

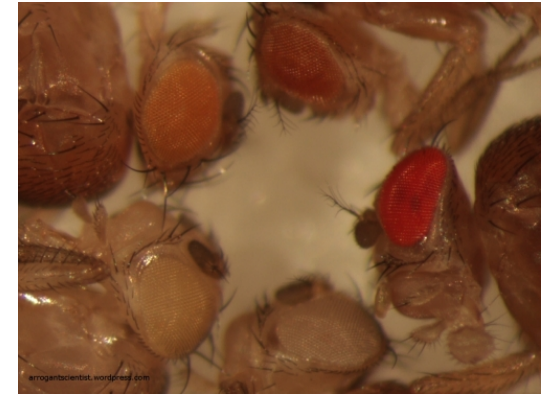
TEMA 1

Tipus de marcadors genètics

1. Importància de la variabilitat biològica en l'anàlisi genètica
2. Marcadors morfològics, bioquímics i moleculars
3. Identificació d'un marcador molecular lligat a un fenotip mutant
4. Resolució de problemes

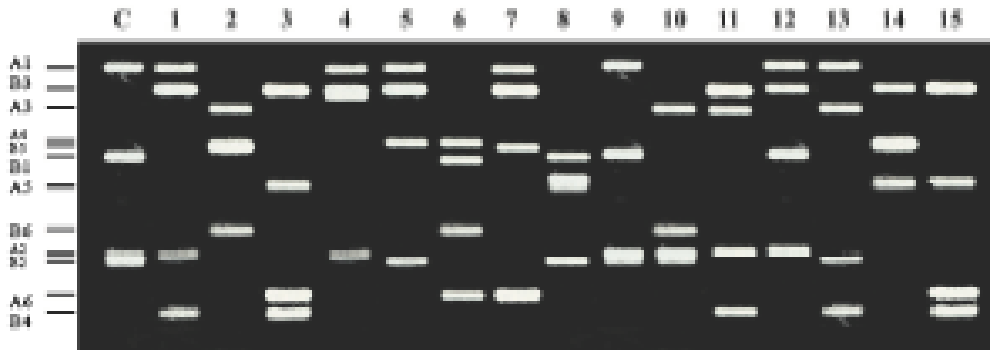
1. Importància de la variabilitat biològica en l'anàlisi genètica

L'anàlisi genètica no seria possible si no tinguérem variants per a un mateix caràcter que ens permetessen visualitzar diferències que suposem que existeixen a nivell del gen, és a dir, organismes o cèl·lules que difereixen en trets particulars.



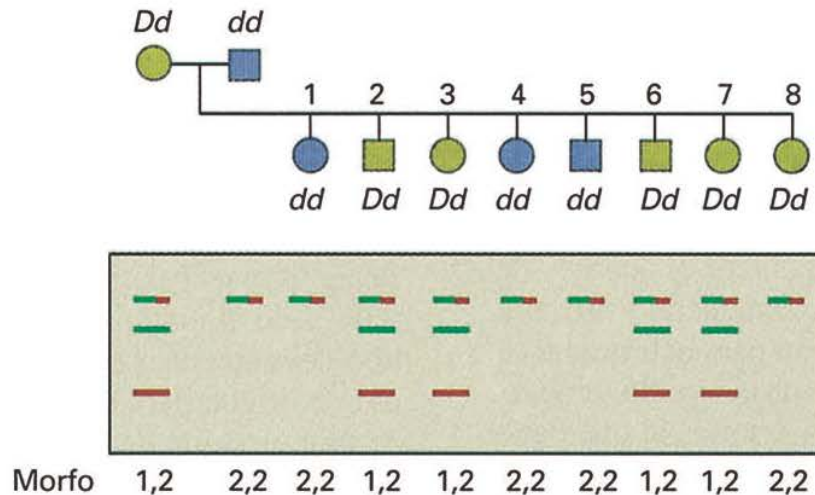
Aquestes variants són **manifestacions fenotípiques de variacions a nivell molecular**, és a dir, en el mateix DNA.

No obstant això, amb les noves tècniques moleculars l'anàlisi genètica es pot fer sense necessitat de variants fenotípiques, ja que la variabilitat estudiada pot manifestar-se únicament a nivell de DNA.



Variabilitat entre membres d'un mateix equip de futbol :

Gel d'agarosa en el qual s'han separat fragments de DNA obtinguts per la tècnica de PCR (*polymerase chain reaction*) a partir de mostres de sang.



Genealogia amb un tret fenotípic (representat pel locus D/d) i un polimorfisme d'RFLP (bandes de fragments de DNA).

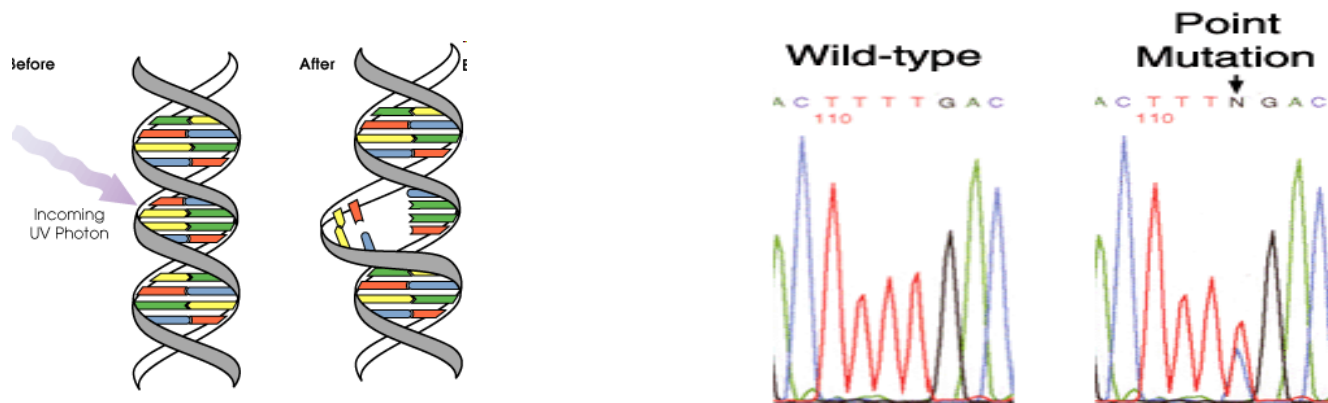
La mutació és responsable d'aquesta variabilitat.

