

---

Goranka  
TANACKOVIĆ

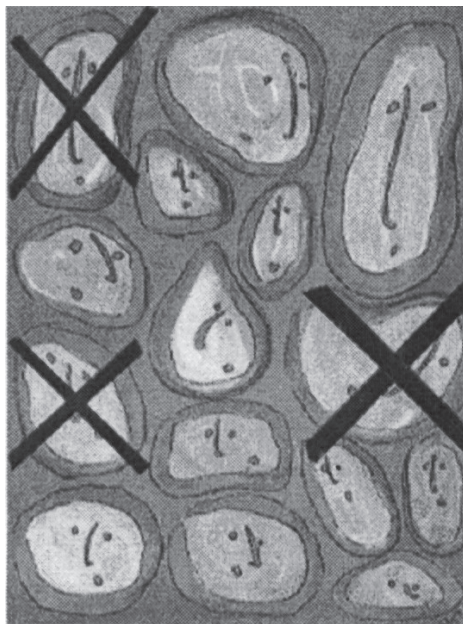
MOLEKULSKA  
GENETIKA U  
OTKRIVANJU  
NASLJEDNIH  
BOLESTI



Za vrijeme nacističke vladavine u Njemačkoj je tiskan novi srednjoškolski udžbenik za matematiku. Kao jedan od zadataka postavljen je i sljedeći:

*U jednom području Trećeg Reicha nalazi se 4.400 mentalno oboljelih osoba o kojima se skrbi država; 4.500 osoba koje primaju potporu države; 1.600 oboljelih osoba u lokalnim bolnicama; 200 osoba oboljelih od epilepsije u specijaliziranim ustanovama i 1.500 osoba u prihvatilištima. Za te institucije država plaća najmanje 10 milijuna RM na godinu.*

1. *Koliko prosječno košta državu svaka tako zbrinuta osoba?*
2. *Na temelju prvog odgovora, izračunajte koliko državu košta ako:*
  - a) *868 pacijenata ostane dulje od 10 godina?*
  - b) *260 pacijenata ostane dulje od 20 godina?*
  - c) *112 pacijenata ostane dulje od 2 godine? (1)*



Slika 1.  
Slika iz udžbenika za matematiku (nacistička Njemačka)

Ova dobro osmišljena ekonomska poruka zapravo je preuzeta iz spisa članova Nazi Physicain League:

*It must be made clear to anyone suffering from an incurable disease that the useless dissipation of costly medications drawn from the public store can not be justified. Parents who have seen the difficult life of a crippled or feeble-minded child must be convinced that, though they may have a moral obligation to care for the unfortunate creature, the broader public should not be obligated... To assume the enormous costs that long-term institutionalization might entail. (1)*

Tu koncepciju vlada Trećeg Reicha ozakonila je 1933. godine kao “Zakon o sprečavanju rađanja osoba s nasljednim oboljenjima”. Prema tom zakonu osobe koje su prenositelji nasljednih bolesti moraju se prisilno sterilizirati.

U povijesti nisu rijetki primjeri poput ovog iz doba nacističke Njemačke, a i danas nisu ništa manje zastupljeni slučajevi diskriminacije obitelji i osoba oboljelih od neke nasljedne bolesti. Mnoga osiguravajuća društva, posebice u Sjedinjenim Američkim Državama i Velikoj Britaniji, odbijaju sklopiti ugovore o životnom osiguranju s osobama oboljelim od neke teške nasljedne bolesti ili ako se zna da je osoba prenositelj takve bolesti. (2)

Za diskriminaciju takvih osoba mnogi su skloni optuživati humanu genetiku i genetičare, najčešće zbog nepoznavanja stvarnog stanja i problematike kojom se bave.

Jesu li doista genetičari uzrok poteškoćama oboljelih od nasljednih bolesti? Nije li izvor takvih problema zapravo u nedovoljno reguliranim pravnim odnosima? Dobra upućenost u osnovne spoznaje i postulate humane genetike i genetike uopće mogle bi pridonijeti boljem razumijevanju problema.

