

Zastosowanie wysoce zimbredowanych linii gatunków z rodzaju *Xiphophorus* w badaniach genetycznych

Piotr Łapa¹

¹Towarzystwo Naukowe Branży Zoologicznej „Animalian”

Zmienność jest w naturze zjawiskiem powszechnym, czyli przyglądając się grupie ryb należących do tego samego gatunku, zaobserwować można między nimi różnice w wyglądzie tj. w ich fenotypie. Przykładowo, rozmnażając ryby stwierdzamy, że nawet wśród rodzeństwa występują wyraźne różnice w wyglądzie, np. pewne osobniki są większe od innych. Ta fenotypowa różnorodność wywołana jest bądź to czynnikami środowiskowymi (np. warunki świetlne i termiczne, żywienie, relacje z innymi organizmami w akwarium), bądź też ma charakter genetyczny, tzn. dziedziczny. Wzajemne oddziaływania genotypu i środowiska na ostateczny fenotyp osobnika, mają często bardzo złożony charakter, dodatkowo komplikowany zjawiskiem interakcji między różnymi czynnikami. Sprawia to, że niemożliwe jest jednoznaczne wskazanie tego z nich, który to w głównym stopniu wpływa na powstanie fenotypu. Poszukując odpowiedzi na pytanie, które z czynników środowiskowych względnie genotypowych, ma większy wpływ na daną cechę, przeprowadza się odpowiednio zaplanowane eksperymenty. Zasadniczo można powiedzieć, że doświadczenia takie sprowadzają się do dwóch sposobów postępowania. W pierwszym z nich hoduje się ryby w identycznych znormalizowanych warunkach środowiskowych, co ma wyeliminować względnie zredukować zmienność wywołaną czynnikami środowiskowymi. W drugim zaś utrzymuje się grupy identycznych genetycznie osobników, przyjmując, że występujące między nimi różnice fenotypowe wywoływane są wyłącznie czynnikami środowiskowymi. Badacze podejmujący takie eksperymenty z zastosowaniem ryb poszukują podłoża różnorodnych cech, w tym również mogących mieć zastosowanie w medycynie ludzkiej w terapii pewnych schorzeń.

Przy planowaniu takiego doświadczenia, podstawową sprawą jest możliwość pozyskania materiału doświadczalnego, spełniającego wymagania dużej identyczności genetycznej. W związku z tym, rodzi się pytanie jak uzyskać populacje ryb identycznych genetycznie? W naturze w świecie zwierząt osobnikami takimi są bliźnięta jednojajowe lub

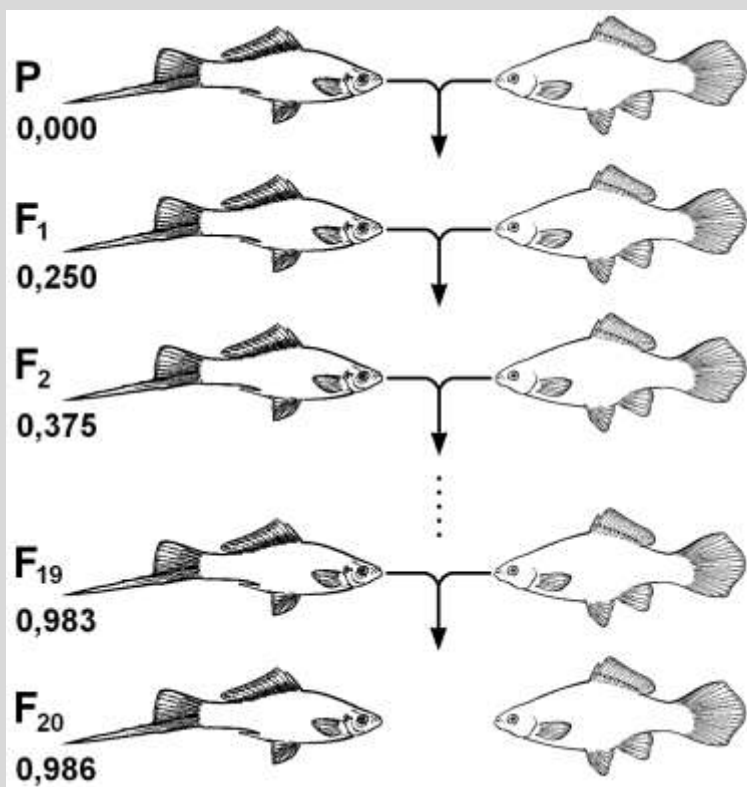
populacje gynogenetyczne. Gynogeneza jest formą rozmnażania płciowego, w której pomimo wnikięcia plemnika nie dochodzi do zapłodnienia komórki jajowej. Wniknięcie plemnika do wnętrza komórki jajowej, daje jej jedynie impuls rozwojowy, a główka tego plemnika już w cytoplazmie komórki jajowej ulega inaktywacji, nie dochodzi więc do połączenia materiału genetycznego ojca i matki. Potomstwo gynogenetycznie rozmnażających się samic, jest wprawdzie diploidalne ale wyłącznie płci żeńskiej, tak więc są to klony, czyli identyczne kopie genetyczne swojej matki. Gatunkami, u których w naturze zaobserwowano zjawisko gynogenezy, są niektóre populacje karasia srebrzystego (*Carassius auratus gibelio* (Gold, 1979)) oraz molinezja meksykańska (*Poecilia formosa* (Girard, 1859)). Uzyskanie w warunkach laboratoryjnych identycznego genetycznie pokolenia potomnego, wymaga przeprowadzenia sztucznej gynogenezy bądź zabiegu klonowania, będących jednak metodami skomplikowanymi i kosztownymi. W praktyce hodowlanej znana jest jeszcze inna metoda uzyskania populacji osobników identycznych genetycznie. Największą jej zaletą jest prostota i relatywnie niskie koszty. Wymaga ona jednak cierpliwości, bowiem praktycznie pełną identyczność genetyczną uzyskuje się dopiero w 20 pokoleniu potomnym ale każde następne pokolenie pochodzące z tej populacji będzie w dalszym ciągu wykazywało pełną identyczność między sobą i ze swoimi przodkami. Metoda ta nazywa się powszechnie chowem wsobnym.

