

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU

Preddiplomski studij biologije

Petra Anić

MUTACIJE I BOLESTI

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Završni rad

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

MUTACIJE I BOLESTI

Petra Anić

Rad je izrađen na Odjelu za biologiju

Mentor: doc.dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Kratak sažetak završnog rada

Mutacije su nasljedne promjene genetičkog materijala koje nastaju spontano ili uslijed djelovanja različitih fizičkih, kemijskih i bioloških čimbenika. Ljudske bolesti kao što su gluhoća, Huntingtonova bolest te cistična fibroza uzrokovane su mutacijama u genima koji kodiraju određene proteina bitne za održavanje homeostaze stanica. Proučavanjem ljudskog genoma postignut je veliki napredak u pogledu otkrivanja glavnih uzroka velikog spektra bolesti te mehanizama koji dovode do njih. Poznavanje tih mehanizama pružit će znanstvenicima mogućnost razvijanja alternativnih metoda liječenja bolesti povezanih s mutacijama gena.

Broj stranica: 19

Broj slika: 6

Broj literaturnih navoda: 21

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: mutacije, koneksin, cistična fibroza, Huntingtonova bolest

Rad je pohranjen u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Biology

Bachelor's thesis

Undergraduate study in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

MUTATIONS AND DISEASES

Petra Anić

Thesis performed at Department of Biology

Supervisor: Dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, Assist. Prof.

Short abstract

Mutations are inherited changes of genetic material arising spontaneously or due to the action of different physical, chemical and biological factors. Human diseases such as deafness, Huntington's disease and cystic fibrosis are caused by mutations in genes encoding certain proteins essential for maintaining homeostasis of cells. By studying the human genome, great progress has been made in detecting the major causes of the large spectrum of diseases and the mechanisms that lead to the onset of the disease. Knowledge of these mechanisms will enable scientists to evolve alternative methods of treating the diseases associated with gene mutations.

Number of pages: 19

Number of figures: 6

Number of references: 21

Original in: Croatian

Key words: mutations, connexin, cystic fibrosis, Huntington's disease

Thesis deposited in the Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in the National university library in Zagreb in electronic form. It is also disposable on the web site of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OSNOVNI DIO	3
2.1. Ljudske bolesti uzrokovane mutacijom gena za koneksin.....	3
2.2. Huntingtonova bolest.....	9
2.3. Cistična fibroza	12
3. ZAKLJUČAK.....	15
4. LITERATURA	17

1. UVOD

Mutacija je nasljedna promjena genetičkog materijala. Evolucijski napredak vrste ovisi o povremenoj sposobnosti gena da mutira. Postojanje varijabilnosti između jedinki uvjet je za opstanak živih bića pri čemu preživljavaju one jedinke koje su najbolje prilagođene novonastalim uvjetima. Mutageneza (proces nastajanja mutacija) može biti (indukcijom ili spontano) izazvana različitim fizičkim, kemijskim i biološkim čimbenicima koje nazivamo mutagenima.

Genske ili točkaste mutacije promjene su u jednom ili više nukleotida te uzrokuju promjene DNA u tjelesnim i u generativnim stanicama. Somatske mutacije još nazivamo modifikacijama te najčešće nastaju kao posljedica djelovanja okoliša. Primjer za takvu mutaciju je mozaicizam koji je vidljiv u fenotipu (npr. mozaičnost šarenice oka, šarolikost listova i cvjetova). Somatske mutacije mogu također uzrokovati pojavu tumora jer dolazi do nakupljanja velikog broja mutacija što uzrokuje nefunkcionalnost tkiva i organa. Mutacije somatskih stanica nisu nasljedne. Suprotno tomu, gametske mutacije nastaju u gametama te se prenose na potomstvo. Ove mutacije su evolucijski vrlo značajne jer se prenose u nizu sukcesivnih generacija. Genske mutacije mogu biti vrlo štetne, mnoge su letalne. Razlog je taj što geni utječu na ekspresiju različitih proteina neophodnih za odvijanje glavnih biokemijskih procesa.

Mutacije nastaju spontano ili su inducirane. Spontane mutacije najčešće nastaju zbog grešaka u replikaciji DNA. U spontane mutacije spadaju bazna supstitucija (genske promjene koje najčešće obuhvaćaju samo jedan nukleotidni par), mutacija nastala zbog pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift*) nastala uslijed adicije (umetanje jednog ili dva nukleotida) ili delecije (gubitak jednog ili dva nukleotida) nukleotida, duplikacija, inverzija (dio kromosoma se rotira za 180°) te translokacija (izmjena dijelova između nehomologa). Insercijom ili delecijom tri nukleotida ne dolazi do pomaka okvira čitanja. Supstitucija može uzrokovati i mutacije bez učinka na krajni produkt ekspresije gena jer više kodona nosi informaciju za istu aminokiselinu. Bazne supstitucije dijelimo na tranziciju (zamjena jednog para purin-pirimidin drugim parom purin-pirimidin) i transverziju (zamjena para purin-pirimidin parom pirimidin-purin). Bazne supstitucije mogu imati različite posljedice. Pogrešne (engl. *missense*) su odgovorne za 45-50% svih humanih patogenih mutacija, dok su besmislene (engl. *nonsense*), mutacije preuranjene

terminacije, odgovorne za oko 11% svih humanih patogenih mutacija. Postoje slučajevi kad dolazi do zamjena trećeg slova u kodonu što najčešće ne utječe na strukturu (redosljed aminokiselina) polipeptidnog lanca (tiha mutacija). Osim mutacija koje nastaju prilikom replikacije, pod spontane mutacije još spadaju tautomerizacija baza (spontani prelazak amino u imino oblik), deaminacija gubitak amino skupine), gdje je najčešća ona na citozinu, te gubitak baza (depurinacija i depirimidinacija).

Do induciranih mutacija može doći djelovanjem fizičkih, kemijskih i bioloških čimbenika. Fizički čimbenici su temperatura i zračenje koje može biti ionizirajuće (prodire u živu materiju) i neionizirajuće (svjetlost, radiovalovi). Kemijski čimbenik je npr. kolhicin, a biološki su transpozoni (male sekvence DNA koje se mogu premještati na različite pozicije unutar genoma).

