

Genetske bolezni in genska preiskava

Radovan Komel



Bolezni, ki so posledica sprememb v strukturi in delovanju genov, so velik zdravstveni problem. Poleg prizadetosti samega bolnika pomenijo čustveno, organizacijsko ter finančno breme svojcem in seveda tudi družbi in njeni zdravstveni službi. So med glavnimi vzroki za smrtnost otrok do petnajstega leta starosti in odraslih v drugem obdobju življenja. Med približno 5.000 z genskimi spremembami povezanimi boleznimi je sicer večina redkih, vendar pa ni malo tudi takih, ki so bolj ali celo zelo pogoste. Vsak petindvajseti med nami je npr. nosilec mutacije na enem alelu CF-gena in bolezen cistična fibroza (CF) prizadene enega na 1.500 novorojenčkov, ki je od obeh staršev podedoval mutirana genska alela.

Genetske spremembe so spremembe v strukturi DNA. Njihove posledice se kažejo kot nepravilnosti v strukturi beljakovin in s tem kot nepravilnosti v zgradbi in delovanju celice oziroma organizma. Spremembe v genih so lahko posledica zunanjih dejavnikov, ki so lahko fizikalni (npr. toplota, ultravijolično ali ionizirajoča sevanja, ki na nekaterih mestih povzročajo lomljenje kromosomov, razpad spojin na radikale, ki reagirajo z DNA, ali pa ustvarjajo nenavadne povezave med bazami nukleotidov DNA), kemijski (razne škodljive kemikalije, ki neposredno ali posredno reagirajo z DNA) ali biološki (npr. virusi, ki vrinejo svojo nukleinsko kislino v gen in s tem spremenijo njegovo zaporedje nukleotidov), lahko pa nastanejo tudi zaradi notranjih vzrokov (npr. zaradi motenj v delovanju encimov, ki popravljajo napake pri podvojevanju DNA, ali pa zaradi napak pri izmenjavi segmentov DNA homolognih kromosomov med mejozo). Mutacija je vsaka sprememba v strukturi DNA (razen tistih, ki nastanejo zaradi normalne rekombinacije med mejozo), ki je celični popravljalni mehanizmi ne odstranijo, in tako postane stalna ter se prenaša na hčerinske celice ali celo v naslednje generacije potomcev. Če do mutacije pride v telesni (somatski) celici in se ta med celično delitvijo prenese le na hčerinske telesne celice, nastane skupek mutiranih celic, v organizmu omejeno, tako imenovano mutirano območje (npr. tumor) in taki mutaciji pravimo somatska mutacija. Govorimo o »genetski« (izraz se nanaša na »dednino«) oziroma »genski« (izraz se nanaša na poškodbe genov) okvari ali nepravilnosti, ki ima za posledico »genetsko/gensko pogojene« bolezni in motnje. Če pa do mutacije pride v kličnih oziroma spolnih celicah, se ta prenese v vse celice bodočega organizma: tako mutacijo imenujemo zarodna (angl. germ-line) mutacija. Zarodna mutacija je lahko »pridobljena« (podobno kot somatske mutacije) in bolezen, ki je njena posledica, do tega trenutka ni bila v bolnikovi družini. Lahko pa je podedovana, kar pomeni, da je navzoča v vseh telesnih in kličnih celicah enega ali obeh staršev; govorimo torej o »družinski« obliki bolezni. V primeru »prirojene« genetske/genske okvare je tako posledica »dedna« genetska bolezen ali motnja, saj izraz vsebuje tudi pojem dedovanja.

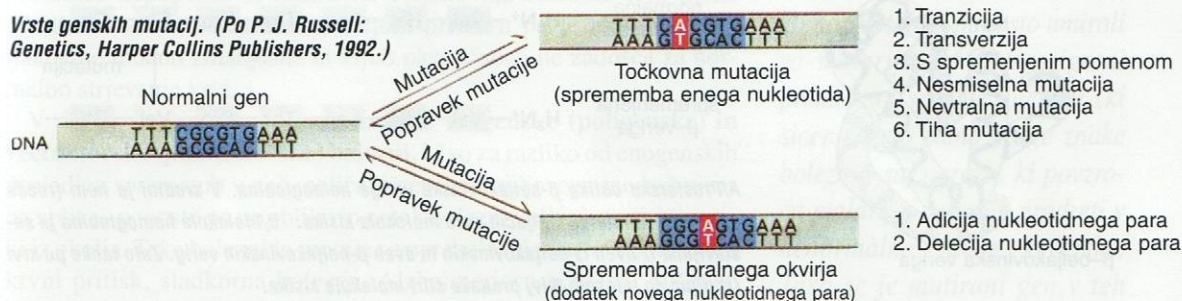
Mutacije DNA so lahko vzrok za genetske bolezni

Mutacije lahko spremenijo strukturo in število kromosomov; govorimo o »kromosomskih aberacijah« oziroma »kromosomskih mutacijah«. Če pride do spremembe v številu celega kompleta kromosomov (človeške celice vsebujejo dva kompleta kromosomov, 2×23 kromosomov, omenjena sprememba pa bi povzročila navzočnost treh

(3 x 23) ali enega (1 x 23) kompleta kromosomov), pa govorimo o »genomski mutaciji«. Vsekakor mutacije, ki vplivajo na strukturo kromosomov, hkrati prizadenejo tudi strukture ali zaporedja posameznih genov.

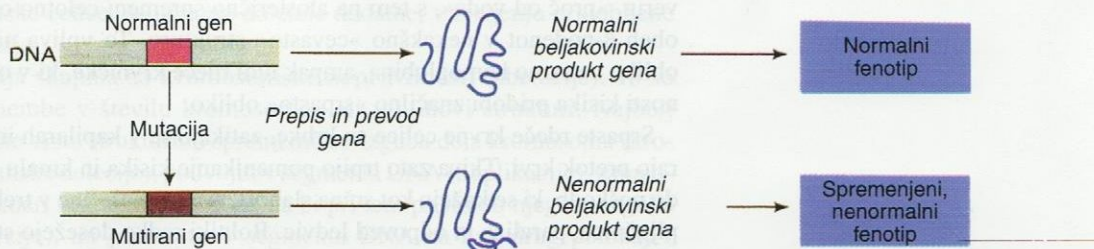
Do mutacij pa lahko pride tudi v različnih genih, ne da bi s tem bili porušeni struktura in organizacija kromosomov. V tem primeru govorimo o »genskih mutacijah«, pri katerih je lahko navzoča kakršnakoli sprememba v zaporedju nukleotidov določenega gena. Lahko gre za obsežnejše izpade krajših ali daljših segmentov DNA (delecije), vrvke segmentov DNA (insercije), lahko pa tudi za spremembe enega samega nukleotida (točkovne mutacije).

Vrste genskih mutacij. (Po P. J. Russell: *Genetics*, Harper Collins Publishers, 1992.)



