

32. van den Worm, SHE; Valegård, K; Fridborg, K; Liljas, L; Stonehouse, NJ; Murray, JB; Walton, C; Stocley, PG. (1998). Crystal structures of MS2 coat protein mutants in complex with wild-type RNA operator fragments. *Nucleic Acids Research* 26: 1345-1351.
33. Weinbauer, MG. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 127-181.
34. Wright, A; Hawkins, CH; Anggard, EE; Harper, DR. (2009). A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol* 34: 349-57.
35. Yin, S; Kiong Ho, C; Miller, ES; Shuman, S. (2004). Characterization of bacteriophage KVP40 and T4 RNA ligase 2. *Virology* 319: 141-151.
36. Zhang, J; McCabe, KA; Bell, CE. (2011). Crystal structures of  $\lambda$  exonuclease in complex with DNA suggest an electrostatic ratchet mechanism for processivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 11872-11877.

Agnieszka Gibala<sup>1,3</sup>, Joanna Szaleniec<sup>2</sup>, Maciej Szaleniec<sup>1\*</sup>

1 – Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk, Kraków; 2 – Katedra i Klinika Otolaryngologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków; 3 – Zakład Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie. \* E-mail: m.szaleniec@cyfronet.pl

## MIKROSATELITY – MAŁE MARKERY GENETYCZNE O WIELKIM ZNACZENIU

Przemysław Tomczyk (Łódź)

### Streszczenie

Mikrosatelity są odcinkami niekodującego DNA, z tego względu pojawiające się w nich mutacje zwykle (ale nie zawsze) nie powodują zmian u organizmu żywego i nie są one naprawiane. Dlatego tempo mutacji mikrosatelitów jest bardzo wysokie i praktycznie każdy organizm ma unikalną ich kombinację – dzięki temu mogą być wykorzystywane jako markery genetyczne w wielu dziedzinach: do badań nad genomem i wykrywania chorób genetycznych, do ustalania ojcostwa, w kryminalistyce, kontroli rodowodów rasowych zwierząt, w badaniach genetyki populacji i rekonstrukcji jej niedalekiej przeszłości.

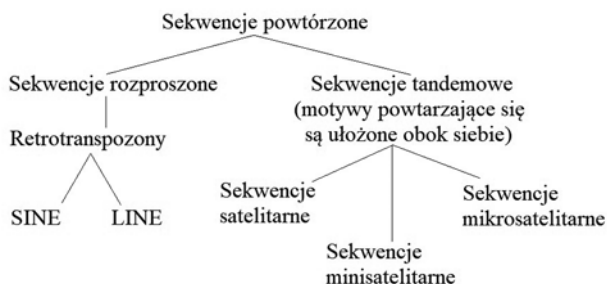
### Abstract

Microsatellites are fragments of non-coding DNA, therefore mutations appearing in them usually (but not always) do not cause changes in the living organism and they are not repaired. Therefore, the rate of microsatellite mutation is very high and practically every organism has a unique combination of its - thanks to this they can be used as genetic markers in many areas: for genomic research and detection of genetic diseases, paternity testing, forensic science, control of animals pedigree, in population genetics and reconstruction of its recent past.

U organizmów eukariotycznych (np. roślin i zwierząt) materiał genetyczny tylko w małej części składa się z „sensownej” informacji. Np. u człowieka geny i sekwencje genopodobne (np. introny) stanowią około 40% genomu, a szacowana liczba genów (około 20 tysięcy) to zaledwie 2%. Pozostała część genomu (około 60%) składa się z DNA międzygenowego i zwykle nie podlega presji selekcyjnej, a zachodzące w niej zmiany (mutacje) są zazwyczaj zachowywane i przekazywane następnemu pokoleniu.

Spośród tego DNA międzygenowego około 18% stanowią sekwencje unikatowe lub występujące w genomie w jednej lub niewielu kopiach. Zdecydowana większość DNA międzygenowego to sekwencje powtórzone umiarkowanie lub wielokrotnie. U człowieka stanowią one około 42% DNA [3], u pozostałych organizmów szacuje się, że ich zawartość to od 30% do nawet 90%. Występują one w genomie w wielu kopiach i charakteryzują się określoną długością, rodzajem oraz układem nukleotydów. Sekwencje

powtórzone można wedle tych kryteriów sklasyfikować na kilka grup (Ryc. 1).



