

Monoalleliczna ekspresja genów – ważny mechanizm wpływający na zmienność cech

Izabela Szczerbal, Dariusz Mróz, Marek Świtoński

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Jednym z istotnych efektów rozwoju genomiki funkcjonalnej jest wykazanie, jak złożone i różnorodne są mechanizmy regulacji ekspresji genów, które odpowiadają za zmienność cech. Przez długi okres zakładano, że jeśli allele jakiegoś genu posiadają prawidłowe sekwencje regulatorowe, to oba podlegają ekspresji zarówno w układzie homo-, jak i heterozygotycznym. Mechanizm ten określany jest terminem biallelicznej ekspresji. Okazało się jednak, że zasada ta nie jest uniwersalna i czasami ma miejsce monolalleliczna ekspresja genu (rys.). Nie ulega wątpliwości, że poznanie podłoża różnicowanego poziomu ekspresji genów ma istotne znaczenie w odkrywaniu genetycznego uwarunkowania niektórych chorób dziedzicznych, a także podłoża zmienności cech ilościowych. Do tej pory kwestia monoallelicznej ekspresji genów u zwierząt domowych była rzadko omawiana. W niniejszym artykule pragniemy zwrócić uwagę na znaczenie tego zjawiska.

Najwcześniej poznany przykład monoallelicznej ekspresji dotyczy genów zlokalizowanych w chromosomie X ssaków. U osobników żeńskich jeden z chromosomów X podlega losowej inaktywacji podczas wczesnego etapu rozwoju zarodkowego, poprzez uruchomienie ekspresji genu *Xist* (*X inactivation specific transcript*) odpowiedzialnego za powstanie niekodującej cząsteczki RNA (ncRNA). W efekcie w komórkach takich osobników tylko jeden chromosom jest aktywny, a zatem ekspresji podlega tylko jeden z alleli. Jeśli założyć, że taki osobnik ma genotyp heterozygotyczny (Aa), to w części komórek ekspresji podlega allel A, a w innych allel a.

Przełomem w poznawaniu znaczenia monoallelicznej ekspresji genu było odkrycie procesu piętnowania genomowego (gametycznego). W genomie ssaków zidentyfikowano szereg genów, które podczas gametogenezy podlegają nielosowej inaktywacji, utrzymywanej po zapłodnieniu we wszystkich komórkach somatycznych. Zestaw genów podlegających inaktywacji podczas spermatogenezy zawsze jest różny od zestawu, który

Tabela 1

Porównanie genów autosomalnych podlegających piętnowaniu genomowemu oraz losowej monoallelicznej ekspresji

Charakterystyka	Piętnowanie genomowe	Losowa monoalleliczna ekspresja
Liczba genów	~100	do kilkunastu %*
Typ monoallelicznej ekspresji	nielosowy	losowy
Rozmieszczenie w genomie	klastry	klastry i rozproszone
Allel podlegający ekspresji	niepiętnowany	losowy

*Wartość zmienna w zależności od analizowanego gatunku czy typu komórek:

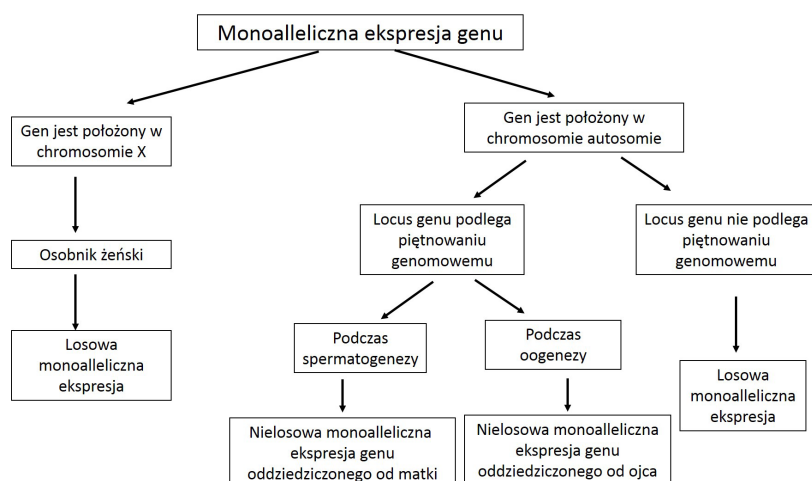
- 0,5% – embrionalne komórki macierzyste myszy [4]
- 3% – neuronalne komórki macierzyste myszy [4]
- 10% – komórki limfoblastyczne człowieka [9]
- 16% – komórki limfoblastyczne myszy [20]