## Što je nasljedna bolest?

---

Nasljedna je bolest posljedica trajnih promjena gena ili kromosoma, koje se prenose s naraštaja na naraštaj neke obitelji. Ovisno o tome da li je promijenjeni gen na tjelesnom ili spolnom kromosomu, bolest ili ne ovisi o spolu ili je vezana za određeni spol (najčešće se spolno vezane nasljedne bolesti prenose s majke na sina). Promijenjeni gen može biti “jači” od “divljeg” tipa gena i tada govorimo o *dominantnoj nasljednoj bolesti*, koja se najčešće javlja u svakom naraštaju. Ako je promijenjeni gen “slabiji” od “divljeg” tipa gena radi se o *recesivnoj nasljednoj bolesti* i ona se najčešće ne uočava u svakom naraštaju. Bolest može izazvati promjena u samo jednom genu i tada govorimo o *monogenskim nasljednim bolestima*. Neke su bolesti posljedi-

ca usporedne promjene u više različitih gena pa ih nazivamo *poligenским bolestima*.

Najčešće monogenske nasljedne bolesti jesu: mišićna distrofija (Duchenne-Beckerova distrofija), cistična fibroza (mukoviscidoza), srpasta anemija, hemofilija, fenilketonurija, talasemija, sindrom fragilnog X, miotonična distrofija (Stainertova distrofija), Huntingtonova bolest, spinocerebelarne ataksije i dr. (3) Neke su od tih bolesti dominantne dok su druge recesivne. Za svaku od njih poznat je gen čija promjena uzrokuje bolest.

### Uloga molekulske genetike u otkrivanju nasljednih bolesti

---

Molekulska genetika ima nezamjenjivu ulogu u dijagnosticiranju nasljednih bolesti, ali je također sve važnija u njihovom sprečavanju i liječenju, što se prvenstveno odnosi na monogenske nasljedne bolesti.

Kako bi uloga molekulske genetike u otkrivanju tih bolesti bila razumljivija, dopustite mi da samo ukratko napomenem koje su osnovne molekulske-genetičke metode u dijagnosticiranju nasljednih bolesti.

Molekulske dijagnostike tih bolesti danas omogućavaju sljedeće metode: lančana reakcija polimerazom ili PCR (od engl. *Polymerase Chain Reaction*), metoda analize heterodupleksa ili HA (od engl. *Heteroduplex Analysis*), analiza oblika jednonančanih molekula DNA ili SSCP (od engl. *Single Strand Conformational Polymorphism*), analiza DNA u denaturirajućem gradijentnom gelu poliakrilamida ili DGGE (od engl. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), analiza DNA cijepanjem pomoću restrikcijskih enzima ili RFLP (od engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), analiza na temelju rodoslovlja (od engl. *Linkage Analysis*), bugaćenjem po Southernu (od engl. *Southern Blot*) i dr.

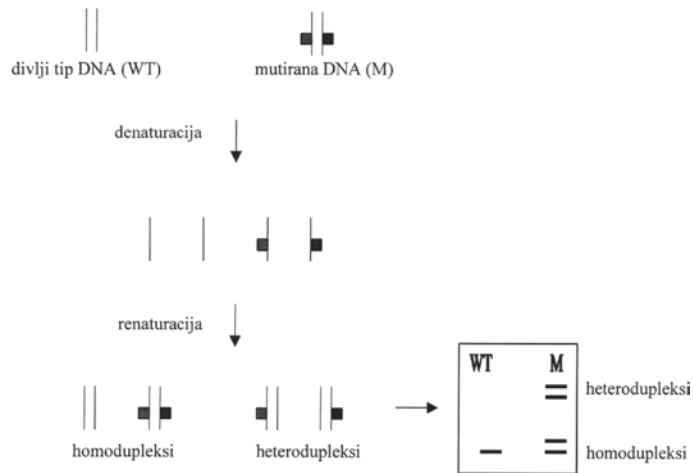
Naša genska uputa, dakle naši geni, danas su nam lako dostupni jer je moguće izolirati DNA iz krvi ili nekog drugog tkiva, odnosno iz stanica amnijske tekućine. Izolirana DNA sadrži sve naše gene, a broj kopija tih gena ovisi o broju stanica koje su upotrijebljene za izolaciju.