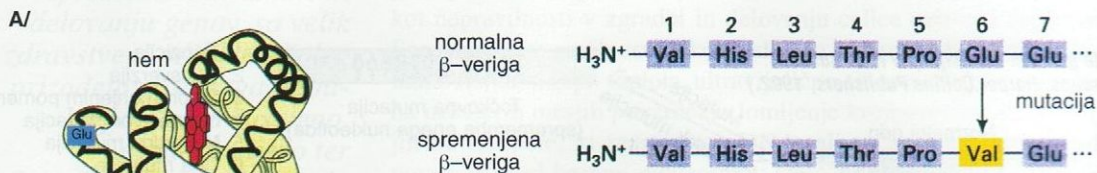
Točkovna mutacija, pri kateri pride v DNA do zamenjave enega nukleotidnega para z drugim, se imenuje zamenjava (substitucijska mutacija). Na sliki (A) je prikazana zamenjava nukleotidnega para št.2 v območju gena, označenem z modrim: par GC se zamenja z AT (označeno rdeče). Posledica bo sprememba kodona CGC v CAC in s tem zamenjava ene aminokislinske v beljakovini, ki jo kodira ta gen. Mutaciji, ki je prikazana na sliki, pravimo tudi »tranzicija«, saj je prišlo do zamenjave enega para purinsko-pirimidinske baze (GC) z drugim purinsko-pirimidinskim parom (AT). Če bi se purinsko-pirimidinski par (GC) zamenjal s pirimidinsko-purinskim (CG), bi to bila »transverzija« mutacija. Če je posledica mutacije zamenjava aminokislinske v beljakovini, taki mutaciji pravimo »mutacija s spremenjenim pomenom« (angl. missense mutation); drugačna aminokislina lahko zelo vpliva na strukturo beljakovine, saj se s šibkimi vezmi drugače povezuje s sosednjimi in bolj oddaljenimi aminokislinami, lahko pa ima tudi neposreden vpliv na njeno aktivnost, še zlasti če se nahaja na funkcionalnem, aktivnem delu beljakovine. Lahko pa je vpliv zamenjave tudi manjši; če funkcija beljakovine kljub zamenjani aminokislini ni prizadeta, govorimo o »nevtralni mutaciji«, če pa mutacija ustvari sicer nov kodon, vendar ta kodira isto aminokislino, govorimo o »tihhi mutaciji«. Sprememba enega nukleotidnega para lahko ustvari tudi enega od STOP kodonov (UAG, UAA ali UGA); v tem primeru gre za »nesmiselno mutacijo« (angl. nonsense mutation); posledica je prehitro zaključek prevajanja mRNA v beljakovino, ki bo s tem krajša in seveda funkcijsko okrnjena.

Drugi del slike (B) prikazuje vrvke (insercijo) novega nukleotidnega para AT (označeno rdeče) v gensko zaporedje. Posledica je, da so od tega mesta naprej premaknjeni vsi tripleti nukleotidov (kodoni), in beljakovina bo zato imela popolnoma spremenjeno aminokislinsko sestavo. Podobno se zgodi pri izgubi (deleciji) nukleotidnega para. Takim mutacijam pravimo »mutacije s premikom bralnega okvirja« (angl. frame-shift mutations).

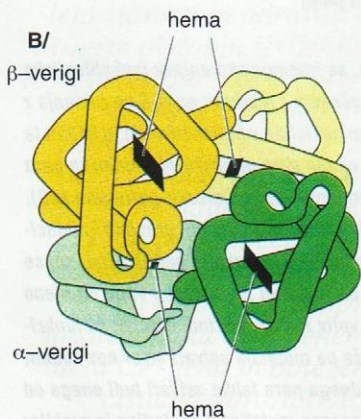


Genetske bolezni uvrščamo v več skupin

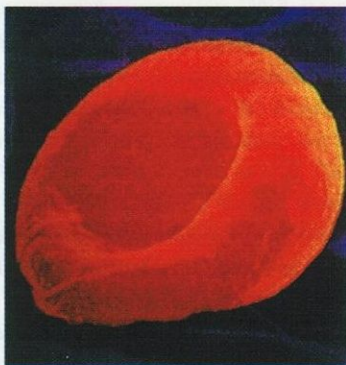
Poznamo tri do štiri skupine genetskih bolezni. **Enogenske (monogenske) bolezni** so posledica mutacije ali več vrst mutacij v posameznem genu. Zato je spremenjena, okvarjena ena sama vrsta beljakovine, ki je del celične zgradbe oziroma njene biokemijske aktivnosti. Taka bolezen je na primer srpasta anemija. Bolezen povzroča mutacija v genu za β -beljakovino, ki je del strukture hemoglobina. Gre za substitucijsko mutacijo, ki spremeni bazni par v šestem kodonu tega gena; kodon, ki sicer kodira glutaminsko aminokislino, se spremeni v kodon za aminokislino valin:



A/Prostorska oblika β -beljakovinske verige hemoglobina. V sredini je hem (rdeče označen), kamor se v pljučih veže molekula kisika. **B/Molekula hemoglobina** je sestavljena iz dveh α -beljakovinskih in dveh β -beljakovinskih verig. Zato lahko po krvi (iz pljuč do telesnih tkiv) prenaša štiri molekule kisika.



(po P. J. Russell: *Genetics*, Harper Collins Publishers, 1992.)



Glutaminska kislina, ki je na N-koncu normalne β -beljakovinske verige, je močno polarna in zato to območje beljakovine usmerja proti vodnemu okolju ter s tem pogojuje celotno obliko molekule, da se prilagaja ostalim trem podenotam hemoglobina in z njimi sodeluje pri prenosu kisika. Aminokislina valin v mutiranem hemoglobinu pa je hidrofobna, zato zvija svoje območje v notranjost β -beljakovinskih verig, »proč od vode«, s tem pa alosterično spremeni celotno obliko obeh β -podenot v nekakšno »cevast« strukturo. To vpliva na vso obliko ne samo hemoglobina, ampak tudi rdeče krvničke, ki v odsotnosti kisika pridobi značilno »srpasto« obliko.

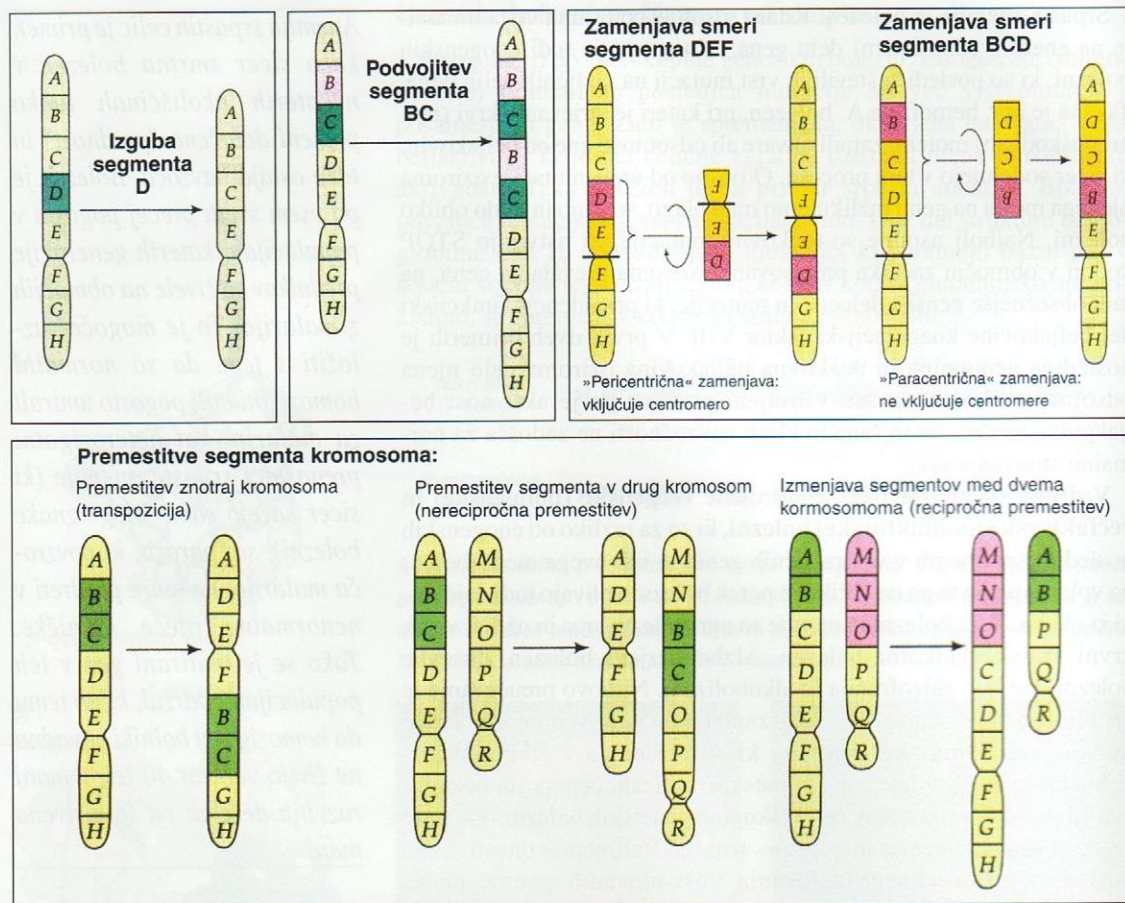
Srpaste rdeče krvne celice so krhke, zatikajo se v kapilarah in ovirajo pretok krvi. Tkiva zato trpijo pomanjkanje kisika in kmalu pride do poškodb, ki se kažejo kot srčna slabost, revma, bolečine v trebuhu, pljučnica, paraliza in odpoved ledvic. Bolniki redko dosežejo starost 40 let.

