

ANDRZEJ JERZMANOWSKI

Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

e-mail: andy@ibb.waw.pl

BIOLOGIA W ERZE POGENOMOWEJ¹

Okres rozwoju biologii, w którym się obecnie znajdujemy, ma już swą nazwę, został określony, jako era pogenomowa. Warto jednak pamiętać o tym, że ery w nauce trwają dziś znacznie krócej niż dawniej. Być może za kilkanaście lat znajdziemy się w erze o zupełnie innej nazwie. Zamierzam przyjrzeć się trzem spośród wielu ciekawych kierunków, w których podąża pogenomowa biologia. Są to: genomika porównawcza, głęboka analiza genomów i poszukiwanie nowych sposobów opisu organizmów. Uważam je za ważne, być może najważniejsze, choć zdaje sobie też sprawę, że

wszelkie sztywne klasyfikacje są dziś bardzo ryzykowne. Ze względu na zmiany wymuszane lawinowym rozwojem technologii, widoczne obecnie podziały już niedługo mogą się stać niewyraźne lub przekształcić w całkowicie nowe. Nie jestem w stanie przedstawić wymienionych wyżej kierunków w sposób systematyczny i wyczerpujący. Każdy z nich urósł już do rozmiarów pokaźnej dziedziny. Chcę raczej zilustrować je za pomocą bardziej lub mniej szczegółowych przykładów mając nadzieję, że ukaże to przynajmniej smak tego, co nas czeka.

GENOMIKA PORÓWNAWCZA – WNIOSKI Z ANALIZY ARCHITEKTURY GENOMU LUDZKIEGO

Od dawna wiadomo, że przypadkowe duplikacje materiału genetycznego mogą być potencjalnym źródłem zmian ewolucyjnych. Pod koniec lat 60. XX wieku amerykański genetyk Susumu Ohno zaproponował, że poliploidyzacja, czyli duplikacje całkowitych genomów, wraz z gromadzącymi się w nich później mutacjami punktowymi, były najistotniejszym katalizatorem wzrostu złożoności u kręgowców (OHNO 1970). Według tej koncepcji, u zarania kręgowców doszło do powstania ewolucyjnego ogniwa pośredniego w postaci tetraploidu (4N), po którym nastąpił powrót do stanu diploidii (2N). Wymaga to oczywiście, by tetra-

ploidalny przodek był żywotny. Takie sytuacje są do dziś powszechne u roślin. Generalnie, poliploidyzacja umożliwia pojawienie się dodatkowych kopii wszystkich istotnych genów, które mogą następnie ewoluować bez ograniczeń narzucanych przez dobór. Wydaje się, że ewolucyjne znaczenie poliploidyzacji u bardziej złożonych zwierząt zmalało po wyłonieniu się linii kręgowców, tj. ok. 450–550 milionów lat temu. Później, możliwe były tylko ograniczone innowacje związane z miejscową duplikacją krótszych odcinków sekwencji genomowych.

¹Referat wygłoszony na posiedzeniu plenarnym Wydziału II Nauk Biologicznych PAN w dniu 22 listopada 2001r.

Innym, ważnym mechanizmem są endoduplikacje – tandemowe duplikacje lokalnych rejonów genomu, będące wynikiem nierównomiernego crossing-over. Zdublikowane fragmenty ulegają raptownej homogenizacji na skutek zjawiska zwanego konwersją genową. Dzięki temu powstają klastery rodzin genowych. W genomie ludzkim istnieje wiele starszych (np. rodzina genów immunoglobulin) i nowszych (np. rodzina genów glikoprotein ciążowych) śladów działania tego mechanizmu.

Nieoczekiwanym wynikiem analizy genomu ludzkiego było stwierdzenie obfitego występowania duplikacji szczególnego rodzaju, zwanych segmentowymi (VENTER i współaut. 2001). Pozostałością po nich są duże bloki sekwencji genomowych o znacznym, w wielu przypadkach przekraczającym 90%, stopniu identyczności i o długości od kilku tysięcy do stu tysięcy par zasad. Zawierają one zarówno sekwencje eksonowe, jak i intronowe, i w przeciwieństwie do rejonów, które uległy duplikacjom tandemowym, są rozrzucone po całym genomie. Duże skupienia sekwencji pochodzących z duplikacji segmentowych występują w rejonach pericentromerowych i subtelomerowych. Uderzające jest to, że podobnego układu sekwencji nie zaobserwowano w poznanych do tej pory genomach bezkręgowców.

