

Podsumowanie z ostatniego wykładu:

- celem procesu izolacji jest uzyskanie wysokocząsteczkowego DNA, występującego w ekstrakcie w dużym stężeniu.
- w uzyskanym DNA znajduje się ogromne bogactwo informacji – zbyt zasobne, by można je było analizować na poziomie populacyjnym.
- w uzyskanym DNA poszczególne geny (markery genetyczne) znajdują się w niewielkiej liczbie kopii – zbyt małej by można je było analizować technikami biologii molekularnej.
- technika łańcuchowej reakcji polimerazy PCR polega na wyodrębnieniu z uzyskanego DNA konkretnego, niewielkiego fragmentu DNA i powieleniu go do ilości umożliwiającej dalsze analizy.

Zastosowanie markerów mikrosatelitarnych w ekologii

Marker – jest to niekoniecznie funkcjonalna część genomu, ale informatywna i łatwa w analizie. Jedną z klas markerów to właśnie markery mikrosatelitarne – czyli loci ze zmienną liczbą tandemowych powtórzeń (VNTR). Taka powtarzająca się sekwencja to motyw, a motywy razem tworzą zgrupowania.

DNA Satelitarne: motyw – 100 i więcej bp; zgrupowanie – $10^3 - 10^7$ bp

DNA minisatelitarne: motyw – 10-100 bp; zgrupowanie – 10^2-10^5 bp

DNA mikrosatelitarne: zgrupowanie – do około 10^2 ; motyw – różne wersje 1-6, 2-8, 1-5, 2-6.

Podział sekwencji mikrosatelitarnych ze względu na długość motywu, np.:

- sekwencja jednonukleotydomowa: AAAAAAAAA(A)_n

- sekwencja dwunukleotydomowa prosta: GTGTGTGTGTGT(GT)₃₉ itd.

Są to tzw. sekwencje mikrosatelitarne czyste/doskonale/zupełne. Nie zawsze jednak jest tak prosto, często sekwencje są:

- złożone, gdy są 2 różne motywy – CACACACACAGAGAGAGAGA

- kompleksowe, gdy są więcej niż 2 motywy – (TTC)₃₋₄(T)₆(TC)₀₋₁(CYKY)_nCTCC(TTCC)₂₋₄

- sekwencje niezupełne, gdy są przerwane krótkim motywem niesatelitarnym(AC)₁₄AGGAA(AG)₁₂

Seqwencje mikrosatelitarne mają swój „cykl życiowy”, nie odbywa się on jednak na przestrzeni życia osobnika, czy populacji, ale w skali ewolucyjnej. Ogólnie są to dość stare struktury, ale szacuje się, że powstały już po rozdzieleniu się linii Prokariota i Eukariota.

Miejsce narodzin, tzw. cryptic simplicity – fragmenty genomu podatne na tworzenie się mikrosatelit przez mutację punktową. Od kiedy można mówić, że jest to już mikrosatelita? Zwykle powinno być co najmniej 6 par zasad, a więc np. 3 razy powtórzenie motywu dwunukleotydomowego, albo 2 razy powtórzenie czteronukleotydomowego – to już w przyszłości może podlegać dalszym procesom charakterystycznym dla mikrosatelit.

Przykład książkowy to pseudogen globinowy u naczelnych, u małp są 4 powtórzenia motywu a u człowieka 5.

Dorastanie sekwencji mikrosatelitarnej.

Proste zgrupowania są podatne na różne procesy przy replikacji jak np. poślizg replikacji, nierównomierny crossing over, błędne parowanie nici opóźnionej – na nici matrycowej lub tworzonej pojawiają się pętle, mikrosatelity są na to podatne, w wyniku tego po replikacji powstaje jeszcze więcej motywów (jeśli pętla na nowej nici), albo liczba ich się zmniejsza.

Podatność DNA na powyższe procesy decyduje o tym, że obserwujemy w populacjach polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych. Różnią się one liczbą motywów w zgrupowaniu.

Jeśli mamy np. osobnika gdzie w obu allelach konkretne sekwencje mikrosatelitarne są tej samej długości to jest to homozygota. A jeśli są różne – heterozygota. Jeśli badamy np. trzy różne sekwencje, to może być w populacji 6 genotypów: 1/1, 2/2, 3/3, 1/2, 1/3, 2/3. zwykle jednak bada się tych alleli nawet po kilkadziesiąt.

