

# BALIKÇILIK VE SU ÜRÜNLERİNDE KULLANILAN GENETİK MARKIR SİSTEMLERİ-II

**Yılmaz ÇİFTÇİ, (SUMAE)**

Genetik markırların çalışılması özellikle balıkçılıkta üç alanda ana etkiye sahiptir. Bunlar; doğal stok yapılarının analizi, kültür balıkçılığı, taksonomi veya sistematik çalışmalardır. Ayrıca yok olmakta olan türlerin genetikleri, genetik farklılık üzerine kirlenmenin ve balıkçılığın etkisi ve bir ortama sonradan sokulan türlerin genetikleri üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

Bu makalenin birinci bölümü YUNUS Dergisinin Eylül 2003 sayısında yayımlanmıştır.

## Mikrosatellit DNA Markır

Çok hücrelilerde sıralı tekrar gösteren nukleotid dizilimlerinin bulunduğu 1968 yılında yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Bu nukleotid dizilimleri kompleks ökaryotik genomun caesium chloride santrifüjü ile belirlenmiş ve orjinal olarak satellit bantlar diye tanımlanmışlardır. Bu şekilde yapılan bir santrifüj işleminden sonra DNA'nın G-C içeriğine bağlı olarak genomik DNA bu şekilde bir yapı göstermektedir. Satellit DNA'ların analizi sonucunda bunların çoğunlukla sıralı tekrar eden nukleotid dizilimlerinden meydana geldiği ortaya konulmuştur. Minisatellit ve mikrosatellit olarak ikiye ayrılırlar. Minisatellitlerin oluşturduğu tekrar dizilimleri genellikle 9-64bp'lik motiflerden oluşmakta ve 0.1 ile 7kb ye kadar ulaşabilmektedir. Bunlar ayrıca VNTR olarak da bilinmektedir. Mikrosatellitler ise genellikle 100-200bp'e ulaşan kısa yapılara sahiptir. Tekrar motifleri ise ikili, üçlü, dördü veya beşli şekilde olabilir ((CA/GT)<sub>n</sub> veya (AGC/TCG)<sub>n</sub> gibi).

Mikrosatellitler ökaryotik genoma geniş bir şekilde yayılmış ve bol olarak bulunurlar fakat bunun aksine minisatellitler, kromozomların telomerik ve centromerik bölgelerinde toplanma eğilimindedir.

Mikrosatellitler çalışılmış olduğu çoğu lokusta tekrar bölgesinin sayısında çok farklılıklar göstermesinden dolayı genetiğin birçok alanında moleküler markır olarak önem arz etmektedir. Bu güne kadar mikrosatellit varyasyonunun en gelişmiş çalışmaları lokusun tipi ve bilgilendirme derecesi, nukleotid

diziliminin boyu ve tekrarlanan nukleotitler arası ilişkilerin araştırılması ile yapılmaktadır. Mikrosatellitler, kusursuz, kusurlu ve bileşik motif olarak üç gruba ayrılmışlardır. Burada mikrosatellitin nukleotid diziliminde ana motifi bozan nukleotitlerin bulunması onun kusurlu dizilim gösterdiği anlamındadır. Ayrıca eğer birbiriyle bitişik iki farklı motif bulunuyorsa buda bileşik motif olarak isimlendirilir. Aşağıdaki örnekte 10 tekrar içeren iki nukleotitli dizilimler motif çeşitlerine göre gösterilmektedir.

Kusursuz	CACACACACACACACACACA
Kusurlu	CACATTCACACATTCATTCA
Bileşik	CACACACACAGAGAGAGAGA

Bu tekrarlar arasında her türlü kombinasyon mümkündür. Ana motif içersinde meydana gelen bozukluklar tekrar sıralarını korumaktadırlar ve kusursuz motiflere göre bu şekildeki bozuk motifler daha az varyasyon gösterir. Ayrıca uzun tekrarların daha polimorfik olmaları beklenir.