Chów wsobny (ang. inbreeding) nazywany też hodowlą w pokrewieństwie, jest w przypadku ryb metodą hodowlaną polegającą na przeprowadzaniu tarła osobników blisko ze sobą spokrewnionych. Pokrewieństwo między rodzicami wybranymi do kojarzenia, jest w przypadku chowu wsobnego wyższe, niż przeciętne spokrewnienie wszystkich osobników w populacji, z której osobniki te pochodzą. Pokrewieństwo dwóch osobników wynika z posiadania identycznych genów, odziedziczonych po wspólnym przodku lub przodkach. Jeżeli dojdzie do tarła między spokrewnionymi ze sobą osobnikami to może się tak zdarzyć, że uzyskane potomstwo powstanie z połączenia gamet, niosących identyczne kopie genów tzw. genów identycznych dzięki pochodzeniu. Genetycznym efektem hodowli w pokrewieństwie jest zwiększona homozygotyczność w stosunku do wielu par genów. W konsekwencji prowadzi to do ustalenia się różnorodnych cech fenotypowych, warunkowanych parami homozygotycznych genów. Wzrost homozygotyczności prowadzi w efekcie do zmniejszenia różnorodności genetycznej, czego konsekwencją jest zmniejszona plastyczność organizmu w dostosowywaniu się do zmiennych warunków środowiskowych. Jednocześnie ujawniają się często niekorzystne recesywne cechy letalne i subletalne, które

w stanie homozygotycznym ograniczają żywotność organizmu, bądź też powodują jego śmierć.

Zwierzęta przebywające w naturalnym środowisku, instynktownie unikają chowu wsobnego, gdyż może on pociągać za sobą wspomniane konsekwencje, niekorzystne dla potomstwa. Dlatego też, w powszechnej opinii hodowla w pokrewieństwie prowadzi do wszelkiego rodzaju degeneracji. Jest to jednak tylko częściowo prawdą, gdyż w przypadku ryb akwariowych często spotykamy się sytuacją, gdy wysoka homozygotyczność nie wywołuje wyraźnie niekorzystnych efektów. Dzieje się tak, dlatego, że większość recesywnych alleli letalnych zostaje z populacji wyeliminowana już w ciągu kilku pierwszych pokoleń hodowli w pokrewieństwie, a pozostałe przy życiu osobniki są już w znacznym stopniu wolne od genów letalnych. Z kolei ubytki wśród potomstwa spowodowane wyższą śmiertelnością narybku, są skutecznie niwelowane poprzez wysoką rozrodczość, jaką obserwujemy u większości gatunków ryb. Dlatego też najczęściej nie sposób zauważyć kilku procentowego spadku plenności, gdy w wyniku tarła uzyskuje się kilkadziesiąt lub kilkaset osobników narybku.

W warunkach hodowli kontrolowanej przez człowieka, chów wsobny jest metodą pozyskiwania, tzw. linii wsobnych czyli populacji które przez wiele pokoleń kojarzone są jedynie w obrębie swojej wąskiej grupy. Niewielka liczebność grupy osobników wchodzących w skład linii wsobnej powoduje, że w ciągu kilku pokoleń znacznie wzrasta homozygotyczność osobników wchodzących w skład takiej populacji oraz rośnie podobieństwo genetyczne między wszystkimi jej członkami. Większość cech fenotypowych warunkowana jest genami w stanie homozygotycznym, więc w kolejnych pokoleniach osobniki takiej populacji pod względem genetycznym i fenotypowym coraz bardziej upodabniają się do siebie. Przeprowadzane celowo kojarzenia w pokrewieństwie stały się jedną z ważniejszych metod hodowli. Tworzenie nowych ras czy odmian wymaga utrwalenia charakterystycznych dla nich cech i odbywa się zawsze w pewnej, małej izolowanej populacji, w której nie można uniknąć kojarzeń w pokrewieństwie. Kojarzenia takie są wręcz pożądane, bowiem pozwalają stosunkowo szybko utrwalić nowe interesujące hodowców cechy, które mogą mieć, np. recesywny charakter dziedziczenia. Przykładem zaczerpniętym z hodowli ryb użytkowych są karpie linii starzawskiej, która utrzymywana jest w czystości rasy od czasu jej wyprowadzenia jedynie z jednej pary tarlaków. Przykładu dostarcza również hodowla amatorska, gdyż znany gatunek ryby akwariowej *Labidochromis caeruleus* Fryer, 1956, ze swoją geograficzną odmianą *Labidochromis „Yellow”*, to populacja, której niemal wszystkie okazy są potomkami jednej pary rodzicielskiej.



