

NOWE WYDANIE

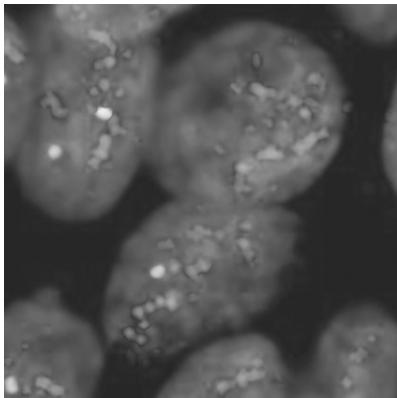
# Biologia molekularna

## w medycynie

### Elementy genetyki klinicznej

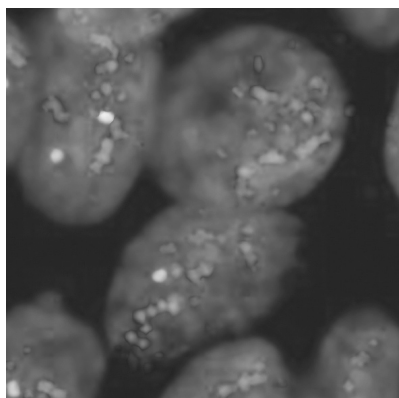
Redaktor naukowy  
**Jerzy Bal**

# Biologia molekularna w medycynie





# Biologia molekularna w medycynie



Elementy  
genetyki klinicznej

Redaktor naukowy  
Jerzy Bal



WYDAWNICTWO NAUKOWE PWN  
WARSZAWA 2013

Projekt okładki i stron tytułowych *Edwin Radzikowski*

Ilustracja na okładce

Po lewej stronie: amplifikacja onkogenu HER-2 w jądrach interfazowych raka piersi. Zastosowano sondę Path Vysion HER-2 Probe Kit, firmy Abbot. Zielone sygnały: centromery chromosomu 17, czerwone – liczne kopie genu HER-2 (dzięki uprzejmości Anity Matyskiel z Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego).

Po prawej: „wymalowane” sondą chromosomy X i 21 w metafazie i jądrach interfazowych prawidłowych komórek. Chromosomy X i 21 wybarwione odpowiednio w kolorze zielonym i na czerwono (Zakład Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie)

Wydawca *Małgorzata Nawrot*

Redaktor *Krystyna Kruczyńska*

Produkcja *Mariola Grzywacka*

Łamanie *Auto Graf, Warszawa*

Książka, którą nabyłeś, jest dziełem twórcy i wydawcy. Prosimy, abyś przestrzegał praw, jakie im przysługują. Jej zawartość możesz udostępnić nieodpłatnie osobom bliskim lub osobiście znanym. Ale nie publikuj jej w internecie. Jeśli cytujesz jej fragmenty, nie zmieniaj ich treści i koniecznie zaznacz, czyje to dzieło. A kopiując jej część, rób to jedynie na użytek osobisty.

Szanujmy cudzą własność i prawo  
Więcej na [www.legalnakultura.pl](http://www.legalnakultura.pl)  
*Polska Izba Książki*

Copyright © by Wydawnictwo Naukowe PWN SA  
Warszawa 2001, 2006, 2011

ISBN 978-83-01-16665-6

Wydanie III zmienione – 1 dodruk

Wydawnictwo Naukowe PWN SA  
tel. 22 69 54 321; faks 22 69 54 288  
infolinia 801 33 33 88  
e-mail: [pwn@pwn.com.pl](mailto:pwn@pwn.com.pl)  
[www.pwn.pl](http://www.pwn.pl)

## Przedmowa do wydania trzeciego

---

W przedmowie do drugiego wydania wspominałem przełomowy dla biologii molekularnej i genetyki rok 1953, w którym to James D. Watson i Francis Crick przedstawili model struktury DNA. Przy okazji obecnego wznowienia książki warto przypomnieć nie mniej przełomowy, a może i ważniejszy, jeżeli chodzi o świadomość społeczną, rok 1859, kiedy to ukazała się praca Karola Darwina zatytułowana *O powstawaniu gatunków*. W obchody 150 rocznicy ukazania się dzieła Darwina wpisują się opublikowane w 2009 roku wyniki badań szkieletu *Ardipithecus ramidus*. Ardi żyła na terenach dzisiejszej Etiopii ponad 4,4 milionów lat temu i, jak się wydaje, jej szczątki są najstarszym znanym do tej pory dowodem ewolucji homonidów. Niejako dopełnieniem tych informacji, pokazującym dodatkowo nowe możliwości technologii molekularnych, jest poznanie i opublikowanie sekwencji DNA genomowego (jądrowego i mitochondrialnego) mężczyzny, z kręgu kultur paleoeskimoskich, żyjącego ponad 4000 lat temu na Grenlandii. Źródłem DNA były znalezione w wiecznej zmarzlinie jego włosy. Wstępna analiza porównawcza, oparta między innymi na markerach typu SNP, wskazała na azjatyckie pochodzenie i pokrewieństwo z obecnie żyjącymi na Syberii populacjami Czukczów, Koriaków i Nganasan (dawna nazwa Tawgijczycy). Craig Venter natomiast, analizując genom *Mycoplasma genitalium*, określił minimalną liczbę genów niezbędnych do życia bakterii, a w 2010 roku odtworzył syn-

tetycznie taki genom i wykazał jego aktywność biologiczną.

Od poprzedniego wydania książki upływa pięć lat. To czas w genetyce molekularnej człowieka, który obfitował w nowe informacje będące rezultatem projektu poznania pełnej sekwencji nukleotydowej genomu człowieka. To przede wszystkim badania i gromadzenie informacji umożliwiających spojrzenie na nasz genom od strony osobniczej, a nie tylko gatunkowej. Tak jak w poprzednich latach akcenty zainteresowania genetyków i biologów przesunęły się z chorób monogenowych na choroby kompleksowe, tak teraz obok badań nad patologią molekularną obserwuje się znaczny wzrost zainteresowań podatnością na występowanie chorób, a genetyczne czynniki ryzyka w coraz większym stopniu postrzegane są przez pryzmat wariantów (alleli) genu/genów. Zmiany te są również konsekwencją dalszego postępu technologicznego. Warto wspomnieć, że zsekwenjonowanie w 2007 roku genomu Jamesa Watsona kosztowało około 1 milion dolarów USA. Obecnie szacuje się, że koszt poznania sekwencji genomu dowolnej osoby będzie się kształtował w granicach 1000 dolarów USA.

Wydanie trzecie nie różni się zasadniczo od poprzedniego. Osia książki pozostały prawa Mendla, zasady dziedziczenia i DNA z zakodowaną informacją genetyczną. W niewielkim stopniu zmieniono układ rozdziałów, zaktualizowano i uzupełniono informacje tak z zakresu patologii molekularnej, jak

i nowych metod analitycznych. Nowymi ważnymi rozdziałami są „Nutrigenetyka” i „Bioinformatyka”. Nutrigenetyka to kolejny, po farmakogenetyce, przykład wzajemnych relacji między osobniczą informacją zapisaną w genomie a środowiskiem. Farmakogenetyka koncentruje się na metabolizmie leków, nutrigenetyka zaś obejmuje metabolizm składników odżywczych. Rozdział poświęcony bioinformatyce to przedstawienie, dostępnych w Internecie, narzędzi niezbędnych w pracy biologa molekularnego. Dużo miejsca poświęcono nowym technologiom, a także metodom, takim jak molekularna nieinwazyjna diagnostyka prenatal-

na. Rozdział poświęcony zagadnieniom prawnym towarzyszącym badaniom genetycznym porusza dodatkowo szereg problemów miejscami przekraczających ramy książki.

Spośród nowych pozycji wydawniczych z zakresu genetyki i biologii molekularnej, jakie ukazały się w ostatnich latach w języku polskim, należy wymienić drugie, zmienione wydanie *Genomów* T.A. Browna (Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009). Warta polecenia jest również więcej niż popularnonaukowa książka J. Watsona i A. Berry'ego *DNA tajemnica życia* (Wydawnictwo CiS i W.A.B., Warszawa 2005).

*Jerzy Bal*

# Autorzy

---

## **Prof. dr hab. Jerzy Bal**

Pracuje w Zakładzie Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka (IMiD) w Warszawie. Zajmuje się badaniami i diagnostyką molekularną chorób dziedzicznych.

## **Prof. dr hab. Ewa Bartnik**

Pracuje w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Uniwersytetu Warszawskiego (UW) oraz w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN (IBB PAN). W ramach zainteresowań genetyką człowieka specjalizuje się w chorobach powodowanych defektem mitochondrialnego DNA.

## **Prof. dr hab. Ewa Bocian**

Kieruje Zakładem Genetyki Medycznej IMiD. Specjalizuje się w badaniach i diagnostyce cytogenetycznej i molekularnej chorób dziedzicznych.

## **Dr Leszek Bosek**

Adiunkt w Instytucie Prawa Cywilnego UW i Uniwersytetu Jagiellońskiego, radca Prokuratury Generalnej Skarbu Państwa.

## **Prof. dr hab. Ewa Brojer**

Kierownik Zakładu Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHT) w Warszawie. Specjalizuje się w badaniach molekularnych antygenów komórek krwi i diagnostyce molekularnej wirusów przenoszonych przez krew.

## **Dr Barbara Czartoryska**

Pracuje w Zakładzie Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. Zajmuje się badaniami biochemicznymi i diagnostyką chorób lizosomalnych.

## **Prof. dr hab. nauk farm. Władysława A. Daniel**

Kierownik Zakładu Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Specjalizuje się w farmakokinetyce i metabolizmie leków działających na ośrodkowy układ nerwowy.

## **Dr Janusz Fiett**

Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Narodowego Instytutu Leków (NIL) w Warszawie. Zajmuje się epidemiologią molekularną zakażeń bakteryjnych oraz metodami typowania bakterii opartymi na analizie DNA.

## **Alain Fischer**

Profesor na Uniwersytecie im. Karzejusza (Paryż V). Zajmuje się diagnostyką i leczeniem pierwotnych niedoborów odporności.

## **Prof. dr hab. Marek Gniadkowski**

Kierownik Zakładu Mikrobiologii Molekularnej NIL. Specjalizuje się w epidemiologii molekularnej zakażeń bakteryjnych.

## **Dr hab. Piotr Grabarczyk**

Pracuje w Zakładzie Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHT. Zajmuje się molekularną diagnostyką wirusologiczną.

## **Dr Katarzyna Guz**

Pracuje w Pracowni Biologii Molekularnej Zakładu Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHT. Specjalizuje się w badaniach molekularnych antygenów erytrocytów, płytek krwi i granulocytów. Od 10 lat zajmuje się nieinwazyjną diagnostyką prenatalną w konfliktach matczyno-rodzowych.



**Dr Józef Kapusta**

Pracuje w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie. Przedmiotem pracy badawczej jest ekspresja w roślinach preparatów biomedycznych.

**Dr hab. Piotr Koziol**

Pracuje w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Specjalizuje się w zastosowaniu analizy DNA w badaniach pokrewieństwa.

**Prof. dr hab. czł. koresp. PAN Janusz Limon**

Kierownik Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zajmuje się genetyką i cytogenetyką nowotworów.

**Dr Barbara Lisowska-Groszper**

Wieloletni dyrektor badań naukowych francuskiego Instytutu Badań Medycznych. W Laboratorium INSERM U429 w Szpitalu Neckera w Paryżu zajmowała się genetyką molekularną pierwotnych niedoborów odporności.

**Prof. dr hab. med. Tadeusz Mazurczak**

Wieloletni kierownik Zakładu Genetyki Medycznej IMiD. Specjalizuje się w genetyce klinicznej i poradnictwie genetycznym chorób dziedzicznych.

**Dr Norman J. Pieniążek**

Kierownik Laboratorium Referencyjnej Diagnostyki Molekularnej Narodowego Centrum Chorób Infekcyjnych, Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorobom w Atlancie. Specjalizuje się w diagnostyce molekularnej chorób pasożytniczych.

**Prof. dr hab. med. Jacek Pietrzyk**

Kierownik Zakładu Genetyki Medycznej Katedry Pediatrii Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii Collegium Medicum UJ. Specjalizuje się w poradnictwie genetycznym chorób dziedzicznych i badaniach chorób kompleksowych.

**Dr Tomasz Pniewski**

Pracuje w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Przedmiotem zainteresowań i pracy badawczej jest ekspresja w roślinach preparatów biomedycznych.

**Prof. dr hab. Marek Safjan**

W pracy naukowej w Instytucie Prawa Cywilnego UW zajmuje się prawem cywilnym i medycznym. Prezes

Trybunału Konstytucyjnego w latach 1998–2006. Obecnie sędzia Europejskiego Trybunału Sprawiedliwości.

**Prof. dr hab. Małgorzata Schlegel-Zawadzka**

Swoje zainteresowania związane z aspektami żywieniowymi osób zdrowych i chorych realizuje w Wydziale Nauk o Zdrowiu Collegium Medicum UJ. Interesuje się aspektami kulturowymi odżywiania i jego wpływu na nasz stan zdrowia.

**Prof. dr hab. Janusz A. Siedlecki**

Kierownik Zakładu Biologii Molekularnej Centrum Onkologii–Instytutu w Warszawie. Specjalizuje się w diagnostyce molekularnej chorób nowotworowych.

**Dr Paweł Siedlecki**

Adiunkt w Zakładzie Bioinformatyki IBB PAN i Instytutu Biologii Eksperymentalnej Roślin UW. Jest autorem publikacji z zakresu projektowania leków *in silico*. Uczy bioinformatyki na UW i Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

**Dr Katarzyna Tońska**

Pracuje w Instytucie Genetyki i Biotechnologii UW. Zajmuje się diagnostyką molekularną i epidemiologią chorób mitochondrialnych oraz polimorfizmami mitochondrialnego DNA.

**Prof. dr hab. med. Anna Tyłki-Szymańska**

Pracuje w Oddziale Chorób Metabolicznych Kliniki Pediatrii Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”. Zajmuje się diagnostyką i leczeniem osób z chorobami metabolicznymi.

**Lek. Joanna Wiszniewska**

Kierownik Laboratorium Diagnostyki Molekularnej w Zakładzie Genetyki Molekularnej Człowieka w Taylor College of Medicine (BCM) w Houston.

**Dr hab. Wojciech Wiszniewski**

Pracuje w Zakładzie Genetyki Molekularnej w BCM. Zainteresowania badawcze obejmują różne aspekty patologii molekularnej chorób dziedzicznych.

**Prof. dr hab. Ewa Ziętkiewicz**

Pracuje w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Specjalizuje się w zagadnieniach genetyki populacyjnej i molekularnych mechanizmach ewolucji *HOMO sapiens*.

# Spis treści

---

|  |                                     |    |
|--|-------------------------------------|----|
| <b>I. Zakres zastosowań diagnostyki molekularnej w medycynie</b>                   | <i>Jerzy Bal, Tadeusz Mazurczak</i> | 1  |
| <b>II. Podstawy genetyki i genomiki</b>  | <i>Jerzy Bal, Ewa Bocian</i>        | 4  |
| II.1. Podstawy genetyki molekularnej   |                                     | 4  |
| II.1.1. Kwas deoksyrybonukleinowy i jego replikacja                                |                                     | 4  |
| II.1.2. Odczytywanie informacji genetycznej  |                                     | 6  |
| II.1.3. Regulacja ekspresji  |                                     | 10 |
| II.1.4. Gen  |                                     | 13 |
| II.1.5. Świat RNA  |                                     | 14 |
| II.2. Genom człowieka  |                                     | 14 |
| II.2.1. Genomika   |                                     | 15 |
| II.2.2. Struktura genomu.  |                                     | 16 |
| II.2.3. Kariotyp   |                                     | 17 |
| II.3. Zmienność i dziedziczność.   |                                     | 24 |
| II.3.1. Mutacje  |                                     | 24 |
| II.3.2. Aberracje chromosomowe   |                                     | 25 |
| II.3.3. Polimorfizm  |                                     | 34 |
| II.3.4. Relacje genotyp–fenotyp  |                                     | 35 |
| II.3.5. Priony   |                                     | 39 |
| <b>III. Uwarunkowania genetyczne chorób dziedzicznych</b>                          | <i>Jerzy Bal, Tadeusz Mazurczak</i> | 41 |
| III.1. Dziedziczenie autosomalne recesywne   |                                     | 44 |
| III.2. Dziedziczenie autosomalne dominujące  |                                     | 45 |
| III.3. Dziedziczenie sprzężone z chromosomem X                                     |                                     | 46 |
| III.4. Dziedziczenie wieloczynnikowe   |                                     | 46 |
| III.5. Dziedziczenie mitochondrialne   |                                     | 49 |
| <b>IV. Genetyczna różnorodność współczesnych populacji ludzkich</b>                | <i>Ewa Ziętkiewicz</i>              | 50 |
| IV.1. Mechanizmy powstawania   |                                     | 51 |
| IV.1.1. Mutacje i rodzaje markerów   |                                     | 51 |
| IV.1.2. Dryf genetyczny  |                                     | 53 |
| IV.1.3. Wpływ demografii na różnorodność populacji.                                |                                     | 53 |
| IV.2. Badania historii populacji   |                                     | 54 |
| IV.2.1. Ocena poziomu różnorodności populacji i efektywna wielkość populacji       |                                     | 54 |
| IV.2.2. Ocena wieku mutacji – metody koalescencyjne w badaniach ewolucji sekwencji |                                     | 55 |
| IV.2.3. Ocena relacji między populacjami   |                                     | 55 |
| IV.2.4. Analiza nierównowagi sprzężeń.   |                                     | 56 |

---

## X Spis treści

---

|  |     |
|--|-----|
| IV.3. Ewolucja <i>Homo sapiens</i> w świetle danych genetycznych . . . . .   | 57  |
| IV.3.1. Modele teoretyczne . . . . .   | 57  |
| IV.3.2. Różnorodność nukleotydowa i efektywna wielkość macierzystej populacji . . . . .  | 58  |
| IV.3.3. Struktura genetyczna gatunku . . . . .   | 58  |
| IV.3.4. Rozmieszczenie różnorodności w populacjach kontynentalnych . . . . .   | 59  |
| IV.3.5. Wiek macierzystej populacji i datowanie ekspansji demograficznej <i>H. sapiens</i> . . . . .                                     | 59  |
| IV.3.6. Model asymilacji . . . . .   | 60  |
| IV.3.7. Procesy migracji i kolonizacja świata . . . . .  | 61  |
| IV.3.8. Prehistoryczne migracje w Europie . . . . .  | 62  |
| IV.3.9. Efekty założyciela w populacjach ludzkich . . . . .  | 63  |
| IV.3.10. Problemy związane z interpretacją różnorodności genetycznej w badaniu historii ewolucyjnej człowieka . . . . .                  | 63  |
| IV.4. Zastosowania praktyczne . . . . .  | 64  |
| IV.4.1. Populacyjne różnice częstości alleli w praktyce medycznej . . . . .  | 64  |
| IV.4.2. Genetyczny profil populacji a mapowanie asocjacyjne w chorobach złożonych . . . . .  | 65  |
| IV.5. Kierunki dalszych badań . . . . .  | 66  |
| <b>V. Prawo a dylematy współczesnej genetyki</b> <i>Marek Safian, Leszek Bosek</i> . . . . .   | 68  |
| V.1. Standardy europejskie . . . . .   | 69  |
| V.1.1. Kilka uwag prawnoporównawczych . . . . .  | 69  |
| V.1.2. Unia Europejska . . . . .   | 72  |
| V.1.3. Stanowisko Rady Europy . . . . .  | 75  |
| V.1.4. Regulacje zawarte w Konwencji o Ochronie Praw Człowieka i Godności Istoty Ludzkiej wobec Zastosowań Biologii i Medycyny . . . . . | 75  |
| V.1.5. Postanowienia protokołu dodatkowego o zakazie klonowania . . . . .  | 79  |
| V.1.6. Postanowienia protokołu dodatkowego o testach genetycznych . . . . .  | 79  |
| V.2. Standardy powszechne . . . . .  | 82  |
| V.3. Założenia do dalszej ewolucji regulacji prawnych . . . . .  | 83  |
| V.4. Stan obecny według prawa polskiego . . . . .  | 84  |
| <b>VI. Metody analizy genomu</b> . . . . .   | 89  |
| VI.1. Metody badania kwasów nukleinowych <i>Jerzy Bal, Joanna Wiszniewska, Wojciech Wiszniewski</i> . . . . .                            | 89  |
| VI.1.1. Techniki analizy DNA . . . . .   | 89  |
| VI.1.2. Identyfikacja mutacji . . . . .  | 98  |
| VI.1.3. Mapowanie i identyfikacja genów . . . . .  | 103 |
| VI.2. Metody analizy cytogenetycznej i cytogenetyki molekularnej <i>Ewa Bocian, Janusz Limon</i> . . . . .                               | 105 |
| VI.2.1. Oznaczanie kariotypu . . . . .   | 105 |
| VI.2.2. Metody analizy chromosomów . . . . .   | 108 |
| VI.2.3. Analiza cytometryczna . . . . .  | 123 |
| VI.2.4. Identyfikacja chromatyny płciowej . . . . .  | 123 |
| VI.3. Bioinformatyka <i>Paweł Siedlecki</i> . . . . .  | 124 |
| VI.3.1. Bazy danych . . . . .  | 124 |
| VI.3.2. Struktura i wizualizacja makromolekuł . . . . .  | 131 |
| VI.3.3. Interaktywny białkowe . . . . .  | 133 |
| VI.3.4. Bazy literatury naukowej . . . . .   | 134 |
| VI.3.5. Przegląd wybranych narzędzi bioinformatycznych . . . . .   | 136 |
| <b>VII. Aspekty kliniczne aberracji chromosomowych</b> <i>Ewa Bocian, Tadeusz Mazurczak</i> . . . . .                                    | 141 |
| VII.1. Wskazanie do analizy kariotypu . . . . .  | 143 |
| VII.2. Zespoły niestabilności chromosomów . . . . .  | 146 |
| VII.3. Interpretacja kariotypu . . . . .   | 146 |
| VII.4. Kontrola jakości badań diagnostycznych w cytogenetyce klinicznej . . . . .  | 148 |
| <b>VIII. Diagnostyka molekularna</b> . . . . .   | 150 |
| VIII.1. Sposób postępowania <i>Jerzy Bal, Wojciech Wiszniewski, Joanna Wiszniewska</i> . . . . .   | 150 |
| VIII.1.1. Badanie sposobu dziedziczenia się genu . . . . .   | 151 |
| VIII.1.2. Analiza mutacji . . . . .  | 154 |
| VIII.2. Nieinwazyjna prenatalna diagnostyka molekularna <i>Ewa Brojer, Katarzyna Guz</i> . . . . .                                       | 164 |
| VIII.2.1. Izolowanie i analiza cff-NA . . . . .  | 165 |
| VIII.2.2. Strategie kontroli obecności cff-DNA i zapobiegania zanieczyszczeniom . . . . .  | 167 |
| VIII.2.3. Aplikacje kliniczne nieinwazyjnych badań molekularnych . . . . .   | 167 |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| VIII.2.4.  | Perspektywy stosowania nieinwazyjnej diagnostyki molekularnej . . . . .   | 170        |
| VIII.2.5.  | Zagadnienia etyczne, społeczne i patentowe . . . . .  | 170        |
| VIII.3.    | Problemy diagnostyczne <i>Jerzy Bal, Wojciech Wiszniewski, Joanna Wiszniewska</i> . . . . .                       | 171        |
| VIII.4.    | Testy genetyczne <i>Jerzy Bal</i> . . . . .   | 171        |
| <b>IX.</b> | <b>Choroby genetycznie uwarunkowane</b> . . . . .   | <b>174</b> |
| IX.1.      | Choroby monogenowe – immunogenetyka . . . . .   | 175        |
| IX.1.1.    | Główny układ zgodności tkankowej i inne układy antygenowe komórek krwi <i>Ewa Brojer, Katarzyna Guz</i> . . . . . | 175        |
| IX.1.2.    | Dziedziczne choroby układu odpornościowego <i>Barbara Lisowska-Grosperre, Alain Fischer</i> . . . . .             | 198        |
| IX.2.      | Choroby kompleksowe <i>Jacek J. Pietrzyk</i> . . . . .  | 208        |
| IX.2.1.    | Klasyfikacja. . . . .   | 209        |
| IX.2.2.    | Znaczenie populacyjne . . . . .   | 209        |
| IX.2.3.    | Genetyka populacyjna – metodyka . . . . .   | 210        |
| IX.2.4.    | Oszacowanie udziału czynników genetycznych i środowiskowych w etiologii chorób kompleksowych . . . . .            | 214        |
| IX.2.5.    | Identyfikacja genów głównych . . . . .  | 216        |
| IX.2.6.    | Wybrane przykłady chorób kompleksowych . . . . .  | 218        |
| IX.2.7.    | Specyfika poradnictwa genetycznego w chorobach kompleksowych . . . . .  | 222        |
| IX.2.8.    | Aktualny stan badań w chorobach kompleksowych . . . . .   | 223        |
| IX.2.9.    | Przyszłe kierunki badań – oczekiwania i ograniczenia . . . . .  | 224        |
| IX.3.      | Choroby nowotworowe . . . . .   | 225        |
|            | <i>Janusz A. Siedlecki</i>  |            |
| IX.3.1.    | Podłoże molekularne . . . . .   | 226        |
| IX.3.2.    | Diagnostyka molekularna . . . . .   | 257        |
| IX.3.3.    | Znaczenie badań genetycznych w klinice . . . . .  | 267        |
|            | <i>Janusz Limon</i>   |            |
| IX.3.4.    | Swoiste aberracje chromosomowe . . . . .  | 269        |
| IX.3.5.    | Badanie predyspozycji genetycznych . . . . .  | 276        |
| IX.3.6.    | Poradnictwo genetyczne w zespołach dziedzicznej predyspozycji do nowotworów . . . . .                             | 277        |
| IX.3.7.    | Wskazania do badań molekularnych . . . . .  | 281        |
| IX.4.      | Choroby mitochondrialne <i>Ewa Bartnik, Katarzyna Tońska</i> . . . . .  | 282        |
| IX.4.1.    | Genom mitochondrialny . . . . .   | 282        |
| IX.4.2.    | Mutacje mtDNA . . . . .   | 283        |
| IX.4.3.    | Korelacje genotyp/fenotyp . . . . .   | 284        |
| IX.4.4.    | Współzależność mtDNA – DNA jądrowy . . . . .  | 285        |
| IX.4.5.    | Diagnostyka chorób mitochondrialnych . . . . .  | 286        |
| IX.4.6.    | Leczenie chorób mitochondrialnych . . . . .   | 287        |
| IX.4.7.    | Polimorfizm mtDNA . . . . .   | 287        |
| IX.4.8.    | Mitochondria a starzenie się . . . . .  | 288        |
| <b>X.</b>  | <b>Genetycznie uwarunkowana zmienność osobnicza a współczesne problemy zdrowotne</b> . . . . .                    | <b>290</b> |
| X.1.       | Farmakogenetyka <i>Władysława A. Daniel</i> . . . . .   | 290        |
| X.1.1.     | Farmakogenetyka jako nowa dziedzina nauki . . . . .   | 290        |
| X.1.2.     | Polimorfizm reakcji utleniania z udziałem cytochromu P450 . . . . .   | 292        |
| X.1.3.     | Polimorfizm reakcji sprzęgania . . . . .  | 297        |
| X.1.4.     | Fenotypowanie . . . . .   | 299        |
| X.1.5.     | Kliniczne znaczenie farmakogenetyki . . . . .   | 301        |
| X.1.6.     | Czy farmakogenetyka dotyczy jedynie enzymów metabolizujących leki? . . . . .                                      | 303        |
| X.1.7.     | Farmakogenetyka i farmakogenomika a indywidualizacja farmakoterapii . . . . .                                     | 305        |
| X.2.       | Nutrigenetyka <i>Małgorzata Schlegel-Zawadzka</i> . . . . .   | 307        |
| X.2.1.     | Produkty żywnościowe, składniki pokarmowe, zwyczaje i nawyki żywieniowe . . . . .                                 | 307        |
| X.2.2.     | Metodyka badań . . . . .  | 308        |
| X.2.3.     | Interakcja składników diety i genów . . . . .   | 308        |
| X.2.4.     | Fenotyp żywieniowy . . . . .  | 311        |
| X.2.5.     | Indywidualizacja diety, zapobieganie chorobom dietozależnym. . . . .  | 313        |
| X.2.6.     | Etyczne problemy a żywieniowe badania genetyczne . . . . .  | 315        |
| <b>XI.</b> | <b>Leczenie – praktyka i nadzieje</b> . . . . .   | <b>317</b> |
| XI.1.      | Znaczenie terapii <i>Jerzy Bal, Tadeusz Mazurczak</i> . . . . .   | 317        |
| XI.2.      | Genetyczne choroby metaboliczne – możliwości leczenia <i>Anna Tylki-Szymańska, Barbara Czartoryska</i> . . . . .  | 318        |
| XI.2.1.    | Definicja choroby metabolicznej . . . . .   | 318        |
| XI.2.2.    | Przyczyny zaburzeń przemian metabolicznych. . . . .   | 319        |

