

[Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Profilowanie aktywności genów w skali genomu

Onkologia, jak żadna inna dziedzina medycyny, jest bezpośrednio powiązana ze zmianami molekularnymi na poziomie komórki. Zgodnie z maksymą cancer is a genetic disease przyjmuje się, że różnego rodzaju zaburzenia materiału genetycznego są podstawą powstawania większości nowotworów. Choć podstawowe zaburzenia molekularne w komórkach nowotworów można w różny sposób klasyfikować (od aberracji chromosomalnych po mutacje punktowe i zmiany epigenetyczne), to i tak końcowy efekt (fenotyp komórki nowotworowej) nie do końca jest uzależniony od pierwotnego charakteru danej zmiany. Istotą zaburzeń genetycznych w przypadku nowotworów jest zmiana ekspresji fenotypowej genu, definiowanej jako całokształt funkcjonowania genu, czy to na poziomie ilościowym (nadmiernie wyrażona aktywność danego genu), czy jakościowym

(nieprawidłowa funkcja lub brak funkcji).

☒ Opisanie sekwencji genomu człowieka pozwoliło na określenie zarysu budowy informacji genetycznej organizmu ludzkiego, a tym samym stworzyło podwaliny pod kompleksową ocenę złożonych układów biologicznych. Znając zasób genów genomu ludzkiego w pełni uzasadnione stało się pytanie, w jaki sposób można całościowo opisać aktywność aparatu genetycznego komórki, zarówno u osób zdrowych, jak i w przebiegu choroby, aby ustalić pełen zakres związanych z chorobą zmian zachodzących w organizmie. Idealne narzędzie do tego celu powinno być w stanie obrazować stan komórki w następujący sposób:

- 1) opisywać stan większości elementów tworzących złożony układ,
- 2) opis elementów powinien być adekwatny do sposobu ich funkcjonowania,
- 3) ocena powinna być pewna (niski poziom szumu do sygnału) i powtarzalna,
- 4) technologia powinna pozwalać na prowadzenie badań w różnych układach eksperymentalnych.

Zachodzące w każdym momencie życia danego organizmu "rozczytywanie genomu" - czyli zjawisko ekspresji genów - jest wieloetapowym procesem, prowadzącym od informacji zakodowanej w cząsteczce kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) genomu danej komórki, poprzez etap pośredni (tzw. informacyjny RNA, czyli mRNA), po właściwy produkt genu, jakim jest białko. Ten na pozór prosty jednokierunkowy przepływ informacji jest zaburzany poprzez rozmaite dodatkowe sposoby regulacji (białko-DNA, RNA-RNA, białko-białko).

Stan komórki najwierniej obrazuje opis składu jakościowego i ilościowego białek komórkowych. Pomimo znacznego postępu w zakresie profilowania składu białkowego komórki, z przyczyn technicznych, technologie proteomiczne (od ang. proteome - globalny zasób białek komórki) nie znalazły szerokiego zastosowania w eksploracji stanu aktywności komórki. Technologia spektroskopii mas z założenia opiera się na identyfikacji fragmentów poszczególnych białek zawartych w próbce materiału biologicznego; peptydy takie są rozpoznawane bądź według przewidywanych wielkości (stosunku masy molarnej do ładunku) peptydów na jakie cięte jest dane białko, bądź też za pomocą sekwencjonowania małej części tych peptydów.

Podstawowymi przeszkodami w szerokim stosowaniu tej technologii nie tylko w badaniach *in vitro*, ale i w ocenie stanu układu biologicznego są:

- 1) zbyt mała liczba analizowanych fragmentów białek, co powoduje, iż opis składu białkowego jest tylko fragmentaryczny,
- 2) trudności w ustaleniu choćby względnych stężeń białek tworzących proteom komórkowy oraz
- 3) zbyt mała powtarzalność metody.

