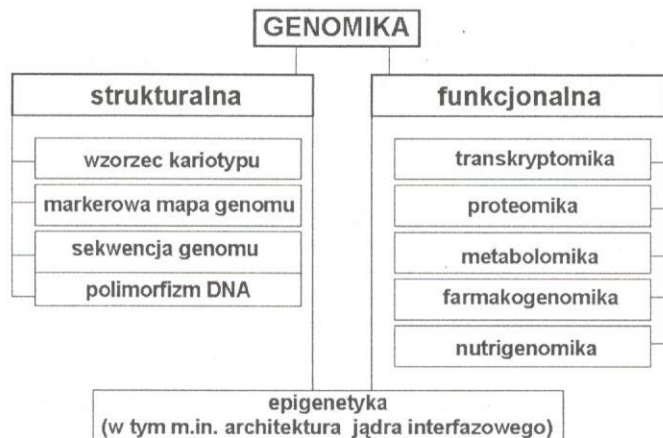


# Od genomiki strukturalnej do funkcjonalnej, czyli kolejny krok na drodze do poznania podłoża ważnych cech hodowlanych

Marek Świtoński, Izabela Szczerbal

Akademia Rolnicza w Poznaniu

Genomika jest interdyscyplinarnym obszarem wiedzy zorientowanym na poznanie struktury i funkcji genomu, na podstawie wiedzy z zakresu genetyki, cytologii, biochemii, fizjologii i bioinformatyki. Przyjmując powyższą definicję wyróżnia się w jej ramach genomikę strukturalną i funkcjonalną (rys.).



W badaniach z zakresu genomiki strukturalnej prowadzi się przede wszystkim analizy sekwencji DNA, w tym jego amplifikację i klonowanie oraz obserwacje cytogenetyczne. Zakres genomiki funkcjonalnej skupia się z kolei na analizie RNA i białek, w tym na funkcjonalnej reakcji genomu na zdefiniowane czynniki środowiskowe (np. leki, substancje żywieniowe). Do najnowszych kierunków badawczych zalicza się niedziedziczne modyfikacje genomu (epigenetyka), które wpływają na ekspresję genów oraz powiązaną z tym architekturę jądra interfazowego.

## Genomika strukturalna

Prace nad poznaniem genomu danego gatunku rozpoczynają się od opisu charakterystycznego dla niego zestawu chromosomowego. Zwieńczeniem tych badań jest przyjęcie międzynarodowych wzorców kariotypu, co osiągnięto dla większości gatunków zwierząt domowych do końca lat 90. XX wieku. Kolejnym etapem jest tworzenie markerowych map genomowych. W początkowym okresie, tzn. od przełomu lat 80. i 90. XX wieku, badania skupiały się na poznaniu organizacji genomu, a w szczególności utworzeniu jego markerowej mapy

oraz ustaleniu sekwencji nukleotydów. Obecnie dysponujemy wysoce nasyconymi mapami markerowymi (liczba markerów o znanej lokalizacji wynosi co najmniej kilka tysięcy) dla: bydła, świni, konia, psa i kury. Rozwijane są również mapy genomowe gatunków o mniejszym znaczeniu gospodarczym, czego przykładem są zwierzęta futerkowe [15].

Opracowane markerowe mapy genomowe zostały wykorzystane na szeroką skalę do tzw. skanowania genomu, którego celem jest identyfikacja regionów chromosomowych (QTL), w których mogą występować mutacje wpływające na zmienność cech produkcyjnych zwierząt. Liczba tak wytypowanych regionów jest bardzo duża. Są one zaprezentowane m.in. w ogólnodostępnych bazach danych dla świni [19] i bydła [20]. W niektórych z tych regionów udało się zidentyfikować mutacje przyczynowe, np. dla cech hipertrofii mięśniowej bydła (mutacje w genie *miostatyny*), wysokiej plenności owiec booroola (mutacja w genie *BMPT-1B*) itd.

Od początku XXI wieku datuje się dynamiczny wzrost liczby gatunków, dla których ustalono sekwencje genomu. Wśród zwierząt domowych osiągnięto ten etap dla psa (2004, 2005), bydła (2004, 2006), kury (2004) i konia (2007). W najbliższych miesiącach można się spodziewać zakończenia prac nad poznaniem sekwencji genomu świni.