---

## XII Spis treści

---

|  |     |
|--|-----|
| XI.2.3. Diagnostyka . . . . .  | 320 |
| XI.2.4. Możliwości lecznicze . . . . .   | 320 |
| XI.2.5. Skuteczność leczenia – „choroby rzadkie” . . . . .   | 327 |
| XI.3. Terapia genowa <i>Jerzy Bal</i> . . . . .  | 328 |
| XI.3.1. Modele zwierzęce chorób dziedzicznych . . . . .  | 329 |
| XI.3.2. Przywrócenie utraconej funkcji – transfer genu . . . . .   | 329 |
| XI.3.3. Zablokowanie ekspresji . . . . .   | 331 |
| XI.4. Terapia genowa chorób nowotworowych <i>Janusz A. Siedlecki</i> . . . . .   | 331 |
| XI.4.1. Supresja fenotypu nowotworowego. . . . .   | 332 |
| XI.4.2. Odpowiedź gospodarz–nowotwór . . . . .   | 332 |
| XI.4.3. Niszczenie komórek nowotworowych . . . . .   | 333 |
| XI.4.4. Ochrona komórek macierzystych . . . . .  | 333 |
| XI.4.5. Antyangiogenna forma terapii nowotworów. . . . .   | 333 |
| XI.5. Terapia – wzmocnienie genetyczne – predyspozycje <i>Jerzy Bal</i> . . . . .  | 334 |
| <b>XII. Poradnictwo genetyczne i profilaktyka chorób</b> <i>Tadeusz Mazurczak</i> . . . . .  | 336 |
| XII.1. Poradnictwo genetyczne . . . . .  | 336 |
| XII.1.1. Definicja i cele poradnictwa genetycznego . . . . .   | 337 |
| XII.1.2. Metodyka poradnictwa genetycznego . . . . .   | 338 |
| XII.1.3. Aspekty psychologiczne poradnictwa genetycznego . . . . .   | 341 |
| XII.2. Profilaktyka chorób genetycznych . . . . .  | 345 |
| <b>XIII. Zakres zastosowań biologii molekularnej</b> . . . . .   | 349 |
| XIII.1. Analiza DNA w medycynie sądowej <i>Piotr Koziół</i> . . . . .  | 349 |
| XIII.1.1. Badania genetyczne w ustalaniu ojcostwa . . . . .  | 349 |
| XIII.1.2. Badanie śladów biologicznych w kryminalistyce . . . . .  | 365 |
| XIII.1.3. Polimorfizm DNA mitochondrialnego . . . . .  | 368 |
| XIII.1.4. Badania predykcyjne . . . . .  | 371 |
| XIII.1.5. Banki profili genetycznych. . . . .  | 373 |
| XIII.2. Diagnostyka chorób infekcyjnych i inwazyjnych . . . . .  | 375 |
| XIII.2.1. Podstawy diagnostyki molekularnej <i>Norman J. Pieniążek</i> . . . . .   | 375 |
| XIII.2.2. Analiza genetyczna w bakteriologii i epidemiologii zakażeń bakteryjnych <i>Janusz Fielt, Marek Gniadkowski</i> . . . . .   | 381 |
| XIII.2.3. Diagnostyka wirusów przenoszonych przez krew <i>Ewa Brojer, Piotr Grabarczyk</i> . . . . .   | 397 |
| XIII.3. Biotechnologia <i>Józef Kapusta, Tomasz Pniwski</i> . . . . .  | 403 |
| XIII.3.1. Szczepionki . . . . .  | 405 |
| XIII.3.2. Wytwarzanie przeciwciał monoklonalnych . . . . .   | 414 |
| XIII.3.3. Biotechnologia w pozyskiwaniu naturalnych farmaceutyków roślinnych. . . . .  | 417 |
| XIII.3.4. Produkcja w roślinach związków biologicznie aktywnych, terapeutyków i nutraceutyków . . . . .  | 417 |
| XIII.3.5. Zwierzęta transgeniczne w produkcji biofarmaceutyków . . . . .   | 418 |
| XIII.3.6. Komórki macierzyste, medycyna regeneracyjna, klonowanie i terapia transplantacyjna . . . . .   | 419 |
| XIII.3.7. Biotechnologia medyczna z perspektywy lat – nowe wyzwania . . . . .  | 426 |
| <b>XIV. Uzupełnienia i załączniki</b> <i>Jerzy Bal, Ewa Bocian</i> . . . . .   | 430 |
| XIV.1. Kod genetyczny . . . . .  | 430 |
| XIV.2. Przygotowanie materiału do badania . . . . .  | 431 |
| XIV.2.1. Pobranie krwi na izolację DNA . . . . .   | 431 |
| XIV.2.2. Pobranie krwi do badania cytogenetycznego . . . . .   | 431 |
| XIV.3. Nazewnictwo genów i mutacji . . . . .   | 431 |
| XIV.4. Ważniejsze osiągnięcia w genetyce i biologii molekularnej w latach 1953–2010 . . . . .  | 432 |
| XIV.5. Słownik terminów. . . . .   | 435 |
| XIV.6. Przykłady wyników diagnostyki molekularnej . . . . .  | 438 |
| XIV.7. Deklaracja świadomej zgody . . . . .  | 445 |
| XIV.8. Konwencja o Ochronie Praw Człowieka i Godności Istoty Ludzkiej wobec Zastosowań Biologii i Medycyny . . . . .   | 446 |
| XIV.9. Projekt Protokołu Dodatkowego do Konwencji o Ochronie Praw Człowieka i Godności Istoty Ludzkiej wobec Zastosowań Biologii i Medycyny w sprawie zakazu klonowania istot ludzkich . . . . . | 453 |
| XIV.10. Projekt komentarza do projektu Protokołu Dodatkowego w sprawie zakazu klonowania istot ludzkich . . . . .  | 454 |
| XIV.11. Protokół Dodatkowy do Konwencji o Prawach Człowieka i Biomedycynie o testach genetycznych dla celów zdrowotnych . . . . .  | 456 |
| Indeks . . . . .   | 463 |

## Zakres zastosowań diagnostyki molekularnej w medycynie

Jerzy Bal, Tadeusz Mazurczak

Poznanie informacji genetycznej człowieka (sekwencji nukleotydowej całego genomu) w sposób radykalny zmienia spojrzenie na medycynę. Przypominając *Anatomię człowieka* Andreeasa Wesaliusza z 1543 roku, która odegrała ważną rolę w rozwoju medycyny, McKusick proponował dla badania struktury i zmian w genomie wprowadzenie określenia „anatomia genomu”. Konsekwentnie porównywanie genomów to „anatomia porównawcza i rozwojowa”, badanie ekspresji genów to „anatomia czynnościowa i patologiczna”. Nie przesądzając aktualności proponowanej terminologii, nie ulega wątpliwości, że współczesna medycyna postrzegana jest jako medycyna molekularna. Wcześniejsze i dokładniejsze rozpoznawanie chorób, postęp w leczeniu, nowe możliwości rokowania rozwoju choroby i profilaktyka to praktyka współczesnej medycyny.

Rozwój metod analizy genomu towarzyszący postępowi medycyny molekularnej powoduje, że coraz powszechniej znajdują one zastosowanie w diagnostyce rutynowej. W klasycznym badaniu cytogenetycznym oceniana jest morfologia chromosomów. Analiza kwasów nukleinowych umożliwia badanie sekwencji nukleotydów cząsteczki DNA czy RNA. Nowe technologie powoli zacierają te różnice, a tradycyjny podział traci na aktualności.

Klasyczne badania cytogenetyczne z powodzeniem są wykonywane w laboratoriach diagnostycznych od początku lat sześćdziesiątych XX wieku. Przełomowi lat siedemdziesiątych

i osiemdziesiątych zeszłego stulecia towarzyszyło stopniowe wprowadzanie techniki analizy DNA. Formalne zakończenie, na początku XXI wieku, programu sekwencjonowania genomu człowieka zaowocowało pokonywaniem kolejnych barier metodycznych oraz istotnym przyspieszeniem badań nad wykorzystaniem metod biologii molekularnej w diagnostyce medycznej. Hybrydyzacja *in situ* czy też sekwencjonowanie DNA są już rutynowymi technikami diagnostycznymi. Również w Polsce, w wielu laboratoriach powstałych głównie przy zakładach genetyki medycznej, techniki te są wprowadzane do codziennej praktyki badawczej. Dzięki nowym technologiom badania i diagnostyka molekularna uległy kolejnym przeobrażeniom. Wprowadzenie mikromacierzy umożliwia nie tylko zwiększenie liczby analiz, ale także, jak w przypadku porównawczej hybrydyzacji genomowej, identyfikację delekcji czy duplikacji o wielkości nawet kilku kbp, co w klasycznej cytogenetyce było nieosiągalne. W jednym eksperymencie można obecnie identyfikować markery w całym genomie czy analizować ekspresję równocześnie setek genów. Kolejne przyspieszenie przynoszą z sobą metody genomowego sekwencjonowania DNA. W tym jednak przypadku wydaje się, że uzyskana ilość informacji znacznie przewyższa możliwość ich wykorzystania, zarówno w świetle obróbki informatycznej, jak i wiedzy, którą obecnie dysponujemy.

Zwiększający się zakres badań molekularnych w medycynie łączy się jednak przede wszystkim z adaptowaniem do celów diagnostyki laboratoryjnej techniki PCR – enzymatycznego powielania fragmen-



Tabela I-1. Zakres zastosowań diagnostyki molekularnej w medycynie

| Specjalności  | Zastosowanie  |
|---|---|
| Zasadniczo wszystkie specjalności medyczne ze szczególnym uwzględnieniem: | <ul style="list-style-type: none"> <li>• genetyki klinicznej</li> <li>• onkologii</li> <li>• wirusologii</li> <li>• bakteriologii</li> <li>• parazytologii</li> <li>• farmakogenetyki</li> <li>• transplantologii</li> <li>• epidemiologii</li> <li>• medycyny sądowej</li> </ul> |
|   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• diagnostyka</li> <li>• patologia molekularna</li> <li>• badania przesiewowe</li> <li>• badania prognostyczne</li> <li>• monitorowanie terapii</li> <li>• ustalanie pokrewieństwa</li> <li>• badanie śladów biologicznych</li> </ul>      |

tów DNA. Dzięki tej technice uległa zwiększeniu czułość i specyficzność badań. Zaowocowało to licznymi zastosowaniami w analizie mikrośladów biologicznych, ale również i w badaniu np. wymarłych gatunków zwierząt czy roślin. Obecność DNA wykryto metodą PCR między innymi w liczących około 135 milionów lat okazach owadów zatopionych w bursztynie czy liczących 5–7 tysięcy lat zmumifikowanych zwłokach faraonów. Znaczącym wynikiem tego typu badań, który zapewne na stałe znajdzie miejsce w historii genetyki człowieka, było wykazanie przyczyny śmierci dziecka, którego szczątki liczące kilka tysięcy lat odkopano w Izraelu. Wykazano, że prawdopodobną przyczyną śmierci była  $\beta$ -talasemia. Wprowadzenie do diagnostyki medycznej techniki PCR uprościło również procedury badawcze, umożliwiając ich automatyzację i wytworzenie wielu rodzajów ogólnie dostępnych testów.

Ciągle poszerza się zakres zastosowań biologii molekularnej w medycynie (tab. I-1). Poszerza się również zakres możliwości genetyki medycznej. Na przykład w 1995 roku zidentyfikowano niespełna 60 genów, w tym geny, których defekty są odpowiedzialne za wystąpienie zespołu Aperta i zespołu Cruzona (receptor 2 czynnika wzrostu fibroblastów), zespołu Sanfillipo A, zespołu Blooma, zespołu Werdniga–Hoffmana, raka piersi czy choroby Alzheimera (presenilina 1 i presenilina 2). W 2003 roku poinformowano o zsekwencjonowaniu całego genomu jądrowego człowieka i poznaniu jego wszystkich 25 000 genów struktury. Nie jest to jednak równoznaczne z poznaniem podłoża molekularnego wszystkich chorób uwarunkowanych genetycznie. Zbadanie ekspresji poszczególnych genów i określenie związku między defektem w DNA a występo-

waniem zmian fenotypowych, czy też odwrotnie, wymaga wielu lat badań. Ponadto należy pamiętać, że ustalenie takich zależności jest stosunkowo łatwe w przypadku chorób dziedziczących się jako cecha monogenowa. Określenia współzależności dla chorób warunkowanych przez wiele genów należy oczekiwać od nowych technologii dopiero wkraczających do biologii.

Na szczególne podkreślenie zasługuje wzrastające znaczenie cytogenetyki i analizy molekularnej w onkologii. Zgromadzone wyniki umożliwiają w wielu przypadkach wczesne rozpoznanie obecności komórek nowotworowych, określenie przebiegu choroby, a w wielu – wybranie rodzaju terapii. Analiza molekularna genów zgodności tkankowej jest badaniem nieodłącznie związanym z transplantologią. Nowe metody badawcze umożliwiają też niezwykle precyzyjne przesledzenie pokrewieństwa wśród członków badanej rodziny w sytuacji czy to spornego ojcostwa, czy identyfikacji mikrośladów. Szczególną rolę i znaczenie metod biologii molekularnej należy dostrzegać w diagnostyce chorób infekcyjnych, inwazyjnych i pasożytniczych. W tym przypadku wyjątkowo duży postęp dokonał się w diagnostyce wolno rosnących lub trudnych do hodowli patogenów. Dzięki możliwości analizy bakteryjnego rybosomowego RNA (rRNA) czułość stosowanych technik zwiększyła się przeszło tysiąc razy. Dostępne handlowo zestawy diagnostyczne umożliwiają identyfikację określonych patogenów (np. *M. pneumoniae*) w materiale biologicznym, przy czym przeprowadzenie badania trwa około dwóch godzin.

Identyfikacja genów, których defekty są odpowiedzialne za choroby uwarunkowane genetycznie, oraz rozwój metod analizy kwasów nukleinowych stanowią również podstawę do wprowadzania nowych typów leczenia w medycynie. Wynikiem pierwszych prób klinicznych terapii genowej niektórych

chorób dziedzicznych i nowotworowych towarzyszy ostrożny optymizm. Należy pamiętać, że nadzieje zarówno badaczy, jak i chorych wobec tej nowej koncepcji leczenia były i są nadal ogromne. Jest to tym bardziej zrozumiałe, że dotychczas stosowane metody terapii charakteryzują się brakiem skuteczności lub małą skutecznością wobec większości chorób genetycznych. Niezależnie od mnogości problemów natury biologicznej i technologicznej, które trzeba jeszcze wyjaśnić i rozwiązać, wydaje się, że w ciągu najbliższych lat terapia genowa stanie się metodą z wyboru w leczeniu niektórych chorób dziedzicznych, nowotworowych oraz pewnych chorób infekcyjnych. Terapia genowa dopiero puka do drzwi medycyny. Nie oznacza to jednak, że jesteśmy całkowicie bezradni w leczeniu chorób dziedzicznych. W tzw. chorobach metabolicznych suplementacja enzymatyczna, mimo olbrzymich kosztów jednostkowych, prowadzona jest również w Polsce.

Wraz z poszerzaniem naszej wiedzy i rozwojem narzędzi analizy genomu uczestniczymy w zmianie priorytetów, jakimi kieruje się genetyka medyczna. Z jednej strony dotyczy to zwiększonego zainteresowania genetycznie uwarunkowanymi chorobami cywilizacyjnymi, a z drugiej indywidualizacją medycyny. Diagnostyka genetyczna będzie obejmować identyfikację osób o zwiększonej predyspozycji do wystąpienia takich schorzeń, jak nadciśnienie, cukrzyca czy choroby psychiczne. Już obecnie wykrywane są mutacje czy markery w specyficznych genach, określające podatność zachorowania na wiele typów nowotworów, w tym raka sutka, raka gruczołu krokowego czy czerniaka. Badanie osobniczych predyspozycji genetycznych najlepiej ilustrują możliwości farmako- i nutrigenetyki.

Farmakogenetyka zajmuje się genetycznie uwarunkowaną zmiennością reakcji organizmu na leki. Zmienność ta, odzwierciedlając różnicowanie populacyjne, może mieć charakter nieoczekiwany, niepożądany, a czasami wręcz zagrażający życiu. Możliwość identyfikacji metodami molekularnymi genotypów warunkujących tego rodzaju reakcje jest już wykorzystywana w medycynie do optymalizacji farmakoterapii. Zmien-

ność osobnicza a stopień tolerancji na składniki pokarmowe leży dla odmiany u podstaw nutrigenetyki. Ta stosunkowo nowa dziedzina nauki o człowieku koncentruje się na badaniu uwarunkowanej genetycznie różnorodnej tolerancji na składniki pokarmowe.

Praktycznym przejawem wykorzystania metod biologii molekularnej w rutynowej diagnostyce medycznej jest powszechny dostępnych do ponad 2000 różnych testów genetycznych. Osiągnięcia biologii molekularnej i możliwości manipulacji genetycznych rodzą jednak problemy społeczne, etyczne i prawne, które towarzyszą poznawaniu i „wglądowi” w ludzki DNA. Wiele wątpliwości reguluje kodeks lekarski. Ponieważ jednak w molekularną diagnostykę kliniczną zaangażowani są również specjaliści z dziedzin pozamedycznych, tworzone nowe normy prawne powinny rozwiązywać możliwie wszystkie niejasności istniejące na tym polu. Dotyczy to warunków i kryteriów kwalifikacji osób do badań molekularnych (warunek świadomej zgody) oraz sposobu przechowywania informacji i dostępności do danych uzyskanych w wyniku analizy DNA. Wydaje się, że poza określonymi prawnie wyjątkami tylko osobom najbardziej zainteresowanym, a więc chorym lub zagrożonym wystąpieniem schorzenia, powinno przysługiwać prawo do uzyskania informacji na ten temat. Ujawnianie ich szerszemu gronu osób może bowiem naruszać prawa jednostki lub grupy osób.

Wprowadzenie metod analizy molekularnej do diagnostyki medycznej sprawia, że umiejętność „myślenia genetycznego” jest jednym z zasadniczych elementów edukacji współczesnego lekarza. Znajomość podstaw genetyki medycznej, w tym cytogenetyki i genetyki molekularnej, staje się niezbędna zarówno dla racjonalnego, odpowiadającego poziomowi współczesnej wiedzy i możliwościom, planowania badań diagnostycznych, właściwej interpretacji uzyskanych wyników, jak i indywidualizacji leczenia.

### *Piśmiennictwo uzupełniające*

1. Strachan T., Read A.P.: *Human molecular genetics*. Wyd. 4. Garland Sciences, 2011.
2. *Zastosowania biologii w medycynie a godność osoby ludzkiej*. Aspekty etyczne i prawne. Red. T. Mazurczak. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.





# Podstawy genetyki i genomiki

Jerzy Bal, Ewa Bocian

|   |    |
|---|----|
| <b>II.1. Podstawy genetyki molekularnej</b> . . . . .   | 4  |
| II.1.1. Kwas deoksyrybonukleinowy i jego replikacja (4) • II.1.2. Odczytywanie informacji genetycznej (6) • II.1.3. Regulacja ekspresji (10) • II.1.3.1. Wyciszanie ekspresji genu (11) • II.1.3.2. Piętnowanie genomowe (12) • II.1.4. Gen (13) • II.1.5. Świat RNA (14) |    |
| <b>II.2. Genom człowieka</b> . . . . .  | 14 |
| II.2.1. Genomika (15) • II.2.2. Struktura genomu (16) • II.2.3. Kariotyp (17) • II.2.3.1. Struktura chromosomu (17) • II.2.3.2. Mitoza (21) • II.2.3.3. Mejoza (22)   |    |
| <b>II.3. Zmienność i dziedziczność</b> . . . . .  | 24 |
| II.3.1. Mutacje (24) • II.3.1.1. Mutacje dynamiczne (25) • II.3.2. Aberracje chromosomowe (25) • II.3.3. Polimorfizm (34) • II.3.4. Relacje genotyp–fenotyp (35) • II.3.4.1. Recesywność i dominacja (38) • II.3.4.2. Antycypacja (38) • II.3.5. Priony (39)              |    |

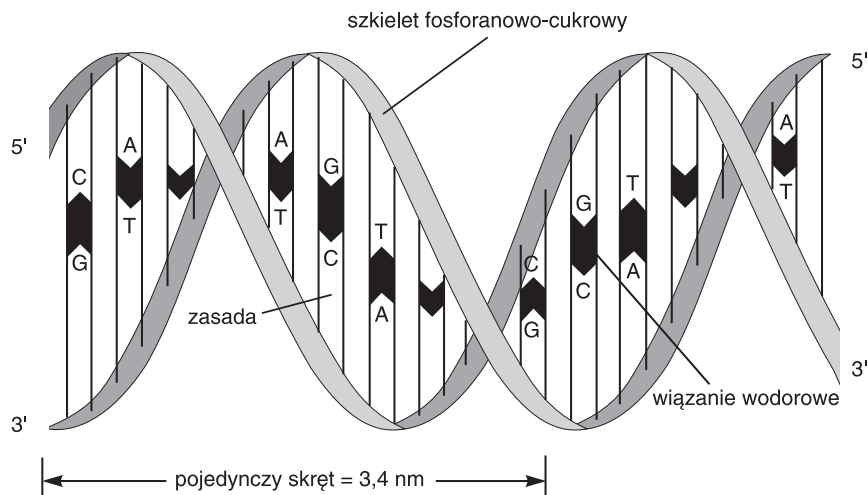
## II.1. Podstawy genetyki molekularnej

### II.1.1. Kwas deoksyrybonukleinowy i jego replikacja

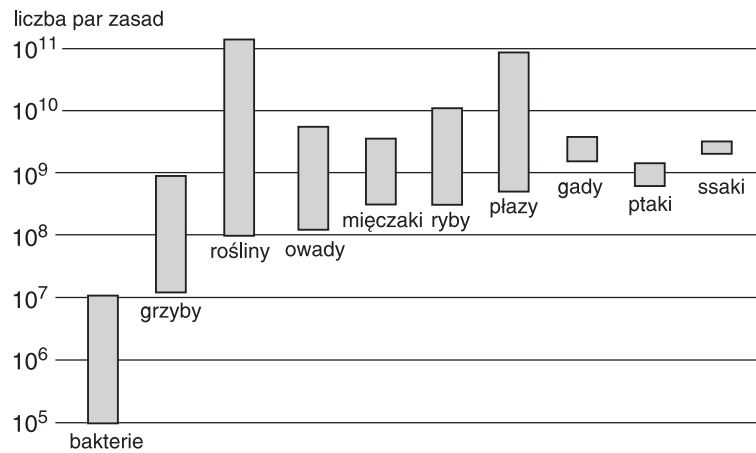
Podstawową jednostką organizacji DNA jest nukleotyd. Zbudowany jest on z trzech elementów: cukru, zasady azotowej (adeniny, guaniny, cytozyny

lub tyminy) oraz reszty kwasu fosforowego. Składnikiem cukrowym jest pięciowęglowa deoksyryboza. Cukier ten, łącząc się z zasadą, tworzy nukleozyd. W zależności od zasady wchodzącej w jego skład, nukleozyd z przyłączoną resztą fosforanową to jeden z czterech nukleotydów: A, G, C lub T. Nukleotydy, łącząc się ze sobą, tworzą łańcuchy. DNA jest więc wielkocząsteczkowym polimerem deoksyrybonukleotydów.

