

EFOP-3.4.3-16-2016-00014

# MOLEKULÁRIS ÖKOLÓGIA: POPULÁCIÓK GENETIKAI VÁLTOZATOSSÁGA

AP4\_TTIK Kárpát-medencei oktatási tér  
kialakítása**PÉNZES ZSOLT**  
**MARKÓ BÁLINT**

SZÉCHENYI 2020

MAGYARORSZÁG  
KORMÁNYAEurópai Unió  
Európai Szociális  
Alap

BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

A molekuláris ökológia előadások célja a molekuláris módszerek néhány alkalmazási lehetőségének bemutatása ökológiai és evolúcióbio-lógiai problémák megfogalmazásában/megválaszolásában. Kérdéseink populációkra, fajokra vonatkoznak – például populációk izolációjának mértéke, egy invazív faj eredete, leszármazási kapcsolatok. A válasz keresése során a molekuláris módszerek eszközként szolgálnak.

Az előadáson a genetikai változatosság jellemzésének alapelveit és a molekuláris markerek néhány általánosan használt típusát tárgyaljuk.

## Alapfogalmak

- Cél: ökológiai, viselkedés, evolúció léptékű mintázatok elemzése, értelmezése
  - populációk és közösségek változatossága – genetikai változatosság
  - a genetikai változatosság megváltozása generációról generációra
- Terminológia
  - lokusz: bármely genom pozíció/régió – allél szegregáció
  - változat, allél – valamilyen módszerrel elkülöníthető, szülő-utód transzmisszió
  - mendeli allél – Mendel szabályoknak megfelelő öröklődés
  - egyed genotípusa: allél kombináció egy adott lokuszon/lokuszokon
  - haploid egy, diploid két allél /lokusz/egyed – poliploid

A populáció változatosságát a populációt alkotó egyedek tulajdonságainak **populációbeli eloszlásával** – vagyis az egyes változatok relatív gyakoriságával – jellemezzük, amelyet különböző tényezők formálnak. Így például a szülők, nagyszülők stb. populációja változatosságának is függvénye, ha a tulajdonság öröklődik. Ez a szülő – utód transzmisszió populációk szintjén függ a populáció szerkezetétől, párválasztás módjától és számos további tényezőtől, amelyek ilyen módon hatással vannak az aktuális változatosságra. Ezért a változatosságról gyűjtött információt felhasználhatjuk arra, hogy közvetett módon betekintést nyerjünk az azt formáló folyamatokba. Ehhez az első lépés a változatosság mértékének **kvantitatív jellemzése**, a változatosság leírása.

A gyakorlatban több különböző megközelítési módot alkalmaznak a változatosság elemzésére. Ezek egyikével foglalkozunk: egyedek olyan tulajdonságait vizsgáljuk, amelyek kifejeződése a környezet változatosságától független és **mendeli** öröklődést mutat. Az így értelmezett **genetikai változatosság** vizsgálatának számos előnye van, például eltérő időskálára alkalmazható standard módszerek állnak rendelkezésre, taxontól, élőhelytől, életmenet stádiumtól függetlenül.

## Alapfogalmak

- Populáció genetikai változatossága
  - allél relatív gyakoriság
  - genotípus relatív gyakoriság (genotípusos változatosság)
  - a változatosság jellemzése – mérőszámok, pl. heterozigotitás, nukleotid diverzitás, fixációs index

- Populáció mérete  $N = 10$  egyed
- Diploid, 20 allél ( $2N$ )
- Két különböző allél ( $A, a$ ), gyakoriságuk:

$$f_A = 7/20$$

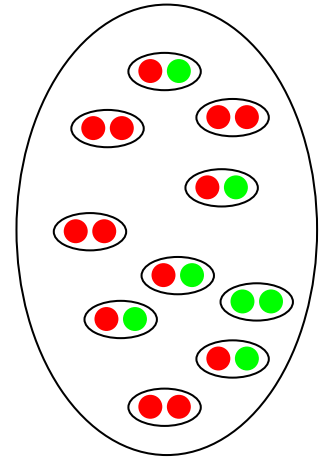
$$f_a = 13/20$$

- Genotípusok gyakorisága:

$$f_{AA} = 1/10$$

$$f_{Aa} = 5/10$$

$$f_{aa} = 4/10$$



Egy populáció genetikai változatosságát a populáció **allél és genotípus készletével** definiáljuk. Olyan tulajdonságokat vizsgálunk, melyekre a változatosságért kizárólagosan felelős lokusz(ok)on az egyed genotípusa és ez alapján alléljai egyértelműen azonosíthatóak. A populációt ezek relatív gyakoriságával ( $f$ , allél és genotípus gyakoriság) jellemezzük.

