

# MOLEKULARNA BIOLOGIJA – MIKRO MREŽE

Radovan Komel

Lani, februarja 2003, je preteklo natanko petdeset let, odkar sta James Watson in Francis Crick v znanstveni reviji *Nature* objavila razkritje dvojnoverižne vijačne strukture DNA, osnovne komponente genomov vseh organizmov na Zemlji, in njene vloge kot informacijske molekule življenja. Malo pred tem, pred tremi leti, sta mednarodni konzorcij 'Projekt človeški genom' in zasebna družba 'Celera Genomics' v revijah *Nature* in *Science* ločeno, vendar istočasno objavila osnutka nukleotidnega zaporedja 3 milijarde nukleotidov velikega človeškega genoma in napovedala začetek obdobja 'funkcijske genomike', ko bomo raziskali vlogo in delovanje vseh 35.000 – 40.000 človeških genov in tako morda razumeli kako deluje celica, kako se je razvilo življenje in kakšne so poti nadaljnje evolucije. Že pred tridesetimi leti so znanstveniki odkrili način rezanja molekul DNA na manjše fragmente in njihovega združevanja v poljubna nova zaporedja in tudi vnašanje omenjenih fragmentov DNA v različne organizme, kjer so se v primeru, ko je šlo za gene, ti lahko izrazili v obliki svojih proteinskih produktov. Z genskim inženirstvom smo do danes pridobili že vrsto rekombinantnih beljakovin, ki jih medicina uporablja za zdravljenje številnih bolezni, pa tudi industrijskih encimov, ki jih uporabljamo v kemični, predelovalni in prehrabeni industriji. Z vnosom novih genov nam je uspelo ustvariti transgenske rastline in živali, na področju medicine je prišlo do prave revolucije v diagnostiki bolezni in pri napovedovanju nagnjenja k nekaterim boleznim, veliki pa so tudi obeti na področju tako imenovanega 'genskega zdravljenja'. Seveda se ob vseh teh uspehih pojavljajo tudi dvomi o možnih zlorabah znanstvenih dognanj, ki jih spremljajo številna etična vprašanja. Rojstvo ovčke Dolly in sedanje polemike o možnostih kloniranja človeka ter o raziskavah izvornih celic za tako imenovano 'terapevtsko kloniranje', ki naj bi medicini prineslo zmagoslavje nad nekaterimi, danes še neozdravljivimi boleznimi, so dogodki, ki močno odmevajo v najširši javnosti.

Rak je brez dvoma bolezen, ki zavzema eno od prvih mest, ko govorimo o svojem zdravju in življenjskih pričakovanjih. Še vedno velja za skrivnostno in neozdravljivo bolezen. Vzbuja vsesplošno zaskrbljenost, kar ni presenetljivo, če vemo, da se vsak tretji prebivalec razvitega sveta slej kot prej sreča z njim in, če se bo sedanji trend nadaljeval, bo vsak četrty za njegovimi posledicami tudi umrl. Že od leta 1914, ko je Theodor Boveri namignil, da bi vzrok lahko bil v poškodbah kromosomov, vemo, da gre za genetsko bolezen, vendar se je znanje o njenih molekularskih osnovah začelo nabirati šele z že omenjenim odkritjem strukture DNA in doseglo vrhunec v zadnjih dveh desetletjih, vzporedno s sistematičnimi raziskavami človekovega genoma. Že pred desetimi leti smo