Współczynniki inbrodu przy stosowaniu różnych systemów chowu w pokrewieństwie.

Pokolenie	Kojarzenie	
	brat × siostra rodzic × potomek	półrodzeństwa
0	0,000	0,000
1	0,250	0,125
2	0,375	0,219
3	0,500	0,305
4	0,594	0,381
5	0,672	0,449
6	0,734	0,509
7	0,785	0,563
8	0,826	0,611
9	0,859	0,654
10	0,886	0,691
11	0,908	0,725
12	0,926	0,755
13	0,940	0,782
14	0,951	0,806
15	0,961	0,827
16	0,968	0,846
17	0,974	0,863
18	0,979	0,878
19	0,983	0,891
20	0,986	0,903

Miarą natężenia chowu krewniaczego jest współczynnik inbrodu, oznaczający prawdopodobieństwo wzrostu homozygotyczności osobnika na skutek kojarzeń krewniaczych jego rodziców. Tworzenie wysoce wsobnych linii polega na hodowli ryb, przez co najmniej 20 pokoleń systemem kojarzeń kazirodzich, czyli brat × siostra. W konsekwencji stopień homozygotyczności genów identycznych dzięki pochodzeniu wynosi aż 98,6% czyli w praktyce wszystkie osobniki takiej populacji są pod względem genetycznym homozygotami, identycznymi względem siebie. Dodatkowo w takiej populacji nie istnieje już żadna zmienność genetyczna. Zanim jednak stan taki zostanie osiągnięty u wielu osobników spośród potomstwa ujawnią się skutki depresji inbredowej w postaci zwiększonej śmiertelności i obniżonej płodności, ale stosunkowo wysoka płodność ryb zrekompensuje skutki wyższej śmiertelności wśród narybku

W warunkach akwariowych, chociaż już nie amatorskich utrzymywana jest populacja, której hodowla już od blisko 100 pokoleń odbywa się w ściśle przestrzeganej wsobności kojarzeń pełnego rodzeństwa. Jednak wbrew obiegowym opiniom towarzyszącym zagadnieniu inbrodu, nie są to żadne „schorowane potworki”. Jest to hodowla prowadzona od 1939 roku w instytucji naukowej znanej jako – *Xiphophorus* Genetic Stock Center (w skrócie XGSC). Od czasu powołania XGSC w jego laboratoriach, utrzymywane są

różnorodne linie genetyczne mieczyków i zmienniaków, będących jeszcze obiektem badań założyciela XGSC dr. Myrona Gordona oraz jego następcy dr. Klause Kallmana. Linie te hodowane są do dziś, stanowią wysoce zimbredowane tzn. w pełni homozygotyczne populacje, u których współczynnik inbredu wynosi praktycznie 1 tzn. 100% homozygotyczności. W hodowlach XGSC znajduje się około 60 odrębnych linii genetycznych reprezentujących blisko 24 gatunków z rodzaju *Xiphophorus*. Populacje utrzymywane w tej placówce, stanowią źródło materiału doświadczalnego dla instytucji naukowych z całego świata, zajmujących się badaniami przy użyciu tych ryb. Dzięki zastosowaniu praktycznie identycznych genetycznie ryb, wyniki badań prowadzonych przez wszystkie placówki naukowe są porównywalne i powtarzalne.