Genom zakodowany w kwasie DNA ma strukturę polimeryczną, złożoną z czterech typów zasad. Opisanie budowy genomu człowieka polegało na rozszyfrowaniu kolejności zasad purynowych (adenina, guanina) i pirymidynowych (cytozyna, tymina) w poszczególnych chromosomach. Podstawową zasadą umożliwiającą prowadzenie badań na poziomie kwasów nukleinowych jest komplementarność. W myśl tej zasady, odpowiednie nukleotydy mogą wchodzić w parowanie tylko w określony sposób (adenina z tyminą; cytozyna z guaniną), a siła parowania zależy od kolejności zasad w obrębie dwóch fragmentów wchodzących w interakcję. Łączenie dopasowanych fragmentów (hybrydyzacja) leży u podstaw metodycznych profilowania aktywności genów na poziomie transkryptów RNA (tj. mRNA).

Analizując wyniki profilowania aktywności genów trzeba pamiętać o podstawowych ograniczeniach takiego podejścia. Przede wszystkim RNA stanowi etap pośredni rozkodowywania informacji genomu, a właściwą rolę, świadczącą o aktywności genu, pełni najczęściej białko (dla uproszczenia pomijając regulatorową rolę RNA). Tym samym wzrost liczby cząsteczek określonego RNA w komórce może, ale nie musi, odzwierciedlać prawdziwy wzrost ekspresji fenotypowej określonego genu. Drugim

ograniczeniem jest istnienie odmiennych form określonego mRNA powstających w procesie alternatywnego splicingu (potranskrypcyjnej obróbki RNA). Alternatywne transkrypty odpowiadają często za powstawanie białek o innej aktywności niż tradycyjnie przypisane do danego genu. W przypadku oceny aktywności genu w mechanizmie hybrydyzacji jego transkryptu zazwyczaj nie ma możliwości rozróżnienia formy splicingowej, która odpowiada za odczytywany sygnał.

Pośród technik profilowania aktywności genów na poziomie RNA najpowszechniej obecnie używaną technologią są mikromacierze oligonukleotydowe. Podstawą działania jest w tym przypadku hybrydyzacja transkryptu genu (fragmentu nici mRNA powtórnie przepisanej na DNA) do odpowiedniego zestawu sond (tj. krótkich fragmentów DNA komplementarnych do danego genu). Kolejnym elementem pozwalającym na stworzenie technologii mikromacierzy było opracowanie sposobu pomiaru aktywności poprzez znakowanie barwnikiem fluorescencyjnym. Sonda, wchodząc w interakcję z transkryptym genu, indukuje zmianę widma emitowanego po wzbudzeniu światłem o zadanej długości fali. Tym samym sondy, które zostały zhybrydyzowane mogą być uwidocznione w czytniku mikromacierzy (ang. microarray scanner). Ostatecznie, poprzez dokładne oznakowanie na powierzchni wielkości około 2 cm² położenia ponad 50 tysięcy zestawów sond, możemy przypisywać obecność sygnału od poszczególnych sond do relatywnych poziomów ekspresji genów. Do zastosowania komercyjnego wprowadzono wiele technologii opartych na mikromacierzach o dużej gęstości. Dwie podstawowe techniki (firmy Affymetrix oraz Illumina) mają zbliżone metody działania; pozwalają one na ocenę aktywności większości znanych genów oraz posiadają zakodowane wewnętrzne mechanizmy kontrolne, umożliwiające wykrycie błędnego sposobu przetwarzania próbki.

Poza technologiami opartymi na hybrydyzacji, używa się także technik opartych na reakcji namnażania fragmentów RNA (amplifikacji). W tych metodach stosuje się zmodyfikowaną reakcję łańcuchową polimerazy (polymerase chain reaction - PCR, tj. trzyetapowy proces enzymatyczny odbudowy komplementarnej nici DNA, który pozwala na wykładniczy przyrost odbudowywanych fragmentów). W tzw. ilościowej PCR następuje ocena w czasie rzeczywistym ilości namnożonej sekwencji (poprzez reakcję z sondą wyznakowaną barwnikiem fluorescencyjnym; sonda związana do DNA posiada inną charakterystykę luminescencji) i na podstawie pomiaru intensywności aktywności sondy oraz znając sposób przyrastania liczebności namnażanego fragmentu - można określić relatywne lub wystandaryzowane stężenie określonego mRNA na początku reakcji. Tego rodzaju platform badawczych jest na rynku kilka, istnieją także odpowiednie pracownie, które mogą stworzyć "uszyte na miarę" konkretnego eksperymentu zestawy sond do analiz (np. odpowiadające genom powiązany z regulacją apoptozy). Zaletą technik opartych na ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy jest to, iż uzyskane wyniki pełniej odpowiadają relatywnym poziomom aktywności poszczególnych genów; nie wymagają one także przetwarzania za pomocą metod bioinformatycznych omówionych poniżej.