La mutació permet a l'organisme diferenciar-se de la resta d'individus de la població.

- Si la modificació no es diferencia significativament a nivell funcional, es parla de **VARIACIÓ POLIMÒRFICA**.

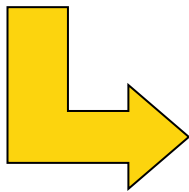
“Un locus és polimòrfic si presenta més d'un al·lel en la població i el menys comú apareix amb una freqüència igual o superior a l'1%”.

- Si el canvi afecta seriosament la funció gènica, llavors es parla de **MUTACIÓ**, en la seua accepció més comuna.



2. Marcadors morfològics, bioquímics i moleculars

Un marcador genètic és una característica morfològica, bioquímica o simplement a nivell del DNA que, a causa del lligament, pot fer-se servir per indicar la presència d'un gen d'interès.



És una variant al·lèlica que s'utilitza per seguir la pista d'un gen.

Els marcadors genètics poden ser:

- Morfològics (a nivell de l'aspecte extern)
- Bioquímics (a nivell de proteïnes)
- Moleculars (a nivell del DNA)

Propietats desitjables dels marcadors genètics:

- **Altament polimòrfics:** depèn del marcador i del mètode de detecció.
- **Reproduïbles.**
- **Codominants:** són més informatius (ens permeten distingir l'heterozigot de l'homozigot).
- **Alta densitat:** distribuïts de manera uniforme en tot el genoma, sobretot si es fan servir per a la cartografia genètica.
- **Discriminants:** capaços de detectar diferències entre individus estretament relacionats (identitat genètica).
- **No subjectes a influències ambientals:** independència de l'ambient, de l'estadi de desenvolupament...
- **Fàcils de mesurar.**
- **Barats.**

Marcadors morfològics

- Els marcadors morfològics van ser el primer tipus de marcadors utilitzats (Mendel).
- Es consideren marcadors morfològics els caràcters d'un individu que s'expressen en un ambient específic. Són marcadors fenotípics, d'expressió.
- Són característiques fenotípiques de variació discreta → es poden identificar fàcilment de forma visual.

Avantatges:

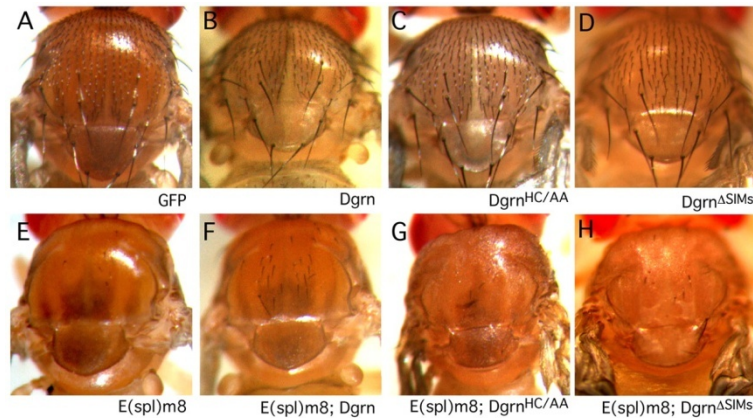
- Fàcilment disponibles.
- La seua avaluació requereix, generalment, d'equip senzill.
- Constitueixen la mesura més directa del fenotip.

Desavantatges:

- Requereixen un coneixement pràctic de l'espècie.
- Estan subjectes a influències ambientals.
- El seu nombre és limitat.
- No acostumen a ser codominants.

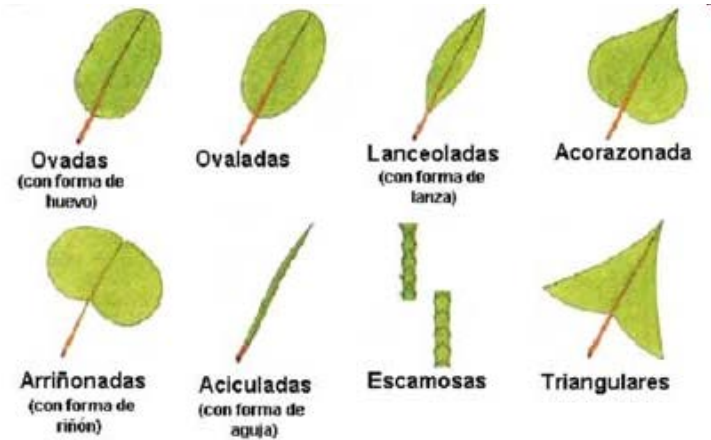
Marcadors morfològics. Exemples:

Drosophila: color d'ulls, forma de les ales, nombre de quetes



Marcadors morfològics. Exemples:

Plantes: color i aspecte de la llavor, forma de la fulla, color de la flor...



Marcadors bioquímics

- Són de caràcter proteic: hormones, enzims, anticossos, etc., presents en líquids corporals o teixits que s'utilitzen per detectar variabilitat genètica. Són polimorfismes d'expressió (dades fenotípiques).
- La majoria estan basats en les propietats de migració de les proteïnes, que permeten la seua separació mitjançant electroforesi.
- Es poden detectar mitjançant assajos histoquímics específics o mitjançant anticossos.

Avantatges:

- Requereixen d'un equip de laboratori relativament senzill.
- Són un valuós complement de l'avaluació morfològica.