tako začeli dobivati samozavestno prepričanje, da bolezen ni več skrivnost in da znanost pluje v varen pristan dokončnega spoznanja: rak nastane zaradi kumulativnih mutacij, ki spremenijo specifična mesta v celični DNA, kar ima za posledico navzočnost strukturno in funkcijsko spremenjenih proteinov, ki izhajajo iz spremenjenih genskih zapisov. To se zgodi, če mutacije prizadenejo dve vrsti genov. Prvi so tako imenovani 'tumorje zaviralni geni' (angl. tumor suppressor genes), ki nosijo zapis za proteine, zaviralce delitvenih aktivnosti celice. V tem primeru mutacije povzročijo neaktivnost ali celo odsotnost zaviralnih proteinov. Druga vrsta genov pa so tako imenovani 'onkogeni', ki so z mutacijami aktivirani proto-onkogeni, geni, ki v normalnih razmerah nosijo zapis za proteine medceličnega in znotrajceličnega signaliziranja, proteine celičnega cikla in delitve DNA oz. celice ter proteine, ki uravnavajo izražanje genov. Mutacije v teh genih povzročijo, da so njihovi proteinski produkti tako spremenjeni, da so preveč aktivni, ali pa vplivajo na uravnavanje njihovega izražanja, kar ima za posledico navzočnost (v nepravem času in na nepravem mestu) prevelikih količin sicer normalnih proteinov, spodbujevalcev celičnega metabolizma, rasti in delitve. V telesu mora več kot deset milijonov milijard celic sodelovati v zapleteni mreži medsebojnih komunikacij in uravnavanja delovanja, da bi človek doživel zdrav in čil svojih osemdeset let. Če se v katerikoli celici zgodi mutacija, ki tej celici podeli prednost pri rasti in boljšo prilagodljivost v trenutnih razmerah, potem bo taka celica rastle in se delila hitreje od celic svoje okolice – izoblikuje se klon spremenjenih celic, ki lahko pomeni 'predrakavo stanje'. Če so take celice genetsko bolj labilne od svoje okolice, in navadno zaradi hitrejše delitve tudi so, se lahko zgodi, da bo v neki od njih prišlo do druge mutacije, ki bo tej podelila še hitrejšo rast oziroma delitev in nastal bo subcelični klon. To se lahko v obdobju življenja posameznika nekajkrat ponovi, dokler neka celica popolnoma ne pobegne iz omejitev svoje rasti in ustvari kolonijo v sosednjem tkivu prizadetega organa. V končni fazi svojega razvoja rak lahko izloča skrajno mutirane celice tudi v krvni obtok in te nato ustvarijo nove kolonije v drugih telesnih organih, kjer začnejo ogrožati življensko pomembne funkcije organizma. V celični kulturi se človeške celice prenehajo deliti po 50-70 generacijah, kar bi v telesu zadostovalo, da bi zdravo živeli vsaj sto let. Rakave celice pa nasprotno pridobijo nekakšno 'nesmrtnost', nekatere vsaj deloma z ohranjanjem svojih telomer, saj ne poznajo več omejitev rasti in delitve po izpolnjenem številu celičnih generacij. Lawrence A. Loeb je leta 1974 predpostavil, da med razvojem raka genetsko labilne, hitro deleče se celice doleti ogromno število naključnih mutacij, 10.000 do 100.000 na celico, kar je neprimerljivo večje število od podobnih dogodkov v normalnih celicah okolnega tkiva, v katerih tudi sicer neoporečno delujejo mehanizmi popravljanja poškodb pri delitvi DNA. Večina celic razvijajočega se raka zato umre, vendar se lahko zgodi, da jih nekaj preživi, saj so akumulirale 'prave' mutacije za njihov nadaljnji razvoj v nove in še bolj invazivne subklone. In v resnici večina tumorjev niso masa identičnih klonov, saj njihova natančnejša preiskava razkrije presenetljivo genetsko raznolikost njihovih celic, med katerimi najdemo tudi take, ki bi jih zlahka lahko imenovali ne več človeške, temveč celice nove življenske vrste. Potem, ko je leta 1971 Alfred G. Knudson