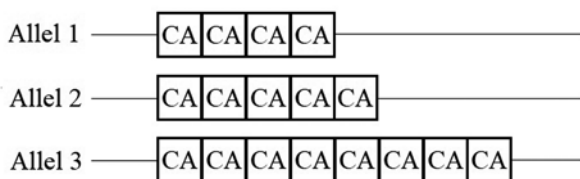
Ryc. 1. Klasyfikacja sekwencji powtórzonych DNA (wykonanie własne).

Sekwencje powtórzone możemy podzielić po pierwsze na: rozproszone, których elementy powtarzające się są oddzielone od siebie innymi sekwencjami oraz na sekwencje tandemowe, których motywy powtarzające się ułożone są obok siebie.

Do sekwencji rozproszonych powtarzających się zaliczamy retrotranspozony (fragmenty DNA, których transkrypty ulegają odwrotnej transkrypcji i w postaci DNA włączają się w genom w nowym miejscu). W zależności od długości sekwencje te dzieli się na:

- SINE (ang. *short interspersed nuclear elements*), sekwencje krótsze niż 500 par zasad (pz),
- LINE (ang. *long interspersed nuclear elements*), sekwencje o długości co najmniej 500 pz.

Z kolei sekwencje tandemowe to zblokowane, seryjne powtórzenia krótkiej sekwencji DNA (Ryc. 2).



Ryc. 2. Allele mikrosatelitów różnią się liczbą powtórzeń charakterystycznego dla nich motywu, w tym wypadku jest to dinukleotyd (CA)<sub>n</sub>. Allel 1: (CA)<sub>4</sub>; Allel 2: (CA)<sub>5</sub>; Allel 3: (CA)<sub>8</sub> (wykonanie własne).

Na podstawie długości dzielą się na trzy typy:

1. Sekwencje satelitarne: wysoce powtarzalne sekwencje DNA o długości od jednego tysiąca do kilku tysięcy par zasad.
2. Sekwencje minisatelitarne: krótsze sekwencje tandemowo powtórzone, zbudowane są z elementów o długości 15-50 pz.
3. Sekwencje mikrosatelitarne, krótkie powtórzenia tandemowe, inaczej nazywane STR (ang. *short tandem repeats*); zawierają od 10 do 50 powtórzeń motywu o długości 1–6 pz [5], a ich długość całko-

wita wynosi 50–500 pz. Tym właśnie sekwencjom przyjrzymy się szczegółowo w dalszej części pracy.

## Czym są mikrosatelity?

Ilość markerów STR jest porównywalna u roślin i zwierząt. Mikrosatelity są równomiernie rozproszone w chromosomach lub wykazują preferencje do obszarów przycentromerowych; mogą występować zarówno w genach, jak i między nimi [9]. Ich sekwencje mają kilka form:

- mikrosatelity „doskonałe” (perfect tandem repetition) [7, 3]: identyczne powtórzenia, np. (AGC)<sub>10</sub>. Takie sekwencje są w istocie najpowszechniejsze, u człowieka najczęstsze są powtórzenia dinukleotydydowe (CA)<sub>n</sub> i powtórzenia mononukleotydydowe (A)<sub>n</sub>. U roślin najczęściej spotyka się sekwencje typu (AT)<sub>n</sub> oraz (TAT)<sub>n</sub>, znacznie rzadsze są sekwencje (GA)<sub>n</sub> i sporadycznie (CA)<sub>n</sub> — te ostatnie powszechne są w genomach zwierzęcych,
- mikrosatelity „niedoskonałe” (imperfect tandem repetition) [7, 3]: podzielone krótkimi kilkunukleotydydowymi wstawkami zaburzającymi ciągłość powtarzającego się motywu, np. (AGC)<sub>5</sub>TG-G(AGC)<sub>7</sub> [3]. Tego typu mikrosatelity są stabilniejsze od wcześniej opisanych i być może odgrywają rolę w regulacji aktywności genów [9],
- istnieją również mikrosatelity składające się z szeregu dwóch lub większej liczby typów motywów powtarzających się, np. (AT)<sub>4</sub>(GC)<sub>7</sub>(AT)<sub>5</sub> [3]. Są one odmianą mikrosatelitów „niedoskonałych” [7, 3].

