

4.3

Marin funksjonell genomforskning

Audun H. Nerland, Havforskningsinstituttet

Funksjonell genomforskning kan gi svar på hvordan komplekse biologiske funksjoner som larveutvikling, kjønnsmodning, vekst og sykdomsresistens fungerer og reguleres. Kunnskap om dette kan være avgjørende for om vi vil klare å utvikle oppdrett av nye arter til økonomisk lønnsomme og konkurransedyktige næringer.

HVA ER FUNKSJONELL GENOMFORSKNING?

Fra 1977, da metoden for DNA-sekvensering ble publisert, har mengden sekvensdata økt eksponentielt. I 1995 var hele genomet (den totale genetiske informasjon) til en levende organisme (bakterien *Haemophilus influenzae*) fullstendig sekvensert, og året var det samme tilfellet for genomet til den første encellede eukaryote organismen (gjærcellen). I 1998 sekvenserte man så genomet til en flercellet eukaryot (rundormen *Caenorhabditis elegans*), og i 2003 hadde man kartlagt hele sekvensen til det menneskelige genomet. I dag er genomet til et titalls eukaryote og et hundretalls prokaryote organismer sekvensert.

Selv med all denne sekvensinformasjonen, betyr det ikke at man dermed fullt ut forstår hvordan den genetiske infor-

masjonen benyttes i livsprosessen, men kunnskapen åpner for muligheten til å studere dette videre. Det er det man kaller funksjonell genomforskning. *Det vil si at man studerer samspillet mellom genene og hvordan de forskjellige genene blir regulert og uttrykt, slik at de muliggjør livsprosessen for enkeltceller og for kompliserte flercellede organismer.*

GENREGULERING

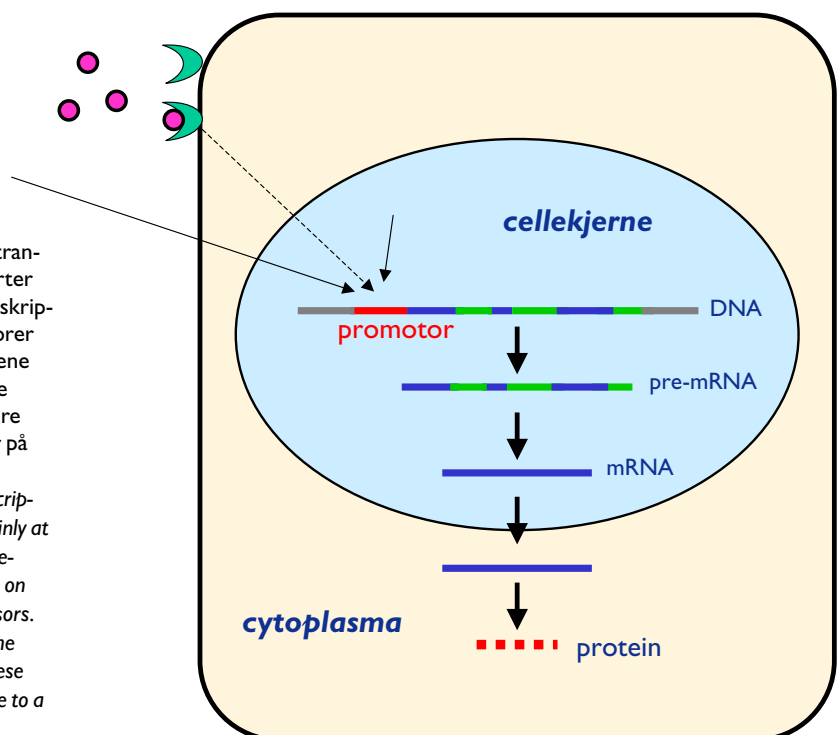
I en høyerestående organisme som for eksempel en fisk vil (med noen få unntak) alle typer celler (leverceller, muskelceller osv.) i organismen inneholde den samme genetiske informasjonen. Hele genomet utgjør omkring 1 milliard basepar og inneholder 20 000–30 000 forskjellige gener, men bare et fåtall av disse genene er til enhver tid i aktivitet. Hvilke gener som er aktivisert avhenger av celletype, vevstype, utviklings- og ytre og indre stimuli.

