

Лекція 2

Тема. Напрямки досліджень сучасної біохімії: геноміка та протеоміка.

План:

1. Картування генома
2. Цілісне секвенування генома
3. Використання геноміки
4. Протеоміка

Література:

1. Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації. Теоретичні аспекти : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, Т. Б. Синельник, І. В. Компанець. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2016. – 639 с.
2. Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації: методи дослідження : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, І. В. Компанець, Т. Б. Синельник. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2017. – 447 с.
3. Гоженко А., Козирев А., Цебржинський О., Гоженко О., Жуков В. Основи молекулярної біології та персональна геноміка фізичних і психічних здібностей людини. Навчальний посібник. RSW. Одеса. Бидгощ. 2017 р. 340 с.
4. Дубінін С. І., Пілюгін В.О., Ваценко А.В., Улановська-Циба Н.А., Передерій Н.О. Сучасні проблеми молекулярної біології. Підручник для студентів ВНМЗ України III-IV рівнів акредитації. Полтава, 2016. 393 с.

Вивчення нуклеїнових кислот почалося з відкриття ДНК, надалі стали вивчати гени та дрібні фрагменти. **Геноміка** - це вивчення цілих геномів, включаючи повний набір генів, їх нуклеотидну послідовність та організацію, а також їх взаємодії всередині виду та з іншими видами.

Досягнення геноміки стали можливими завдяки технології секвенування ДНК. Геномна інформація використовується для створення карт ДНК різних організмів.

Першим організмом, для якого було одержано генетичну карту, стала чорнобрюха дрозоділа (*Drosophila melanogaster*). Надалі генетичне картування стали здійснювати для інших видів. Так, першим птахом та першою свійською твариною, для яких була побудована генетична карта, стала курка.

1. Картування генома

Картування генома - це процес знаходження розташування генів на кожній хромосомі.

Генетична карта - це ілюстрація, яка перераховує гени та їх розташування на хромосомі. Генетичні карти дають загальну картину і використовують генетичні маркери. Генетичний маркер - це ген або послідовність на хромосомі, який показує генетичний зв'язок з ознакою, що цікавить.

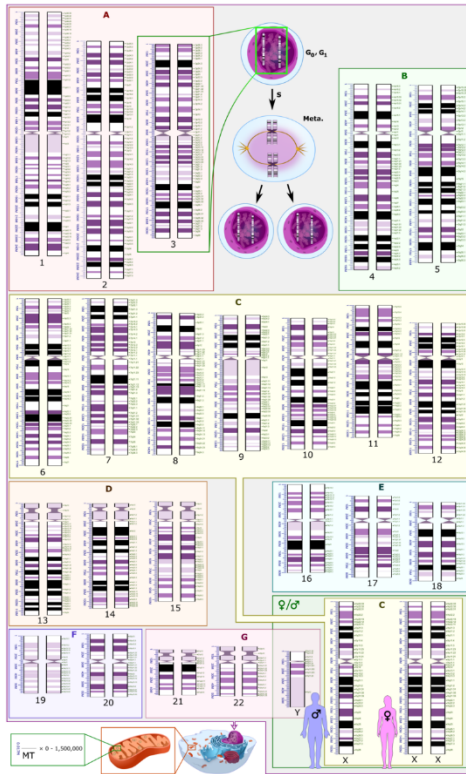


Рисунок 1. Графічне уявлення нормального людського каріотипу як ідіограм всіх його хромосом.

Хромосомна ідіограма (ISCN) - схематичне зображення, що показує розмір хромосоми та її смугастість. Смуги, що проявляються при фарбуванні хімічним розчином і їх видно в мікроскоп, використовуються для опису розташування генів на кожній хромосомі.

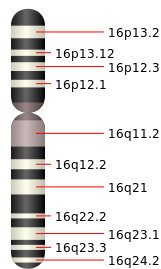


Рисунок 2 - 16 хромосома людини.

Ідіограма визначає місце окремих генів на хромосомах та пов'язані з хромосомними порушеннями патології. Для зображення генів використовується послідовна система нумерації, що починається із її центромери.

