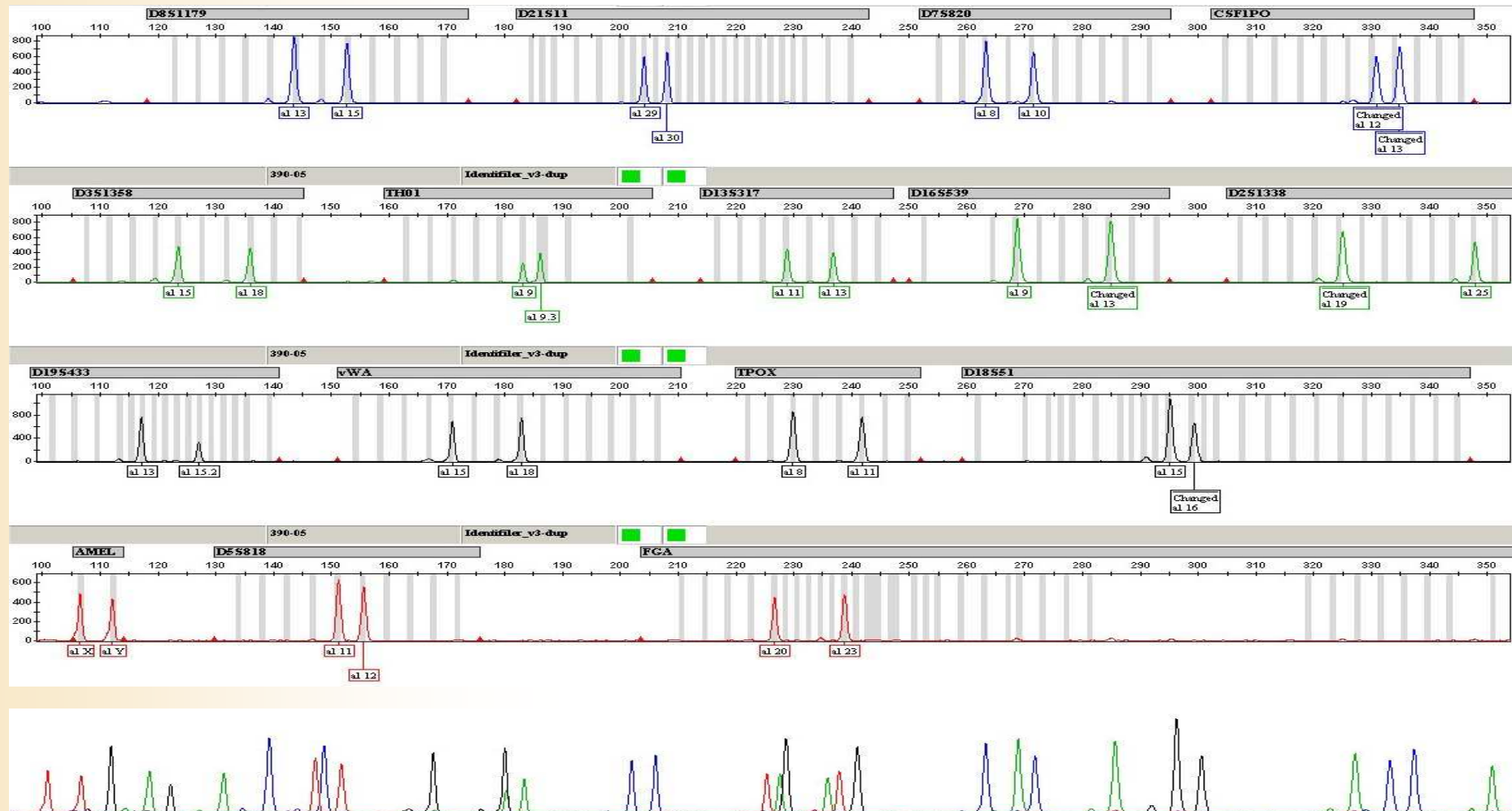
3.



