

Mikrosatellitler ve Kullanım Alanları

Cemal Ün Klaus Wimmers Siriluck Ponsuksili

Friedrich Schmoll Karl Schellander

Institute of Animal Science, University of Bonn, Germany

Özet: Mikrosatellitler genom içerisinde, mono, di, tri yada tetra nükleotid permutasyonların her hangi bir formu şeklinde tandem olarak tekrarlanan (tandem repeated) ve polimorf özellik gösteren kısa DNA sekanslarıdır.

Bir çok omurgalı genomunda görülen mikrosatellitlerin temel motifi $(CA)_n$ dir. Mikrosatellit tekniğiyle yapılan marker destekli seleksiyon, doğumla beraber uygulanması mümkün yasa ve cinsiyete bağımlı olmaksızın uygulanabilen bir yöntemdir. Bu açıdan genetik ilerleme formülünde kullanılan faktörleri etkileyerek daha etkin ve güvenilir bir seleksiyon uygulamasını mümkün kılmaktadır.

Anahtar sözcükler: Mikrosatellitler, Marker destekli seleksiyon, PCR, Genom analizi

Microsatellites and Their Usage

Abstract: Microsatellites are iterated DNA sequences which are polymorphe and built up by any permutation of mono-, di-,tri- or tetranucleotide motifs. The motif $(CA)_n$ is the most common variant in most vertebrates.

Selection based on markers can be made indepently of sex or age. In that case marker assisted selection affect the factors in formel of genetic gain and increases intensity of selection.

Key words: Microsatellites, Marker assisted Selection, PCR, Genom Analysis

Giriş

Geçtiğimiz 50-60 yıl içerisinde hayvan ıslahında temel olarak kantitatif genetik yöntemler kullanılmıştır (Sellier, 1994). Bu dönemde ıslah konusu hayvanlarla ilgili genetik bilgiyi yapısında saklı tutan DNA'nın farklı bölümlerinin verim özellikleri yada önemli genetik hastalıklarla ilişkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Bu durum günümüzde de yapısını büyük oranda korumaktadır. Kantitatif genetik alanında hayvanın damızlık değerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan genetik-istatistik yöntemler, hayvanın kompleks genetik yapısını ancak kısmen hesaba katmakta ve bazı küçük gen etkilerini hesaba katmamaktadır. Buna rağmen bu yöntemlerle hayvan ıslahı alanında büyük ilerlemeler sağlanmıştır.

Günümüzde moleküler genetik yöntemler, hayvanların genetik enformasyon yapısını belirlemeyi ve hangi genetik kökenli hastalığın yada ekonomik öneme sahip verim özelliğinin hangi genler tarafından kontrol edildiğinin anlaşılmasını olası kılmaktadır (Gelderman, 1988; Schwerin, 1997). Moleküler genetik alanındaki iki temel gelişim bu durumu mümkün kılmıştır. İlk olarak 1985 yılında polimeraz zincirleme reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) aracılığıyla DNA'nın küçük bir parçasının ısı

siklusunun kontrollü olarak değiştirilmesiyle in vitro olarak çoğaltılabileceğinin bulunması ve ikinci olarak, 1989 yılında yine PCR aracılığıyla genom içerisinde tandem olarak tekrarlanan (tandem repeated) DNA sekanslarının bulunduğu ve bunların polimorf olduğunun yada yüksek düzeyde allelik varyasyon gösterdiğinin bulunması hayvan ıslahında ve tıp alanında kalıtım hastalıklarına neden olan genlerin bulunması alanında yeni çığırılar açmıştır (Neitzel, 1989).

Marker Destekli Seleksiyon

Kantitatif genetikte kullanılan genetik-istatistik modeller hayvanın damızlık değerinin belirlenmesinde temel lokuslar üzerindeki gen etkilerinden yola çıkmakta ve bazı küçük gen etkilerinin hesaba katılmasını olası kılmamaktadır. Ayrıca genotip ile fenotip arasında lineer bir ilişki kurulmaktadır (lineer model). Bu bilgiler her koşulda doğru olmayabilmektedir.

