POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 39 2012 NR 1 (112-118)

ZABURZENIA GENOMOWE – KONSEKWENCJE KLINICZNE I ZASTOSOWANIE W DIAGNOSTYCE*

GENOMIC REARRANGEMENTS – CLINICAL AND DIAGNOSTIC ASPECTS

Małgorzata JARONIEC[1], Danuta OSTALSKA-NOWICKA[2]

[1]Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, [2]Klinika Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Warianty genomowe, obok zmian epigenetycznych uwarunkowanych przez czynniki środowiskowe i behawioralne, stanowią przyczynę zmienności wewnątrzgatunkowej. Przekształcenia genomowe mogą przyczyniać się do rozwoju chorób mendlowskich oraz nieistotnych z klinicznego punktu widzenia polimorfizmów, do których należą między innymi polimorfizmy pojedynczego nukleotydu oraz polimorfizmy zróżnicowania liczby kopii. Przekształcenia w ludzkim genomie powstają w wyniku czterech procesów: nie-allelicznej homologicznej rekombinacji, nie-homologicznego łączenia końców, blokowania widełek i przełączania matrycy oraz replikacji indukowanej przez pęknięcia w rejonach mikrohomologii. Zaburzenia w genomie mogą także powstawać w wyniku retrotranspozycji z udziałem mRNA. Zautomatyzowane metody badania zaburzeń genomowych są obecnie szeroko stosowane w diagnostyce molekularnej. Służą zarówno identyfikacji zmian w DNA, jak i badaniu uwarunkowanej genetycznie odpowiedzi na leki. Wiedza na temat zmian w nici DNA oraz mechanizmów ich powstawania służy rozwojowi diagnostyki, dzięki czemu szanse pacjentów na odzyskanie zdrowia są znacznie większe.

Słowa kluczowe: Warianty genomowe, polimorfizmy, rekombinacja, diagnostyka molekularna

Summary: Apart from epigenetics associated with environmental and behavioral factors, genetic variants contribute to human variation and may cause either disorders or neutral polymorphisms, such as single nucleotide polymorphisms and copy number variants. Genome rearrangements include different regions of DNA, from single base pair to chromosomal regions of millions of nucleotides. There are four main mechanisms of genetic variants origin: non-allelic homologous recombination, non-homologous end-joining, fork stalling and template switching and microhomology mediated break induced replication. mRNA retrotransposition may also lead to some genome rearrangements. Molecular diagnostic is currently based on automated techniques that identify DNA variants and predict treatment response dependent on genetic factor. Knowledge in the field of genetic variants contributes to molecular diagnostics that improve life conditions of patients.

*Praca dofinansowana z grantu nr 0060/B/P01/2008/35

Key words: genetic variants, polymorphisms, recombination, molecular diagnostic

Wykaz skrótów: **CNV** – (ang. *copy number variation*) – polimorfizmy zróżnicowania liczby kopii, **LCR** – (ang. *low–copy repeats*) – powtórzenia małej liczby kopii, **CCR** – (ang. *complex chromosomal rearrangenemts*) – złożone przekształcenia chromosomów, **NAHR** – (ang. *non–allelic homologous recombination*) – nie–alleliczna homologiczna rekombinacja, **NHEJ** – (ang. *non–homologous end–joining*) – nie–homologiczne łączenie końców, **FoSTeS** – (ang. *fork stalling and template switching*) – model blokowania widełek i przełączania matrycy, **MMBIR** – (ang. *microhomology-mediated break-induced replication)* – replikacja indukowana przez pęknięcia w rejonach mikrohomologii, **DSB** – (ang. *double strand break*) – naprawy dwuniciowych pęknięć DNA, **LOH** – (ang. *loss of heterozygosity*) – utrata heterozygotyczności, **SNP** – (ang. *single nucleotide polymorphisms*) – polimorfizmów pojedynczego nukleotydu

ZŁOŻONOŚĆ GENOMU LUDZKIEGO I TYPY ZMIAN W SEKWENCJI DNA

Analiza podłoża genetycznego danej choroby wymaga szczegółowego poznania struktury genomu, jego zmienności oraz konsekwencji, jakie niosą za sobą obserwowane cechy materiału genetycznego. Elementy różnicujące przedstawicieli jednego gatunku określane są mianem wariantów genomowych, których dystrybcja zależy od mutacji, selekcji, dryfu genetycznego, rekombinacji, migracji oraz demografii populacji [5]. Obok wariantów genomowych, różnorodność fenotypowa ludzi wynika ze zmian epigenetycznych powiązanych z czynnikami środowiskowymi i behawioralnymi.