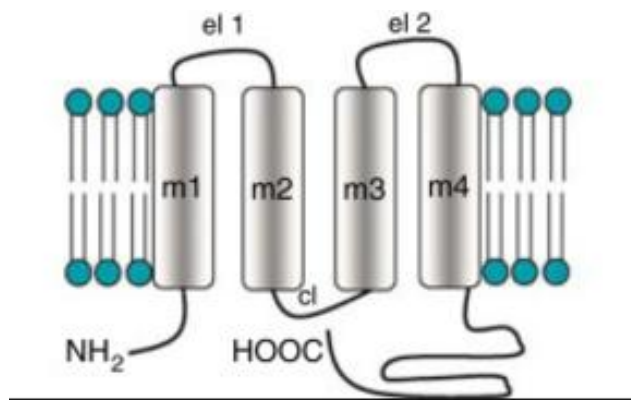
Stopa mutacija jako varira od organizma do organizma, i od gena do gena. Stopa mutacija u organizama s kratkim životnim ciklusom je veća nego u vrsta s duljim životnim ciklusom. Mutacije se mogu odvijati u dva smjera. Jedan je da idu iz normalnog u mutirano, a drugi je da ide iz mutiranog u normalno, što je rijetkost. Organizam je razvio veliki broj mehanizama koji uklanja većinu mutacija u kodirajućem, funkcionalnom dijelu genoma. Zbog toga najveći dio mutacija upravo nalazimo u nekodirajućim regijama, koji čini više od 98% ljudskog genoma, te zbog tog one nemaju niti pozitivan niti negativan učinak na organizam (WEB 1). Mutacije mogu imati pozitivan, negativan ili neutralan utjecaj na organizam. Većina ljudskih urođenih bolesti klinički su bile opisane puno prije nego što je bila poznata njihova genetička osnova. Na osnovu većeg broja pacijenata s istim tipom poremećaja, liječnici su uspostavili dijagnozu temeljenu na značajkama pojedine bolesti te su klasificirali različite poremećaje. Sekvencioniranje ljudskog genoma uvelike je potpomoglo otkrivanju različitih mutacija, pogotovo onih koje uvjetuju rijetke bolesti te su također opisane uloge mnogih gena u funkcioniranju organizma, koje su do tada bile nepoznate. Veliki broj bolesti upravo je uzrokovan mutacijama određenog dijela humanog genoma (Srinivas i sur., 2017). Funkcionalna istraživanja počela su otkrivati osnovne mehanizme koji opisuju kako određena mutacija utječe na razvoj bolesti. Detaljna istraživanja pojedinih mehanizama olakšat će liječenje velikog broja bolesti i njihovo suzbijanje. Ljudske bolesti uzrokovane mutacijom gena za koneksin, Huntingtonova bolest i cistična fibroza uzrokovane su promjenom funkcije određenog proteina nastalom zbog mutacija gena.

2. OSNOVNI DIO

2.1. Ljudske bolesti uzrokovane mutacijom gena za koneksin

Mutacije deset različitih gena za koneksin povezane su s pojavom 28 različitih bolesti. Od tih bolesti osam ih je uzrokovano mutacijom koneksina (Cx)26, dok mutacija Cx43 dovodi do pojave čak šest različitih bolesti. Najveći broj bolesti uzrokovan je mutacijom Cx32. Upravo zbog toga, najveći broj istraživanja se bavi tim genima. Napredovanjem same metode sekvencioniranja olakšano je samo otkrivanje mutacija koje dovode do pojedinih bolesti, što također pridonosi rješavanju problema vezanih uz nepravilnosti različitih koneksina (Srinivas i sur., 2017).

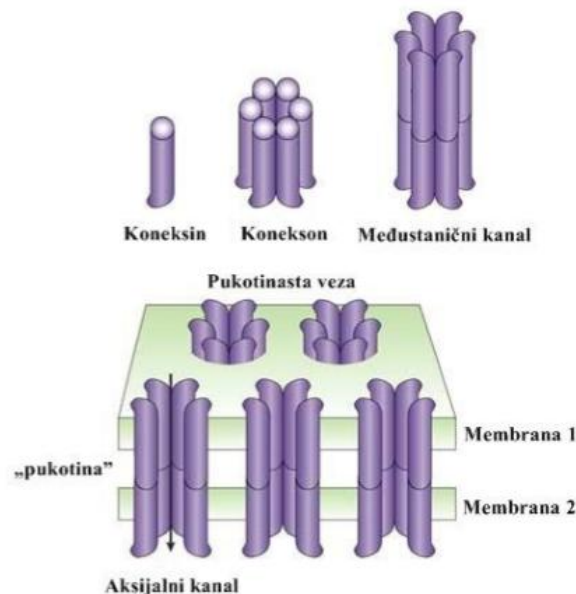
Pukotinaste veze sastoje se od proteina koneksina i omogućuju prolaz malim molekulama između susjednih stanica. Koneksin (Slika 1) je građen od četiri transmembranske domene, m1 - m4, povezane s dvije transmembranske omče, el 1 - el 2, koje se medijalno spajaju. N i C terminalni krajevi te omča koja povezuje m2 i m3 nalaze se na citoplazmatskoj strani plazma membrane. Kod sisavaca koneksine kodira oko 13 visoko konzerviranih gena (Srinivas i sur., 2017).



Slika 1. Građa koneksina (Preuzeto: C. Wagner 2008.)