Diploid egyedekből álló  $N$  méretű populáció allélszáma  $2N$ , hiszen minden egyednek két allélja van a kérdéses lokuszon. A homozigóták két azonos, a heterozigóták két eltérő alléllal rendelkeznek. A genotípus gyakoriságok ismeretében az allél gyakoriságok **egyértelműen meghatározhatóak** a populációban. A gyakorlatban mintát veszünk egy populációból és a genotípus illetve allél gyakoriságokat ez alapján becsüljük a kérdéses lokuszra.

Noha a populáció genetikai változatosságát a gyakoriság értékekkel, vagyis a variánsok eloszlásával egyértelműen jellemezzük, céljainktól függően (pl. populációk összehasonlítása, leszármazási kapcsolatokra történő következtetés) különböző **mérőszámokat** képezhetünk belőlük.

## Alapfogalmak

- Populáció genetikai változatossága – példa: ember *MC1R* gén
  - lokusz: *MC1R* gén 478. pozíciója
  - allél: C és T (SNP – single nucleotide polymorphism)
  - fenotípus:
    - melanocortin 1 receptor, melanocita
    - normális receptor: phaeomelanin → eumelanin konverzió – sötét bőr és haj (Afrika)
    - mutáció, pl. TT homozigóta: csak phaeomelanin – szeplő, vörös haj
  - adatok (minta egy populációból, USA):
    - egyedek genotípusa CC: 25 és TC: 5 esetben ( $N = 30$ )
    - genotípus gyakoriság:
 
$$f_{CC} = 25/30 = 0.833,$$

$$f_{TC} = 5/30 = 0.167,$$

$$f_{TT} = 0$$
    - allél gyakoriság:
 
$$f_C = (2 * 25 + 5)/(2 * 30) = 0.833 + 0.167/2 = 0.917,$$

$$f_T = 1 - f_C = 0.083$$

Az emberek közötti **pigmentációs** különbségeknek több különböző oka lehet, mint például az *MC1R* gén mutációi. Akár egy, a gén szekvenciájában tapasztalható eltérés, amely különbséget eredményez a róla szintetizálódó MC1R fehérjében is, jelentős fenotípusos következménnyel járhat, amennyiben a mutáció az MC1R receptor funkcióját is érinti. Az MC1R receptort melanocitákban az MSH aktiválja. Működési zavara hatással van a phaeomelanin → eumelanin konverzióra. Például a felhalmozódó phaeomelanin világos bőr színt, szeplősséget, vörös hajszínt eredményezhet. Az egyes allélok gyakoriságában jelentős különbségek lehetnek a populációk között. Egyéb gerinces csoportokban is ismert az *MC1R* gén mutációk hasonló vagy kissé eltérő fenotípusos hatása (pl. jaguár, sarki lúd). Példánkban lokusznak egy **DNS szekvencia pozíciót** (a gén 478. pozíciója) tekintünk két lehetséges alléllal (nukleotidok) a populációban. Esetünkben a két allél C és T (a populációban a kódoló szálon A és G előfordulására nincs adat a kérdéses pozícióban). A gyakoriságokat egy a populációból vett minta alapján becsültük. A genotípus és allél gyakoriságokkal a genetikai változatosságot teljes mértékben jellemeztük a kiválasztott lokuszon.

## Molekuláris markerek

- Tulajdonságok változatossága – leírás (mérőszámok) és értelmezés
- Molekuláris markerek: egyedek öröklődő tulajdonságai – a következtetés eszközei
  - elmélet: evolúciós változás – populációgenetika, kvantitatív genetika
  - genetikai markerek – előnyök: változatosság értelmezése (pl. környezettől független)
  - következtetés pl. egyedek, populációk, fajok leszármazási kapcsolatára
  - következtetés modellekkel

Egy **molekuláris marker** olyan molekuláris tulajdonság, ami a vizsgálat objektumának (pl. egyed, egyedek alkotta populáció, populációk alkotta faj) kérdésünk szempontjából fontos sajátosságait tükrözi. Például egy ősi populációból történő, fizikai izoláció megjelenését követő fokozatos divergencia a különböző, így már izolált utód populációk egyedei közötti hasonlóság csökkenését eredményezi számos tulajdonságra. **DNS szekvenciák** szintjén például az egyik populáció egy egyedében bekövetkező pontmutáció a kérdéses populációban elterjedhet és fixálódhat (természetes szelekció vagy genetikai sodródás hatására), míg a másik populációban ez variáns nem is fordul elő. A változatosság oldaláról megközelítve, a divergencia következtében kialakult tulajdonságbeli eltérés felhasználható például diagnosztikai céllal: egy szekvencia variáns a populációbeli hovatartozásra utalhat.