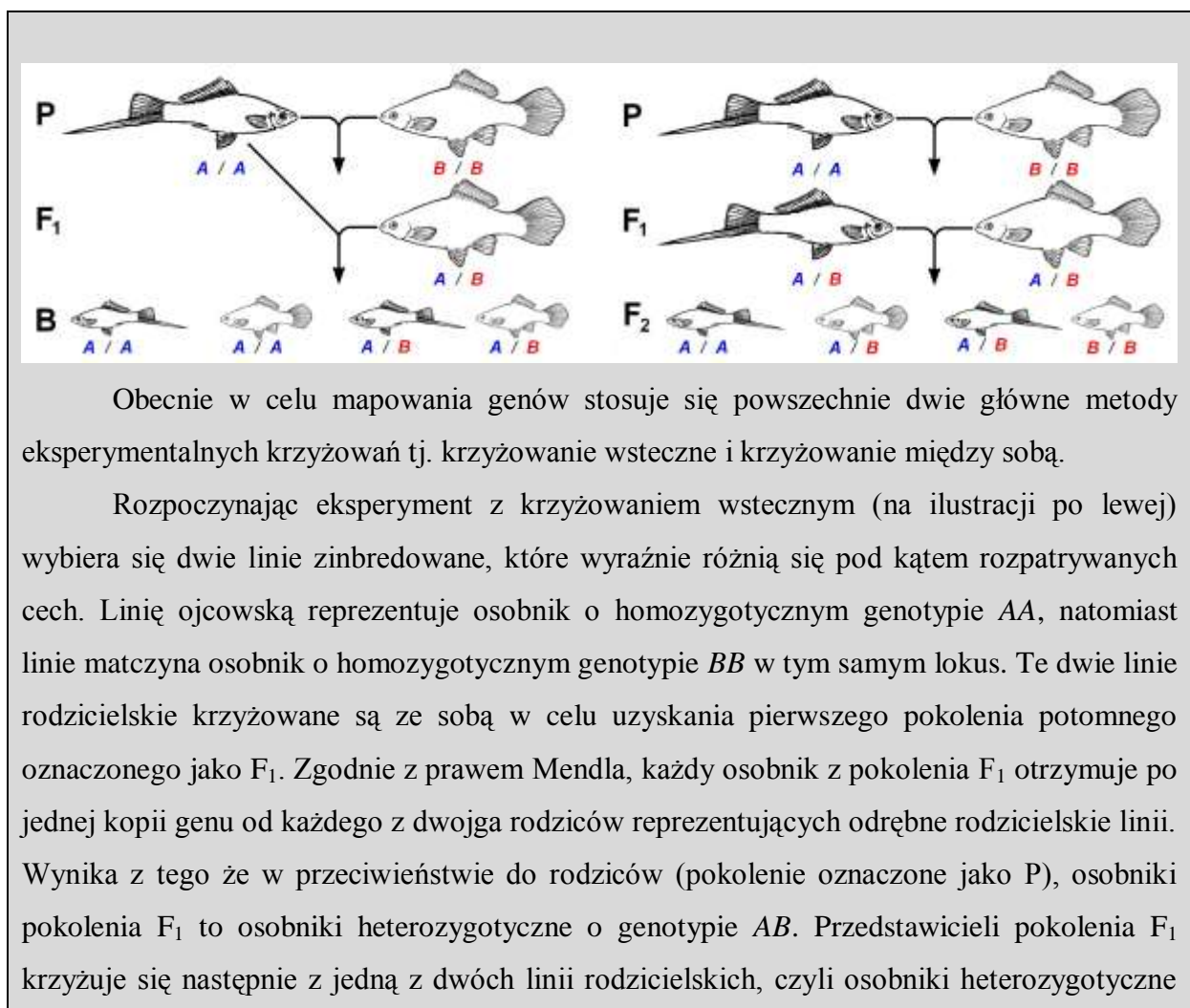
Identyczność genetyczna osobników należących do poszczególnych wsobnych linii utrzymywanych w XGSC, jest powodem ich szerokiego stosowania jako organizmów modelowych w badaniach związanych m.in. z genetyką behawioralną (np. dziedziczenie cech związanych z zachowaniem), mechanizmami doboru płciowego (np. przesłanki kierujące wyborem partnera płciowego), systematyką biogeograficzną (np. występowanie różnych gatunków w zależności od regionu geograficznego) oraz szczególnie ważnych badaniach nad procesem nowotworzenia. O ciągłym zainteresowaniu systematyków rodzajem *Xiphophorus* świadczy fakt, że dość niedawno w 2004 roku doniesiono o ustanowieniu dwóch nowych gatunków, tj. *X. mixei* Kallman, Walter, Morizot & Kazianis, 2004 i *X. monticolus* Kallman, Walter, Morizot & Kazianis, 2004. Instytucja *Xiphophorus* Genetic Center Stock pełni jeszcze jedną, mniej znaną funkcję tzn. jest ostatnią bezpieczną ostoją dla tych gatunków dla których pojawiło się zagrożenie wyginięciem w środowisku naturalnym.

Obecnie przyjmuje się, że do rodzaju *Xiphophorus* należy blisko 30 gatunków, co z dodatkowymi liniami genetycznymi umożliwia uzyskanie dużej ilości możliwych kombinacji krzyżowań. Mieszanie międzygatunkowe wewnątrz tego rodzaju, są często używane w badaniach mających na celu identyfikacje tych regionów w genomie, które związane są z dziedziczeniem złożonych cech. Badania takie są możliwe dzięki ciągłemu rozszerzaniu puli znanych markerów genetycznych tzn. polimorficznych cech organizmu, które charakteryzują się prostym dziedziczeniem „mendlowskim” oraz które można dokładnie identyfikować metodami analitycznymi. Polimorficzność oznacza występowanie w tym samym lokus od kilku lub kilkunastu różnych alternatywnych sekwencji DNA. Markery genetyczne dzieli się na dwie klasy; klasa I są to geny kodujące cechy jakościowe organizmu takie jak np. antygeny erytrocytarne, czyli układy grupowe krwi, natomiast markerami genetycznymi klasy II są niekodujące sekwencje DNA np. sekwencje mini- i mikrosatelitarne.

Ostatnie doniesienia wskazują, że mapa sprzężeniowa rodzaju *Xiphophorus* posiada loci markerowe zlokalizowane średnio, co 7,5 cM (centyMorgany). Dzięki temu można stosunkowo precyzyjnie wskazać na konkretny odcinek chromosomu, na którym znajduje się sekwencja DNA odpowiedzialna za analizowaną cechę fenotypową. Dzięki wykorzystaniu mieszańców międzygatunkowych udało się uzyskać stosunkowo dokładną mapę genetyczną i fizyczną dla całego rodzaju *Xiphophorus*. Pozwala to na coraz bardziej dynamiczny rozwój badań z zakresu genetyki molekularnej, gdyż coraz łatwiej i szybciej można określić położenie konkretnej sekwencji DNA w genomie oraz możliwe jest skonfrontowanie swoich wyników z osiągnięciami innych badaczy.