U području između Golgijevog aparata i endoplazmatskog retikuluma koneksini tvore polukanale (još se nazivaju koneksoni) koji se sastoje od šest koneksinskih monomera (Slika 2). Polukanali se zatim transportiraju do plazma membrane, gdje se zadržavaju kao funkcionalni kanali ili bivaju transportirani do mjesta spoja dviju stanica gdje pronalaze susjedni polukanal te zajedno s njim tvore pukotinaste veze (Slika 2). Polukanali tada postanu aktivni ili je pak njihova aktivnost modulirana kemijskom promjenom koja uvjetuje prolazak malih molekula kao što je

Ca^{2+} , ATP, glutamat ili NAD^+ kroz staničnu membranu (Srinivas i sur., 2017). Ovisno o tipu pukotinaste veze, molekule mogu ravnomjerno prolaziti u oba smjera, ili asimetrično, tako da će se kod nekih kanala molekule kretati u jednom smjeru brže nego u drugom smjeru. Kanali pukotinastih veza nisu uvijek otvoreni. Sposobnost kanala da se otvori ili zatvori je djelomično omogućen kalcijevim ionima, koji induciraju reverzibilnu konformacijsku promjenu u proteinskim jedinicama koje izgrađuju tu vezu, što dovodi do zatvaranja kanala na njegovoj izvanstaničnoj površini. Citoplazmatski kraj svakog koneksiona također se može zatvoriti, ako je potrebno. Ulazak određenih molekula u stanicu dovodi do aktivacije signalne kaskade ili pak do različitih fizioloških odgovora.



Slika 2. Građa pukotinastih veza

(Preuzeto: Martínez i sur. 2009)

Pukotinaste veze nalaze se na mnogim mjestima u cijelom tijelu. To uključuje epitel, koji čini pokrov na našem tijelu, kao i u živcima, srčanim i glatkim mišići. Njihova primarna uloga je koordinacija aktivnosti susjednih stanica. Na primjer, kada sve srčane stanice moraju ujednačeno kucati, pukotinaste veze omogućuju prijenos električnih signala između stanica. Kanali izgrađeni od različitih koneksina funkcionalno su drugačiji u pogledu propuštanja određenih molekula, provodnosti te samom kontroliranju veze između dviju stanica. Genetička

istraživanja provedena na miševima pokazuju da te funkcionalne razlike između koneksina imaju izrazito veliko značenje jer je nemoguće nadomjestiti određenu proteinsku varijantu ako dođe do njenog gubitka. Svaka stanica proizvodi više od jednog koneksina, na primjer keratinocite sintetiziraju čak četiri tipa koneksina, Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31 i Cx43. Polukanali mogu biti izgrađeni od samo jedne proteinske varijante koneksina (homomer) ili od više tipova (heteromer). Sama građa heteromera ovisi o sposobnosti različitih koneksina da se povežu. Ne mogu se svi koneksini povezati jedni s drugima. Samo spajanje polukanala u homomerne ili heteromerne pukotinaste veze je izrazito kompleksno. Slijed u el 2 domeni određuje kompatibilnost u samom spajanju između pojedinih koneksina. Zbog tog, mutacija samo jednog gena za koneksin utječe na mnoge tipove kanala, što u konačnici može dovesti do razvoja različitih tipova bolesti (Srinivas i sur., 2017).

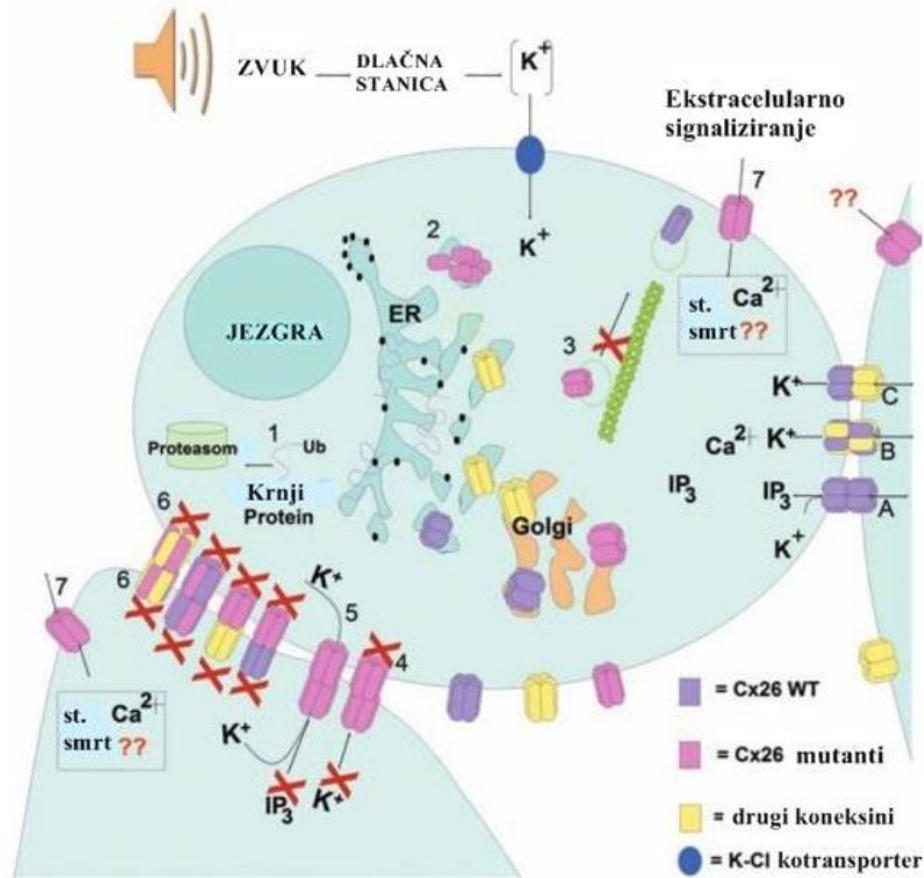
Gluhoća je djelomični ili potpuni gubitak sluha i pojavljuje se u 1 od 1000 novorođenčadi. Ovisnosti o mutaciji, gubitak može biti stabilan ili se može vremenom sve više povećavati te se također može izgubiti sposobnost primanja određenih frekvencija zvučnih valova (Srinivas i sur., 2017). Gluhoća djeluje na govorne i spoznajne procese te zbog toga predstavlja bitan javnozdravstveni problem (Zaputović, 2007). Etiologija slušnog oštećenja je vrlo raznolika, no dokazano je da je više od polovice nepravilnost uvjetovano genetičkim čimbenicima. Oko trećine genetički uvjetovanog oštećenja sluha nalazimo u sklopu različitih sindroma, dok je u dvije trećine gluhoća jedini simptom. Otkrivene su i mnoge mutacije gena koje dovode do strukturnih ili funkcionalnih oštećenja što je dovelo do značajnog napretka u proučavanju uloge genskih produkata u normalnom i poremećenom procesu prijenosa slušnog signala (Barišić i sur., 2004). Mutacije Cx26 sudjeluju u više od 50% svih genetički uvjetovanih gluhoća te se sam sluh može djelomično ili u potpunosti izgubiti. Mutacije gena *GJB2* (engl. *Gap Junction Protein B*) koji kodira Cx26 su česte kod ljudi. Većina Cx26 mutacija uzrokuju pojavu nesindromske gluhoće, koja može biti autosomno recesivna DFNB1A (autosomno recesivnu nesindromsku gluhoću) ili autosomno dominantna DFNA3A (autosomno dominantnu nesindromsku gluhoću). Nesindromsko oštećenje sluha nasljeđuje se u oko 80% slučajeva autosomno recesivno, u 18% autosomno dominantno, a oko 2% pripada X-vezanom i mitohondrijskom tipu nasljeđivanja. Autosomno recesivni oblici gluhoće obično su teži i prelingvalni (dijagnosticiraju se prije razvoja govora), dok su autosomno dominantni oblici obično blaži, postlingvalni i progresivni. Ipak neki recesivni geni mogu uzrokovati gluhoću koja