Mikrosatellit tekrarların bulunduğu genom bölgelerindeki genetik varyasyonlar genellikle DNA kayması sonucunda meydana gelir. Mikrosatellit lokuslardaki mutasyonlar, DNA replikasyonu sırasında tekrarın bulunduğu kısımda yanlış eşleşme veya bir tekrarın atlanması sonucunda meydana geldiği düşünülmektedir. Diğer bir deyişle replikasyon sırasında DNA'nın iki iplikçisindeki tekrar kısmı beklenmedik bir eşleme yapabilir ve daha sonra bunun tamiri mikrosatellit lokusun uzaması veya

kısalması ile sonuçlanır. En yaygın değişim yalnızca tek bir tekrar ünitesinin kaybı veya fazladan oluşması ile olur. Populasyon içersindeki varyasyonun belirlenmesinde en önemli unsur mutasyon oranıdır. Bu mikrosatellite lokuslarda  $10^{-4}$  ile  $10^{-6}$  arasında değiştii tahmin edilmektedir.

Tekrar bölgelerinin her iki tarafında bulunan bölgeler 'flanking' bölgesi olarak isimlendirilir ve buralarda meydana gelecek mutasyonlar çok önemlidir çünkü buralar primerlerin bağlanma noktalarıdır ve null allel oluşumuna neden olur. Null alleller alloenzim ve minisatellit çalışmalarında çok iyi bilinmesine rağmen mikrosatellit lokuslarda da olmaktadır. Primer bölgelerinde meydana gelen nukleotit eklenmeleri veya çıkmaları (insertion ve deletion) mikrosatellit allellerin amplifike olmamasına neden olacaktır.

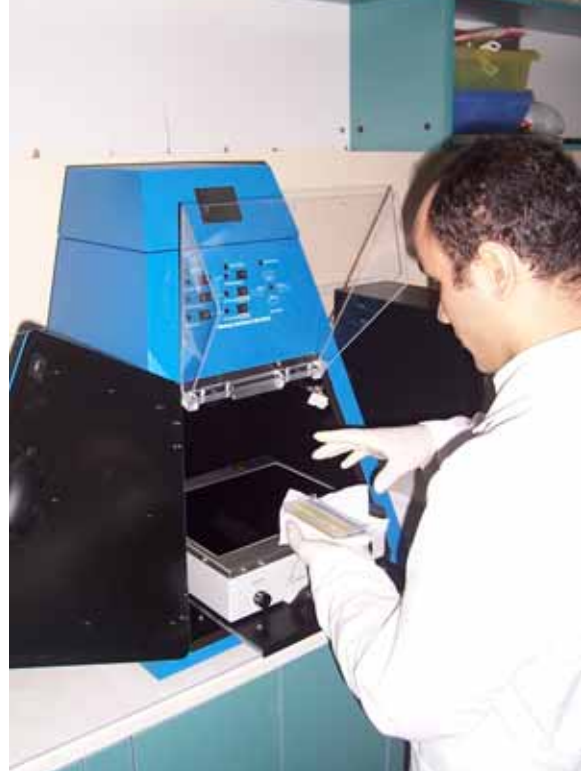


Bir çok canlı ve bitki türünde (pirinç, tavşan, fare, arı ve kuş gibi) yapılan çalışmalarda mikrosatellitlerin yüksek seviyeli polimorfizm gösterdiği rapor edilmiştir. Balıklarda ise mikrosatellit DNA lokusları çoğunlukla Pasifik ve Atlantik Salmon populasyonları ve levrek balıklarının populasyon yapılarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Mikrosatellit lokiler kodominant markerlardır yani heterozigotlar homozigotlardan ayırt edilebilir ve PCR (polymerase chain reaction) kullanımı ve allellerin jel üzerine seperasyonunun yapılmasıyla tüm genetik bilgilere ulaşmak mümkündür.

Mikrosatellitler ayrıca evolusyonla ilgili çalışmalarda, kriminolojik çalışmalarda, fertlerin akrabalık seviyelerinin ve ana ve babalarının belirlenmesinde, genomdaki genlerin haritalarının çıkarılmasında, populasyonun

genetik parametrelerinin (gen akışı ve etkili populasyon büyüklüğü gibi) tahmini ve populasyon farklılıklarının belirlenmesi gibi çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun nedeni mikrosatellitlerin genomda yoğun bir şekilde dağılmış olmaları ve işlemlerinin kolay ve otomatik bir şekilde yapıyor olmasıdır.