Seleksiyonda önemli kriterlerden birisi, seleksiyonla elde edilen genetik ilerlemedir. Genetik ilerleme genel olarak aşağıdaki gibi formüle edilebilir,

$$\Delta G = i P \sigma_A / t$$

Burada

i = Seleksiyon yoğunluğu

P = Seleksiyon kriterleri ile gerçek damızlık değeri arasındaki korelasyon

t = kuşak aralığı

Genom analizi sonucu ölçülen kantitatif karakter lokus (QTL) yada genlerden elde edilen genetik bilgilerin kullanımıyla genetik ilerleme formülünde kullanılan bu üç faktörde etkilenmektedir.

Marker destekli seleksiyon yaşa ve cinsiyete bağımlı olmaksızın yapılabilmektedir ve bu nedenle seleksiyon yoğunluğunu kantitatif yöntemle göre daha etkili kullanmayı mümkün kılmaktadır. Öte yandan marker destekli seleksiyon kantitatif genetik yöntemlerinde kullanılan bilgilere ek olarak destekleyici bilgiler sunmaktadır, bu nedenle gerçek damızlık değerinin tahmin edilmesindeki performansı artırmaktadır. Bir diğer avantaj ise kuşak aralığının seleksiyon ilerlemesine olan etkisinin iyileştirilmesidir. Marker destekli seleksiyonda, hayvanla ilgili genetik bilgiler doğumla birlikte yada çok genç yasta elde edilebilir bu nedenle hayvanın verim zamanını beklemeye gerek kalmadan gerekli seleksiyon uygulanabilir (Sellier, 1994).

Mikrosatellitlerin Genom Analizinde Kullanılması

Mikrosatellitler genom içerisinde mono, di, tri yada tetra nükleotid permutasyonların herhangi biri şeklinde tandem olarak tekrarlanan (tandem repeated) kısa DNA sekanslarıdır (Ellegren, 1993) Mikrosatellitlerin önemli bir özellikleri polimorf olmalarıdır. Mikrosatellitler temel olarak tüm populasyon içerisinde benzer özellikler

göstermesine rağmen bireyden bireye küçük farklılıklar göstermektedirler (Catherine,1992). Bu polimorfizm tarzı mikrosatellitlerin genom analizi ve gen kartlarının çıkarılması alanlarında kullanımlarını uygun hale getirmektedir. Bir çok omurgalı hayvanda bulunan mikrosatellitlerin temel motifi (CA)_n dir. Mikrosatellitler genom içerisinde rast gele dağılmışlardır.

Metot

Mikrosatellitler aracılığıyla genotipin belirlenmesi 4 basamak oluşmaktadır. Sağlıklı ve güvenilir veri elde edilebilmesi bakımından her basamak üzerinde titizlikle durulması gerekmektedir. Bu basamaklar şu şekilde sıralanabilir.

1. DNA izolasyonu
2. PCR
3. Elektroforez
4. Verilerin elde edilmesi ve değerlendirilmesi.

DNA İzolasyonu

Moleküler genetik amaçlarla kullanılacak olan DNA'nın elde edilmesi için kullanılacak metodun mümkün olduğunca yüksek moleküllü ve proteinlerden arındırılmış bir izolasyon sağlaması gerekmektedir. Bu anlamda iki nokta üzerinde durmak gerekmektedir.

1. Hücreden DNAsın inaktive edilmesi ve bu esnada mekanik etkilerden mümkün olduğunca kaçınılması. Yüksek derecede mekanik etki spesifik olmayan DNA fragmentlerinin oluşmasına yol açmaktadır.
2. Elde edilen DNA'nın enzimlerle kolayca reaksiyona girebilmesi için proteinlerden tamamen arındırılması gerekmektedir.

Söz konusu özellikleri sağlayabilmek için temel olarak üç aşamalı bir işleme ihtiyaç duyulur. Bunlar ilk olarak hücrelerin açılıp, DNA nin serbest hale getirilmesi ve proteinas-k aracılığıyla DNAsların inaktive edilmesi yoluyla DNA nın proteinlerinden bağımsız hale getirilmesi. İkinci olarak fenol-kloroform kullanmak suretiyle proteinlerin uzaklaştırılması ve son olarak DNA nın optik aletlerle ölçülüp, kalitesinin belirlenmesi.

PCR

Polimeras zincir reaksiyonu (polimerase chain reaction), belirli reaksiyon komponentlerinin belirli oranlarda bir araya getirilip isi siklusunun kontrollü olarak değiştirilmesiyle, in-vivo DNA replikasyonunun yapay olarak (in-vitro) gerçekleştirilmesi şeklinde tanımlanabilir. Reaksiyon için gerekli olan komponentler, tek iplikçikli DNA (denatüre edilmiş DNA), oligonükleotitler (primers),

desoksiniükleotid trifosfat (dNTPs) ve DNA polimeraz enzimi gibi komponentlerdir. PCR başlıca üç basamaktan oluşan siklusun tekrarlanmasıyla gerçekleşmektedir.

