

Charakterystyka markerów mikrosatelitarnych

Milena Sawera, Joanna Gruszczyńska,
Wiesław Świderek

SGGW

Terminem „marker genetyczny” określane są polimorficzne cechy jakościowe organizmu, które charakteryzuje proste dziedziczenie mendlowskie oraz które można dokładnie zidentyfikować metodami analitycznymi. Nowoczesne techniki analizy molekularnej umożliwiły ujawnienie występowania polimorfizmu również w niekodujących rejonach genomu oraz wykorzystanie ich w genetycznej charakterystyce organizmów.

Markery genetyczne podzielono na dwie klasy [15]. Markery genetyczne klasy I są to geny kodujące cechy jakościowe organizmu, natomiast markerami genetycznymi klasy II są niekodujące sekwencje DNA. Do markerów genetycznych klasy I zalicza się: antygeny erytrocytarne (układy grupowe krwi), antygenowe determinanty białek surowicy krwi (allotypy immunoglobulin, allotypy lipoprotein), białka polimorficzne (osocza krwi, erytrocytów, mleka, białka jaj ptaków), antygeny leukocytarne oraz powierzchniowe komórek jądrzastych, czyli antygeny głównego układu zgodności tkankowej (Major Histocompatibility Complex – MHC). Markerami genetycznymi klasy II są: polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA (Restriction Fragment Length Polymorphisms – RFLPs); minisatelitarny polimorfizm DNA w postaci zmiennej liczby tandemowych powtórzeń (Variable Number of Tandem Repeats – VNTRs); mikrosatelitarny polimorfizm DNA w postaci krótkich tandemowych powtórzeń (Short Tandem Repeats – STRs) oraz polimorfizm losowo amplifikowanych fragmentów DNA (Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD) [8].

Markery genetyczne klasy I identyfikuje się metodami serologicznymi lub metodami elektroforetycznymi. Natomiast markery genetyczne klasy II identyfikowane są przy użyciu technik analizy molekularnej, np. łańcuchowej reakcji polimerazy (Polymerase Chain Reaction – PCR) lub metody hybrydyzacji z sondą molekularną. Markery genetyczne klasy II, dzięki charakteryzującemu je wysokiemu polimorfizmowi oraz możliwości określenia stopnia polimorfizmu bez względu na wiek czy płeć osobnika, mają ogromne zastosowanie w nowoczesnej biologii, medycynie człowieka i zwierząt oraz w hodowli zwierząt.

Mikrosatelitarny polimorfizm DNA

Po 1989 roku, wraz z postępowaniem technik genetyki molekularnej, nastąpił rozwój badań sekwencji mikrosatelitarnych. Sekwencje mikrosatelitarne to proste, tandemowe powtórzenia składające się z dwu-, trzy- lub czteronukleotydujących motywów. Najczęściej identyfikowane mikrosatelity są to sekwencje o dwunukleotydującym motywie powtórzeń [(GT)/(CA)]_n. Może to być również jeden powtarzający się motyw, np. (GT)_n, przerywany inną sekwencją mikrosatelitarną, np. (GT)₁₉CT(GT)₄CT (w locus MP35 u świni), lub sekwencja złożona, np. (GT)₁₆(AG)₁₄ (w locus S0068 u świni) [2]. Mikrosate-

lity występują głównie w obrębie niekodujących fragmentów DNA – w intronach genów, chociaż ich obecność stwierdzono również w eksonach niektórych genów, np. w genie ApoA1 u świni, w którym liczba dwunukleotydujących powtórzeń mikrosatelitarnych wynosi od 10 do 50 [2].

Mikrosatelity dziedziczone są zgodnie z prawami Mendla. Sekwencje te cechuje duże zróżnicowanie liczby powtórzeń motywu podstawowego, co warunkuje polimorfizm długości mikrosatelitów, który można stwierdzić w reakcji amplifikacji PCR i elektroforezy w żelu. Zróżnicowanie liczby powtórzeń występuje zarówno pomiędzy poszczególnymi rasami, jak i między osobnikami należącymi do tej samej rasy [3]. W genomie człowieka sekwencje te występują z częstotliwością raz na około sześć tysięcy par zasad. Ze względu na częstotliwość występowania, wysoki stopień polimorfizmu oraz równomierne rozmieszczenie w genomie są one doskonałymi markerami genetycznymi.