Canlıların genomunda yoğun olarak bulunan mikrosatellitler son yapılan çalışmalara göre türlere bağlı olarak farklı frekanslarda farklı motiflere sahip oldukları tespit edilmiştir. İki nukleotitli tekrarlar dikkate alındığında  $(CA/GT)_n$  nukleotit tekrarı memelilerin genomunda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu tip tekrar memeli genomunda her bir 50-150kb'de bir olmaktadır. Memelilerdeki durumun aksine son çalışmalar gelişmiş yüksek bitkilerde  $(AT/TA)_n$  nukleotit diziliminin yaygın olduğunu göstermiştir. Ayrıca Atlantik salmonunun genomunda  $(GT/CA)_n$  tekrarının ortalama olarak her bir 24-35kb'de bir, kahverengi alabalık da ise 76kb'de bir olduğu gözlenmiştir. Son zamanlarda bilim adamları üç nukleotitli mikrosatellitler üzerine yoğunlaşmıştır çünkü üçlü nukleotit dizilimlerin insanlarda görülen hastalıklarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Örnek olarak Fragile x, Myotonic dystrophy ve Huntington hastalılarının temel nedeni üç nukleotitli mikrosatellitlerdir. Üçlü nukleotitler hastalıkla bağıntılı olarak

büyük bir uzunluğa ulaşmasına rağmen ikili nükleotitler kadarda polimorfiktirler.

Mikrosatellitler farklı genetik çalışmaları için çok güçlü tek lokus genetik markır olarak kabul edilmiş olmasına rağmen, allellerin PCR amplifikasyonu için türe has primer geliştirilmesi çok pahalı çalışmalar gerektirmektedir. Bir diğer önemli dezavantaj ise alleller denatüre olmuş polyacrylamide jel üzerinde ayrıştırıldığı zaman genellikle merdiven veya gölge şeklinde bantlar oluşturmaktadırlar. Bu istenmeyen bantların, amplifikasyon ürünlerinin denaturasyonunun tamamlanmamış olmasından veya PCR aşamasında oluşan yanlış eşleşmelerden dolayı olduğu düşünülmektedir. Bu durum allellerin okunması esnasında genellikle problem yaratmaktadır. Fakat bunun yanında üç veya dört nükleotitli mikrosatellitlerde bu durum pek görülmez. Son dezavantaj ise önceden de bahsedildiği gibi null allellerin oluşmasıdır.

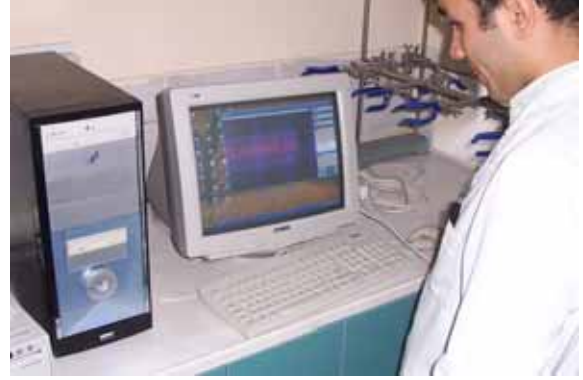
#### **RAPDs (Randomly amplified polymorphic DNA): Rastgele amplifike edilmiş polimorfik DNA'lar**

Adından da anlaşılacağı gibi bu metot bilinmeyen DNA parçalarının PCR amplifikasyonu ile alakalıdır. Ayrıca AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) ve DAF (DNA Amplification Fingerprinting) gibi iki metot daha bulunmaktadır. Gerçekte bu üç metot çalışma prensibi olarak aynı ve birbirlerinin varyasyonlarıdır. Bu metotların üçünde de temel prensip PCR'in tek primerle kullanımına dayanır. RAPDs ve AP-PCR arasındaki temel fark PCR amplifikasyonunda kullanılan primerin nükleotit uzunluğudur. AP-PCR tekniğinde 15-25bp'lik primer kullanılırken RAPDs de 10-12bp'lik primerler kullanılır. Ayrıca DAF tekniğinde ise 5-10bp'lik primer kullanılır ve diğerlerine göre daha fazla DNA parçasının amplifikasyonunu sağlar. AP-PCR ayrıca PCR kondisyonu bakımından da diğerlerinden farklılık gösterir.