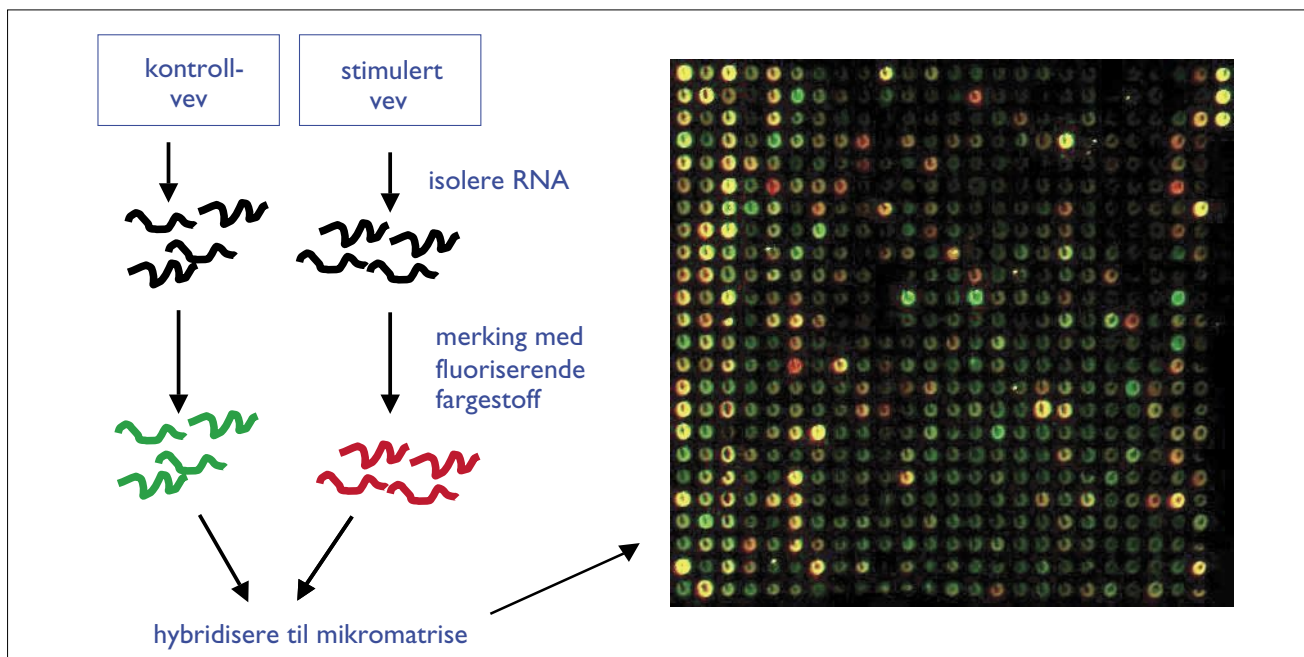
Hvert gen består av en promotor, etterfulgt av sekvensen som koder for proteinet. Promotoren er bryteren der genet kan bli slått på eller av. Uttrykking av genet skjer ved at RNA-polymerasen binder seg til promotoren og starter transkripsjon av mRNA. Dette skjer i cellekjernen. Etter en del modifiseringer

Figur 1

Genetisk informasjon i en celle går fra DNA til mRNA (transkripsjon) til protein (translasjon). Genkontrollen ligger hovedsakelig på transkripsjonsnivå. I hvilken grad RNA-polymerasen starter transkripsjonen fra promotoren, er avhengig av transkripsjonsfaktorer, aktivatorer, koaktivatorer og repressorer (undertrykkende faktorer). Disse reguleringsfaktorene kan enten være syntetisert inne i cellen, eller komme utenfra. Syntesen av reguleringsfaktorer kan ofte være resultatet av at et hormon binder seg til en reseptor på cellens overflate.