se javlja kasnije (DFNB2 - *MYO-7A*, DFNB8/10 – *TMPRSS3*, DFNB16 – *STRC*), a neki dominantni gluhoću koja se javlja u prelingvalnoj fazi (DFNA3 i DFNA8/12). Mutacijom Cx26 može doći do pojave čak pet oblika gluhoće koje su popraćene drugim simptomima kao što je bolest kože (Srinivas i sur., 2017) .

Mutacije u samo jednom lokusu DFNB1 (13q12) uzrok su čak polovice svih autosomno recesivno nasljednih nesindromskih oštećenja sluha. Gen DFNB1 (*GJB2*) kodira koneksin Cx26 koji je sastavni dio pukotinastih veza (Barišić i sur., 2004). Gen *GJB2* sastavljen je od dva eksona kao i većina gena koji kodiraju za koneksine. Ekson 1 je nekodirajući, stoga je cijela kodirajuća regija smještena u eksonu 2 koji je odvojen od 5' - netranslantirane regije intronom promjenjive veličine. Ekson 2 dužine je 681 pb i prevodi se u protein izgrađen od 226 aminokiselina. Opisano je više od 220 varijanti gena *GJB2* koje su temelj razvoja poremećaja ARNSHL (engl. *autosomal recessive non-syndromic hearing loss*). Mutacije 35delG (delecija jednog gvanina), W24X (gubitak triptofana na poziciji 24) i L90P (zamjena leucina prolinom na poziciji 90) opisane su kao uzrok ARNSHL, dok su mutacije V37I, R127H i V153I ponekad opisane kao polimorfizmi (Baysal i sur.' 2008). Recesivna mutacija 35delG najučestalija je u populaciji europskog podrijetla. Mutacija 35delG uzrokuje pomak okvira čitanja. Delecija jednog gvanina u slijedu od šest, od nukleotidnog mjesta 30 do 35, rezultira stvaranjem preuranjenog kodona stop na nukleotidnom položaju 38. Posljedica je stvaranje nefunkcionalnog protein (van Eyken i sur., 2007).

Pužnica je struktura u unutrašnjem uhu koja se sastoji od tri odjeljka: *scala media*, *scala vestibuli* i *scala tympani*. Koncentracija kalijevih iona je visoka (150 mmol/dm³), dok su niske koncentracije natrijevih (1mmol/dm³) i kalcijevih iona (0.02 mmol/dm³) izvan endolimfe (Kikuchi i sur. 1995). Nakon zvučne stimulacije osjetnih dlakavih stanica stanice pukotinaste veze omogućuju recikliranje iona kalija od baze dlakavih stanica preko potpornih stanica i fibroblasta do *stria vascularis*, odakle se posebnim kanalima kalij ponovno izbacuje u endolimfu. U koliko ne dođe do recikliranja kalijevih iona, postoji mogućnost njihovog nakupljanja i stvaranja viška koji uzrokuje oštećenje funkcija dlakavih stanica koje su svojim bazalnim dijelom uronjene u perilimfu. Upravo mutacije u Cx26 dovode do poremećaja u međustaničnoj komunikaciji (Slika 3). No, ipak je najvažnija funkcija propusnih veza građenih od Cx26 transport hranjivih tvari i signalnih molekula kao što su *IP₃* i glukoza, čija je glavna funkcija održavanje epitelnog osjetnog integriteta i stanica s dlačicama. U bazolateralnim i apikalnim

regijama također dolazi da ekspresije Cx26 gdje dolazi do stvaranja veza između stanica, dovodeći do toga da polukanali postaju povezani s perilifatičnim i endolimfatičnim odjeljcima (Srinivas i sur., 2017). Većina je mutacija smještena u unutarstaničnim i izvanstaničnim petljama te u drugoj domeni opne, a na temelju njihovog djelovanja možemo ih razvrstati u tri kategorije. Prva skupina mutacija utječe na prikupljanje proteina, druga skupina na njihov prijenos i ugradnju u membranu, dok treća skupina stvara naizgled normalne koneksine koji se prenose do membrane, ali oni ne mogu obavljati svoju funkciju staničnog povezivanja (Barišić i sur., 2004).