Profilowanie aktywności genów wiąże się z jeszcze jedną niedogodnością, częściowo wspólną dla obu wymienionych wyżej typów technologii. Aby można było dobrze profilować aktywność genów z wykorzystaniem mikromacierzy, materiał do wykonania badania powinien pochodzić z fragmentu wielkości kilku skrawków mikrotomu. Wiadomo, jak zróżnicowany może być skład tkankowy w kilku polach tego samego preparatu mikroskopowego. Wynik profilowania aktywności genów jest wypadkową aktywności genów z każdej grupy komórek obecnych w preparacie. Tym samym istotnym parametrem wstępnej oceny możliwości zastosowania danej metody profilowania jest tzw. komórkowość tkanki badanej, oceniana jako średni odsetek komórek nowotworowych w preparacie. Niestety, nawet szczegółowa analiza morfometryczna nie pozwala na zniwelowanie efektu sumowania profili aktywności genów pochodzącej z utkania nowotworowego i innych populacji tkankowych (np. naciek zapalny czy podścielisko), gdyż każda z populacji komórkowych może posiadać inną bezwzględną ilość RNA. Tym samym stwierdzenia, że "sygnatura aktywności genów powiązanych ze stanem zapalnym jest czynnikiem prognostycznym w raku płuca" mogą być związane

z prawdziwą zmianą molekularną w obrębie komórki nowotworowej, ale także może to być wynikiem obecności nacieku zapalnego w badanym materiale. Profilowanie z wykorzystaniem techniki namnażania można także wykonać dla mniejszej wielkości materiału biologicznego, co jednak istotnie wpływa na uzyskiwane wyniki profilowania. Podobnie jednak jak w poprzednio omówionym przykładzie, należy dbać, aby zawsze tego typu analizy poprzedzało szczegółowe badanie mikroskopowe próbek.

Ostatnim parametrem wpływającym na jakość oceny profilowania jest analiza uzyskanych wyników za pomocą metod biologii obliczeniowej (bioinformatyki). Wykorzystanie dowolnej platformy mikromacierzowej przynosi wynik w postaci tabeli, zawierającej liczbowy opis relatywnych aktywności przypisanych do danych sond (zestawów sond) w poszczególnych próbach. Aby przetworzyć taką listę wynikową w odpowiedni opis, np. przebiegu zaburzeń w sygnalizacji komórkowej, należy zastosować algorytmy, zoptymalizowane dla konkretnej platformy badawczej. Wypracowano pewien zestaw podstawowych technik bioinformatycznych, warto jednak tu podkreślić, iż niepewność wyników analizy mikromacierzowej wzmagają fakt, iż nie ma jednego optymalnego algorytmu postępowania, a wyniki uzyskane za pomocą powszechnie uznanych algorytmów, np. normalizacji odczytów lub przetworzenia list genów w zestawy procesów biologicznych, mogą się diametralnie różnić.

Technologie mikromacierzowe zrewolucjonizowały nie tylko sposób prowadzenia badań, ale także podejście do rozumienia funkcjonowania komórki. Pomimo początkowych nadziei, iż wreszcie będzie można w pełni opisać procesy rządzące czynnością komórki w danym stanie chorobowym, obecnie profilowanie aktywności genów w skali całego genomu służy jako metoda przesiewowa identyfikacji spektrum zaburzeń molekularnych. W połączeniu ze szczegółowymi analizami aktywności poszczególnych genów, zwłaszcza badanymi na innym poziomie niż RNA (np. obecność produktów białkowych, ich aktywność, obecność fosforylacji konkretnych białek), uzyskuje się głęboki wgląd w przebieg procesów biologicznych. Przykładowo - samo profilowanie aktywności genów nie pozwala odróżnić podstawowych zaburzeń pierwotnych dla danego procesu, od zaburzeń wtórnych (adaptacyjnych) od stanu środowiska powiązanego z chorobą. Oznacza to, że obecność "sygnatury genów hipoksji" może być zaburzeniem pierwotnym nowotworów o dużej złośliwości, lecz może też oznaczać adaptację szybko rosnącego guza do niewystarczającego unaczynienia.