Model struktury kwasu deoksyrybonukleinowego został zaproponowany przez Watsona i Cricka



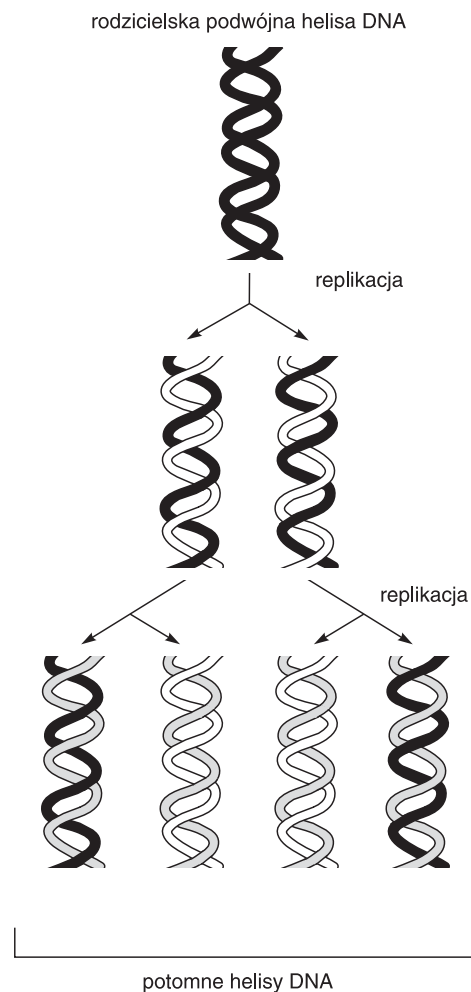
Rycina II-1. Budowa podwójnej helisy DNA



Rycina II-2. Wielkość genomów różnych organizmów

w 1953 roku. Zgodnie z nim cząsteczka DNA składa się z dwóch przeciwbieżnych łańcuchów nukleotydowych skręconych spiralnie wokół siebie. Orientację łańcuchów ułatwia to, że reszta fosforanowa łącząca nukleozydy przyłącza się do węgla 3' jednego cukru i 5' sąsiedniego. Łańcuchy spirali zorientowane są więc: jeden od końca 5' do 3', a drugi od końca 3' do 5'. Konstrukcja tej helisy utrzymywana jest między innymi dzięki tworzeniu się między zasadami obu łańcuchów wiązań wodorowych. Szkielet stanowią składniki cukrowo-fosforanowe, a zasady usytuowane są w środku cząsteczki. Układ zasad w jednym łańcuchu determinuje ich układ w drugim w myśl reguły, że adenina łączy się zawsze z tyminą, a cytozyna – z guaniną. Łańcuchy w tak zbudowanej cząsteczce DNA określa się jako komplementarne (ryc. II-1). Różnice między cząsteczkami DNA pochodzącymi z odmiennych organizmów dotyczą topologii cząsteczki, sekwencji nukleotydów i długości łańcucha. W zależności od organizmu liczba nukleotydów w jednej cząsteczce DNA wynosi od  $10^5$  do  $10^{11}$  (ryc. II-2). Wzajemne zależności nukleotydów w DNA określa się stosunkiem A + T/G + C. Jest to wielkość charakterystyczna i stała dla DNA każdego organizmu.

Replikacja DNA jest procesem, który poprzedza podział komórki. W jej wyniku powstają kopie macierzystego DNA rozdzielane następnie do komórek potomnych. Odwzorowaniu podlega osobno każda z nici DNA. Replikacja jest katalizowana przez skomplikowany kompleks enzymatyczny, zawierający enzymy rozplatające helisę DNA (heli-kazy DNA), białka stabilizujące jednoniciowy DNA oraz co najmniej trzy różne polimerazy DNA. Te ostatnie enzymy powodują polikonden-



**Rycina II-3. Model semikonserwatywnej replikacji DNA.** W każdej rundzie replikacyjnej, poprzedzającej podział komórki, obie nici są wykorzystywane jako matryce do syntezy komplementarnego łańcucha. Powstająca w ten sposób podwójna helisa składa się zawsze z łańcucha starego i nowego, a przekazywany zapis informacji genetycznej nie ulega zmianie

sację deoksyrybonukleotydów na matrycy, którą są obie nici rodzicielskiego DNA. W wyniku replikacji prowadzonej zgodnie z zasadą komplementarności powstają więc dwie identyczne cząsteczki dwuniciowego DNA, z których każda zawiera nić starą (rodzicielską) i nić nową. Taki typ replikacji jest określany jako semikonserwatywny (*ryc. II-3*).

W organizmach eukariotycznych replikacja zachodzi z szybkością około 50 nukleotydów na sekundę. Jej swoistość jest przy tym bardzo duża. Jeden błąd zdarza się przeciętnie raz na  $10^6$  nowo wstawianych nukleotydów. Ewentualne błędy mogą być naprawiane już w czasie trwania replikacji przez same polimerazy DNA lub też przez specjalne wieloenzymatyczne systemy naprawcze. Większość pozostałych uszkodzeń jest naprawiana przed kolejną rundą replikacji DNA. Konsekwencją nienaprawionych błędów są mutacje prowadzące do zmiany w sekwencji DNA. Zmiany te są utrwalane w następnych rundach replikacyjnych.

### II.1.2. Odczytywanie informacji genetycznej

W DNA, w jego sekwencji nukleotydów, jest zakodowana informacja o strukturze i rodzaju białek, różnych klasach RNA oraz o właściwościach regulacyjnych genów. Odczytywanie informacji dotyczącej białek odbywa się w dwóch etapach. W pierwszym, zwanym transkrypcją, po rozpleceniu helisy, jednoniciowe fragmenty DNA są przepisywane na cząsteczki informacyjnego RNA (ang. messenger RNA, mRNA). W drugim etapie, translacji, sekwencje nukleotydowe mRNA zostają przetłumaczone na sekwencje aminokwasów. W procesie translacji jest niezbędny udział transferowych kwasów nukleinowych (tRNA) oraz rybosomów.

RNA, podobnie jak DNA, jest polimerem nukleotydów. Różnice w stosunku do DNA polegają na tym, że ryboza zastępuje deoksyrybozę, a uracyl (U) zastępuje tyminę (T). RNA występuje przeważnie w formie jednoniciowej. Przestrzennie jest to cząsteczka bardzo pofałdowana, choć w zasadzie nie tworzy długich struktur dwuniciowych, komplementarne fragmenty nici mogą się ze sobą łączyć.

W organizmach eukariotycznych synteza RNA odbywa się w obrębie jądra komórkowego. **Transkrypcji genów** kodujących białka dokonuje specyficzna polimeraza RNA, której w jądrze komórkowym jest około 40 000 cząsteczek. Łańcuch RNA jest syntetyzowany z rybonukleotydów na matrycy,

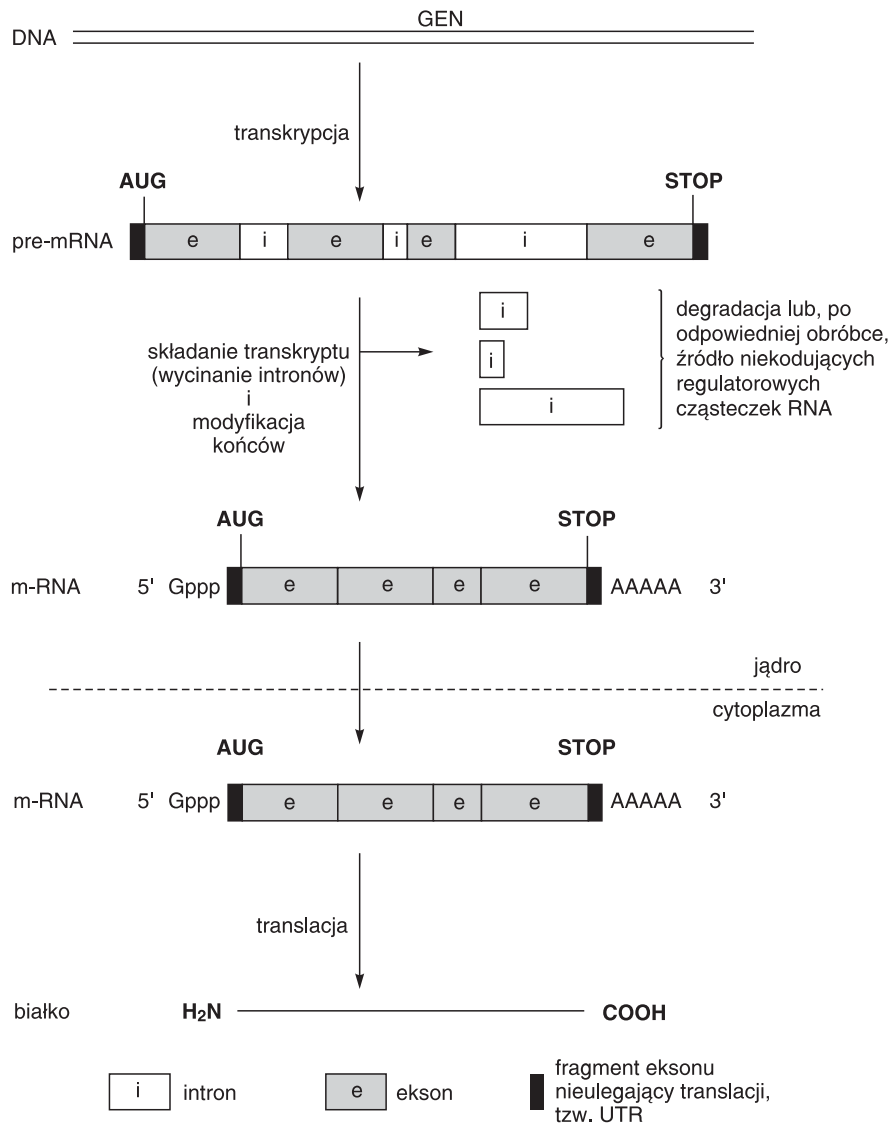
którą jest rozpleciony jednoniciowy fragment cząsteczki DNA. Naprzeciwko znajdujących się w DNA deoksyrybonukleotydów G, C, T, A, zgodnie z zasadą komplementacji, w nici RNA są wstawiane odpowiednio rybonukleotydy: C, G, A i U.

U organizmów eukariotycznych tylko w nielicznych przypadkach obserwuje się prostą zależność między sekwencją genu kodującego białko a sekwencją transkryptu. Sekwencja nukleotydów pierwotnego transkryptu (pre-mRNA) może być bowiem zmieniana w procesie dojrzewania RNA. Proces ten jest wieloetapowy i obejmuje różne typy modyfikacji transkryptu, składanie genów i niekiedy jego końcowe redagowanie.

W etapie **modyfikacji** zmianom ulegają oba końce transkryptu (*ryc. II-4*). Do końca 5' zostaje przyłączona 7-metyloguanozyna, tzw. czapeczka, a do końca 3', w większości znanych transkryptów (wyjątkiem są transkrypty genów kodujących białka histonowe), ogon złożony z poli(A). Rolą czapeczki jest zabezpieczenie transkryptu przed atakiem enzymów nukleolitycznych, ułatwienie transportu transkryptu z jądra do cytoplazmy. Czapeczka odgrywa również rolę w procesie wycinania intronów oraz w inicjacji translacji. Modyfikacja końców decyduje o stabilności i trwałości transkryptu. Usunięcie czapeczki, a także stopniowe odcinanie ogona poli(A) redukuje trwałość mRNA. Niekodująca część może nieść w sobie informacje o tkankowo specyficznej trwałości transkryptu. Modyfikacje końców zachodzą w jądrze komórkowym i odbywają się mniej więcej w tym samym czasie.

W przypadku genów kodujących białka, w procesie **składania transkryptu** (ang. splicing) z pre-mRNA są wycinane fragmenty zwane intronami. Pozostałe fragmenty – eksony są łączone ze sobą, a powstały w ten sposób mRNA zawiera ciągłą informację o strukturze peptydu, chociaż nie wszystkie eksony ulegają translacji.

Znanych jest kilka mechanizmów składania genów. Samowycinanie obserwuje się między innymi w genach mitochondrialnych. W jądrowych genach kodujących białka u *Eukaryota* w mechanizmie składania genów bierze udział wiele białek oraz specjalne klasy małych jądrowych RNA, zwanych snRNA. Odszukanie miejsca cięcia cząsteczki RNA jest ułatwione przez zachowanie na wszystkich stykach intron/ekson/intron takich samych lub bardzo podobnych sekwencji nukleotydów. Z reguły każdy intron zaczyna się od sekwencji GT, a kończy AG. Proces wycinania intronów jest nie-



Rycina II-4. Schemat ekspresji genu eukariotycznego kodującego białko

zwykle precyzyjny. Pominięcie lub zamiana nawet jednego nukleotydu w charakterystycznej sekwencji na styku intron/ekson czy ekson/intron jest równoznaczna z mutacją. Rolę we właściwym procesie wycinania przypisuje się tzw. miejscu rozgałęzienia (ang. branch site) znajdującemu się blisko końca każdego intronu.

Introny są różnej długości „wstawkami” w sekwencji genu. W liczącym np. 18 kbp genie pro- $\alpha$ -1 kolagenu znajduje się 50 różnej długości intronów. Stanowią one niekiedy znaczną część samego genu. Ponad 65% sekwencji genu insuliny to sekwencje intronowe. W genie kodującym polimerazę DNA introny stanowią 95% sekwencji genu. W genie *CFTR* jest ich 97,6%, a w genie *DMD* aż

99,4%. Introny, po wycięciu, mogą ulec degradacji albo po odpowiedniej obróbce być źródłem niekodujących regulatorowych cząsteczek RNA.

Dotychczas brak jest pełnej odpowiedzi na pytanie dotyczące funkcji sekwencji intronowych, a także tego, kiedy pojawiły się w trakcie ewolucji. Obecność intronów, ich wycinanie, wykorzystywanie alternatywnych miejsc składania genu oraz procesy tasowania czy duplikacji to mechanizmy, które obok powstawania mutacji sprzyjają tworzeniu się różnorodności molekularnej i powiększaniu zasobu informacji genetycznej.

Transkrypt, który nie przeszedł modyfikacji i obróbki, nie jest zdolny do przemieszczenia się z jądra do cytoplazmy, gdzie odbywa się właściwe

odczytanie zawartej w nim informacji genetycznej. Liczba transkryptów kodujących białka (ulegających ekspresji) stanowi jedynie niewielki procent transkryptomu. O funkcji regulatorowego RNA, szczególnie małych RNA, takich jak miRNA czy sRNA, wiemy coraz więcej, ale – jak się wydaje – w 2011 roku jesteśmy na początku drogi.

Na modyfikacji i obróbce transkryptu nie kończy się proces dojrzewania mRNA. Transkrypt może bowiem podlegać jeszcze **redagowaniu**. Proces ten został po raz pierwszy opisany dla transkryptów mitochondrialnych świdrowców, ale występuje również u roślin i zwierząt, w tym u człowieka. Wydaje się obecnie, że może on dotyczyć większej liczby transkryptów, niż wcześniej myślano. W czasie redagowania transkrypt wzbogaca się o poszczególne nukleotydy lub traci je. Proces ten zachodzi stopniowo od końca 3' do 5' i obejmuje różne części transkryptu. W wyniku redagowania mogą powstać nowe otwarte ramki odczytu, nowe miejsca startu translacji czy też sekwencje określające miejsce wycinania intronu. U świdrowców informacji niezbędnej do redagowania dostarczają krótkie, kilkudziesięcionukleotydowe tzw. naprowadzające RNA (ang. guide RNA, gRNA). Przypuszczalnie cząsteczki gRNA, stanowiąc matrycę, zgodnie z którą dokonuje się redagowanie transkryptu, współuczestniczą też w samym procesie enzymatycznej wymiany nukleotydów. Redagowanie mRNA jest jednym z mechanizmów regulacji ekspresji genów. Ponieważ proces ten zmienia się wraz ze stadium rozwoju czy z wiekiem, stopniowa utrata zdolności redagowania może być jedną z oznak starzenia się organizmu.

Cząsteczki kwasów nukleinowych i białek są złożone z jednostek uszeregowanych w łańcuchy. W przypadku DNA i RNA jednostkami tymi są nukleotydy, a w przypadku białek – aminokwasy. Istotą **kodu genetycznego** jest to, że sekwencja nukleotydów określa rodzaj i kolejność aminokwasów w białkach. **Kod genetyczny jest taki sam dla wszystkich organizmów żyjących na Ziemi.**

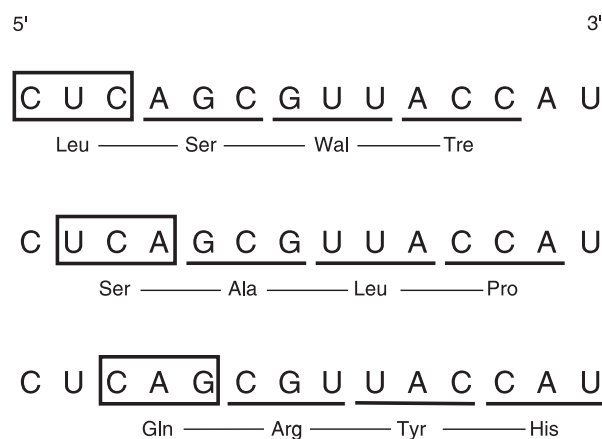
Informacja genetyczna jest cechą charakterystyczną danego organizmu i jest zawarta w DNA, dokładniej w nici kodującej. Do wyjątków należą jedynie niektóre typy wirusów przechowujące swoją informację genetyczną w RNA. W dalszym ciągu tego rozdziału sekwencje nukleotydów będą podawane zgodnie z tymi, jakie występują w RNA.

**Informacja genetyczna** jest zapisana w postaci trójek nukleotydów stanowiących podstawową jednostkę zwaną kodonem. Ponieważ cząsteczka

kwasu nukleinowego jest polimerem czterech różnych nukleotydów, to liczba możliwych trypletów (kodonów) wynosi 64 ( $4^3$ ) (patrz *ryc. XIV-1*). Spośród 20 aminokwasów wchodzących w skład białek większość jest więc kodowana przez więcej niż jeden tryplet. O takim kodzie mówi się, że jest zdegenerowany. Trzy spośród 64 trypletów: UAA, UAG i UGA nie kodują żadnego aminokwasu i sygnalizują koniec syntezy polipeptydu. Określane są one jako kodony stop lub nonsens.

Wśród trypletów należy wyróżnić trójkę AUG kodującą zwykle metioninę. Stanowi ona zazwyczaj początek zapisu informacji dla każdego białka. Właściwe jej rozpoznanie przez aparat translacyjny warunkuje prawidłowe odczytanie następujących po niej trypletów. Początkowy kodon AUG wyznacza więc trójkową ramkę odczytu (ang. open reading frame, ORF). Przesunięcie fazy w ramce o jeden lub dwa nukleotydy, np. w wyniku mutacji, prowadzi do zmiany sensu zapisu i powstania polipeptydu odmiennego, niż pierwotnie kodowany (*ryc. II-5*).

Właściwe rozszyfrowanie kodu genetycznego następuje w procesie **translacji**. Obok mRNA biorą w tym udział także cząsteczki tRNA i rybosomy. Cząsteczki tRNA spełniają rolę klucza umożliwiającego rozszyfrowanie kodu zawartego w strukturze mRNA. Rybosomy są organellami komórkowymi, zbudowanymi z białek i rybosomowego RNA (rRNA). W strukturze tej jest katalizowany proces biosyntezy białek (*tab. II-1*).



**Rycina II-5. Różne możliwości odczytu tej samej sekwencji nukleotydów.** Informacja zawarta w RNA jest odczytywana od końca 5' do końca 3' w postaci kodonów złożonych z trzech kolejnych nukleotydów. Rodzaj nukleotydów wchodzących w skład kodonu wyznacza określony aminokwas. Przesunięcie ramki odczytu kolejno o jeden nukleotyd prowadzi do otrzymania polipeptydów różniących się całkowicie składem aminokwasów, a często do przedwczesnej terminacji translacji



**Tabela II-1.** Budowa rybosomu eukariotycznego

|                                 | Białka            |      |                   |      |
|---------------------------------|-------------------|------|-------------------|------|
|                                 | Podjednostka duża |      | Podjednostka mała |      |
| Masa cząsteczkowa (w daltonach) | 28 000 000 (60S)  |      | 1 400 000 (40S)   |      |
| Liczba                          | ok. 49            |      | ok. 33            |      |
|                                 | rRNA              |      |                   |      |
|                                 | 5S                | 28S  | 5,8S              | 18S  |
| Masa cząsteczkowa               | 5S                | 28S  | 5,8S              | 18S  |
| Liczba nukleotydów              | 120               | 4700 | 160               | 1900 |

Ocenia się, że do prawidłowego przeprowadzenia procesu biosyntezy białek komórka eukariotyczna w czasie swojego życia musi wytworzyć około 10 milionów rybosomów. Zadanie to jest o tyle ułatwione, że w genomie człowieka znajduje się około 200 kopii genów kodujących rRNA. Geny te są zgrupowane w blokach w krótkich ramionach chromosomów 13, 14, 15, 21 i 22.

Synteza rRNA odbywa się w obrębie jąderka, wydzielonej struktury jądra komórkowego, do której wypętłają się fragmenty chromosomów kodujących zblokowane geny rRNA. W procesie syntezy rRNA, a następnie formowania się rybosomu uczestniczą inne specyficzne cząsteczki RNA – snRNA (ang. small nucleolus RNA). Przyjmuje się, że ułatwiają one przyjęcie przez rRNA odpowiedniej struktury przestrzennej i stopniowe obudowywanie jej białkami rybosomowymi.

Tworzenie łańcucha polipeptydowego odbywa się na rybosomie. Funkcja cząsteczek tRNA polega na odczytywaniu kodonów z mRNA oraz dostarczaniu aminokwasów odpowiednich dla tworzącego się polipeptydu. Odczytywanie sekwencji nukleotydów w mRNA jest rolą jednej z pętli cząsteczki tRNA. Wśród siedmiu nukleotydów wchodzących w jej skład trzy stanowią tak zwany antykodon. Sekwencja antykodonu jest komplementarna do trójki nukleotydów tworzącej kodon w mRNA.

Proces syntezy łańcucha polipeptydowego można podzielić na trzy etapy: inicjację, elongację i terminację. W czasie **inicjacji** dochodzi do stopniowego uformowania się kompleksu mRNA–rybosom–inicjatorowy tRNA. Inicjatorowym tRNA jest specyficzna cząsteczka przenosząca metioninę, której antykodon rozpoznaje na mRNA początkową trójkę AUG. Właściwa budowa i wydłużanie

**Tabela II-2.** Inhibitory hamujące transkrypcję lub translację

| Nazwa inhibitora    | Zakres działania |           | Miejsce działania  |
|---------------------|------------------|-----------|--|
|                     | Prokaryota       | Eukaryota |  |
| Tetracyklina        | +                |           | blokuje wiązanie naładowanego tRNA do miejsca A na rybosomie |
| Streptomycyna       | +                |           | hamuje inicjację syntezy białka                              |
| Chloramfenikol      | +                |           | blokuje transferazę peptydylową                              |
| Erytromycyna        | +                |           | blokuje przesuwanie się rybosomu po matrycy                  |
| Ryfampicyna         | +                |           | blokuje inicjację transkrypcji                               |
| Cykloheksamid       |                  | +         | blokuje transferazę peptydylową                              |
| $\alpha$ -Amanityna |                  | +         | blokuje syntezę mRNA   |
| Puromycyna          | +                | +         | prowadzi do przedwczesnej terminacji polipeptydu             |
| Aktynomycyna D      | +                | +         | wiążąc się do DNA, blokuje ruch polimerazy RNA               |

łańcucha polipeptydowego następuje w procesie **elongacji**. Aminokwasy dostarczane przez odpowiednie tRNA są dodawane jeden po drugim zgodnie z informacją wyznaczoną przez kolejne kodony w mRNA. Wiązanie peptydowe między aminokwasami powstaje z udziałem enzymu – transferazy peptydylowej, której katalitycznym komponentem jest rRNA. Proces elongacji powtarza się cyklicznie, a powstający polipeptyd wydłuża się. Sygnałem dla **terminacji** translacji jest sekwencja zasad zawierająca jeden lub kilka kodonów nonsens. Jak wspomniano wyżej, translacja rozpoczyna się zazwyczaj od trójki AUG kodującej metioninę. Nie oznacza to jednak, że wszystkie białka rozpoczynają się od tego aminokwasu, jest on bowiem zazwyczaj usuwany.

Chociaż proces odczytywania mRNA charakteryzuje się dużą specyficznością, zdarzają się jednak błędy. Szacuje się, że na skutek mutacji powstałych w genach kodujących tRNA i białka rybosomowe, jeden na 1000 do 10 000 aminokwasów jest podstawiony błędnie. Podczas lawinowego wręcz wytwarzania białek, odbywającego się równocześnie na wielu rybosomach, nie ma to istotnego znaczenia. Na przykład, w organizmie człowieka w ciągu sekundy jest wytwarzanych  $5 \times 10^{14}$  kopii hemoglobiny, białka składającego się z 574 aminokwasów.