Przekształcenia genomowe mogą przyczyniać się do rozwoju chorób mendlowskich oraz nieistotnych z klinicznego punktu widzenia polimorfizmów. Warianty, które mogą wpływać na zmiany fenotypu w kierunku chorób genetycznych określane są jako zaburzenia genomowe [15]. Ich występowanie jest na ogół podobne w różnych populacjach, choć opisano przypadki populacyjno specyficznych zaburzeń genomowych [27].

Warianty genetyczne klasyfikowane są według dwóch podstawowych kryteriów: składu genetycznego oraz częstości występowania w populacji. W zależności od składu genetycznego wśród polimorfizmów wyróżnia się warianty sekwencyjne oraz strukturalne. Warianty sekwencyjne obejmują zmiany od pojedynczego nukleotydu do tysiąca par zasad [12] i dotyczą insercji lub delecji. Polimorfizmy dotyczące pojedynczego nukleotydu określane są mianem SNP (ang. single nucleotide polymorphism) i oprócz insercji/delecji, obejmują także substytucje. Większe insercje i delecje, wraz z duplikacjami, inwersjami i translokacjami określane są mianem wariantów strukturalnych i dotyczą sekwencji w zakresie od tysiąca par zasad do 5 milionów par zasad [12]. Wśród wariantów strukturalnych wyróżnia się typ nie wpływający na dawkę genu, generowany w wyniku inwersji lub zrównoważonych translokacji. Istotną rolę

odgrywa także neutralny pod względem liczby kopii mechanizm utraty heterozygotyczności (ang. loss of heterozygosity, LOH) powodujący utratę jednego z alleli w wyniku delecji, rekombinacji mitotycznej czy też nondysjunkcji w procesie mitozy. [8]. Drugi typ jest związany z dawką genu i obejmuje szeroko badane w ostatnich latach, polimorfizmy zróżnicowania liczby kopii (ang. copy number variation, CNV) [18]. Istnieje szereg procesów takich jak: duplikacje, triplikacje, inwersje i translokacje, które mogą prowadzić do powstania CNV.

Inny podział wariantów genetycznych uwzględnia ich częstość występowania w populacji, warianty rozpowszechnione występują z częstością większą niż 5% w badanej populacji, a warianty rzadkie nie przekraczają progu 5%. Polimorfizm jest określany jako wariant występujący z częstością nie mniejszą niż w 1% populacji [10].

Przekształcenia genomowe mogą uwzględniać polimorfizmy neutralne dla funkcji genu, lecz mogą powodować również zmiany fenotypowe poprzez różnorodne mechanizmy, takie jak zmiana liczby kopii, zakłócenia genów, tworzenie genów fuzyjnych [2], czy neutralna dla liczby kopii utratę heterozygotyczności [8]. Wszelkie konsekwencje fenotypowe spowodowane wystąpieniem przekształceń genomowych określane są zbiorczo terminem zaburzeń genomowych [2].

Ukończony projekt sekwencjonowania ludzkiego genomu dostarczył wielu ciekawych informacji [17]. Określono, że około 95% sekwencji genomu stanowią sekwencje unikalne [3]. Grupę sekwencji liczących powyżej tysiąca par zasad i identycznych w co najmniej 90% określono jako powtórzenia małej liczby kopii (ang. low-copy repeats, LCR) lub duplikacje segmentalne.

Kolejną klasą zróżnicowania genomu są złożone przekształcenia chromosomów (ang. complex chromosomal rearrangenemts, CCR), które opisują strukturalne przekształcenia genomu obejmujące co najmniej trzy cytogenetycznie widoczne punkty krytyczne (ang. breakpoint) oraz wymianę materiału genetycznego między dwoma lub więcej chromosomami [31]. Obecność CCR została powiązana z nowotworem tarczycy [9], czy niepłodnością u mężczyzn [11].