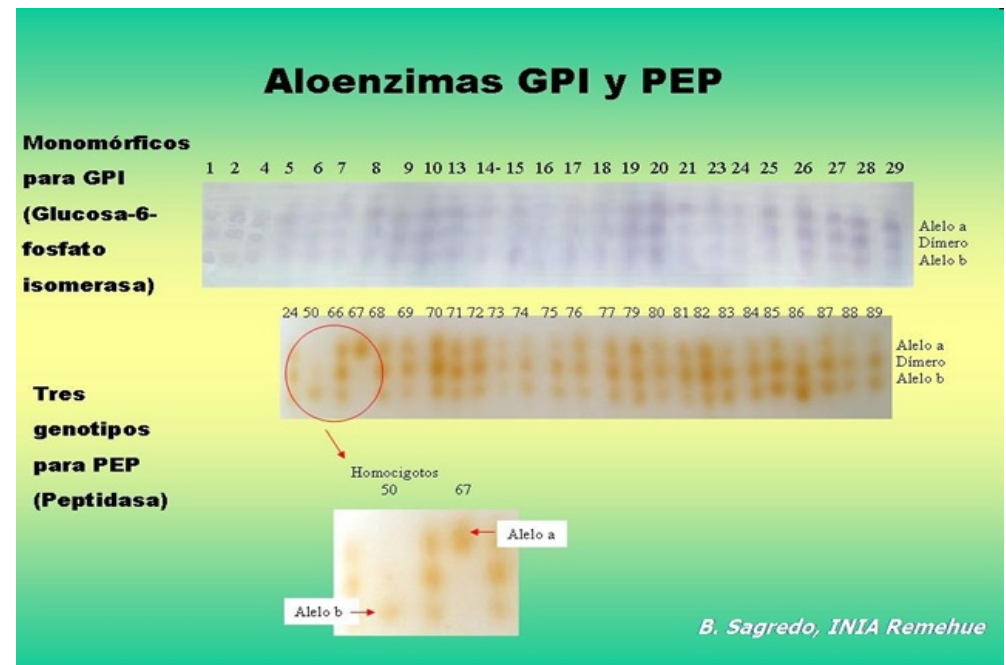
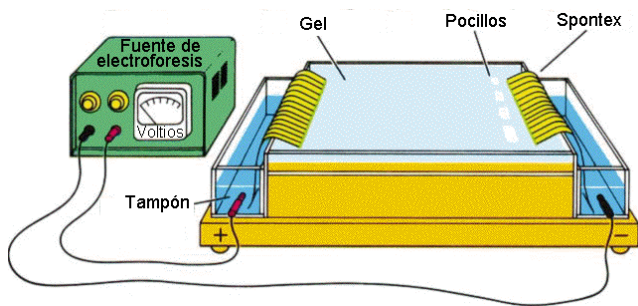
Desavantatges:

- Alguns poden estar subjectes a influències ambientals.
- El seu nombre és limitat.
- Grau de polimorfisme baix.

Marcadors bioquímics. Exemples:

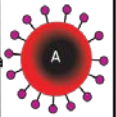
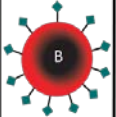
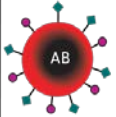
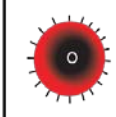



Isoenzims: Són variants enzimàtiques que poden ser degudes a un o més loci, a part de a variacions posttraduccional. Si es deuen a un sol locus, llavors s'anomenen aloenzims.

Se solen determinar mitjançant un revelat específic (amb el substrat i cofactor de la reacció) després de la seua separació electroforètica.



Marcadors bioquímics. Exemples:

Sistema AB0: Distints al·lels d'un únic gen al cromosoma 9q. Els al·lels I^A i I^B són codominants, i dominants sobre I^0

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O
Sangre roja célula				
Anticuerpos	 Anti-B	 Anti-A	Ningunos	 Anti-A y Anti-B
Antígenos	A antígeno	B antígeno	A y B antígeno	No antígenos

Sistema HLA: Sistema d'antígens dels leucòcits humans, també anomenat complex major d'histocompatibilitat.

- Molts antígens → Són un grup de gens del cromosoma 6p.
- Els al·lels del sistema HLA s'hereten en bloc (Haplotip).
- Per a tot el sistema HLA: haplotip patern + matern.
- Hi ha haplotips molt freqüents en la població, i d'altres poc freqüents → important en donacions entre individus no emparentats.

Marcadors moleculars

- Són polimorfismes detectats en la seqüència del DNA.
- Són llocs del genoma on hi ha heterozigosi per a alguna mena de variació neutra del DNA (la variació neutra és aquella que no està associada a cap variació fenotípica observable).
- Poden localitzar-se al DNA nuclear o d'òrgànuls (mitocondris o cloroplasts).

Avantatges :

- El seu nombre és, potencialment, il·limitat.
- No estan subjectes a influències ambientals.
- Són una mesura objectiva de la variació.

Desavantatge principal: necessiten d'un equip tècnicament més complex.

Principals tipus de marcadors moleculars

- **RFLP:** Polimorfisme en la llargària de fragments de restricció (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), 1975
Dos al·lels
Southern blot / PCR
- **VNTR:** Nombre variable de repeticions en tàndem (*Variable Number of Tandem Repeats*) (d'unes 6 a 64 pb) = minisatèl·lit, 1985
Molts al·lels (Al·lelomorfitisme múltiple)
Southern blot
- **STR:** Seqüència curta de repetició (*Short Tandem Repeat*) (de 2 a 4 pb, normalment 2) = microsatèl·lit, 1989
Molts al·lels (Al·lelomorfitisme múltiple)
PCR
- **RAPD** (pronunciat “rapid”): DNA polimòrfic amplificat a l'atzar (*Random amplified polymorphic DNA*), 1990
Dos al·lels / Més d'un locus
PCR
- **AFLP:** Polimorfisme en la llargària de fragments amplificats (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), 1993
Generalment dos al·lels / Més d'un locus
PCR
- **SNP** (pronunciat “snip”): Polimorfisme d'un únic nucleòtid (*Single Nucleotide Polymorphism*), 1998
Dos al·lels
PCR / Tècniques automatitzades

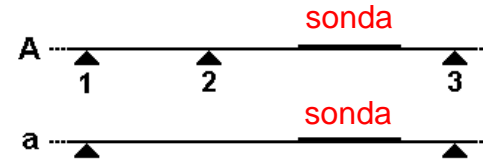
Característiques dels principals tipus de marcadors moleculars