Tradycyjne badania genetyczne, koncentrowały się na analizie i wyjaśnianiu zasad dziedziczenia cech jakościowych, takich jak np. ubarwienie (np. typ dziki, albinizm, melanizm) i odmiany barwne (np. u mieczyków: czerwony, czarny, berliński, wagtail). Cechy takie są często efektem zmian czyli mutacji w pojedynczych loci i różnicują poszczególne osobniki na wyraźnie odróżnialne grupy fenotypowe. W większości przypadków cechy jakościowe mają monogenowy charakter dziedziczenia, tzn. warunkowane są genami tylko jednego loci, a wpływ środowiska na ich ekspresję fenotypową jest niewielki. Oznacza to, że o ich wystąpieniu decydują wyłącznie geny, natomiast warunki środowiska w żadnym stopniu lub jedynie minimalnie, wpływają na fenotyp określonej cechy. Identyfikacja genu warunkującego takie fenotypowe różnice, może zostać przeprowadzona poprzez wykonywanie serii zaplanowanych krzyżowań pomiędzy osobnikami różniącymi się fenotypowo pod względem analizowanej cechy. Najprostszą ze stosowanych metod jest krzyżowanie wsteczne (ang. backcrossing). W wyniku stosowania krzyżowania wstecznego uzyskuje się potomstwo, które pod względem wszystkich loci w genomie, posiada tylko jeden z dwóch możliwych genotypów tj. homozygotyczny bądź heterozygotyczny. Inną powszechnie stosowaną metodą w takich eksperymentach jest krzyżowanie osobników pokolenia F₁ między sobą (ang. intercrossing). Potomstwo uzyskane z takiego kojarzenia posiada jeden z trzech możliwych genotypów. W ten sposób, w każdym loci osobniki F₂ będą, bądź to heterozygotami, bądź też homozygotami pod względem jednego lub drugiego z alleli. Badania takie są projektowane w ten sposób, by uzyskać stosunkowo dużą ilość potomstwa, gdyż przyjęto że minimalnie powinna być to grupa blisko 100 osobników. Później określa się fenotyp każdego z osobników pod kątem interesujących badacza cech. W przypadku cech jakościowych jest to prosta obserwacja występowania lub też nie występowania interesującej cechy, natomiast w przypadku cech ilościowych są to odpowiednie pomiary wielkości danych cech. Każdy osobnik jest również genotypowany pod

kątem pewnej liczby markerów genetycznych, rozmieszczonych wzdłuż chromosomów w odległości około 10-20 centyMorganów (cM), wybranych tak, by jak najbardziej jednolicie pokrywały cały genom. Odległość między dwoma loci równa 1 cM to genetyczny odstęp między nimi równy 1% rekombinacji między tymi loci. W wyniku takich badań określa się dla każdego osobnika i każdego markera genotyp, który jest bądź homozygotyczny bądź też heterozygotyczny. Jeżeli okaże się, że markerowa sekwencja DNA występuje w genotypach osobników o wyższej wartości analizowanej cechy, a nie odnaleziono markerów genetycznych w genotypach osobników charakteryzujących się fenotypem o niższej wartości, to w sytuacji gdy zaobserwowane różnice są istotne statystycznie można przypuszczać, że w bliskim sąsiedztwie markera znajduje się gen odpowiedzialny za obserwowaną różnicę fenotypową. Można wtedy rozpocząć dokładniejsze badania przy zastosowaniu bardziej skomplikowanych metod matematyczno-statystycznych, w celu dokładnej lokalizacji odcinka DNA odpowiedzialnego za ekspresja danej cechy.



AB odbywają tarło z osobnikami homozygotycznymi (*BB* lub *AA* – w tym przykładzie). Potomstwa uzyskane z krzyżowania wstecznego oznaczone jako B (ang. backcross) otrzymuje jeden chromosom od linii czystej (homozygotycznej) i jeden od pokolenia F_1 (heterozygotycznego). W ten sposób, w każdym z loci, osobniki tego pokolenia są homozygotami o genotypie *AA* bądź też heterozygotami o genotypie *AB*. W rzeczywistości chromosomy tego potomstwa pochodzące od rodziców F_1 są mozaiką chromosomów dwóch rodzicielskich linii powstałe podczas mejozy w wyniku rekombinacji, jednak nie zmienia to faktu że każde loci w chromosomach pokolenia B jest homozygotyczne bądź też heterozygotyczne (*AA* lub *AB*).

Innym powszechnie stosowanym eksperymentem jest krzyżowanie między sobą (na ilustracji po prawej). Eksperyment znów rozpoczyna się od dwóch linii zimbredowanych, które wyraźnie różnią się pod względem rozpatrywanych cech (oznaczone jako genotypy *AA* i *BB*). Linie rodzicielskie krzyżowane są ze sobą w celu uzyskania pierwszego pokolenia potomnego F_1 . Heterozygotyczne osobniki o genotypie *AB* z pokolenia F_1 kojarzone ze sobą dając kolejne pokolenie F_2 . Wszystkie osobniki w nowo powstałym pokoleniu F_2 pod względem genetycznym można podzielić na trzy grupy odwzorowujące trzy możliwe kombinacje rodzicielskich chromosomów tj. homozygoty – *AA* i *BB* oraz heterozygoty *AB*.