Крім генетичної, існує і фізична карта хромосоми.

Фізична карта хромосоми - це зображення фізичної відстані, в нуклеотидах, між генами або генетичними маркерами.

Хромосоми мають довгі та короткі плечі щодо центроміри. Маленька частина завжди позначається вгорі, більша частина внизу для зручності позначок та коментарів. Кожен кінець хромосоми потім ділиться на області (регіони), яким присвоюється свій номер. Номери областей збільшуються від центроміри до теломери - p1, p2, p3 і т. д. на короткому кінці, і q1, q2, q3 ... на довгому кінці. Області визначаються смугами, забарвленими методом Романовського-Гімзи, коли одні частини хромосоми забарвлюються (G-смуги), інші відкидають барвник (R-смуги). Якщо додаткове фарбування виявляє додаткові смуги в межах

пронумерованої області, то додається додаткова цифра, яка пишеться через точку - p12.1, p12.2, p12.3 ... і відповідно q22.1, q22.2, q22.3 ...

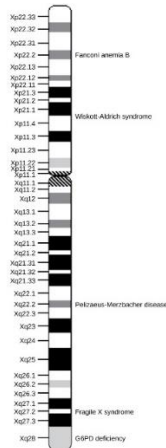


Рисунок 3 - фізична карта Х-хромосоми людини

Як карти генетичних зв'язків, так і фізичні карти необхідні для побудови повної картини генома. Наявність повної карти генома полегшує дослідникам вивчення окремих генів. Карти генома людини допомагають дослідникам у їх зусиллях ідентифікувати людські хвороботворні гени. Крім того, картографування генома може бути використано для виявлення організмів з корисними ознаками, такими як мікроби, здатні очищати забруднюючі речовини або навіть запобігати забрудненню. Дослідження, що включають картування генома рослин, можуть призвести до методів, які дають більш високі врожаї сільськогосподарських культур або до розвитку рослин, які краще адаптуються до зміни клімату.

Генетичні карти надають контури, а фізичні карти надають деталі. Легко зрозуміти, чому обидва типи методів геном-картографування важливі, щоб показати загальну картину. Інформація, отримана з кожної методики, використовується в комплексі для вивчення генома. Геномне картографування використовується з різними модельними організмами, які використовуються для досліджень.

2. Цілісне секвенування генома

Для розуміння багатьох захворювань дослідники використовують цілі секвенування генома. Цілісне секвенування генома - це процес, який визначає послідовність ДНК цілого генома. Для секвенування першого генома людини знадобилося 13 років, але тепер сучасні технології скоротили цей процес приблизно до 24 годин, хоча на аналіз і осмислення цих даних потрібно більше часу.

Приклади секвенування генома при хворобах:

А) 10-річна дівчинка, попередні сім років якої намагалися встановити діагноз, неодноразово госпіталізувалася до реанімації, протягом 307 відвідувань лікарні коштувала 356 571 фунт стерлінгів. Геномна діагностика дозволила їй пройти лікувальну трансплантацію кісткового мозку (вартістю 70 000 фунтів стерлінгів). Крім того, прогностичне тестування її братів і сестер показало, що інші члени сім'ї не наражались на ризик.

Б) Чоловік віком 60 років, який протягом багатьох років лікувався від серйозного захворювання нирок, включаючи дві трансплантації нирок. Вже знаючи, що його дочка успадкувала те саме захворювання, геномний діагноз, поставлений на основі аналізу всього геному для нього та його дочки, дозволив перевірити його 15-річну онучку. Це показало, що вона не успадкувала хворобу і може відмовитись від регулярних дорогих оглядів.

В) Дитина, яка серйозно захворіла відразу після народження і, на жаль, померла в чотири місяці. Аналіз всього його геному виявив серйозне порушення обміну речовин через нездатність приймати вітамін B12 усередині клітин, що пояснює його хворобу. Це дозволило запропонувати молодшому братові прогностичний тест протягом одного тижня після його народження. У молодшої дитини було діагностовано те саме захворювання, але його можна було лікувати щотижневими ін'єкціями вітаміну B12, щоб запобігти прогресуванню хвороби.

