

BARBARA GRALAK

*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN
Jastrzębiec, 05-551 Mroków*

POZNAWCZE I APLIKACYJNE ZNACZENIE BADANIA POLIMORFIZMU SEKWENCJI MIKROSATELITARNYCH DNA

Mikrosatelity są jedną z klas polimorficznych fragmentów DNA. Stanowią je krótkie tandemowo powtarzające się sekwencje nukleotydów (<10 pz). Występują w DNA wszystkich Eukaryota, jak również u niektórych wirusów. Mikrosatelity są rozproszone w genomie w różnych regionach chromosomów (ELLEGREN 1993, SKOWROŃSKI i współaut. 1984). Zwykle identyfikuje się trzy rodzaje sekwencji mikrosatelitarnych:

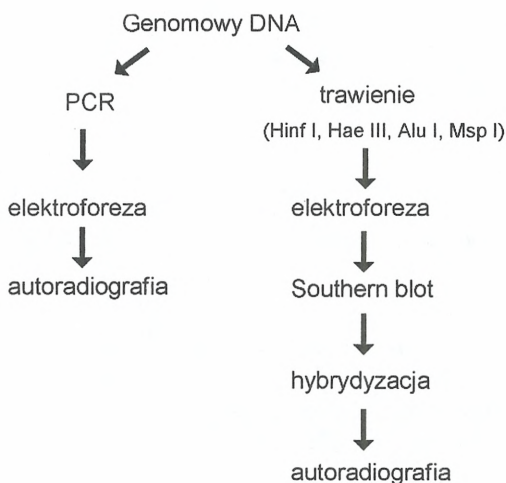
- jeden motyw powtarzający się (perfect tandem repetition), na przykład (CA)₂₃ — locus EA2C4 (GRALAK i współaut. 1994);
- jeden motyw powtarzający się przerywany inną sekwencją (imperfect tandem repetition), na przykład (GT)₁₉CT(GT)₄ — locus MP35 u świń (JOHANSSON i współaut. 1992);
- różne motywy powtarzające się (imperfect repetition with another type), na przykład (GT)₁₄GAT(AG)₅ — locus HTG4 u koni (ELLEGREN i współaut. 1992).

Najczęściej występującym motywem u ssaków jest motyw (CA)_n (50 000–100 000 kopii). Istnieje wysoka korelacja pomiędzy wielkością genomu a liczbą kopii (CA)_n. Dostępne dane sugerują, że dla większości motywów krótsze odcinki powtórzeń liczbowo przewyższają liczbę dłuższych. Mikrosatelity zostały po raz pierwszy opisane przez SKINNER i współautorów w 1974 roku lecz rozwój badań nastąpił dopiero w roku 1989 (BUTKAMP i współaut. 1991). Stwierdzono, że segregują zgodnie z prawami Mendla i wykazują niezwykle zróżnicowanie międzyosobnicze, czego wyrazem jest obserwacja 10–50 kopii jednego motywu.

To zróżnicowanie w odniesieniu do określonego locus w genomie nazywamy polimorfizmem tandemowo powtarzających się sekwencji nukleotydów (VNTR, variable number of tandem repeats). Do tej pory nie zostały wyjaśnione funkcje mikrosatelitów. Przypuszcza się, iż pełnią rolę w regulacji ekspresji genów, jak również podczas rekombinacji. Mikrosatelity identyfikuje się dwoma sposobami (ryc. 1). Pierwszy sposób polega na tym, że genomowe DNA poddaje się trawieniu jednym z enzymów restrykcyjnych, które nie rozpoznają sekwencji powtarzających się (HinfI, HaeIII, AluI i MspI).

Strawione DNA jest rozdzielane elektroforetycznie na 0,9% żelu agarozowym, przenoszone na filtr nitrocelulozowy metodą Southerna, który następnie hybrydyzuje się z sondą molekularną (syntetyczny oligonukleotyd np. (GT)_n, (CAC)_n

i inne) znakowaną ^{32}P na końcu 5'. Otrzymuje się wzór prążków na autoradiogramie, tak zwany „DNA fingerprinting” badanego osobnika. Dobór odpowiedniej sondy i enzymu restrykcyjnego umożliwia otrzymanie „odcisku palca DNA” o najbardziej przydatnym do analizy zróżnicowaniu międzyosobniczym. Opisana powyżej metoda jest przydatna w potwierdzaniu rodzicielstwa zarówno u ludzi, jak i u zwierząt.



