

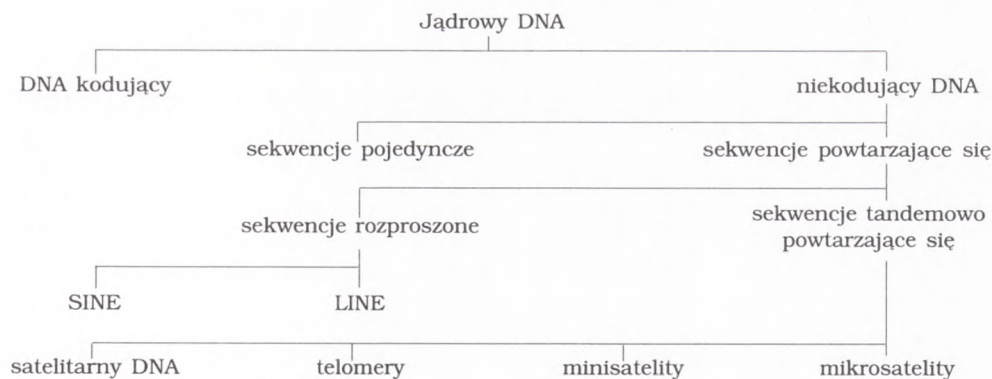
Wykorzystanie sekwencji mikrosatelitarnych DNA w mapowaniu genów cech ilościowych u zwierząt

Agnieszka Korwin-Kossakowska
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN
Jastrzębiec

Polialleliczne markery mikrosatelitarne odgrywają ogromną rolę w konstruowaniu genetycznej mapy sprzężeniowej u zwierząt domowych. Badania te są szczególnie zaawansowane w odniesieniu do genomu świni.

Genom zwierzęcy można podzielić ogólnie na część kodującą i niekodującą (rys. 1) (1). W części niekodującej znajdują się m.in. mini- i mikrosatelity. Sekwencje mini- i mikrosatelitarne są jednym z typów powtarzających się sekwencji nukleotydowych, będących charakterystyczną cechą organizmów eukariotycznych. Zjawisko powtarzalności niektórych sekwencji nukleotydowych określane jest mianem redundacji. Sekwencje te stanowią u różnych organizmów od 1 do 60% ogólnej wielkości genomu. Minisatelity to dłuższe, 16-64-nukleotydowe powtórzenia, zaś mikrosatelity są szeroko poznane jako tandemowe powtórzenia prostych, dwu-, trzy-, czteronukleotydowych motywów. Występują one głównie w obrębie niekodujących fragmentów DNA, chociaż znane są pojedyncze przypadki ich występowania również w eksonach, np. w genie białka Apo AI u świni. W tym przypadku liczba powtórzeń dwunukleotydowych w polimorficznych mikrosatelitarnych loci jest generalnie uszeregowana od 10 do 50 (2). Wśród najczęściej spotykanych polimorficznych loci u wielu eukariota są dwunukleotydowe powtórzenia $(CA)_n$. W genomie świni liczba powtórzeń CA została oszacowana między 65 000 do 100 000 kopii, silnie rozproszonych w genomie (3). Wyróżnić można trzy grupy mikrosatelitów:

- 1) jeden motyw powtarzający, np. $(TG)_{23}$ - locus MP66 u świni,
 - 2) jeden motyw powtarzający się, przerywany inną sekwencją, np. $(GT)_{19}CT(GT)_4CT$ -locus MP35 u świni,
 - 3) różne motywy powtarzające się, np. $(GT)_{16}(AG)_{14}$ - locus S0068 u świni (4).
- Historię odkrycia mini- i mikrosatelitów zapoczątkowali Wyman i White,



Rys. 1. Podział genomu zwierzęcego (1).

którzy w 1980 r. zwrócili uwagę na tego typu sekwencje w DNA człowieka. Zauważyli, że liczba powtórzeń była różna nie tylko dla różnych populacji, ale i zróżnicowana między poszczególnymi osobnikami. Zjawisko to określono mianem (ang. *Variable Number of Tandem Repeats*) zróżnicowanie w liczbie tandemowych powtórzeń. Prawdziwy rozwój tych badań nastąpił dopiero po 1989 r. (5).