Marcador	Polimorfisme	Dominància	Al·lelisme	Densitat genòmica	Automatització
RFLP	Baix/mitjà	Codominant	Dial·lèlic	Mitjana/alta	Baixa
VNTR	Alt	Codominant	Polial·lèlic	Baixa	Baixa
STR	Alt	Codominant	Polial·lèlic	Alta	Mitjana/alta
RAPD	Mitjà/alt	Dominant	Dial·lèlic	Alta	Mitjana
AFLP	Alt	Dominant	Dial·lèlic	Alta	Mitjana/alta
SNP	Molt alt	Codominant/ dominant	Dial·lèlic	Molt alta	Alta

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

Polimorfisme en la llargària dels fragments de restricció

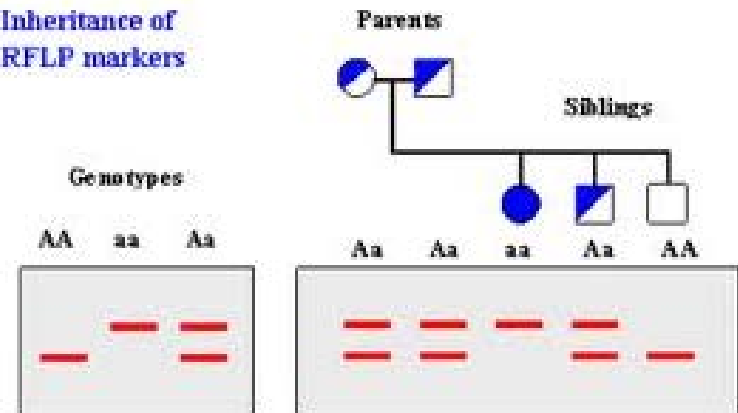
- Variació en els llocs de tall d'un enzim de restricció.
- Diferències en la mida dels fragments generats.



Causes:

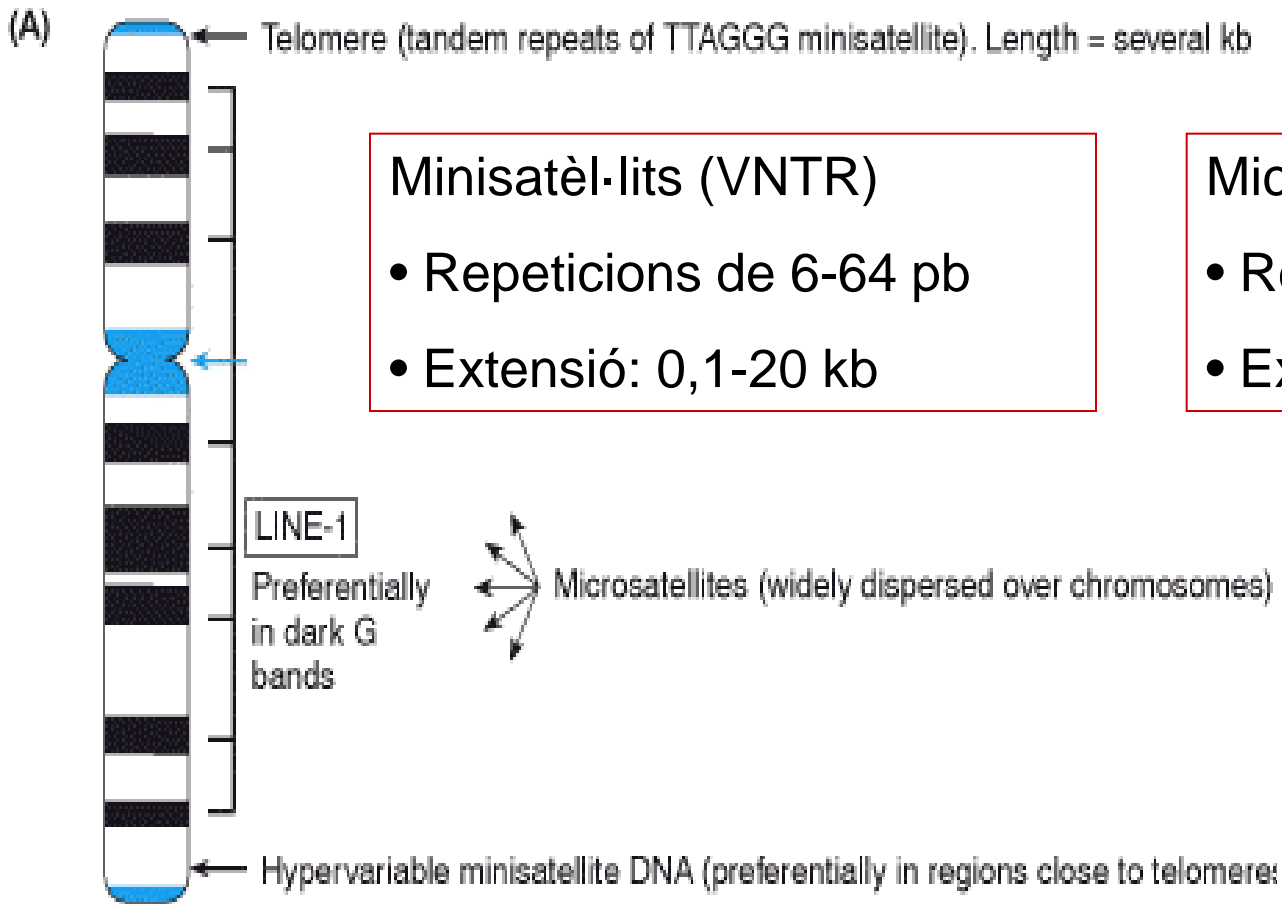
- Canvis en las seqüències de DNA que generen o destrueixen una diana per a un lloc de restricció.
 - Insercions.
 - Delecions.
- Apareixen dos o més patrons de restricció diferents per a una determinada regió cromosòmica.