Różnice w strukturze białek i RNA biorących udział w procesach transkrypcji i translacji u *Prokaryota* i *Eukaryota* są przyczyną różnic między innymi we wrażliwości na antybiotyki. Znalazło to szerokie zastosowanie w biologii i medycynie (*tab. II-2*). Umożliwia bowiem wybiórcze hamowanie rozwoju jednych organizmów bez ingerencji w rozwój innych.

Wyjaśnienie mechanizmu transkrypcji stwarza nowe możliwości specyficznej ingerencji w proces jej regulacji. Poznanie w ciągu najbliższych lat białek uczestniczących w procesie transkrypcji określonych genów to nadzieja na produkcję nowej generacji leków do walki z nowotworami, chorobami serca, układu odpornościowego, a także infekcjami wirusowymi.

### II.1.3. Regulacja ekspresji

Regulacja ekspresji, regulacja działania genów i ich produktów zachodzi w komórce zarówno na poziomie DNA, RNA, jak i białka. U *Prokaryota* system inicjacji transkrypcji obejmuje zasadniczo jeden fragment genu, położony w sąsiedztwie części kodującej, nazywany promotorem. Polimeraza RNA

wiąże się do DNA i rozpoczyna transkrypcję od promotora, a regulacja działania genu – liczba powstających transkryptów jest funkcją liczby przyłączanych do niego cząsteczek polimerazy. Polimeraza rozpoznaje sekwencje promotorowe genu dzięki podjednostce „sigma”.

Eukariotyczny promotor składa się z kilku części regulatorowych. Miejsce startu transkrypcji poprzedza promotor rdzeniowy pełniący rolę podobną do promotora bakteryjnego. W obrębie części rdzeniowej występuje najczęściej sekwencja bogata w pary AT (TATA-box) oraz sekwencja CAAT (CAAT-box). Inne sekwencje regulacyjne są umiejscowione poza rdzeniem promotora. Należą do nich: wzmacniacze (ang. enhancers) i wyciszacze (ang. silencers). Regiony regulacyjne mogą być położone w znacznej odległości, niekiedy nawet kilku tysięcy nukleotydów, od części kodującej genu. Rozpoczęcie procesu transkrypcji, jego szybkość i czas trwania są regulowane przez białkowe czynniki transkrypcyjne przyłączające się do sekwencji regulatorowych. U *Eukaryota* sekwencja promotora nie jest bezpośrednio rozpoznawana przez polimerazę, lecz przez wspomniane czynniki transkrypcyjne. Zapoczątkowywany jest w ten sposób kompleks transkrypcyjny, który obok polimerazy RNA, składa się z około 50 różnych białek. Znajdują się w nim białka rozpoznające sekwencję TATA, specyficzne aktywatory, represory spowalniające transkrypcję itp. Eukariotyczna „sigma” jest więc kompleksem białkowym.

Opisanemu systemowi regulacji transkrypcji nie podlega pewna klasa genów, zwanych genami metabolizmu podstawowego (ang. housekeeping genes), których produkty są niezbędne do ciągłego przebiegu procesów życiowych komórki. W genach tych polimeraza rozpoczyna transkrypcję od sekwencji bogatej w pary GC rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny SP1.

System regulacji działania genów może mieć strukturę hierarchiczną. Najbardziej jest to widoczne w procesach genetycznej regulacji różnicowania się organizmów tkankowych. Każdy organizm zwierzęcy powstaje z pojedynczej, zapłodnionej komórki jajowej, która dzieląc się wielokrotnie, różnicuje się, tworząc w pełni ukształtowany organizm złożony z odmiennych i różnie umiejscowionych tkanek. Jak się wydaje, geny kierujące procesem różnicowania (np. geny homeotyczne) są podobne zarówno u bezkręgowców, jak i kręgowców. Prawidłowa funkcja genów homeotycznych polega na przypisaniu komórkom, znajdującym się w różnych częściach tworzącego się organizmu,

określonej przestrzennej orientacji. Wydaje się, że liniowy porządek występujących w blokach genów homeotycznych (od 5' do 3') odpowiada osiowemu porządkowi różnicującego się organizmu (typu głowa–ogon). Produktami genów homeotycznych są białka wiążące się z DNA, uczestniczące w procesie regulacji genów.

O ile opisywane mechanizmy regulacji transkrypcji dotyczyły konkretnych genów czy też ich fragmentów regulatorowych, o tyle metylacja DNA nie jest tak specyficzna. Dotyczy bowiem sekwencji występujących w genomie bardzo często. Może więc dotyczyć regulacji grupy genów, a nawet całego chromosomu (inaktywacja jednego z chromosomów X). Metylacja zaliczana jest do tzw. mechanizmów epigenetycznych, terminu stworzonego początkowo jedynie dla tej części regulacji, która jest związana z rozwojem zarodka. Proces metylacji/demetylacji DNA jest powiązany z innymi regulacyjnymi mechanizmami epigenetycznymi, takimi jak np. acetylacja/deacetylacja histonów, w wyniku którego następują zmiany struktury chromatyny, co umożliwia lub blokuje aktywność transkrypcyjną poszczególnych fragmentów chromosomów.

Po zakończeniu translacji wiele białek przechodzi swoistą potranslacyjną modyfikację, polegającą między innymi na metylacji, fosforylacji lub glikozylacji cząsteczki. Liczne białka są syntetyzowane w formie prekursorów. W tym przypadku modyfikacja polega na odcięciu fragmentu peptydu. Potranslacyjna modyfikacja może mieć również charakter swoistego procesu składania białka, analogicznego do składania RNA. Wykazano, że niektóre peptydy mają zdolność autokatalitycznego usuwania ze swojej struktury fragmentów zwanych inteinami (analogia do intronów). Trudno powiedzieć, jak powszechny jest to proces i jakie funkcje pełnią w komórce inteiny. Niewątpliwie proces składania białka zwiększa różnorodność produktów kodowanych przez dany gen.

Prawidłowa funkcja białka jest związana z przyjęciem odpowiedniej struktury drugo- i trzeciorzędowej. Do niedawna panowało przekonanie, że pełna informacja o prawidłowym pofałdowaniu białka jest zawarta w sekwencji nukleotydów kodujących odpowiednie aminokwasy. Mówiono nawet o drugim kodzie genetycznym. Okazało się jednak, że do przyjęcia właściwej konformacji niezbędna jest obecność specyficznej klasy białek. Wśród nich wyróżnia się enzymy katalizujące fałdowanie oraz białka opiekuńcze (towarzyszące) (ang. cha-

perone). Opisano kilka klas tych białek. Białka opiekuńcze ułatwiają właściwe fałdowanie innych białek, ale nie jest to proces aktywny. Nie towarzyszy mu powstawanie wiązań kowalencyjnych, białka te nie wchodzi również w skład fałdujących się polipeptydów. Białka opiekuńcze biorą udział także we wszystkich etapach metabolizmu komórkowego, w ochronie przed stresem (np. podwyższeniem temperatury), a także w „naznaczaniu” białek przeznaczonych do degradacji. Charakteryzują się między innymi dużą konserwatywnością sekwencji aminokwasów.

Swoistym mechanizmem regulacji ekspresji genu jest tzw. wyciszanie. Wyciszanie ekspresji danego genu może się dokonać poprzez degradację transkryptu, blokowanie translacji lub indukcję mechanizmów epigenetycznych takich jak metylacja DNA.

### II.1.3.1. Wyciszanie ekspresji genu

Jedną z postaci potranskrypcyjnego mechanizmu wyciszenia ekspresji genów jest nazywana interferencją RNA (ang. RNA interference, RNAi). Szczególną rolę w tym procesie pełni klasa cząsteczek RNA zaliczanych do niekodującego RNA (niekodujących białek) (ang. noncoding RNA, ncRNA).

Na etapie transkrypcji regulacja ekspresji odbywa się poprzez degradację transkryptu. W procesie tym uczestniczą tzw. siRNA (ang. small interfering RNA). siRNA to dwuniciowy RNA o wielkości 21–23 nukleotydów, który powstaje w wyniku cięcia długich dwuniciowych fragmentów RNA przez RNazy specyficzne wobec tego typu cząsteczek. W kompleksie z białkami siRNA rozplata się i teraz już jednoniciowy RNA łączy się z komplementarnymi fragmentami transkryptu. Uruchomiony proces degradacji transkryptu zostaje ostatecznie dokonany przez specjalny kompleks białkowy.

W blokowaniu translacji uczestniczą inne cząsteczki niekodującego RNA. Są nimi miRNA. W odróżnieniu od siRNA, miRNA, chociaż jednoniciowy, tworzy struktury komplementarne. Proces blokowania translacji polega na połączeniu wraz z kompleksem białkowym z nieulegającym translacji końcem 3' transkryptu (3' UTR) i nie jest aż tak specyficzny, jak komplementacja siRNA. miRNA powstaje również z większych prekursorowych cząsteczek RNA. Na terenie cytoplazmy przyjmują one strukturę „spinki do włosów”. Wykazano, że siRNA i miRNA często współuczestniczą w wyciszaniu genów.



Ewolucyjnie mechanizm RNAi rozwinął się jako jeden z elementów obrony przed infekcją wirusową, również jako mechanizm eliminujący rearanżacje genomu związane z przemieszczaniem się transpozonów. Jak się wydaje, poza wyciszaniem ekspresji genów RNAi może również odgrywać rolę w degradacji transkryptów zawierających przedwczesny kodon terminacji translacji (ang. nonsense-mediated decay, NMD).

Przykładem wyciszenia ekspresji poprzez indukcję procesów epigenetycznych jest proces inaktywacji jednego z chromosomów X u kobiet. Proces ten jest sterowany przez gen XIST zlokalizowany na nieaktywnym transkrypcyjnie chromosomie X. Produktem tego genu jest specyficzny ncRNA, którego powstanie zapoczątkowuje proces inaktywacji innych genów na tym chromosomie.

### II.1.3.2. Piętnowanie genomowe

Informacja genetyczna u człowieka jest sumą informacji przekazanych przez matkę i ojca. Komórki naszego organizmu są diploidalne. Stwierdzenie to w pełni odnosi się jednak tylko do kobiet. Tylko u kobiet bowiem każdy z alleli ma swój odpowiednik (22 pary autosomów i dwa chromosomy X). U mężczyzn występowanie dwóch różnych chromosomów płci (X i Y) powoduje, że większość genów kodowanych na tych chromosomach ulega monoallelicznej ekspresji. Monoalleliczna ekspresja występuje często w przypadku *loci* autosomalnych, gdy z dwóch alleli danej pary tylko jeden ulega ekspresji. Ewolucyjnie musiał więc powstać mechanizm równoważący dawkę genu. Takim mechanizmem jest piętnowanie genomowe (ang. genomic imprinting). Mechanizm ten nie jest związany ze zmianą sekwencji DNA, ma więc charakter epigenetyczny i potencjalnie dotyczy odwracalnych modyfikacji DNA. Mechanizm wyciszenia alleli w piętnowaniu genomowym polega z reguły na metylacji fragmentu DNA. Piętnowanie może mieć charakter losowy, jak u kobiet w przypadku inaktywacji jednego z chromosomów X, lub rodzicielski (ang. parental genomic imprinting), gdy wykluczanie poszczególnych alleli jest uzależnione od ich ojcowskiego bądź matczyńskiego pochodzenia.

Zależna od pochodzenia rodzicielskiego ekspresja genów odgrywa decydującą rolę w rozwoju i różnicowaniu zarodka. Ten typ modyfikacji prowadzi do funkcjonalnej asymetrii między matczynym i ojcowskim genomem. Jedną z możliwych funkcji rodzicielskiego piętnowania genomowego może być zapobieganie homozygotyczności, np.

partenogenezie. Udane próby klonowania zwierząt dowodzą jednak, że bariery narzucone przez piętnowanie mogą być eksperymentalnie przezwyciężane.

Wzór piętnowania (metylacji) jest specyficzny dla komórki rozrodczej (inny dla plemnika, inny dla komórki jajowej) i jego przekazywanie następuje w czasie podziału komórki (pamięć komórkowa). Po zapłodnieniu, we wczesnym etapie po powstaniu zarodka (na etapie moruli), wzór metylacji jest wymazywany, a następnie nadawany ponownie w czasie implantacji. Jest tkankowo specyficzny, a jego regulacja – demetylacja/metylacja odgrywa również ważną rolę w rozwoju osobniczym.

Mimo znanego od wieków faktu, że muł – krzyżówka ogiera z oślicą fenotypowo różni się od osłomuła – krzyżówki osła z kobyłą, do czasu opisanego zjawiska rodzicielskiego piętna genomowego równocześnieść informacji genetycznej otrzymywanej od matki i od ojca, poza różnicami dotyczącymi chromosomów płci, do niedawna nie była kwestionowana. Uważano również, że w przypadku dowolnej mutacji jej skutki fenotypowe są niezależne od tego, od którego z rodziców została odziedziczona. Wzór piętna genomowego może ulec zmianie w wyniku mutacji w rejonach regulatorowych piętnowanych genów lub np. w genach kodujących enzymy modyfikujące DNA (metylaza/demetylaza). Mechanizmem molekularnym ujawniającym, które geny, fragmenty chromosomów, podlegają piętnowaniu, może być delecja fragmentu DNA na ulegającym ekspresji rodzicielskim chromosomie lub jednorodzicielska disomia (dziedziczenie obu kopii *locus* genetycznego od jednego z rodziców).

Uważa się, że brak ekspresji informacji genetycznej w określonych *loci* pochodzenia ojcowskiego jest odpowiedzialny za następujące zespoły wad genetycznych człowieka: Pradera–Willego (chromosom 15q), kociego krzyku (5p), Millera–Diekera (17p), Wolfa–Hirschhorna (4p) czy Beckwitha–Wiedemanna (11p). Brak ekspresji w określonym *locus* informacji pochodzenia matczyńskiego jest odpowiedzialny za występowanie zespołów Angelmana (15q), Di George’a (22q) czy zespołu włosowo-nosowo-palczkowego typu II (ang. trichorhino-phalangeal syndrome) (8q). Defekt w piętnowaniu genomowym wykazano także w wielu chorobach nowotworowych, w tym dotyczących ekspresji niektórych onkogenów.

**Tabela II-3.** Wielkość niektórych genów człowieka kodujących białka\*

| Produkt genu                | Wielkość (kbp) | mRNA (kbp) | Liczba eksonów |
|-----------------------------|----------------|------------|----------------|
| $\alpha$ -Globina           | 0,8            | 0,5        | 3              |
| $\beta$ -Globina            | 1,5            | 0,6        | 3              |
| Pro- $\alpha$ 1 kolagen I   | 18             | 5,0        | 51             |
| Albumina                    | 25             | 2,1        | 14             |
| Receptor LDL                | 45             | 5,5        | 18             |
| Hydroksylaza fenylalaninowa | 90             | 2,4        | 12             |
| Czynnik VIII                | 186            | 9,0        | 26             |
| CFTR                        | 250            | 6,5        | 27             |
| Neurofibromina              | 350            | 12,0       | 60             |
| Dystrofina                  | 2000           | 16,0       | 79             |

\* Informacje o genach człowieka są zgromadzone w bazie danych np.: (<http://www.ensembl.org/index.html>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome>).

#### II.1.4. Gen

Kolejnym etapom rozwoju genetyki towarzyszyły różne definicje genu. Trudno jest obecnie podać prosty opis, w którym jest zawarta pełna wiedza, jaką na ten temat posiadamy. Najogólniej gen to fragment kwasu nukleinowego, DNA lub RNA (jak to jest u niektórych wirusów), w którym jest zapisana informacja o kodowanym produkcie. W swej strukturze gen obok fragmentów kodujących (eksonów) (*tab. II-3*) może zawierać elementy niekodujące, takie jak promotor czy introny.

W zasadzie jeden gen koduje jeden produkt, chociaż i od tej zasady znanych jest wiele odstępstw. Przykładem może być kodowanie różnych produktów z wykorzystywaniem odmiennych faz w tej samej ramce odczytu lub też kodowanie drugiego produktu w intronie danego genu. Geny mogą kodować informacje o RNA (np. tRNA, rRNA, snRNA) lub za jego pośrednictwem o białku.

Istnieją także wyjątki od zasady, że gen zajmuje zawsze stałe miejsce w chromosomie. Tak zwane transpozony, czyli fragmenty DNA mające zdolność przemieszczania się po chromosomie, liczą niekiedy kilka tysięcy par nukleotydów i mogą kodować różne geny. Skutkiem „nieuprawnionego” włączenia się transpozonu w chromosom może być inaktywacja genu, a także jego zwielokrotniona i wyzwolona spod kontroli ekspresja. Inny przykład zmienności struktury genów jest związany z procesem różnicowania się limfocytów. Sposób

powstawania ogromnej liczby specyficznych przeciwciał został wyjaśniony, gdy okazało się, że układ segmentów, z których są składane geny kodujące przeciwciała, może ulegać różnym przekształceniom. Prowadzi to w konsekwencji do zmian w zapisie genetycznym w komórkach układu odpornościowego, czyli zmian w strukturze genu.

Wielkość genu może również ulegać pewnym modyfikacjom. W sekwencji nukleotydów genu *FMRI*, którego defekt prowadzi do jednej z postaci niedorozwoju umysłowego (zespół FraX), można wyróżnić od 6 do 54 powtórzeń trójki nukleotydów CGG. Zmienność ta ma charakter populacyjny, a jej mechanizm nie jest w pełni wyjaśniony.

Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat zmieniły się poglądy co do liczby genów w genomie człowieka. Do końca 1995 roku znane były sekwencje (sekwencje eksonowe i flankujące je sekwencje intronów) około 5000 genów człowieka. Oceniano, że do zakodowania informacji genetycznej o podstawowych białkach potrzeba około 80 tysięcy genów. Wyniki sekwencjonowania chromosomu 21 i 22 podały w wątpliwość te szacunki. Ekstrapolując „nasylenie” genami stwierdzone dla tych chromosomów, odpowiednio 225 i 545, należało przyjąć, że w genomie człowieka znajduje się łącznie około 40 tysięcy genów. Dane te byłyby zgodne z wynikami określającymi liczbę genów na podstawie liczby tych fragmentów genomu, które służą jako matryce do wytwarzania RNA. Wydawało się jednak, że chromosomy 21 i 22 charakteryzują

się małą liczbą kodowanych genów. Wskazywać na to mogło np. zagęszczenie genów kompleksu MHC na chromosomie 6. Ostatecznie na podstawie ogłoszonych (2001 r.) wyników roboczej wersji sekwencji genomu, uzyskanych w ramach połączonych wysiłków HUGO i organizacji prywatnych, przyjmuje się, że całkowita liczba genów kodujących białka wynosi około 25 tysięcy.

**Z dogmatów obowiązujących w biologii pozostało niewiele. Nadal uważa się, że informacja o strukturze białek zakodowana jest w kwasach nukleinowych. Kierunek przekazywania informacji odbywa się więc od kwasów nukleinowych do białek, a nie odwrotnie. Trójkowy kod genetyczny jest kodem uniwersalnym, obowiązującym w całym świecie ożywionym. Różnice występują jedynie w zapisie genetycznym. W niektórych organizmach, a także w mitochondriach drożdży i ssaków wykazano bowiem, że określone kodony wyznaczają inne aminokwasy, niż to jest zazwyczaj. Jednak i w tych przypadkach, jak się wydaje, proces redagowania transkryptów przywraca zasady uniwersalnego kodu genetycznego. Uniwersalność kodu genetycznego oznacza, że wszystkie żyjące organizmy pochodzą od wspólnego przodka.**

### II.1.5. Świat RNA

RNA, od początku gdy tworzyły się podstawy wiedzy o kodowaniu i ekspresji genów, był obecny we wszystkich rozważaniach. Jego rolę ograniczano jednak tylko do pośredniczenia w przekazywaniu informacji. Widziano w nim głównie matrycę do syntezy białka. Już wtedy jednak RNA niekodujący zaznaczył swoją obecność chociażby w postaci tRNA i rRNA.

Z pewnym zaskoczeniem odkryto zdolności katalityczne niektórych cząsteczek RNA. Rybozomy to termin, którym określono RNA wykazujący aktywność enzymatyczną. Może być ona skierowana na własną cząsteczkę (autokataliza) lub na inne cząsteczki RNA. Niekiedy kompleks enzymatyczny jest tworzony łącznie ze specyficznymi białkami. Autokatalityczną aktywność wykazują małe wirusy RNA. Samowycinanie jest cechą pewnej klasy intronów, zachodzi też ono w czasie redagowania RNA. Funkcje w tworzeniu wiązań peptydowych przypisuje się RNA związanemu z białkami w takim kompleksie, jakim jest rybosom.

Rola, jaką obecnie przypisuje się RNA, a dokładniej ncRNA, odmieniła się radykalnie. ncRNA

nie stanowi jednolitej grupy cząsteczek ani pod względem funkcji, ani wielkości, ale udowodniono jego udział w takich procesach, jak regulacja transkrypcji, replikacja DNA, składanie RNA, jego modyfikacja i edycja, stabilizacja transkryptu oraz w procesach translacji i degradacji białek. Możliwość komplementacji nici kwasów nukleinowych jest bowiem mechanizmem dużo bardziej precyzyjnym niż oddziaływania kwasy nukleinowe–białka. W tej sytuacji nie dziwi wysoki stopień konserwatywności genomu w części kodującej ncRNA.

Jak wspomniano wcześniej, ncRNA jest wysoce heterogenną klasą cząsteczek zarówno funkcjonalnie, jak i strukturalnie. ncRNA kodowany jest głównie w części genomu nie tak dawno określanej mianem DNA śmieciowego. ncRNA działa z reguły w kompleksie z białkami. Być może było to powodem niedostrzegania roli RNA. Szereg metod umożliwiających zarówno identyfikację, jak i badanie funkcji białek zakłada bowiem na wstępie całkowitą ekstrakcję kwasów nukleinowych. Uczestnicząc u *Eukaryota* w procesie składania transkryptów (wycinaniu intronów), RNA mógł odegrać rolę w procesach różnicowania sekwencji, a więc i jej ewolucji.

Życie na Ziemi powstało około 3,5 miliarda lat temu. Jak się wydaje, warunkiem jego powstania było uzyskanie przez pierwotne organizmy zdolności do powielania własnej informacji genetycznej. O ile w laboratorium można odtworzyć warunki pradawnej atmosfery ziemskiej i powstawanie w niej określonych związków organicznych, o tyle brak jest w dalszym ciągu przekonujących koncepcji, czym był pierwotny materiał genetyczny i jakie były zasady jego replikacji. Pierwotny system replikacji mógł mieć charakter nieorganiczny. Raczej nie był oparty na białkach, bo nie mają one zdolności do replikacji. Wielu uczonych uważa, że taką pierwotną cząsteczką niosącą informację genetyczną, a jednocześnie mającą funkcje katalityczne był RNA. Zgodnie z tą hipotezą DNA, obecnie powszechnie kodujący informację genetyczną, jako cząsteczka stabilniejsza jest kolejnym, po RNA, etapem w ewolucji informacji genetycznej. Niezależnie jednak od tego, jaki był pierwszy system kodowania i powielania informacji genetycznej, od czasu jego powstania należy datować życie na Ziemi.

## II.2. Genom człowieka

Informacja genetyczna człowieka jest zapisana w genomach jądrowym i mitochondrialnym. Genom mitochondrialny jest zamknięty w kolistej

cząsteczce DNA, a jego wielkość stanowi około 0,0005% genomu jądrowego. Genom jądrowy liczy ponad 3 miliardy nukleotydów i jest podzielony na 24 chromosomy. Genomy jądrowy i mitochondrialny różnią się nie tylko umiejscowieniem w komórce, wielkością, liczbą i rodzajem kodowanych genów, ale podlegają również odmiennym zasadom dziedziczenia. Informacje o genomie mitochondrialnym zamieszczono w rozdziałach opisujących zasady dziedziczenia, choroby mitochondrialne i analizę DNA w medycynie sądowej.

### II.2.1. Genomika

Początek lat dziewięćdziesiątych XX wieku przyniósł decyzje dotyczące pełnego poznania genomu człowieka. Ten światowy program był koordynowany przez Human Genome Organization (HUGO). Skalę przedsięwzięcia, na tamte lata, mogą zobrazować następujące informacje. Do końca 1997 roku tylko dla kilku bakterii, w tym: *M. genitalium* (0,58 Mpz), *Haemophilus influenzae* (1,83 Mpz), *Methanococcus jannaschii* (2 Mpz), *Staphylococcus aureus* (2,8 Mpz), udało się poznać pełną genomową sekwencję nukleotydów. W genomie *M. genitalium* zidentyfikowano 517 genów, w genomie *H. influenzae* 1743, a w *S. aureus* – 2400. W porównaniu z tymi organizmami genom człowieka jest większy o trzy rzędy wielkości (tab. II-4)<sup>1</sup>, a liczbę kodowanych w nim genów szacuje się na około 25 tysięcy.

Przyspieszenie prac nad sekwencjonowaniem genomu ludzkiego było związane z zaangażowaniem kapitału prywatnego. Do 1995 roku w ludzkich bankach genów znajdowało się niespełna 12 Mpz sekwencji nukleotydowych, co stanowi około 0,4% całego genomu. Tylko 19 spośród znanych sekwencji DNA miało większą długość niż

50 kpz. Postęp dokonany w ciągu 1996 roku był stosunkowo niewielki. Znana była sekwencja około 1% genomu. W 1999 roku znanych już było 188,9 Mpz, co stanowiło 6,3% całego genomu. W 2000 roku opublikowano prawie pełną sekwencję dwóch najmniejszych chromosomów człowieka: 21 i 22. Zapowiedziano opublikowanie sekwencji DNA chromosomów 5, 16 i 19. Podano również informację o zakończeniu prac nad roboczą wersją genomu.