Wielkość polimorfizmu mikrosatelitów jest tak wysoka, że poziom heterozygotyczności w locus mikrosatelitarnym wynosi przeciętnie 80%. Często nawet we względnie małych populacjach stanowi on ponad 60%. Wysoki poziom heterozygotyczności w loci mikrosatelitarnych spowodowany jest wysokim poziomem mutacji, którego frekwencję szacuje się na około 0,001 w locus na pokolenie. Dzięki temu mikrosatelity są bardzo przydatnymi markerami genetycznymi w badaniach ewolucyjnych zależności pomiędzy blisko spokrewnionymi populacjami zwierząt [14].

Dodatkową zaletą mikrosatelitów, obok dużej zmienności liczby powtórzeń warunkującej polimorfizm, jest równomierne rozmieszczenie w genomach eukariotów. Dlatego też mikrosatelity uznawane są za idealne markery wykorzystywane w mapowaniu genetycznym oraz w ustalaniu map genomów zwierząt. W większości badań molekularnych mikrosatelity zajmują miejsce takich markerów, jak RFLP i RAPD [4].

Identyfikacja jak największej liczby markerów genetycznych, jakimi są mikrosatelity, jest niezwykle pomocna w mapowaniu genów cech ilościowych (Quantitative Trait Loci – QTL). W tym celu wykorzystuje się znajomość sprzężeń pomiędzy łatwymi do identyfikacji mikrosatelitami a fenotypową ekspresją cech ilościowych. Sekwencje mikrosatelitarne, dla których znane są sekwencje flankujące, identyfikuje się wykorzystując metodę łańcuchowej reakcji polimerazy (Polymerase Chain Reaction – PCR), w wyniku której następuje amplifikacja danego odcinka DNA [7]. Zaletą mikrosatelitów jest to, że jedynym wymogiem w badaniu danego locus mikrosatelitarnego jest znajomość sekwencji starterów (krótkich odcinków liczących około 20 par zasad – pz) niezbędnych do amplifikacji badanego odcinka. Bardzo ważną cechą jest możliwość numerycznego opisanie polimorfizmu mikrosatelitów oraz komputerowej analizy danych.

Mikrosatelity można również identyfikować wykorzystując metodę hybrydyzacji fragmentów genomowego DNA z różnymi sondami molekularnymi o przykładowych sekwencjach: (GATA)_n, (GACA)_n, (GT)_n. Tę metodę identyfikacji mikrosatelitów wykorzystuje się często w kontroli pochodzenia zwierząt (np. u bydła, koni, psów).

Funkcja mikrosatelitów nie jest do końca wyjaśniona. Najprawdopodobniej mogą one mieć wpływ na ekspresję genów oraz na miejsca rekombinacji. Iraqi i Teale [6] zaobserwowali, że zwiększenie długości sekwencji mikrosatelitarnych występujących w regionach promotorów genów ma wpływ na transkrypcję danego genu. Sugeruje to, że mikrosatelity mogą działać jak elementy wzmacniające transkrypcję genu czy sekwencje aktywacji (Upstream Activation Sequences – UASs).

Wykorzystanie markerów mikrosatelitarnych

Metody genetyki molekularnej umożliwiają identyfikację coraz większej liczby rozproszonych w genomie markerów genetycznych (sekwencji minisatelitarnych i mikrosatelitarnych), wykorzystywanych w nowoczesnej hodowli zwierząt do badań polimorfizmu DNA. Mikrosatelity zidentyfikowane u zwierząt gospodarskich (u bydła, koni, świń, owiec) zarejestrowane są w międzynarodowym banku genów GenBank lub EMBL (European Molecular Biotechnology Lab) [10]. Stanowią one znaczną pulę ważnych markerów genetycznych, bardzo przydatnych w mapowaniu sprzężeń genetycznych w genomie człowieka oraz w genomach zwierząt gospodarskich. Mikrosatelity były wykorzystane w mapowaniu genetycznym chromosomu X człowieka, w którym to chromosomie występuje tylko kilka markerów RFLP i VNTRs [9]. Fakt, że sekwencje mikrosatelitarne są identyczne lub bardzo podobne u blisko spokrewnionych gatunków, umożliwia stosowanie w reakcji amplifikacji takich samych zestawów starterów u różnych gatunków zwierząt. Startery ustalone do amplifikacji mikrosatelitów u jednego gatunku, mogą być wykorzystane do analizy polimorfizmu długości mikrosatelitów w genomach innych gatunków zwierząt [12].