Slika 3. Patogeni mehanizam oštećenja sluha povezan s mutacijama Cx26
(Preuzeto: Martínez i sur. 2009)

Sinteza divljeg tipa koneksina se odvija u ER/Golgijevom odjeljku. Polukanali tada bivaju transportirani do stanične membrane putem sekrecijskog puta. Epitelne i potporne stanice pužnice proizvode Cx26 i Cx30. Pukotinaste veze izgrađene od Cx26 propusne se za ione, kao što su kalijevi, ali i za veće molekule (npr. IP₃). Kanali izgrađeni od Cx30 imaju veću tendenciju

propuštanja kalijevih iona nego IP_3 . Pukotinaste veze također mogu biti izgrađene i od Cx30 i od Cx26. Mutacijom Cx26 može doći do poremećaja u transportu polukanala do stanične membrane, formiranja polukanala, neispravno sintetiziranih koneksina i u konačnici formiranja nefunkcionalnih kanala. Aktivacijom stanica s dlačicama putem zvučno inducirano gretanja tektorijske membrane, dolazi do povećanja izvanstaničnog kalija na bazalnoj površini. To je povećanje rezultat aktivacije KCNQ4 (engl. *potassium voltage – gated channel subfamily Q member 4*) i maxi – K kalijevih kanala u bazalnoj membrane dlakavih stanica. Kalijevi ioni prolaze potpornim i epitelnim stanicama te zatim odlaze u falangealne stanice (engl. *Dieter cells*) uz pomoć K/Cl kotransportera i drugim K^+ kanalima. Radistribucijom, K^+ se vraćaju u potporne i epitelne stanice. Ove stanice su povezane pukotinastim vezama (epitelna GJ veza). Izvanstaničnom signalizacijom, uz pomoć ATP-a (aktivira purinergične receptore), endoplazmatski retikulum proizvodi IP_3 i otpušta Ca^{2+} . Prolaskom IP_3 kroz pukotinastu vezu izgrađenu od Cx26 omogućeno je širenje kalcijevih iona, koji su signalne molekule mnogih staničnih funkcija. Predloženo je da kalcijevi ioni mogu aktivirati kloridne kanale potpornih stanica, čime bi došlo do otpuštanja kloridnih iona u izvanstanični prostor. To bi pospješilo kruženje kalijevih iona u endolimfi. Pošto su stanice pužnice stalno aktivne, njihov metabolizam proizvodi reaktivnih kisikove spojeve (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), koje se učinkovito kontroliraju antioksidacijskim sustavom. ROS su negativni regulatori pukotinastih veza jer smanjuju međustanično povezivanje u mnogim sustavima. Upravo zbog toga, gubitak sluha starenjem može biti posljedica povećane proizvodnje ROS-a i smanjenja aktivnosti antioksidacijskih enzima u pužnici (Martínez i sur., 2009).

Opisano je otprilike oko stotinjak mutacija gena *GJB2*. Mutacije gena *GJB2* na oba alela u pravilu su povezane sa značajnim prelingvalnim gubitkom sluha, a kod trećine gluhoća ima progresivan tijek. Heterozigoti imaju oštećenje sluha varijabilno teže. Osim gena *GJB2*, nađeni su i drugi geni (*GJB3* – Cx30, *GJB6* – Cx31 te *GJA1*) koji sudjeluju u izgradnji pukotinastih veza. Mutacije u genima *GJB3* i *GJB6* također mogu uzrokovati naglušost tako što dolazi do smanjenja endokohlearnog potencijala i apoptoze osjetnog epitela koja je vjerovatno uzrokovana izvanstaničnim nakupljanjem kalijevih iona oko dlakavih stanica, što dovodi do kronične depolarizacija stanične membrane (Srinivas i sur., 2017).

Potreba za ranim otkrivanjem oštećenja sluha prisutna je u cijelom svijetu te se sve češće savjetuje testiranje gluhih na mutaciju gena za Cx26. Molekularna analiza je postala rutinski

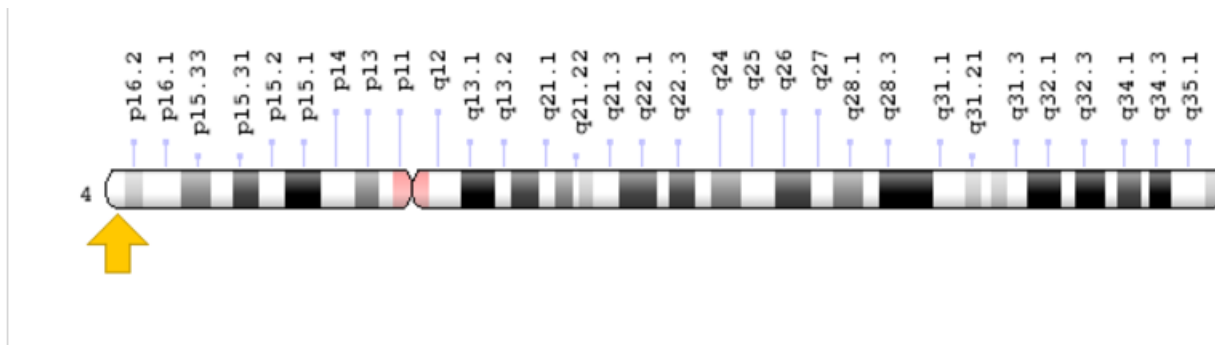
postupak te se testiranja mogu provoditi za veliki broj gena. Pošto su mutacije gena *GJB2* i *GJB6* najčešće, veliki broj istraživanja je upravo usmjeren na navedene gene.

2.2. Huntingtonova bolest

Huntingtonova bolest (HB) je autosomska dominantna neurodegenerativna bolest koja uključuje poremećaje kretanja, kognitivne i psihijatrijske smetnje. Prvi put ju je opisao američki liječnik George Huntington 1872. godine (Telarović i sur., 2015). HB se smatra pravom dominantnom bolešću jer samo jedan mutirani gen je dovoljan da uzrokuje bolest, unatoč prisutnosti normalnog gena naslijeđenog od drugog roditelja. Pacijenti s HB imaju problem s vraćanjem ustaljenih sjećanja, a ne sa stvaranjem novih sjećanja. Emocionalne smetnje u obliku depresije su uobičajene karakteristike (Cummings, 1995.). Koreiformni poremećaji karakteristični za ovu bolest obilježeni su nevoljnim pokretima distalnih mišića udova koji zahvaćaju mišiće prstiju i dlanova ruku te mišiće lica. Izražene su teškoće u hodu i sakadnim pokretima oka (Telarović i sur., 2015). Povećana je učestalost treptanja praćena nevoljnim protruzijama jezika. HB je okarakterizirana izrazitom specifičnošću neuronskog gubitka. Regije na koje najviše utječe su striatum. Strijatalna degeneracija započinje u medijalnim dijelovima kaudatusa, ali širenjem atrofije zahvaća i druga područja uz poštedu *nucleusa accumbensa*. Postoji i gubitak jezgrinog obujma koji utječe uglavnom na velike piramidalne neurone u slojevima III, V i VI (Brinar i sur., 2009). Pošto zahvaća piramidne neurone, koji su gabanergični neuroni inhibitornog djelovanja, dolazi do pada razine neurotransmitera γ -aminomaslačne kiseline (GABA) i supstance P (neuropeptid koji se oslobađa na krajevima nerona i smanjuje osjećaj boli). Bolest je uzrokovana ekspanzijama CAG (citozin-adenin-gvanin) poliglutaminskog slijeda u huntingtin (htt) proteinu. Htt protein, zajedno s drugim proteinima, ima važnu ulogu u različitim staničnim procesima kao što su signalizacija, transkripcija i transport (Pogledić i Relja, 2012).