Želimo li provjeriti kako "izgleda" bilo koji od naših gena pomoći će nam metoda lančane reakcije polimerazom, koja omogućuje umnažanje određenog odsječka DNA (čitavoga gena ili samo jednog njegova dijela). To je vrlo brza, pouzdana i specifična metoda za otkrivanje mutacija. Produkt reakcije PCR analizira se elektroforezom u gelu agaroze ili poliakrilamida. (4)

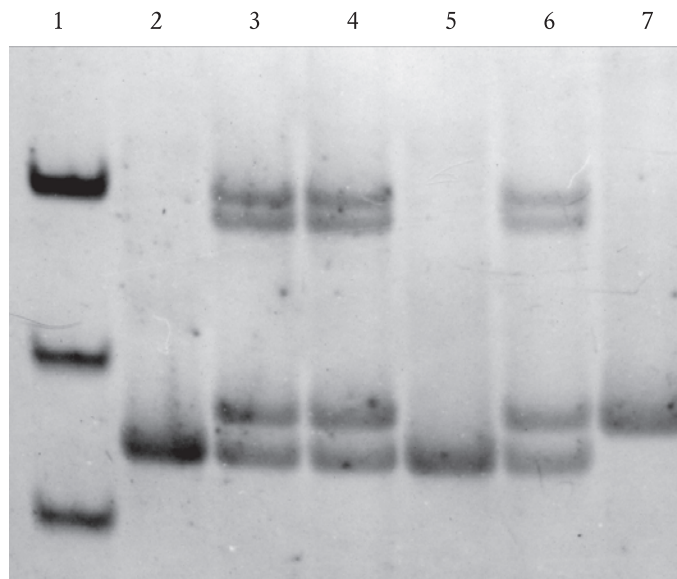
Umnoženu sekvencu možemo, osim elektroforezom, analizirati i drugim, već spomenutim metodama.

Analiza heterodupleksa utemeljena je na sposobnosti stvaranja heterodupleksa (hibridne molekule DNA) između divljeg tipa i mutirane DNA. Takvi heterodupleksi mogu se vidjeti na gelovima poliakrilamida, jer putuju sporije kroz gel nego homodupleksi. (5,6) (Slika 2 i 3)

Slika 2.  
 Načelo analize heterodupleksa

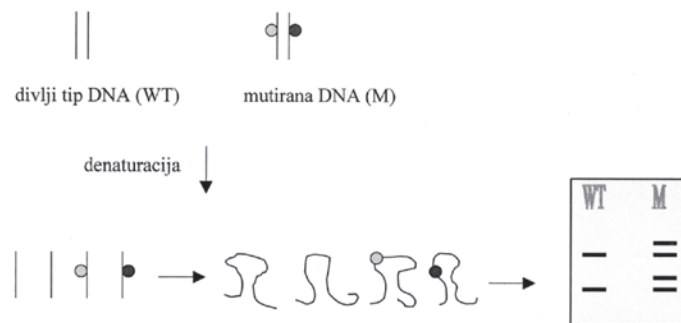


Slika 3.  
 Analiza heterodupleksa kojom  
 otkrivamo mutaciju  $\Delta F508$  u  
 genu *CFTR*



Analiza oblika jednonančanih molekula DNA omogućuje otkrivanje male promjene u genu, tzv. točkaste mutacije, nakon njihova umnožavanja lančanom reakcijom polimeraze. Temelji se na spoznaji da jednonančani odsejci DNA, koji se razlikuju čak u samo jednoj bazi, ima-

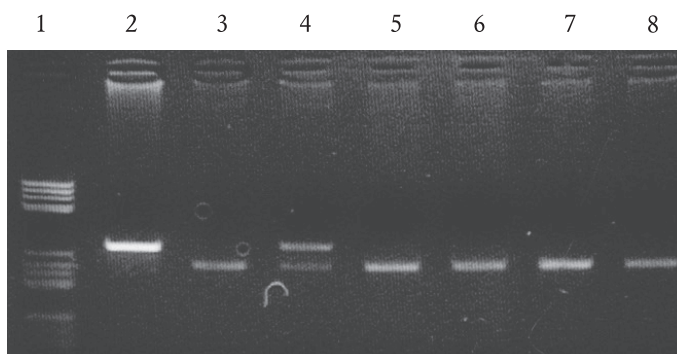
ju različitu pokretljivost u nativnom gelu poliakrilamida. Lanci molekule DNA razdvoje se denaturacijom i, budući da imaju različit slijed nukleotida, imaju i različite oblike, različitim brzinama putuju kroz gel. (6) (Slika 4)



