

Komparativní genomika

Ačkoli je lékařská genetika logicky zaměřena na odhalování souvislostí mezi strukturálními a funkčními aspekty lidského genomu a patofyziologií lidských onemocnění, je logické, že v některých případech nelze z důvodů etických či logických testovat experimentální hypotézu přímo na lidských subjektech. Proto většina doposud objasněných zákonitostí genetiky a jejího vztahu k onemocněním byla původně objevena v modelových systémech. Těch je používána celá řada, od jednobuněčných organismů až po vyšší savce. Mezi klasické mnohobuněčné genetické modely patří *Caenorhabditis elegans* nebo *Drosophila melanogaster*, ale také zástupce rostlinné říše *Arabidopsis thaliana*. podrobněji se budeme věnovat dvěma savčím modelům, myši (*Mus musculus*) a potkanovi (*Rattus norvegicus*).

Doposud sekvenované savčí genomy



Obrázek 1. Doposud sekvenované savčí genomy

Komparativní genomika využívá dostupnosti sekvencí genomů člověka i modelových organismů k odhalování nových relevantních informací studiem genomů v globálním měřítku. Pomocí nástrojů komparativní genomiky je tak možné predikovat ještě neanotované lidské geny, jejichž existence je poté ověřena laboratorními metodami. Například nedávno byl objeven nový významný gen, kódující apolipoprotein A5 (APOA5) pomocí komparativní sekvenace oblasti jedenáctého lidského chromozómu odpovídající úsekům genomu myši a potkana, kde byl tento gen nejdříve identifikován. Celogenomové analýzy ukazují na přítomnost velkého množství evolučně konzervovaných sekvencí v genomech člověka a mnoha modelových organismů. Komparativní genomika samozřejmě není zaměřena jen na objevy nových genů, ale i dalších funkčních komponent genomu, jako jsou společné motivy pro vazbu transkripčních faktorů. Dva nejčastěji využívané nástroje pro tyto studie jsou VISTA (<http://www-gsd.lbl.gov/vista>) a PIPMAKER (<http://bio.cse.psu.edu/pipmaker>). Skrze internetová rozhraní těchto aplikací je možné vložit a analyzovat rozsáhlé sekvence (získané buď přímo sekvenací nebo z internetových databází) a zjišťovat přítomnost konzervovaných

úseků. VISTA má dokonce k dispozici již kompletní srovnání myšního a lidského genomu. Tyto aplikace mohou být používány pro odhalování genů, regulačních sekvencí a také jako základ pro zkoumání evolučních souvislostí jednotlivých druhů.

Dokonce i databáze zaměřené na genomy modelových organismů mají inkorporovány komparativně genomické moduly - jako příklad uveďme virtuální komparativní mapu VCmap (<http://rgd.mcw.edu/VCMAP>) na serveru Rat Genome Database. S její pomocí je možné vygenerovat komparativní mapu vybrané části lidského, potkaního a myšního genomu díky algoritmům využívajícím kombinace informací uložených v internetových referenčních databázích map a sekvencí.

Právě komparativní genomika ukázala, že alespoň na úrovni sekvence DNA jsou člověk a primáti evolučně blíže hlodavcům, než ostatním savcím modelům (prase, pes). Potkaní a myšší modely poskytují celou řadu výhod z hlediska experimentálního zkoumání geneticky determinovaných znaků - předně máme možnost **cíleného křížení a produkce dostatečného množství potomstva** pro segreganční analýzu, dále je podstatná možnost standardizace a cílená manipulace podmínek vnějšího prostředí (např. podávání diet o speciálním složení, léků, změny v teplotě prostředí, režimu světlo/tma apod.). Velmi často pracujeme s **inbredními kmeny** zvířat, která jsou v rámci jednoho kmene a pohlaví geneticky identická (odpovídá genetické (nikoli epigenetické!) identitě monozygotických dvojčat), což odbourává problematizující faktor genetické různorodosti lidských kohort. V současné době patří asi mezi hlavní výhody využití modelů možnost cílené modifikace genomu v podmínkách živého organismu a zpětné sledování dopadů takové změny. Naopak mezi nevýhody patří např. fakt, že souvislosti zjištěné u modelového organismu nelze samozřejmě přímo převádět do kontextu lidského, ale je potřeba pečlivé validace.

Nejčastěji používané typy experimentálních kmenů potkana a myši a konkrétní příklady jejich využití v lékařské genetice a genomice jsou náplní e-learningové prezentace "Základy experimentální genetiky", zde uvádíme jen stručný přehled:

Kongenní kmeny jsou takové kmeny, u nichž je cíleně vnesena část genomu jednoho inbredního kmene (kmen A) na genetické pozadí inbredního kmene druhého (kmen B). Jelikož i kongenní kmen je inbrední, tedy homozygotní v rozsahu celého genomu, jediným genetickým rozdílem mezi kmenem B a kongenním kmenem B.AX (kde X je konkrétní číslo chromozómu) je právě tzv. diferenciální segment chr.X. Pokud se kmeny B a B.AX liší v nějakém fenotypickém znaku (hmotnost, glykémie, nebo citlivost na teratogen), je možné usuzovat, že právě v diferenciálním segmentu je gen nebo geny, podílející se na genetické determinaci měřeného znaku.

Konsomické kmeny jsou speciálním případem kongenních kmenů. Diferenciální segment je představován celým chromozómem.

Rekombinantní inbrední kmeny představují velmi robustní model pro segreganční a vazebnou analýzu. Křížením parentální generace dvou inbredních kmenů získáme první filiální generaci - F1, jejíž jedinci jsou z definice identičtí, heterozygotní v celém rozsahu genomu. Křížením jedinců F1 získáme druhou filiální generaci, ve které dojde jak k segregaci alel obou parentálních kmenů, ale i vloh pro zkoumané znaky. Poté náhodně vybereme dvojici samec-samice z F2 populace, které se stanou základem pro jednotlivé budoucí rekombinantní inbrední kmeny. Toho se dosáhne klasickým inbreedingem, tedy opakovaným křížením bratr x sestra po více než 20 generací. Takto ustavené kmeny jsou inbrední, každý

kmen ve svém genomu nese specifickou kombinaci alel parentálních kmenů. Jedna ze světově nejvyužívanějších sad rekombinantních inbredních kmenů potkana, sada HXB a BXH, vznikla na Ústavu biologie a lékařské genetiky ve spolupráci s Fyziologickým ústavem Akademie věd ČR v osmdesátých letech 20. století.

Do genomu **transgenních kmenů** je vnesen pomocí vektoru gen, který je následně transgenním zvířetem exprimován (pokud je gen vnesen společně s tkáňově specifickým promotorem, pak k expresi může docházet jen v určité tkáni). Vnesený gen nemusí nutně pocházet ze stejného druhu, speciálně u myši jsou časté transgenní modely exprimující lidské geny ("humanized mice").

Tzv. "knock-out" a "knock-down" modely jsou k dispozici prozatím pouze u myši. U těchto modelů dochází buď k úplnému vyřazení genu z funkce ("knock-out") nebo k utlumení jeho exprese pomocí mechanismu RNA interference("knock-down", viz heslo v glosáři).