Ustalony zapis rodzaju i kolejności nukleotydów w cząsteczce ludzkiego DNA miał charakter modelowy. Można się spodziewać, że w krótkim czasie po 2010 roku sekwencja nukleotydów w genomowym DNA będzie znana dla setek osób. Poznanie rodzaju i zakresu istniejących różnic umożliwi między innymi pełną charakterystykę genomu: określenie dodatkowych markerów genetycznych przydatnych w mapowaniu genów, w badaniach z zakresu patologii molekularnej i w badaniach prognostycznych. W ramach tego typu projektów przewiduje się podjęcie systematycznych badań grup etnicznych i populacji izolowanych.

Rok 2000 zaowocował opublikowaniem sekwencji genomowej 30 organizmów, w tym nicienia *Caenorhabditis elegans* (97 Mpz) i rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana* (125 Mpz). W 2005 roku poznaliśmy między innymi sekwencję genomu psa i szympansa. W 2010 roku znane już były genomy ponad 200 organizmów (<http://www.genomesize.com/>), w tym 25 samych tylko różnych gatunków ssaków. ([http://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_sequenced\\_eukaryotic\\_genomes](http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_sequenced_eukaryotic_genomes)). Poznaliśmy również genom neandertalczyka.

Wynikiem identyfikacji sekwencji kolejnych genomów towarzyszy napływ olbrzymiej ilości informacji. Częściową odpowiedzią na konieczność przetwarzania napływających danych są zarówno

Tabela II-4. Liczba genów kodujących białka u różnych organizmów

| Gatunek                         | Wielkość genomu<br>× 10 <sup>6</sup> pz | Liczba<br>chromosomów | Średnia wielkość<br>genu (kpz) | Liczba genów |
|---------------------------------|---|-----------------------|--------------------------------|--------------|
| <i>Escherichia coli</i>         | 4,63                                    | 1                     | 1,2                            | 3025         |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 14                                      | 16                    | 1,7                            | 6702         |
| <i>Drosophila melanogaster</i>  | 170                                     | 8                     | 11,3                           | ok. 13 000   |
| <i>Homo sapiens</i>             | 3000                                    | 46                    | 16,3                           | ok. 25 000   |

<sup>1</sup> Pierwszym genomem, jaki w pełni zsekwencjonowano, był liczący 5386 pz chromosom bakteriofaga  $\Phi$  X174 (1977 r.), kolejnym był złożony z 48 502 pz genom bakteriofaga  $\lambda$  (1982 r.).



nowe technologie, jak i powstanie odrębnej gałęzi genetyki molekularnej, jaką jest genomika. Genomika porównawcza już obecnie przynosi odpowiedź na szereg podstawowych pytań z zakresu ewolucji genomu, pochodzenia i roli poszczególnych genów. Celem genomiki funkcjonalnej jest badanie nie tyle funkcji danego genu, ile organizacji i kontroli dróg metabolicznych odpowiadających za biochemię i fizjologię komórki. Oznacza to równocześnie badanie ekspresji wielu genów na poziomie tworzonych transkryptów (analiza transkryptomu). Kompleksowymi badaniami ekspresji białek i ich wzajemnych oddziaływań zajmuje się, z kolei, proteomika. Nie sposób w tym kontekście nie wymienić bioinformatyki, a także badań *in silico*, które same w sobie stanowią wydzieloną dziedzinę umiejętności.

## II.2.2. Struktura genomu

Początkowe trudności w sekwencjonowaniu genomu człowieka odzwierciedlały w pewnym stopniu zróżnicowanie jego struktury (tab. II-5). Szczególnie poznanie długich powtarzających się sekwencji nukleotydów, niezależnie od przyjętej strategii sekwencjonowania, odwlekło moment opublikowania pierwszego pełnego zapisu informacji genetycznej.

Sekwencje unikatowe, wśród których znajdują się geny kodujące białka, stanowią jedynie około 1,5% całego genomu. Sekwencje te to swoistego

rodzaju wyspy w morzu sekwencji tylko częściowo znanej funkcji. Rzadko spotyka się zgrupowania genów, takich jak np. kodujące rybosomowy RNA. Geny te występują bowiem w blokach w pięciu różnych chromosomach człowieka.

Sekwencje powtórzone, to znaczy występujące w genomie w wielu kopiach, charakteryzują się określoną wielkością, rodzajem i układem nukleotydów. Stanowią one około 40% genomu. Sekwencje te z reguły nie kodują białek. Wyróżnia się wśród nich sekwencje rozproszone i sekwencje tandemowe (ryc. II-6).

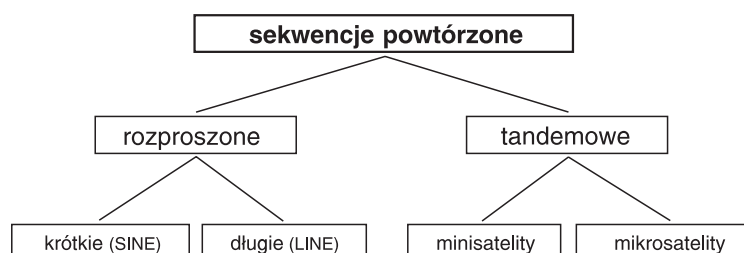
Sekwencje rozproszone dzieli się z kolei na sekwencje krótkie i długie. Sekwencje krótkie (ang. short interspersed nuclear element, SINE) o długości 130–300 nukleotydów są rozproszone w tysiącach kopii w całym genomie. Na przykład sekwencja Alu o długości około 300 nukleotydów jest „porozrzucana” po genomie w 1 milionie kopii. Sekwencja ta, zaliczana niekiedy do transpozonów, czyli elementów zdolnych do przemieszczania się po genomie, stanowi łącznie około 10% całego genomu. Jej występowanie jest charakterystyczne dla naczelnych i, jak się wydaje, może być podatna na redagowanie RNA. Sekwencję Alu zlokalizowano również w intronach genów kodujących  $\alpha$ - i  $\beta$ -globinę, hormon wzrostu czy apolipoproteinę B. W liczącym 17 kpb genie inhibitora C1 (mutacje tego genu są odpowiedzialne za dziedziczny obrzęk naczynioruchowy) zlokalizowano aż 17 sekwencji Alu.

Długie sekwencje rozproszone (ang. long interspersed nuclear element, LINE) o wielkości około kilku tysięcy nukleotydów reprezentują, podobnie jak sekwencja Alu, klasę sekwencji pochodzących od transpozonów. Szacuje się, że stanowią one około 20% genomu.

Sekwencje tandemowe, nazywane również satelitarnymi, to zblokowane seryjne powtórzenia krótkiej sekwencji nukleotydów. Dzieli się je na minisatelity i mikrosatelity, które różnią się między sobą liczbą nukleotydów zawartych w powtarza-

Tabela II-5. Struktura genomu człowieka

| Typ sekwencji                    | Część genomu (%) |
|----------------------------------|------------------|
| Unikatowe (geny kodujące białka) | ~1,5             |
| Geny RNA                         | ~4               |
| Powtórzone                       | ~45              |
| Inne                             | ~50              |



Rycina II-6. Rodzaje sekwencji powtórzonych

jącym się motywie. Nazwa sekwencji satelitarne pochodzi od jednorodnej (satelitarnej) frakcji DNA obserwowanej w gradientach gęstości w czasie frakcjonowania genomowego DNA.

Minisatelity to bloki wielokrotnych, zblokowanych kopii, w których powtarzający się motyw zawiera od 10 do 100 nukleotydów. Szacuje się, że w genomie człowieka znajduje się kilka tysięcy *loci* dla minisatelitów. Występują one w obrębie genów, takich jak: gen insuliny, kolagenu typu II, mieliny, apolipoproteiny,  $\alpha$ -globiny oraz w specyficznych *loci* zlokalizowanych poza genami struktury. Niektóre sekwencje powtórzone ulegają transkrypcji, brak jednak dowodu na ich ekspresję. Wyjątkiem jest nadzmienny *locus MUC1*, który koduje wysoce polimorficzną mucynę. Biologiczna funkcja minisatelitarnego DNA nie jest znana. Jedna z hipotez mówi, że ze względu na położenie sekwencji te mogą mieć znaczenie w tworzeniu par chromosomów homologicznych i rekombinacji. Sekwencjom powtórzonym przypisuje się również wpływ na strukturę chromosomów, trwałość transkryptów oraz udział w regulacji ekspresji genów. Spośród sekwencji minisatelitarnych rekrutują się tzw. sondy Jeffreya wykorzystywane, kilkanaście lat temu, w badaniu pokrewieństwa członków danej rodziny.

Mikrosatelity to sekwencje tandemowe, w których podstawowy motyw zawiera od 1 do 6 nukleotydów i powtarza się w pojedynczym *locus* od 5 do 100 razy. Mikrosatelity są rozłożone równomiernie co 6–10 kbp, również w obszarach zajmowanych przez geny. Pięć grup powtórzeń mono-, di-, tri- i pentanukleotydowych (A > AC > AAAN > AAN > AG, gdzie N oznacza C, G, T) występuje najczęściej i stanowi 76% znanych sekwencji mikrosatelitarnych. W genach najczęściej umiejscowione są w sekwencjach flankujących i intronach, chociaż są spotykane również w sekwencjach kodujących. Badania populacyjne wykazują, że sekwencje mikrosatelitarne charakteryzują się małą częstością mutacji i to zarówno w komórkach rozrodczych, jak i somatycznych.

Najmniej można obecnie powiedzieć o tej części genomu, którą określono jako „inną”, mimo że, jak się wydaje, to właśnie tu zakodowana jest większość informacji regulacyjnych, decydujących o rozwoju i funkcjonowaniu organizmu.

### II.2.3. Kariotyp

Prawidłowa komórka somatyczna człowieka jest diploidalna i zawiera 23 pary chromosomów. Je-

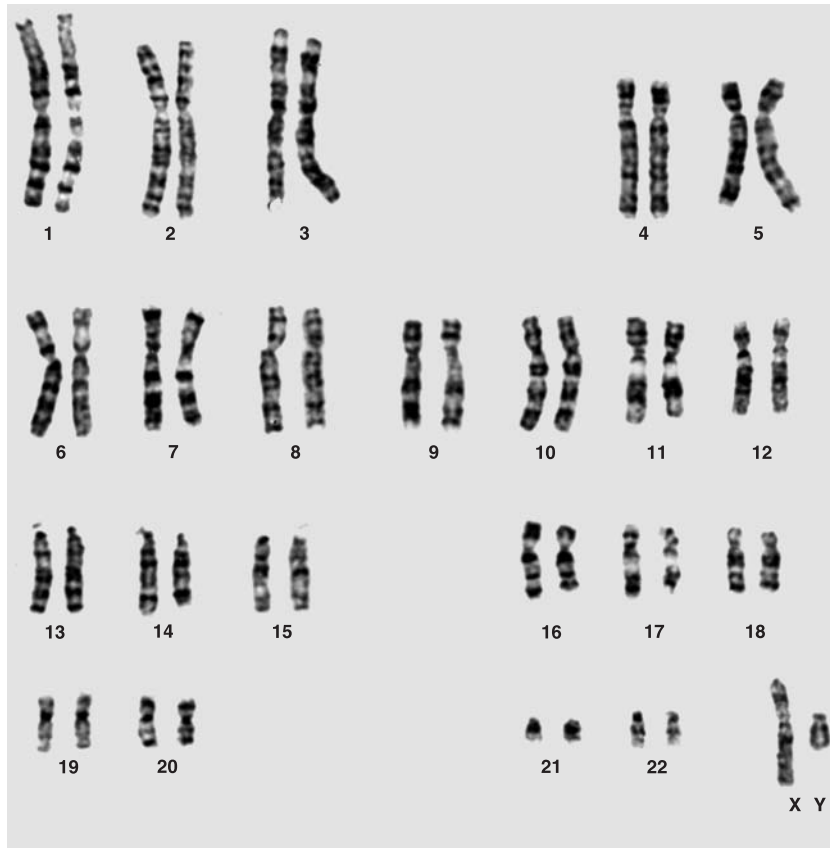
den chromosom z każdej pary pochodzi od matki, drugi od ojca. Zestaw chromosomów komórki został podzielony na 7 łatwych do odróżnienia grup, oznaczonych początkowymi literami alfabetu od A do G. W każdej grupie chromosomy mają podobną wielkość i kształt oraz są uszeregowane według malejącej wielkości (*ryc. II-7*). Pary chromosomów od 1 do 22 stanowią tzw. autosomy. Ostatnią, 23 parą, są chromosomy płci – XX u kobiet i XY u mężczyzn. Kariotyp jest opisywany z zastosowaniem symboli uwzględniających liczbę chromosomów, chromosomy płci oraz określenie stwierdzonej nieprawidłowości (*tab. II-6*). Zapis 46,XX oznacza prawidłowy kariotyp żeński, a 46,XY prawidłowy kariotyp męski.

Chromosomy występują we wszystkich komórkach jądrzastych, a nazwę swą zawdzięczają zdolności do wybarwiania (gr. chromos – kolorowy, soma – ciało). Każdy gatunek roślin i zwierząt ma charakterystyczny dla siebie zestaw chromosomów nazywany kariotypem. Określenie to jest stosowane także w odniesieniu do zestawu chromosomów typowego dla danego osobnika. Podstawowe zasady klasyfikacji i identyfikacji chromosomów oraz formy przedstawiania kariotypu zostały opracowane podczas trzech konferencji: w Denver (1960), Londynie (1963) i Paryżu (1971). Zestaw chromosomów pojedynczej komórki przedstawiony zgodnie z tymi zasadami nazywa się kariogramem.

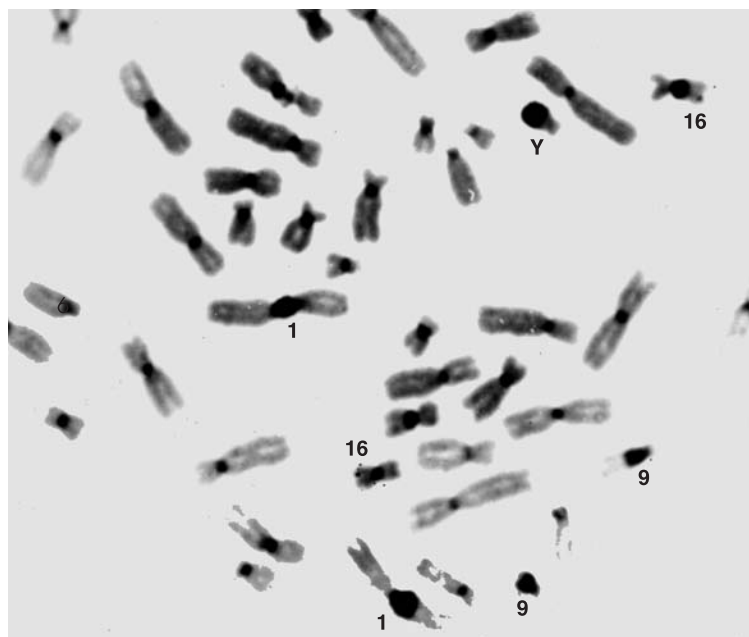
Około 30% populacji wykazuje niewielkie dziedziczne różnice w budowie chromosomów (tzw. warianty morfologiczne). Tego rodzaju zmienność osobnicza, określana jako heteromorfizm chromosomów, stanowi przykład polimorfizmu genetycznego. Dotyczy on regionów nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny długiego ramienia chromosomu Y, przycentromerowych regionów chromosomów 1, 9 i 16 pary oraz wszystkich chromosomów akrocentrycznych (*ryc. II-8*). Heteromorfizm jest charakterystyczny także dla regionów organizatorów jąderka i satelitów występujących w chromosomach akrocentrycznych.

#### II.2.3.1. Struktura chromosomu

Chromosom jest zbudowany z DNA i białek, z których największą masę stanowią histony. Histony odznaczają się zwiększoną, w porównaniu z innymi białkami, liczbą aminokwasów zasadowych, takich jak lizyna i arginina, co ułatwia im wiązanie się z DNA. Spośród pięciu typów histonów cztery mają wysoce konserwatywną budowę. Oznacza to, że skład aminokwasowy tych białek jest zachowy-



Rycina II-7. Prawidłowy kariotyp męski. Obraz prążków G uzyskany po trawieniu chromosomów trypsyną i barwieniu odczynnikiem Giemsy



Rycina II-8. Specyficzne barwienie regionów centromerowych chromosomów – prążki C. Chromosomy 1, 9, i 16 mają ciemno wybarwione regiony heterochromatyny konstytucyjnej, a chromosom Y heterochromatynę dystalnej części długiego ramienia

**Tabela II-6.** Podstawowe symbole stosowane do opisu kariotypu (ISCN, 2009; nowe wydanie planowane w 2013 r.)

|               |   |
|---------------|---|
| <b>add</b>    | dodatkowy materiał chromosomowy nieznanego pochodzenia  |
| <b>cen</b>    | centromer   |
| <b>del</b>    | delecja   |
| <b>der</b>    | pochodna przegrupowania chromosomowego  |
| <b>dic</b>    | chromosom dicentryczny (zawierający dwa centromery)   |
| <b>dn</b>     | <i>de novo</i> , aberracja chromosomowa, która nie została odziedziczona  |
| <b>dup</b>    | duplikacja  |
| <b>fra</b>    | miejsce łamliwe   |
| <b>h</b>      | heterochromatyna  |
| <b>i</b>      | izochromosom  |
| <b>ins</b>    | insercja  |
| <b>inv</b>    | inwersja lub odwrócona duplikacja   |
| <b>mar</b>    | chromosom markerowy   |
| <b>mat</b>    | pochodzenie matczyne  |
| <b>mos</b>    | mozaikowy   |
| <b>p</b>      | krótkie ramię chromosomu  |
| <b>pat</b>    | pochodzenie ojcowskie   |
| <b>q</b>      | długie ramię chromosomu   |
| <b>r</b>      | chromosom pierścieniowy   |
| <b>rcp</b>    | wzajemny  |
| <b>rob</b>    | translokacja robertsonowska   |
| <b>rec</b>    | chromosom zrekombinowany  |
| <b>s</b>      | satelity  |
| <b>subtel</b> | region subtelerowy chromosomu   |
| <b>t</b>      | translokacja  |
| <b>ter</b>    | terminalny lub telomer  |
| <b>upd</b>    | disomia jednorodzielska   |
| <b>var</b>    | wariant lub zmieniony   |
| <b>+/-</b>    | przed numerem chromosomu oznacza dodanie lub utratę całego chromosomu, po numerze chromosomu oznacza dodanie lub utratę jego części |
| <b>:</b>      | złamanie chromosomu   |
| <b>::</b>     | złamanie i ponowne połączenie   |
| <b>-&gt;</b>  | określa opisywany fragment chromosomu „od-do”   |

wany w procesie ewolucji, ze względu na pełnione przez nie funkcje.

Kompleks kwasu nukleinowego-białka jest nazywany chromatyną. Jest ona widoczna w jądrze

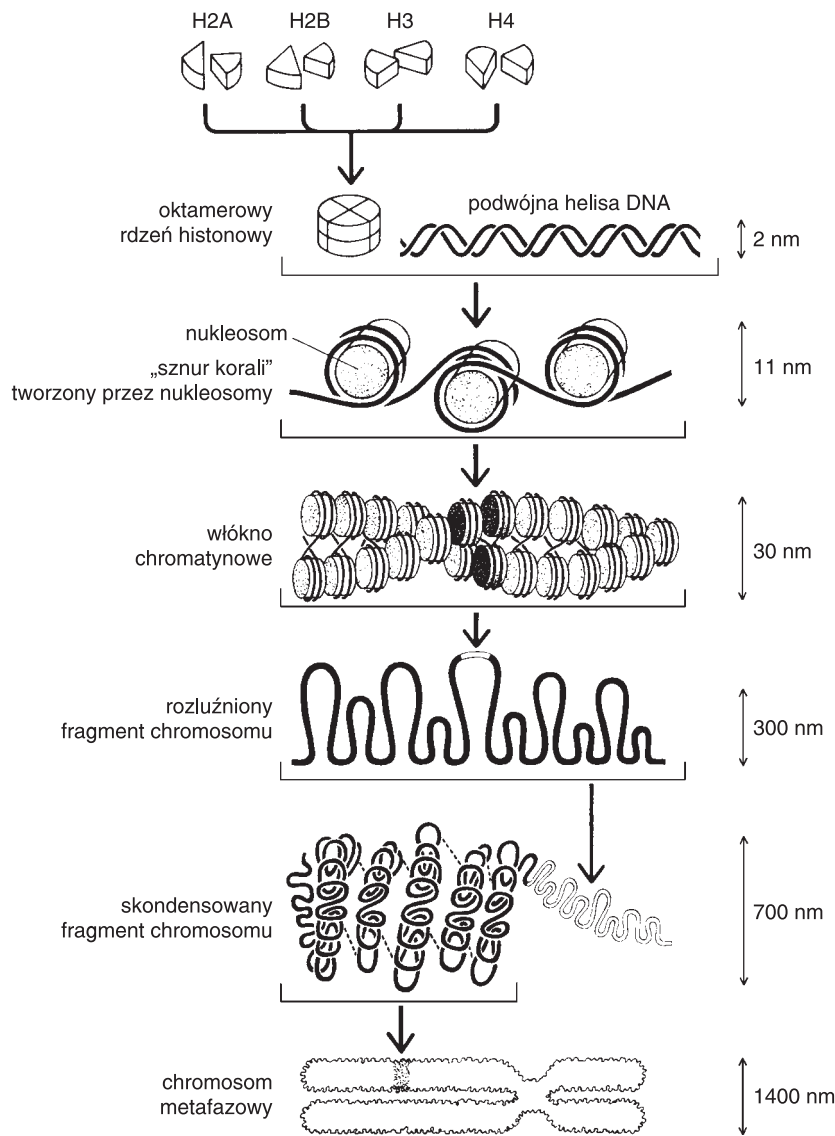
interfazowym jako substancja wykazująca zróżnicowany stopień zagęszczenia – kondensacji. Chromatyna o dużym stopniu kondensacji jest określana jako heterochromatyna w odróżnieniu od mniej skondensowanej euchromatyny.

Chromosomy jako indywidualne struktury są widoczne tylko podczas podziału komórkowego. Stanowią one specyficzną formę wielostopniowej organizacji przestrzennej chromatyny (*ryc. II-9*). Podstawową jednostką ich struktury jest nukleosom, na który składają się białka histonowe mocno związane z opasującą je 2 i 1/2 raza podwójną helisą DNA. DNA nukleosomu zawiera zawsze tę samą liczbę par nukleotydów. W dalszym etapie organizacji chromatyny, nukleosomy łączą się ze sobą w strukturę przypominającą sznur koralu. W wyniku pofałdowania i skręcenia struktury nukleosomowej tworzy się następnie włókno chromatynowe, które związa się w postać tzw. selenoidu. Kolejne poziomy organizacji są poznane dużo słabiej. Przyjmuje się, że chromosom metafazowy, najbardziej skondensowana postać chromatyny, powstaje w wyniku tworzenia się kolejnych skrętów i pętli selenoidu. Chromosom metafazowy wykazuje 10 000 razy większą kondensację DNA niż chromatyna jądra interfazowego.

Chromosomy metafazowe są zbudowane z dwóch identycznych (siostrzanych) chromatyd. Miejsce połączenia chromatyd – centromer (tzw. przewężenie pierwotne) dzieli chromosom na dwa ramiona, krótkie i długie. Regiony na końcach obu ramion są nazywane telomerami (gr. telos – koniec). Położenie centromeru decyduje o kształcie chromosomów, różnicując je na chromosomy meta-, submeta- i akrocentryczne (*ryc. II-10*). Długość ramion w chromosomach submeta- i akrocentrycznych jest wyraźnie zróżnicowana, w chromosomach metacentrycznych natomiast w przybliżeniu taka sama. Cechą wyróżniającą chromosomy akrocentryczne jest obecność na końcu ramion krótkich grudek chromatyny, zwanych w terminologii cytogenetycznej satelitami. Charakterystyczna jest wielkość i liczba satelitów, a także długość nitki satelitonośnej.

Centromer jest niezbędnym elementem struktury chromosomu zapewniającym właściwą segregację chromosomów w czasie mejotycznego i mitotycznego podziału komórki. W kilkumilionowej sekwencji nukleotydów składającej się na centromerze znaleziono jedynie różnego typu sekwencje powtórzone. W większości są to sekwencje satelitarne, ale wyróżniono też wiele sekwencji typu

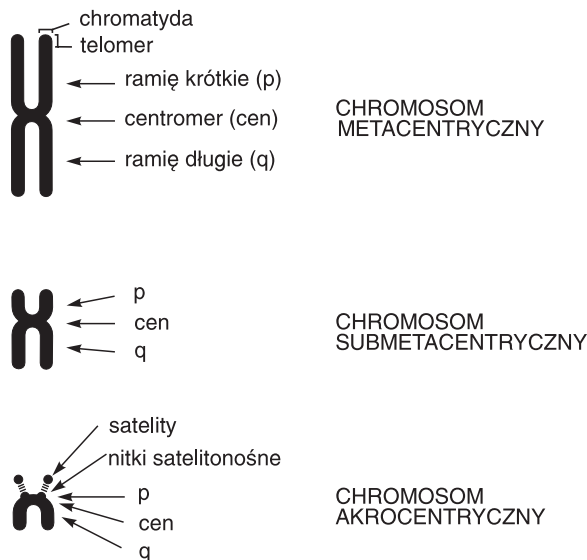




**Rycina II-9. Struktura chromatyny.** Kolejne etapy upakowania podwójnej helisy DNA. H2A, H2B, H3 i H4 to oznaczenia dla poszczególnych typów histonów o budowie konserwatywnej

SINE czy LINE. Wśród pięciu typów sekwencji satelitarnych różniących się długością powtarzanej sekwencji, w centromerach wszystkich chromosomów występuje sekwencja  $\alpha$ . Długość powtarzającego się motywu wynosi 171 nukleotydów. W większości badanych centromerów jest obecny również satelita 5-nukleotydowy  $(GGAAT)_n$ . Pozostałe sekwencje satelitarne są charakterystyczne dla określonych chromosomów. Bloki sekwencji satelitów  $\alpha$  i 5-nukleotydowe stanowią podstawę struktury i organizacji centromeru. Budowę centromeru dopełniają specyficzne białka wiążące się między innymi z satelitą  $\alpha$ . Wiele tych białek ma strukturę podobną do histonów.

