Лекция 13. Функциональная геномика. Методы определения функций геномных последовательностей.

1 Функциональная геномика.

2 Методы определения функций геномных последовательностей.

1. **Функциональная геномика.** [Функциональная геномика](https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/functional-genomics) — это изучение физиологических и биохимических последствий функции генов и взаимодействий. Общепризнанно, что [метаболомика](https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/metabolomics) может информировать об изменениях в экспрессии генов более прямыми способами, чем методы, измеряющие уровни мРНК или [полипептидов](https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/polypeptide). Исследователь в этой области обычно изучает гены или области в масштабе «генома» (т. е. все или несколько генов/областей одновременно), надеясь сузить их до списка генов-кандидатов или областей для более детального анализа.

Цель функциональной геномики — определить, как отдельные компоненты биологической системы работают вместе, чтобы произвести определенный фенотип. Функциональная геномика фокусируется на  **динамической экспрессии продуктов генов в определенном контексте** , например, на определенной стадии развития или во время болезни. В функциональной геномике мы пытаемся использовать наши текущие знания о функции генов, чтобы разработать модель, связывающую генотип с фенотипом.

***Технологии редактирования генома в функциональной геномике.*** Для изучения функциональной геномики доступен ряд технологий. Но самой эффективной и универсальной на сегодняшний день является революционная технология редактирования генов CRISPR/Cas9 – или CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat). В 2015 году журнал Science назвал ее прорывом года *и*[быстро](https://www.science.org/content/article/and-science-s-2015-breakthrough-year) превратил ее в широко распространенный и высоко ценимый исследовательский инструмент.

CRISPR представляет собой прорывной подход к редактированию генов, и было разработано множество вариантов. В своем простейшем применении CRISPR действует как молекулярные ножницы, которые можно использовать для точного разрезания и модификации интересующей последовательности ДНК. Точная, программируемая и адаптируемая, эта технология нашла широкое применение в нескольких областях биологических и биофармацевтических исследований.

Функциональная геномика охватывает исследования [регуляции генов](https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/glossary/gene-expression/) , включая [эпигенетику](https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/glossary/epigenetics/) (какие гены включаются или выключаются), [транскрипцию](https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/glossary/transcription/) (как ДНК копируется в [РНК](https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/glossary/ribonucleic-acid-rna/) ) и [трансляцию](https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/glossary/translation/) (как РНК действует как матрица для сборки белков).

Из-за этого функциональная геномика тесно связана с [транскриптомикой , протеомикой и эпигеномикой.](https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/glossary/transcriptomics/)[Подробнее об этих «омиках»](https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/blog/omics-a-cut-out-and-keep-guide/) можно прочитать здесь .

Используя большие наборы данных, полученные в результате [секвенирования](https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/glossary/sequencing/) всего генома и всего транскриптома , функциональная геномика может исследовать, как экспрессия гена изменяется в контексте заболевания и как на это влияет лечение.

Эти соображения включают в себя время и место экспрессии генов, то, как контролируется изменчивость экспрессии между различными типами клеток, а также регуляцию генов, включая местоположение и активацию или инактивацию [промоторных последовательностей](https://www.nature.com/scitable/definition/promoter-259/) в геноме.

Подход функциональной геномики также может помочь улучшить понимание функций конкретных генов и их места в клеточных процессах. Изучение взаимодействия генов с продуктами генов (РНК и белки) и взаимодействия, которые эти продукты генов имеют друг с другом, может дать представление о том, как развиваются заболевания, что потенциально приводит к новым стратегиям профилактики заболеваний, вмешательств и управления ими.

Функциональная геномика использует подходы «омики», такие как транскриптомика, протеомика и метаболомика, для всестороннего анализа активности генов и их продукции. Транскриптомика позволяет исследовать, какие гены экспрессируются в определенных условиях, включая реакции на внешние стимулы, стадии развития и адаптацию к стрессам. Примером может служить транскриптомный анализ растений в условиях засухи, который показывает, какие гены активируются для поддержания водного баланса. Подобные исследования помогают выявить гены, отвечающие за устойчивость к стрессам, что полезно для улучшения культурных растений.