Srpasta anemija je bolezen, katere vzrok je ena sama vrsta mutacije na enem (vedno istem) delu gena. Mnogo pa je tudi enogenetskih bolezni, ki so posledica številnih vrst mutacij na različnih delih gena. Takšna je npr. hemofilija A, bolezen, pri kateri je strjevanje krvi (npr. pri poškodbah) moteno zaradi okvare ali odsotnosti ene od beljakovin, ki sicer sodelujejo v tem procesu. Odvisno od vrste mutacije oziroma njenega mesta na genu razlikujemo med blago, srednjo in hudo obliko bolezni. Najbolj usodne so točkovne mutacije, ki ustvarijo STOP kodon v območju začetka prepisovanja oziroma prevajanja gena, pa tudi obsežnejše genske delecije in mutacije, ki prizadenejo funkcijski del beljakovine koagulacijski faktor VIII. V prvih dveh primerih je posledica nepopolna in neaktivna beljakovina oziroma celo njena odsotnost v krvni plazmi, v tretjem primeru pa je aktivnost beljakovine močno zmanjšana in kljub navzočnosti ne zadošča za normalno strjevanje krvi.

V drugo skupino uvrščamo prirojene **večgenske (poligenske) in večfaktorske (polifaktorske) bolezni**, ki so za razliko od enogenetskih posledica sprememb v več različnih genih in njihovega medsebojnega vpliva, pogosto pa na obliko in potek bolezni vplivajo tudi dejavniki iz okolja. Take bolezni in motnje so npr. bolezni srca in ožilja, visok krvni pritisk, sladkorna bolezen, Alzheimerjeva bolezen, duševne bolezni, kot npr. shizofrenija in alkoholizem. Njihovo preučevanje je zaradi različnih dejavnikov zelo zapleteno. V to skupino bi lahko uvrstili tudi **somatske motnje**, ki so posledica v življenju pridobljenih mutacij v telesnih (somatskih) celicah, čeprav jih nekateri avtorji uvrščajo v posebno, četrto skupino genetskih bolezni. Do pred kratkim smo za »genetske bolezni« namreč šteli nepravilnosti, ki so posledica nenormalnega delovanja poškodovanih genov, podedovanih od staršev. V zadnjih letih pa je postalo jasno, da številne oblike raka izvirajo iz v življenju pridobljenih poškodb genetskega ustroja posameznih telesnih celic. Večina tkiv se stalno obnavlja, kar zahteva pravilno in nadzorovano delitev celic ter njihovo rast oziroma »zorenje«. Celično delitev in diferenciacijo nadzorujejo številni geni v teh celicah oziroma v celicah, ki s svojimi beljakovinskimi produkti vplivajo na dogajanja v prvih. Če pride do poškodb teh genov, lahko to sproži maligno transformacijo celice (glej Proteus št.6/60, str. 255-259), in danes že vemo, da rak nastane kot posledica v življenju pridobljenih mutacij celega niza omenjenih vitalnih genov. Pri številnih oblikah lahko tudi podedujemo določene gene z mutacijami, kar pomeni večjo verjetnost maligne transformacije posamezne somatske celice, če jo bodo doletele dodatne, v življenju pridobljene mutacije.

Tretja skupina so **kromosomske nepravilnosti (aberracije)**. To so spremembe v številu kromosomov ali v njihovi strukturi. Najbolj pogoste vrste strukturnih sprememb so izguba dela kromosoma (kromosomske delecije), podvojitev segmenta DNA (duplikacije), zamenjava smeri segmenta DNA, ne da bi pri tem prišlo do njegove izgube (inverzije), ter premestitev segmenta DNA na kak drug položaj v genomu, npr. v drug kromosom (translokacije).

Anemija srpastih celic je primer, kako sicer smrtna bolezen v nekaterih okoliščinah lahko pomeni določeno "prednost" in tako ostaja navzoča. Bolezen je po vsem svetu precej pogosta v populacijah, katerih generacije prednikov so živele na območjih z malarijo. To je mogoče razložiti s tem, da so normalni homozigoti bolj pogosto umirali za malarijo kot heterozigotni prenašalci srpaste anemije (ki sicer kažejo samo blage znake bolezni), saj parazit, ki povzroča malarijo, ne more prodreti v nenormalne rdeče krvničke. Tako se je mutirani gen v teh populacijah obdržal, kljub temu da homozigotni bolniki navadno ne živijo več kot 40 let, v manj razvitih deželah pa še bistveno manj.



Do loma kromosomov lahko pride zaradi vročine, radiacije, škodljivih kemikalij, virusne infekcije ali pa zaradi napak pri rekombinaciji segmentov DNA med prekrivanjem homolognih kromosomov (angl. crossing over) v procesu oblikovanja spolnih celic (mejoza, glej Proteus 7/60, str.316). Odlomljeni segmenti DNA se lahko izgubijo ali pa prerazporedijo po enem od opisanih načinov. Posledica so fenotipske nepravilnosti in bolezni zaradi motenj pri ločevanju (segregaciji) kromosomov med mejozo, zaradi prekinitev genov ob mestih loma kromosoma, zaradi izgube genov pri deleciji, zaradi čezmernega izražanja genov pri duplikaciji ali zaradi njihovega nepravilnega razvrščanja in izražanja pri inverziji oziroma translokaciji (po P. J. Russell: *Genetics*, Harper Collins Publishers, 1992).

Spremembe v številu kromosomov povzročajo aneuploidnost, monoploidnost ali poliploidnost.

Pri aneuploidnosti pride do izgube oziroma dodatka enega ali več kromosomov k običajnemu številu kromosomov. Kromosomi se lahko izgubijo oziroma dodajajo zaradi kakšne od opisanih kromosomskih sprememb, ki moti normalen potek mitoze oziroma mejoze. Pri »ničsomni« celici je izgubljen en komplet kromosomski par, pri »monosomni« celici je izgubljen en kromosom določenega para homolognih kromosomov, pri »trisomni« celici je k nekemu kromosomskemu paru dodan še en homologen kromosom, za »tetrasomijo« pa je značilen dodatek dveh homolognih kromosomov h kromosomskemu paru, torej štirje homologni kromosomi med ostalimi normalnimi, kjer sta le po dva. Ena najbolj poznanih bolezni je trisomija

kromosoma 21, tako imenovani Downov sindrom (mongolizem). Ker je kromosom 21 eden najmanjših človekovih kromosomov, vsebuje manj genov od večine ostalih. Dodatna genska doza ima zato manjše posledice, kot bi jih npr. imela bistveno večja navzočnost dodatnih genskih kopij pri trisomiji enega od večjih kromosomov. Nepravilnost se tako kaže le v obliki manjšega inteligenčnega kvocienta (IQ), kratkih in odebeljenih okončin, pomanjšani telesni teži ter poševnih očesnih gubah.