Wiedza o mapach i sekwencjach genomu jest powszechnie dostępna w różnych bazach, a wśród nich najbardziej rozbudowana jest baza NCBI (National Center for Biotechnology Information). Umożliwia to prowadzenie szerokich i wielokierunkowych badań porównawczych, które określane są jako genomika porównawcza. Porównywanie organizacji genomu różnych gatunków ssaków, wskazujące m.in. fragmenty chromosomów zawierające *loci* tych samych genów, stało się ważnym narzędziem typowania tzw. genów kandydujących [17]. W badaniach porównawczych zazwyczaj odwołuje się do genomów najlepiej poznanych, czyli człowieka, myszy i szczura. Ostatnio do gatunków tych dołączył również pies, ze względu na jego rosnącą rolę jako gatunku modelowego dla chorób dziedzicznych człowieka [16].

Równoległe z pracami nad sekwencjonowaniem genomu, szeroko zakrojone były poszukiwania polimorfizmu genów i sekwencji pozagenowych. Z jednej strony było to spowodowane zapotrzebowaniem na dużą liczbę markerów, które powinny mieć ustaloną pozycję na mapach markerowych (dotyczyło to początkowo przede wszystkim tzw. markerów mikrosatelitarnych). Drugą przesłanką było poszukiwanie polimorfizmów funkcjonalnych, czyli wywołujących określony efekt fenotypowy (np. choroba, zmienność cechy ilościowej) w tzw. genach kandydujących. W tym przypadku zainteresowanie skierowano przede wszystkim na markery SNP (polimorfizm podstawień jednonukleotydowych), a w mniejszym stopniu na markery typu InDel (polimorfizm insercyjno-delecyjny). Zakończenie programów sekwencjonowania niektórych genomów pokazało, że nasycenie genomu polimorfizmami typu SNP jest ogromne. Przykładowo, w genomie człowieka szacuje się występowanie ponad 10 mln polimorfizmów SNP [8], a w genomie psa wstępne badania wskazują, że jest ich nie mniej niż 2 mln [12]. Zestawienie to jednoznacznie wskazuje, że z wielką ostrożnością należy podchodzić do wyciągania wniosków na temat związku pojedynczego polimorfizmu ze zmiennością cechy (np. ilościowej). Dlatego coraz częściej analizuje się nie pojedyncze SNP, ale zestawy (haplotypy) dziedziczonych się łącznie, czyli blisko siebie leżących wa-

riantów polimorficznych SNP, między którymi nie zachodzi lub zachodzi bardzo rzadko rekombinacja (crossing over).

Przełomem w analizie genetycznej, bazującej na polimorfizmach typu SNP, stała się technologia mikromacierzy DNA. Umożliwia ona równoczesną ocenę genotypu nawet w kilkuset tysiącach miejsc polimorficznych SNP. Najbardziej zaawansowana mikromacierz dostępna jest do badań genomu człowieka i obejmuje aż 500 tys. markerów SNP [18]. W przypadku zwierząt domowych dostępna jest mikromacierz do genotypowania bydła (20 tys. SNP) i psa (20 tys. SNP). Przewiduje się, że w najbliższym czasie pojawią się dla tych gatunków mikromacierze obejmujące nawet 100 tys. SNP. Technologię tę wykorzystano m.in. do poszukiwania w genomie bydła bloków haplotypowych, tzn. regionów chromosomowych charakteryzujących się silną nierównowagą sprzężeń (ang. linkage disequilibrium) [10]. Autorzy ustalili genotyp 1000 buhajów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej dla ponad 15 tys. SNP i zidentyfikowali ponad 700 bloków haplotypowych. Wiedza o takich blokach i charakterystycznych dla nich SNP (ang. tag SNP) ma istotne znaczenie w zwiększeniu efektywności poszukiwań sprzężeń z mutacjami wywołującymi określony efekt fenotypowy.

Opracowywane są również macierze ze znacznie mniejszą liczbą SNP, ale wytypowanych w związku z ich udowodnioną lub potencjalną przydatnością w ocenie wartości genotypowej. Przykładem może być macierz pozwalająca na równoczesną analizę 16 kandydujących SNP dla cech użyteczności mlecznej bydła, w takich genach jak: *GHR*, *DGAT1*, *LEP*, *CSN3* [9].

