

BALIKÇILIK VE SU ÜRÜNLERİNDE KULLANILAN GENETİK MARKIR SİSTEMLERİ

Yılmaz ÇİFTÇİ - (SÜMAE) Genetik ve Islah Bölüm Başkanı

GİRİŞ

Balıkçılık araştırmalarında moleküler genetik teknikleri uygulamaları 1950'li yıllardan beri giderek artış göstermektedir. Bunun nedeni uygun tekniklerin ve genetik bilgilerin önemi üzerine olan ilginin artmasıdır. Yapılan ilk çalışmalar özellikle morinalarda, salmonidler ve ton balıklarında kan grubu farklılıkları üzerine olmuş ve populasyon yapısının analizinde kullanılmak üzere genetik olarak kontrol edilen varyasyonların mevcudiyeti başarılı bir şekilde ortaya konulmuştur. Fakat bu serolojik işlemler balıkçılık çalışmalarına tam olarak adapte olmadığı için kısa süre içinde yerini protein polimorfizminin genetik olarak belirlendiği elektroforetik işlemlere bırakmıştır. Kolay, hızlı ve ucuz bulunan protein elektroforezi ile çoğu bitki ve ticari olarak pahalı balık türlerini de içine alan hayvan türlerindeki populasyon farklılıkları hızlı bir şekilde tespit edilmiştir.

Protein veya alloenzim elektroforezi nükleer DNA'daki farklılıkları dolaylı olarak tahmin etmektedir. Fakat direk tahminler ancak kesici enzimlerin izolasyonu ile mümkün olmuştur. Bu enzimler DNA'yı spesifik baz dizilimlerinden kesmekte ve elektroforez jeli üzerinde dağılabilen farklı büyüklükte parçalar oluşturmaktadır. Bu teknolojinin başlangıçtaki kullanımı çoğunlukla mitokondriyal DNA'lar (mtDNA) üzerinde olmuştur. Çünkü mtDNA'lar küçük boydadır ve elde edilmeleri kolaydır. Fakat son zamanlarda kesici enzimlerin nükleer DNA'lar üzerine kullanımı giderek artmaktadır. Yakın zamanda ise PCR teknolojisinin gelişimi çok az miktardaki DNA'nın çoğaltılmasına ve analizine imkan vererek moleküler genetik çalışmalarına geniş ve farklı bir boyut kazandırmıştır.

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

Bu sunuşun birincil amacı özellikle balıkçılıkta yaygın olarak kullanılan moleküler genetik tekniklerinin tanıtılması, avantaj ve dezavantajlarının ortaya konulmasıdır.

Protein Elektroforezi

İsoenzim bir veya birden fazla loki tarafından kodlanan enzimlerin fonksiyonel olarak benzer fakat ayrılabilen formlarıdır. Aynı lokusta farklı allellerin ürünü ise alloenzim olarak isimlendirilir. Yaklaşık yirmi yıldır balık genetikçileri farklı balık türlerinde populasyon düzeyinde genetik farklılıkları karakterize edebilmek için protein elektroforezlerini ana araç olarak kullanmaktadırlar. Bu teknik ilk başlarda insanlarda kan gruplarının tetkikinde kullanılmıştır. Fakat daha sonra diğer türlerde kullanımı için uyarlanmıştır. Nispeten ucuz olması, çok az özel geliştirilmiş aletlere ihtiyaç duyması, geniş çapta ve hızlı bir işleme sahip olması ve genom içerisinde yayılmış ve birbirinden ayrı lokileri eşzamanlı olarak izlenmesine imkan tanınması bu tekniği genetik çalışmalarda avantajlı kılmaktadır. Bir çok çalışmada stoklar arasındaki protein allel frekansları arasındaki farklılıkların belirlenmesi, özellikle anadrom balıklarda stokun teşhis edilmesinde protein elektroforezlerini yararlı bir markır haline getirir.

Metod temelde elektrik akımı verildiği zaman protein molekülünün kendisinin tersi yüke doğru yönelmesi esasına dayanır. Nişastadan yapılmış jel içerisindeki yer değişikliklerinin mesafesi molekülün elektrik yüküne ve büyüklüğüne bağlıdır. Proteinin elektrik yükü ise içerdiği aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. DNA yapısındaki herhangi bir değişiklik aminoasitlerin diziliminde farklılıklara sebep olur ve böylece molekülün net yükünü etkiler.