Протеомика, исследующая набор белков, экспрессируемых клеткой или тканью, также важна для функциональной геномики. Изучение протеомов позволяет понять, какие белки синтезируются, какие функции они выполняют и как они взаимодействуют друг с другом. Например, исследование протеома клеток человека показало, что определенные белки, участвующие в клеточной сигнализации, активируются при развитии онкологических заболеваний. Изучение белков позволяет раскрывать молекулярные механизмы патогенеза и выявлять мишени для лекарственной терапии.

Метаболомика, анализирующая малые молекулы, или метаболиты, дополнительно расширяет понимание функциональных аспектов генома. Изменения в концентрации метаболитов могут указывать на активные метаболические пути, вовлеченные в конкретные физиологические процессы или реакции на стресс. Например, метаболомический анализ бактерий, выращенных в различных условиях, позволяет выявить метаболические адаптации, важные для их выживания.

Современные методы функциональной геномики включают технологии секвенирования РНК (RNA-seq), которые позволяют детально исследовать экспрессию генов. RNA-seq анализирует транскриптом клетки и показывает, какие гены активно транскрибируются в данных условиях. Этот метод применялся в различных исследованиях, включая выявление генов, связанных с раковыми заболеваниями, что позволило определить транскрипционные профили опухолей и создать базы данных для персонализированной медицины.

Другим важным инструментом является технология CRISPR-Cas9, которая позволяет проводить высокоточные модификации генов. В функциональной геномике CRISPR применяется для инактивации или изменения конкретных генов, чтобы изучить, как их отсутствие или модификация влияет на клеточные процессы. Например, метод использовался для изучения функции гена FOXP2, ассоциированного с развитием речевых навыков у человека. С помощью CRISPR исследователи могут «выключать» этот ген у модельных животных, чтобы оценить его роль в развитии нервной системы и когнитивных способностей.

Функциональная геномика также активно использует методы массового параллельного скрининга, позволяющие исследовать функциональные роли тысяч генов одновременно. Например, в исследованиях на дрожжах ученые могут создать тысячи мутаций и затем наблюдать, какие из них выживают в условиях стресса. Это помогает выявить гены, отвечающие за стрессоустойчивость и адаптацию, что особенно полезно в биотехнологии и для разработки новых лекарственных препаратов.

Сравнительные исследования функциональной геномики позволяют выявить консервативные и уникальные гены среди различных видов, что помогает понять общие механизмы и специфические адаптации. Например, функциональная геномика применялась для анализа генов, участвующих в фотосинтезе у растений, что позволило выявить общие для многих видов механизмы регуляции и адаптации к разным условиям освещения и влажности.

Таким образом, функциональная геномика предоставляет ценные инструменты для глубокого анализа биологических функций генов и их продукции, что является основой для медицины, сельского хозяйства и биотехнологии. Она позволяет не только изучить фундаментальные процессы, происходящие в клетке, но и применить эти знания для создания новых методов лечения заболеваний и улучшения сельскохозяйственных культур.

1. **Методы определения функций геномных последовательностей.**

Функциональная геномика представляет собой область генетики, которая направлена на изучение биологических функций генов и других элементов генома, раскрывая их вклад в процессы клеточного метаболизма, развития и адаптации. В отличие от структурной геномики, ориентированной на изучение последовательностей и структуры ДНК, функциональная геномика фокусируется на вопросах экспрессии генов, их взаимодействия и регуляции. Это позволяет выявлять связи между генетической информацией и фенотипическими проявлениями, что особенно важно для понимания молекулярных механизмов заболеваний и физиологических процессов.