Monoploidnost pomeni izgubo celotnega kompleta kromosomov, ne samo enega ali nekaj kromosomov posameznih kromosomskih parov; celica organizma, ki je sicer diploiden, tako postane monoploidna. Poliploidnost pa pomeni, da ima celica oziroma organizem enega ali več dodanih celotnih kompletov kromosomov. Monoploidnost in poliploidnost, ki sta genomske mutaciji, sta usodni za večino živalskih organizmov, imeli pa sta pomembno vlogo pri razvoju rastlinskih vrst.

Kako se genetske bolezni dedujejo

Človekov diploidni genom je sestavljen iz dveh kompletov avtosomov (2×22 nespolnih kromosomov; v vsakem homolognem paru teh 44 avtosomov je po en kromosom materin in en očetov) ter enega para spolnih kromosomov (XX ali XY; X je ženski in Y moški spolni kromosom). V mitohondrijih, celičnih dihalnih organelih, pa je v več kopijah navzoč še majhen mitohondrijski kromosom. Glede na kromosomsko lokacijo poznamo tri osnovne načine dedovanja sprememb, ki povzročajo genetske bolezni.

Geni, katerih mutacije povzročajo avtosomno recesivne bolezni, se nahajajo v avtosomnih (nespolnih) kromosomih. Heterozigoti, ki imajo mutiran samo en alel homolognega genskega para, so prenašalci mutacije, fenotipsko pa so zdravi, saj neprizadeti genski alel proizvaja dovolj beljakovine za normalno delovanje organizma oziroma določenega organa. Zbolijo lahko otroci heterozigotnih staršev, in sicer tedaj, ko podedujejo oba mutirana alela (po enega od obeh staršev), in so tako homozigotni za mutiran gen; ta verjetnost je 25-odstotna, prav tako kot verjetnost, da ne bodo podedovali nobenega od mutiranih alelov in bodo tako genotipsko ter fenotipsko normalni. S 50-odstotno verjetnostjo pa bo otrok heterozigotnih staršev podedoval prizadeti alel le od enega od staršev in bo tako tudi on fenotipsko zdrav ter samo prenašalec mutiranega gena. Zato so mutirani geni avtosomno recesivnih bolezni v neki populaciji precej pogosti. Taki bolezni sta na primer srpasta anemija in v uvodu omenjena cistična fibroza.

		<i>a</i> – mutirani alel <i>A</i> – normalni alel	
		<i>a</i>	<i>A</i> oče
mati	<i>a</i>	<i>aa</i>	<i>aA</i>
	<i>A</i>	<i>Aa</i>	<i>AA</i>

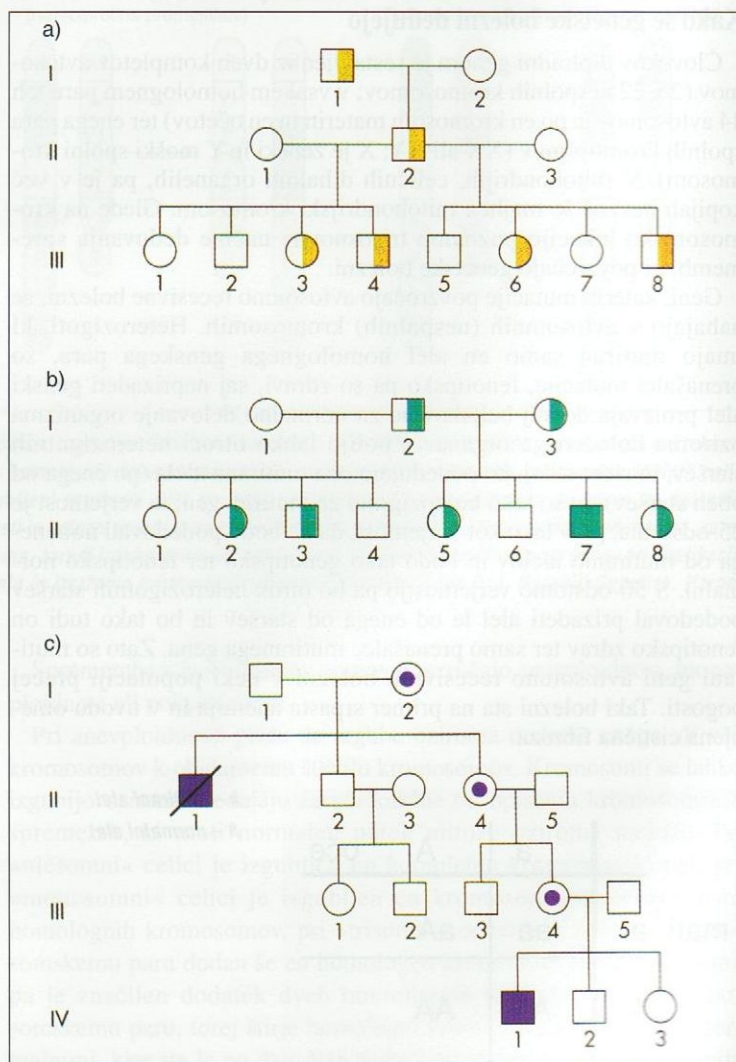
Za **avtosomno dominantne bolezni** je značilno, da je dovolj že mutacija na enem od obeh alelov homolognega genskega para in tako so heterozigoti bolniki. Posledica mutacije gena je pomanjkanje beljakovinskega produkta za normalno delovanje organizma, kljub navzočnosti nemutiranega alela, lahko pa se tudi zgodi, da je produkt mutiranega gena škodljiv. Če je eden od staršev bolnik, imajo otroci 50% možnosti, da bodo tudi sami heterozigotni bolniki. Problem pri teh boleznih je, da se včasih pojavijo šele kasneje v življenju oziroma jih zaradi spremenljivega izražanja ne spoznamo dovolj zgodaj. Tako imajo starši otroke, ne da bi se zavedali, da je eden od njih bolnik in prenašalec mutiranega gena. Taka bolezen je na primer policistična bolezen ledvic, ko zaradi pojava cist v starejši življenjski dobi lahko pride do odpovedi ledvic in tako odvisnosti bolnika od dialize.

(a): Družinsko drevo pri avtosomno dominantni dedni bolezni. Sin II/2 očeta, heterozigotnega bolnika I/1, ima otroke z dvema genotipsko zdravima ženskama (II/1 in II/3). Prikazana je verjetnost prenosa bolezni na potomce, ki je v obeh primerih 50-odstotna.

(b): Družinsko drevo pri avtosomno recesivni dedni bolezni. S kvadrati so označeni moški, s krogi pa ženski družinski člani. S polzapolnjenimi simboli so označeni heterozigotni prenašalci, s polnimi simboli pa homozigotni bolniki. Prikazani sta obe možnosti (I): poroka heterozigotnega prenašalca 2 z genotipsko normalno žensko 1 oziroma s prenašalko 3.

(c): Družinsko drevo pri X-vezani bolezni. Verjetnost, da bo otrok od heterozigotne matere podedoval mutiran X-alel, je 50-odstotna.