ugotovil, da sta za inaktivacijo nekega zaviralnega gena potrebni najmanj dve mutaciji, vsaka na enem od obeh genskih alelov, in s tem postavil hipotezo o 'dveh zadetkih', so znanstveniki, med njimi tudi velik zagovornik hipoteze o 'večih zadetkih' Robert A. Weinberg, prišli do spoznanja, da mora biti prizadetih vsaj pet do šest različnih sistemov nadzora, da celica preide v popolno maligno rast. Med temi sistemi sta tudi člana že omenjene začetne dogme o inaktivaciji zaviralnih genov in aktivaciji onkogenov, ki je doživela popravek z vključitvijo predhodnjih motenj v genih, ki nosijo zapis za proteine popravljanja napak pri delitvi DNA. Če se napake ne popravljajo, se nove mutacije, med njimi tudi tiste v onkogenih in zaviralnih genih, ohranjajo in prenašajo v nove celične generacije. Kmalu se je pridružila še teorija o 'zgodnji genomski nestabilnosti', ki predpostavlja, da nekaj utiša enega ali več še neznanih genov upravljavcev celične delitve, kar naj bi imelo za posledico, da nekatere hčerinske celice pridobijo napačno število kromosomov, nekatere pa kromosome z manjkajočimi ročicami in nekatere druge celice kromosome z dodanimi segmenti. Nepravilnosti se slabšajo iz ene celične generacije v drugo, s tem pa se v posameznih celicah tudi kopiči število nekaterih genov (npr. onkogenov), nekateri drugi geni (npr. zaviralni geni) pa izginjajo. Sčasoma zato koncentracija zaviralnih proteinov pade pod kritično vrednost, koncentracija onkoproteinov pa nevarno naraste. Tej teoriji je v zadnjih letih začela konkurirati teorija o 'vsesplošni aneuploidnosti', ki pravi, da napaka pri celični delitvi povzroči nastanek aneuploidnih celic, to je celic z nenormalnim številom kromosomov, ki zato doživijo velike spremembe v količini tisočerihih genov, to pa ima za posledico primanjkljaj celih skupin encimov, ki so v normalnih celicah udeleženi pri podvajanju in popravljanju DNA. Večina aneuploidnih celic zato umre, nekaj pa jih vseeno preživi in njihove hčerinske celice morda lahko pridobijo sicer nenavadno kombinacijo kromosomov, ki jim podeli rastne prednosti glede na normalne celice njihovega neposrednega okolja.

Molekularni biologi so postavili hipotezo, da 4-10 mutacij v 'pravih genih' lahko usodno spremeni katerokoli celico. Seznam ugotovljenih 'rakovornih mutacij' se je do danes razširil na več kot 100 onkogenov in 15 tumorje zaviralnih genov. Kljub temu pa dve desetletji naporov, da bi ugotovili ključne gene ali specifičen vzorec mutacij, ki bi bil splošno značilen za večino oblik raka pri človeku, nista prinesli uspeha. Weinberg in William C. Hahn sta tako v novembrski številki revije *New England Journal of Medicine* iz leta 2002 resignirano ugotovila, da je zelo verjetno, da je vsak tumor edinstven glede vzorca svojega genetskega 'izmreženja'. Celo tega ne vemo, kaj je izvorni dogodek: mutacije ali aneuploidnost? Kakšna je pri tem vloga epigenetskih dejavnikov in časovni izpostavljenosti dejavnikom iz okolja? Vemo, da je rak predvsem bolezen starejših ljudi, vendar kljub temu večina ljudi doživi starost, ne da bi zboleli za to boleznijo. Zagotovo v življenjskem obdobju kar lepo število med desetimi milijoni milijard naših telesnih celic akumulira vzorec mutacij, ki bi jih lahko povedel v razvoj tumorja, pa vendar bo manj od polovice prebivalstva doživelo bolezen, ki bi bila usodna. Tudi pri naših raziskavah adenokarcinoma želodca smo ugotovili, da se v potencialnih predrakavih spremembah kot so kronični

atrofični gastritis, razjeda želodca, želodčna metaplazija in displazija, pojavlja jo spremembe pri izražanju nekaterih onkogenov, ki so sicer značilne za tumor in njegove napredovale oblike. In vendarle je znano, da večina omenjenih sprememb ne preide v maligno rast. Izkazalo se je, da raziskave, ki so se usmerjale na iskanje posameznih 'genov raka', niso prinesle dovolj velikega napredka pri razumevanju te bolezni, da bi jo lahko zanesljivo prepoznavali in tudi obvladali, čeprav smo pri tem odkrivali mutacije in ugotavljali njihov vpliv na mehanizme delovanja nekaterih genov.