Wyniki badań Moore'a i Vankana [13] oraz Crawforda i wsp. [1] dowodzą, że około 68% (276 z analizowanych 406) par starterów wykorzystanych do amplifikacji fragmentów mikrosatelitarnych bydła, może być stosowanych w reakcji amplifikacji PCR analogicznych sekwencji u owiec, przy czym polimorfizm wykazuje prawie 67% loci mikrosatelitarnych [5]. Slate i wsp. [16] stwierdzili wysoki konserwatyzm genetyczny sekwencji mikrosatelitarnych bydła u prymitywnej owcy soay oraz u dwóch gatunków jelenia – jelenia szlachetnego i jelenia sika. Autorzy przeanalizowali możliwość stosowania 174 par starterów sekwencji mikrosatelitarnych bydła w analizie molekularnej u wymienionych gatunków zwierząt. W wyniku reakcji PCR, w której wykorzystano około 74% z analizowanych 174 par starterów, otrzymano produkty amplifikacji, z których około 40% wykazało polimorfizm.

U wielu gatunków ssaków, w genie dystrofii mięśniowej (u ludzi gen dystrofii mięśniowej Duchenne'a), dokładnie w odcinku 3' regionu niepodlegającego translacji (UTR – untranslated region) tego genu, występuje wysoko konserwatywna sekwencja mikrosatelitarna o motywie powtórzenia $(CA)_n$ [17]. Zeiss i wsp. [17] zastosowali specyficzne dla gatunków z rodziny psowatych pary starterów do amplifikacji regionów 3' – UTR genu dystrofii mięśniowej u 18 różnych gatunków zwierząt mięsożernych oraz u 6 innych (człowieka, szympansa, kozy, bydła, królika i myszy). Badacze ci wykazali homologię powtórzenia $(CA)_n$ w genie dystrofii mięśniowej nawet u odległych ewolucyjnie gatunków.

Moore i wsp. [11] stwierdzili konserwatyzm dwunukleotydowej sekwencji mikrosatelitarnej $(CA)_n$ występującej w końcu 3' niepodlegającego translacji regionu genu NCAM – cząsteczki adhezji na komórkach nerwowych (Neural Cell Adhesion Molecule) u bydła, szczura oraz człowieka. Wysoki poziom identyczności sekwencji genu NCAM umożliwia wykorzystanie jednego zestawu starterów do amplifikowania sekwencji obejmującej powtórzenie mikrosatelitarne w tym regionie u wielu gatunków zwierząt. Analiza sekwencji mikrosatelitarnych ujawniła identyczność powtórzenia dwunukleotydowego u wszystkich gatunków ssaków, u których badano zróżnicowanie długości tej sekwencji mikrosatelitarnej. Polimorfizm regionu 3' genu NCAM stwierdzono u szczura, owcy, bydła, orki, delfina oraz bizona [11].

Sekwencje mikrosatelitarne jako markery genetyczne wykorzystywane są w hodowli zwierząt w następujących badaniach: w charakterystyce struktury genetycznej populacji oraz stopnia zimbredowania populacji, w szacowaniu zmienności genetycznej zwierząt, w badaniach kontroli pochodzenia, w ocenie dystansu genetycznego pomiędzy rasami, populacjami czy określonymi liniami zwierząt. Ponadto stosowane są w badaniach filogenetycznych (ustalaniu filogenetycznej historii populacji zwierząt), identyfikacji genów cech ilościowych (QTL), identyfikacji osobników będących nosicielami genów głównych oraz w konstrukcji genetycznych map sprzężeniowych genomów zwierząt domowych.