Slika 4.  
 Analiza oblika jednolančanih  
 molekula DNA

Analiza DNA u denaturirajućem gelu poliakrilamida temelji se na činjenici da je mutirana DNA nestabilna zbog pogrešno sparenih baza. Putujući kroz gel, pojedine domene lanca DNA disociraju, ovisno o tome kakva im je struktura, u točno određenom dijelu koncentracijskog gradijenta gela. Takvo djelomično “taljenje” dvolančane DNA uzrokuje različitu pokretljivost mutiranog i divljeg tipa DNA.

Metoda analize DNA cijepanjem pomoću restrikcijskih enzima omogućuje detekciju točkastih mutacija. Mutacija može biti takva da stvara novo restrikcijsko mjesto, koje nije postojalo u divljem tipu gena, odnosno takva da uklanja postojeće mjesto djelovanja enzima. Ta se metoda danas često koristi, jer pouzdano otkriva već poznate mutacije. (7) (Slika 5)

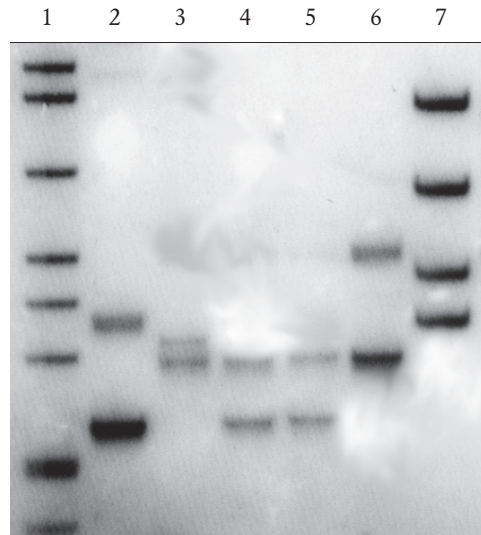


Slika 5.  
 Metoda analize DNA  
 cijepanjem pomoću  
 restrikcijskih enzima, kojom se  
 otkriva mutacija G542X u  
 genu *CFTR*

Analiza rodoslovlja najčešće koristi u prenatalnoj dijagnostici kad nisu poznate mutacije u roditeljskim genima, ili u slučaju višestrukih mutacija u genu. Ta dijagnostička

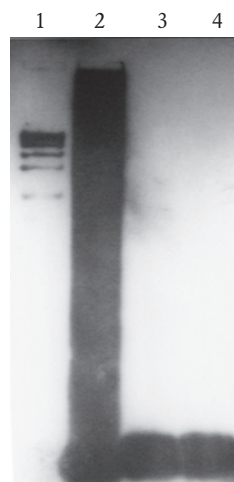
metoda, koja koristi intragenske biljege, ne otkriva o kojim je točno mutacijama riječ, no pouzdano može upozoriti da li je plod zdrav, bolestan ili nosi “bolestan” alel. Za takve analize nužno je imati uzorke DNA fetusa, uže obitelji i barem jednog oboljelog člana obitelji. (8) (Slika 6)

Slika 6.  
Analiza rodoslovlja za gen  
*DMPK*



Analiza bugaćenjem po Southernu omogućuje otkrivanje točno određenih dijelova DNA, karakterističnih za pojavu neke bolesti, npr. za detekciju velikih odsječaka DNA koji mogu biti posljedica tzv. dinamičnih mutacija, kad dolazi do ekspanzije trinukleotidnih slijedova unutar nekog gena. Takve mutacije uzrokuju bolesti kao što su sindrom fragilnog X, Huntingtonova bolest, miotonična distrofija, spinocerebelarne ataksije i dr. (9) (Slika 7)

Slika 7.  
Analiza po Southernu





## Prednosti i nedostaci molekulske dijagnostike

---

Prednosti molekulske dijagnostičkih metoda pred klasičnim dijagnostičkim metodama su brojne: one su preciznije i pouzdanije – ponekad klinička slika bolesnika nije karakteristična niti posve jasna i tada jedino molekulska dijagnostika može točno odgovoriti o kojoj se bolesti radi; omogućuju točno prepoznavanje uzroka bolesti (vrstu promjene u genu); pružaju mogućnost preimplantacijske i prenatalne dijagnostike – pravodobno uočavanje moguće bolesti još nerođenog potomstva; omogućuju primjenu genetskog liječenja.