Kolejnym etapem takich doświadczeń jest odnalezienie statystycznych zależności pomiędzy genotypem osobników a ich właściwościami fenotypowymi. Jeśli jest to możliwe wyszukuje się ten marker genetyczny, który związany jest z wystąpieniem konkretnej cechy fenotypowej. Najczęściej wymaga to zastosowania bardziej wyszukanych metod statystycznych mapowania loci cech ilościowych tzn. QTL (ang. **Quantitative Trait Loci**).

Może się też okazać, że więcej niż jeden marker wykazuje ścisły związek z interesującym fenotypem, co sugeruje, że cecha ta warunkowana jest przez więcej niż jeden gen o dużym wpływie. Dzieje się tak w przypadku wielu cech interesujących hodowców ryb takich jak; masa ciała, wymiary liniowe czy płodność. Są to cechy ilościowe przejawiające się fenotypowo z różnorodnym nasileniem przechodząc w sposób płynny pomiędzy skrajnymi wartościami (np. stopień wybarwienia od jasnej do ciemnej czerwieni). Dlatego cechy ilościowe opisywane są jako wartości w odróżnieniu od cech jakościowych przyjmujących postać wariantów. Już Grzegorz Mendel w swych teoretycznych rozważaniach proponował wyjaśnienie ilościowej zmienności cech poprzez współdziałanie kilku niezależnych czynników genetycznych. Dziś już wiemy, że cechy takie warunkowane są przez wiele par

genów jednocześnie tzn. poligenowo, co oznacza, że większa ilość genów zlokalizowanych w różnych loci wpływa na ekspresję danego fenotypu danej cechy, a dodatkowo w dużej mierze może na cechę taką wpływać środowisko.

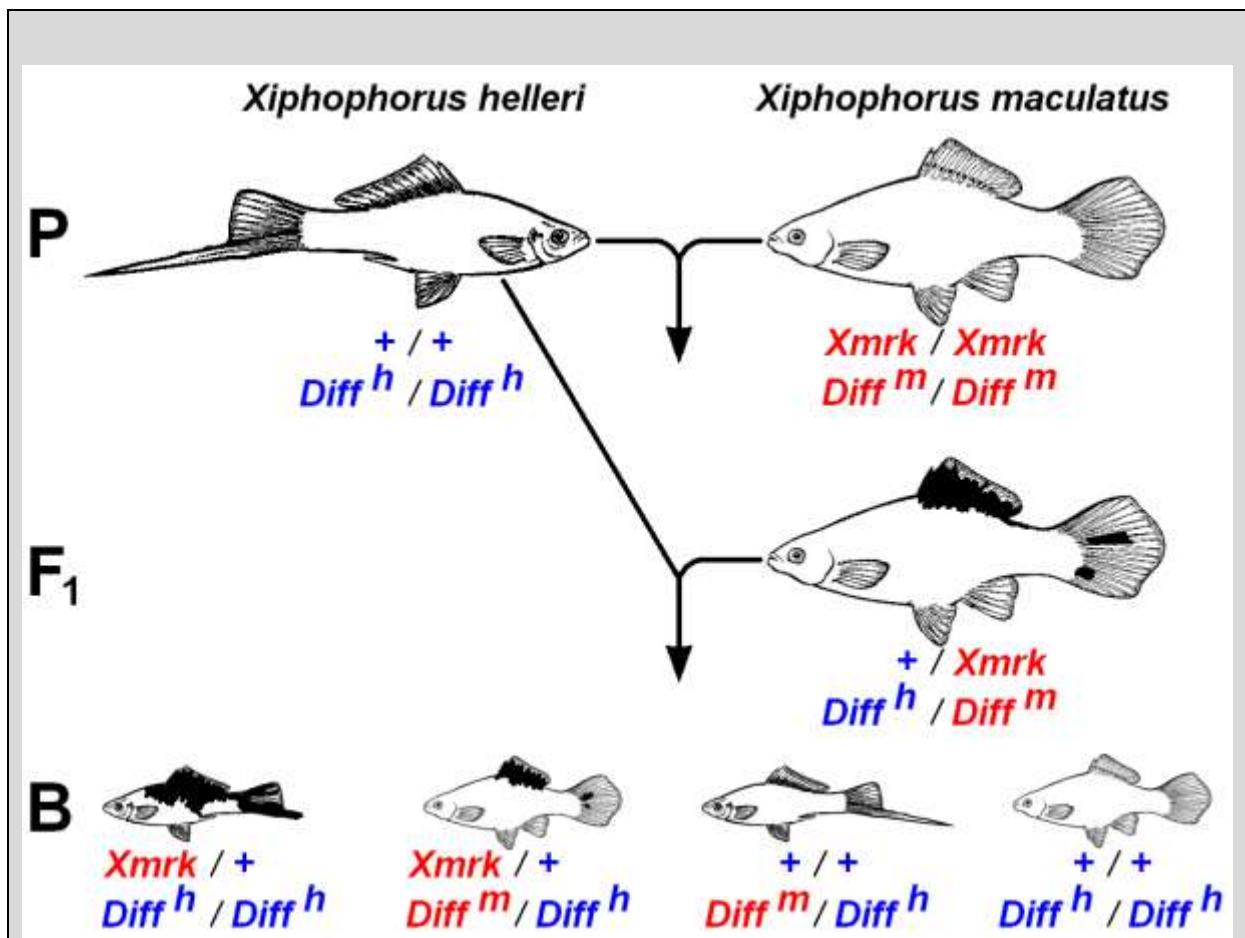
Podobny poligenowy charakter warunkowania, posiadają cechy zwane progowymi, jednak ekspresja fenotypowa może w ich przypadku mieć charakter zerojedynkowy. Przykładem jest np. odporność na niektóre choroby warunkowana wieloma genami, jednak przejawiająca się jedynie dwoma stanami, czyli zachorowaniem bądź też odpornością.