Na sliki je prikazano, kako lahko bolezen "preskoči" celo generacijo (III) in se pojavi šele v naslednji (IV/1). Gre za hudo obliko bolezni, saj je bolni sin iz druge generacije (II/1) umrl, še preden je lahko imel svojo družino.



Bolezni, ki so posledica mutacij v genih v spolnem kromosomu X, so **X-vezane bolezni**. Moški imajo samo en kromosom X (genotip XY) in se bolezen pri njih zato kaže kot dominantna. V tem primeru pa niso prenašalci mutacije, saj njihov kromosom X vedno prehaja samo na ženske potomce. Pri ženskah, ki imajo dva kromosoma X (genotip XX), je mutacija recesivna in heterozigotne (mutacijo samo v enem od obeh kromosomov X) so prenašalke bolezni, fenotipsko pa so zdrave. Pri združitvi moškega bolnika in ženske prenašalke lahko pride tudi do rojstva homozigotne hčerke, z mutacijo na obeh alelih kromosoma X. Hči je v tem primeru bolnik. Primer X-vezane bolezni je hemofilija A.

Genska preiskava in diagnostika genetskih bolezni

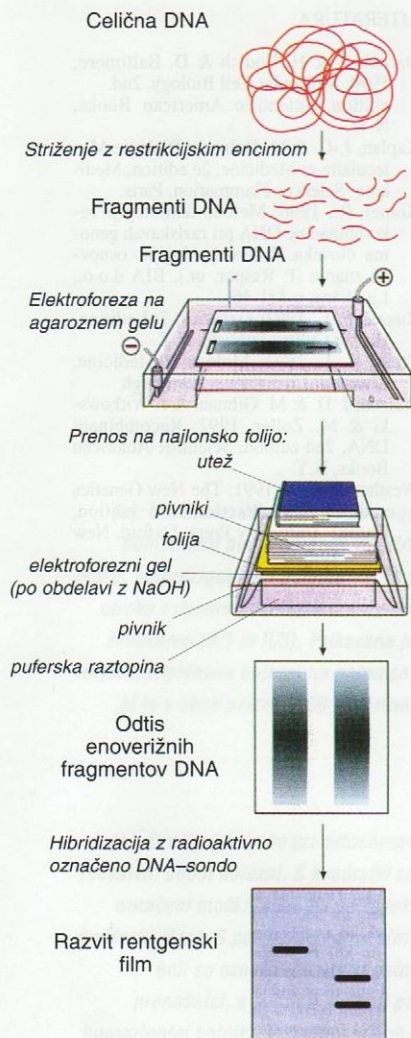
Med približno 5.000 z genskimi spremembami povezanimi boleznimi je le manjši del, približno 600, takšnih, za katere poznamo okvarjeno beljakovino, ki bolezen povzroča. Biokemijska diagnostika s preiskavo beljakovin ima številne omejitve, saj se nekatere beljakovine izražajo le v nekaterih, večkrat težko dostopnih tkivih, gojenje celic (s tem želimo pridobiti več beljakovine za preiskavo) v celičnih kulturah pa je zahtevno in dolgotrajno. Pogosto pride do okužb in propada celic, še preden jih je dovolj za preiskavo. Številni beljakovinski testi so nezanesljivi in nenatančni ter jih je mogoče uporabiti šele, ko se je bolezen že razvila.

Uvedba metod genske preiskave je močno izboljšala možnosti prepoznavanja genetskih bolezni (klinična diagnostika), v številnih primerih tudi več let pred pojavom bolezenskih znakov (predisimptomatična diagnostika) ali celo pred rojstvom (predrojstvena oziroma prenatalna diagnostika). Pri preiskavi DNA nismo omejeni samo na prepoznavanje genetskih bolezni, pri katerih poznamo njihovo biokemijsko osnovo (okvarjeno beljakovino), ampak lahko določamo vse bolezni, za katere poznamo gen oziroma mutacije, ki bolezen povzročajo. Govorimo o neposredni diagnostiki s preiskavo DNA, ki je hitra, natančna in zanesljiva. V številnih primerih, ko ne poznamo niti okvarjene beljakovine niti gena, pa lahko izvajamo tako imenovano posredno diagnostiko, pri kateri preiskujemo DNA v bližini predpostavljenega položaja »bolezenskega« gena. Iz načina dedovanja s takšno preiskavo najdene posebnosti v preiskanem delu DNA, ki naj bi se zaradi bližine prenesla skupaj z bolezenskim genom na potomce, lahko sklepamo tudi o tem, ali je potomec bolezen podedoval ali ne. Prednost obeh pristopov je tudi v tem, da lahko odkrivamo tudi prenašalce mutiranih genov, ki sicer ne kažejo znakov bolezni.

Na primeru avtosomno recesivne bolezni si oglejmo, kako poteka postopek diagnostike dedne bolezni z gensko preiskavo. Preiskovanju in njegovim staršem odvzamemo vzorec krvi. DNA izoliramo iz lahko dostopnih belih krvnih celic (levkocitov), saj je poznano, da imajo vse celice našega organizma enako gensko sestavo. Izolirano DNA lahko preiščemo s klasično metodo po Southernu oziroma z novejšo metodo verižnega pomnoževanja DNA.

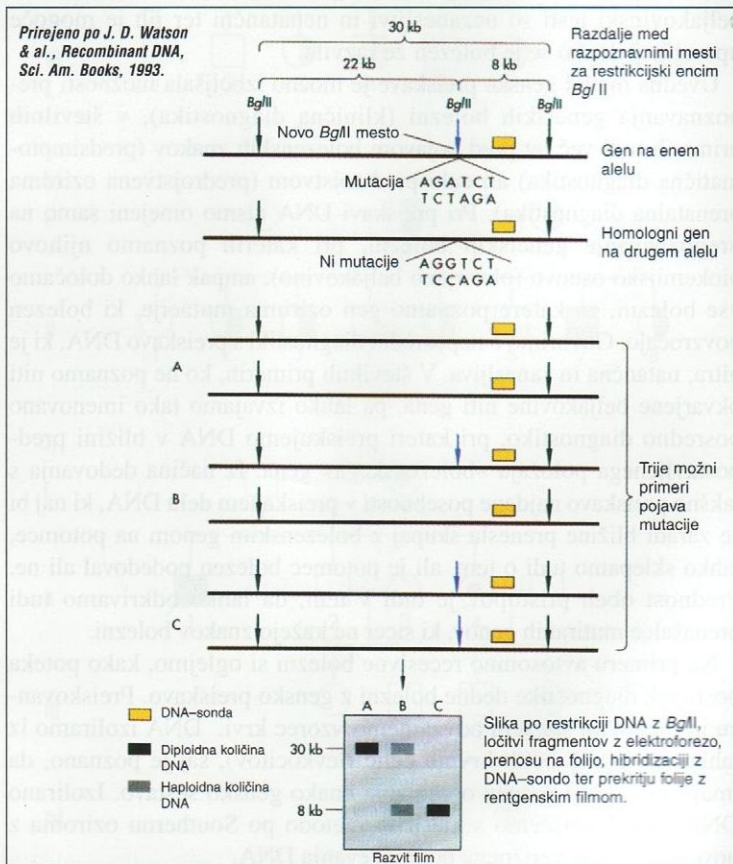
LITERATURA:

- Darnell, J. & H. Lodish & D. Baltimore, 1990: Molecular Cell Biology, 2nd edition, Scientific American Books, N.Y.
- Kaplan, J.-C. & M. Delpuch: Biologie Moléculaire et Médecine, 2e édition, Médecine-Sciences Flammarion, Paris.
- Komel, R., 1996: Metode tehnologije rekombinantne DNA pri raziskavah genoma človeka. V: Biotehnologija - osnovna znanja (P. Raspor, ur.), BIA d.o.o., Ljubljana, p.331-46.
- Russel, P. J., 1992: Genetics, 3rd edition, Harper Collins Publish., N.Y.
- Trent, R. J., 1993: Molecular Medicine, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Watson, J. D. & M. Gilman, & J. Witkowski & M. Zoller, 1992: Recombinant DNA, 2nd edition. Scientific American Books, N.Y.
- Weatherall, D. J., 1991: The New Genetics and Clinical Practice, 3rd edition, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.