Literatura: 1. Crawford A.M., Dodds K.G., Ede A.J., Pierson C.A., Montgomery G.W., Garmonsway H.G., Beattie A.E., Davies K., Maddox J.F., Kappes S.W., Stone R.T., Nguyen T.C., Penty J.M., Lord E.A., Broom J.E., Buitkamp J., Schwaiger W., Epplen J.T., Matthe P., Matthews M.E., Hulme D.J., Beh K.J., McGraw R.A., Beattie C.W.: *Genetics* 140 (2), 703-724, 1995; 2. Fredholm M., Wintero A.K., Christensen K., Kristensen B., Nielsen W.D., Archibald A.: *Mammalian Genome* 4, 187-192, 1993; 3. Fredholm M., Wintero A.K.: *Animal Genetics* 27, 19-23, 1996; 4. Goldstein D.B., Pollock D.D.: *Journal of Heredity* 88 (5), 335-342, 1997; 5. de Gortari M.J., Freking B.A., Kappes S.M., Leymaster K.A., Crawford A.M., Stone R.T., Beattie C.W.: *Animal Genetics* 28, 274-290, 1997; 6. Iraqi F., Teale A.: *Immunogenetics* 48, 302-304, 1998; 7. Kemp S.J., Brezinsky L., Teale A.J.: *Animal Genetics* 24, 363-365, 1993; 8. Kuryl J.: *Prace i Materiały Zootechniczne*, 48-75, 1997; 9. Luty J.A., Guo Z., Willard H.F., Ledbetter D.H., Ledbetter S., Litt M.: *American Journal of Human Genetics* 46, 776-783, 1990; 10. Moore S.S., Barendse W., Berger K.T., Armitage S.M., Hetzel D.J.: *Animal Genetics* 23, 463-467, 1992; 11. Moore S.S., Hale P., Byrne K.: *Animal Genetics* 29, 33-36, 1998; 12. Moore S.S., Sargeant L.L., King T.J., Mattick J.S., Georges M., Hetzel J.S.: *Genomics* 10 (3), 654-660, 1991; 13. Moore S.S., Vankan D.: *Australasian Biotechnology* 4 (2), 107-108, 1994; 14. Nei M., Takezaki N.: *Animal Genetics* 27, Suppl. 2, 1, 1996; 15. O'Brien S.J., Womack J.E., Lyons L.A., Moore K.J., Jenkins N.A., Copeland N.G.: *Nature Genetics* 3, 109, 1993; 16. Slate J., Coltman D.W., Goodman S.J., MacLean I., Pemberton J.M., Williams J.L.: *Animal Genetics* 29, 307-315, 1998; 17. Zeiss C.J., Trepanier L.A., Aguirre G., Ray K.: *Animal Genetics* 29, 224-227, 1998.

Oferta

Zainteresowanych żywieniowców i hodowców uprzejmie informujemy, że w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonnie są jeszcze dostępne w sprzedaży następujące tytuły wydawnicze:

1. Normy żywienia drobiu. Zalecenia żywieniowe i wartość pokarmowa pasz, 1996 (wyd. III) – 10 zł
2. Normy żywienia koni. Zalecenia żywieniowe i wartość pokarmowa pasz, 1997 (wyd. II) – 10 zł
3. Normy żywienia mięsożernych i roślinożernych zwierząt futerkowych. Wartość pokarmowa pasz, 1994 – 10 zł
4. Dodatki paszowe w żywieniu drobiu, 1996 (wyd. II) – 10 zł
5. Dodatki paszowe w żywieniu świń, 1995 – 10 zł
6. Współczesne zasady żywienia świń. Cz. 2, 1997 – 20 zł
7. Wartość pokarmowa żyta, pszenżyta i pszenicy w żywieniu drobiu, 1998 – 25 zł
8. Rzepak w żywieniu zwierząt, 1992 – 5 zł

Zamówienia prosimy kierować na adres Instytutu pocztą (05-110 Jabłonna, ul. Instytucja 3), faxem 774-20-38, e-mail: infizyz@atos.warman.com.pl.