Ważną cechą mikrosatelitów jest ich wysoki polimorfizm, tzn. występowanie w populacji kilku lub nawet kilkunastu różnych form – alleli (odmian) danego markera, różniących się liczbą powtórzeń danego motywu, a więc i długością (Ryc. 2) [4]. Polimorfizm STR jest imponujący - według obecnego stanu wiedzy nie ma dwóch żyjących osobników, które miałyby identyczną kombinację alleli mikrosatelitarnych. Szacuje się, że polimorfizm charakteryzujący pojedyncze loci mikrosatelitarne sięga 90% [7]. Uważa się, że ta zmienność jest wynikiem nagromadzenia w czasie ewolucji mutacji, najczęściej pojedynczych zmian sekwencji nukleotydów, a ponieważ, jak wspomniano wyżej, są to obszary niekodujące, mutacje te nie mają wpływu na fenotyp czy zdolności adaptacyjne, przez co nie podlegają selekcji [4].

Wysoki polimorfizm mikrosatelitów jest spowodowany pomyłkami polimerazy DNA, tzw. „ślizganiem” się polimerazy (ang. polymerase slippage): w wielokrotnie tandemowo powtórzonej sekwencji nie ma punktów odniesienia dla polimerazy, tak jak

w przypadku sekwencji unikatowych. Prowadzi to zazwyczaj do wydłużania, rzadziej do delecji (usunięcia), przynajmniej jednej z powtórzonych jednostek. Tak więc co pewien czas poślizg polimerazy prowadzi do powstania nowego wariantu STR o innej długości, wzbogacając zestaw alleli znajdujących się w populacji [7]. Innym możliwym mechanizmem powstawania nowych wariantów mikrosatelitów jest nierówny *crossing-over* (rekombinacja) [4].

Ewentualne funkcje mikrosatelitów należy rozpatrywać w dwóch aspektach. W DNA niekodującym, jeżeli w ogóle STR odgrywają jakąś rolę, jest ona nadal nieznaną. Ze względu na to, że mikrosatelity powstają w wyniku błędów w procesie kopiowania genomu podczas podziału komórki, mogą być po prostu niechcianym skutkiem replikacji genomu [3]. Jeżeli należałoby wskazać, gdzie mikrosatelity mogłyby pełnić jakąś funkcję dla organizmu, podaje się: wpływ na organizację chromatyny, rekombinacje, replikacje DNA, cykl komórkowy oraz system naprawy błędnie sparowanych nukleotydów (ang. *mismatch repair*, MMR). Nie jest to jednak nadal rozstrzygnięte [7].

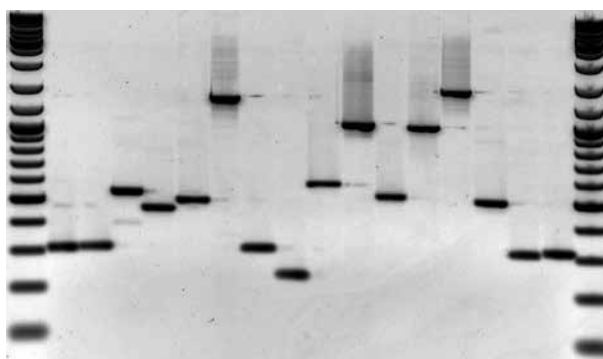
Powyżej opisane rozważania dotyczą DNA niekodującego. Mikrosatelity mimo swego braku wpływu *per se* na fenotyp i adaptację, mogą oddziaływać na nie pośrednio: jeśli znajdują się w obrębie lub w pobliżu genu. W przypadku, gdy sekwencja mikrosatelity o prawidłowej (choć zmiennej w pewnych granicach) długości ulegnie wydłużeniu ponad wartość progową, może mieć negatywny wpływ bezpośrednio na gen (ekspansja powtórzeń w sekwencji kodującej), powodując powstanie toksycznego białka. Ekspansje powtórzeń trinukleotydowych odpowiadają np. za genetyczne choroby neurodegeneracyjne i neuro mięśniowe, takie jak np. zespół kruchego chromosomu X i płasawica Huntingtona [3].