Kullanılan bu teknikler basit ve ucuz oldukları için çok tercih edilmektedirler ve çoğunlukla taksonominin belirlenmesinde, gen akışının analizinde, hibrit çalışmalarında ve karışık genom örneklerinin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

Kısa primerlerin ve düşük annealing sıcaklıklarının kullanımı genom içine tesadüfi dağılmış çeşitli kısımların fazla miktarda amplifikasyonunu sağlar. Fertler arasındaki

nükleotit dizilimi farkından oluşan polimorfizm RAPD bantlarının olup olmayışlarına göre belirlenir. RAPDs dominant genetik markır olarak kabul edilir ve gen haritası çıkarılması çalışmalarında bu hesaba katılır.



Bu üç teknik için asıl sorun, oluşan bant yapısının kullanılan DNA'nın kalitesine, PCR sıcaklık profiline ve reaksiyon kondisyonuna bağlı olarak hassasiyet göstermesidir. Hatta bazı araştırmacılara göre RAPD fingerprint yapısının, kullanılan polimerase enziminin tipine göre de farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. Eğer üsteki parametrelerin hepsi kontrol altına alınsa bile bu teknikler için bir diğer dezavantaj homozigotluk ve heterozigotluğun tespit edilememesidir. Son olarak RAPD'lerin mutasyon oranı hakkında şu ana kadar herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

#### **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Kesici endonükleazlar enzim çeşidi olup DNA'nın genel olarak 4,5 veya 6bp uzunluğundaki, bilinen nükleotit dizilimlerini tanıyıp, spesifik olarak bu noktalardan keserler. Bu enzimlerin 1960 ve 1970'li yılların başında tanımlanması DNA'nın kullanımını mümkün kılan anahtar keşif olmuştur. Çoğu bakterilerde kesici-modifikasyon sistemleri bulunmaktadır ve hücre içine yabancı DNA'ların girişine karşı savunma mekanizması oluşturur. Bunlar iki bileşene sahiptir; ilki kesici endonükleazdır: kısa ve simetrik DNA nükleotit dizilimini tanırlar ve DNA'nın ikili iplikçliğini tanıdıkları bölgeden keserler (hydrolyzes). Böylece yabancı DNA nispeten küçük parçacıklara ayrılır. Sistemin ikinci bileşeni "methylase" dir ki buda hücrel DNA'nın tanınan bölgesinde bulunan C ve A

nukleotitlerine methyl grubunu ilave eder. Bu modifikasyon endonükleaz enzimlerine karşı DNA'nın direnç göstermesine yardımcı olur.

Örnek olarak; *EcoRI* (*Escherichia coli*) endonükleaz enzimidir. Bu enzim 6bp nukleotit dizilimini tanıır ve iki iplikçikli linear DNA'yı bu nukleotit dizilimini gördüğü her noktada keser.

*EcoRI* 5'GAATTC3'  
3'CTTAAG5'