# Identifikace osob

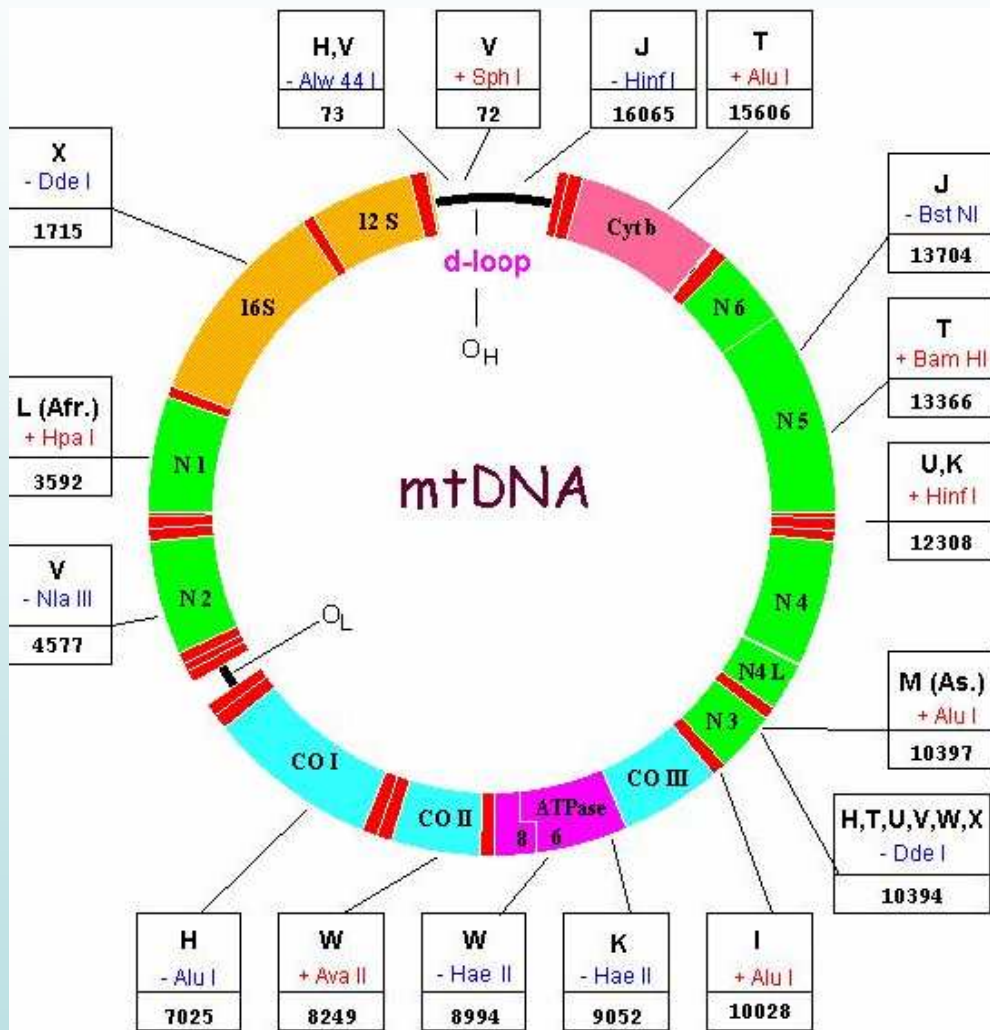


- Multiplex PCR 16 fluorescenčně značných mikrosatelitových polymorfismů
- Pravděpodobnost identity dvou náhodných jedinců  $10^{-17}$





# Polymorfismus mtDNA



## Polymorfismy mtDNA:

- Mimo D-kličky 10x častější než v gDNA
- V rámci D-kličky až 100x častější než v gDNA
- Žádná rekombinace: haplotypy; haploskupiny
- Matrilinéární dědičnost
- Využití: studium evoluce lidských populací



# Přenos mtDNA, Y-chromozální DNA a autozomální DNA



Před 5 generacemi měl každý jedinec  $2^5 = 32$  předků, z nich jen od jednoho zdědil Y, od jednoho mtDNA, ale od každého část autozomální DNA