### Zastosowania mikrosatelitów

Z uwagi na związki STR z występowaniem pewnych chorób, można je wykorzystywać jako markery w badaniach genetycznych. Poza wyżej wymienionymi schorzeniami dzięki zastosowaniu mikrosatelitów można oszacować ryzyko wystąpienia takich chorób jak niektóre dziedziczne formy cukrzycy, dystrofia mięśniowa, pewne dziedziczne formy nowotworów i wiele innych [3].

Innym ważnym zastosowaniem markerów STR jest możliwość ich wykorzystania w sporządzaniu map genetycznych o dużej rozdzielczości (służących do mapowania genów w diagnostyce wielu chorób dziedzicznych) oraz w analizie sprzężeń. Stwarza to wspólną podstawę do dalszych badań genetycznych [3].

Innym interesującym zastosowaniem mikrosatelitów jest sądownictwo. Ponieważ STR są bardzo polimorficzne i każdy organizm posiada praktycznie własny unikalny profil STR, na tej podstawie można zidentyfikować konkretną osobę czy organizm. Znajduje to zastosowanie w kryminalistyce (kiedy dysponujemy próbką biologiczną z miejsca przestępstwa i potrzebujemy udowodnić do kogo należała) oraz ustalaniu rodzicielstwa zarówno u ludzi, jak i u zwierząt [2]. W sądownictwie wykorzystywane są również i rośliny. Materiał roślinny może stanowić cenną informację w śledztwie wielu kategorii przestępstw, w szczególności gdy podczas popełniania czynu materiał roślinny (np. pyłek) został przeniesiony z jednego miejsca na drugie [5].



Ryc. 3. Żel agarozowy po przeprowadzonej elektroforezie. Pążki to odcinki DNA o danej długości, każdy „słupek” to badana próbka lub mieszanina wzorcowych DNA o znanej długości (wzorce długości DNA położone są najbardziej skrajnie, po lewej i po prawej) – na ich podstawie ocenia się długość alleli mikrosatelitów (źródło: Wikimedia Commons, na licencji 3.0; autor: Rkalendar).

Możliwość identyfikacji osobników na podstawie profili STR znajduje zastosowanie w jeszcze jednej dziedzinie: badaniach i kontroli rodowodów rasowych zwierząt, np. psów czy koni [4]. Jest to ważne również w przypadku gatunków rzadkich i ginących, np. żubrów. Z uwagi na bardzo ograniczoną liczebność tych zwierząt, jest sprawą kluczową, aby kojarzyć ze sobą osobniki jak najbardziej różne genetycznie i w miarę możliwości nie dopuszczać do krzyżowania w pokrewieństwie. Mikrosatelity umożliwiają zweryfikowanie stopnia pokrewieństwa zwierząt.

W naukach ekologicznych STR są bardzo użyteczne w badaniach genetyki populacji, są jednym z najbardziej popularnych i wszechstronnych markerów [6, 7]. Pozwalają nam ustalić strukturę genetyczną populacji, czy jest zróżnicowana, bogata genetycznie, czy wręcz przeciwnie. W zdrowych, licznych w osobniki populacjach, zróżnicowanie STR jest duże, w populacjach izolowanych i inbredowanych (takich, gdzie osobniki z konieczności krzyżują się w pokrewieństwie) mikrosatelity są krótsze i ich zróżnicowanie jest znacząco niższe [5]. Związek między

wielkością populacji i zróżnicowaniem mikrosatelitów można wykorzystać w badaniach organizmów, które z różnych względów trudno policzyć czy dotrzeć do nich. Na podstawie analizy profili STR małej (ale reprezentatywnej) próby osobników można szacować, jak wielka jest cała populacja. Możliwa jest również ocena zmiany wielkości populacji w czasie, np. wykrycie jej niedawnej redukcji wielkości [1].