W 1991 r. Johansson, Ellegren i Andersson opisali pierwszych 6 mikrosatelitów u świni, używając w oznaczaniu locus symbolu MP (ang. *microsatellite of pig*) (2) zaś w 1992 r. na 23 konferencji Międzynarodowego Stowarzyszenia Genetyki Zwierząt (ISAG) w Interlaken (Szwajcaria) odbyły się pierwsze warsztaty na temat mapowania genów u świń (PiGMaP), dotyczące konstruowania mapy genetycznej dla tego gatunku i uzgadniania kryteriów tworzenia tej mapy. Już wówczas znanych i opublikowanych było około 56 markerów mikrosatelitarnych (6). W 1993 r. Ellegren i wsp. opisali dalszych 30 mikrosatelitów, przy czym dla 15 mikrosatelitów określono lokalizację w eksonach konkretnych genów (7,10). Mniej więcej w tym samym czasie Amerykanie opisali 337 nowych mikrosatelitów o łącznej liczbie 1911 alleli (8). Aktualna mapa genomu świni obejmuje łącznie około 450 loci mikrosatelitów, dla których ustalono w sumie około 2600 alleli (3-4, 6-8).

Funkcja mikrosatelitów nie jest jasna. Są różne hipotezy na ten temat — wpływ na ekspresję genów oraz miejsca rekombinacji (2). Stwierdzono, że segregują one zgodnie z prawami Mendla i wykazują niezwykle zróżnicowanie w liczbie powtórzeń motywu podstawowego pomiędzy poszczególnymi rasami (tab. 1), oraz w zróżnicowaniu międzyosobniczym (4).

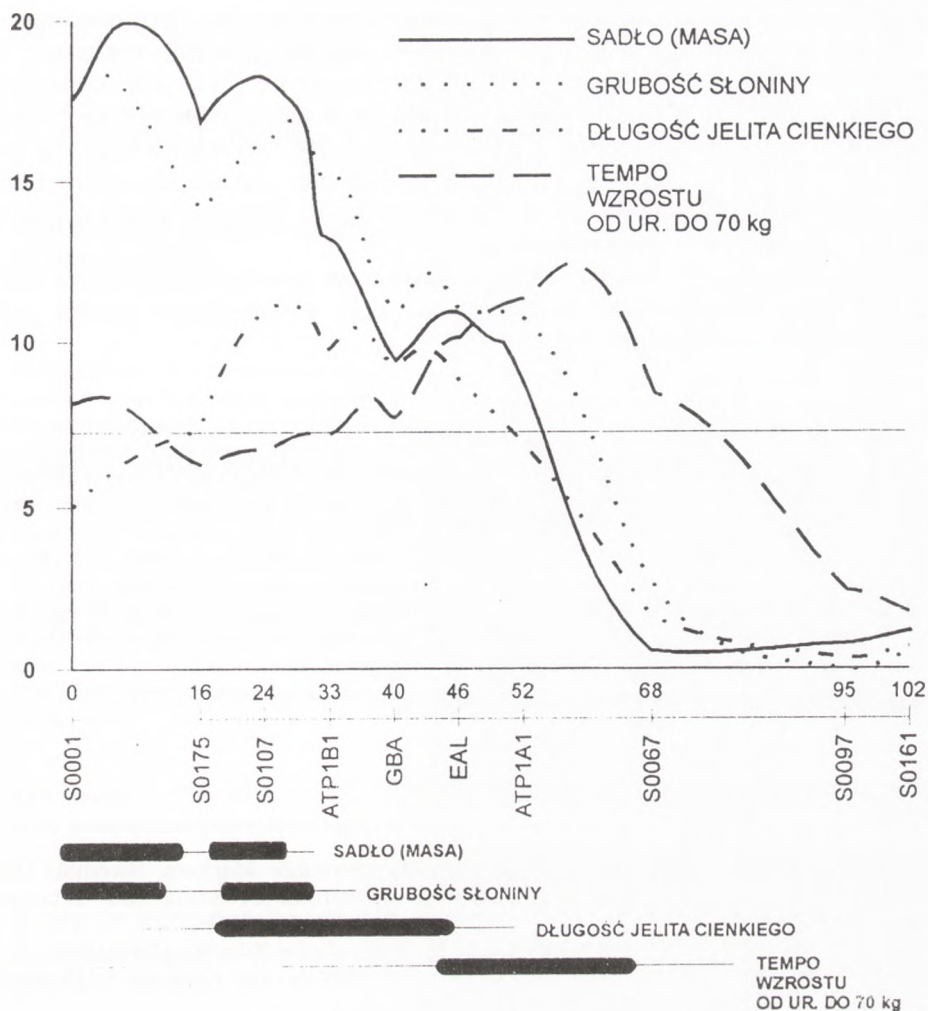
TABELA 1
 HETEROZYGOTYCZNOŚĆ MIKROSATELITÓW U RÓŻNYCH RAS ŚWIŃ (4)