Telomery uniemożliwiają zlepianie się chromosomów i zapewniają im właściwe umiejscowienie wewnątrz jądra komórkowego. Nie zawierają sekwencji kodujących. Zbudowane są z wielokrotnych powtórzeń sekwencji bogatych w GT. U człowieka jest to sekwencja 5'-TTAGGG-3'. W momencie urodzenia długość poszczególnych telomerów wynosi od 6 do 10 tysięcy nukleotydów. Jak się wydaje, najważniejszą jego funkcją jest ochrona chromosomów przed skracaniem w czasie kolejnych podziałów komórkowych. Problem ten jest szczególnie istotny dla chromosomów w komórkach rozrodczych. Nieograniczone zmniejszanie długości prowadziłoby bowiem z czasem do eliminacji



Rycina II-10. Budowa chromosomu metafazowego

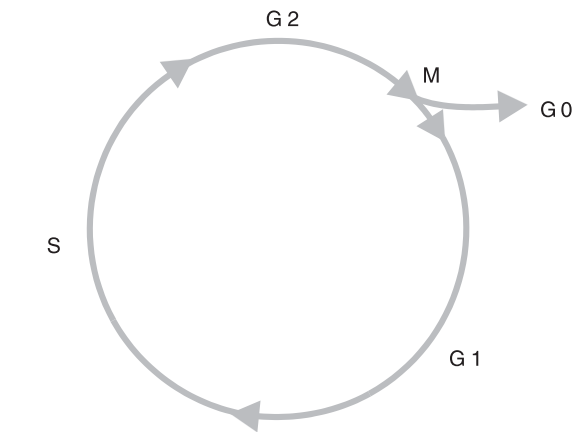
genów położonych na końcach chromosomu. Uzupełnianie skracających się telomerów jest rolą telomerazy. Funkcję katalityczną tego enzymu pełnią łącznie białko i RNA. Sekwencje nukleotydów RNA służą jako matryca do syntezy podstawowej jednostki DNA telomeru. Proces skracania się telomerów, nierównoważony przez aktywność telomerazy, może prowadzić do śmierci komórki.

Numeracja chromosomów człowieka, od 1 do 22, odpowiada w zasadzie gradacji ich wielkości. Na przykład w chromosomie 1 jest zakodowane 8% całej informacji genetycznej (250 Mpz). W chromosomie 21 – 1,5%, a w chromosomie 22 – 1,6% tej informacji. W chromosomie X jest zawarte 5% informacji genetycznej (154 Mpz), a w chromosomie Y – 1,7% (53 Mpz) genomu.

### II.2.3.2. Mitoza

Podział komórki somatycznej, w którym z jednej tworzą się dwie identyczne genetycznie komórki, jest nazywany mitozą. W czasie mitozy z chromatyd każdego chromosomu powstają chromosomy potomne, dzięki czemu komórki potomne zachowują taką samą liczbę chromosomów jak komórka macierzysta.

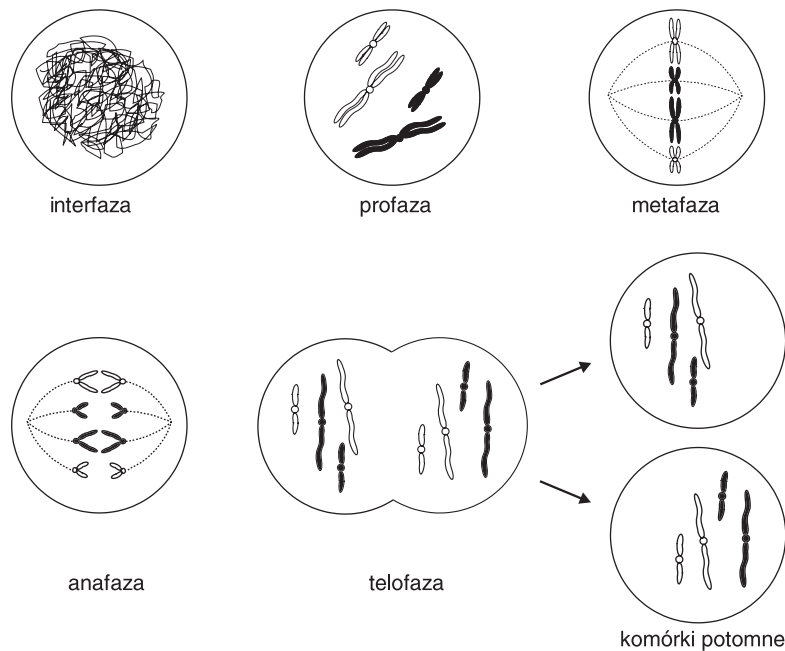
Komórki eukariotyczne dzielą się cyklicznie (ryc. II-11). Każdy podział komórki poprzedza synteza DNA, podczas której następuje podwojenie jego ilości w komórce (faza S syntezy DNA trwająca ok. 8 godz.). Okres, w którym cały genom jest podwojony, trwa około 4 godzin i został nazwany



Rycina II-11. Schemat cyklu komórkowego. G1 – faza spoczynkowa, trwają przygotowania do syntezy DNA, S – faza replikacji DNA, G2 – faza spoczynkowa, trwają przygotowania do organizacji materiału genetycznego, M – faza podziałowa

fazą G2 (ang. gap). Faza podziału mitotycznego (M) trwa niespełna 1 godzinę, po czym następuje interfaza (G1) wykazująca bardzo zróżnicowaną długość trwania. Komórki, które nie będą się już dzielić, pozostają w fazie G0.

W przebiegu mitozy można wyróżnić cztery fazy (ryc. II-12). W pierwszej (profaza) w jądrze następuje stopniowa spiralizacja i kondensacja chromatyny, chromosomy stają się widoczne. Każdy z nich jest przyczepiony do określonego miejsca błony jądrowej i składa się z przylegających do siebie chromatyd siostrzanych połączonych w centromerze. Zanika błona jądrowa. W drugiej (metafaza) chromosomy osiągają największy stopień kondensacji, wędrują do płaszczyzny równikowej komórki i formują płytkę metafazową. Powstaje wrzeciono mitotyczne. W tym stadium najłatwiejsza jest analiza liczby i struktury chromosomów, co wykorzystuje się w badaniach cytogenetycznych. W późnej metafazie następuje podział centromerów i oddzielenie od siebie chromatyd siostrzanych chromosomów. W następnej fazie (anafaza) chromatydy wędrują do przeciwległych biegunów komórki, stając się chromosomami potomnymi. W końcowym etapie podziału (telofaza) zostaje odtworzona błona jądrowa. Następuje podział cytoplazmy i powstają dwie komórki potomne zawierające po 46 chromosomów (każdy z nich składa się z jednej chromatydy). W nowo powstałych komórkach zachodzą procesy odwrotne do obserwowanych w czasie profazy. Chromosomy ulegają dekondukcji do interfazowej postaci chromatyny.



Rycina II-12. Schemat podziału mitotycznego komórki (na przykładzie dwóch par chromosomów). Chromosomy od jednego z rodziców zaznaczono na czarno, od drugiego są jasne

### II.2.3.3. Mejoza

Jako mejoza określane są dwa sprzężone ze sobą podziały komórkowe (mejoza I i mejoza II), w których wyniku powstają komórki płciowe – gamety (ryc. II-13). Różnią ją od mitozy dwa zjawiska o podstawowym znaczeniu biologicznym: redukcja liczby chromosomów i rekombinacja genetyczna.

W czasie mejozy diploidalna liczba chromosomów, typowa dla komórek somatycznych ( $2n = 46$ ), zostaje zredukowana do haploidalnej ( $n = 23$ ). Zapewnia to zachowanie stałej, charakterystycznej dla gatunku liczby chromosomów, która zostaje odtworzona po połączeniu gamety męskiej i żeńskiej w zygotę. Każda komórka organizmu rozwijającego się z zygoty ma więc dwa zestawy chromosomów, jeden pochodzący od matki, drugi od ojca. Odpowiadające sobie chromosomy tworzą pary. Chromosomy jednej pary są nazywane homologicznymi.

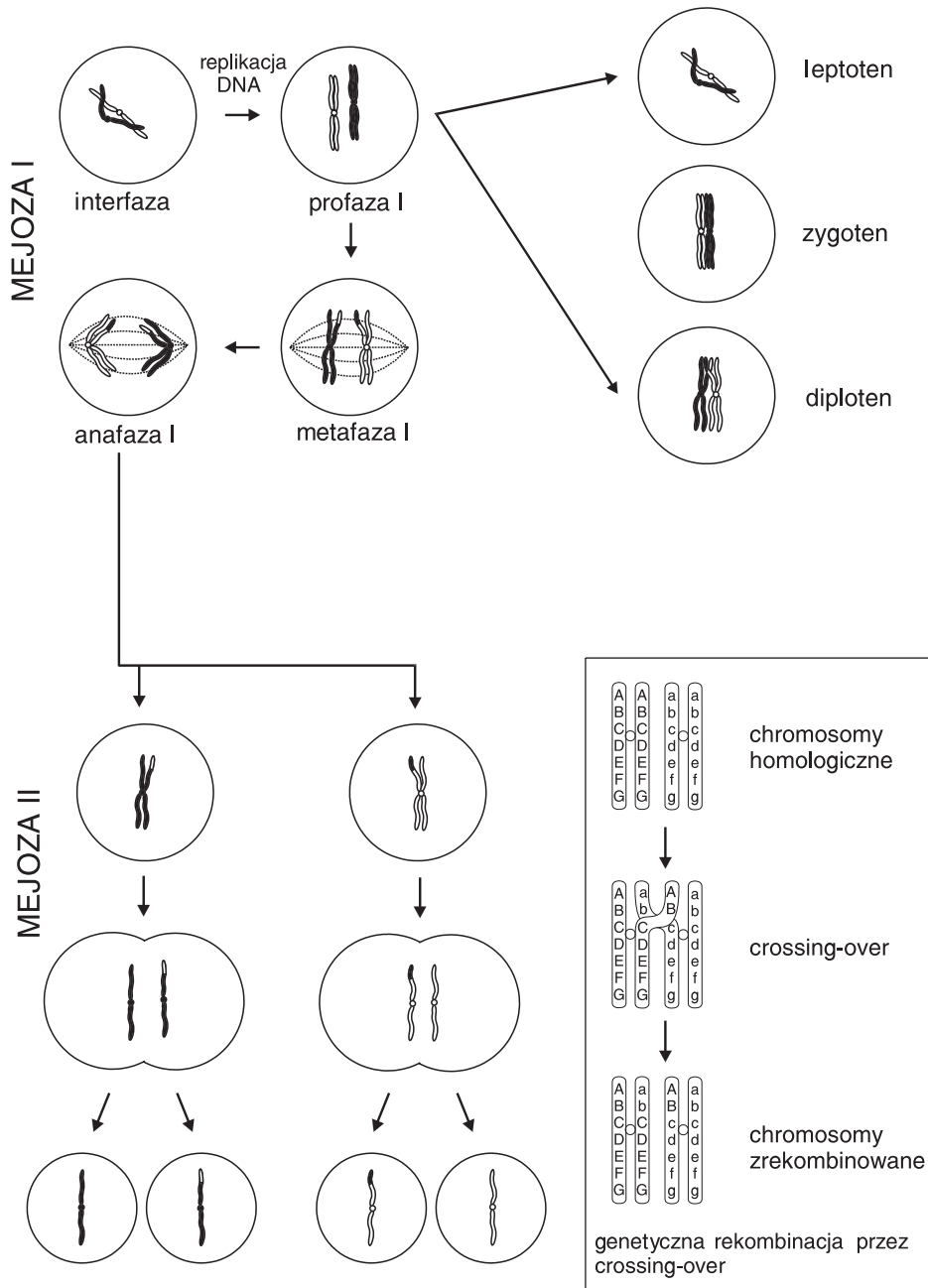
Rekombinacja stanowiąca wynik wymiany fragmentów chromosomów homologicznych zapewnia genetyczną zmienność i niepowtarzalność genotypu gamet, a zatem i rozwijającego się z zygoty nowego organizmu. Oba te zjawiska, redukcja liczby chromosomów i rekombinacja, zachodzą w I podziale mejotycznym. Pierwsze z nich realizuje się dzięki temu, że dwu podziałom komórkowym towarzyszy tylko jedna runda replikacji DNA, po-

przedzającą mejozę I. Drugie zachodzi w czasie profazy tego podziału.

#### Mejoza I

Rozpoczyna się od długo trwającej profazy, w której wyróżnia się kilka następujących po sobie stadiów. Chromosomy homologiczne, widoczne początkowo jako długie, cienkie nici (leptoten), przylegają do siebie, tworząc biwalenty (zygoten), po czym ulegają kondensacji (pachyten). W tym czasie w każdym z chromosomów można wyróżnić dwie chromatydy (biwalent składa się więc z 4 chromatyd). Następuje wymiana fragmentów chromatyd chromosomów homologicznych, tzw. crossing-over. Warunkiem tej wymiany jest powstanie połączeń chromatyd (chiasm) widocznych w czasie rozdzielania się biwalentów (diploten). Stopniowemu rozdzielaniu się biwalentów towarzyszy terminalizacja chiasm (w diakinezie pozostają one jedynie na końcach chromosomów). Chromosomy, w których nastąpił crossing-over, nazywane są zrekombinowanymi. Zawierają one mieszaninę materiału genetycznego zawartego pierwotnie w chromosomach homologicznych, a więc mieszaninę informacji genetycznej matki i ojca.

W dalszym przebiegu mejozy I chromosomy homologiczne gromadzą się w płaszczyźnie równikowej komórki (metafaza I), a następnie wędrują do jej przeciwległych biegunów (anafaza I). Pow-



Rycina II-13. Schemat podziału mejotycznego komórki (na przykładzie dwóch par chromosomów). Chromosomy od jednego z rodziców zaznaczono na czarno, od drugiego są jasne

stają dwie komórki potomne zawierające po 23 chromosomy (po jednym chromosomie homologicznym z każdej pary).

### Mejoza II

Następuje bezpośrednio po zakończeniu pierwszej. Nie poprzedza jej interfaza ani synteza DNA. Mechanizm i przebieg tego podziału jest taki sam, jak podziału mitotycznego. Powstają komórki po-

tomne identyczne pod względem liczby chromosomów i zawartej w nich informacji genetycznej.

U mężczyzn gamety są wytwarzane w procesie spermatogenezy, a u kobiet oogenezy. W podziale mejotycznym z diploidalnego spermatogonium powstają 4 spermatozoa. W gonadach żeńskich natomiast, w wyniku nierównego podziału cytoplazmy w obu podziałach mejotycznych, powstaje jeden oocyt i jedno ciało kierunkowe, które następnie

ulega degradacji. Tak więc ostatecznym wynikiem mejozy jest powstanie tylko jednej gamety żeńskiej – dojrzałego oocytu.

## II.3. Zmienność i dziedziczność

Obserwowana na co dzień zmienność i różnorodność świata żywego ma podłoże zarówno dziedziczne, jak i uwarunkowane czynnikami środowiskowymi. W zależności od warunków zewnętrznych organizmy o identycznym genotypie mogą niekiedy znacznie się różnić między sobą fenotypowo. Zmiany w środowisku mogą bowiem warunkować sytuacje, w których cecha dziedziczona z pokolenia na pokolenie nie ujawnia się. Na zmienność fenotypową składa się również wiele cech, które organizmy (rośliny, zwierzęta czy ludzie) nabywają w trakcie życia osobniczego. Nie są to jednak cechy przekazywane potomstwu. Podstawą zmienności są mechanizmy, które prowadzą do utrwalonych zmian w obrębie kwasów nukleinowych. W organizmach jednokomórkowych wszystkie zmiany w DNA są dziedziczne. U organizmów wielokomórkowych przekazywane z pokolenia na pokolenie są tylko zmiany następujące w DNA komórek, z których powstają gamety.

Zmienność dziedziczna jest kształtowana w procesach rekombinacji DNA i mutacji. Rekombinacja, czyli wymiana między niemi DNA lub fragmentami chromosomów, zachodzi w procesach podziału komórek i prowadzi do powstania różnych kombinacji genów oraz ich alleli. Ma to szczególne znaczenie dla genotypu gamet, a w konsekwencji dla ujawniania się określonych cech fenotypowych u osobników potomnych. Gamety danego osobnika, mimo posiadania pełnej informacji genetycznej, nie są bowiem genetycznie identyczne.

### II.3.1. Mutacje

Za tworzenie się nowych alleli danego genu, czy też nowych genów, są odpowiedzialne mutacje. To właśnie zmienność mutacyjna jest podstawą procesów ewolucyjnych. Nie wszystkie jednak mutacje są dziedziczne. Mutacje komórek somatycznych, a także mutacje letalne nie są dziedziczone z pokolenia na pokolenie. Mutacje mogą dotyczyć sekwencji nukleotydów w cząsteczce DNA oraz struktury i liczby chromosomów. Powstają spontanicznie lub

też na skutek działania czynników mutagennych, takich jak promieniowanie jonizujące czy niektóre związki chemiczne. Mutacjom może podlegać każdy nukleotyd w cząsteczce kwasu nukleinowego. Znane są jednak obszary chromosomu, w których częstość mutacji jest dużo większa niż w innych odcinkach.

Mutacją punktową jest zamiana jednego nukleotydu na inny. Może nią być również ubytek lub wstawienie pojedynczego nukleotydu. Wśród mutacji punktowych wyróżnia się mutacje w części kodującej, zmieniające bezpośrednio sens informacji genetycznej, oraz mutacje w obszarach regulacyjnych genu czy np. w intronach. W takich przypadkach można się spodziewać zmian w ekspresji genu lub błędnego składania RNA.

Gdy mutacja punktowa następuje w sekwencji kodującej genu, skutkiem jej może być zamiana nukleotydu i utworzenie trójki nukleotydów kodującej inny aminokwas (ang. missens). Może też powstać mutacja nonsens, gdy w wyniku zamiany nukleotydów zostaje utworzony jeden z kodonów stop. W przypadku delekcji lub wstawienia nukleotydu powstaje mutacja zmiany ramki odczytu (ang. frameshift) w sekwencji kodującej informację genetyczną. Skutkiem mutacji punktowej może być zmiana lub utrata funkcji kodowanego białka. Obserwowany w przypadku powstania mutacji nonsens, a bardzo często i „frameshift” częściowy lub całkowity brak kodowanego białka jest wynikiem przedwczesnej terminacji translacji. Mutacje punktowe mogą być również odpowiedzialne za utratę zdolności oddziaływania z białkami opiekuńczymi, a w rezultacie braku właściwego fałdowania się polipeptydu.

W postaci klasycznej terminem mutacja polimorficzna (por. podrozdz. II.3.3) określa się natomiast te punktowe zmiany w genie, które nie prowadzą do zmiany aminokwasu w cząsteczce kodowanego białka. Sytuacje takie występują wtedy, gdy dany aminokwas jest wyznaczany przez kilka różnych kodonów, tzw. degeneracja kodu genetycznego.

Obok mutacji punktowych wyróżnia się też delekcje, wstawianie czy inwersję większych fragmentów genu. Mutacją genową jest więc też delekcja całego genu *DMD* (2,3 Mbp), kodującego dystrofinę. Gen ten stanowi 1,5% chromosomu X, a delekcja tego genu jest dobrze widoczna w badaniu cytogenetycznym i mogłaby być klasyfikowana jako aberracja chromosomowa.

Mutacja nie musi się ujawniać w momencie powstania. Efekty działania mutacji uwidaczniają się dopiero wtedy, gdy zaistnieją warunki fenoty-



powej ekspresji zmutowanego genu. Przykładem relacji mutacja i środowisko mogą być mutacje klasyfikowane niekiedy jako tzw. zmiany ekogenetyczne. Dziedzicznie uwarunkowana zdolność do wyczuwania cyjanowodoru czy fenylotiomocznika ujawnia się tylko wtedy, gdy cyjanowodor pojawi się w powietrzu lub też gdy dana osoba polże bibułę nasyoną fenylotiomocznikiem. Osoby z akatalazją charakteryzują się brakiem katalazy. Cecha ta ujawni się jedynie wtedy, gdy krew zabarwi się na brunatno w czasie przemywania skaleczenia lub krwawiącej rany wodą utlenioną. U osób z *xeroderma pigmentosum* (defekt w genie kodującym jedną z helikaz uczestniczących w procesie naprawy DNA) zmiany skórne występują tylko wtedy, gdy osoby te są wystawione na promieniowanie słoneczne.

W literaturze można spotkać różne klasyfikacje mutacji. Jedną z nich jest bardzo przydatny podział pod względem skutków na poziomie genu. Wyróżnia się między innymi mutacje utraty funkcji (ang. loss-of-function) i mutacje uzyskania funkcji (ang. gain-of-function).

### II.3.1.1. Mutacje dynamiczne

Odmiernym typem mutacji są zmiany opisane po raz pierwszy w genie *FMRI*, którego defekt jest odpowiedzialny za występowanie zespołu łamliwego chromosomu X (FraX). Zmiany te polegają na zwielokrotnieniu liczby trójnukleotydowego motywu w sekwencji genu. U osób zdrowych liczba kopii, trójki CGG w nieulegającej translacji części pierwszego eksonu *FMRI*, nie przekracza 54. U bezobjawowych nosicieli zespołu FraX dochodzi do 200 (premutacja). U osób chorych liczba kopii może przekraczać 1000 powtórzeń. Ten typ zmian nazwano mutacją dynamiczną. Cechą charakterystyczną wielu chorób powodowanych mutacjami dynamicznymi jest występowanie zjawiska antycypacji.

Mutacje dynamiczne występują w części kodującej lub niekodującej odpowiedniego genu. Klasyfikacja zależy od roli, jaką mutacje te odgrywają w patogenezie poszczególnych chorób. Pierwszą grupę stanowiłyby choroby takie jak zespół FraX i ataksja Friedreicha, w których brak białka lub jego bardzo małe stężenie spowodowane jest zaburzeniem prawidłowego przebiegu transkrypcji. W zespole FraX jest to na przykład spowodowane hipermetylacją powtórzeń CGG na końcu 5'. Do drugiej grupy zalicza się choroby, w których produkt

białkowy jest obecny, ale został zmieniony w wyniku obecności ciągów glutamin (efekt wielokrotnych powtórzeń motywu CAG w sekwencji genu). Takie białko z reguły nabywa nową, szkodliwą dla organizmu funkcję, a mutacja jest dominująca. Brak charakterystycznego dominującego dziedziczenia w przypadku rdzeniowo-opuszkowego zaniku mięśni (defekt genu *AR* zlokalizowanego na chromosomie X), jest prawdopodobnie wynikiem zjawiska losowej inaktywacji chromosomu X. Trzecią grupę stanowią choroby powodowane powieleniem trójnukleotydowego motywu w niekodujących fragmentach genu, w których efekt dominacji wywołany jest nabyciem nowej funkcji przez RNA. Ta nowa funkcja jest wynikiem pojawienia się w cząsteczce RNA powielonych trójnukleotydowych motywów. „Toksyyczny” RNA, np. w przypadku dystrofii miotonicznej typu 1, poprzez sekwestrację<sup>2</sup> białek wiążących ciągi (CUG)<sub>n</sub> w mRNA zaburza prawidłowy przebieg procesu składania różnych transkryptów, co powoduje plejotropowość zmian fenotypowych charakterystycznych dla tej choroby. Podobny patomechanizm sugeruje się dla zespołu drżenia/ataksji związanej z łamliwym X (FXTAS). Do trzeciej grupy zalicza się też ataksje rdzeniowo-mózdkowe typu 8, 10, 12, a także chorobę podobną do choroby Huntingtona.

Do końca 2010 roku opisano jeszcze kilkadziesiąt innych chorób genetycznych spowodowanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych (*tab. II-7*). Opisano także takie choroby, jak dystrofia miotoniczna typu 2, gdzie wykazano zwielokrotnienie motywu czteronukleotydowego (CCTG), oraz ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 10 z powielonym wielokrotnie motywem pięcionukleotydowym (ATTCT).

### II.3.2. Aberracje chromosomowe

Pojęcie aberracja chromosomowa odnosi się do wszelkich nieprawidłowości chromosomów. Zgodnie z klasyczną definicją określa ono mutację tak dużą, że staje się ona widoczna w mikroskopie świetlnym. Wielkość najmniejszej widocznej w mikroskopie mutacji, np. delecji, oceniana jest na  $2-4 \times 10^6$  par zasad. Aberracje chromosomowe powstają w komórkach somatycznych lub w gametach. Mogą powstawać *de novo* lub być dziedziczone od rodziców. Wyróżnia się aberracje liczbowe i strukturalne.

<sup>2</sup> Sekwestracja – tu włączanie białek w strukturę agregatów tworzone przez nieprawidłowo zwinięte białko.