W badaniach klinicznych dotyczących nowotworów litych nie doczekano się dotychczas zbyt wielu wskazań do prowadzenia badań molekularnych o znaczeniu prognostycznym lub rokowniczym. Jednym z przykładów z ostatnich lat jest badanie mutacji w obrębie KRAS przy planowaniu leczenia skierowanego na hamowanie sygnalizacji EGFR w przypadku chorych na raka jelita grubego. Pomimo faktu, iż mutacja ta warunkuje występowanie istotnych zaburzeń w biologii guza, dotychczas nie opracowano testu, który poprzez profilowanie aktywności genów odzwierciedlałby tak odmienną biologię tego zdefiniowanego molekularnie podtypu choroby. Tym samym, w mojej ocenie podstawowym zastosowaniem mikromacierzy i innych technologii profilowania aktywności genów w skali globalnej jest identyfikacja zaburzeń molekularnych, które będą miały zastosowanie w klinice dopiero po "przetłumaczeniu" na podstawowe pierwotne zjawiska biologiczne (np. mutacja konkretnego pojedynczego genu, nadmierna aktywność określonego onkogenu). W związku z metodycznymi trudnościami związanymi ze stosowaniem w praktyce klinicznej technologii badań wielkoskalowych (np. mikromacierzy), należy się spodziewać, iż sposobem definiowania molekularnego podtypu nowotworu będzie analiza pojedynczych elementów (np. genotypowanie mutacji, czy ilościowa PCR dla pojedynczego genu). I choć dotychczas opracowano pojedyncze testy wykorzystujące profilowanie aktywności genów w tworzeniu czynników rokowniczych, wyróżniając kilka podstawowych typów molekularnych raka piersi (por. "Możliwości leczenia »potrójnie ujemnego« raka sutka", S. Cleator, W. Heller, R.C. Coombes, MP - Onkologia 1/2008, s. 7 - przyp. red.), to większości wniosków praktycznych z takiego testu może być sprowadzone do oceny

immunohistochemicznej ekspresji wybranych białek, czy oceny amplifikacji pojedynczego genu. Trzeba jednak pamiętać o tym, że postęp w zakresie technologii w biologii jest bardzo szybki i nie można wykluczyć, iż w przyszłości powstaną nowe metody profilowania aktywności genów w skali genomu, które będą pozbawione większości ograniczeń obecnych technik. Istnieje więc realna szansa, iż za kilka lat takie techniki zagoszczą na stałe w panelu badań dodatkowych regularnie stosowanych w pracy onkologa klinicznego.

Autor: dr hab. med. Lucjan S. Wyrwicz

Źródło: <http://www.mp.pl>

Fot.: <http://www.scientificamerican.com>

<http://laboratoria.net/artukul/11795.html>

Informacje dnia: [Ekrany dotykowe bez problematycznego indu Świat atomów i cząsteczek Żyjemy w czasach multitożsamości](#) [Dlaczego Polki rzadziej jedzą mięso niż Polacy? Co 3 osoba dorosła zagrożona chorobami z powodu braku ruchu](#) [Cynk może pomóc chronić uprawy przed zmianami klimatu](#) [Ekrany dotykowe bez problematycznego indu Świat atomów i cząsteczek Żyjemy w czasach multitożsamości](#) [Dlaczego Polki rzadziej jedzą mięso niż Polacy? Co 3 osoba dorosła zagrożona chorobami z powodu braku ruchu](#) [Cynk może pomóc chronić uprawy przed zmianami klimatu](#) [Ekrany dotykowe bez problematycznego indu Świat atomów i cząsteczek Żyjemy w czasach multitożsamości](#) [Dlaczego Polki rzadziej jedzą mięso niż Polacy? Co 3 osoba dorosła zagrożona chorobami z powodu braku ruchu](#) [Cynk może pomóc chronić uprawy przed zmianami klimatu](#)

Partnerzy