Identyfikacja pojedynczych genów warunkujących fenotypowe przejawianie się cech jakościowych jest stosunkowo prosta, natomiast w przypadku cech ilościowych jest to utrudnione ze względu na dużą liczbę genów zaangażowanych w proces ekspresji cechy, co w efekcie daje niewielki efekt poszczególnych genów rozpatrywanych oddzielnie. Z tego też względu poszukiwania ogranicza się do tych loci, które w najwyższym stopniu wpływają na rozpatrywaną cechę. Geny takie o znacząco większym wpływie na fenotyp nazywamy genami głównymi.

Poszukiwanie nowych genów oraz określanie dokładnej lokalizacji już znanych przy zastosowaniu eksperymentów polegających na odpowiednim kojarzeniu zwierząt, jest niezbędne dla pełnego zrozumienia biochemicznych podstaw złożonych jak i prostych cech przejawianych fenotypowo. Głównym niezwykle ważnym zagadnieniem naukowym, którego analiza możliwa jest dzięki wysoko zimbredowanym liniom *Xiphophorus* to badania nad czerniakiem złośliwym skóry. Dwa gatunki a mianowicie *Xiphophorus maculatus* i *Xiphophorus helleri* są typowymi rybami, które znalazły zastosowanie w badaniach nad tym nowotworem. Pomimo tego, że u naturze nowotwór ten nie występuje u żadnego z tych gatunków to jednak pojawia się on w populacji ryb będących mieszańcami tych dwóch wyjściowych gatunków.

Dlaczego jednak osobniki czysto gatunkowe są zdrowe a u mieszańców ujawnia się nowotwór? Zmienniaki są typowymi nosicielami dominującego genu *Tu* (ang. **t**umor gene) powodującego wytwarzanie melaniny. W skład tego genu zlokalizowanego na chromosomie płciowym wchodzi onkogen oznaczany jako *Xmrk* (ang. *Xiphophorus* **m**elanoma **r**eceptor **k**inase). Wytwarzanie melaniny warunkowane jest przez gen *Tu*, którego funkcjonowanie musi być ściśle kontrolowane przez mechanizmy regulacji komórkowej. Brak takiej kontroli może prowadzić do nadmiernej ekspresji, co prowadzi do nadprodukcji melaniny i w konsekwencji do nowotworzenia. Genetycznym początkiem tworzenia się raka jest ekspresja onkogenu *Xmrk* w komórkach pigmentowych u mieszańców niektórych genotypów. Działanie tego genu, a co za tym idzie wystąpienie tego nowotworu jest tłumione w dzikim

typie przez autosomalne loci znoszące *Diff* (oznaczane również jako *R*) ograniczające zasięg barwnika. Dlatego też zmienniaki posiadają w swym genomie geny potencjalnie odpowiedzialne za nowotwór tj. *Xmrk* oraz geny zabezpieczające przed nim tj. *Diff*. W genomie mieczyków nie ma takiego inhibitora, ale też nie jest on potrzebny, gdyż mieczyki nie posiadają onkogenu *Xmrk*. Fenotypowe przejawianie się pigmentacji u mieszańców jest zróżnicowane w wyniku zmian w genetycznej regulacji procesu melanogenezy. Brak genu regulatorowego prowadzi do rozrostu komórek barwnikowych, a w konsekwencji do wystąpienia nowotworu złośliwego – czerniaka.



Powyższy schemat ilustruje krzyżowanie wsteczne i rozkład genotypów u osobników biorących udział w doświadczeniu nad ekspresją onkogenu wywołującego czerniaka. Pod uwagę wzięto dwa niezależnie dziedziczące się loci tj. onkogen (*Xmrk*) ze swoim nieszkodliwym allelem (+) oraz inhibitor (*Diff^m*) ze swoim nieaktywnym allelem (*Diff^h*). Geny pochodzące z *X. helleri* (brak onkogenu i brak inhibitora) oznaczono kolorem niebieskim a ich odpowiedniki pochodzące z *X. maculatus* (onkogen i jego inhibitor) oznaczono kolorem czerwonym. Żaden z osobników będących rodzicami, oznaczonych jako

pokolenie P nie wykazuje objawów wystąpienia nowotworu, natomiast już u niektórych mieszkańców F₁ występują zmiany melanistyczne w okolicy płetwy grzbietowej lub ogonowej. W pokoleniu powstałym w wyniku krzyżowania wstecznego oznaczonym jako B u 25% osobników spontanicznie rozwijają się rozległe zmiany melanistyczne powodujące nekrozę najczęściej w okolicach płetw.