Özel boyama maddelerinin kullanımı ve oluşan bant yapılarının çok dikkatli yorumlanmasıyla proteini kodlayan lokusun veya lokilerin genetik yapısının belirlenmesi böylece mümkün olabilir. Alloenzim yapılarının doğru yorumlanması birkaç faktöre bağlıdır:

a. Tüm bantların açık bir şekilde görünür olması gerekir yani enzim yeteri derecede aktif olmalıdır. Bu genellikle örneklerin saklama kalitesi ile alakalı bir durumdur (canlı öldükten sonra örneklerin ne kadar hızlı dondurulduğu, örneklerin soğuk muhafazayla veya -20°C saklandığı gibi). Fakat bazı enzimler diğerlerine göre daha çok hassas olabilirler. Örneklerin uygun olmayan şartlarda stoklanması bant yapısında bozuklukları artırır bu da subunitelerin parçalanmasından meydana gelir.

b. Kullanılan buffer sisteminin bantları yeteri derecede çözebilecek etkide olması gerekir. Farklı buffer sistemlerinde çözünürlük, farklılıklar gösterir, bu da enzimin optimal pH'sı ile birlikte molekülün büyüklüğüne ve elektrik yüküne bağlıdır.

c. Bazı lokilerin ürünleri yalnız bazı organlarda ortaya çıkar. Tüm lokilerin ürünlerinin elektroforetik hareketliliğinin belirlenmesi önemlidir. Böylece örneklerin kontaminasyonu sonucunda farklı dokudan olan lokus ürünleri ile gerçek örneğin allallerinin karşılaştırılmasının önüne geçilebilir.

Yukarıda anlatılan bu tür faktörler dikkate alınarak yapılan çalışmadan sonra gözlenen bant yapıları yalnızca allelik değişiklikler olarak yorumlanır. Yani, örneğin parçalanmasından dolayı gereksiz bantların oluşumu gibi açıklamaların şansı yoktur.

Genel olarak alloenzim çalışmaları DNA markırları ile karşılaştırıldığında;

a. Kimyasal kullanım ve işçilik bakımından düşük ücret gerektirir.

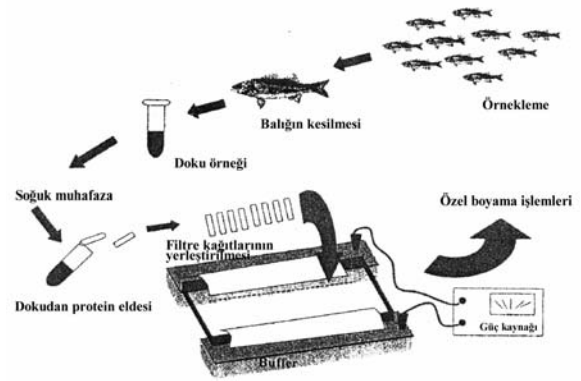
b. Kısa süre içerisinde çeşitli alloenzim lokileri için çok fazla sayıda örnek çalışılabilir.

c. Kodominantlık; diploit organizmalarda her iki allel genellikle açık bir şekilde belirlenebilir ve heterozigotlar homozigotlardan ayırt edilebilir.

Bütün bunlarla birlikte alloenzim çalışmalarının bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Yeni bir allel yalnızca nukleotid dizilimde meydana gelecek değişikliklerle birlikte oluşacak aminoasit değişiklikleri ile molekülün elektroforetik hareketliliğindeki değişim yoluyla tespit edilebilir ve polimorfik olarak nitelendirilir. Yalnızca 64 kodonun 20 tane aminoasidi kodlaması ve her aminoasit değişiminin elektrik yükünde değişiklik meydana getirmemesi ve yalnızca nukleotidlerin %30'unun değişiminin ancak elektroforetik olarak tespit edilmesi sınırlayıcı etkenlerdendir. Teorik olarak DNA ile yapılan çalışmalar proteine göre daha polimorfiktirler. Alloenzim elektroforezlerinin kullanımı genomun yalnız belirli bir kısmındaki değişiklikleri belirlemekle sınırlıdır. Kullanılan doku tipleri (kas, ciğer, göz, kalp gibi) genellikle örnek toplarken canlının ölmesini gerektirmektedir. Ayrıca örneklerin saklanması bir aya kadar -20°C 'de, bundan uzun süreler için -70°C 'de olmalıdır.