Molekulska dijagnostika ima i nedostatke: dulje traje nego klasični dijagnostički postupci, koji se temelje na biokemijskim analizama; takva dijagnostika je skuplja nego klasična biokemijska analiza.

## Dobrobit molekulske dijagnostike

---

Mnogi su ljudi skloni optuživati genetičare za nehumanost, nepoštovanje ljudskog života i za manipulaciju njime, no s takvim izjavama treba biti oprezan. Molekulska genetika i njezina primjena u dijagnostici nasljednih bolesti dala je svakom čovjeku pravo na istinu – istinu o njegovu stvarnom stanju i njegovoj budućnosti. Omogućila je, razvojem preimplantacijske i prenatalne dijagnostike, svakoj obitelji pravo na izbor – uz dobar genetički savjet i mogućnost rađanja zdravog djeteta. Molekulska genetika danas kupuje vrijeme i budućnost za mnoge oboljele od nasljednih bolesti sve bržim razvojem genetskog liječenja.

Unatoč tome, mnogo je onih koji se neće složiti s takvim postavkama. Je li moralno raditi molekulske dijagnostiku Huntingtonove bolesti, čiji se prvi simptomi pojavljuju tek oko 50-te godine života? Je li etički raditi presimptomatsku dijagnostiku npr.  $\beta$ -talasemije, kad njezina klinička slika može biti vrlo blaga i osoba može živjeti bez većih problema? No, pri tome će zaboraviti što je s potomstvom tih osoba, što je sa sljedećim naraštajima? Što ako klinička slika bolesti u sljedećem naraštaju ne bude tako blaga? Pitanje se posebno odnosi na bolesti uzrokovane dinamičnim mutacijama, a karakterizira ih činjenica da se poremećaj u svakom sljedećem naraštaju pojavljuje sve ranije i ima sve težu kliničku sliku. Što ako za samo mjesec ili godinu dana genska terapija omogući potpuno izliječenje oboljelih od tih bolesti?

Mnogo je onih koji će biti skloni vidjeti samo loše strane pouzdane dijagnostike nasljednih bolesti i reći da to olakšava diskriminaciju ljudi, izaziva niz psiholoških i so-

cioloških problema, potiče pobačaje itd. Mogli bismo nabrajati puno razloga za i protiv molekulske genetike i molekulske dijagnostike, no ne smijemo zaboraviti da svaka osoba ima pravo odlučiti prihvatiti ili ne genetičko testiranje. Prva misao svakoga humanoga genetičara mora biti kako pomoći čovjeku i omogućiti mu sretniju budućnost, što je potpuno u skladu s etičkim načelima.

Upućenost većeg broja ljudi u problem nasljednih bolesti te znanje o ulozi molekulske genetike znatno bi pojašnjali problem i dali više odgovora na još neriješena pitanja.

## LITERATURA

1. <http://www.techreview.com/articles/as96/allen.html>  
Allen, G. E. (1996), *Science misapplied: The eugenics are revisited by Garland E. Allen.*
2. Holtzman, N. A., Shapiro, D. (1998), Genetic testing and public policy, *British Medical Journal*, 316:852-856.
3. <http://www.med.upenn.edu/bioethic/genetics/articles/>  
Holme, H. (1999), *Ethic and Genetic Paper. Choose Better human genes.*
4. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (1990), *PCR protocols*, Academic Press Inc.
5. Glavač, D., Dean, M. (1995), Applications of heteroduplex analysis for mutation detection in disease genes, *Human Mutation*, 6:281-287.
6. Glavač, D., Dean, M. (1995), Comparison of the sensitivity of single-strand conformational polymorphism and heteroduplex methods, *Methods in Neurosciences*, 26:194-209.
7. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York: 5.10-5.34.
8. Morral, N., Estivill, X. (1992), Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene, *Genomics*, 13:1362-1364.
9. Southern, E. M. (1975), Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *Journal of Molecular Biology*, 98:503-517.