Одним из ключевых инструментов функциональной геномики являются методы анализа экспрессии генов, такие как RNA-seq, которые позволяют детально исследовать уровни транскрипции генов в различных условиях. RNA-seq, или секвенирование РНК, предоставляет детализированные данные о транскрипционном профиле клеток и тканей, что помогает идентифицировать активные гены и их роль в конкретных биологических процессах. Например, с помощью RNA-seq были выявлены гены, играющие роль в адаптации растений к засухе, что позволяет оптимизировать сельскохозяйственные культуры в условиях климатических изменений.

Использование методов на основе CRISPR-Cas9 стало еще одним прорывом в функциональной геномике, позволяя ученым инактивировать или модифицировать конкретные гены и исследовать их функцию. Этот метод применяется для изучения сложных заболеваний, таких как онкологические патологии, где выявление генов, способствующих устойчивости клеток к препаратам, открывает возможности для создания таргетной терапии. Важным преимуществом CRISPR является возможность адресного воздействия на геном, что делает его ценным инструментом для функциональных скринингов.

Протеомика и метаболомика дополняют функциональную геномику, позволяя исследовать белковые продукты и метаболиты, которые являются непосредственными результатами экспрессии генов. Протеомика анализирует разнообразие и динамику белков в клетках, что необходимо для понимания функционирования белковых комплексов и сигнальных путей. Метаболомика же позволяет оценить концентрации различных метаболитов и их роль в обмене веществ. Эти подходы применяются, например, в исследованиях заболеваний, таких как метаболический синдром, и помогают изучать метаболические пути, которые могут стать мишенями для лечения.

Ин-силико методы, включающие предсказание функции генов на основе их структуры и филогенетического анализа, также играют важную роль в функциональной геномике. С помощью биоинформатических алгоритмов и машинного обучения можно предсказать, какие гены участвуют в определенных биологических процессах, даже если их функции не известны. Моделирование и анализ сетей взаимодействий генов и белков позволяют выявлять ключевые элементы клеточных систем, что необходимо для разработки новых биомедицинских приложений.

Компьютерный анализ играет важную роль в поиске генов в последовательностях ДНК, и что одним из самых мощных инструментов, доступных для этой цели, является поиск гомологии, который находит гены, сравнивая изучаемую последовательность ДНК со всеми другими последовательностями ДНК в базах данных. Основа поиска гомологии заключается в том, что родственные гены имеют схожие последовательности, и поэтому новый ген может быть обнаружен в силу его сходства с эквивалентным, уже секвенированным геном из другого организма. Теперь мы более подробно рассмотрим анализ гомологии и увидим, как его можно использовать для назначения функции новому гену.

***Гомология отражает эволюционные отношения.*** Гомологичные гены — это гены, которые имеют общего эволюционного предка, выявленного по сходству последовательностей между генами. Эти сходства формируют данные, на которых основаны молекулярные филогении. Гомологичные гены делятся на две категории:

* [Ортологичные](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/n/genomes/A9089/def-item/A9743/) гены — это те гомологи, которые присутствуют у разных организмов и общий предок которых существовал до разделения видов.
* [Паралогичные](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/n/genomes/A9089/def-item/A9750/) гены присутствуют в одном и том же организме, часто являясь членами признанного мультигенного семейства, причем их общий предок, возможно, существовал или не существовал ранее вида, в котором эти гены обнаружены в настоящее время.

Пара гомологичных генов обычно не имеет идентичных нуклеотидных последовательностей, потому что два гена подвергаются различным случайным изменениям в результате мутации, но они имеют схожие последовательности, потому что эти случайные изменения произошли в одной и той же начальной последовательности, общем гене-предке. Поиск гомологии использует эти сходства последовательностей. Основой анализа является то, что если вновь секвенированный ген оказывается похожим на ранее секвенированный ген, то можно сделать вывод об эволюционной связи, и функция нового гена, скорее всего, будет такой же или, по крайней мере, похожей на функцию известного гена.

Figure 7.9. Two DNA sequences with 80% sequence identity.