MECHANIZMY POWSTAWANIA ZMIAN W SEKWENCJI W LUDZKIM GENOMIE

Mechanizmy rearanżacji w ludzkim genomie ukazują proces prowadzący do zmian fenotypowych u pacjentów. Zaproponowane zostały cztery podstawowe mechanizmy powstawania przekształceń genomowych: nie-alleliczna homologiczna rekombinacja (ang. non-allelic homologous recombination, NAHR), nie-homologiczne łączenie końców (ang. non-homologous end-joining, NHEJ), model blokowania widełek i przełączania matrycy (ang. fork stalling and template switching, FoSTeS) [7] oraz replikacji indukowanej przez pęknięcia w rejonach

mikrohomologii (ang. microhomology mediated break induced replication, MMBIR) [29].

Proces NAHR wymaga obecności w DNA segmentów o niemal identycznej sekwencji w obrębie LCR [24]. Mechanizm NAHR może skutkować zarówno duplikacją, delecją, jak i inwersją fragmentu, który ulega przekształceniu [24], co ma istotne konsekwencje, gdy odwrócony segment zawiera geny. Może wówczas dojść do całkowitej utraty funkcji genu lub jego skrócenia. Zjawisko NAHR może zchodzić podczas mejozy oraz mitozy.

Drugim mechanizmem powstawania rearanżacji genomowych jest NHEJ, proces, który w komórkach eukariotycznych jest jednym z podstawowych narządzi naprawy dwuniciowych pęknięć DNA (ang. double strand break, DSB) [19] powstałych w wyniku rekombinacji oraz wywołanych przez czynniki patologiczne (np. promieniowanie jonizujące). Mechanizm NHEJ nie wymaga obecności w DNA sekwencji homologicznych [14] i generuje delecje oraz duplikacje [22].

Trzecim mechanizmem powstawania przekształceń w genomie jest, powiązany z replikacją DNA, proces blokowania widełek i przełączania matrycy – FoSTeS. Do jego odkrycia przyczynił się znaczący postęp w dziedzinie technik molekularnych, który umożliwił badanie złożonych przekształceń genomowych [13]. Wcześniej opisane NAHR i NHEJ w klarowny sposób tłumaczą powstanie prostych przekształceń, jednak w przypadku zmian złożonych, właściwym modelem jest FoSTeS [26]. Mechanizm działa podczas replikacji DNA [13] i wynika z błędów podczas tego procesu. Model FoSTeS oraz MMBIR tłumaczą powstawanie złożonych przekształceń genomowych i chromosomowych [29, 30].

Oprócz opisanych trzech modeli generujących zmienność międzyosobniczą, warianty strukturalne mogą powstawać w wyniku retrotranspozycji z udziałem mRNA [4]. Mimo, że retrotranspozycja nie jest odpowiedzialna za znaczącą grupę wariantów strukturalnych, to zmiany powstałe z jej udziałem mają istotne znaczenie dla funkcjonowania genomu. Co więcej, wykazano, ze elementy repetytywne, takie jak Alu oraz LINE-1, także przyczyniają się do zmienności strukturalnej [16].

ROLA ZMIAN W SEKWENCJI W DIAGNOSTYCE MOLEKULARNEJ

Identyfikacja genów odpowiedzialnych za zaburzenia genetyczne oraz mutacji wpływających na mechanizm patogenezy pozwoliły na opisanie licznych chorób. Pierwotne hipotezy zakładające zależność jeden gen – jedna choroba, są obecnie modyfikowane w kierunku sieci oddziaływań i tymczasowych struktur molekularnych [28]. Badania chorób genetycznych nie mają na celu jedynie identyfikacji zaburzeń skorelowanych ze zmienionym fenotypem, ale także próbę

wyjaśnienia mechanizmu molekularnego patogenezy. Z tego względu szczegółowym analizom podlegają komponenty całych szlaków sygnalizacyjnych powiązanych z chorobą genetyczną. Zidentyfikowane w ten sposób markery molekularne mogą stanowić element testów diagnostycznych w ramach spersonalizowanej medycyny.

Tradycyjne techniki molekularne oparte o metodę sekwencjonowania są wysoce informatywne, jednak czasochłonne. W odpowiedzi na zapotrzebowanie, opracowano znacznie szybsze zautomatyzowane metody, takie jak macierze DNA oraz sekwencjonowanie następnej generacji (ang. massive parallel sequencing), które pozwalają na jednoczesną analizę setek tysięcy indywidualnie wybranych loci genowych. Macierze DNA wykorzystywane są do genotypowania i identyfikacji genów, analizy mutacji, polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphisms, SNP), detekcji zaburzeń chromosomowych oraz szeroko pojętych modyfikacji potranslacyjnych [23].