Proteinleri oluşturan 20 amino asitin ancak 5'i elektrik akımına maruz bırakıldığında farklı elektrik yüküne sahip olurlar ve jel içerisinde farklı oranlarda hareket ederler. Bu

aminoasitlerden 3'ü (lysine, arginine ve histidine) pozitif net yüke, diğer 2'si ise (aspartik asit ve glutamik asit) negatif yüke sahiptir. Geriye kalan 15 tanesi ise elektrostatiksel olarak nötrdür. Elektrik akımının jele verilmesi ile elektrik yüklü proteinlerin hareket etmesine neden olunur ve daha sonra boyama yöntemi ile protein gözlenir. Basit olarak eğer protein homojen ise (yani homozigot ürünü) jelde tek bant görülür ve bu homozigotluğu gösterir. Eğer protein heterojen ise (yani iki bant belirmiş ise) bu da heterozigotluğun göstergesidir. Burada iki allelik protein ürünleri amino asit bakımından farklıdır ve farklı elektrik yüküne sahiptir. Böylece farklı oranlarda hareket ederler.



Şekil 1. Protein Elektroforezinin çalışma aşamaları

DNA Düzeyi Varyasyon

DNA düzeyindeki farklılıklar iki kategori altında genellenebilir. Bazı değişimi veya ekleme (insertion) ve çıkarma (deletion). Varyasyonun en basit formu, tek bir nukleotidin bir başka nukleotit yerine ikame etmesidir. Buna ayrıca nokta mutasyonu da denir. Bu küçük değişiklik önemsiz görülebilir fakat insan hemoglobinin geninde tek bir nukleotidin bir başkası tarafından ikamesi hemoglobinde amino asit değişikliğine neden olmaktadır. Bu sebepten 4 milyar nukleotitten birinin değişimi canlıda önemli bir değişiklik meydana getirmektedir. DNA yapısında yalnızca 4 nukleotidin bulunması nokta mutasyonunda bir nukleotidin ancak diğer üç nukleotitten biriyle yer değiştirebilir anlamındadır. Fakat burada her bir nukleotit değişimi aynı etkiyi göstermez. Nukleotitler arası yer değişimi purinden purine veya primidinden primidine olursa bu transition olarak adlandırılır. Bunun yanında eğer yer değişimi purinden primidine veya tersi olursa buda transversion olarak adlandırılır.

DNA diziliminde meydana gelen diğer tip değişiklik bir veya birden fazla nukleotidin eklenmesi veya çıkmasıdır. Genelde bu eklenme ve çıkma yalnız bir nukleotitde

olabileceği gibi yüzlerce ve binlerce uzunluktaki nukleotit diziliminde de olabilir. İki iplikçiğin karşılaştırılmasında eklenme ve çıkma olan her iki taraftaki nukleotit dizilimi aynıdır.

Mitokondriyal DNA

Bir çok nedenden dolayı, canlılarda en fazla çalışılan kısımların başında gelmektedir. Çoğu kez hücrenin güç santrali olarak düşünülen mitokondriler, solunum olarak bilinen kimyasal tepkimelerin meydana geldiği bölgelerdir. Mitokondri hücre solunumu ve diğer fonksiyonlar için hayati olan genleri içeren kendi DNA'sına sahiptir. Hücrenin DNA'sından fiziksel olarak ayrılmıştır, yani nukleusun dışında bulunur. Fiziksel olarak izole ve 16.000-20.000 bp'lik nukleotid dizilimi ile sirküler halde bulunması mtDNA'yı milyarlarca nukleotide sahip genomik DNA'dan kolay bir şekilde ayırmaktadır. MtDNA kompakt bir yapıya sahip olmasının yanında haploittir. Sitoplazmik olarak kalıtsaldır ve yumurtanın sitoplazması dışından geldiği için mtDNA'da baskın olarak anneden (maternal) geçmektedir. MtDNA paternal olarak döllere çok az veya hiç geçmemektedir ve mitokondri genomları arasında rekombinasyon yoktur. Çoğu organizmalarda mutasyonların birikimi mtDNA da tek kopyalı nukleer genlere oranla daha hızlı olmaktadır. Bir başka deyişle mtDNA genetik kaymaya karşı hassas ve büyük farklılıklar gösteren bir markır olarak gözükmemektedir ve böylece türler ve populasyonlar arasındaki farklılıkları görmek kolaylaşır ve bu da mtDNA'yı hem sistematik hem de populasyon genetiği çalışmaları için çekici kılar.