Spremembo v razmišljanju je prinesla funkcijska genomika. Njen namen ni samo ugotoviti biokemijsko sestavo in vlogo vseh 35.000 – 40.000 genov človeškega organizma in njihovih proteinskih produktov, temveč tudi, kako ti geni in proteini med seboj komunicirajo v zapleteni mreži soodvisnosti. Začeli smo govoriti o 'transkriptomih', ki pomenijo sliko sočasnega izražanja vseh genov v neki celici v trenutnih fizioloških razmerah, ter o 'proteomih', ki so slika trenutne navzočnosti vseh celičnih proteinov in tudi njihovih interakcij. Zadeva je podobna opazovanju nočnega mesta z ljubljanskega gradu: luči, ki v raznih barvnih odtenkih in z različno močjo svetijo ob osmi uri zvečer, ustvarjajo slikovni vzorec mesta, ki bi mu lahko, če bi namesto njih šlo za 'sijaj' genov, ki se v tem trenutku izražajo, rekli 'transkriptom'. Tako pa imamo pred seboj le 'fiziološko podobo stanja mesta ob osmi uri zvečer'. Ob dveh zjutraj bo vzorec mestnih luči popolnoma drugačen in bo izdajal 'fiziološko stanje' mesta ob tej uri. Če v neki ulici pride do večje okvare nekega releja, se bo vzorec luči v omenjeni ulici in ožji okolici nekoliko spremenil, če bo okvara večja, pa bo to lahko vplivalo na celo mestno četrt ali celo širše. Da bi odpravili napako, se podamo na vid(e)no mesto okvare, poiščemo vzrok in poskusimo vzpostaviti prejšnje stanje.

Enako ravna tudi nova veda, ki jo imenujemo 'transkriptomika'. Njeno orodje so DNA-čipi oziroma mikro-mreže. Na pol do nekaj kvadratnih centimetrov veliko stekleno, silikonsko ali najlonsko ploščico je vezano veliko število različnih nukleotidnih zaporedij, ki jim rečemo 'sonde', 'lovke' ali 'probe'. Ta zaporedja, ki odgovarjajo značilnim delom preiskovanih genov, so urejena kot mikroskopsko gosta mreža točk z natančno določenim položajem na nosilcu. Sonde so navadno enoverižni, nekaj deset nukleotidov dolgi sintetični oligonukleotidi ali s polimerazno verižno reakcijo (PCR) pomnoženi deli preiskovanih genov. Posamezen gen je zastopan z najmanj tremi različnimi sondami, ki odgovarjajo različnim predelom njegovega nukleotidnega zaporedja. Mikromreže z nizko gostoto (angl. low-density microarrays) pripravimo tako, da sonde na nosilec (npr. stekleno ploščico) nanašamo s pomočjo robota, ki nanašalno iglo potopi v raztopino posamezne sonde (ta je navadno pripravljena v enem od 96-ih žepkov mikrotitrne ploščice) in se nato z njo dotakne površine nosilca in s tem nanj, na točno določeno mesto, prenese majhen volumen vzorca. Pred potopom v naslednji žep mikrotitrne ploščice, torej pred postopkom nanosa druge sonde, robot iglo seveda temeljito spere in s tem z nje odstrani sledove prejšnje sonde. Po končanem nanosu vseh sond le-te na nosilec trdno kovalentno vežemo z ultravijolično svetlobo. Na ta način lahko na površini pol kvadratnega centimetra ustvarimo mrežo nekaj tisoč točk, 'zastopnikov' nekaj

tisoč različnih genov. Nekoliko drugačna je priprava mikromrež z visoko gostoto (angl. high-density microarrays), ki so večinoma namenjene analizam celotnega genoma. Na poenostavljen način postopek lahko razložimo takole: Površina nosilca je prevlečena s fotolabilnim zaščitnim premazom, ves čip pa je pokrit z masko, ki ima mikronske okence. Ko skozi to okence posvetimo z ultravijolično svetlobo, ta na površini enega mikrona s površine nosilca odstrani zaščitni premaz in na tem mestu omogoči kemijsko sintezo in pritrditev večjega števila molekul specifičnega oligonukleotida, predstavnika nekega gena. Okence nato robot premakne na sosednji mikronski položaj in postopek se ponovi, tokrat za nek drug programirani oligonukleotid. Vsak gen običajno predstavlja 20 različnih 25-mernih oligonukleotidov, kar močno izboljša specifičnost in zanesljivost analize. Zaradi zapletenega postopka so visokogostotne mikromreže zelo drage, vendar, kot rečeno, omogočajo analize celotnega genoma oziroma transkriptoma, saj so danes že dostopni komercialni visokogostotni bio-čipi, kjer so na samo treh čipih zastopani vsi potencialni geni človeškega genoma, pojavljajo pa se tudi 'tematski čipi' (npr. 'onkočipi') z deset- ali dvajsettisočimi geni, ki so kandidati za različna fizio-patološka stanja.