Wielkim odkryciem dotyczącym organizacji genomu okazało się zidentyfikowanie sekwencji DNA niosących informację o tzw. niekodujących cząsteczkach RNA (ncRNA), innych niż powszechnie znane rRNA i tRNA. Odgrywają one kluczową rolę w regulacji ekspresji genów, czego przykładem jest zjawisko interferencji RNA (RNAi), polegające na blokowaniu translacji mRNA konkretnych genów. Okazało się zatem, że nie tylko sekwencje odpowiedzialne za kodowanie białek, ale również regulatorowe RNA odgrywają wielką rolę w kształtowaniu zmienności fenotypowej. Właśnie zakłócenie tego mechanizmu jest przyczyną powstania hipertrofii mięśniowej u owiec rasy texel [4].

Wiedza o strukturze genomu jest podstawą dla badań mających na celu udzielenie odpowiedzi na pytania dotyczące mechanizmów regulujących jego funkcjonowanie. Poznanie molekularnych uwarunkowań ekspresji genów, a w tym mechanizmów regulujących włączanie/wyłączenie i intensywność przebiegu transkrypcji (transkryptomika) oraz translacji (proteomika) jest wielkim wyzwaniem. Z racji na wielokierunkowe formy interakcji pomiędzy genami oraz czynnikami pozagenetycznymi, zadanie to wydaje się niezwykle trudne do wykonania.

### Genomika funkcjonalna

Na obecnym, początkowym etapie rozwoju genomiki funkcjonalnej większość badań koncentruje się na transkrytomice. Najczęściej stosowanymi podejściami metodycznymi w tych badaniach są jakościowa (RT-PCR) lub ilościowa (real time RT-PCR) ocena przebiegu transkrypcji oraz masowa identyfikacja transkrypcji genów przy pomocy technologii mikromacierzowej (tzw. mikromacierze ekspersyjne).

Wykrycie zróżnicowanego profilu ekspresji określonych genów, powiązanego z określonym stanem organizmu (np.

etap rozwoju osobniczego, patologiczny obraz tkanki, wartość cechy produkcyjnej, podatność lub odporność na konkretną chorobę infekcyjną itp.), pozwala na typowanie genów kandydujących, którym może być przypisana odpowiedzialność za obserwowaną zmienność fenotypową. Z drugiej strony, wykryte polimorfizmy w sekwencjach regulatorowych genu mogą być analizowane w kontekście związku z poziomem transkrypcji tego genu.

Profil transkryptomiczny może być badany przy pomocy mikromacierzy zawierających oligonukleotydy, które zsynetyzowano opierając się na mRNA wyizolowanym z różnych tkanek i narządów danego gatunku lub wywodzących się z konkretnej tkanki (np. mięśniowej, tłuszczowej), czy narządu (np. jajnik, wątroba). Mikromacierz, zawierającą oligonukleotydy dla ponad 18 tysięcy genów bydła, zastosowano do identyfikacji zróżnicowanego poziomu ekspresji genów w mięśniach buhajków rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, w zależności od ich wieku [14]. Autorzy wskazali 50 genów wykazujących zróżnicowany poziom transkrypcji. Z kolei mikromacierz specyficzną dla tkanki mięśniowej (zawiera oligonukleotydy dla ponad 500 genów) wykorzystano do porównania profilu ekspresji genów w płodach świni rasy duroc i pietrain [2]. Ujawniono, że intensywniejsza ekspresja genów związanych z miogenezą ma miejsce w młodych płodach rasy duroc (od 14. do 49. dnia ciąży) oraz starszych płodach rasy pietrain (od 63. do 91. dnia ciąży).

Przeprowadzenie badań z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnych na zwierzętach o zróżnicowanym fenotypie powinno umożliwić wskazanie genów kandydujących, którym może być przypisany określony efekt fenotypowy. Tak wytypowane geny zasługują na szczegółową analizę sekwencji nukleotydowej, której celem jest identyfikacja polimorfizmu wywołującego dany efekt.

Wykrycie polimorfizmu w części promotorowej genu rodzi pytanie, czy ma on wpływ na intensywność transkrypcji. Analiza bioinformatyczna takich miejsc polimorficznych wskazuje niejednokrotnie, że występują one w obrębie potencjalnych sekwencji konsensusowych dla czynników transkrypcyjnych. Ocena funkcjonalności tego polimorfizmu może być sprawdzona z jednej strony poprzez ilościową ocenę transkrypcji (np. technika real time PCR) u osobników różniących się genotypem względem takiego polimorfizmu, a z drugiej – analizę wiązania czynnika transkrypcyjnego przez sekwencje różniące się w miejscu polimorficznym (np. technika EMSA). W taki sposób był badany m.in. polimorfizm C/T w regionie promotorowym genu leptyny bydła, wskazując na zależność między genotypem CC i podwyższoną ekspresją genu [1].