Z podobnym zjawiskiem spotykają się niekiedy hodowcy amatorsko zajmujący się rybami z rodziny pięknicznkowatych (*Poeciliidae*). Mieczyki i zmienniaki tworzące populacje ryb utrzymywanych w warunkach akwariowych najczęściej nie są czysto gatunkowe, dlatego też można napotkać osobniki z charakterystycznymi zmianami melanistycznymi najczęściej w okolicach płetw. Obrzmienia te są efektem miejscowego nagromadzenia się pigmentu, co związane jest z brakiem wspomnianej genetycznej regulacji melanogenezy. Przykrą konsekwencją tego zjawiska jest występujące czasami rozległe zniszczenie tkanek w okolicach melanistycznych „wykwitów”, postępująca nekroza i w ostateczności śmierć zwierzęcia. Typowym przykładem jest berlińska odmiana charakteryzująca się obecnością czarnych nieregularnych plam na krwiście czerwonym tle ciała. W przypadku odmiany berlińskiej również dochodzi do rozregulowania genetycznych podstaw kontroli melanogenezy, czego konsekwencją są „ozdobne” plamy. Gdy są one zbyt rozległe dochodzi do martwicy a ryba przestaje być atrakcyjna wizualnie i co najważniejsze, osobnik taki cierpi.

Region genomu warunkujący czerniaka oraz tłumiące go loci zostały zidentyfikowane dzięki sprzężeniu ze znanymi wcześniej loci markerowymi. Dalsze dokładne badania molekularnych podstaw rozwoju czerniaka, są bardzo ważne ze względu na podobieństwo mechanizmów funkcjonowania i ultrastruktury tego nowotworu występującego u ryb i u ssaków, w tym u człowieka. U ludzi czerniak jest wyjątkowo inwazyjny i bardzo szybko tworzy przerzuty, dlatego też chirurgiczne leczenie czerniaka złośliwego skóry jest skuteczne tylko w bardzo wczesnym etapie rozwoju tego nowotworu. Natomiast już od kilkadziesiąt lat obserwuje się w naszym kraju stały wzrost zachorowalności na ten typ nowotworu. Fakt ten wymusza na naukowcach pilną potrzebę opracowania skutecznych metod leczenia chorych z bardziej zaawansowanym nowotworem. W badaniach tych dopingujące jest również i to, że czerniak jest obecnie uważany za najbardziej złośliwy nowotwór spośród wszystkich znanych typów raka skóry. Nowotwór ten wywodzi się z komórek barwnikowych, tzw. melanocytów, których rozwój kontrolowany jest m.in. przez gen MITF (ang. **m**icrophthalia-associated **t**ranscription **f**actor). Duża ilość kopii tego genu w genomie

oraz intensywna jego ekspresja sprzyja rozwojowi czerniaka i jego przerzutom. Z kolei spadek aktywności MITF bardziej uwrażliwia komórki czerniaka na chemioterapię. Gen MITF ma ogromne znaczenie dla metabolizmu komórkowego, gdyż koduje białko z grupy tzw. czynników transkrypcyjnych, regulujących funkcje bardzo wielu innych genów. Białko kodowane przez ten gen występuje w dwóch formach również u ryb z rodzaju *Xiphophorus* tj. mitf-B (identyczne z ludzkim w 63%) i mitf-M (identyczne z ludzkim w 53%). Odpowiednie białka, a co za tym idzie również sekwencje genów u tych ryb, odnaleziono podczas analiz molekularnych materiału biologicznego, pochodzącego od osobników będących mieszańcami *Xiphophorus maculatus* × *Xiphophorus helleri*. Duże nadzieje wiąże się z terapią genową tej choroby nowotworowej, jaką jest czerniak. By możliwe było opracowanie metod jej zwalczania przy pomocy terapii wykorzystującej manipulacji genetyczne, niezbędne jest bardzo dokładne poznanie molekularnych podstaw nowotworzenia. Nieodzowną pomocą w zgłębianiu wiedzy na temat nowotworzenia, stały się ryby znane przede wszystkim z amatorskich akwariów tj. mieczyki i zmienniaki.

Jak to się jednak dzieje, że wśród mieczonoszy melanistyczne zmiany nowotworowe utrzymują się w populacji, mimo iż są śmiertelnym obciążeniem dla swych nosicieli? Okazało się, że plamiste samce są atrakcyjniejsze dla samic, przez co silny dobór płciowy przyjmuje kierunek przeciwny presji selekcyjnej doboru naturalnego. Zagadnienie to jest na tyle obszerne iż stanowić będzie temat osobnego opracowania.

Literatura:

1. Broman W.: 1997. Identifying quantitative trait loci in experimental crosses. PhD dissertation, Department of Statistics, University of California, Berkeley
2. Hawkins W.E., Clark M.S., Shima A., Walter R.B., Winn R.N., Westerfield M.: 2001. Four Resource Centers for Fishes: Specifics, Stocks, and Services. *Marine Biotechnology* 3: 239–248.
3. Kallman, D.K, Walter B.R., Morizot C.D., Kazianis D.: 2004. Two New Species of *Xiphophorus* (Poeciliidae) from the Isthmus of Tehuantepec, Oaxaca, Mexico, with a Discussion of the Distribution of the X. Clemenciae Clade; *The American Museum of Natural History*, number 3441: 34.
4. Walter B.R., Kazianis S.: 2001. *Xiphophorus* Interspecies Hybrids as Genetic Models of Induced Neoplasia. *ILAR Journal*, Volume 42, Number 4:299-321.
5. Walter B.R., Hazlewood L., Kazianis S.: 2006. *The Xiphophorus Genetic Stock Center Manual*.