***Рисунок 1.*** *Две последовательности ДНК с 80% идентичностью последовательностей.*

Важно не путать слова *гомология* и *сходство*. Неправильно описывать пару родственных генов как «гомологичные на 80%», если их последовательности имеют идентичность нуклеотидов на 80%. Пара генов либо эволюционно связана, либо нет; промежуточных ситуаций не существует, и поэтому бессмысленно приписывать процентное значение гомологии.

#### *Функциональный анализ путем инактивации генов.* В традиционном генетическом анализе генетическая основа фенотипа обычно изучается путем поиска мутантных организмов, в которых фенотип был изменен. Мутанты могут быть получены экспериментально, например, путем обработки популяции организмов (например, культуры бактерий) ультрафиолетовым излучением или мутагенным химикатом, или мутанты могут присутствовать в естественной популяции. Ген или гены, которые были изменены в мутантном организме, затем изучаются с помощью генетических скрещиваний, которые могут определить положение гена в геноме, а также определить, является ли ген тем же самым, что и тот, который уже был охарактеризован. Затем ген может быть дополнительно изучен с помощью методов молекулярной биологии, таких как клонирование и секвенирование.

#### Общий принцип этого традиционного анализа заключается в том, что гены, ответственные за фенотип, можно идентифицировать, определив, какие гены инактивированы в организмах, которые демонстрируют мутантную версию фенотипа. Если отправной точкой является ген, а не фенотип, то эквивалентной стратегией будет мутация гена и идентификация полученного фенотипического изменения. Это основа большинства методов, используемых для назначения функций неизвестным генам.

#### Одним из направлений функциональной генетики является метод анализа мутантов, полученных путем «нокаута» исследуемых генов. Генетические нокауты осуществляются посредством делеции гена, либо путем нарушения его функции, например, с помощью инсерционного мутагенеза, далее изучается фенотип полученных мутированных организмов, что дает ключ к разгадке функции нарушенного гена.

#### Информативный метод для понимания организации, регуляции и функции генов – это метод гибридизации in situ. Он используется для выявления местоположения конкретных транскриптов в тканях либо известных фрагментов нуклеиновых кислот на хромосомах. Для локализации определенной мРНК в клетках или тканях (in situ) применяют меченую комплементарную цепь ДНК или РНК (пробу). Метод особенно эффективен для детекции генетических транскриптов в отдельных клетках или небольших тканях таких структур, как зародышевый мешок, семязачаток и семя. Гибридизация in situ со смысловой и антисмысловой пробами показала, что профили экспрессии генов RPN1a и RPN1b при 74 эмбриогенезе были очень похожи. И RPN1a, и RPN1b транскрипты были обнаружены в семенах, при этом наиболее сильные сигналы гибридизации наблюдались в халазальной части эндосперма и зародышах вплоть до поздней глобулярной стадии. Затем на стадиях сердечковидного, торпедовидного и зрелого зародыша уровни гибридизации значительно снижались.

#### 

#### *Рисунок 1. Экспрессия циклина B1 в семенах мутанта rpn1a.*

Таким образом, функциональная геномика, используя широкий спектр экспериментальных и вычислительных методов, играет центральную роль в современном понимании биологических функций генов и регуляции геномных последовательностей. Она предоставляет фундаментальные знания для разработки инновационных подходов к лечению заболеваний, улучшению сельскохозяйственных культур и глубокой оптимизации биотехнологий, что делает ее одним из ключевых направлений в биологических науках.

Вопросы для самоконтроля:

1. В чем заключается основная цель функциональной геномики?
2. Как метод RNA-seq помогает в анализе экспрессии генов?
3. Как CRISPR-Cas9 используется для исследования функций генов?
4. Какие задачи решаются с помощью методов протеомики в функциональной геномике?
5. Как сравнительная геномика помогает определять функции генов?
6. Как ин-силико методы способствуют предсказанию функций генов?