Poszerzająca się wiedza o genomie ujawniła szereg mechanizmów epigenetycznych, czyli niezależnych od sekwencji nukleotydów, które mają istotny wpływ na funkcjonowanie genomu. Modyfikacje chemiczne chromatyny (DNA lub białek), a także jej przestrzenna organizacja w jądrze interfazowym (inaczej architektura jądra interfazowego) mają szczególne znaczenie.

### Architektura jądra interfazowego

Powszechnie uznaje się, że położenie chromosomów i genów w trójwymiarowej przestrzeni jądra komórkowego jest ważnym czynnikiem wpływającym na ekspresję genów [11]. Podstawową techniką wykorzystywaną w poznawaniu wewnętrznej organizacji chromatyny w jądrze interfazowym jest trójwymiarowa hybrydyzacja *in situ* (tzw. 3D-FISH). Wyko-

rzystując odpowiednio dobrane sondy molekularne (np. chromosomowo-specyficzne i genowo-specyficzne) oraz przeciwciała (np. przeciwko wybranym strukturalnym jądru) dokonuje się analizy położenia terytoriów chromosomowych i genów w jądrach interfazowych, których struktura trójwymiarowa została zachowana. Badania takie wykonuje się przy pomocy mikroskopu konfokalnego.

Położenie chromosomów w jądrze komórkowym nie jest przypadkowe. Każdy chromosom zajmuje ściśle określone miejsce, zwane terytorium chromosomowym [5]. Wielkość i ich umiejscowienie są tkankowo-specyficzne i zależą od fazy cyklu komórkowego. Między terytoriami chromosomowymi znajduje się przestrzeń międzyterytorialna, która zawiera kompleksy białkowe niezbędne do przeprowadzenia transkrypcji, w tym składania mRNA. Również wewnątrzjądrowe położenie genów jest ściśle zdefiniowane. Przyjmuje się, że geny aktywnie transkrybowane najczęściej lokują się na powierzchni terytoriów chromosomowych, w pobliżu przestrzeni międzyterytorialnych, gdzie zachodzi transkrypcja. Z kolei *loci* o długotrwałym braku aktywności są usytuowane w pewnej odległości od przestrzeni międzyterytorialnych, we wnętrzach skondensowanej frakcji chromatyny danego chromosomu. Należy jednak zaznaczyć, że opisano również odstępstwa od tych reguł [6].

Wykazano, że zmiana położenia wybranych genów może być czynnikiem regulującym ich ekspresję. Największe reorganizacje materiału genetycznego w jądrze obserwuje się podczas procesów rozwoju i różnicowania komórek. Jednym z przykładów może być reorganizacja terytoriów chromosomowych w trakcie spermatogenezy świni domowej. Przeprowadzone badania wykazały, że w spermatocytach I i II rzędu chromosomy X i Y zajmowały bardziej peryferyjną lokalizację, natomiast w spermatydach znajdowały się w centrum jądra. Dodatkowo, część z autosomów przemieszczała się w obszary peryferyjne jądra [7]. Może to wskazywać, że ułożenie chromosomów w jądrze plemnika ma znaczenie w późniejszej ekspresji genów w zarodku, a wszelkie zaburzenia tego procesu mogą negatywnie wpływać na proces zapłodnienia i rozwoju zarodka.

Jednym z mechanizmów regulacji ekspresji genów jest przemieszczenie danego *locus* w obszary heterochromatynowe, co powoduje jego inaktywację. Innym mechanizmem jest migracja *locus* poza obszar zajmowany przez chromatynę danego chromosomu. Takie „wypętlanie” genu do przestrzeni międzyterytorialnej, w postaci domeny chromatynowej, wymagane jest do aktywacji transkrypcji [3].

Jeżeli określona organizacja przestrzenna chromosomów i genów w jądrze interfazowym wymagana jest do prawidłowego funkcjonowania komórki, to można przewidywać, że wszelkie reorganizacje będą powodowały niestabilność genomu. Badania takie prowadzone były przede wszystkim w odniesieniu do komórek nowotworowych. Wiadomo, że wiele typów nowotworów charakteryzuje się obecnością swoistej aberracji chromosomowej. Wykazano m.in., że znacznie częściej dochodzi do translokacji między takimi chromosomami, które w jądrze interfazowym położone są blisko siebie. W przypadku niektórych nowotworów obserwowano także zmianę położenia w jądrze genu fuzyjnego (który powstał w efekcie chromosomowej translokacji wzajemnej), przy czym lokalizacja nietranslokowanych regionów genomu nie zmieniała się [13].

Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie genomu w trójwymiarowej przestrzeni jądrowej wymagane jest do pełnego zrozumienia wszystkich procesów życiowych. Można przewidywać, że wiedza o położeniu i organizacji chromosomów i genów w jądrze rzuci nowe światło na zmienność procesu transkrypcji i powiązane z tym efekty fenotypowe. Patologiczna zmiana pozycji danego regionu genomu w jądrze, pociągająca za sobą zmiany w regulacji ekspresji genów, może m.in. prowadzić do wystąpienia procesu chorobowego.

#### Podsumowanie

Dwadzieścia lat temu (we wrześniu 1987 r.) ukazał się pierwszy numer czasopisma GENOMICS. Od tego czasu powstało wiele nowych czasopism, mających w tytule słowo „genomics”. W bazie NCBI uwzględnionych jest aż 19 takich tytułów. Jest to jeden z dowodów wskazujących na to, że badania z tego zakresu rozwijają się niezwykle dynamicznie. Praktyczne wykorzystanie tych badań, polegające na poznaniu podłoża molekularnego zmienności cech, jest już znaczące, a najbliższe lata niewątpliwie przyniosą jeszcze więcej takich osiągnięć. Twórcze włączenie się w nurt tych badań wymaga zespolenia sił. Do warunków niezbędnych trzeba zaliczyć:

- bardzo dobrą współpracę z hodowcami, w tym dostęp do wiarygodnej i dobrze udokumentowanej oceny zmienności badanej cechy;

- dysponowanie właściwie dobranym i precyzyjnie opisanym materiałem badawczym;

- stosowanie różnorodnych technik genomiki strukturalnej, porównawczej (bioinformatyka) i funkcjonalnej.

**Literatura:** 1. Adamowicz T., Flisikowski K., Starzyński R., Zwierchowski L., Świtoński M., 2006 – Mamm. Genome 17, 77-82. 2. Cagnazzo M., te Pas M.F., Priem J., de Wit A.A., Pool M.H., Davoli R., Russo V., 2006 – J. Anim. Sci. 84, 1-10. 3. Chambeyron S., Da Silva N.R., Lawson K.A., Bickmore W.A., 2005 – Development 132, 2215-2223. 4. Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibe B., Bouix J., Caiment F., Elsen J.M., Eychenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C., Georges M., 2006 – Nat. Genet. 38, 813-818. 5. Cremer T., Cremer C., 2001 – Nat. Rev. Genet. 2, 292-301. 6. Foster H.A., Bridger J.M., 2005 – Chromosoma 114, 212-229. 7. Foster H.A., Abeydeera L.R., Griffin D.K., Bridger J.M., 2005 – Cell Sci. 118, 1811-1820. 8. International HapMap Consortium, 2005 – Nature 437, 1299-1320. 9. Kamiński S., Brym P., Ruś A., Wójcik E., Ahman A., Magi R., 2006 – Anim. Biotechnol. 17, 1-11. 10. Khatkar M.S., Zenger K.R., Hobbs M., Hawken R.J., Cavanagh J.A., Barris W., McClintock A.E., McClintock S., Thomson P.C., Tier B., Nicholas F.W., Raadsma H.W., 2007 – Genetics 176, 763-772. 11. Lanctot C., Cheutin T., Cremer M., Cavalli G., Cremer T., 2007 – Nat. Rev. Genet. 8, 104-115. 12. Lindblad-Toh K. i wsp., 2005 – Nature 438, 803-819. 13. Meaburn K.J., Misteli T., Soutoglou E., 2007 – Semin. Cancer Biol. 17, 80-90. 14. Sadkowski T., Jank M., Oprządek J., Motyl T., 2006 – J. Physiol. Pharmacol. 57 (Suppl. 7), 95-110. 15. Szczerbal I., Fijak H., Świtoński M., 2007 – Przegląd Hodowlany 2, 5-7. 16. Świtoński M., Hadyńska A., Szczerbal I., 2005 – Przegląd Hodowlany 6, 21-23. 17. Womack J.E., 2005 – Genome Res. 15, 1699-1705. 18. <http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/500k.affx> 19. <http://www.animal-genome.org/QLTdb/pig.html> 20. <http://bovineqtlv2.tamu.edu/index.html>