Na sliki desno je prikazan primer, ko mutacija v genu ustvari še eno, dodatno cepitveno mesto za encim, s katerim smo sicer razcepili DNA na že omenjeno veliko število fragmentov. Možni so naslednji primeri: na obeh genskih alelih na tem položaju ni cepitvenega mesta in fragmenta, ki ju prepozna DNA-sonda, sta daljša - oseba je v tem primeru homozigot brez mutacije (A); na enem alelu je mutacija ustvarila dodatno cepitveno mesto in DNA-sonda bo prepoznala pri tem nastali krajši fragment, na drugem alelu pa daljšega, saj tam ni mutacije - oseba je heterozigot (B); na obeh genskih alelih je prišlo do mutacije in nastanka dodatnega cepitvenega mesta, zato bo DNA-sonda v obeh primerih prepoznala krajša fragmenta - oseba je homozigot z mutacijo (C).

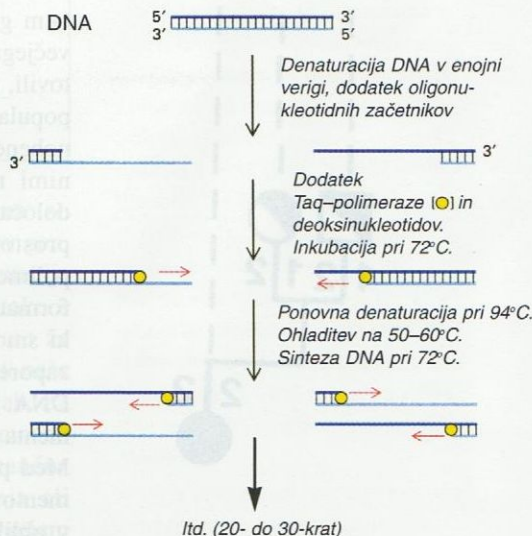
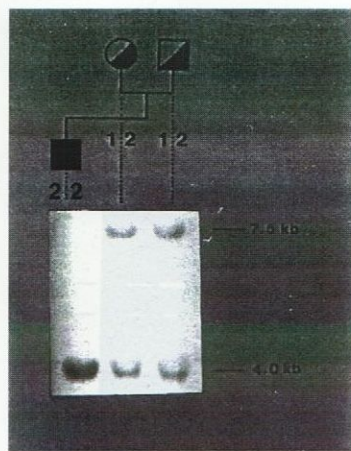
Southernov prenos (angl. Southern blot): Izolirano DNA razstrižemo z izbranim restrikcijskim encimom (glej Proteus 1/60, str. 12) in na ta način ustvarimo 500.000 do milijon različno dolgih fragmentov DNA. Njihovo natančno število je odvisno od števila specifičnih kratkih nukleotidnih zaporedij v genotipski DNA, ki jih encim prepozna, njihove dolžine pa so različne zaradi različnih razdalj med posameznimi restrikcijskimi mesti. Fragmente ločimo z elektroforezo na gelu agaroze; ker ima DNA zaradi v vodnem okolju ioniziranih fosfatnih skupin (ki so del njene strukture) negativni naboj, bodo fragmenti po gelu potovali v smeri od - proti + polu, in sicer krajši hitreje, večji pa počasneje. Tako se bodo razporedili po celi dolžini gela. Po končani elektroforezi fragmente DNA z natrijevim hidroksidom še v samem gelu denaturiramo v enoverižne (NaOH namreč prekine vodikove vezi med baznimi pari v dvoverižni DNA) in jih s kapilarnim vlekem prenesemo na posebno nitrocelulozno ali najlonsko folijo, kamor se trdno vežejo. Folijo nato potopimo v raztopino, v kateri je z radioaktivnim izotopom označena genska sonda (angl. DNA probe) - fragment enoverižne DNA, ki je komplementaren preiskovanemu genu oziroma delu tega gena. Ta bo seveda med vsemi številnimi enoverižnimi fragmenti DNA na foliji »poiskala« tistega, ki ji je komplementaren, in se nanj trdno vezala (hibridizirala). Folijo nato speremo, osušimo, v temnici prekrivamo s fotografskim rentgenskim filmom in tega po določenem času razvijemo. Na mestih vezave genske sonde bomo na filmu opazili značilne počrtnitve - proge, katerih število in položaj predstavljata genotip preiskanege vzorca DNA (slika po P. J. Russell, Genetics, Harper Collins Publishers, 1992).

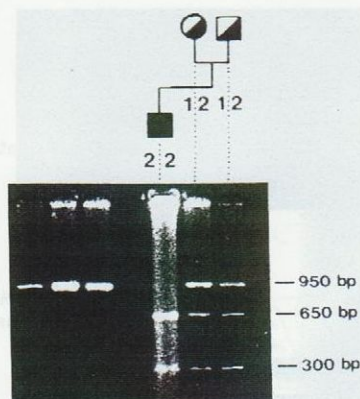


Na sliki je družinsko drevo, kjer sta starša heterozigota - fenotipsko zdrava, vendar prenašalca mutiranega alela, bolan otrok pa je homozigot z mutacijo na obeh alelih. Če poznamo gen in mutacijo, ki bolezen povzroča (in jo v opisanem primeru tudi lahko neposredno odkrijemo, saj je v genu ustvarila novo restrikcijsko mesto), je taka diagnostika lahko neposredna in preiskava DNA staršev ni potrebna. Ta v tem primeru služi samo za potrditev rezultata preiskave.

Na podoben način poteka tudi posredna diagnostika, kjer je razlika v tem, da z DNA-sondo tako kot v prejšnjem primeru prepoznavamo spremenljivo (polimorfno) restrikcijsko mesto, to pa ne leži v genu (ki ga v tem primeru ne poznamo), temveč v njegovi bližini. Da je resnično v njegovi bližini, vemo iz raziskav, ki so odkrile, da se omenjeno polimorfno mesto kot »genski označevalec« v nekaterih družinah deduje povezano z bolezenskim fenotipom. Govorimo o polimorfizmu restrikcijskih fragmentov (angl. RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). Polimorfna zaporedja so sicer pogosta v našem genomu, navzoča so na vsakih 150 - 200 nukleotidov DNA, vendar so za posredno diagnostiko uporabna le tista, za katere se je z obsežnimi raziskavami genetske vezanosti ugotovilo, da so označevalci za zasledovanje določenih bolezenskih fenotipov in kot taki »informativni«. Pri posredni diagnostiki torej spremljamo RFLP in na podlagi dobljenega genotipa sklepamo o navzočnosti mutiranega gena. Zato moramo v tem primeru preiskati DNA staršev in v družini živečega bolnega otroka, šele na podlagi razbranega genotipa pa lahko nato izvajamo tudi predrojstveno diagnostiko. Če sta starša heterozigota za RFLP, bolan otrok pa homozigot, lahko razberemo, katera alela sta pri tej družini posredno, na podlagi z bolezenskim fenotipom vezanega dedovanja, povezana z mutacijo v bližnjem, vendar še nepoznanem bolezenskem genu.