Inheritance of RFLP markers



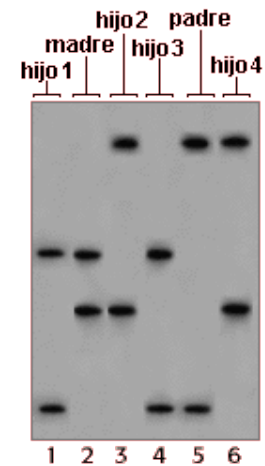
ÚS: Cartografia per RFLPs. Primer mapa genètic humà (1980).

Minisatèl·lits i microsatèl·lits



Microsatèl·lits (STR)

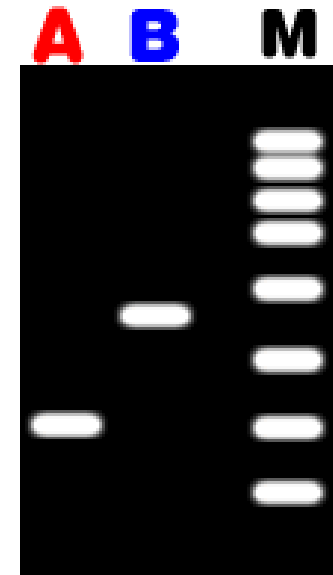
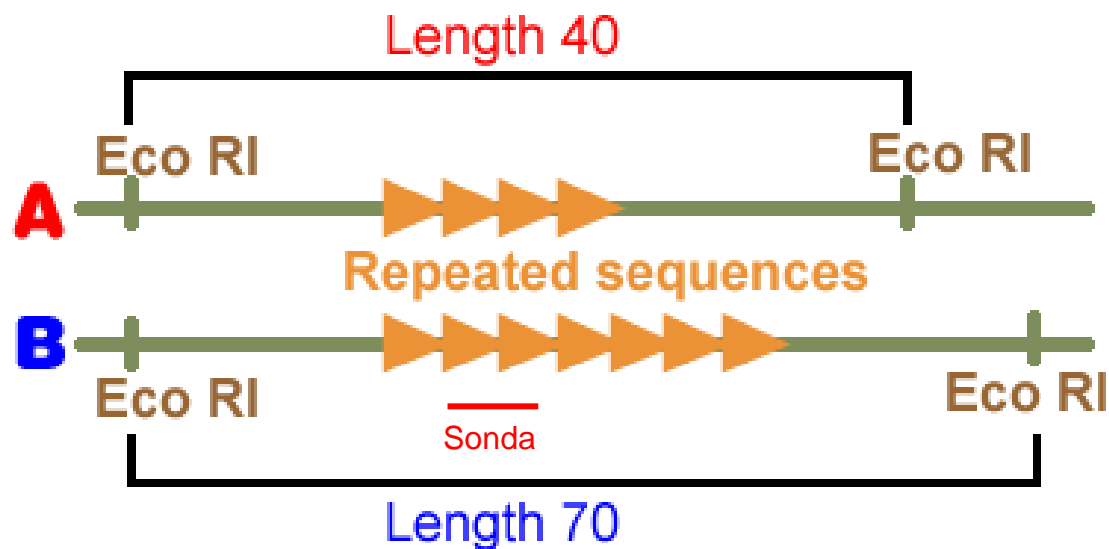
- Repeticions de 2-4 pb
- Extensió: <150 pb



ÚS: Identitat genètica. Usos forenses, paternitat.

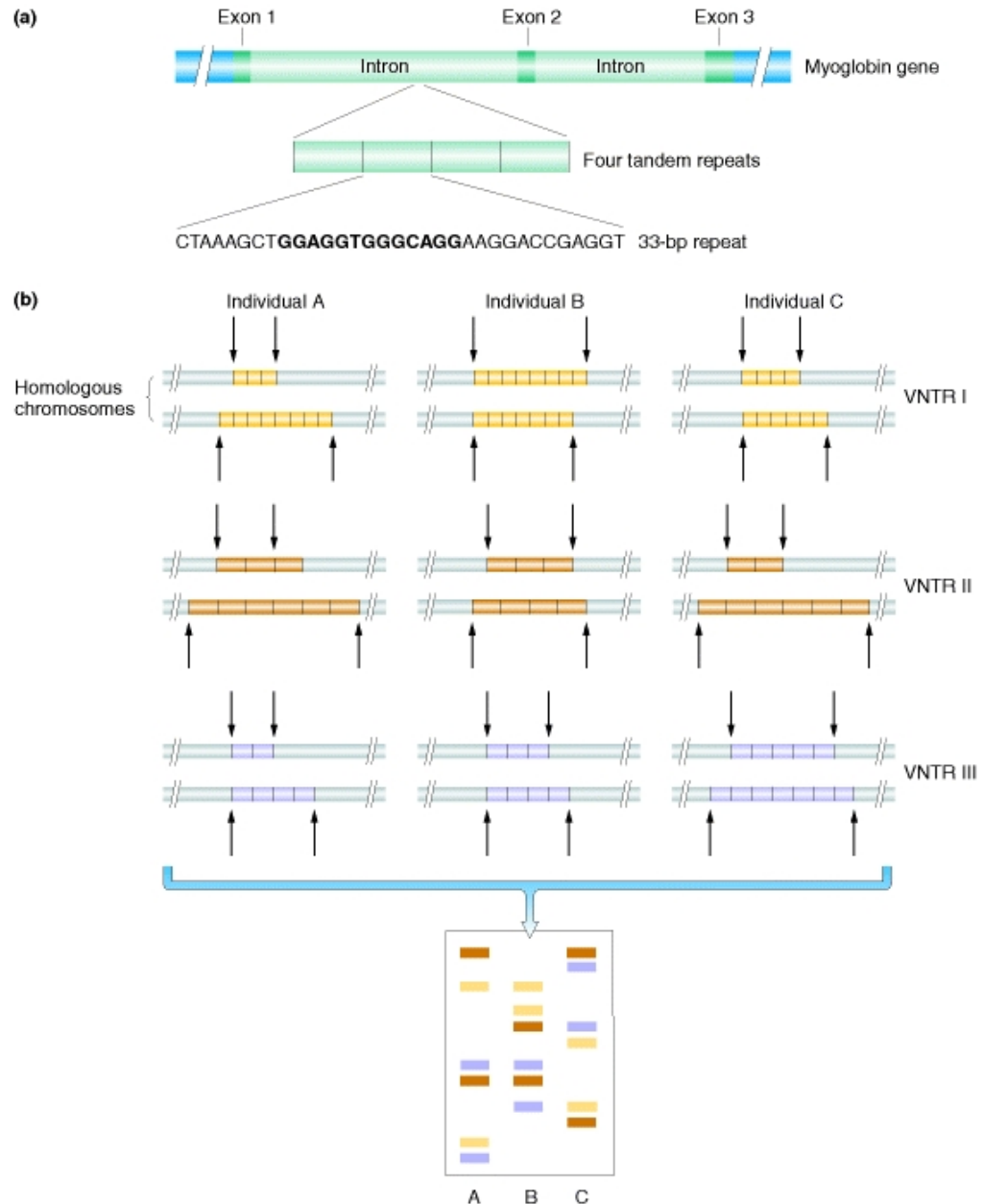
Minisatèl·lits:

- L'augment o disminució en la llargària d'un minisatèl·lit resulta de canvis en el nombre de repeticions.
- El perfil de VNTR apareix quan un enzim de restricció talla fora de la repetició.
- Es detecten fent servir sondes.



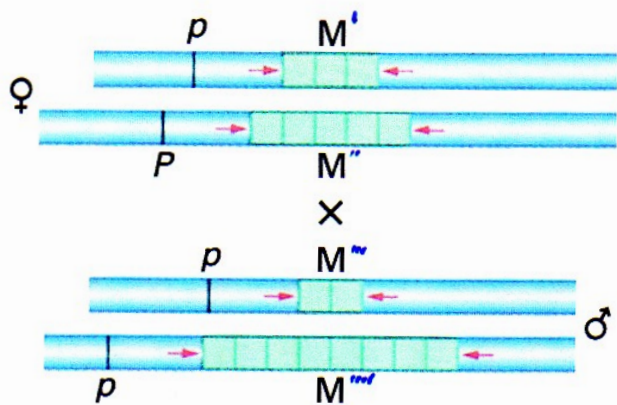
Minisatèl·lits:

Normalment, minisatèl·lits derivats de la mateixa unitat de repetició es troben dispersos pel genoma, de manera que amb una sola sonda es pot detectar més d'un locus ("sonda multilocus").

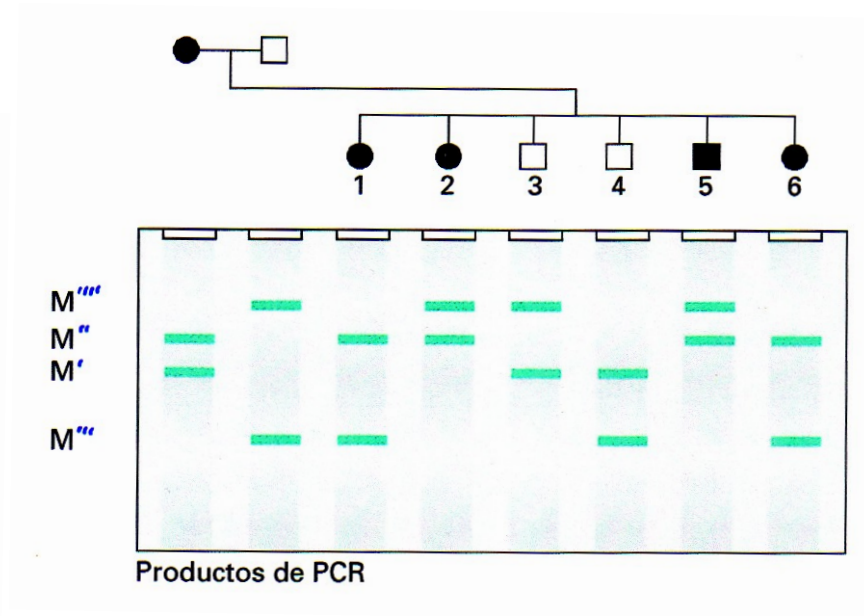


Microsatèl·lits:

Es detecten per PCR, mitjançant l'amplificació de la seqüència repetida fent servir un parell d'encebadors que hibriden amb les regions flanquejants.



- Clave
- → Cebadores de PCR
 - Repeticiones del microsatélite
 - P Alelo dominante de la enfermedad
 - M' - M''' Marcadores moleculares