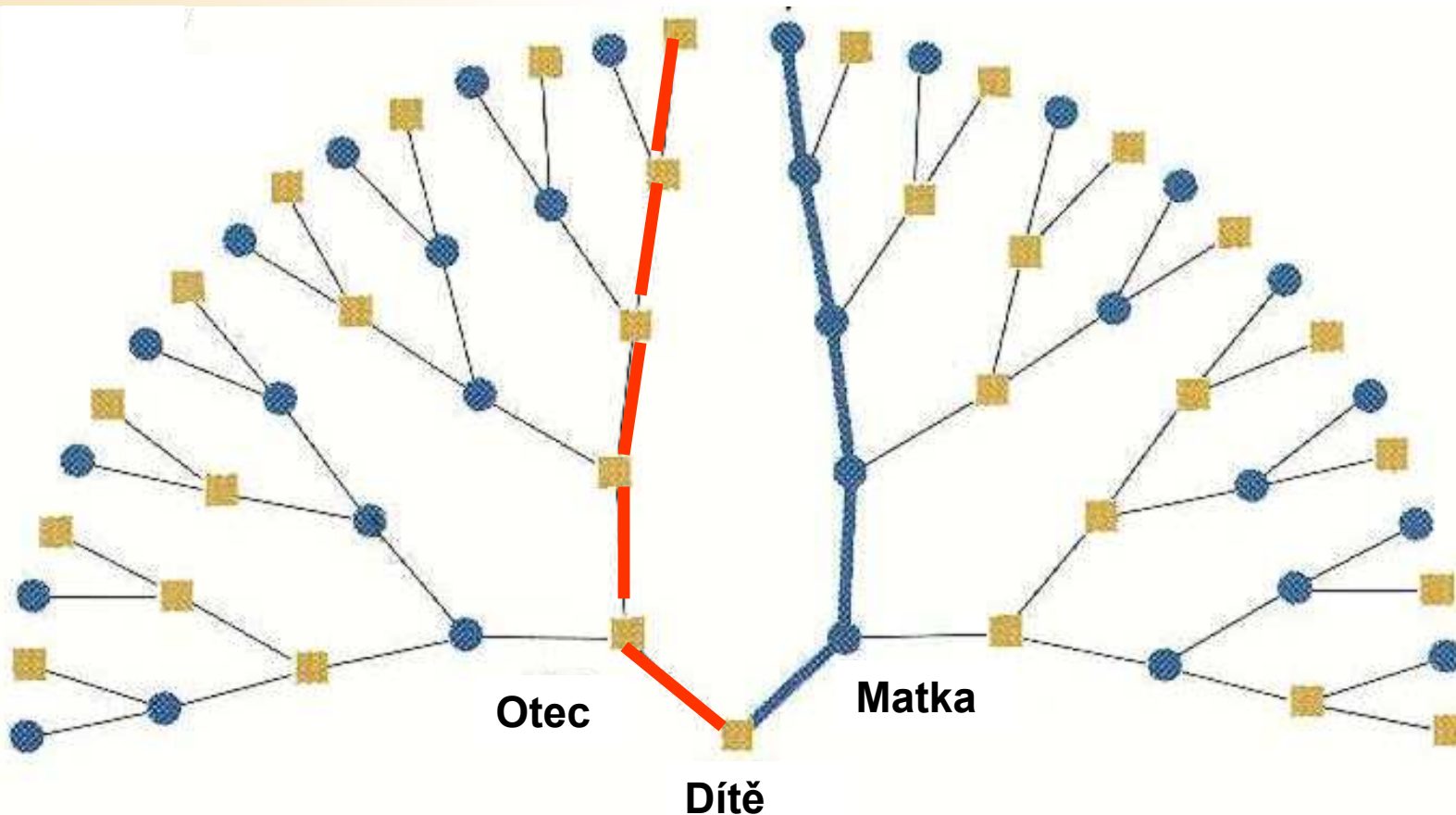
mtDNA a Y-DNA: žádná rekombinace



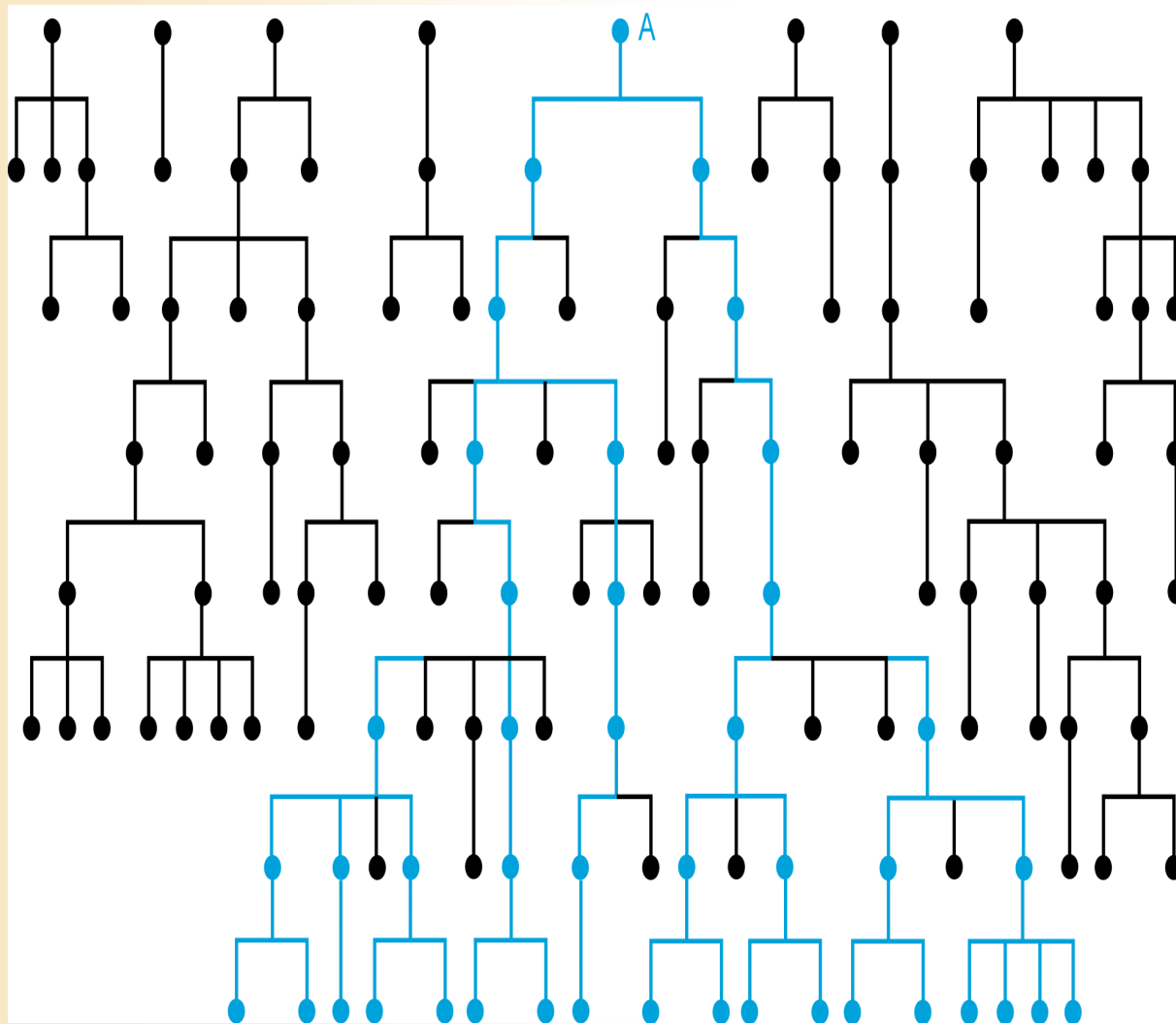
přenos „*en bloc*“ přes generace



Každý má právě jednoho Y-předka a jednoho mt předka v kterékoliv předešlé generaci

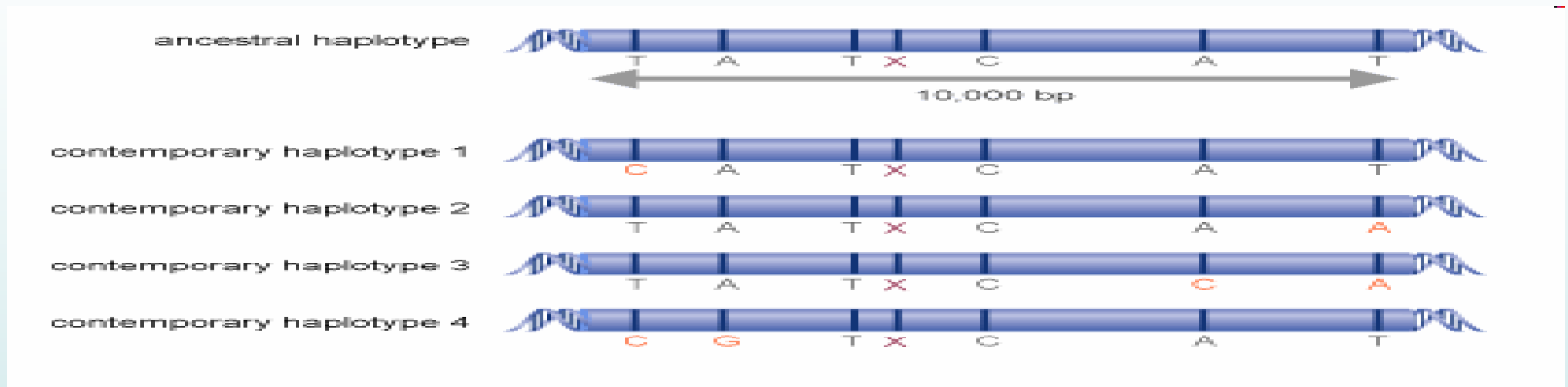


# Koalescence linií mtDNA a Y-DNA „mitochondriální Eva“



- Možné najít společného předka pro členy populace, protože
- v každé generaci dojde k zániku a naopak k zmnožení některých linií,
- a po čase v rovnovážné populaci převládne mt/Y DNA odvozené od jednoho společného předka

# Polymorfní haplotypy



- **Haplotyp**: soubor alel na jednom chromozomu, které se jen zřídka oddělí rekombinací
- **Haplotypové bloky** v lidském genomu: rekombinační „cold spots“
- **Využití**: studium „věku“ mutací