Számos genom régiót (vagy akár a teljes genomot) alapul véve a szekvenciák hasonlósága fordítottan arányos lehet a populációk divergencia idejével, hiszen hosszabb idő alatt több eltérés halmozódhat fel. Így a hasonlóság a leszármazási (rokonsági) kapcsolatra utalhat. Ilyen módon a tulajdonságok **eszközök** lehetnek ahhoz, hogy betekintést nyerjünk a biológiai sajátosságokba, történetbe.

## Molekuláris markerek

A genetikai adatok típusai:

- ① SNP allél – pl. *MC1R* gén szekvencia 478. pozíció
- ② Indel allél – szekvencia szakasz hossza
  - CFTR gén → transzmembrán fehérje (ozmotikus egyensúly)
  - $\Delta F508$  mutáció: 3 nukleotid (→ 508. aminosav, F) hiánya
  - homozigóta: cisztás fibrózis
  - CFTR- $\Delta F508$  gyakorisága akár 2% (Európa)
- ③ Ismétlődő (repeat) szekvencia motívumok – szakasz hossza
  - másolási hibák – pontmutációknál nagyobb mutációs ráta
  - mikroszatellitek (SSR, STR) – pl. (CA)<sub>7</sub> allél: CACACACACACACA
  - gyakori – humán genom: átlagosan egy CA mikrosatellit/6000 nukleotid
  - nincs specifikus funkció
  - számos lokusz és allél a populációban

A markerek olyan jellemzők, amelyek állapotát (esetünkben az allélokot) **egyértelműen azonosítani** tudjuk. Genetikai adatok esetén az azonosítás történhet **szekvencia (nukleotid sorrend) meghatározással** vagy szekvenciahosszban is megnyilvánuló változatosság esetén **gélelektroforézis** is elegendő lehet. A szekvencia hossza alatt a szekvenciát alkotó nukleotidok („bázispárok”, bp) számát értjük. Az *MC1R* gén példában a változatosságot DNS szekvencia pozícióra értelmeztük, ahol a különböző variánsok (állapotok) jelenléte nukleotid szubsztitúció(k)ra vezethető vissza: bekövetkezett egy pontmutáció amely elterjedt. Ez a variáns az **SNP** (kiejtve „sznip”). Azonban az, hogy mit tekintünk SNP-nek a változatosság definíciójától is függ (lásd polimorfizmus, pl. gyakorisága minimum 1%). A szekvenciahossz eltérések oka DNS szakaszok kiesése (deléció) vagy beépülése (inzerció). Mivel pusztán a szakasz vizsgálatából nem tudjuk megmondani melyik esemény következett be (ehhez ismernünk kell az ősi állapotot), egyszerűen **indel**-nek nevezzük. Egy fontos csoportját alkotják a markereknek a **tandem repeat** szekvencia motívumokkal jellemezhető genom régiók, gyakoriságuk és jelentős mutációs rátájuk miatt. Itt az ismétlődő egységek száma változik. Ide tartoznak a mikroszatellitek.

## Molekuláris markerek

- Genotípus különbségek kimutatása
  - multilokusz mintázatok
  - egy lokuszos mintázat – előnye: elmélet
- Szekvenálás – amennyiben megvalósítható...
  - költséges, gyakran körülményes
  - ezért alternatív módszerek is – de kevesebb információ
- Genetikai változatosság becslése egy adott lokuszon
  - 1960-as évekig morfológia (mendeli öröklődés) – ökológiai genetika
  - fehérje elektroforézis (enzimpolimorfizmus) – sok adat, eltérés aminosav szekvencia szinten, töltés különbség
  - PCR (polymerase chain reaction) és Sanger szekvenálás – kezdetben mtDNS
  - RFLP (restriction fragment length polymorphism) – magi szakaszok is, nem kódoló régiók, genom térképek
  - mikroszatellit – hatékony genotipizálás (PCR)
  - NGS (next-generation sequencing) – direkt szekvenálás, populációkra is (nem teljes genom, pl. transzkriptóma), számos előny

Egy lokuszon az egyedet általában a **genotípusával** jellemezzük. Meghatározása diploid egyedre a két allél azonosítását jelenti, végső esetben DNS szekvenálással. Ez ma már kivitelezhető, azonban nem mindig volt így. Ismereteink jelentős része a gyakran ma is használt tradicionális, és általában kevésbé költséges módszereken alapul.