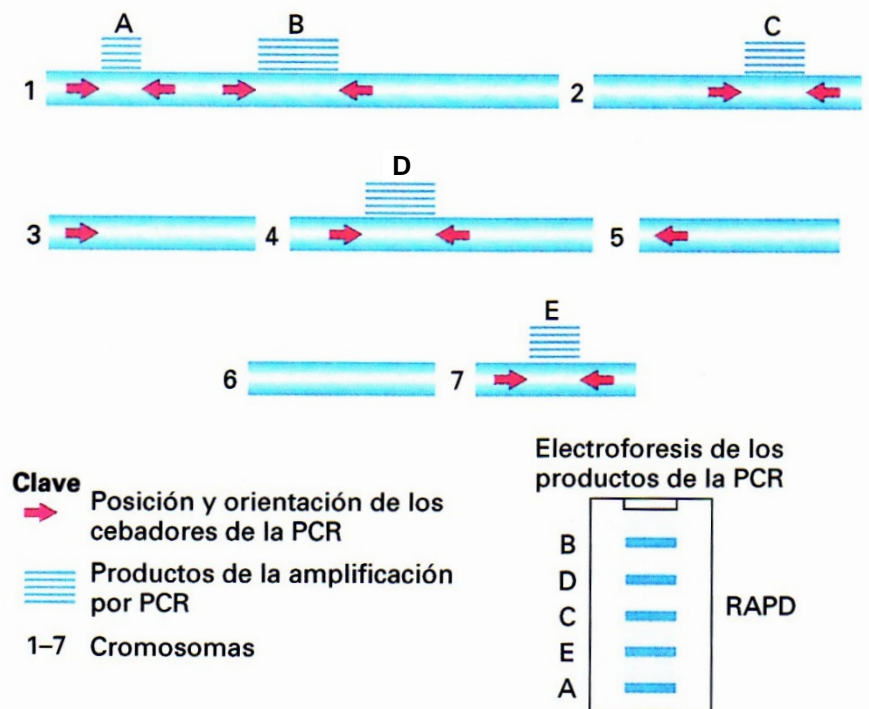


RAPDs: *Random Amplified Polymorphic DNA*

DNA polimòrfic amplificat a l'atzar

- Possibilitat d'obtenir marcadors genètics, a l'atzar, per PCR.
- FONAMENT:
 - Ús d'encebadors curts (10 nt) (normalment un a soles) de seqüència escollida a l'atzar.
 - Podran reconèixer diferents llocs en el genoma.
 - Només quan l'encebador s'uneix a dues seqüències pròximes (<2kb) i en la orientació correcta, es produeix amplificat.

ÚS: Cartografia genètica en genomes no seqüenciats.
Lligament a marcadors fenotípics.



AFLPs: Amplified Fragment Length Polymorphisms

Polimorfismes en la llargària dels fragments amplificats

- Possibilitat d'obtenir marcadors genètics d'un genoma sense necessitat de conèixer la seua seqüència.
- Aplica la tècnica de PCR als RFLPs (diferent del PCR-RFLP).

PAS 1 → Digestión del DNA con enzimas de restricción



PAS 2 → Ligar adaptadores específicos



PAS 3 → Amplificación selectiva de fragmentos de DNA con cebadores específicos



PAS 4 → Separación de los fragmentos en gels de secuenciación



ÚS: Cartografía genètica en genomes no seqüenciats. Lligament a marcadors fenotípics.

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*

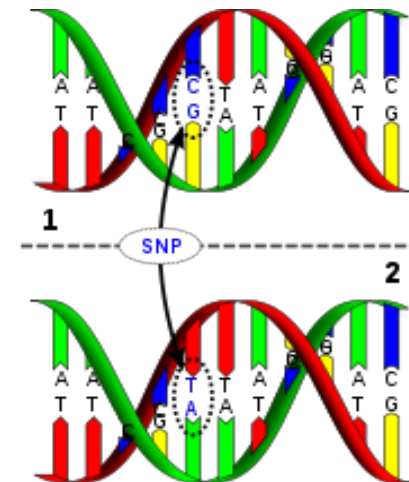
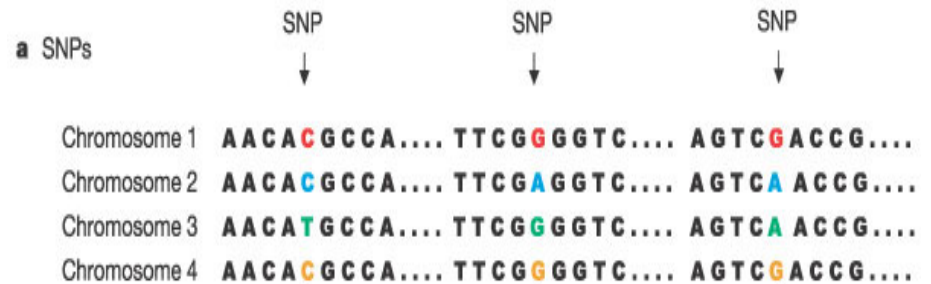
Polimorfismes d'un únic nucleòtid ("Snip")

És una variació en el nucleòtid present en una posició específica del DNA.

És la mena de variació més freqüent en el genoma. S'han identificat uns 10 milions de SNPs en el genoma humà.

S'està estenent el seu ús perquè:

- Són molt estables (baixa taxa de mutació).
- Es poden analitzar per PCR, piroseqüenciació, xips...



ÚS: Mapeig genòmic, lligament a marcadors fenotípics (malalties), identitat genètica.

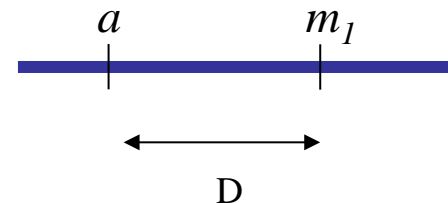
3. Identificació d'un marcador molecular lligat a un fenotip mutant

Un marcador molecular i el gen responsable d'un fenotip mutant segregaran **no independentment** si estan relativament a prop l'un de l'altre al genoma:

≠ 9:3:3:1 si es fa un encreuament F1 x F1
≠ 1:1:1:1 si es fa un encreuament prova