**Tabela II-7.** Choroby dziedziczne warunkowane mutacjami dynamicznymi w obszarach powtórzeń sekwencji trójnukleotydowych (podział ze względu na lokalizację mutacji)

| Choroba  | Gen                 | Locus       | Rodzaj powtórzeń | Antycypacja <sup>1</sup> | Dziedziczenie <sup>2</sup> | Lokalizacja w genie <sup>3</sup> | Patomechanizm <sup>4</sup> | Typ choroby <sup>5</sup> |
|--|---------------------|-------------|------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>Mutacje w części kodującej genów</b>  |                     |             |                  |                          |                            |                                  |                            |                          |
| Choroba Huntingtona (HD)   | <i>HTT</i>          | 4p16.3      | CAG              | O                        |                            |                                  | ZF/UF                      |                          |
| Choroba podobna do HD typ 2 (HDL-2)  | <i>JPH3</i>         | 16q24.3     | CAG/CTG          | ?                        |                            |                                  |                            |                          |
| Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typ 1 (SCA1)  | <i>ATXN1</i>        | 6p23        |                  |                          |                            |                                  |                            |                          |
| Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typ 2 (SCA2)  | <i>ATXN2</i>        | 12q24       |                  | O                        |                            |                                  |                            |                          |
| Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typ 3 (SCA3)<br>[Choroba Machado-Josepha (MJD)]           | <i>ATXN3</i>        | 14q24.3-q31 | CAG              |                          | AD                         | ORF                              | ZF                         | ND                       |
| Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typ 6 (SCA6)  | <i>ACNA1A</i>       | 19p13       |                  | n.o.                     |                            |                                  |                            |                          |
| Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typ 7 (SCA7)  | <i>ATXN7</i>        | 3p21.1-p12  |                  | O                        |                            |                                  |                            |                          |
| Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typ 17 (SCA17)  | <i>TBP</i>          | 6q27        | CAG/CAA          | ?                        |                            |                                  |                            |                          |
| Zanik jąder zębatach, czerwiennych, gałek błędyh i ciał podwzgórzowych Luysa (DRPLA) | <i>DRPLA</i>        | 12p13.31    | CAG              | O                        |                            |                                  |                            |                          |
| Rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni związany z chromosomem X (SMAX1)                    | <i>AR</i>           | Xq13-21     |                  | n.o.                     | XR                         |                                  |                            |                          |
| <b>Mutacje w części niekodującej genów</b>   |                     |             |                  |                          |                            |                                  |                            |                          |
| Zespół familiowego chromosomu X (FXS, FraX)  | <i>FMR1</i>         | Xq27.3      | CGG              | M                        | XD                         | 5' UTR                           | UF<br>RNA ZF               | ZW                       |
| Zespół drżenia/ataksji związany familiowym chromosomem X (FXTAS)                     | <i>FMR2</i>         | Xq28        | GCC              | n.o.                     | XD (?)                     |                                  | UF                         |                          |
| Upośledzenie umysłowe związane z FRAXE (FXE MR)                                      | <i>TXN8/ATXN80S</i> | 13q21       | CTG/CAG          | M                        | AD                         | 3' UTR/ORF                       | n.z.                       | ND                       |
| Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typ 8 (SCA8) <sup>6</sup>                                 | <i>DMPK</i>         | 19q13       | CTG              |                          |                            | 3' UTR                           | RNA ZF                     | ZW                       |
| Dystrofia miotoniczna typ 1 (DM 1)   | <i>PP2R2B</i>       | 5q31-q33    | CAG              | ?                        |                            | 5' UTR                           | n.z.                       | ND                       |
| Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typ 12 (SCA12)  | <i>FRDA</i>         | 9q13-21.1   | GAA              | M                        | AR                         | intron                           | UF                         | ZW                       |

Wg D. Hoffman-Zacharskiej, Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, porównaj także: [www.neuro.wuustl.edu/neuromuscular](http://www.neuro.wuustl.edu/neuromuscular)

n.o. – nie określono

n.z. – mechanizm nieznamy

<sup>1</sup> Antycypacja zazwyczaj w dziedziczeniu: O – odojcowskim; M – odmatczynym;

<sup>2</sup> Dziedziczenie: XD – dominujące sprzężone z płcią; XR – recesywne sprzężone z płcią; AD – autosomalne dominujące;

<sup>3</sup> ORF – otwarta ramka odczytu; UTR – region nieulegający translacji (ang. untranslated region);

<sup>4</sup> ZF – zmiana/zaburzenie funkcji białka; UF – utrata funkcji białka; RNA ZF – zaburzenie oddziaływań RNA;

<sup>5</sup> ND – choroba zwyrodnieniowa ośrodkowego układu nerwowego; ZW – zespół wieloukładowy;

<sup>6</sup> Mutacja warunkująca SCA8 dotyczy dwóch zachodzących na siebie genów ulegających ekspresji w odwrotnej orientacji: *ATXN80S* (CTG w regionie 3'UTR) i *ATXN8* (CAG w ORF).

**Tabela II-8.** Częstość występowania chorób dziedzicznych spowodowanych aberracjami liczbowymi chromosomów

| Choroba   | Częstość występowania (urodzeń) |               |
|---|---------------------------------|---------------|
| nieprawidłowości chromosomów autosomowych                               |                                 |               |
| Trisomia 21 (zespół Downa)  | 1 na                            | 650           |
| Trisomia 18   | 1 na                            | 5000          |
| Trisomia 13   | 1 na                            | 8000          |
| nieprawidłowości chromosomów płci                                       |                                 |               |
| Zespół Klinefeltera (47,XXY)  | 1 na 1000                       | (chłopców)    |
| Zespół XYY (47,XYY)   | 1 na 800                        | (chłopców)    |
| Zespół Turnera (45,X lub 45,X/46,XX lub 45,X/46,XY lub izochromosom Xq) | 1 na 2500                       | (dziewczynek) |

### Aberracje liczbowe

Wśród nieprawidłowości liczbowych chromosomów wyróżnia się poliploidię i aneuploidię. Komórki, w których liczba chromosomów stanowi wielokrotność liczby haploidalnej większą niż  $2n$  (u człowieka np.  $3n = 69,XXY$  lub  $4n = 92,XXYY$ ), nazywane są poliploidalnymi. Zestaw chromosomów, w którym ich liczba nie stanowi prostej wielokrotności liczby haploidalnej, np.  $47,XXX$ , określane jest jako aneuploidalny.

**Poliploidia** – u człowieka jest zazwyczaj cechą letalną. Najczęściej występującą postacią poliploidii jest triploidia oraz tetraploidia. Triploidia powstaje zazwyczaj w wyniku zapłodnienia oocyta przez dwa plemniki lub przez połączenie dwóch gamet, z których jedna jest nieprawidłowa, diploidalna. Tetraploidia jest skutkiem braku pierwszego podziału zygoty, powodującego podwojenie liczby chromosomów bezpośrednio po zapłodnieniu.

**Aneuploidia** – należy do najczęściej występujących aberracji chromosomowych (1/250 noworodków) (tab. II-8). Najczęstszą jej postacią jest trisomia (obecność dodatkowego chromosomu, tzn. trzech zamiast dwóch kopii danego chromosomu). Wśród stwierdzanych trisomii 50% stanowią trisomie autosomów (21, 13, 18), drugą połowę zaś trisomie chromosomów płci (XXY, XXX i XYY). Brak jednego chromosomu w diploidalnym zestawie, określane jako monosomia, jest zazwyczaj cechą letalną. Wyjątek stanowi obecność jednego chromosomu X ( $45,X$ ) odpowiedzialna za występowanie zespołu Turnera.

Aneuploidia powstaje w wyniku nieprawidłowego rozdzielenia się chromosomów homologicznych (jednej pary) lub chromatyd siostrzanych chromosomu w czasie podziału komórkowego. Najczęściej jest to nierozdzielenie się (nondysjunkcja) chromo-

somów (ryc. II-14). Nondysjunkcja może nastąpić podczas mejozy (w momencie powstawania gamet) lub w trakcie podziałów mitotycznych zygoty. Nondysjunkcja występuje częściej w oogenezie niż w spermatogenezie.

W wyniku nondysjunkcji mejotycznej powstają gamety disomiczne lub nullisomiczne w odniesieniu do specyficznego chromosomu. Połączenie z gametą prawidłową prowadzi do powstania zygoty trisomicznej lub monosomicznej. Wszystkie komórki rozwijającego się organizmu mają wówczas tę samą nieprawidłową liczbę chromosomów.

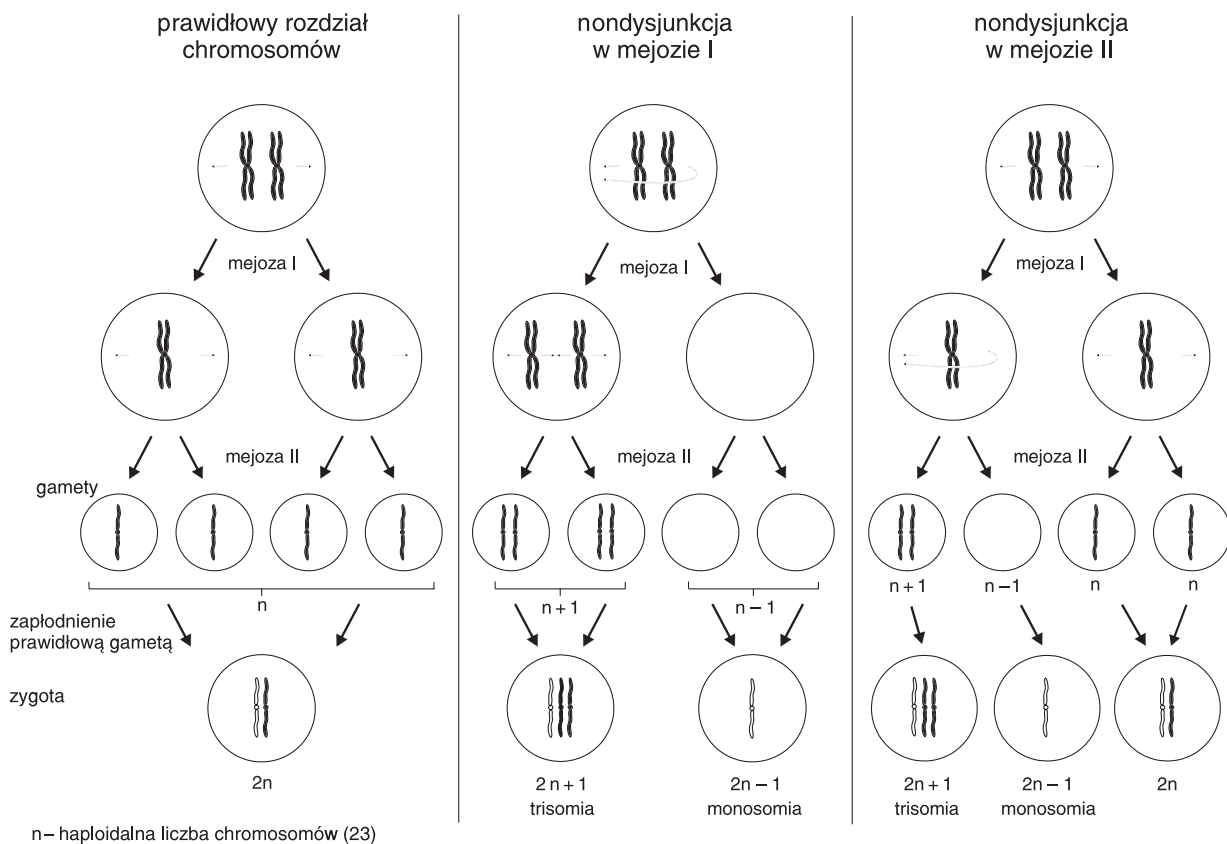
Nondysjunkcja mitotyczna prowadzi do powstania mozaikowości chromosomowej. Oznacza to wystąpienie w organizmie rozwijającym się z zygoty dwóch lub więcej subpopulacji komórkowych różniących się zestawem chromosomów (np. mozaikowość  $45,X/47,XXX$ ).

Przyczyną monosomii może być również wyeliminowanie jednego chromosomu z komórki wskutek opóźnienia jego ruchu podczas anafazy podziału mitotycznego. Przyjmuje się, że opóźnienie się chromosomu Y podczas mejozy stanowi najczęstszą przyczynę monosomii chromosomu X w zespole Turnera.

### Aberracje strukturalne

Ten typ aberracji powstaje w wyniku złamania jednego lub kilku chromosomów i nieprawidłowego połączenia się (w nową konfigurację) powstałych „lepkich” końców. Może temu towarzyszyć przegrupowanie się fragmentów chromosomów. W klasyfikacji cytologicznej tych aberracji wyróżnia się: translokacje, inwersje, izochromosomy, delecje, duplikacje, chromosomy pierścieniowe i dicentryczne (ryc. II-15). W odniesieniu do ich skutków fenotypowych można je podzielić na zrównowa-





Rycina II-14. Nondysjunkcja mejotyczna pary chromosomów i jej skutki

żone i niezrównoważone. Do zrównoważonych zaliczane są te aberracje, w czasie powstawania których nie doszło do utraty lub zwiększenia ilości materiału chromosomowego. Nie mają one na ogół wpływu na cechy fenotypu ich nosiciela. Są natomiast przyczyną powstawania w czasie mejozy gamet z nieprawidłowym zestawem chromosomów. Aberracje niezrównoważone cechuje zmniejszenie lub zwiększenie, w stosunku do stanu prawidłowego, ilości materiału chromosomowego. Powstają w wyniku mejotycznej segregacji aberracji zrównoważonych, ale mogą też powstać *de novo*.

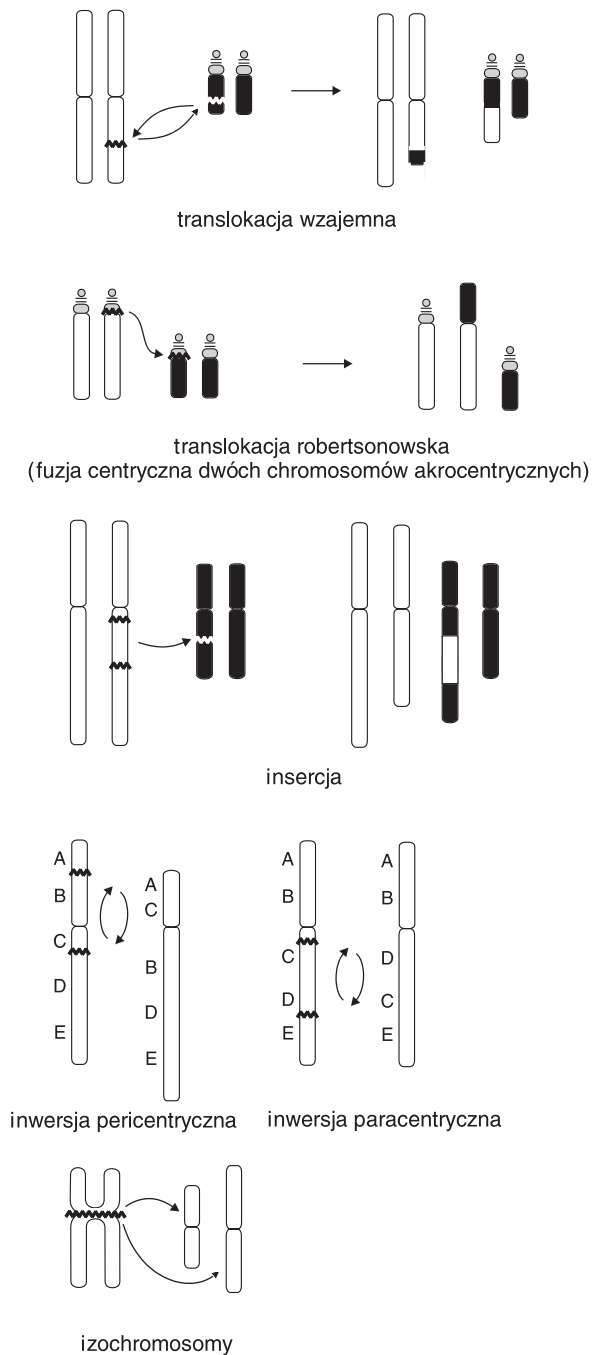
**Translokacje** należą do najczęściej występujących aberracji strukturalnych chromosomów. Powstają w wyniku złamania chromosomów i przegrupowania (najczęściej wzajemnej wymiany) fragmentów między dwoma chromosomami. Są to tzw. translokacje wzajemne. Poza nimi, wśród translokacji wyróżnia się fuzje centryczne oraz insercje.

Fuzje centryczne, określane też jako translokacje robertsonowskie, dotyczą zawsze chromosomów akrocentrycznych (13–15, 21 i 22), w których złamanie następuje w centromerze lub blisko niego. W wyniku połączenia dwóch chromosomów

akrocentrycznych tworzy się jeden, często zawierający oba centromery chromosomów, z których powstał. Krótkie ramiona chromosomów uczestniczących w fuzji są najczęściej eliminowane z komórki. Translokacje tego typu są zrównoważone, ponieważ krótkie ramiona chromosomów akrocentrycznych są zbudowane z nieczynnej genetycznie heterochromatyny. Fuzje centryczne chromosomów 13 i 14 oraz 14 i 21 są najczęściej występującymi translokacjami u człowieka.

Insercje powstają w wyniku trzech złamań w dwóch chromosomach. Fragment chromosomu powstały między dwoma złamaniami w jednym chromosomie zostaje przeniesiony do drugiego chromosomu i połączony z nim w miejscu złamania.

W przypadku translokacji wzajemnej w pierwszym podziale mejotycznym, podczas łączenia się chromosomów homologicznych w parę, każdy z prawidłowych chromosomów danej pary łączy się ze swoim nieprawidłowym homologiem (produktem translokacji). Równocześnie homologiczne fragmenty obu chromosomów uczestniczących w translokacji też łączą się w parę, w wyniku czego



Rycina II-15. Aberracje strukturalne chromosomów

powstaje czteroramienna konfiguracja chromosomów (ryc. II-16). Po rozłączeniu się tej struktury w anafazie dochodzi do rozdzielania dwóch chromosomów do jednej i dwóch do drugiej komórki potomnej (segregacja 2:2) lub też, co zdarza się rzadziej, trzech chromosomów do jednej komórki i jednego do drugiej (segregacja 3:1).

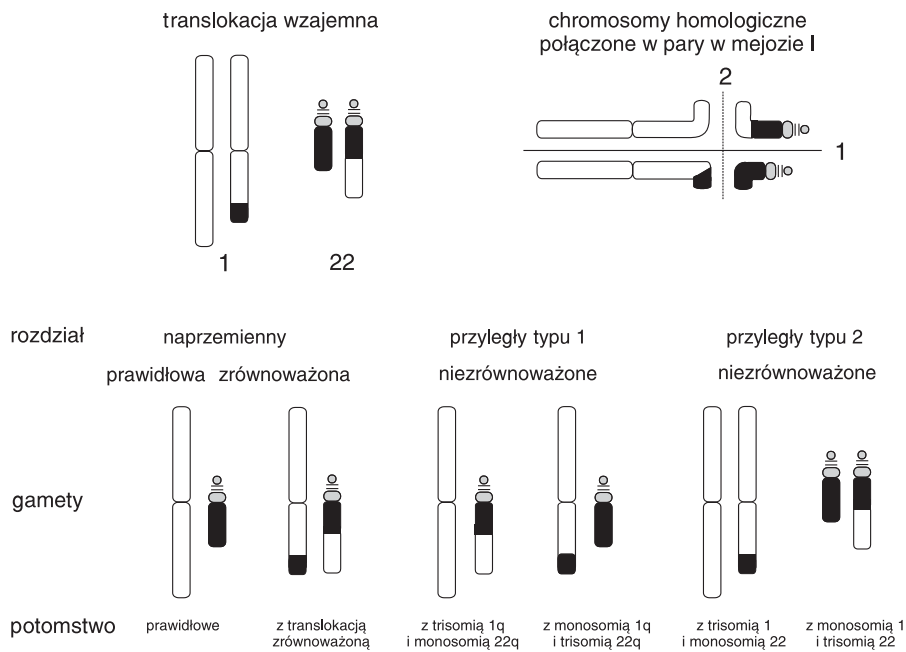
Wyróżnia się trzy typy rozdziału chromosomów. W rezultacie rozdziału naprzemiennego jedna ko-

mórka potomna (gameta) otrzymuje zrównoważoną translokację, druga zaś prawidłowe homologi chromosomów uczestniczących w translokacji. W przypadku rozdziału przyległego typu 1 i 2 wszystkie gamety są nieprawidłowe i zawierają duplikacje oraz delecje przegrupowanych fragmentów chromosomów, a zygoty mają tzw. częściowe trisomie i monosomie (patrz ryc. II-16). W przypadku translokacji robertsonowskich w wyniku segregacji chromosomów mogą powstać gamety nullisomiczne i disomiczne względem danego chromosomu. Zygoty natomiast będą zawierały trisomie lub monosomie całych chromosomów (ryc. II-17).

**Inwersja** jest to odwrócenie fragmentu chromatyny między dwoma miejscami złamań w chromosomie. Inwersja fragmentu jednego ramienia chromosomu jest określana jako paracentryczna. Gdy odwrócony fragment zawiera centromer (punkty złamań znajdują się w obu ramionach chromosomu), mówimy o inwersji pericentrycznej. Obecność inwersji zakłóca łączenie się w pary chromosomów homologicznych podczas mejozy. Odwrócony fragment chromosomu tworzy pętlę umożliwiającą kontakt między odpowiadającymi sobie (homologicznymi) regionami. W przypadku inwersji pericentrycznych crossing-over w obrębie pętli prowadzi do powstania chromosomów z duplikacjami i delecjami dystalnymi (zewnątrznymi) fragmentów chromosomu w stosunku do miejsc złamań. Rekombinacja w obrębie pętli utworzonej przez inwersję paracentryczną powoduje powstanie niestabilnych chromosomów dicentrycznych i acentrycznych (z dwoma centromerami lub bez centromeru) zawierających duplikacje i delecje (ryc. II-18).

**Izochromosomy** są to chromosomy składające się z dwóch identycznych (długich lub krótkich) ramion. Tworzą się w wyniku duplikacji jednego i delecji drugiego ramienia chromosomu. Mogą powstawać wskutek nieprawidłowego, poprzecznego podziału chromosomu w obrębie centromeru. U człowieka najczęściej stwierdza się izochromosom długich ramion chromosomu X występujący w zespole Turnera. Izochromosomy większości autosomów (z nielicznymi wyjątkami, jak izochromosomy krótkich ramion chromosomów 9, 12 oraz chromosomów akrocentrycznych) są letalne.

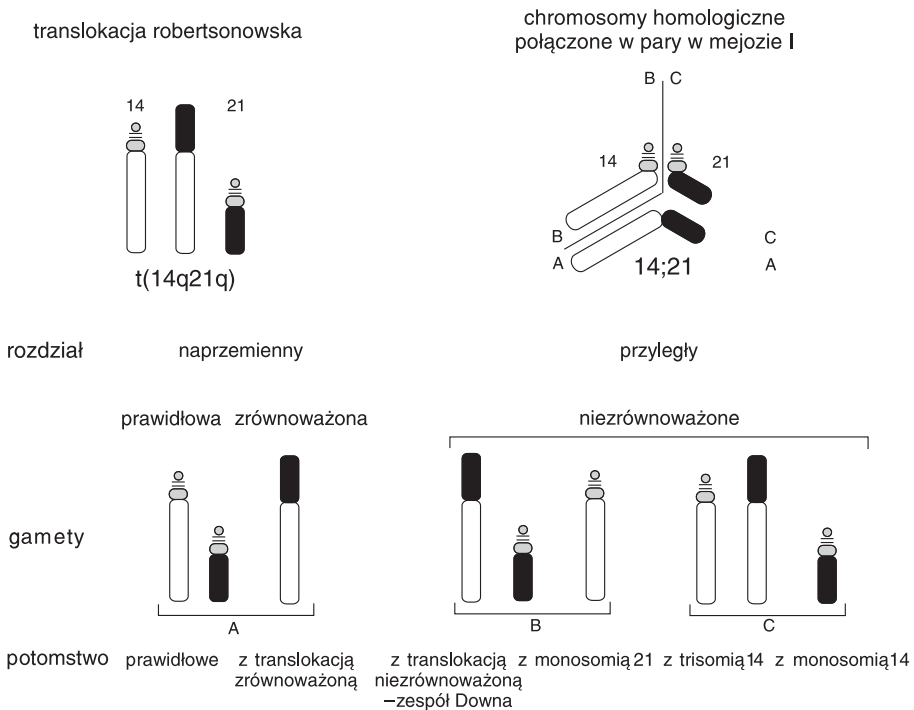
**Delecja** jest to utrata fragmentu chromosomu w wyniku jednego (terminalna) lub dwóch (interstycjalna) złamań chromosomu. Jak wspomniano wcześniej, aberracje te mogą powstać w rezultacie segregacji rodzinnej inwersji lub translokacji chromosomowej. Delecje występujące w określonych



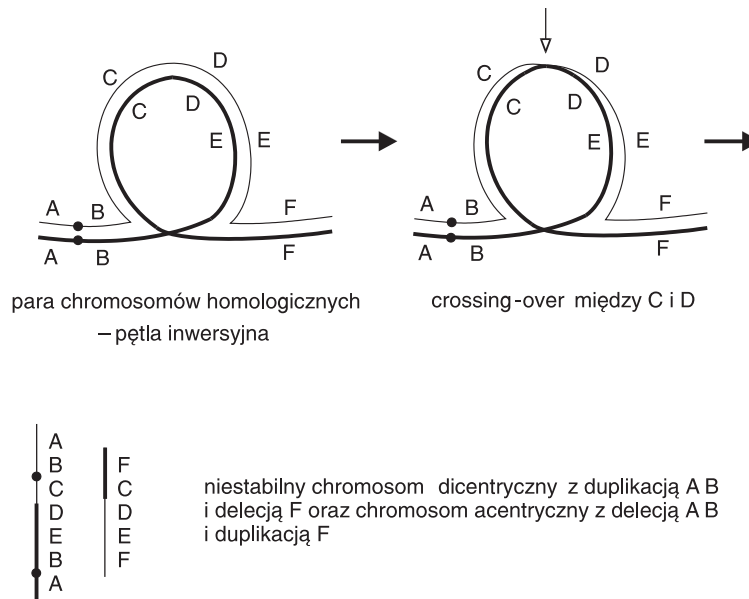
Rycina II-16. Segregacja chromosomów z translokacją wzajemną w czasie I podziału meiotycznego

regionach chromosomów odpowiedzialne za tzw. zespoły mikrodelecji mają stałą lokalizację w obrębie tych regionów. Powstają w wyniku nieprawidłowej rekombinacji DNA podczas mejozy – nieallelicznej rekombinacji homologicznej określanej też jako nierówny crossing-over. Uwarunkowana

jest ona specyficzną architekturą genomu regionów zawierających tzw. LCR (ang. low copy repeats) o podobieństwie sekwencji > 95–97%. Produktem nieprawidłowej rekombinacji jest delecja i wzajemna duplikacja fragmentu genomu między dwoma sekwencjami LCR zorientowanymi w tym samym



Rycina II-17. Segregacja translokacji robertsonowskiej w czasie I podziału meiotycznego



Rycina II-18. Konsekwencje crossing-over w inwersji paracentrycznej. Chromosom z inwersją tworzący pętlę oznaczono grubą kreską

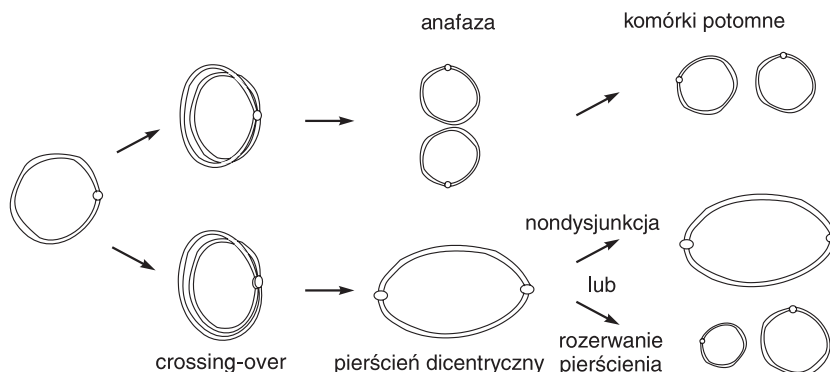
kierunku lub inwersją, gdy duplikony są ułożone w kierunku przeciwnym. Zespoły kliniczne uwarunkowane powstającymi w ten sposób rearanżacjami genomu są określane mianem chorób genomowych.