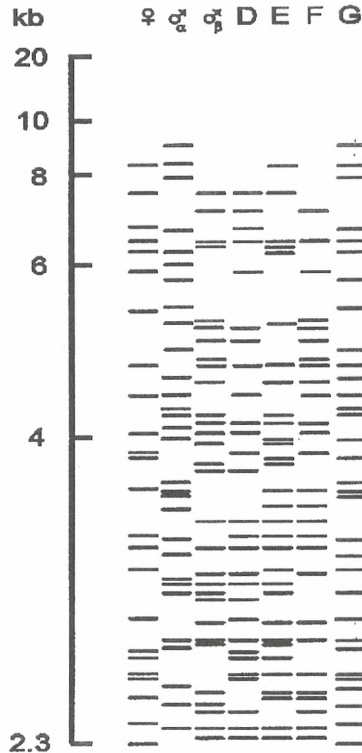
Ryc. 1. Metody identyfikacji powtarzających się sekwencji DNA.

Metodą tą uzyskuje się obraz wielu loci mikrosatelitarnych rozsianych w całym genomie danego osobnika (ryc. 2). Chcąc poznać polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnej, polegający na występowaniu zmiennej liczby powtórzeń określonego motywu w odniesieniu do konkretnego locus w genomie, stosuje się drugą metodę. Po wyizolowaniu DNA z leukocytów amplifikuje się fragment DNA zawierający mikrosatelitę metodą łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR, polymerase chain reaction) (SAIKI i współaut. 1988). Do przeprowadzenia reakcji amplifikacji konieczna jest znajomość sekwencji flankujących i temperatury ich przyłączania. Produkt PCR poddaje się rozdziałowi na żelu poliakrylamidowym.

Dzięki zastosowaniu znakowanego nukleotydu [α - ^{32}P]-CTP uzyskujemy obraz prążków na autoradiogramie (ryc. 3). Metodą multiplex PCR na jednym żelu można jednorazowo identyfikować kilka mikrosatelitarnych loci (SKOLNICK i WALLACE 1988). Mikrosatelity ze względu na ich rozproszenie w genomie i wysoki polimorfizm stały się liczniejszą pulą wysoko informacyjnych markerów genetycznych aniżeli badania grup krwi czy polimorfizmu białek krwi. Wykazują wysoki stopień zróżnicowania międzyosobniczego oraz wskaźnik heterozygotyczności 30–80%. Z powyższych powodów mikrosatelity są wykorzystywane do badań szeregu problemów biologicznych (cytowane wg CAMASCHELLA i współaut. 1993). Umożliwiają głębszą analizę przekazywania genów, charakterystykę struktury genetycznej populacji i ocenę dystansu genetycznego między rasami, liniami i populacjami.

Markery te są szczególnie przydatne dla określania parametrów genetycznych, badań ewolucyjnych czy określania pochodzenia w populacjach małych, zamkniętych, zimbredowanych lub zagrożonych wyginięciem, które wykazują

bardzo niską heterozygotyczność loci allozymów. Dla przykładu heterozygotyczność loci allozymów u osy *P. annularis* wynosi 0,035, podczas gdy wartość H loci mikrosatelitarnych równa się 0,59 (HUGHES i QUELLER 1993). W ostatnim czasie informacje o mikrosatelitach wykorzystuje się do identyfikacji jednostek chorobowych. Co najmniej siedem chorób neurologicznych u ludzi jest wynikiem wyższej liczby trójnukleotydowych powtórzeń w określonych genach (WOOSTER i współaut. 1994). Obecność więcej niż 37 kopii powtórzenia CAG, zlokalizowanego blisko końca 5' genu, położonego na chromosomie 4 w rejonie 4p16.3 powoduje symptomy choroby Huntingтона (HD).



Ryc. 2. Schemat „fingerprinting DNA” wykorzystany w analizie pochodzenia.