Встановлений діагноз допомагає отримувати цілеспрямованішу клінічну допомогу. Проводиться подальший сімейний скринінг, зміна дієти, забезпечення вітамінами та/або мінералами та інші методи лікування.

Велика кількість фундаментальних досліджень проводиться на модельних організмах. Модельний організм - це вид, який вивчається як модель для розуміння біологічних процесів в інших видах, які можуть бути представлені модельним організмом. Наприклад, фруктові мухи здатні метаболізувати алкоголь, як люди, тому гени, що впливають на чутливість до алкоголю, були вивчені у фруктових мух, що було спробою розуміння різниці чутливості до алкоголю у людини.

3. Використання геноміки

Геноміка зараз використовується в самих різних областях, таких як метагеноміка, фармакогеноміка та мітохондріальна геноміка. Найбільш відоме застосування геноміки - це зрозуміти та знайти ліки від хвороб.

А) Фармакогеноміка

Фармакогеноміка передбачає оцінку ефективності та безпеки лікарських засобів на основі інформації з геномної послідовності індивіда. Інформація про послідовність персональних геномів може бути використана для призначення ліків, які будуть найбільш ефективними та найменш токсичними на основі індивідуального генотипу пацієнта. Вивчення змін експресії генів може надати інформацію про профіль транскрипції гена в присутності препарату, який може бути використаний як ранній показник потенціалу токсичних ефектів. Наприклад, гени, що беруть участь у клітинному зростанні та контрольованої загибелі клітин, коли їх порушують, можуть призвести до зростання ракових клітин. Широкі дослідження генома також можуть допомогти знайти нові гени, що беруть участь у токсичності ліків.

Б) Метагеноміка

Традиційно мікробіологія викладається з тією метою, що мікроорганізми найкраще вивчаються в умовах чистої культури, що передбачає виділення одного типу клітини та культивування її в лабораторії. Оскільки мікроорганізми можуть пройти кілька поколінь за лічені години, їх профілі експресії генів дуже швидко адаптуються до нового лабораторного середовища. З іншого боку, багато видів чинять опір культивуванню ізолювано. Більшість мікроорганізмів живуть не як окремі утворення, а в мікробних спільнотах, відомих як біоплівки.

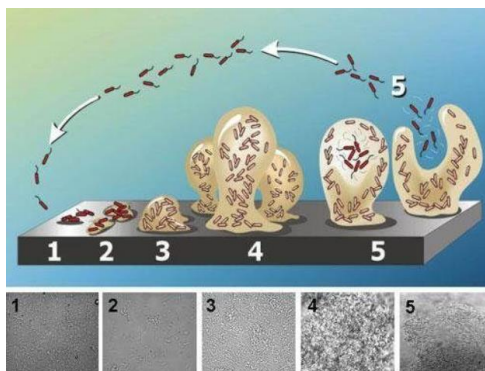


Рисунок 4 - Стадії формування біоплівки у *Pseudomonas aeruginosa*

- 1 – первинне прикріплення клітин до поверхні;
- 2 – незворотне прикріплення;
- 3, 4 – стадії дозрівання;
- 5 – дисперсія біоплівки.

Внизу кожен етап проілюстровано з мікрофотографіями в конфокальній лазерній скануючій мікроскопії.

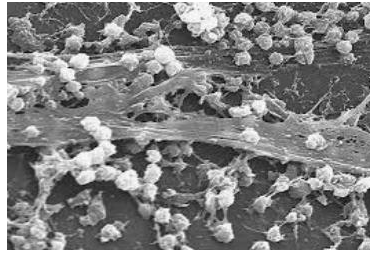


Рисунок 5 - *Staphylococcus aureus* в складі біоплівки на поверхні катетера.