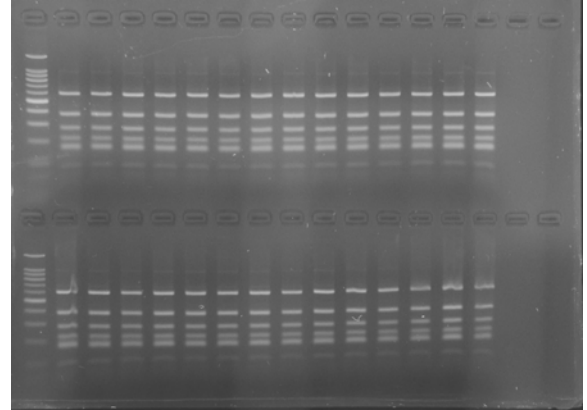
Bunun anlamı 6bp'lik tanınan alan genom içerisinde tesadüfi olarak yaklaşık her  $4^6=4096$ bp olacaktır. Bunun gibi yüzlerce kesici enzim bulunmaktadır ve ticari olarak bulmak mümkündür. Bunlar genellikle 4-8bp'lik dizilimleri tanırlar. Linear DNA, bu enzimler kullanılarak kesildikten sonra parça büyüklüklerine göre agaros jel üzerinde seperasyonu yapılır. Bu DNA parçalarının miktarı ve büyüklükleri genellikle nukleotit diziliminde mutasyonla meydana gelecek değişikliğe bağlı olarak varyasyon gösterir. Bu yaklaşım bize üretilen DNA parçacıklarının miktarı ve büyüklüklerinin karşılaştırılması imkanını verir. DNA parçacıkları genellikle direk olarak ethidium bromide boyamasıyla, end labelling ( $^{32}P$ ) veya hibridizasyon yöntemi ile görüntülenirler. Bu güne kadar bu analiz yöntemi çoğunlukla mtDNA üzerinde kullanılmıştır. MtDNA'ların yüksek evölüsyon hızına sahip olması (single copy nuklear DNA'ya göre 5-10 kez daha fazla), maternal olarak (anneden) kalıtsal olması ve boyut olarak çok küçük olması bu molekülün RFLP analizini populasyon çalışmaları için vaz geçilmez kılmaktadır.

### PCR (The Polymerase Chain Reaction)

1970 yıllarında genlerin klonlanma tekniklerinin gelişimi, geçmişte mümkün olmayan gen aktivitelerinin araştırılmasını mümkün kılmıştır. Genetik alanında ikinci devrim ise aynı şekilde 1980'lerde PCR'in icadı ile yaşanmıştır. PCR'la birlikte DNA'nın küçük bir bölgesi DNA polimerase enziminin de kullanımı ile birlikte milyonlarca defa kopyalamak mümkün olmuştur. Fakat burada önemli olan şey çalışılacak olan DNA parçasının her iki ucunun nukleotit diziliminin bilinmesi gerekmektedir. Bu bilgi ilgilenilen DNA parçasının her iki ucu için primer geliştirilmesini zorunlu kılar. Primerler oluşturulduktan sonra iki

uç arasındaki bölüm PCR kullanılarak çoğaltılabilir.

Amplifikasyon genellikle DNA polimerase enzimi ile birlikte yürütülür. Bu enzim sıcak kaplıca sularında yaşayan *Thermus aquaticus* isimli bakteriden sağlanmıştır. Aynı bakteri ayrıca kesici enzimlerden *TagI*'i de üretir. *Tag* polimerase enzimi sığağa toleranslı olması denaturasyona karşı dirençli olduğunu gösterir ve PCR metodunda vazgeçilmez bir unsur olarak karşımıza çıkar. PCR amplifikasyonuna başlamak için enzim ve primer, geliştirilmiş hedef DNA'nın bulunduğu ortama konulur ve sentezlemenin oluşumu için inkübe edilir. Karışım daha sonra 94°C'ye kadar ısıtılarak yeni sentezlenmiş iplikçiklerin hedef DNA'dan ayrılması sağlanır (denaturation) ve örnek soğutulur, bu aşama primerlerin örnek ve yeni sentezlenmiş olan tek DNA iplikçiklerinde kendi pozisyonlarına hibridize olmalarını sağlar (annealing). Daha sonra *Tag* polimerase ikinci kez DNA'yı sentezler. Bu denaturasyon -hibridizasyon -sentez turları yaklaşık olarak 25-30 kez devam eder ve bunun sonucunda hedef DNA parçasının yüz milyonlarca kez kopyalarının oluşması sağlanır. PCR çalışmasının sonucunda örnek genellikle agaros jel elektroforez ile analiz edilir. Daha sonra örnek ethidium bromide ile boyanarak görünümü sağlanır.



PCR tekniğinin kullanımıyla DNA amplifikasyonunun gelişimi, 100 yıllık veya daha eski pul veya saklanan herhangi doku örneği üzerinde balık populasyonlarındaki genetik değişikliklerin araştırılmasını mümkün kılmaktadır. Ayrıca canlıyı öldürmeden alınacak çok küçük bir doku parçası bile bu teknik için yeterli olmaktadır.