A **PCR** technika jelentős fejlődést jelentett a populációk vizsgálatában, hiszen lehetővé vált a DNS szekvencia meghatározása múzeumi példányokból, bizonyos esetekben fossziliákból, vagy nem invazív módon vett mintákból (pl. csont, toll). A lokusz „kiemelése” a genomból, vagyis a szekvencia felszaporítása megfelelően megválasztott primer párral történik.

Az úgynevezett **egylokuszos módszerekkel** is több lokuszt **genotipizálunk** (több tíz mikroszatellit, akár több százezer SNP), de az allélt a lokuszhoz hozzá tudjuk rendelni – ellentétben a multilokuszos technikákkal. Mivel a kiértékelés során alkalmazott elmélet allél és genotípus gyakoriság értéket igényel, ez utóbbiak lokuszonkénti azonosítása alapvető feltétel. A genetikai változatosságon alapuló következtetésekhez így általában egylokuszos módszerekre van szükség.





## Molekuláris markerek – DNS szekvencia

Közeli rokon parazitoid darázs fajok (GI01-10 jelű minták) citokró-m-c-oxidáz génje (*coxI*) egy szakaszának szekvenciája:

```

GI01 GGATAATTGGGTCAGCTTTAAG
GI02 GAATAATTGGTTCAGCTCTAAG
GI03 GAATAATC GGATC GGCTCTAAG
GI04 GAATAATTGGGTCAGCTTTAAG
GI05 GGATAATTGGATCAGCTTTAAG
GI06 GAATAATTGGATCAGCATTAAG
GI07 GGATAATTGGGTCCTGCTTTAAG
GI08 GAATGATTGGGTCCTGCTTTAAG
GI09 GAATAATTGGCTCAGCTTTAAG
GI10 GGATAATTGGGTCAGCTTTAAG

```

Konzervatív és változatosságot mutató pozíciók (SNP)

**DNS szekvencia** a legfontosabb adattípus. Egy példa **ortológ** szekvenciákra, vagyis minden egyes pozíció (az „adatmátrix egy oszlopa”) egy ősi szekvencia megfelelő pozíciójából származik. Mivel a példában fehérjét kódoló gén szekvenciájáról van szó, a változatosságot alapvetően a kodon harmadik pozícióiban tapasztaljuk (a szekvenálás kodon 2. pozíciótól indult). A szekvenciák meghatározásához a kérdéses régiót PCR reakcióval felszaporítottuk, külön minden mintára a DNS izolálást követően.

Néhány indok a DNS szekvencia adatok jelentőségére:

- mendeli öröklődésben gondolkozva a fenotípus és genotípus elkülönítés érvényét veszíti;
- változatosság: fehérje szekvencia szinten például a gén szekvencia változatosság csak egy része jelenik meg (pl. a kodon 3. pozíció „lötyögése”), vagyis több allélunk lehet DNS szekvencia szintjén;
- az elmélet a DNS szekvenciák változására összpontosít, erre vannak realisztikus modelljeink;
- gyakorlati előnyök, pl. automatizált módszerek a szekvenálásra.

## Ellenőrző kérdések

- ① Mit értünk allél alatt?
- ② Milyen tulajdonságot tekintünk molekuláris markernek?
- ③ Melyek a genetikai adatok fő típusai?
- ④ Mik az SNP-k?
- ⑤ Mik a mikroszatellitek?
- ⑥ Milyen előnyei vannak a DNS szekvencia adatoknak?
- ⑦ Miért létezik annyi különböző módszer a genotipizálásra?
- ⑧ Melyek az egylokuszus módszerek előnyei a multilokuszushoz képest?

**JELEN TANANYAG A SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEMEN  
KÉSZÜLT AZ EURÓPAI UNIÓ TÁMOGATÁSÁVAL. PROJEKT  
AZONOSÍTÓ: EFOP-3.4.3-16-2016-00014**

**SZÉCHENYI** 



MAGYARORSZÁG  
KORMÁNYA

Európai Unió  
Európai Szociális  
Alap



**BEFEKTETÉS A JÖVŐBE**