Postęp jaki dokonał się w dziedzinie diagnostyki pozwolił na wprowadzenie do powszechnego użycia badań genetycznych, których wyniki mogą potwierdzić zaburzenie genetyczne lub określić prognozę rozwoju danej choroby. Wyróżnia się dwa typy testów genetycznych: diagnostyczno-prognostyczne oraz testy dla celów farmakogenomiki [20]. W pierwszym przypadku test ma na celu identyfikację przyczynowych mutacji genetycznych lub polimorfizmów określających podatność na zachorowanie, z kolei testy farmakogenomiczne ujawniają cechy DNA oraz RNA powiązane z odpowiedzią na leki.

Wśród polimorfizmów, analizie poddaje się między innymi polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP), których liczba w ludzkim genomie przekracza 10 milionów [25]. SNP rozprzestrzenione są w całym genomie [1], powstają w wyniku mutacji, które są selektywnie utrwalane w populacjach. Niezwykle istotną cechą SNP jest silne powiązanie częstości alleli z badaną populacją; w literaturze opisano wiele wariantów SNP występujących tylko w wybranej populacji [1]. W miarę postępu genomiki i prowadzenia badań nad rolą SNP wyselekcjonowano istotne polimorfizmy, które mogą stanowić zarówno element ochronny, jak i czynnik podatności na zachorowanie. W literaturze opisano szereg metod asocjacji SNP z chorobami [6, 17], większość polega na identyfikacji genotypów i haplotypów powiązanych ze stanem chorobowym. Podstawą identyfikacji jest istotna różnica częstości alleli danego polimorfizmu między pacjentami i grupą kontrolną, w której nie występują cechy choroby [21]. Mimo setek projektów badawczych, analiza chorób złożonych i próby ich wyjaśnienia w oparciu o SNP wciąż stanowią odległy cel.

Wiedza na temat zmian w nici DNA oraz mechanizmów ich powstawania służy zatem rozwojowi diagnostyki, dzięki czemu szanse pacjentów na odzyskanie zdrowia poprzez dobór odpowiedniej terapii są znacznie większe. Mimo licznych trudności, zarówno technicznych, jak i obliczeniowych, spresonalizowana medycyna, oparta o analizę molekularną, stanowi niewątpliwą przyszłość diagnostyki. Coraz pełniejsze poznanie ludzkiego genomu przyczynia się nie tylko

do rozwoju nauki, stanowi niejednokrotnie klucz do poznania złożonych zaburzeń, których konsekwencje fenotypowe uniemożliwiają prawidłowe funkcjonowania organizmu.

LITERATURA

[1] BABOLA-POKORA K, PROŚNIAK A, JACEWICZ R, BERENT J. The usefulness of SNP markers for analyses of highly degraded biological materials. *Arch Med Sadowej Kryminol* 2009; **59**: 118-123. Polish.

[2] CARVALHO CM, ZHANG F, LUPSKI JR. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genomic disorders: a window into human gene and genome evolution. Review. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 1765-1771.

[3] CAMPBELL CD, SAMPAS N, TSALENKO A, SUDMANT PH, KIDD JM, MALIG M, VU TH, VIVES L, TSANG P, BRUHN L, EICHLER EE. Population-genetic properties of differentiated human copy-number polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2011; **88**: 317-332.

[4] CHEN JM, COOPER DN, FEREC C, KEHRER-SAWATZKI H, PTRINOS GP. Genomic rearrangements in inherited disease and cancer. Review. *Semin Cancer Biol* 2010; **20**: 222-233.

[5] CONRAD DF, HURLES ME. The population genetics of structural variantion. *Nat Genet* 2007; **39**: 30-36.

[6] GAŁECKI P, MAES M,FLORKOWSKI A, LEWIŃSKI A, GAŁECKA E, BIEŃKOWICZ M, SZEMRAJ J. Association between inducible and neuronal nitric oxide synthase polymorphisms and recurrent depressive disorder. *J Affect Disord* 2011; **129**: 175-182.

[7] GU W, ZHANG F, LUPSKI JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Patho Genetics* 2008; **1**: 4.

[8] HASTINGS PJ, LUPSKI JR, ROSENBERG SM, IRA G. Mechanisms of change in gene copy number. Nat *Rev Genet* 2009; **8**: 551-564.