1. DNA'nın denatüre edilmesi

DNA 94-95 C° birkaç dakika ısıtıldığı zaman denatüre olup iplikçikleri birbirinden ayrılır. Denatüre olmuş DNA reaksiyonun ilerleyen aşamalarında hiç bir zaman tekrar renatüre olmaz.

2. Oligonükleotidlerin DNA ile bağlantı kurması

Oligonükleotitler (primers), DNA nın belirli bir bölgesini tanıyıp o bölgeyle reaksiyona girebilen ardışık nükleotitlerdir (Chan, 1994). Oligonükleotitler DNA nın belirli bir bölgesini tanıyıp o bölgeyle reaksiyona girerek kesebilmek için belirli bir sıcaklığa (annealing temperatur) ihtiyaç duyarlar. Bu sıcaklık her oligonükleotidin içerdiği nükleotit sayısına göre değişim gösterir. İyi bir PCR ürünü elde etmede en önemli faktörlerden bir oligonükleotitlerin reaksiyona girmek için gereksinim duyduğu optimum sıcaklık derecesidir.

Bir oligonükleotitin reaksiyona girmek için gereksinim duyduğu optimum sıcaklık derecesi aşağıdaki formüle göre hesaplanabilir.

$$AT = 2x(A + T) + 4x(G + C)$$

AT = optimum reaksiyon ısısı

A = Adenin, T = Timin, G = Guanin, C = Sitozin

3. Yeni DNA zincirinin elde edilmesi

PCR reaksiyonunun üçüncü ve son basamağında polimeraz enzimi aracılığıyla yeni DNA zincirleri üretimi başlar.

Söz konusu PCR basamakları ortalama olarak 25-35 kez tekrarlanmak suretiyle işlem tamamlanmış olur. PCR reaksiyonun da kullanılan araç gereçlerin temiz olması özel bir önem taşır.

Elektroforez

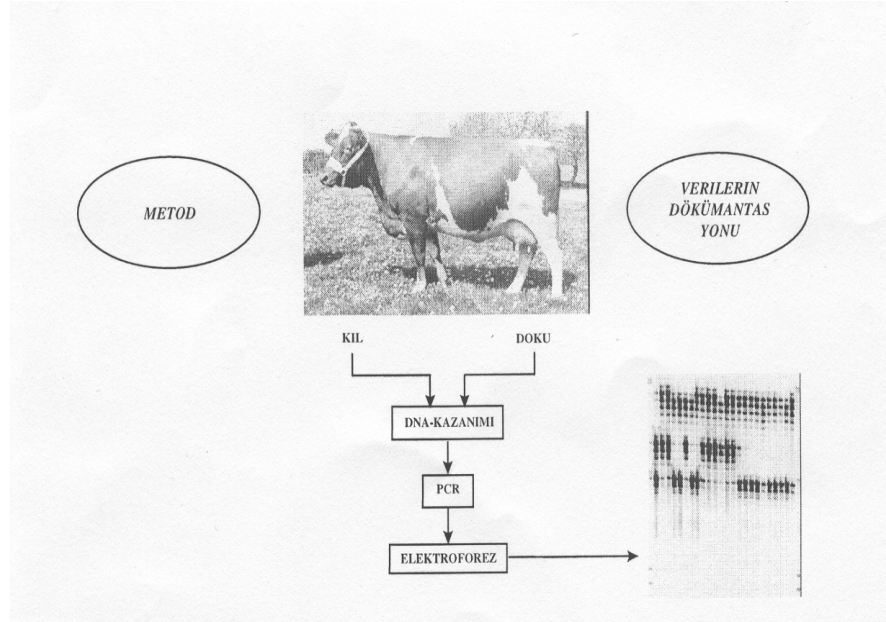
DNA zincirlerinin elektroforezi için agaros ve poliakrilamid jelleri kullanılmaktadır. Her iki jel türü de hem DNA analizleri hem de nükleik asit preparatlarının kazanımı için kullanılmaktadır- Poliakrilamid jeller agaros jölelerle karşılaştırıldıklarında daha fazla ayırıcı özelliğe sahiptirler. Elektroforez sırasında fosfat grupları iyonize edilir ve polinükleotitler polianyon şeklinde geride kalırlar. Bu polinükleotitler elektroforez sırasında yüksek voltajın etkisiyle katottan anota doğru yolalırlar. Katottan anota doğru hareketin hızı moleküler büyüklüğe göre değişim gösterip küçük moleküller daha hızlı büyük moleküller daha yavaş ilerlemektedirler. Bu özellikten yararlanarak DNA kesitlerinin büyüklüğü ölçülmektedir. Ancak bu ölçümün yapılabilmesi için daha