З усіх цих причин чиста культура не завжди є найкращим способом вивчення мікроорганізмів. Метагеноміка - це вивчення колективних геномів декількох видів, які ростуть і взаємодіють в екологічній ніші. Метагеноміка може бути використана для більш швидкого виявлення нових видів і аналізу впливу забруднюючих речовин на навколишнє середовище

В) Мітохондріальна геноміка

Мітохондрії - це внутрішньоклітинні органели, які містять власну ДНК.

Мітохондріальна ДНК людини стала першою значною частиною людського геному, що вдалося секвенувати. Це секвенування показало, що мтДНК людини включає 16569 пар основ і кодує 13 білків.

Мітохондріальна ДНК мутує швидкими темпами і часто використовується для вивчення еволюційних зв'язків. Ще однією особливістю, яка робить цікавим вивчення геному мітохондрій, є те, що у більшості багатоклітинних організмів мітохондріальна ДНК передається від матері в процесі запліднення. З цієї причини для відстеження генеалогії часто використовується мітохондріальна геноміка.



Рисунок 6 - Схема мітохондріальної ДНК людини

Біологи можуть визначати, а потім порівнювати послідовності мтДНК різних видів та використовувати результати порівнянь задля побудови еволюційного дерева для вивчених видів.

Приклад 1:

Дослідження мітохондріальної ДНК, яка була виділена із зуба мастодонта (*Mammut americanum*), що мешкав на рівнинах Аляски 50 – 130 тисяч років тому, показує еволюційну історію мастодонтів, слонів та мамонтів.

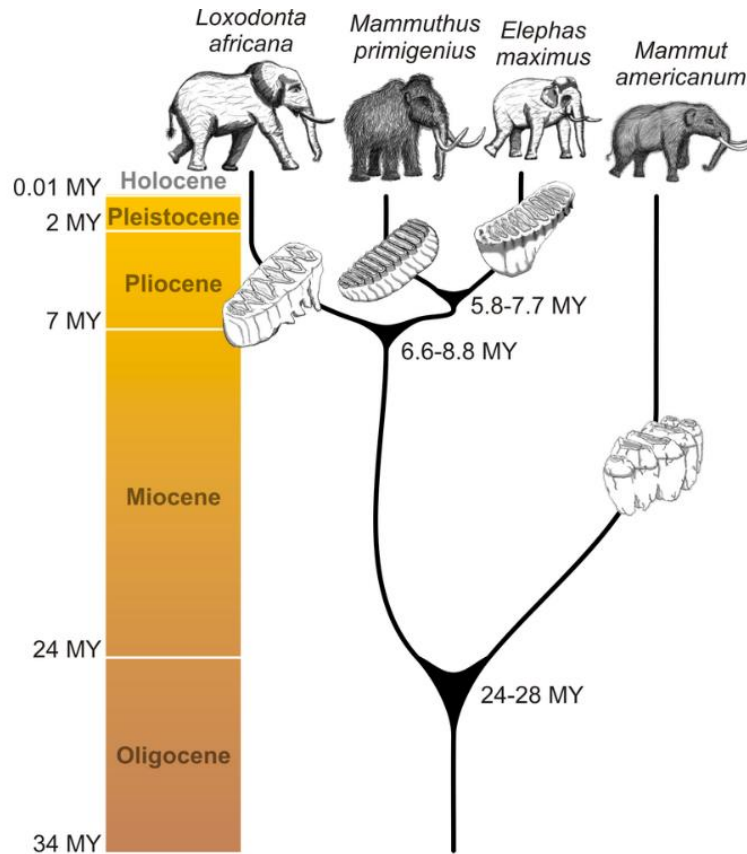


Рисунок 7 - Мітохондріальна геноміка хоботних. (джерело - Rohland N, Malaspina A-S, Pollack JL, Slatkin M, Matheus P, et al. (2007) Proboscidean Mitogenomics: Chronology and Mode of Elephant Evolution Using Mastodon as Outgroup. PLoS Biol 5(8): e207. [doi:10.1371/journal.pbio.0050207](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050207))

Приклад 2:

Хоча більшість ядерних генів у людей і шимпанзе майже тотожні, їхні мітохондріальні геноми розрізняються на 9,8 %. Мітохондріальні геноми людини і горили розрізняються на 11,8 %, що дозволяє припустити, що люди можуть бути тісніше пов'язані з шимпанзе, ніж з горилами.