Genetic information is going from DNA to mRNA (transcription) to protein (translation). The gene control occurs mainly at the level of transcription. To what degree the RNA polymerase starts the transcription from the promoter depends on transcription factors, activators, coactivators and repressors. The regulation factors can either be synthesised inside the cell or enter the cell from the outside. The synthesis of these factors may often be a result of the binding of a hormone to a receptor on the cell surface.





Figur 2

Ved bruk av mikromatriseteknologi kan transkripsjonsreguleringen av et stort antall gener studeres på samme tid. For å lage en mikromatrise må man ha isolert et stort antall enkeltgener fra den aktuelle organismen, og små mengder DNA for hvert enkeltgen blir lagt på en overflate. RNA isoleres fra celler/vev som skal studeres og fra en tilsvarende kontrollprøve. RNA omdannes til DNA, samtidig som det merkes med fluoriserende fargestoff. Deretter blandes disse og hybridiseres til mikromatrisen. De genene prøven binder seg til fremstår som røde, de genene kontrollprøven binder seg til fremstår som grønne, mens de som binder seg til begge ser gule ut.

By using the micro array technology the regulation of the transcription of a large number of different genes can be studied simultaneously. To make a micro array a large number of genes from the organism in question must have been isolated and spotted on a solid support. To conduct the assay, RNA is isolated from the sample and from a relevant control. The RNA is converted to DNA, labelled with fluorescent dyes, mixed and hybridised to the micro array. The genes binding the probe from the sample appear red, the genes binding the probe from the control appear green, and those binding both appear yellow.

av mRNA (spleising) blir denne transportert ut i cellens cytoplasma hvor proteinsyntesen finner sted (Figur 1).

Genreguleringen skjer hovedsakelig på transkripsjonsnivå, det vil si i hvilken grad RNA-polymerasen "får lov" til å transkribere det aktuelle genet. Dette avhenger av hvorvidt transkripsjonsfaktorer, aktivatorer, koaktivatorer og represorer binder seg til regionen omkring promotoren. Slike reguleringsfaktorer kan være proteiner som er kodet fra et annet gen (som igjen er regulert), eller det kan være mer lavmolekylære forbindelser. Reguleringsfaktorene kan være syntetisert inne i cellen eller komme inn i cellen utenfra. Ofte blir reguleringsfaktorer produsert inne i cellen som et resultat av at cellen får et signal utenfra (f.eks. et hormon binder seg til reseptor på cellens overflate).

Vi vet i dag en god del om hvordan noen enkeltgener blir regulert. Men de fleste biologiske prosesser blir styrt av flere gener. Energimetabolismen i kroppen utgjør for eksempel omkring 500 forskjellige biokjemiske reaksjoner med tilhørende enzymer. For å forstå komplekse biologiske prosesser er vi derfor interessert både i hvilke gener som er involvert, og hvordan reguleringen av disse foregår som en helhet.

FORSKNING PÅ FORSKJELLIGE NIVÅER

Funksjonell genomforskning foregår på flere nivåer. På det første nivået studerer man *hvilke* gener som er involvert i en

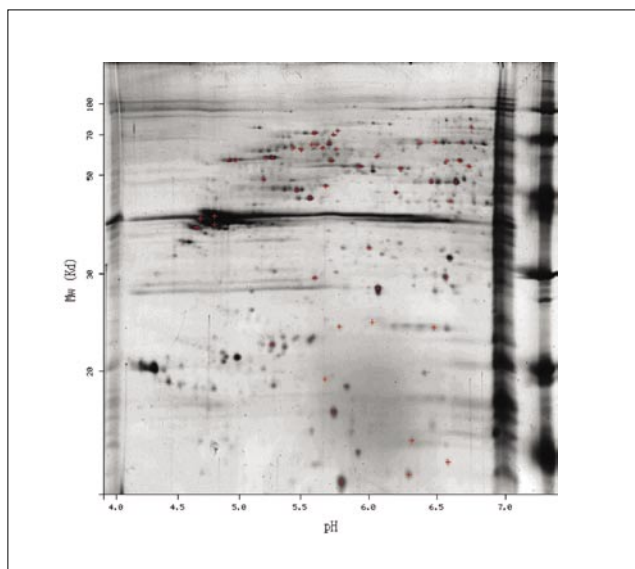
biologisk prosess. Dette kan gjøres enten ved å undersøke opp- eller ned-regulering av mRNA, eller tilsvarende undersøkelser av proteinsyntesen. Sentrale metoder her er henholdsvis mikromatriseteknologi (Figur 2) og todimensjonal gelelektroforese (Figur 3).