jest inaktywowany podczas oogenezy. Szacuje się, że ok. 100 genów ssaków podlega piętnowaniu genomowemu [19] – tabela 1. Podkreślić należy, że kwestia identyfikacji genów podlegających piętnowaniu nie jest zamknięta. W przypadku człowieka wskazuje się na ok. 70 takich genów, a u myszy liczba ta przekracza 130. Warto jednak odnotować, że w 2010 roku pojawiła się publikacja w prestiżowym czasopiśmie *Science*, w której sugerowano, że liczba ta może być większa niż 1000 [11]. Kolejne badania zakwestionowały jednak te wyniki, wskazując na popełnione błędy metodyczne. Z kolei u zwierząt gospodarskich, takich jak bydło, świnia i owca, liczba opisanych genów piętnowanych jest niska i wynosi ok. 20. Wśród tych genów są i takie, których polimorfizmy mają znaczący wpływ na zmienność cech produkcyjnych. Do klasycznych już przykładów należy polimorfizm w intronie genu *IGF2* świni, który ma duży wpływ na mięsność i otluszczenie, oraz w *locus CLPG* powiązany z hipertrofią mięśniową owiec. Interesujące spostrzeżenia dotyczące ekspresji genu *IGF2* była przedstawili Zwierchowski i wsp. [21]. Okazało się, że w wątrobie 5-miesięcznych płodów dochodzi do biallelicznej ekspresji i stan ten utrzymuje się również po urodzeniu. Jeśli taki profil ekspresji byłby również w innych tkankach, to oznaczałoby to, że piętnowanie genu *IGF2* była miałoby wpływ na rozwój jedynie we wczesnym okresie rozwoju płodowego.

Piętnowanie genomowe odgrywa również ważną rolę w rozwoju chorób dziedzicznych. Przykładem może być letalny niedorozwój somatyczny u cieląt rasy ayrshire, który stwierdzono u ok. 50% potomków cennego buhaja inseminacyjnego użytkowanego w Finlandii [6]. Bardzo wysoki udział cieląt z nieprawidłowym rozwojem był podstawą do przyjęcia hipotezy, że buhaj jest nosicielem (heterozygotą) allelu letalnego w *locus*, który podlega piętnowaniu podczas oogenezy. Szeroko zakrojone badania molekularne, w tym wykonane przy wykorzystaniu mikromacierzy SNP, potwierdziły tę hipotezę i wskazały, że sprawczą mutacją jest delekcja długiego fragmentu (ok. 100 tys. pz) w piętnowanym podczas oogenezy regionie (PEG3) chromosomu 18.

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się losowej monoallelicznej ekspresji (ang. *random monoallelic expression* – RME) genów położonych w autosomach [5]. Wykazano, że podobnie jak geny zlokalizowane w chromosomie X, także geny autosomalne mogą w części komórek wykazywać ekspresję allelu matczynego, a w części allelu ojcowskiego. Może również dochodzić do takiej sytuacji, że w jednych komórkach geny podlegają ekspresji biallelicznej, a w innych wykazują ekspresję tylko jednego allelu [2]. Prowadzi to do ukształtowania się unikalnego allelo-specyficznego wzoru ekspresji w wybranym typie komórek.

Początkowo uważano, że RME dotyczy raczej niewielkiej frakcji genów kodujących białka (ok. 1-2%) oraz że ma to miejsce głównie w przypadku genów tworzących duże rodziny genowe, takie jak geny immunoglobulin, receptorów limfocytów T, interleukin czy receptorów węchowych.



Rys. Modele monoallelicznej ekspresji genu

Tabela 2

Geny kodujące receptory węchowe (OR) u wybranych gatunków ssaków

Gatunek	Liczba sekwencji specyficznych dla OR	Liczba genów funkcjonalnych	Liczba pseudogenów	Źródło
Bydło	1071	881	542	Lee i wsp. [12]
Świnia	1301	1113	188	Nguyen i wsp. [15]
Mysz	1209	913	296	Godfrey i wsp. [10]
Pies	1100	811	289	Niimura i Nei [17]
Kot	1052	677	375	Montague i wsp. [13]
Człowiek	802	388	414	Niimura i Nei [16]

Przykładowo, największą znaną rodzinę genową w genomie ssaków stanowią geny receptorów węchowych (ang. *olfactory receptors* – OR) [18]. Ulegają one ekspresji w komórkach węchowych, a białka przez nie kodowane mają zdolność rozpoznawania różnych zapachów. W większości neuronów węchowych ekspresji ulega tylko jeden allel danego genu. Monoalleliczny profil ekspresji genów OR sprawia, że pojedyncze neurony węchowe są bardzo wyspecjalizowanymi komórkami. Liczba genów OR wynosi od 900 u człowieka do 1300 u myszy i świni. Zaznaczyć jednak należy, że u różnych gatunków występuje zróżnicowana liczba pseudogenów (tab. 2). Najwięcej genów aktywnych posiada świnia, co może przekładać się na zdolności w rozpoznawaniu większej liczby różnorodnych substancji zapachowych tego gatunku w porównaniu do innych gatunków ssaków [15].