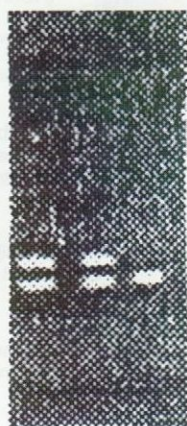
Verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain reaction): S to metodo lahko pomnožimo odsek DNA, za katerega poznamo robni zaporedji nukleotidov. Sintetiziramo 16-24 nukleotidov dolga oligonukleotidna začetnika (angl. oligonucleotide primers); prvi se v smeri 5' → 3' prilega -verigi DNA na koncu fragmenta, ki ga želimo pomnožiti, drugi pa se v smeri 5' → 3' prilega +verigi DNA na nasprotnem koncu tega fragmenta. V reakcijsko raztopino damo manjšo količino DNA, velik prebitek obeh oligonukleotidnih začetnikov in deoksinukleotidov (ki so gradbeni elementi pri sintezi DNA) ter temperaturno stabilen encim Taq-polimerazo. To je encim, ki kot vsaka DNA-polimeraza lahko na enoverižni DNA-matrici v smeri 5' → 3' podvaja DNA, če je na startu prisoten dvoverižni začetek (glej Proteus 7/60, str.309), je pa za razliko od ostalih polimeraz stabilen tudi pri visokih temperaturah, saj je izoliran iz bakterij, ki živijo v vročih islandskih vrelcih. Z dvigom temperature na 94°C najprej denaturiramo oziroma razklenemo dvojno verigo DNA. Nato hitro znižamo temperaturo na 50-60°C, da se oba oligonukleotidna začetnika priležeta vsak na 3'-začetek svoje enojne verige DNA; ker sta majhna, »prehitita« večji enojni DNA in jima z vezavo nanju preprečita, da bi se povezali nazaj v dvojno verigo. Takoj zatem hitro dvignemo temperaturo na 72°C, ki je optimalna za delovanje encima Taq-polimeraze, in encim bo podvojil vsako od obeh razklenjenih verig DNA. To ponovimo 20- do 30-krat. Na ta način iz ene molekule DNA pridobimo 2ⁿ fragmentov (n je število ciklov, 20-30), kar je dovolj, da jih po elektroforezi na agaroznem ali poliakrilamidnem gelu in naknadnim barvanjem lahko opazimo s prostim očesom kot progo v gelu.





Na sliki je prikazan isti primer, kot smo ga uporabili za prikaz neposredne diagnostike s Southernovo metodo. Na levi polovici slike vidimo s PCR pomnožen fragment bolezenskega gena pri vseh treh družinskih članih. Na desni je rezultat tako imenovane restrikcijske analize. Ker gre, kot smo že povedali, za mutacijo, ki ustvari novo restrikcijsko mesto, smo s PCR pomnožene fragmente z restrikcijskim encimom razgradili in nato izvedli elektroforezo. Kot vidimo, sta starša heterozigota, saj je en alel ostal nerazcepljen, drugi alel pa je restrikcijski encim razcepil na dva manjša fragmenta (različno dolga, saj z mutacijo ustvarjeno cepitveno mesto očitno ni v sredini alela). Bolan otrok je homozigot za mutacijo, saj sta pri njem navzoča samo oba manjša fragmenta, kar pomeni, da je restrikcijski encim razcepil oba alela - in to je dokaz za mutacijo na obeh.

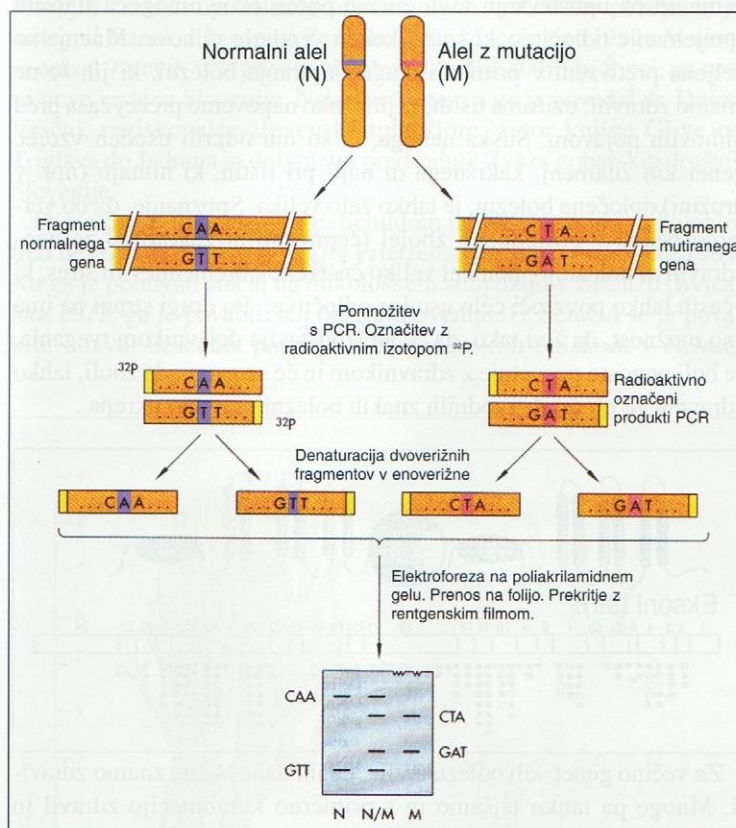
Metoda PCR je elegantnejša od Southernove analize, saj potrebuje bistveno manj DNA. To je pomembno pri predrojstveni diagnostiki, pri kateri DNA zarodka pridobimo z odvzemom (z iglo skozi trebušno steno nosečnice) drobnega koščka horionskih resic, tkiva, ki v maternici obdaja zarodek, ali pa iz celic amnijske tekočine (povečini gre za zarodkov urin in izločke v njegovi okolici). Prav tako pri PCR ne potrebujemo radioaktivno označenih kemikalij in pot do rezultata je bistveno enostavnejša in hitrejša. Vendar včasih še vedno uporabljamo analizo po Southernu, posebno kadar želimo ugotavljati obsežnejše spremembe v DNA, npr. velike delecije in prerazporeditve.



Na sliki je prikazana neposredna diagnostika recesivne dedne bolezni cistične fibroze (CF). Gre za bolezen, ki je posledica okvare beljakovinskega kanalčka za prehod kloridnih ionov skozi membrano epitelijskih celic. Kaže se predvsem v pljučih in prebavilih, saj nenormalno gost izloček zamaši vode. To povzroča stalne pljučne infekcije in moteno izločanje prebavnih sokov, kar pripelje do degenerativnih sprememb tkiv in pojava cist. Vzrok bolezni je ena od številnih možnih mutacij v genu za CF-beljakovino, med njimi pa je najpogostejša mutacija $\Delta F508$, ki je delecija (Δ) treh nukleotidov v CF-genu. Posledica je izpad ene aminokislone (fenilalanina, F) na 508. mestu v zaporedju aminokislin CF-beljakovine. Z metodo PCR je bil pomnožen odsek gena, ki vsebuje omenjeno mesto delecije. Z elektroforezo pomnoženega fragmenta je mogoče ločevati med daljšim alelom brez delecije in za tri nukleotide krajšim alelom z delecijo. Vidimo, da sta v prikazanem primeru starša heterozigota, otrok pa je bolnik z delecijo na obeh alelih.