For å etablere mikromatriseteknologien må man først kjenne sekvensen til den kodende delen av majoriteten av gene til organismen man skal studere. Dette gjøres ved å isolere mRNA fra organismen, omdanne denne til DNA som så kan sekvenseres (cDNA-sekvensering eller EST-sekvensering).

På det neste nivået studerer man *hvordan* gene som er involvert blir regulert. Da må man ha tilgang på sekvensinformasjon som omfatter promotoren til gene, hvilket innebærer sekvensering av genomisk DNA. Dette muliggjør studier av DNA-protein og interaksjoner mellom proteiner.

NYTTEVERDI

Går man i dybden i enhver biologisk problemstilling, kommer man før eller senere ned på gennivå. Funksjonell genomforskning vil derfor være grunnleggende for forskning innenfor de fleste aspekter av akvakultur. Det er ikke vanskelig å finne eksempler der dette vil ha en nytteverdi, eller kanskje være avgjørende for å få en økonomisk lønnsom og konkurransedyktig næring.



Figur 3

Ved todimensjonal gelelektroforese blir proteinmolekylene i en prøve spredd utover en gel. Ved å sammenligne to geler der den ene kommer fra celler før stimulering og den andre fra celler etter stimulering, kan man studere opp- og nedreguleringen av syntesen av enkeltproteinene.

In 2D-gel electrophoresis the protein molecules in a sample are spread on a gel. By comparing two gels where one is from cells before stimulation and the other is from stimulated cells, the up- and down-regulation of the synthesis of the individual proteins can be studied.



Forståelse av genetisk regulering ved kjønnsmodning kan være viktig både for laksenæringen og i oppdrett av nye marine arter; likeledes forståelsen av hvordan lysmanipulering regulerer produksjonen av vekstregulerende hormoner. Marine arter har ofte en lang larve- og yngelfase som det har vist seg vanskelig å mestre, med høy dødelighet og feilutvikling som resultat. Funksjonell genomforskning kan gi viktig informasjon om hvordan miljøet (lys, temperatur, fôr, etc.) kan innvirke på f.eks. skjelettutvikling hos torsk og øyevandring og pigmentering hos kveite. En forståelse av hvordan immunsystemet hos fisk reguleres vil kunne gjøre det lettere å lage effektive vaksiner. Det kunne også gjøre det mulig å optimalisere vaksineringsstidspunktet med hensyn til fiskestørrelse, vanntemperatur osv.

Kartlegging av hvilke gener som er med på å styre viktige biologiske prosesser som kjønnsmodning, kroppsform, vekst og sykdomsresistens vil også kunne nyttes til å gjøre avlsarbeid mer målrettet.

Funksjonell genomforskning vil imidlertid ikke bare være nyttig hva angår selve oppdrettsorganismen. Tilsvarende forskningsaktivitet og økt kunnskap om forskjellige sykdomsfremkallende organismer som virus, bakterier og parasitter kan sette oss i stand til å finne svake punkter i livssyklusen til den patogene organismen, noe som igjen kan benyttes i sykdomsbekjempelse. De største internasjonale laboratoriene vil i dag bare bruke noen få måneder til å sekvensere hele genomet til en fiskepatogen bakterie. Dersom man har slik informasjon tilgjengelig, kan man ved sekvensanalyse finne de komponentene av bakterien som vil være mest egnet i en vaksine mot denne bakterien.

FORSKNINGSSTRATEGI

På slutten av 1990-tallet så norske forskningsmiljøer faren for at de ble akterutseilt innenfor funksjonell genforskning. Det ble derfor tatt initiativ til å etablere et eget forskningsprogram innenfor dette feltet, og i 2001 startet Norges forskningsråd FUGE-programmet med spesielt fokus på human medisin og marin forskning.