Rasa	Heterozygotyczność mikrosatelitów						
	CGT1	CGT9	CGT13	CGT15	CGT16	CGT17	CGT7
Duroc	0,33	0,19	0,60	0,20	0,00	0,19	0,55
Landrace	0,64	0,00	0,65	0,55	0,14	0,29	0,65
Hampshire	0,4	0,00	0,45	0,33	0,45	0,82	0,73
Yorkshire	0,5	0,18	0,55	0,41	0,05	0,68	0,79

Ta ostatnia ich właściwość oraz to, że zmienność ta jest z łatwością analizowana przy użyciu techniki PCR (*ang. polymerase chain reaction*) spowodowała to, że mikrosatelity są idealnymi genetycznymi markerami. Badania związane z identyfikacją mikrosatelitów zmierzają w kierunku mapowania genów cech ilościowych (*ang. quantitative traits loci – QTL*). Wykorzystuje się tu informacje na temat sprzężeń pomiędzy stosunkowo łatwo identyfikowanymi mikrosatelitami a poziomem cechy ilościowej.

Pierwszy etap konstruowania takich map genetycznych przewiduje zlokalizowanie i opisanie w genomie jak największej liczby loci markerowych o znanych odległościach genetycznych między nimi. Na bazie tak skonstruowanych danych następuje „poszukiwanie” genów QTL w kolejnych zmarkowanych fragmentach. Położenie locus tego genu (QTL) można wstępnie stwierdzić na podstawie sprzężenia z sąsiadującymi markerami. Dla skutecznej identyfikacji dowolnego genu odległość między sąsiadującymi loci markerów nie powinna przekraczać 20 cM. Materiał doświadczalny w mapowaniu genów stanowią populacje pochodzące po krzyżowaniu osobników ras różniących się ekstremalnie zarówno markerami genetycznymi, jak i poziomem badanej cechy ilościowej. Kojarzenia przeprowadzane są w taki sposób aby potomstwo było heterozygotyczne względem jak największej liczby loci (zarówno w markerach jak i QTL).

Do doskonałym przykładem sprzężeń tej grupy markerów genetycznych z genami cech ilościowych u trzody chlewnej jest praca Andersson i wsp. (10). Sprzężenia pomiędzy poszczególnymi genotypami mikrosatelitarnymi a poziomem poszczególnych parametrów jakości tuszy oraz tempem wzrostu obliczono za pomocą odpowiednich testów statystycznych. Istotne sprzężenie stwierdzono między loci zlokalizowanymi uprzednio na chromosomie 4, a takimi cechami ilościowymi, jak: procentowa zawartość sadła w tuszy, średnia grubość słoniny grzbietowej oraz długość jelita cienkiego, a także tempem wzrostu od urodzenia do 70 kg. Wyniki te sugerują, że geny warunkujące wartość wymienionych cech ilościowych mogą być zlokalizowane na tym chromosomie (10) (rys. 2). Ze statystycznie wykazanych sprzężeń pomiędzy tymi cechami wynika, że geny odpowiedzialne za wymienione cechy znajdują się w rejonie położenia loci mikrosatelitów S0001, S0107, oraz genów ATP-azy czy układu grupowego krwi L – locus EAL.



Rys. 2. Istotność sprzężenia między niektórymi parametrami jakości tuszy i tempem wzrostu do 70 kg a genami zlokalizowanymi na 4 chromosomie świni (6).

Podobne sprzężenie wykazano u owiec Booroola pomiędzy mutacją genu *FecB*, wpływającego na wzrost poziomu owulacji i wielkość miotu, a dwoma markerami mikrosatelitarnymi *OarAE101* i *OarHH55* (tab. 2). Rasa Booroola Merino jest szczególnie interesująca ze względu na wyjątkowe właściwości reprodukcyjne. Już w 1980 r. udowodniono, że wielkość miotu jest wynikiem działania „głównego genu”, a w następnych opracowaniach potwierdzono segregację tego genu w rodzinach, jako pojedynczej autosomalnej mutacji. Początkowo konkretna lokalizacja tego genu u owiec nie była znana i opierano

się tylko na homologii z ludzkim genem, zlokalizowanym na chromosomie 4. Obecnie, na podstawie identyfikacji sprzężeń między genami, wiadomo, że gen Booroola FecB umiejscowiony jest na chromosomie 6 (12,13). Odległość między loci OarAE101 i FecB wynosi 13 cM, zaś między OarHH55 i FecB 20 cM. Obydwie te mikrosatelity dzieli dystans 5 cM. Wynika z tego, że pomiędzy tymi trzema loci występuje istotne sprzężenie. Lokalizacja genu FecB na chromosomie 6 w rejonie 6q23-q31 jest punktem wyjścia do identyfikacji tego genu, a następnie jego produktu.