Prikazana je bila diagnostika z ugotavljanjem mutacije v določenem genu, ki edina povzroča bolezen, oziroma tiste (v primeru večjega števila različnih možnih mutacij), za katero smo poprej ugotovili, da je navzoča v določeni družini ali bolj pogosta v določeni populaciji. Problem nastane, kadar s poprejšnjo preiskavo nismo našli nobene od pogostejših mutacij in smo tako prisiljeni iskati med številnimi možnimi. V takem primeru uporabimo eno od metod za določanje položaja neznane mutacije v genu, npr. analizo sprememb prostorskih oblik enoverižnih DNA (analizo konformacijskih polimorfizmov enoverižnih DNA; angl. SSCP, Single Stranded Conformation Polymorphism). Z izbranimi oligonukleotidnimi začetniki, ki smo jih izbrali tako, da omejujejo 300-500 nukleotidov dolga zaporedja v genu, pomnožimo vsa območja, ki so deli kodirajoče DNA. Vsakega od njih s segrevanjem pretvorimo v enoverižna fragmenta in ju med ohlajanjem skupaj prenesemo v elektroforezni gel. Med potekom elektroforeze se bo vsak od obeh enoverižnih fragmentov zvil v prostoru v klobčičasto strukturo (konformacijo), to je v obliko, ki je odvisna od njegovega nukleotidnega zaporedja. Po

določenem času elektroforezo ustavimo. Ker je bila hitrost potovanja fragmentov odvisna od njihove velikosti in oblike, bomo za vsak PCR-fragment po obarvanju opazili dva enoverižna pasova. Enoverižna fragmenta, ki izvirata iz pomnoženega predela DNA, v katerem je navzoča mutacija, se bosta prostorsko oblikovala nekoliko drugače kot fragmenta primerjalne DNA zdravega človeka, ki izvirata iz istega pomnoženega predela DNA. To opazimo kot razliko v hitrosti potovanja med elektroforezo in na ta način najdemo odsek DNA z mutacijo. Ta odsek oziroma s PCR pomnožen fragment nato preiščemo z analizo zaporedja nukleotidov (sekvenciranjem DNA).

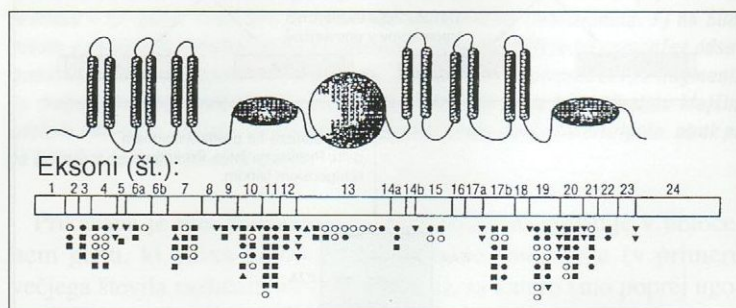


SSCP analiza - slika po elektroforezi: N - normalen homozigot; M - homozigot z mutacijo na obeh alelih (iz spremembe v položaju prog obeh enojnih verig s PCR pomnoženega fragmenta sklepamo na navzočnost mutacije); N/M - heterozigot (dve enojni verigi pripadeta normalnemu alelu, dve pa mutiranemu) (po J. D. Watson & al., *Recombinant DNA*, Sci. Am. Books, 1992).

Intenzivne in usklajene raziskave človekovega genoma so povzročile, da znanstveniki tako rekoč vsak dan odkrijejo nov gen, med njimi pa se včasih najde tudi takšen, pri katerem so mutacije povezane s kakšno genetsko boleznijo ali motnjo. Danes tako s pomočjo metod preiskovanja DNA načeloma lahko ugotovimo že blizu 300 različnih genetskih nepravilnosti, povečuje pa se tudi naše znanje o večgenskih in večfaktorskih boleznih oziroma motnjah. Za DNA-diagnostiko velja, da je hitra in zanesljiva, zato pomeni močno orožje pri preprečevanju genetskih bolezni. Zgodnja in natančna klinična diagnostika omogočata pravilno izbiro zdravljenja ali lajšanja bolezni že v samem začetku. V družinah z visokim tveganjem

za kakšno genetsko bolezen je mogoče ugotoviti zdrave (heterozigotne) prenašalce genskih okvar. Ti lahko prenesajo okvarjen alel na potomce, v redkih primerih, da doživijo mutacijo na svojem drugem genskem alelu, pa zbolijo. Predrojstvena diagnostika, ki je bila v preteklosti v večini primerov nezanesljiva in tvegana, je po uvedbi metod genske tehnologije dosegla raven, ko je mogoče iz majhnega, z biopsijo odvzetega vzorca tkiva, ki obdaja zarodek, že v prvem trimesečju nosečnosti določiti njegov genotip in v primeru neugodne prognoze priporočiti razmeroma varno prekinitve nosečnosti. S tem je omogočeno zanesljivejše zdravnikovo genetsko svetovanje, ki ob upoštevanju vseh etičnih pomislekov omogoča staršem sprejemanje odločitev, ki so na koncu vendarle njihove. Mnenja so deljena predvsem v primerih diagnosticiranja bolezni, ki jih še ne znamo zdraviti, oziroma tistih, ki jih lahko napovemo precej časa pred njihovim pojavom. Stiska nekoga, ki so mu odkrili usoden vzorec genetskih znamenj, kakršnega ni najti pri tistih, ki nimajo (npr. v družini) določene bolezni, je lahko zelo velika. Spoznanje, da bo verjetno nekoč v prihodnosti zbolel (čeprav to ni zagotovo) za neozdravljivo boleznijo, pomeni veliko čustveno obremenitev in stres, ki včasih lahko povzroči celo usodne odločitve. Po drugi strani pa ima vso možnost, da živi tako, da se ne izpostavlja dejavnikom tveganja, se bolj pogosto posvetuje z zdravnikom in če se zgodi, da zboli, lahko zdravnik že ob prvih zgodnjih znakih bolezni pravilno ukrepa.

Cistična fibroza: gen je bil odkrit leta 1989 in do sedaj so našli že blizu 700 različnih mutacij, ki povzročajo bolezen. CF-beljakovina še ni bila izolirana in prečiščena, da bi ji lahko določili prostorsko strukturo. Slika prikazuje vzporejanje z računalnikom predvidenega modela strukture CF-beljakovine (predvidene na podlagi nukleotidnega zaporedja gena in iz njega izvirajočega zaporedja aminokislin) s CF-genom in nekaterimi bolj pogostimi mutacijami. Na ta način s pomočjo računalniškega modeliranja preučujemo odnos struktura-funkcija beljakovine in iščemo odgovor na vprašanje, ali lahko z identifikacijo mutacij (npr. pred rojstvom ali v zgodnjem otroštvu) predvidimo potek in obliko bolezni in damo s tem zdravniku vredno informacijo za čim uspešnejše zdravljenje.



Za večino genetskih bolezni velja, da jih danes še ne znamo zdraviti. Mnoge pa lahko lajšamo in s primerno kombinacijo zdravil in fizioterapije močno izboljšamo kakovost bolnikovega življenja. Znanstvene raziskave so usmerjene v iskanje genov in mutacij ter povezovanje teh izsledkov z vrstami bolezni in oblikami posameznih bolezni. Na ta način spoznavamo molekulske mehanizme nastanka bolezni in njihovega poteka.

Nova spoznanja o genetskih boleznih pa niso dragocena samo za izboljšanje diagnostike in lajšanja neozdravljivih ali težko ozdravljivih bolezni in motenj, ampak pomenijo tudi izhodišče za gensko zdravljenje (gensko terapijo), s katerim bo morda že v bližnji prihodnosti mogoče popravljati napake v genih oziroma okvarjene gene nadomeščati z nepoškodovanimi. O tem bomo izvedeli kaj več v eni od prihodnjih števil Proteusa!