Figur 4

Hele genomet til sebrafisk, fugu og medaka er fullstendig sekvensert.

The entire genomes of zebrafish, fugu and medaka are sequenced.

Første fase av programmet gikk ut på å etablere teknologiplattformer som var nødvendige for slik forskning, eksempelvis mikromatriseteknologi, proteinanalyse og bioinformatikk. Andre fase var støtte til konkrete forskningsprosjekter.

Innenfor human medisin er som nevnt genomet til mennesket sekvensert. Det er også genomet til mus, det dyret som er mest brukt som modell innenfor human medisinsk forskning. Grunnlaget for funksjonell genomforskning forelå derfor allerede ved starten.

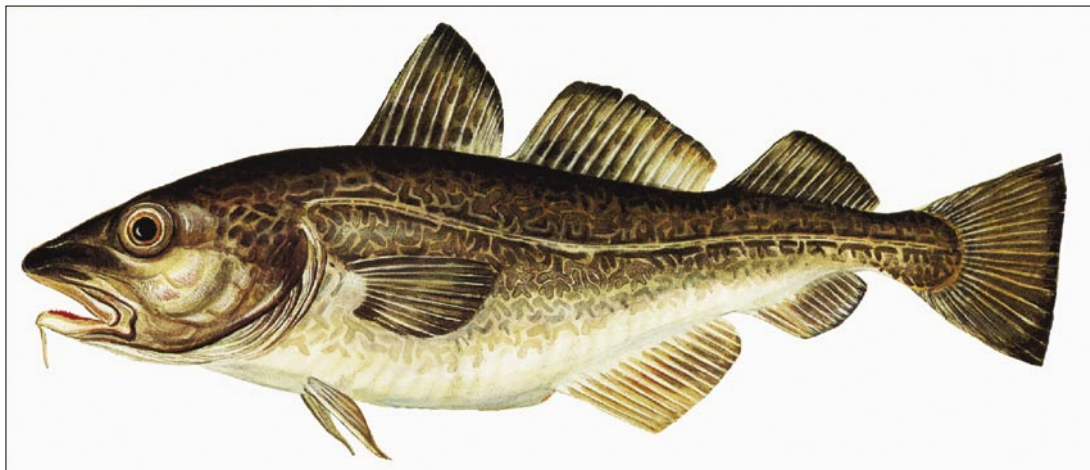
Innenfor marin forskning er forutsetningene dårligere. Riktignok er genomet til sebrafisk, fugu og medaka ferdig sekvensert (Figur 4). Sekvensen for disse fiskene kan være til stor hjelp for å kartlegge tilsvarende gener fra fisk relatert til norsk fiskeri og akvakultur. Slike modellfisker er fordelaktige ved at de har kort generasjonstid, og fordi de krever relativt små ressurser. Men for å få i gang funksjonell genomforskning på våre oppdrettsarter må det først gjøres et grunnleggende arbeid for å skaffe til veie relevante sekvensdata.

Ved Norges veterinærhøgskole har det foregått en genkartlegging av atlantisk laks (Salmon Genome Project), som mellom annet innbefatter EST-sekvensering (Figur 5). I et samarbeidsprosjekt mellom Havforskningsinstituttet, Universitetet i Bergen og Universitetet i Tromsø har man startet et tilsvarende prosjekt for atlantisk torsk (Figur 6). Tanken er at dette skal danne grunnlaget for en storstilt funksjonell genomforskning på torsk i årene framover.



Figur 5

Et stort antall EST-er er sekvensert fra atlantisk laks (*Salmo salar*).
A large number of ESTs are sequenced from Atlantic salmon (*Salmo salar*).



Figur 6

Norske forskningsmiljøer ønsker å gjennomføre en storstilt funksjonell genomforskning på atlantisk torsk (*Gadus morhua*).

Norwegian scientists want to carry through a large-scale functional genomic on Atlantic cod (*Gadus morhua*).