HTT gen i njegova mutacija otkriveni su 1993. godine. Gen je lociran na kraćem kraku kromosoma 4 (4p16.3) i kodira veliki protein zvan huntingtin koji sadrži više od 3000 aminokiselinskih ostataka (Slika 4). Iako je točna funkcija ovog proteina nepoznata, čini se da igra važnu ulogu u živčanim stanicama (neuronima) u mozgu i bitno je za normalan razvoj prije rođenja. Huntingtin se nalazi u mnogim tjelesnim tkivima, s najvišim stupnjevima aktivnosti u

mozgu. Huntingtin protein je potreban za ljudski razvoj i normalnu funkciju mozga. Podložan je posttranslacijskoj modifikaciji, a neki događaji, kao što je fosforilacija, mogu igrati ogromnu ulogu u regulaciji toksičnosti proteina huntingtina. Unutar stanice, ovaj protein može biti uključen u kemijsko signaliziranje, transport materijala, pričvršćivanje na protein i druge strukture, te zaštitu stanice od apoptoze. Jedna regija *HTT* gena sadrži određeni DNA segment poznat kao CAG trinukleotidno ponavljanje. Taj se segment sastoji od niza od tri građevna bloka DNA, citozina, adenina i gvanina, koji se pojavljuju više puta zaredom. Uobičajno, CAG segment se ponavlja 10 do 35 puta unutar gena. Akson divljeg tipa gena sadrži niz neprekinutih ponavljanja CAG trinukleotida koja se transliraju u serije uzastopnih ostataka glutamina, stvarajući tako poliglutaminski trakt (Pogledić i Relja, 2012).



Slika 4. Kromosom 4. Strelica označava kraći krak kromosoma 4 (4p16.3)

(Preuzeto: WEB 2)

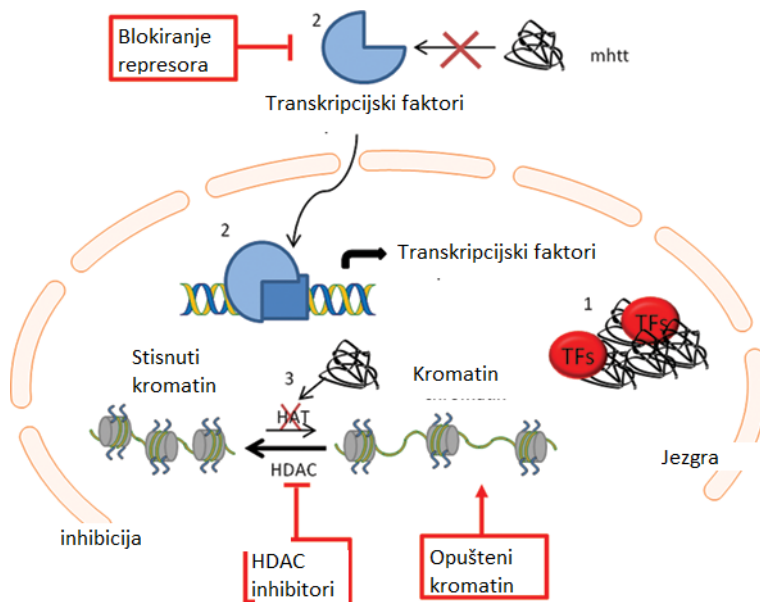
Asimptomatska bolest ima 35 ili manje ponavljanja, a HB je uzrokovana ekspanzijom 36 ili više ponavljanja. Postoji povezanost između broja CAG ponavljanja i dobi pojave simptoma: što je veći broj CAG ponavljanja, ranije se bolest pojavljuje (Pogledić i Relja, 2012.). Većinom se bolest pojavljuje u odrasloj dobi kada ima 40 do 50 CAG ponavljanja, dok kod 55 ponavljanja bolest se javi u maloljetničkoj dobi. Oko 70% razlike u dobi pojave HB može se opravdati brojem CAG ponavljanja (Telarović i sur., 2015).

Budući da je glutamin polarna molekula, pretjeranom sintezom glutamina dolazi do stvaranja proteinskih agregata, umjesto funkcionalnog proteina jer nastaju dodatne vodikove veze unutar i između proteina. Dolazi do njihovog nakupljanja u živčanim stanicama što ometa njihovo normalno funkcioniranje. Ti proteinski agregati mogu biti ili uzrok ili posljedica neurodegenerativnih bolesti kao što je HB. Prijenos nepravilnih htt proteina, s proširenim

poliglutaminskim domenama aktivira stanične proteaze, kao što su kaspaza-3 i kaspaza-6 čija je funkcija da nepravilne proteine razgrađuju na manje fragmente koji se tada mogu reciklirati. Neki fragmenti, posebice oni iz N-terminalne domene htt proteina, štetni su za stanicu i uzrokuju agregaciju proteina. Htt proteinski fragmenti, koji nisu posljedica obrade proteazama, već nastaju uslijed abnormalnog alternativnog spajanja *htt* mRNA, su vrlo maleni i mogu ući u jezgri i tamo ometati procese koji se odvijaju u jezgri. Jedan takav proces je transkripcija. Takva abnormalna alternativna spajanja zabilježena su kod svih HB modela miševa kod kojih je broj CAG ponavljanja bio između 50 i 100. Također, spajanja su zabilježena i u humanom mutantnom Htt proteinu u fibroblastima i krvnim stanicama pacijenata oboljelih od HB. Navedena alternativna spajanja posredovanja su proteinom SRSF6 (serinski i argininski spajajući faktor 6), koji se veže na početak mutantnog *htt* mRNA transkripta i uzrokuje stvaranje tih malih proteinskih fragmenata (Anglada-Huguet i sur., 2017.).