**Duplikacja** oznacza obecność dwóch kopii fragmentu chromosomu powstających najczęściej w wyniku translokacji, inwersji lub utworzenia izochromosomu. Duplikacje powstają także jako efekt nierównego crossing-over podczas mejozy. Występują jako powtórzenia proste (duplikacje tandemowe) lub odwrócone względem siebie (duplikacje odwrócone).

**Chromosomy pierścieniowe** powstają w wyniku połączenia dwóch złamanych końców jednego lub kilku chromosomów. Towarzyszy temu powstanie delecji fragmentów chromosomu dystalnych w sto-

sunku do miejsc złamań. Chromosomy pierścieniowe są niestabilne (ryc. II-19). W czasie podziału mitotycznego, w wyniku wymiany między chromatydami siostrzanymi chromosomu pierścieniowego, powstaje dwukrotnie większy chromosom pierścieniowy dicentryczny. W anafazie ulega on najczęściej rozerwaniu lub wędruje w całości do jednego bieguna komórki. Następuje nierówne rozdzielanie materiału chromosomowego między komórki potomne.

**Chromosomy dicentryczne** zawierają dwa centromery i podobnie jak chromosomy pierścieniowe są niestabilne podczas podziału komórkowego. Powstają wskutek translokacji, inwersji, a także wymiany chromatyd siostrzanych lub chromatyd chromosomów homologicznych.



Rycina II-19. Zachowanie się chromosomu pierścieniowego podczas podziału mitotycznego komórki

### Inne aberracje

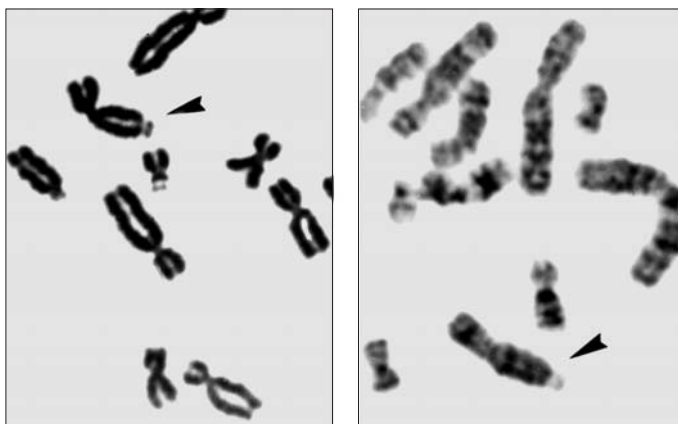
**Chromosomy markerowe.** Określenie to obejmuje wszystkie chromosomy, których pochodzenie i mechanizm powstania są nieznane. Chromosomy markerowe występujące konstytucyjnie są małe (przeważnie mniejsze niż chromosom 22) i występują zazwyczaj jako chromosomy dodatkowe. Mogą to być chromosomy meta- lub akrocentryczne, czasami mają strukturę pierścienia. Zawierają jeden lub dwa centromery, często wykazują obecność satelitów. Niestabilność mitotyczna chromosomów markerowych jest przyczyną stosunkowo częstego ich występowania w formie mozaikowej. Zawartość hetero- i euchromatyny decyduje o wpływie tych chromosomów na cechy fenotypu nosiciela.

**Miejsca łamliwe.** Są to miejsca w chromosomach, które wykazują zwiększoną częstość złamań i przerw (niebarwiących się miejsc) w warunkach częściowego zahamowania replikacji DNA. Opisało 120 miejsc łamliwych, wśród których wyróżnia się, zależnie od częstości występowania w populacji, dwa podstawowe typy: pospolite (ang. common) i rzadko występujące (ang. rare). Każdą z tych grup dzieli się na klasy zależnie od warunków, które muszą być spełnione do ich cytogenetycznej ekspresji.

Wśród 31 rzadko występujących miejsc łamliwych tylko dwa zlokalizowane w chromosomie X, FRAXA w Xq27.3 i FRAXE w Xq28, mają w pełni udokumentowany związek z patologią (niepełnosprawnością intelektualną). Należą one do klasy folianowrażliwych miejsc łamliwych, tzn. takich, których warunkiem ekspresji cytogenetycznej jest niedobór kwasu foliowego i tymidyny w podłożu hodowlanym komórek (ryc. II-20) Podłożem molekularnym łamliwości tych miejsc jest wydłużenie

niestabilnych, trójnukleotydowych sekwencji DNA w obrębie genów odpowiedzialnych za chorobę (por. mutacje dynamiczne). W większości przypadków za wystąpienie zespołu łamliwego chromosomu X jest odpowiedzialne wydłużenie niestabilnej sekwencji  $(CGG)_n$  w pierwszym eksonie genu *FMRI* i metylacja pobliskiej wyspy CpG. Miejsce łamliwe FRAXA jest cytogenetycznym przejawem tego typu mutacji. Obecnie przypuszcza się także, że pospolite miejsca łamliwe, jako regiony szczególnie wrażliwe na zaburzenia replikacji DNA, uczestniczą w powstawaniu rearanżacji chromosomowych i niestabilności genomu w komórkach nowotworowych.

**Aberracje chromatydowe.** Stanowią odrębną grupę aberracji, które z definicji, w odróżnieniu od aberracji typu chromosomowego, dotyczą uszkodzeń i zmian w pojedynczych chromatydach chromosomów. Powstają w czasie replikacji DNA lub po replikacji, tzn. w fazie S lub G2 cyklu komórkowego. W następnym cyklu (w komórkach potomnych) aberracje chromatydowe stają się aberracjami chromosomowymi. Wśród aberracji chromatydowych wyróżnia się miejsca niebarwiące się, tzw. przerwy chromatydowe (ang. gap) oraz złamania i wymiany chromatydowe (ryc. II-21). Nie wchodząc w szczególności omawianie rozmaitych typów wymian, ogólnie można je podzielić na takie, które powstają między dwiema chromatydami jednego chromosomu, lub takie, które dotyczą chromatyd dwóch lub kilku chromosomów. Wymiany chromatyd między kilkoma chromosomami powodują powstanie charakterystycznych trójramiennych, czteroramiennych lub bardziej złożonych konfiguracji chromosomów. Jeśli dwa złamania prowadzące do wymiany powstaną w tym samym *locus* na obu

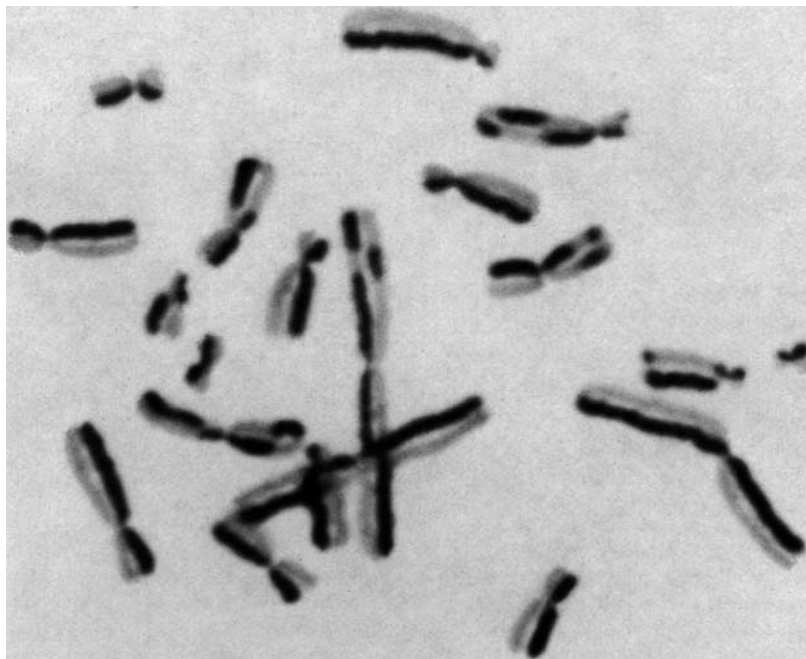


Rycina II-20. Obraz łamliwego chromosomu Xq27.3. Po lewej stronie chromosomy są wybarwione odczynnikiem Giemsa, natomiast po prawej techniką prążkowego barwienia GTG umożliwiającą identyfikację chromosomu X





**Rycina II-21. Przerwy, złamania i wymiany chromatydowe.** Wymiany są widoczne jako specyficzne konfiguracje chromosomów. Aberracje chromatydowe zostały wywołane mitomycyną C w hodowli *in vitro* komórek chorego z zespołem Fanconiego



**Rycina II-22. Wymiany chromatyd siostrzanych (SCE)**

chromatydach jednego chromosomu, są to wymiany chromatyd siostrzanych, SCE (ang. sister chromatid exchange). Mogą być one uwidocznione pod mikroskopem tylko po zastosowaniu specyficznych technik zróżnicowanego wybarwienia chromatyd siostrzanych chromosomu (ryc. II-22).

Aberracje chromatydowe, w odróżnieniu od konstytucyjnych aberracji chromosomowych, należą do aberracji nabytych. Mogą powstawać pod wpływem różnych czynników mutagennych (np. promieniowania jonizującego, mutagenów chemicznych czy infekcji wirusowych). Stanowią też

przedmiot badań cytogenetycznych w diagnostyce zespołów o genetycznie uwarunkowanej niestabilności chromosomów.

### II.3.3. Polimorfizm

Wzajemne występowanie wykluczających się form strukturalnych jednego lub kilku chromosomów jest określane jako polimorfizm chromosomów. Na poziomie genu zmianami polimorficznymi określa się jednoczesne występowanie w populacji różnych form allelicznych danego genotypu. W przypadkach wątpliwych jako kryterium odróżniające zmianę polimorficzną od mutacji przyjmuje się częstość ich występowania. Jeżeli w populacji określona zmiana sekwencji nukleotydów (wariant alleliczny) występuje częściej niż w 1%, to uważa się ją za zmianę polimorficzną. Polimorfizm może dotyczyć pojedynczego nukleotydu, powtarzającego się motywu sekwencji, a także liczby kopii fragmentu DNA.

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w sekwencji DNA określa się jako SNP (ang. single-nucleotide polymorphism). SNP najprościej wykrywa się, sekwencjonując DNA. Może być identyfikowany również z wykorzystaniem technik przesiewowych, takich jak SSCP (ang. single-strand conformation polymorphism), DGGE (ang. denaturing gradient gel electrophoresis) czy HRM (ang. high resolution melt). W szczególnych przypadkach, gdy SNP zlokalizowany jest w sekwencjach rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne, enzymy te mogą zostać zastosowane w jego wykrywaniu. Taki typ polimorfizmu jest określane jako zmienność długości fragmentów restrykcyjnych, RFLP<sup>3</sup> (ang. restriction fragment length polymorphism). Polimorfizm sekwencji minisatelitarnych oznacza się skrótem VNTR (ang. variable number of tandem repeats), a sekwencji mikrosatelitarnych SSLP lub STRP (ang. single sequence length polymorphism lub short tandem repeat polymorphism).

Polimorfizmy wszystkich typów są wykorzystywane jako fizyczne markery genetyczne. W genomie człowieka najmniejszą rozdzielczością charakteryzuje się RFLP. Wynika to ze stosunkowo niewielkiej liczby miejsc rozpoznawanych w cząsteczce ludzkiego DNA przez enzymy restrykcyjne. Polimorfizm ten jest dwualleliczny. Analiza RFLP znalazła stałe miejsce w badaniach molekularnych.

W określonych przypadkach umożliwia różnicowanie sekwencji prawidłowych od zmienionych na skutek mutacji.

Duża zmienność liczby powtarzających się motywów powoduje, że minisatelity i mikrosatelity są doskonałymi markerami genetycznymi. Duża liczba alleli występujących w danym *locus* predysponuje ten typ polimorfizmu do analizy sposobu dziedziczenia się badanych genów.

Największe nadzieje w praktycznym wykorzystaniu markerów polimorficznych wiąże się z analizą SNP. Powodem tego jest liczba miejsc zmienionych w całym genomie, a nie jak w przypadku minicy mikrosatelitów liczba alleli w danym *locus*. Najczęściej spotykany jest polimorfizm dwualleliczny, rzadko trójalleliczny, natomiast prawdopodobieństwo wystąpienia czwartego allelu w danym *locus* jest bliskie zera. Szacuje się, że w genomie człowieka jest około 3 miliony markerów typu SNP, co stanowi około 90% wszystkich różnic w sekwencji. Ocenia się, że ten typ polimorfizmu DNA jest mutacyjnie stabilniejszy niż polimorfizm sekwencji satelitarnych. Średnio SNP występuje 1 na 300–1000 pz. Gęstość i nasycenie SNP nie są jednak identyczne dla całego genomu. Obszarem, gdzie obserwuje się największe zagęszczenie, jest *locus* HLA na chromosomie 6. Z drugiej strony na chromosomie X zidentyfikowano „pustynie SNP”, tj. fragmenty, z których największy miał około 1,7 Mpz, gdzie nie wykryto żadnego SNP. Założeniem wykorzystania analizy SNP w badaniach jest równoczesna identyfikacja wielu tych markerów w dużych częściach lub wręcz w całym genomie, co umożliwiła technologia oparta na mikromacierzach DNA. Planuje się na przykład wykorzystanie typowania SNP w prognozowaniu wystąpienia kompleksowych chorób cywilizacyjnych, takich jak astma, cukrzyca, migrena czy choroby serca. Zmiany genetyczne, w tym zmiany prowadzące do występowania chorób, zachodzą w określonym „tle genetycznym”. Jak wspomniano, analiza SNP umożliwiła opisanie tego „tła”. Diagnostyka molekularna będzie w takich przypadkach polegać na określeniu osobistego, indywidualnego dla badanej osoby, wzoru SNP i porównaniu go ze znanym wzorem SNP charakterystycznym dla danej choroby. Szerog tego typu informacji przynoszą badania populacyjne określane w literaturze anglosaskiej jako GWAS (ang. genome-wide association studies).

<sup>3</sup> Terminem RFLP powszechnie określa się również rodzaj analizy DNA, w której są wykorzystywane enzymy restrykcyjne.

Wynik analizy SNP może w przyszłości stać się podstawą tworzenia genetycznych „wizytówek” człowieka (por. <http://snp.cshl.org>).

Nasza wiedza o organizacji genomu poszerzyła się o polimorfizm zmiennej liczby kopii fragmentów DNA. CNV (ang. copy number variation) obejmuje delecje i duplikacje fragmentów chromosomów. W genomie człowieka zidentyfikowano ponad 1500 regionów CNV i szacuje się, że stanowi to około 12% jego wielkości. Szacuje się też, że częstość występowania większości opisanych CNV w populacji nie przekracza kilku procent. Rozmieszczenie CNV w genomie nie wydaje się całkowicie przypadkowe i jest związane z jego strukturą. CNV, podobnie jak SNP i inne typy polimorfizmów sekwencji nukleotydowych, stanowi o osobniczym charakterze danego genomu (danej osoby), a niekiedy i grupy etnicznej. CNV może być dziedziczony z pokolenia na pokolenie, mieć charakter zmian somatycznych – tkankowo zależnych, może powstawać *de novo*. Polimorfizmowi typu CNV przypisuje się znaczenie w procesie ewolucji genomu w dużo większym stopniu niż np. mutacjom pojedynczych nukleotydów.

Wykazano, że CNV dotyczy około 15% genów, których mutacje mają znaczenie w patologii molekularnej znanych chorób genetycznie uwarunkowanych. Znanych jest obecnie szereg chorób „wrażliwych” na dawkę genu. Duplikacja genu *LMNB1* jest odpowiedzialna za występowanie autosomalnie dominującej postaci leukodystrofii (ADLD), a przewlekłe zapalenie trzustki może być powodowane mutacją punktową w genie *PRSS1* lub triplikacją tego genu. Rolę CNV wykazano w chorobie Charcota–Marie’a–Tootha typu 1A, neurofibromatozie typu 1 czy w podatności na zakażenie wirusem HIV (liczba kopii genu *CCL3L1* warunkuje stopień podatności na zakażenie).

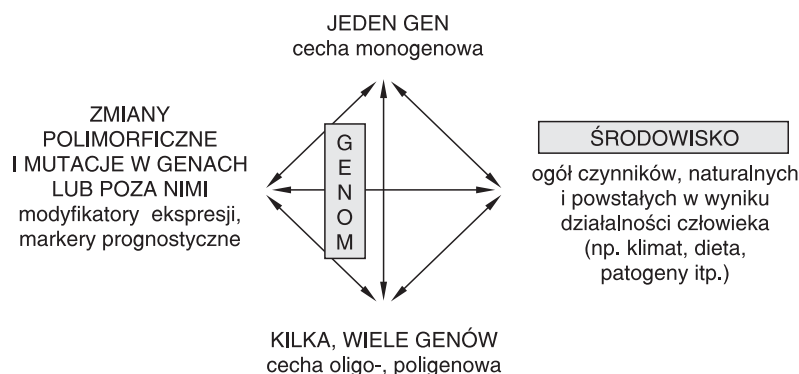
Wpływ CNV na obraz kliniczny choroby jest z kolei dobrze widoczny w przebiegu rdzeniowego zaniku mięśni (ang. spinal muscular atrophy, SMA). Choroba warunkowana jest najczęściej homozygotyczną delecją eksonu 7 genu *SMN1*. Modyfikatorem fenotypu SMA jest gen *SMN2*, którego liczba kopii w populacji kształtuje się od zera do sześciu. Im większa liczba genów *SMN2*, tym fenotyp SMA jest łagodniejszy (gen *SMN2* odpowiada za ok. 15% aktywnego białka SMN). Wykazano również, że w populacjach, gdzie tradycyjnie dieta oparta jest (była) w dużym stopniu na spożyciu skrobi, liczba genów *AMY1* kodujących, obecną w ślinie,  $\alpha$ -amylazę jest średnio większa, niż w populacjach wykorzystujących inne składniki odżywcze. Występowanie CNV okazało się też charakterystyczne dla fragmentów subteleromowych wielu chromosomów. W regionach tych mapuje się szereg rearanżacji mających znaczenie kliniczne.

Wydaje się, że często obserwowana asocjacja między występowaniem CNV, także SNP a wariantami ekspresji danego genu może być modelowa dla chorób kompleksowych, takich jak schizofrenia, autyzm, choroba Parkinsona czy Alzheimer.

### II.3.4. Relacje genotyp–fenotyp

Występowanie chorób dziedzicznych jest spowodowane mutacjami genu (genów). Na obraz kliniczny choroby składają się dodatkowo tok dziedziczenia, typ mutacji odpowiedzialnej za defekt genu, funkcja kodowanego przez gen polipeptydu, wzajemne relacje między białkami oraz wpływ genetycznych i środowiskowych modyfikatorów funkcji genu (ryc. II-23).

Przykłady zależności między rodzajem i lokalizacją mutacji w danym genie a obserwowanym fenotypem klinicznym można znaleźć w dystrofii



Rycina II-23. Zależność genotyp–fenotyp w ekspresji cech dziedzicznych

**Tabela II-9.** Przykłady różnych chorób dziedzicznych wywoływanych mutacjami w tym samym genie

| Gen          | Lokalizacja   | Choroba  |
|--------------|---------------|--|
| <i>PAX3</i>  | 2q35          | – zespół Waardenburga<br>– mięśniak mięśni prążkowanych  |
| <i>RET</i>   | 10q11.2       | – rdzeniasty rak tarczycy typu 2A i 2B,<br>– choroba Hirschsprunga<br>– postać rodzinna rdzeniastego raka tarczycy |
| <i>SCN4A</i> | 17q23.1-q25.3 | – paramiotonia wrodzona<br>– porażenie napadowe hipokaliemiczne<br>– miotonia wrodzona                             |
| <i>PRNP</i>  | 20p12-pter    | – choroba Creutzfeldta–Jakoba<br>– śmiertelna rodzinna bezsenność  |
| <i>GNAS1</i> | 20q13.2       | – osteodystrofia Albrighta<br>– zespół McCune'a–Albrighta  |
| <i>AR</i>    | Xcen-q22      | – zespół niewrażliwości na androgeny<br>– choroba Kennedy'ego  |

typu Duchenne'a i Beckera. Większość mutacji w genie *DMD* ma charakter delecji. Gdy mutacje te są zlokalizowane na początku genu, obserwuje się występowanie dystrofii mięśniowej o bardzo ciężkim przebiegu (typu Duchenne'a). Delecje obejmujące końcowe odcinki genu *DMD* są odpowiedzialne za postać dystrofii przebiegającej znacznie łagodniej (typu Beckera).

Różnorodność cech fenotypowych obserwowanych w wielu chorobach uwarunkowanych genetycznie może być powodowana również funkcją danego genu zależną od tkanki, w której ulega on ekspresji. Taki mechanizm prawdopodobnie jest przyczyną występowania z jednej strony dziedzicznej choroby Hirschsprunga (defekt unerwienia odcinka jelita grubego), z drugiej zaś wielu zmian nowotworowych. W obu przypadkach pierwotny defekt jest umiejscowiony w tym samym genie *RET* (tab. II-9).

Obserwowany obraz kliniczny określonej choroby dziedzicznej może być też funkcją mutacji różnych genów. Często towarzyszy temu szerszy aniżeli w chorobach jednogenowych zakres zmian klinicznych. Mutacje w wielotorbielowości nerek mapują się w genie *PKD1* umiejscowionym w chromosomie 16 i w genie *PKD2* z chromosomu 4. Mniej więcej połowa przypadków rodzinnej postaci stwardnienia guzowatego jest sprzężona z genem *TSC1* (9q34), a druga połowa z genem *TSC2* umiejscowionym blisko genu *PKD1*. Podobnie zmienność

objawów klinicznych w różnych postaciach kardiomiopatii przerostowej znajduje wytłumaczenie w występowaniu charakterystycznych dla tej choroby mutacji w kilku różnych *loci* (tab. II-10).

Heterogenność objawów klinicznych sprawia, że nomenklatura molekularna często nie odpowiada nazewnictwu przyjętemu w medycynie. Wykazano na przykład, że defekt genu *CFTR*, charakterystyczny dla mukowiscydozy, stwierdza się także w niezależnie dotychczas klasyfikowanych chorobach takich, jak: obu- i jednostronna niedrożność przewodów nasiennych, przewlekłe zapalenie oskrzeli, rozstrzenie oskrzeli, przewlekłe zapalenie zatok obocznych nosa z polipowatością, kropidłkowe alergiczne odoskrzelowe zapalenie płuc. Infekcje bakteryjne, wiele schorzeń układu oddechowego czy też niedrożność przewodów nasiennych u mężczyzn są klasycznymi objawami mukowiscydozy. Wydaje się więc, że w opisanych przypadkach wielość objawów chorobowych jest przejawem zmienności na poziomie genu, a wymienione schorzenia należałoby klasyfikować raczej jako łagodne postaci mukowiscydozy lub choroby *CFTR*-zależne.

W niektórych chorobach dziedzicznych jako cecha autosomalna recesywna obserwuje się niekiedy pewne odstępstwa od tego kanonu dziedziczenia. Zaobserwowano bowiem występowanie cech klinicznych choroby również u nosicieli zmutowanego genu. U obligatoryjnych nosicieli muta-