Markery mikrosatelitarne można również wykorzystywać do rekonstruowania przeszłości populacji. Wydają się one bardzo użytecznym narzędziem w wyjaśnianiu powiązań ewolucyjnych pomiędzy blisko spokrewnionymi populacjami [8]. Co ważne jednak, takie badania, z uwagi na wysokie tempo mutacji STR można wykonywać tylko na blisko spokrewnionych populacjach i w badaniach dotyczących krótkiego geologicznie okresu czasu. Do badań dalej spokrewnionych organizmów i dotyczących dłuższych okresów czasu służą wolno ewoluujące markery filogenetyczne.

### Metody badań markerów STR

Przy całej mnogości zastosowań mikrosatelitów warta podkreślenia jest stosunkowa łatwość ich badań. W analizach STR najczęściej stosuje się reakcję PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy) oraz elektroforezę, dwie stosunkowo proste metody laboratoryjne. Do przeprowadzenia reakcji PCR (która służy amplifikacji, namnożeniu, uzyskaniu wielu kopii STR do przeprowadzenia dalszych analiz) konieczna jest znajomość sekwencji flankujących i temperatury ich przyłączenia [2]. W przypadku dobrze znanych markerów

nie jest to problemem, pewnym wyzwaniem jest zaś opracowanie i ustawienie warunków reakcji dla markerów nowych i/lub dla nowych gatunków.

Namnożone podczas reakcji PCR mikrosatelity rozdziela się elektroforetycznie w celu ustalenia, jakiej długości allele i w jakiej kombinacji występują w danej próbce. Rozdział elektroforetyczny przeprowadza się zwykle za pomocą elektroforezy kapilarnej, która pozwala na precyzyjne rozdzielanie i detekcję fragmentów DNA różniących się nawet o 1 parę nukleotydów [3]. Możliwa jest również elektroforeza w żelu poliakrylamidowym [2] lub w wysokorozdzielczej agarozie, które również cechują się wysoką rozdzielczością, są jednak metodami bardziej czasochłonnymi.

Markery mikrosatelitarne mają zastosowania w wielu dziedzinach, zarówno naszego życia, jak i badaniach otaczającego nas świata. Umożliwiają nie tylko wgląd w aktualny stan przyrody, ale również w odtwarzanie jej przeszłości. Wciąż jednak nie wiemy wszystkiego na temat samych STR, np. czy i jaka jest ich funkcja w genomie. Postęp prowadzonych na całym świecie badań daje nam nadzieję, że z czasem będziemy rozwiązywać coraz więcej zagadek ukrytych w kodzie życia, w DNA.

*Praca powstała w wyniku realizacji projektu o nr 2016/23/N/NZ8/02057 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.*

---

### Bibliografia

1. Garza J.C., Williamson E.G. (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 305–318.
  2. Gralak B. (1996) Poznawcze i aplikacyjne znaczenie badania polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA. *Kosmos* 45: 157-162.
  3. Korytko M., Łączmańska I. (2016) Sekwencje mikrosatelitarne i ich wykorzystanie w diagnostyce medycznej. *Kosmos* 65: 11-16.
  4. Radko A., Miszczak M. (2015) Zastosowanie markerów mikrosatelitarnych DNA w identyfikacji osobniczej oraz kontroli rodowodów psów. *Wiadomości Zootechniczne* 4: 121–126.
  5. Selkoe K.A., Toonen R.J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629.
  6. Skonieczna K. (2010) Roślina prawdę ci powie... . *Genetyka i Prawo* 1: 4-5.
  7. Szućko I., Achrem M., Kalinka A. (2012) Charakterystyka i zastosowanie SSR oraz ISSR w badaniach genomów roślinnych. *Kosmos* 61: 597-602.
  8. Takezaki N., Nei M. (1996) Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees From Microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389-399.
-

9. Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

**Mgr Przemysław Tomczyk**, Uniwersytet Łódzki, Katedra Geobotaniki i Ekologii Roślin, Pracownia Ekologii i Adaptacji Roślin, Łódź.  
E-mail: przemyslaw.tomczyk@biol.uni.lodz.pl

## CZĘŚCI ZAMIENNE DLA LUDZKICH ZMYŚLÓW. IMPLANTY ŚLIMAKOWE

*Ryszard Tadeusiewicz (Kraków)*

### Streszczenie

W artykule zasygnalizowany został problem sprzęgania fragmentów systemu nerwowego z urządzeniami technicznymi przez tak zwany Brain-Computer Interface (BCI). Ogólna tematyka BCI jest bardzo ciekawa, ale raczej przyszłościowa i w dużej mierze hipotetyczna, więc w tym artykule będzie tylko zasygnalizowana. Natomiast w artykule dokładniej omówiono urządzenie, które od lat wykorzystuje połączenie systemu technicznego z mózgiem. Jest to tak zwany implant ślimakowy, będący protezą narządu słuchu przyłączoną do nerwu słuchowego. W artykule przedstawiono jego budowę i zasadę działania.

### Abstract

The article indicates the problem of coupling fragments of the nervous system with technical devices by the so-called Brain-Computer Interface (BCI). The general topic of BCI is very interesting, but rather forward-looking and largely hypothetical, so in this article will only be signaled. Instead of general discussion the article discusses more detail one interesting example: the device that has been using the connection between the technical system and the brain for years. This is the so-called cochlear implant, which is a prosthesis of the auditory organ connected to the auditory nerve. The article presents its structure and principle of operation.

### Wprowadzenie

Rozwój techniki medycznej powoduje, że coraz częściej ośmielamy się zastępować naturalne organy człowieka ich odpowiednikami wykonanymi jako twory techniki. W ten sposób moglibyśmy organy niepoprawnie rozwinięte w życiu płodowym (wady wrodzone) lub uszkodzone w następstwie wypadku albo choroby zastąpić elementami sztucznymi. Jak w samochodzie – gdy się coś zepsuje, wystarczy użyć części zamiennej. Mamy takie części zamienne. Operacje ortopedyczne, w których zerwane ścięgna zastępuje się włóknami sztucznymi to już rutyna. Sprężyste stenty rozpierające zwężone przez sklerozę naczynia krwionośne to także często używane elementy techniczne, służące do naprawiania niedoskonałości ludzkiego ciała.

Robimy to coraz śmielej. Wymieniamy zużyte stawy biodrowe na tytanowe implanty, wszywamy sztuczne zastawki serca, używamy pomp insuliny zastępujących funkcjonowanie trzustki u diabe-

tyków i elektronicznych rozruszników serca. Budujemy też sztuczne narządy. Powszechnie używane są sztuczne nerki, ratujące życie ludzi z niewydolnością ich własnych nerek, dostępne jest sztuczne płuco-serce, używane przy zabiegach kardiochirurgicznych, gdy własne serce pacjenta jest zatrzymane albo wręcz wyjęte z klatki piersiowej (na przykład podczas przeszczepu). Wprawdzie sztuczne serce czy sztuczna nerka, które można by było umieścić w ciele pacjenta w miejsce jego własnych narządów, to dopiero przyszłość, bo obecnie budowane sztuczne narządy mają rozmiar sporej szafki i to raczej pacjent jest przyłączany do sztucznego narządu, a nie odwrotnie, ale postęp techniki już nieraz pokazał, do jak daleko idącej miniaturyzacji jesteśmy zdolni.

Jest jednak fragment naszego ciała, do którego podchodzimy z najdalej posuniętą ostrożnością. To mózg – siedlisko myśli, ośrodek uczuć, narzędzie inteligencji, opakowanie osobowości. O sztucznym mózgu możemy chwilowo tylko pomarzyć – zresztą, gdyby człowiekowi wymienić mózg na sztuczną