Mitokondriyal genomun farklı bölgeleri farklı oranlarda ortaya çıktığından bu bölgeler belirli tip çalışmalar için hedeflenmiştir. Cytochrome b ve ND genleri populasyon düzeyinde farklılık gösterdiği rapor edildiğinden bir çok türde çalışılmaktadır. Ayrıca D-loop memelilerde yüksek oranda farklılıklar gösterdiği için populasyon çalışmaları için tercih edilmektedir fakat bu durum balıklar için geçerli değildir. Mitokondriye ait ribozomal genler türler için ve hatta familya seviyesinde çalışmalarda kullanılmaktadır. Mitokondriyal genom otuzun üzerinde gene sahip olmasına rağmen, rekombinasyona sahip olmamalarından dolayı populasyon genetiği çalışmalarında tek lokus olarak kabul edilmektedirler.

Minisatellite DNA Markır

Çok hücrelilerde sıralı tekrar gösteren nukleotid dizilimlerinin bulunduğu 1968 yılında yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Bu nukleotit dizilimleri kompleks ökaryotik genomun caesium klorit santrifüjü ile belirlenmiş

ve orijinal 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. Satellite DNA'ların analizi sonucunda bunların çoğunlukla sıralı tekrar eden nukleotit dizilimlerinden meydana geldiği ortaya konulmuştur. Minisatellit ve mikrosatellit olarak ikiye ayrılırlar. Minisatellitlerin oluşturduğu tekrar dizilimleri genellikle 9-64 bp'lik motiflerden oluşmakta ve 0.1 ile 7 kb (kilo baz)'a kadar ulaşabilmektedir. Mikrosatellitler ise genellikle 100-200 bp'e ulaşan kısa yapılarla sahiptir. Tekrar motifleri ise ikili, üçlü, dördü veya beşli şekilde olabilir, ((CA/GT)_n veya (AGC/TCG)_n gibi).

Nukleer genomda aşırı farklılık gösteren minisatellit lokillerin ortaya çıkarılması genetik markır sistemleri içersinde çok fazla değişikliklere neden olmuştur. Kodlama yapmayan bölgelerin farklılıklarının gözlenmesi yalnızca populasyon ve filogenetik çalışmaları değil ayrıca doğal populasyondaki familyaları, akrabalık derecelerini ve fertlerin pozitif olarak tanınmasını mümkün kılmıştır.

Minisatellite DNA'ların varlığı 1985 yılında Jeffrey ve arkadaşları tarafından insan minisatellit probunun izolasyonu ile tam olarak ortaya çıkmıştır. Bu multilokus probular birden fazla lokusta bulunan sıralı tekrar içeren nukleotit dizilimlerinin merkezinin hibridizasyonunda kullanılmaktadır. En iyi bilinen insan minisatellit probuları 33.6 ve 33.15 ökaryotların çoğunun DNA'sını hibridize ettiği tespit edilmiştir. Bunlar ve bunun gibi multilokus probular geniş bir alana yayılmış şekilde bitki, kuş ve hayvan türlerinde populasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Polimorfiklik çalışılan bölgelerde tekrar gösteren nukleotit diziliminin sayısında meydana gelen eşit olmayan krosingover ve DNA replikasyonu sırasında DNA kaymasından dolayı olmaktadır.

Multilokus polimorfik markırlar genetik çalışmalarda geniş bir yere sahip olmalarına rağmen çok fazla sayıda bant oluşması nedeniyle heterozigotluğun veya homozigotluğun tesbitinin mümkün olmaması ve aynı lokustan gelen bantların veya farklı lokuslardan benzer büyüklükteki DNA parçalarının jel üzerinde aynı şekilde yer değiştirmesi genetik hesaplamalarda belirsizlikler yaratmaktadır. Bu problemlerden kaçınmak için tek lokus minisatellit kullanımı mümkündür. Tek lokus minisatellit, DNA'nın kodlama yapmayan kısımlarının kullanılarak yüksek derecede genetik farklılıklar sergilemesi bu analiz tekniğini alloenzim tekniğine karşı da alternatif yapmaktadır.