önceden büyüklüğü bilinen standart bir örneğin ölçümü yapılacak olan diğer DNA larla birlikte elektroforeze tabii tutulması gerekmektedir.

Günümüzde bilgisayar uyumlu elektroforez cihazları piyasada bulunmakta ve poliakrilamid jeller ya döküme hazır çözelti yada kullanıma hazır jöleler olarak pazarlanmaktadır.

Verilerin elde edilmesi ve analizi

Elektroforez sonucu elde edilen poliakrilamid jeller klasik yöntemle göre gümüş boyama yöntemiyle (silver staining) değerlendirilebilirler. Fakat günümüzde piyasada bulunan bilgisayar uyumlu elektroforez cihazlarında daha elektroforez aşamasında DNA moleküllerinin fotoğraflarını otomatik olarak ekran üzerinde görüntülemekte ve belleğe kaydetmektedir. Bu fotoğraflar daha sonra özel analiz programlarıyla ve birlikte elektroforeze tabii tutulan ve uzunluğu bilinen standart örnek yardımıyla analiz edilerek hangi DNA nin ne kadar uzunlukta bir mikrosatellit içerdiği moleküler ağırlık yada baz çifti cinsinden hesaplanır. Elde edilen bu veriler istatistik programlar aracılığıyla test edilerek söz konusu mikrosatellitin herhangi bir verim özelliği yada genetik hastalıkla ilişkili olup olmadığı belirlenir.



Sekil 1. Mikrosatellit tekniğinin uygulama aşamaları

Sonuç

Mikrosatellitlerin belirli bir tür içerisinde polimorf olmaları ve temelde benzer olmasına rağmen bireyden bireye küçük farklılıklar içermeleri moleküler genetik alanında marker olarak kullanılmasını uygun hale getirmektedir. Hayvan ıslahında seleksiyon en önemli alanlardan birini oluşturmaktadır. QTL yada genlerin, hayvanların damızlık değerlerinin belirlenmesinde kullanılan modellere dahil edilmesi damızlık değerin daha güvenilir hesaplanmasını sağlamaktadır. Hayvanın genetik yapısı daha yaşamının başında analize hazır olduğundan bu yöntemin çok erken yasta (yaşa bağlı olmaksızın) uygulanabilmesini olası kılmaktadır. Gelecekte birçok lokusun belirlenmesiyle birlikte hayvan ıslahında marker destekli seleksiyondan büyük oranda yararlanılacaktır.

Kaynaklar

- Catherine M. Hearne., Somutria, Ghosh and John. A. Todd, 1992. Microsatellites for Linkage Analysis of Genetic Traits. Tig August 1992 vol.8 No.8 England.
- Chen. Yizhou, 1994. Darstellung und Anwendung von VNTRs beim Schwein. Dissertation. Universität Hohenheim, Institut für Tierhaltung und Tiezüchtung. Stuttgart
- Ellegren. Hans, 1993. Genome Analysis with Microsatellite Markers. Dissertation. Department of Animal Breeding and Genetics, Swedish University of Agricultural Science. Uppsala
- Gelderman. Hans, 1988. Genomanalyse bei Nutztieren. Züchtungskunde 60(3). S. 232-247 Stuttgart
- Neitzel. H, 1989. Humangenetik: Aktuelle Möglichkeiten- Zukünftige Perspektiven. Biologie Heute Nov./ Dez. 1989 No: 370
- Schwerin. M, 1997. Molekulargenetische Grundlagen Funktioneller Merkmale beim Rind. Arch. Tierz. Dummerstorf 40(1997) Sonderheft Dummerstorf
- Sellier. P, 1994. The Future Role of Molecular Genetics in the Control of Meat Production and Meat Quality. Meat Science 36 (1994) 29-44 England