Szczególny rozkład w chromosomach i niedawne pojawienie się, o czym świadczy wysoki stopień identyczności, powielonych segmentów w genomie człowieka wskazują więc na istnienie trzeciego mechanizmu duplikacji, niezależnego od poliploidyzacji i duplikacji tandemowych. Niektóre duplikacje segmentowe pojawiły się już po rozdzieleniu się linii prowadzących do człowieka i szympansa. Szczegółowe analizy filogenetyczne wskazują na skomplikowany, wielowarstwowy charakter duplikacji segmentowych: po duplikacji i przeniesieniu początkowej sekwencji, w jej obrębie następowały kolejne duplikacje i przeniesienia wtórne. Wiele z tych wtórnych zmian, szczególnie w duplikacjach transchromosomowych, nastąpiło już po rozdzieleniu się linii hominidów (człowiekowatych) i małp człekokształtnych.

Ponad 5% ludzkiego genomu stanowią niedawne duplikacje segmentowe. Wiele wskazu-

je na to, że zjawisko duplikacji segmentowych jest unikatowe dla genomów naczelnych. Podobnie, jak w przypadku dwóch poprzednio wspomnianych typów duplikacji, duplikacje segmentowe mogły się przyczynić do pojawiania się nowych genów u hominoidów. Jednak ich znaczenie dla przebiegu ewolucji może wynikać z czegoś zupełnie innego. Być może stanowią one główny motor ewolucji strukturalnej chromosomów. Skąd to przypuszczenie?

Duplikacje segmentowe (wewnątrz- i międzychromosomowe) zasadniczo zwiększają prawdopodobieństwo wtórnych rearanżacji prowadzących do dodatkowych inwersji, delekcji i duplikacji. W tym sensie duplikacje segmentowe mogą być uznane za typowe mutacje dynamiczne, to jest takie, w których początkowe wydarzenie mutacyjne zwiększa prawdopodobieństwo wydarzenia wtórnego. Duże bloki niemal identycznych sekwencji stanowią idealny materiał dla wtórnych rekombinacji niehomologicznych. Mozaikowa architektura wielu segmentowych duplikacji w chromosomach ludzkich jest prawdopodobnie wynikiem wielokrotnych rund rekombinacji, które następowały jedna po drugiej, w stosunkowo krótkim czasie w trakcie ewolucji. U człowieka, na każdym 1000 urodzeń, pojawia się spowodowana duplikacją segmentową rearanżacja chromosomów w linii płciowej. Duże wydarzenia mutacyjne, które na ogół zmniejszają dostosowanie, są ślepą uliczką jeśli chodzi o ewolucję chromosomów, ale ostatnio udokumentowano u człowieka kilka znacznych rearanżacji chromosomowych nie mających żadnych bezpośrednich następstw klinicznych. Opisano, związane z niedawnymi duplikacjami segmentowymi, polimorfizmy strukturalne obejmujące zmiany od małych delekcji liczących 54 tysiące par zasad do inwersji odcinków o długości przekraczającej 5 milionów par zasad. Te rearanżacje strukturalne pozostają w równowadze Hardy-Weinberga², przynajmniej wewnątrz grup etnicznych. Obejmują przy tym nie tylko heterochromatynę, ale i bogate w geny rejony euchromatynowe (ECHLER 2001). Z perspektywy ewolucyjnej taka płynność strukturalna może mieć istotne znaczenie w konstrukcji barier dla krzyżowania. Osobnicy homozygotyczni pod względem zmienionych chromosomów, mogliby w teorii wytworzyć barierę dla krzyżowania z osobnikami o nie-

²Stan dużej populacji, charakteryzującej się swobodnym doбором partnera, w którym frekwencja genów i genotypów jest stała z pokolenie na pokolenie (przyj. Red.).

zmienionych chromosomach, polegającą na uniemożliwieniu prawidłowego parowania i segregacji chromosomów homologicznych.