Stosowane w ostatnich latach nowoczesne metody badania genomu (mikromacierze SNP, globalne sekwencjonowanie cząsteczek mRNA – tzw. RNA-Seq) ujawniły, że zjawisko monoallelicznej ekspresji genów autosomalnych jest znacznie powszechniejsze niż wcześniej sądzono [9]. Szacuje się, że liczba genów podlegających RME jest kilkakrotnie większa i może stanowić nawet kilkanaście procent genów kodujących białka. Wartości te jednak mogą się różnić w zależności od badanej linii komórkowej (tab. 1). Początkowo wydawało się, że wśród genów podlegających RME przeważają takie, które kodują białka powierzchniowe komórek, co mogło wskazywać, że RME odpowiada za tworzenie unikatowej tożsamości każdej indywidualnej komórki. Jednak w ostatnich latach zidentyfikowano szereg innych genów należących do różnych klas i pełniących różnorodne funkcje. Wśród nich są geny związane z podstawowymi procesami, takimi jak np. rozwój czy różnicowanie. Wykazano, że w trakcie różnicowania macierzystych komórek embrionalnych w neuronalne komórki macierzyste wzrasta liczba genów podlegających RME z ok. 0,5% do 3% [4]. Zidentyfikowano również geny podlegające RME, w których obecność mutacji prowadzi do rozwoju chorób genetycznych (np. neurologicznych) oraz nowotworowych. Przykładem może być niedawno opisana mutacja genu *FOXP2* człowieka, podlegającego RME, który określany jest „genem mowy” [1]. Mutacje tego genu prowadzą m.in. do zaburzeń mowy. Delecja regionu regulatorowego oddalonego o ok. 3 mln pz od tego genu powoduje zaburzenie jego ekspresji i prowadzi do charakterystycznego stanu haploinsuficencji. Oznacza to, że obecność tylko jednego niezmutowanego allelu nie jest wystarczająca do powstania prawidłowego fenotypu. Odkrycie, że gen *FOXP2* podlega RME dowodzi, że w niektórych komórkach wystąpi całkowity brak transkryptu tego genu. Wyniki te wskazują, że RME może mieć istotne znaczenie w patologiiach związanych z haploinsuficencją w dominującym dziedziczeniu autosomalnym. W badaniach RME zidentyfikowano kilka genów o takim modelu dziedziczenia, których mutacje u człowieka zaangażowane są w rozwój chorób, takich jak: zespół skrzelowo-uszno-nerkowy i głuchota (geny *EYA1*, *SIX1* i *EYA4*), dziecięca dystrofia mięśniowa (gen *BAG3*) czy choroba Parkinsona (gen *SNCA*) [8].

Niewiele do tej pory wiadomo o genach podlegających RME u zwierząt domowych. Większość doświadczeń przeprowadzono dotąd na komórkach myszy [3, 20] i wykazano, że 16% genów wykazuje typ monoallelicznej ekspresji. Ograniczeniem metod stosowanych w identyfikacji RME (np. allelo-specyficznego sekwencjonowania RNA) jest konieczność występowania SNP w badanych *loci*, aby możliwe było rozróżnienie allelu ak-

tywnego od nieaktywnego. Ostatnio opracowano nowe podejścia metodyczne omijające ten problem [14]. Opierają się one na analizie rozmieszczenia znaczników epigenetycznych, jakimi są modyfikacje histonów. Dowiedziano, że dwie modyfikacje histonów związane z aktywnością transkrypcyjną (H3K36me3 – trimeetylacja lizyny w pozycji 36, w histonie H3) lub wyciszeniem transkrypcji (H3K27me3 – trimeetylacja lizyny w pozycji 27, w histonie H3), występujące jednocześnie w części strukturalnej genu, wykazują charakterystyczny wzór rozmieszczenia w genach podlegających bialelicznej i monoallelicznej ekspresji.