Nedavna istraživanja pokazuju da izmjenjeni Htt protein može djelovati i na male regulatorne proteine i premještati ih. Izmjenjeni Htt protein inhibira CREB-vezujući protein (engl. *cAMP-response element-binding protein, CBP*), manji regulatorni protein koji je ključan za preživljavanje stanica. CPB je građen od 18 glutamina koji mogu izravno reagirati s proširenim Htt glutaminskim lancem. Agregati Htt proteina povlače CPB daleko od njegovog normalnog položaja (uz DNA u jezgri), što ometa njegovu funkciju aktiviranja transkripcije gena koji su bitni za preživljavanje organizma (Anglada-Huguet i sur., 2017; Slika 5). Međutim, istraživači su mogli potpuno zaustaviti i preokrenuti ovaj degenerativni proces u laboratoriju. Ovaj preokret postignut je umetanjem promjenjenog oblika CPB-a koji nema glutamin ponavljanja. Budući da Htt izravno reagira s glutaminima CPB-a, modificirani CPB nije bio prepoznat od strane Htt proteina. Modificirani CPB nije bio izdvojen od strane proteina, a živčane stanice su preživjele. CPB sadrži acetiltransferaznu domenu i koaktivator je na mnogim promotorima (Steffan i sur., 2000.). Dokazano je da se *htt* egzon 1 s 51-nim glutaminom izravno veže za acetiltransferaznu domenu CPB te na p300/CPB-vezujući čimbenik (P/CAF). Time se smanjuje acetilacija histona H4, što dovodi do zaključka da izravna interakcija Htt s acetiltransferaznom domenom smanjuje acetiliranje histonskih proteina. Istraživanja provedena na voćnim mušicama pokazuju da inhibitori HDAC smanjuju ove negativne učinke izmjenjenog Htt proteina što ukazuje na potencijalne mogućnosti za nove načine liječenja bolesti (Sadri-Vakili i Cha, 2006).

Iako terapije s HDAC inhibitorima mogu imati i negativne efekte. Na primjer, produljena TSA terapija povećava kromosomsku nestabilnost koja uzrokuje neispravnost centromera i abnormalnu kromosomsku segregaciju. Također dovode do pojave tumora te je zato određivanje njihove toksičnosti od izrazito velike važnosti (Sadri-Vakili i Cha, 2006.).



Slika 5. Mehanizmi transkripcijskog poremećaja u Huntingtonovoj bolesti.

(Preuzeto: Anglada-Huguet i sur., 2017)

2.3. Cistična fibroza

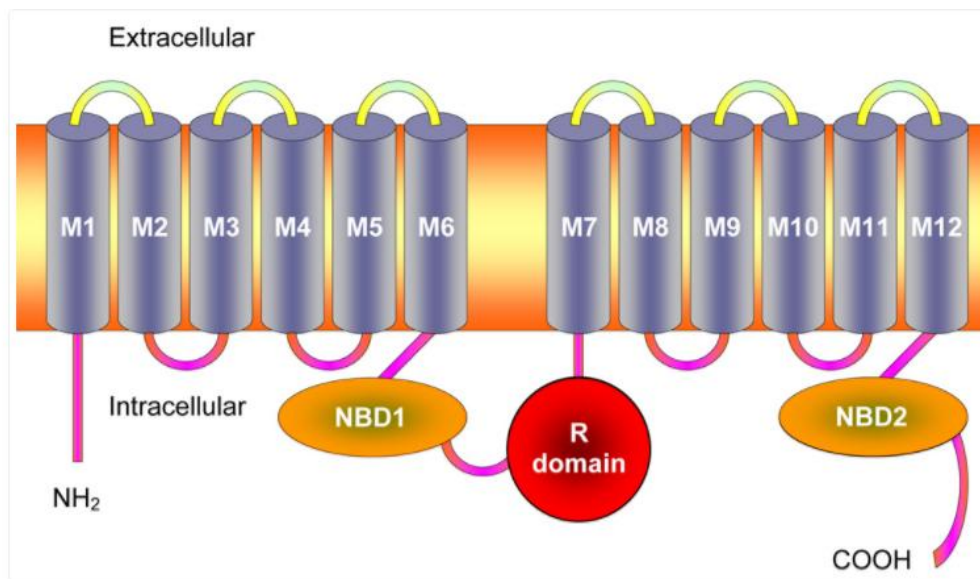
Cistična fibroza (CF) prvi put je opisana prije više od 400 godina u Njemačkoj i najčešći je autosomni recesivni poremećaj kod bijelaca. To je nasljedna bolest koja uzrokuje da određene žlijezde proizvede abnormalne sekrete, koji najviše utječu na probavni trakt, gušteraču i epitelne dišne putove. Unatoč velikom napretku koji je napravljen u razumijevanju molekularne i stanične povezanosti između plućne infekcije i upale, te poremećaja *CFTR* gena (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), i dalje nedostaje jasan odgovor kako mutirani *CFTR* gen uzrokuje pojavu CF. Ovaj protein funkcionira kao kanal preko membrane stanica koje proizvode mukus, znoj, slinu, suze i probavne enzime. Kanal provodi negativno nabijene čestice, kloridne ione, u stanice i iz njih. Prijenos kloridnih iona pomaže u kontroli kretanja vode u tkivima, što je neophodno za proizvodnju sluzi. Sluz podmazuje i štiti podlogu dišnih putova,