Ciekawy przyczynek do rozważań o przyszłych losach populacji ludzkiej

GŁĘBOKA ANALIZA GENOMÓW – ŚWIAT MAŁYCH RNA

Badania ostatnich kilku lat dowodzą, że komórkowy świat małych cząsteczek RNA jest znacznie bardziej skomplikowany niż się do tej pory wydawało. Małe RNA pełnią w komórce najrozmaitsze funkcje. Głęboka analiza genomów wskazuje, że tkwi w nich informacja, która może się okazać odpowiednikiem ciemnej materii gwiazdnej: jest obok nas, lecz pozostaje niewidoczna. Najlepszym przykładem jest nieznaną do niedawna rodzaj RNA, tzw. mikroRNA – niewielkie, liczące 22–25 nukleotydów cząsteczki RNA o szczególnej funkcji (RUVKUN 2001).

Po raz pierwszy cząsteczki mikroRNA, 22-nukleotydowe *lin-4* i *let-7*, zidentyfikowano w trakcie analizy genetycznej wczesnego rozwoju *Caenorhabditis elegans*. Ekspresja *lin-4* w pierwszym stadium larwalnym, a *let-7* w czwartym, powoduje unieczynnienie pewnych docelowych mRNA poprzez oddziaływanie z ich rejonami 3'-końcowymi (tzw. 3' UTR, rejony nie ulegające translacji), które są komplementarne do poszczególnych rodzajów mikroRNA. Umożliwia to precyzyjną regulację profilu transkrypcji w czasie, związana z determinacją losów komórek. Na ślad nowej klasy RNA natrafiono także analizując biochemiczne podłoże zjawiska tzw. interferencji RNA, polegającego na hamowaniu aktywności transkrypcyjnej docelowych genów przez dwuniciowe RNA, z których w komórkach powstawały 21–25 nukleotydowe formy pośrednie – RNAi, działające jako matryce dla swej własnej amplifikacji. Wkrótce się okazało, że ta sama rybonukleaza, zwana Dicer, pośredniczy zarówno w wytwarzaniu naturalnych małych RNA typu *let-7*, jak i

w obróbce sztucznie wprowadzanych prekursorów dla RNAi. Okazało się także, że mutacje w Dicer powodują liczne aberracje rozwojowe u zarówno u zwierząt, jak i u roślin. Kluczowa dla analizy znaczenia i rozpowszechnienia tej strategii regulacji rozwoju była głęboka analiza genomów szeregu organizmów. Ujawniła ona, że małe RNA, o których mowa, nie są artefaktami ani produktami rozpadu większych cząsteczek. Około 12% zidentyfikowanych mikroRNA to sekwencje konserwowane wśród nicieni, owadów i ssaków. Niektóre z nich ulegają ekspresji tylko w linii komórek płciowych lub we wczesnym rozwoju, inne pojawiają się w trakcie różnicowania specyficznych tkanek. Zidentyfikowano już wiele regulatorowych sekwencji rozmieszczonych w rejonach 3'UTR transkryptów wyrażanych w komórkach płciowych i we wczesnych stadiach embriogenezy. Znalezienie w bazach danych tych, które są komplementarne do poznanych już mikroRNA pozwoli na identyfikację potencjalnych szlaków genetycznych czynnych w rozwoju.

Wydaje się, że mikroRNA mogą też uczestniczyć w kontroli translacji mRNA zlokalizowanych w rejonach dendrytów komórek neuronalnych, które – jak się sądzi – pośredniczą w plastyczności synaptycznej. U roślin, mikroRNA wytwarzane z dwuniciowych prekursorów regulują nie tylko stabilność mRNA, ale i transkrypcję genów docelowych. Niewykluczone, że wiele z nie odkrytych jeszcze miRNA reguluje geny na poziomie transkrypcji. Ciekawa jest koncepcja pośrednictwa miRNA w odpowiedziach systemicznych, np. u roślin zakażonych wirusami.