[9] HIEBER L, HUBER R, BAUER V, SCHÄFFNER Q, BRASELMANN H, THOMAS G, BOGDANOVA T, ZITZELSBERGER H. Chromosomal rearrangements in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: evaluation by spectral karyotyping and automated interphase FISH. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 691-693.

[10] International HapMap Consortium: A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; **437**: 1299–1320.

[11] KIM JW, CHANG EM, SONG SH, PARK SH, YOON TK, SHIM SH. Complex chromosomal rearrangements in infertile males: complexity of rearrangement affects spermatogenesis. *Fertil Steril* 2011; **95**: 349-352.

[12] KU CS, LOY EY, SALIM A, PAWITAN Y, CHIA KS. The discovery of human genetic variations and their use as disease markers: past, present and future. Review. *J Hum Genet* 2010; **55**: 403-15.

[13] LEE JA, CARVALHO CM, LUPSKI JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 2007; **131**: 1235-1247.

[14] LIEBER MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 2008; **283**: 1-5.

[15] LIMON J, MITELMAN F. Significance of chromosomal abnormalities in solid tumors of humans. Review. *Pol J Pathol* 1994;**45**:1-15. Polish.

[16] LUPSKI JR. Retrotransposition and structural variation in the human genome. Cell 2010; **7**: 1110-1112.

[17] MANOLIO TA, BROOKS LD, COLLINS FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest* 2008; 118: 1590–1605.

[18] MARCINKOWSKA M, SZYMANSKI M, KERZYZOSIAK WJ, KOZLOWSKI P. Copy number variation of microRNA genes in the human genome. *BMC Genomics* 2011; **12**:183.

[19] NATARAJAN AT, PALITTI F. DNA repair and chromosomal alterations. Review. *Mutat Res* 2008; **657**: 3-7.

[20] NOVELLIA G, CICCACCIA C, BORGIANIA P. Genetic tests and genomic biomarkers: regulation, qualification and validation. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 2008; **5**: 149-154.
[21] PADMANABHAN S, HASTIE C, PRABHAKARAN D, DOMINCZAK AF. Genomic approaches to coronary artery disease. Review. *Indian J Med Res* 2010; **132**: 567-578.
[22] POPŁAWSKI T, STROCZYNSKI E, BLASIAK J. Non-homologous DNA end joining--new proteins, new functions, new mechanisms. Review. *Postepy Biochem* 2009; **55**:36-45. Polish.
[23] ROMAN I. DNA microarrays--perspective of application for drug effectivity and safety evaluation. Review. *Postepy Biochem*. 2008; **54**: 107-115. Polish.
[24] SASAKI M, LANGE J, KEENEY S. Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. Review. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**: 182-195.
[25] SHASTRY BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. Review. *Methods Mol Biol* 2009; **578**: 3-22.
[26] SLACK A, THORNTON PC, MAGNER DB. On the mechanism of gene amplification induced under stress in Escherichia coli. *PLoS Genet* 2006, **2**: e48.
[27] STANKIEWICZ P, LUPSKI JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med* 2010; **61**: 437-455.
[28] SUPERTI-FURGA A, GARAVELLI L. Current themes in molecular pediatrics: molecular medicine and its applications. Review. *Ital J Pediatr* 2010; **19**: 36:20.
[29] VISSERS LE, BHATT SS, JANSSEN IM, XIA Z, LALANI SR, PFUNDT R, DERWINSKA K, DE VRIES BB, GILLISEN C, HOISCHEN A, NESTERUK M, WISNIOWIECKA-KOWALNIK B, SMYK M, BRUNNER HG, CHEUNG SW, VAN KESSEL AG, VELTMAN JA, STANKIEWICZ P. Rare pathogenic microdeletions and tandem duplications are microhomology-mediated and stimulated by local genomic architecture. *Hum Mol Genet* 2009; **19**: 3579-3593.
[30] ZHANG F. The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate human genomic, genic, and exonic complex rearrangements. *Nat Genet* 2009; **15**: 231-246.
[31] ZHANG F, CARVALHO CM, LUPSKI JR, PAI GS. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. Review. *Trends Genet* 2009; **25**: 298-307.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 03.09.2011
Przyjęto: 29.12.2011
dr n. med. Małgorzata Jaroniec
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytet Medyczney im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań,
tel. 61 854-64-55, fax 61 854-64-40
e-mail: malgorzata.jaroniec@gmail.com