Im dłuższy jest motyw tym większe tempo mutacji. Sekwencje takie mutują 6 razy szybciej niż normalny genom kodujący. Większość mutacji to insercje lub delecje jednego motywu. W dłuższych zgrupowaniach jest przewaga inercji pojedynczych motywów nad delecjami i insercjami większej liczby motywów.

Są różne modele tego jak te mutacje zachodzą w populacji:

- model allelu nieskończonego – jeśli sekwencja mikrosatelitarna mutuje, to w danej populacji powstaje nowy allel, z tym, że jest jednakowe prawdopodobieństwo tego ile motywów ulegnie zmianie. Zawsze jednak powstaje unikatowy allel.
- model stopniowych mutacji – mutacja zachodzi tylko w 1 motywie. Jest więc tzw. „pamięć allelu”, można stwierdzić które sekwencje są od siebie bardziej odległe w czasie – dłużej odizolowane, po tym jak się różnią.
- model dwufazowy – łączy dwa powyższe, ponieważ większość mutacji jest stopniowa, ale 5-10% to większe mutacje.
- model k-allelu

Homoplazja – niezależne pojawianie się w dwóch zupełnie odrębnych liniach ewolucyjnych takiego samego allelu.

Śmierć sekwencji mikrosatelitarnej

Na mechanizm selekcyjny tych sekwencji nie ma bezpośrednich dowodów, ale są przesłanki za tym, jak np. choroby ekspansji powtórzeń trójnukleotydowych, np. choroba Huntingtona, albo groźna głównie dla mężczyzn – zespół wrażliwego chromosomu X – powstają na nim tzw. łamliwe miejsca.

Podatność dłuższych zgrupowań na duże delecje -> odtwarzanie się zgrupowań o małej liczbie motywów -> podatność długich zgrupowań na substytucje nukleotydowe -> powstawanie sekwencji niepełnych i osłabienie procesów generujących ekspansję -> degradacja do poziomu regionów cryptic simplicity.

Sekwencje mikrosatelitarne na tle genomu

- sekwencje mikrosatelitarne są rzadkie w regionach kodujących;
- najczęściej występują sekwencje z powtórzeniami dwunukleotydowymi;
- dłuższe i częstsze są u kręgowców niż bezkręgowców i dłuższe u kręgowców zmiennocieplnych niż stałocieplnych;
- insercje i delecje są najczęściej 3-nukleotydowe, bo nie zmienia się wtedy ramka odczytu.

Funkcje i efekty obecności mikrosatelit w genomie

- wpływ na organizację chromatyny;
- na regulację procesów metabolicznych w DNA;
- na regulację działania genów (transkrypcja, translacja, wiązanie białek).

Sekwencje te nie powinny być funkcjonalne, aby nie odzwierciedlały efektów doboru, tylko izolację. Czasami mają one jednak funkcje. A czasami są rejony gdzie u wielu różnych gatunków jest dużo takich sekwencji, np. centromery, telomery.

Metody analizy sekwencji mikrosatelitarnych

Namnaża się takie sekwencje metodą PCR, jeśli są dłuższe niż 6 par, to można rozdzielić na żelu, ale zwykle używa się już automatyczne sekwenatory.

Loci utrwalone – takie które występują tylko w postaci jednego allelu. Są takie np. u kuny domowej i leśnej i można po tym te dwa gatunki odróżnić.

Szacowanie zmienności genetycznej

Różnorodność alleliczna (A) – średnia liczba alleli występująca w badanych loci

mikrosatelitarnych (A – liczba stwierdzonych alleli/liczba analizowanych loci)

Heterozygotyczność (H) – udział loci heterozygotycznych w całej puli badanej (H – liczba loci heterozygotycznych/liczba badanych loci x liczba badanych osobników)

Zróźnicowanie genetyczne – to polimorfizm między populacjami

Zmienność genetyczna – to polimorfizm w obrębie populacji, w danej grupie

Szacowanie zróźnicowania genetycznego między populacjami:

- Fst – bazuje na różnicach we frekwencji alleli między populacjami (model nieskończonego allelu),

- Rst – bazuje na różnicach w liczbie motywów alleli występujących w różnych populacjach (model stopniowych mutacji)