Sugeruje się, że ani metylacja DNA, ani położenie genu w jądrze interfazowym (tzw. architektura jądra interfazowego), a tylko modyfikacja histonów pozwala na rozróżnienie allelu aktywnego i nieaktywnego [4]. Jest to sytuacja odmienna od genów podlegających imprintingowi, gdzie dany allel można rozróżnić na podstawie profilu metylacji. Inną cechą charakterystyczną genów piętnowanych jest to, że występują w klastrach często obejmujących nawet kilkaset tysięcy pz, przy czym niejednokrotnie w takim klastrze obecny jest gen niekodującej cząsteczki RNA. W przypadku genów podlegających RME, występowanie w klastrach obserwuje się w przypadku niektórych genów, które tworzą duże rodziny genowe, natomiast inne geny są rozproszone w całym genomie (tab. 2).

Monoalleliczna ekspresja genów budzi w ostatnich latach duże zainteresowanie, szczególnie w kontekście regulacji rozwoju osobniczego oraz patogenezy chorób dziedzicznych. Badania te prowadzono przede wszystkim na liniach komórkowych oraz u zwierząt modelowych (np. mysz), a wyniki tych badań omówiono w kilku artykułach przeglądowych [2, 4, 7, 8]. Można przewidywać, że rozwój wiedzy z tego zakresu zaowocuje również lepszym zrozumieniem podłoża zmienności fenotypowej cech produkcyjnych oraz przyczyn powstawania chorób dziedzicznych u zwierząt domowych.

Literatura: 1. Adegbola A.A., Cox G.F., Bradshaw E.M., Hafner D.A., Gimelbrant A., Chess A., 2015 – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112, 6848–6854. 2. Chess A., 2013 – Neuropsychopharmacology 38, 55–61. 3. Deng Q., Ramsköld D., Reinius B., Sandberg R., 2014 – Science 343, 193–196. 4. Eckersley-Maslin M.A., Thybert D., Bergmann J.H., Marioni J.C., Flicek P., Spector D.L., 2014 – Dev. Cell 28, 351–365. 5. Eckersley-Maslin M.A., Spector D.L., 2014 – Trends Genet. 30, 237–244. 6. Flisikowski K., Venhoranta H., Nowacka-Woszek J., McKay S.D., Flyckt A., Taponen J., Schnabel R., Schwarzenbacher H., Szczerbal I., Lohi H., Fries R., Taylor J.F., Switonski M., Andersson M., 2010 – PLoS One 5 (11), e15116. 7. Gaur U., Li K., Mei S., Liu G., 2013 – J. Appl. Genet. 54, 271–283. 8. Gendrel A.V., Attia M., Chen C.J., Diabangouaya P., Servant N., Barillot E., Heard E., 2014 – Dev. Cell 28, 366–380. 9. Gimelbrant A., Hutchinson J.N., Thompson B.R., Chess A., 2007 – Science 318, 1136–1140. 10. Godfrey P.A., Malnic B., Buck L.B., 2004 – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2156–2161. 11. Gregg C., Zhang J., Weissbourd B., Luo S., Schroth G.P., Haig D., Dulac C., 2010 – Science 329, 643–648. 12. Lee K., Nguyen D.T., Choi M., Cha S.Y., Kim J.H., Dadi H., Seo H.G., Seo K., Chun T., Park C., 2013 – BMC Genomics 14, 596. 13. Montague M.J., Li G., Gandolfi B., Khan R., Aken B.L., Searle S.M., Minx P., Hillier L.W., Koboldt D.C., Davis B.W., Driscoll C.A., Barr C.S., Blackstone K., Quilez J., Lorente-Galdos B., Marques-Bonet T., Alkan C., Thomas G.W., Hahn M.W., Menotti-Raymond M., O'Brien S.J., Wilson R.K., Lyons L.A., Murphy W.J., Warren W.C., 2014 – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 17230–17235. 14. Nag A., Savova V., Fung H.L., Miron A., Yuan G.C., Zhang K., Gimelbrant A.A., 2013 – Elife 2, e01256. 15. Nguyen D.T., Lee K., Choi H., Choi M.K., Le M.T., Song N., Kim J.H., Seo H.G., Oh J.W., Lee K., Kim T.H., Park C., 2012 – BMC Genomics 13, 584. 16. Niimura Y., Nei M., 2005 – Gene 346, 23–28. 17. Niimura Y., Nei M., 2007 – PLoS One 2 (8), e708. 18. Niimura Y., Matsui A., Touhara K., 2014 – Genome Res. 24, 1485–1496. 19. O'Doherty A.M., MacHugh D.E., Spillane C., Magee D.A., 2015 – Front Genet. 6, 156. 20. Zwemer L.M., Zak A., Thompson B.R., Kirby A., Daly M.J., Chess A., Gimelbrant A.A., 2010 – Genome Biol. 13 (2), R10. 21. Zwierchowski L., Siadkowska E., Oprządek J., Flisikowski K., Dymnicki E., 2010 – Czech J. Anim. Sci. 55, 227–233.