Analiza transkriptoma temelji na postopku hibridizacije nukleinskih kislin. Iz tkiva, ki ga želimo analizirati, najprej izoliramo celokupno mRNA in nato z reverzno transkriptazo izdelamo stabilnejše enoverižne kopije komplementarnih DNA (cDNA). Pri tem vanje vgrajujemo s fluorescentnim barvilom označene nukleotide. Komplementarne DNA iz tumorskega tkiva bomo npr. označili z rdečim fluorescentnim barvilom, cDNA iz okolnega normalnega tkiva pa zeleno. S tako pripravljenima raztopinama označenih cDNA bomo preplavili mikro-mrežo. Ker je v vsaki točki mikromreže, ki predstavlja sondo za nek gen, veliko število molekul te sonde, bodo zeleno in rdeče označene cDNA tekmovala za vezavo na na nosilcu oz. v eni točki pritrjene molekule sonde. Če se bo vezalo več zeleno označenih sond, se bo točka obarvala zeleno in to bo pomenilo, da se preiskovani gen bolj izraža v zdravem tkivu kot v tumorskem. Obratno bo, če se gen bolj izraža v tumorskem tkivu; v tem primeru se bo točka obarvala rdeče. Po končani analizi dobimo sliko tisočerih točk, ki žarijo v različnih barvnih odtenkih in različnih intenzitetah in računalnik nam bo lahko za vsako točko/gen izračunal stopnjo genskega izražanja v normalnem oziroma tumorskem tkivu in seveda tudi razlike med obema vrstama tkiv.

Vendar se transkriptomika ne ustavi pri informaciji za posamezne gene. Funkcijska genomika je namreč veda, ki celico in dogajanja v njej obravnava sistemsko. Računalnik namreč 've', kakšnim genskim družinam (glede na njihove proteinske produkte) pripadajo posamezni geni, ki so zastopani na mikromreži. Zato bo zelene, rdeče in rumene točke grupiral v ustrezne skupine, imenovane 'grozdi' (angl. clusters) in na računalniškem zaslonu se izriše slika, ki nam že na prvi pogled lahko pove kaj več o fiziološkem stanju celice, v našem primeru npr. o obliki ali stadiju tumorja, saj se tako oblikovane slike razlikujejo od primera do primera. Naloga transkriptomike je sedaj preiskati transkriptome čim večjega števila vzorcev neke bolezni in tako bomo morda že

v bližnji prihodnosti dobili bio-čipe, ki bodo poleg raziskovalne imeli tudi diagnostično in prognostično vrednost.

Transkriptom je lahko zelo informativen o trenutnem sistemskem izražanju genov, lahko nas tudi usmeri v raziskovanja posameznih genov, pri katerih opazimo velika odstopanja njihovega izražanja v različnih fizioloških razmerah in jih zato začnemo obravnavati kot 'ključne gene' za nastanek in razvoj neke patologije. Resnična slika stanja neke celice pa je vendarle proteom, saj so proteini tisti, ki izgrajujejo celično strukturo in v zapleteni mreži interakcij in sporazumevanja opravljajo njene življenske funkcije. 'Transkriptomika' je veda, ki preiskuje navzočnost proteinov v celici, išče razlike v njihovih količinah in navzočnosti in raziskuje njihove medsebojne interakcije – s pogledom na celico kot sistem. Z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo in primerjavo elektroferogramov patološko spremenjenega tkiva z normalnim lahko pridobimo diferencialne proteinske karte, ki kažejo razlike v navzočnosti stoterih ali tisočerih proteinov med obema vrstama tkiv. Proteine, ki kažejo te razlike, lahko iz gela izrežemo in jih analiziramo oziroma identificiramo z masno spektrometrijo. Dobimo seznam proteinov, med katerimi so lahko tudi številni 'anonimni', kar pomeni, da nam je računalnik s primerjavo njihove ugotovljene aminokislinske strukture s podatki iz mednarodnih podatkovnih baz, ki temeljijo na spoznanjih in predvidevanjih raziskovanja človeškega genoma, predlagal sorodnost oziroma podobnost s proteini iz omenjenih datotek. Ta seznam proteinov nam lahko pomeni nekakšen 'proteom', ki ga lahko vzporedimo s transkriptomom iz predhodne analize, in koreliranje obeh nam bo verjetno dalo bolj zanesljive podatke o stanju celice kot bi jih sicer dobili samo iz prej opisane analize transkriptoma.