Mikrosatelity stanowią zatem tę grupę markerów genetycznych, która stała się aktualnie podstawą badań mających na celu identyfikację genów cech ilościowych (QTLs) zwierząt.

TABELA 2

ANALIZA SPRZEŻENIA GENETYCZNEGO MIĘDZY LOCI FecB A LOCI MIKROSATELITARNYMI OarAE101 I OarHH55 (12)

Częstość rekombinacji								
locus	n	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	Z _{max}	0
OarAE101	218	14,35	17,04	16,21	12,03	5,74	17,33	0,13
OarHH55	172	0,80	6,52	9,38	7,96	4,07	9,38	0,20

Z_{max} — maksymalna wartość logarytmu ilorazu wiarygodności

0 — współczynnik rekombinacji

Literatura

- Ellegren H., (1993), *Genome Analysis with Microsatellite Markers*, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Animal Breeding and Genetics, Ph. D. Thesis.
- Johansson M., Ellegren H., Andersson L., (1992), *J. Hered.*, 83, 196-198.
- Coppieters W., van de Weghe A., Peelman L., Depicker A., van Zeveren A., Bouquet Y., (1993), *Anim. Genet.*, 24, 163-170.
- Fredholm M., Wintero A. K., Christensen K., Kristensen B., Nielsen W. D., Archibald A., (1993), *Mamm. Genome*, 4, 187-192.
- Buitkamp J., Ammer H., Geldermann H., (1991), *Electrophoresis*, 12, 169-174.
- Andersson L., Archibald A. L., Gellin J., Schook L. B., (1993), *Anim. Genet.*, 24, 205-216.
- Ellegren H., Chowdhary B. P., Johansson M., Marklund L., Fredholm M., Gustavsson I., Andersson L., (1994), *Genetics*, 137, 1089-1100.
- Rohrer G. A., Lesson J. A., Keele J. W., Smith T. P., Beattie C. W., (1994), *Genetics*, 136, 231-245.
- Ellegren H., Johansson M., Chowdhary B. P., Marklund S., Ruyter D., Marklund L., Brauner-Nielsen P., Edfors-Lilja I., Gustavsson I., Juneja R. K., Andersson L., (1993), *Genomics*, 16, 431-439.
- Andersson L., Haley Ch. S., Ellegren H., Knott S. A., Johansson M., Andersson K., Andersson-Eklund L., Edfors-Lilja I., Fredholm M., Hansson I., Hakansson J., Lundstrom K., (1994), *Science*, 263, 1771-1774.
- Moran C., (1993), *J. Hered.*, 84, 274-280.
- Montgomery G. W., Crawford A. M., Penty J. M., Dodds K. G., Ede A. J., Henry

- H. M., Pierson C. A., Lord E. A., Galloway S. M., Schmack A. E., Sise J. A., Swarbrick P. A., Hanrahan V., Buchanan F. C., Hill D. F., (1993), *Nat. Genet.*, 4, 410-414.
13. Montgomery G. W., Lord E. A., Penty J. M., Dodds K. G., Broad T. E., Cambridge L., Sunden S. L. F., Stone R. T., Crawford A. M., (1994), *Genomics*, 22, 148-153.

Application of microsatellites in genetic mapping of quantitative trait loci in farm animals

Summary

Microsatellites are tandem repeats of a simple sequence that occur abundantly and at random throughout most eukaryotic genomes. Mammalian microsatellite loci have been shown to be highly polymorphic due to variation in the number of repeat units. They are very good markers for quantitative traits loci (QTLs) mapping studies.

Swedish group from Agricultural University in Uppsala found evidence for QTLs on chromosome 4 with large effects on growth, fat deposition and length of the small intestine based on the analysis of genetic linkage between quantitative traits level and 105 genetics markers (68 microsatellite loci and 37 other markers).

The localization of the gene affecting the ovulation rate and litter size on chromosome 6 in sheep has been documented on the basis of identification of genetic linkage between Booroola fecundity (FecB) gene and two microsatellite loci (OarHH55 and OarAE101) by a New Zealand scientist.

Out of all types of actually known genetic markers microsatellites are most useful for QTLs mapping.

Key words:

gene mapping, microsatellite loci, quantitative trait loci (QTLs).

Adres do korespondencji:

Agnieszka Korwin-Kossakowska, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, 05-551 Mroków.