Г) Геноміка в судмедекспертизі

Інформація та підказки, отримані із зразків ДНК, знайдених на місцях злочину, використовувались як доказ у судових справах, а генетичні маркери використовувались у криміналістичному аналізі. У 2001 році було опубліковано перше використання геноміки в криміналістиці. Це було спільними зусиллями між академічними науково-дослідними установами та ФБР, щоб вирішити загадкові випадки сибірської виразки, який був перевезений Поштовою службою США. Бактерії сибірської виразки були перетворені в інфекційний порошок і надіслані поштою ЗМІ та двом американським сенаторам. Порошок заразив адміністративний персонал і поштових працівників, які відкривали або обробляли листи.

П'ятеро людей померли, а 17 захворіли. Використовуючи мікробну геноміку, дослідники визначили, що конкретний штам сибірської виразки використовувався у всіх розсилках; в кінцевому підсумку джерело простежилося до вченого в національній лабораторії біозахисту в штаті Меріленд.

Д) Геноміка в сільському господарстві

Вчені використовують геномні дані для виявлення бажаних ознак, а потім передають ці риси іншому організму для створення нового генетично модифікованого організму. Вчені виявляють, як геноміка може поліпшити якість і кількість сільськогосподарської продукції. Наприклад, вчені можуть використовувати бажані риси для створення корисного продукту або покращення існуючого продукту, наприклад, роблячи чутливу до посухи культуру більш толерантною до сухого сезону.

4. Протеоміка

У хворому стані функція білка може бути порушена через зміни на генетичному рівні або через прямий вплив на конкретний білок.

Протеом - це весь набір білків, що виробляються клітиною. Вивчення функції протеомів називається **протеоміка**. Протеоміка доповнює геноміку і корисна, коли вчені хочуть перевірити свої гіпотези, засновані на генах. Незважаючи на те, що всі клітини багатоклітинного організму мають однаковий набір генів, набір білків, що виробляються в різних тканинах, різний і залежить від експресії генів. Таким чином, геном постійний, але протеом змінюється і є динамічним всередині організму. Крім того, РНК може альтернативно сплайсуватися, а багато білків після синтезу ще й модифікуються.

Мета протеоміки - проаналізувати різні протеоми організму в різний час, щоб виділити відмінності між ними.

Геноми і протеоми пацієнтів, які страждають специфічними захворюваннями, вивчаються для розуміння генетичної основи захворювання.

Наприклад, вміст білка в раковій клітині часто відрізняється від вмісту здорової клітини. Певні білки в раковій клітині можуть не бути присутніми в здоровій клітині, що робить ці унікальні білки гарними мішенями для протираккових препаратів.

Окремий білок називається **біомаркером**, тоді як набір білків зі зміненими рівнями експресії називається **білковою сигнатурою**.

Щоб біомаркер бул корисним як кандидат для раннього скринінгу та виявлення раку, він повинен виділятися в рідині організму, таких як піт, кров або сечу. Це дозволяє масштабно проводити скринінг неінвазивним способом. Актуальною проблемою використання біомаркерів для раннього виявлення раку є висока швидкість хибно-негативних результатів. Помилково-негативний результат - це негативний результат тесту, який повинен був бути позитивним. Іншими словами, багато випадків раку залишаються непоміченими, що робить біомаркери ненадійними. Деякі приклади білкових біомаркерів, що використовуються при виявленні раку, - CA-125 для раку яєчників та PSA для раку передміхурової залози.

Білкові сигнатури можуть бути більш надійними, ніж біомаркери для виявлення ракових клітин.

Протеоміка також використовується:

- для розробки індивідуальних планів лікування, що передбачає прогнозування того, чи буде людина реагувати на конкретні препарати та побічні ефекти, які може мати людина.
- для прогнозування можливості рецидиву захворювання.