Projekt človeški genom je svojo prvo stopnjo zaključil z ugotovitvijo tri milijarde velikega zaporedja nukleotidov človeškega genoma in predvidel, da ta vsebuje 35.000 – 40.000 različnih genov, ki naj bi nosili zapise za lahko tudi več stotisoč različnih proteinov. Danes bolj podrobno poznamo biokemijsko strukturo in način delovanja samo nekaj sto oziroma nekaj tisoč proteinov, če pri tem upoštevamo njihove tkivne in medvrstne različice. Nobelovi nagrajenci so še pred nekaj leti, pred nastopom funkcijske genomike, predvideli, da bomo za prepoznanje strukture in vloge vseh proteinov človeškega telesa potrebovali nadaljnjih 150 – 300 let. Projekt človeški genom in funkcijska genomika pa sta prinesla visoko zmogljive tehnologije nove generacije, ki bo skupaj z informacijsko tehnologijo močno skrajšale to obdobje. Analize transkriptomov in začetni koraki v proteomiki nam že danes omogočajo razpoznavanja proteinov, ki morda igrajo ključne vloge pri uravnavanju in razvoju nekaterih fizio-patoloških procesov, kar usmerja raziskovanja v 'prioritetne proteine' in naše misli v bodoče proteinske mikromreže, s katerimi bo mogoče raziskovati ne samo celična proteinska stanja temveč tudi interakcije, ki v mreži soodvisnosti oblikujejo življenje neke celice. Na teh osnovah bomo začeli prepoznavati ključna vozlišča uravnavanja življenskih procesov in z modeliranjem struktur morda že v bližnji prihodnosti lahko tudi ustvarjali molekule, s katerimi bomo učinkovito in obenem zelo selektivno, brez stranskih učinkov, vplivali na omenjena dogajanja.

Medicinski center za molekularno biologijo Medicinske fakultete v Ljubljani je vključen v raziskave s področja funkcijske genomike. Ustanovili smo slovenski konzorcij za pripravo in analizo bio-čipov, v katerega je vključenih 13 laboratorijev iz naših univerzitetnih in kliničnih ustanov ter raziskovalnih inštitutov in farmacevtske industrije. Na Medicinski fakulteti je v izgradnji nacionalni infrastrukturni center za bio-čipe, zato v tem trenutku raziskave potekajo v najetih prostorih na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Z mikromrežami nizke gostote, ki jih izdelujemo sami, med drugim raziskujemo tudi celične procese, ki bi lahko bili povezani z onkogenezo, že v bližnji prihodnosti pa bomo raziskave nadgradili tudi z uporabo tehnologije visokogostotnih mikromrež, kar smo do sedaj in preliminarno izvajali v sodelovanju s tujimi raziskovalnimi ustanovami. V okviru teh sodelovanj smo pričeli tudi z raziskavami na ravni proteoma in že v tem letu bomo aktivno posegli v snovanje novih tehnologij za izdelavo proteinskih mikromrež. Upamo, da bomo v naslednjih letih prispevali k novim spoznanjem o nastanku in razvoju raka in tudi to, da bomo z našim znanjem lahko izdelovali bio-čipe, ki bodo v pomoč pri natančnejši diagnostiki in prognostiki nekaterih oblik te hude bolezni.

## Literatura

1. Hahn C. and Weinberg R.A.: Rules for making human tumor cells. *N. Eng. J. Med.* 347(20) (2002) 1593-1603.
2. Loeb L.A., Loeb K.R. and Anderson J.P.: Multiple mutations in cancer. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 100(3) (2003) 776-781.
3. Gibbs W.W.: Untangling the roots of cancer. *Sci. Am.* 289(1) (2003) 48-57.
4. Brown S.M., Hay J.G., Ostrer H.: *Essentials of Medical Genomics*. Willey-Liss, Inc., Hoboken, New Jersey, 2003.
5. Hunt S.P. and Livesey F.J.: *Functional Genomics – A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, 2000.