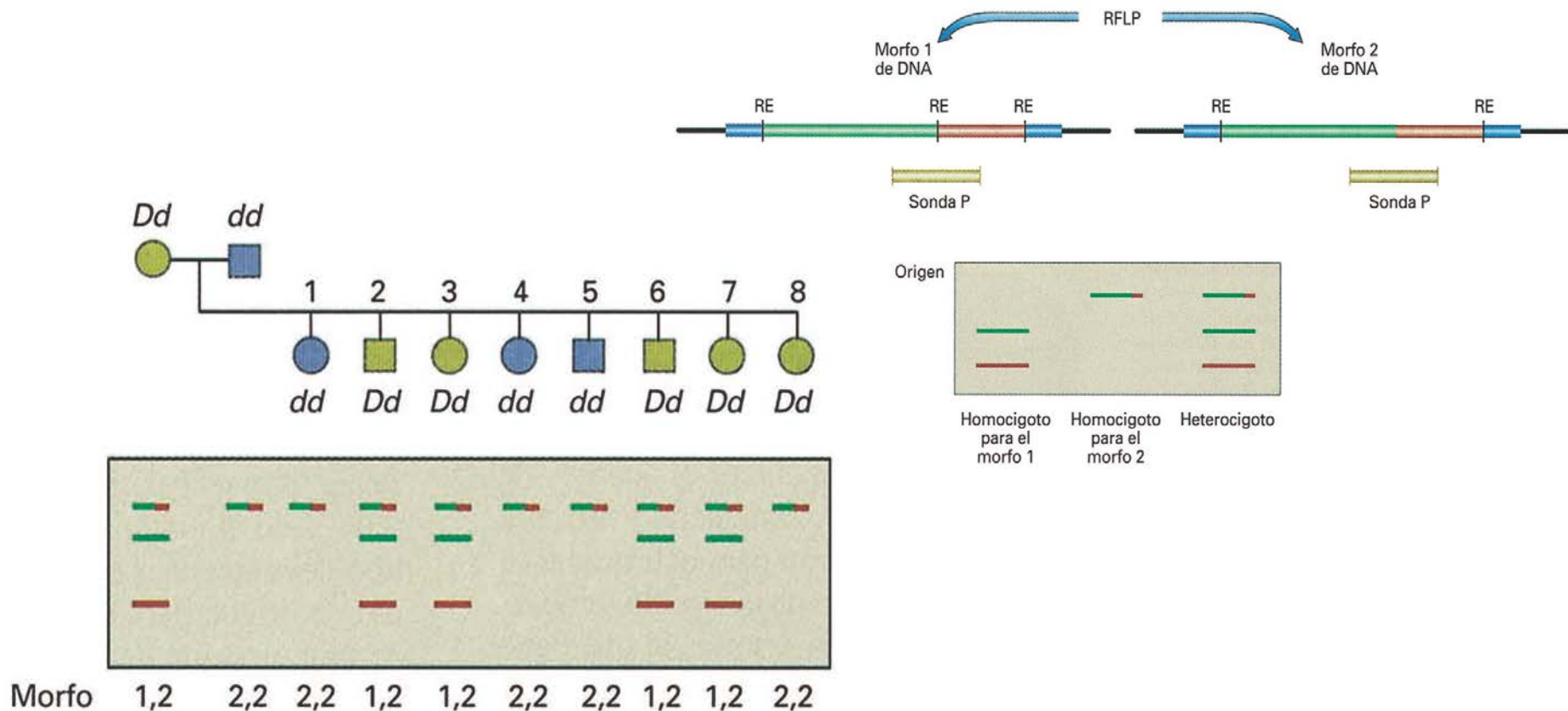
Si es demostra una segregació diferent a l'esperada si no hi hagués lligament, es passarà a estimar la distància genètica com si es tractara de dos gens mendelians:

$$D \text{ (um)} = FR \times 100$$

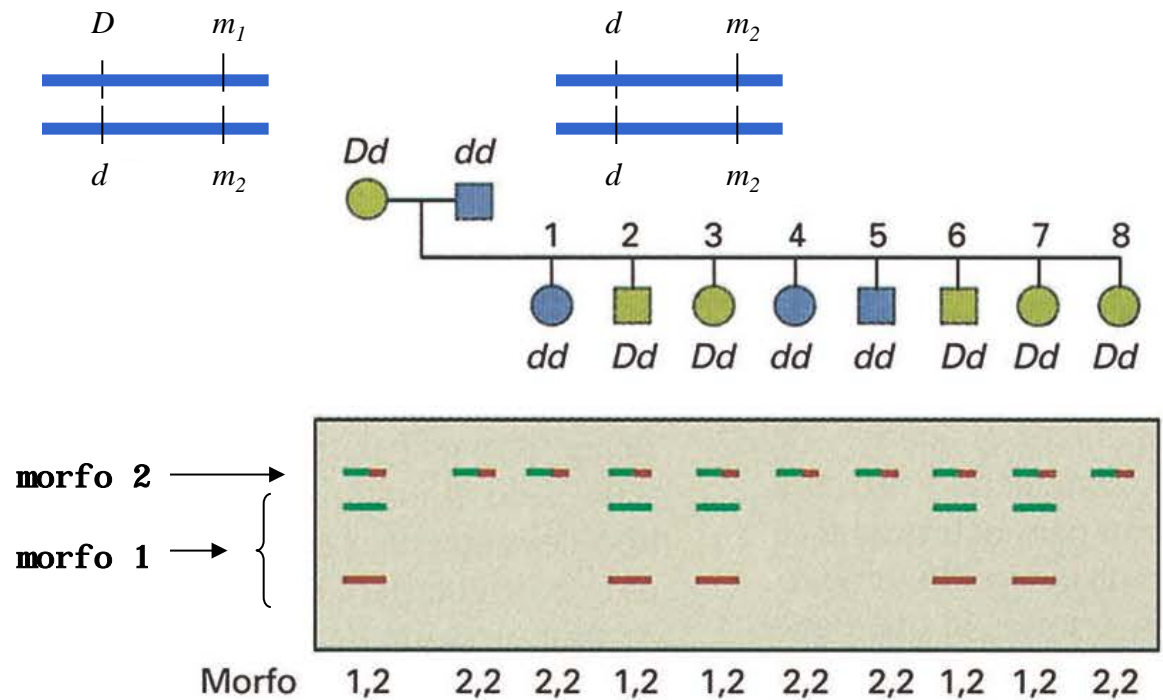


Exemple: Determinació de la relació de lligament d'un caràcter fenotípic amb un marcador molecular (RFLP)

➤ La següent família, amb un historial de patir una determinada malaltia (membres representats amb una coloració ocre), ha estat analitzada per a un determinat polimorfisme de fragments de restricció utilitzant una determinada sonda i enzim (o combinació d'enzims) de restricció.



➤ Els resultats suggereixen fortament que l'RFLP està lligat al locus gènic de la malaltia (locus D/d) i que els membres portadors de l'al·lel representat per les dues bandes monocolor (morfo 1) tenen una probabilitat molt alta d'heretar l'al·lel D responsable de la malaltia.



- Els resultats suggereixen fortament que l'RFLP està lligat al locus gènic de la malaltia (locus D/d) i que els membres portadors de l'al·lel representat per les dues bandes monocolor (morfo 1) tenen una probabilitat molt alta d'heretar l'al·lel D responsable de la malaltia.
- L'individu 8 podria explicar-se per una recombinació entre el locus del marcador d'RFLP i el locus D/d responsable de la malaltia, la qual cosa indicaria que el marcador RFLP no es troba dins de la regió del gen D/d.