NOWE SPOSOBY OPISU ORGANIZMÓW

Biolodzy molekularni są przyzwyczajeni do opisywania komórki tak, jakby była kryształem o zdeterminowanej geometrii albo sztywną strukturą zbudowaną z idealnie dopasowanych części. Tymczasem komórka nie jest kryształem, a zasady które w niej obowiązują przypominają bardziej te, które odnoszą się do tworzenia struktur dysypatywnych niż precyzyjnie zaplanowanych budowli. Lokalne nieho-

mogenności, gradienty i zależne od transportu procesy samoorganizacji muszą być podstawa funkcjonowania większości procesów komórkowych. Trudno tu o lepszy przykład niż proces mitozy i, szerzej, relacje między jądrem a cytoplazmą. Plastyczność procesu organizacji wrzeczona kariokinetycznego i jego odporność na zakłócenia da się wytłumaczyć jedynie poprzez założenie, że stochastycznym zacho-

waniem się mikrotubul steruje pole oddziaływań. Pole jest tu zdefiniowane, jako obszar wewnątrz którego siła wywiera wpływ na każdy punkt. Pytanie, czym jest ta siła? Odpowiedź, najbardziej prawdopodobna z możliwych, brzmi: są nią gradienty stężeń regulatorów dynamiki mikrotubul i ich aktywności motorycznych (KARSENTI i VERNOS 2001).

Istnieją doświadczone dowody, że wokół chromosomów mitotycznych wytwarza się gradient fosforylacji statminy, drobno-cząsteczkowego regulatora dynamiki mikrotubul (nieufosforylowana forma statminy aktywnie destabilizuje mikrotubule). Gradient ten jest najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem obserwowanej stabilizacji mikrotubul wokół chromatyny. Drugi, bardzo prawdopodobny przypadek gradientu dotyczy białka RAN, małej GTPazy, która jest kluczowa dla

kontroli transportu białek z sygnałem lokalizacji jądrowej do jądra, a także dla indukcji nukleacji mikrotubul w okolicy chromosomów w mitozie. W jądrze RAN związany jest z GTP, zaś w cytoplazmie z GDP. Dynamiczny gradient RAN ustala się na skutek istnienia odmiennych białek wiążących obie formy – białka RCC1, występującego w chromosomach i białka GAP, występującego w cytoplazmie. Przepuszczalnie, w mitozie odgrywają też rolę inne, nie wykryte dotąd pola oddziaływań.

Do odkrycia logiki złożonych systemów komórkowych nie wystarczy tylko ustalenie, które białka oddziałują z którymi. Niezbędne są nowe sposoby opisu, uwzględniające dynamikę procesów w komórce, choćby tych sterowanych przez pola oddziaływań, o których tu wspomniano.

BIOLOGY IN POSTGENOMIC PHASE

S u m m a r y

The current postgenomic phase in biology is characterized by the occurrence of numerous novel research areas. Within the next twenty years or so, some of them will probably develop into well defined sub-disciplines, the other will disappear or transform into something completely new. Of the emerging directions, three seem particularly promising. They are: comparative genomics, deep analysis of the genomes and a search for the new ways of describing organisms. The recent exemplary achievements obtained by

researchers pursuing these directions were the elucidation of the role of segmental DNA duplications in the evolution of mammals, the discovery of the regulatory functions and the widespread occurrence in the genomes of the tiny RNA molecules, the microRNA, and the finding that such processes as karyokinesis or nuclear-cytoplasmic transport are controlled by the fields of interactions resulting from gradients of regulatory molecules.

LITERATURA

- ECHLER E. E., 2001 *Recent duplication, domain accretion and the dynamic mutation of the human genome*. Trends in Genetics 17, 661-669.
- KARSENTI E., VERNOS I., 2001. *The mitotic spindle: a self-made machine*. Science 294, 543-547.
- OHNO S., 1970. *Evolution by Gene Duplication*. Springer Verlag, New York.
- RUVKUN G., 2001. *Glimpses of a Tiny RNA World*. Science 294, 797-799.
- VENTER J. C. i współaut., 2001. *The sequence of the human genome*. Science 291, 1304-1351.