Podobnie jest w przypadku kilku innych schorzeń, takich jak miotonia zanikowa (DM), ataksja rdzeniowo-mózdkowa czy rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni, gdzie częstsze występowanie powtórzeń CAG lub CTG jest przyczyną wystąpienia objawów (HOU JIAN i współaut. 1994). Syndrom kruchego chromosomu X i syndrom FRAXE są spowodowane przez ekspansję powtórzeń CGG. Częstość ekspansji genetycznych i delecji jest zależna od kierunku replikacji. Ekspansje występują częściej, jeżeli powtórzenia CTG znajdują się na nici prowadzącej, natomiast delecje zdarzają się częściej, jeżeli te powtórzenia są na nici opóźnionej (KANG i współaut. 1995). W rejonie genu dystrofiny, gdzie często zachodzą delecje, zlokalizowano cztery $(CA)_n$ markery (CLEMENS i współaut.

ramieniu ludzkiego chromosomu Y (nie występuje w genomie żeńskim). Dzięki temu, że mikrosatelity są rozsiane stosunkowo równomiernie w genomie i wykazują wysoką heterozygotyczność oraz wspomnianą wyżej polimorficzność, stały się niezastąpioną grupą markerów genetycznych w mapowaniu genów. Aktualnie mapy takie są sporządzane dla człowieka, myszy i zwierząt gospodarskich takich jak: świnie (PiGMap), bydło (BoVMap), psy (DoGMap), owce (Sheep-Map) i drób (ChickMap). W dniach od 18.10. do 20.10.1995 w Lexington KY, USA odbyły się pierwsze warsztaty na temat mapowania genomu koni. Szerokie zastosowanie powoduje, że liczba zidentyfikowanych loci mikrosatelitarnych wzrasta w bardzo szybkim tempie.

W końcu 1993 roku opisano u świń 64 loci a w połowie 1995 roku znanych już było 400. Dwa lata temu u koni zidentyfikowanych było 5 loci, obecnie jest 129 (I Międzynarodowe Sympozjum Mapowania Genów u Koni, 18–20.10.1995, Lexington KY, USA). Podobnie było u bydła (obecnie 520 loci), owiec (233 loci) i drobiu. Wiele z nich zostało zlokalizowanych na konkretnych chromosomach a niektóre w intronach czy eksonach genów. Zidentyfikowane sekwencje mikrosatelitarne są rejestrowane w międzynarodowych bankach genów (GeneBank i EMBL DNA database). Dzięki tak szybkiemu wzrostowi liczby poznanych sekwencji powtarzających się, stanowiących grupę stosunkowo łatwo identyfikowalnych markerów genetycznych, wzrosło niewspółmiernie prawdopodobieństwo identyfikacji sprzężeń pomiędzy nimi a genami cech ilościowych czy występowaniem jednostek chorobowych.

Pozwoli to już we wczesnym okresie życia zwierzęcia prognozować jego przydatność do dalszej hodowli w odniesieniu do określonej cechy produkcyjnej lub odporności na określoną jednostkę chorobową na podstawie zidentyfikowanego profilu sekwencji mikrosatelitarnej. Wydaje się, iż w najbliższym czasie polimorfizm DNA odegra pierwszoplanową rolę w analizie i doskonaleniu genomu zwierząt.

IMPORTANCE OF STUDIES ON POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE DNA SEQUENCES

Summary

Microsatellites are short tandemly repeated sequences of DNA in eukaryotic genome. Most of them are highly polymorphic and show a high heterozygosity rate. For these reasons they are used to investigate many biological problems such as genetic variation, linkage analysis, evolution, and moreover in forensic studies. These markers have aided in identification of mutations, confirmation of paternity, prenatal diagnosis and in genome mapping.

LITERATURA

- BLISKOVSKII V. V., 1994. *Human Genes with Variable Number of Absolute Tandem Repeats in the Coding Region: Possible Role in Pathogenesis (A Review)*. Mol. Biol. 28, 185–189.
- BUITKAMP J., AMMER H., GELDERMAN H., 1991. *DNA fingerprinting in domestic animals*. Electrophoresis 12, 169–174.
- CAMASCHELLA C., ROETTO A., G. DE SANDRE, PIPERNO A., TOTARO A., DIANZANI I., GASPARINI P., 1993. *Construction of a genetic map telomeric to HLA-A by microsatellite analysis*. Mol. Cell. Probes 7, 411–414.

- CLEMENS P. R., FENWICK R. G., CHAMBERLAIN J. S., GIBBS R. A., M. de ANDRADE, CHAKRABORTY R., CASKEY C. T., 1991. *Carrier Detection and Prenatal Diagnosis in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Families, Using Dinucleotide Repeat Polymorphisms*. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 951-960.
- ELLEGREN H., 1993. *Genome Analysis with Microsatellite Markers*. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Animal Breeding and Genetics, Ph.D. Thesis.
- ELLEGREN H., JOHANSSON M., SANDBERG K., ANDERSSON L., 1992. *Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse*. *Anim. Genet.* 23, 133-142.
- GRALAK B., COPPIETERS W., VAN DE WEGHE A., 1994. *Two new equine dinucleotide repeat microsatellites at the EA2C4 and EB2E8 loci*. *Anim. Genet.* 25, 285.
- HOU J., HSU CH., ZHU Z., LONGSHORE J. W., FINLEY W. H., 1994. *Over-representation of the disease associated (CAG) and (CGG) repeats in the human genome*. *Nucl. Acid. Res.* 22, 1735-1740.
- HUGHES C. R., QUELLER D. C., 1993. *Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism*. *Mol. Ecol.* 2, 131-137.
- JOHANSSON M., ELLEGREN H., ANDERSSON L., 1992. *Cloning and Characterization of Highly Polymorphic Porcine Microsatellites*. *J. Hered.* 83, 196-198.
- JEFFREYS A. J., WILSON V., THEIN S.L., 1985b. *Individual-specific „fingerprints“ of human DNA*. *Nature* 316, 76-79.
- KANG S., JAWORSKI A., OHSHIMA K., WELLS R. D., 1995. *Expansion and deletion of CTG repeats from human disease genes are determined by direction of replication in E. coli*. *Nature Genet.* 10, 213-218.
- RICHARDS R. I., SUTHERLAND G. R., 1994. *Simple repeat DNA is not replicated simply*. *Nature Genet.* 6, 114-116.
- SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S. J., HORN G. T., MULLIS K. B., EHRLICH H. A., 1988. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science* 239, 487-491.
- SANTOS F. R., PENA S. D. J., EPPLER J. T., 1993. *Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique*. *Hum. Genet.* 90, 655-656.
- SKINNER D. M., BEATTIE W. G., BLATTNER F. R., STARK B. P., DAHLBERG J. E., 1974. *The repeat sequence of a hermetic crab satellite deoxyribonucleic acid is (-T-A-G-G)_n (-A-C-C-C)_n*. *Biochemistry* 13, 3930-3937.
- SKOLNICK M.H., WALLACE R.B., 1988. *Simultaneous analysis of multiple polymorphic loci using amplified sequence polymorphisms (ASPs)*. *Genomics* 2, 273-279.
- SKOWROŃSKI J., PLUCIENNICZAK A., BEDNAREK A., JAWORSKI J., 1984. *Bovine 1-709 Satellite. Recombination Hotspots and Dispersed Repeated Sequences*. *J. Mol. Biol.* 177, 399-416.
- STRATTON M. R. *Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers*. *Nature Genet.* 6, 152-156.
- UCHIDA TOYOAKI, WADA CHIEKI, WANG CHUNXI, ISHIDA HIRONORI, EGAWA SHIU, YOKOYAMA EIJI, OHTANI HIDEKI, KOSHIBA KEN, 1995. *Microsatellite instability in prostate cancer*. *Oncogene* 10, 1019-1022.
- WOOSTER R., CLETON-JANSEN A.- M., COLLINS N., MANGION J., CORNELIS R.S., COOPER C. S., GUSTERSON B. A., PONDER B. A. J., VON DEIMLING A., WIESTLER O. D., CORNELISSE C. J., DEVILEE P., STRATTON M. R., 1994. *Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers*. *Nature Genet.* 6, 152-156.