probavnog sustava, reproduktivnog sustava i drugih organa i tkiva. CFTR protein također regulira funkciju drugih kanala, poput onih koji transportiraju pozitivno nabijen natrijev ion preko membrane stanica. Ti su kanali potrebni za normalnu funkciju organa poput pluća i gušterače (WEB 3). Kod CF u epitelu dišnog puta poremećene su dvije funkcije CFTR-a. Prva je gubitak inhibitornog djelovanja na tzv. epitelne natrijeve kanale zbog čega je pojačana apsorpcija Na^+ , a druga je gubitak sposobnosti sekrecije klorida što dovodi do smanjenog volumena tekućeg površnog sloja na epitelnim stanicama dišnog puta. Dolazi do poremećaja funkcije cilija i gubitka važne sposobnosti "podmazivanja" čiji je učinak sprječavanje adherencije sluzi na površini dišnog puta (Tješić-Drinković i sur., 2005; 2007.). Neishranjenost u cističnoj fibrozi posljedica je nerazmjera između povećanih potreba za energijom, povećanih gubitaka, manjeg iskorištavanja hranjivih tvari s jedne strane i nedostatnog unosa hrane s druge. Vodeći uzrok maldigestije i malapsorpcije je insuficijencija gušterače. Vjeruje se da postoji pomak u metaboličkim putovima na razini mitohondrijskog transporta energije kao posljedice same mutacije. Dolazi do smanjene apsorpcije masnoća, bjelancevina, vitamina topljivih u mastima i nekih mikroelementa. CFTR protein u probavnom sustavu uključen je i u apsorpcijske i u sekrecijske procese. Gubitkom funkcije ovog proteina, dolazi do smanjene sekrecije aniona, crijevni sadržaj je dehidriran, a sluz viskozna, slabo topiva i predisponira usporenom tranzitu kroz crijeva i djelomičnoj opstrukciji lumena. Takav medij oko crijevnih resica onemogućuje normalnu topivost, razgradnju i apsorpciju hranjivih sastojaka (Tješić-Drinković i sur., 2015).

Više od 1000 mutacija u genu CFTR identificirano je kod osoba s cističnom fibrozom. Većina tih mutacija mijenja pojedine proteinske blokove (aminokiseline) u CFTR proteinu ili uzrokuje gubitak malog dijela DNA iz CFTR gena. Najčešća mutacija, nazvana delta F508, je brisanje jedne aminokiseline na poziciji 508 u CFTR proteinu. Nastali abnormalni kanal se raspada ubrzo nakon što je sastavljen, tako da nikad ne stiže do stanične membrane te time ni ne sudjeluje u prijenosu kloridnih iona. Mutacije koje uzrokuju bolesti u genu CFTR mijenjaju proizvodnju, strukturu ili stabilnost kloridnog kanala. Sve te promjene sprječavaju pravilno funkcioniranje kanala, što narušava prijenos kloridnih iona i kretanje vode u stanice i iz njih. Kao rezultat toga, stanice proizvode izrazito gustu i ljepljivu sluz.

Otkriće gena, te kloniranje CFTR-a i zatim njegova identifikacija kao kloridnog kanala pridonijelo je produbljivanju spoznaja o vezi između poremećenog ionskog transporta i bolesti organa u CF. Gen je lociran na kraćem kraku kromosoma 7 (7q31.2) (Kerem i sur., 1989).

Protein CFTR je član obitelji ATP-vezujućih proteina koji djeluju kao jednosmjerne pumpe i sudjeluju u prijenosu molekula izvan i unutar stanice. Protein se sastoji od 1480 aminokiselina organiziranih u pet funkcionalnih domena. Transmembranski je protein kojeg nalazimo i u prokariotskoj i eukariotskoj stanici te ima dvije ATP-vezne domene, NBD1 i NBD2 (Slika 6). Većina CF kromosoma (70%) ima jednu deleciju kodona koja rezultira nedostatkom fenilalaninskog ostatka na položaju 508 (delta F508) proteina. To je slijed koji kodira NBD1. Općenito, CFTR mutacije mogu se pojaviti u genskoj sekvenci koja kodira bilo koju od 5 protein domena. Jedinstven za ovu obitelj proteina, CFTR protein posjeduje dodatnu visoko nabijenu domenu (R domena) koja sadrži nekoliko konsenzusnih polipeptidnih sekvenci za fosforilaciju kinazama. N terminalni dio R-domene (RD1) visoko je konzerviran između vrsta, ali postoji niži stupanj očuvanosti između ostatka domene (RD2) (Hyde i sur., 1990). Iako CFTR ima strukturnu sličnost s ostalim članovima obitelji ATP-ovisnih pumpi, prekomjerna ekspresija proteina u različitim vrstama stanica povezana je s pojavom cAMP-osjetljivog Cl-kanala.



Slika 6. Izgled CFTR proteina

(Preuzeto: WEB 4)

Samo 4% CFTR proteina nalazi se u ekstracelularnom prostoru. Petlje su označene prema regijama koje prekrivaju membranu, M1-M2, M3-M4, M5-M6, M7-M8, M9-M10 i M11-M12. S izuzetkom M1-M2 i M7-M8 te izvanstanične domene su vrlo kratke. M7-M8 petlja sadrži dva N-

vezana glikozilacijska mjesta. 19% CFTR proteina čini dvanaest transmembranskih domena (M1 - M12) (Slika 6). Pokazalo se da promjene u tim područjima mijenjaju stanje vodljivosti kanala (WEB 4).

Sintezom nefunkcionalnog CFTR proteina ili kada uopće ne dolazi do njegove sinteze, ravnoteža klorida unutar stanica dramatično se mijenja što dovodi do povećane vodljivosti natrija. To dovodi do abnormalnih "slanih" staničnih sekrecija koje potiču bakterijsku kolonizaciju pluća i konačno uzrokuju oštećenja pluća u pacijenata oboljelih od CF. Povećana koncentracija soli inaktivira djelovanje antimikrobnih peptide, tzv. defenzina (β -defenzin-1, β -defenzin-2). Aktivnost defenzina s drugim činiteljima prirođene imunosti, kao što su lizosomi i laktoferini, sinergistički inhibira rast bakterija u dišnom putu. Kod CF ta je aktivnost nije učinkovita (Tješić-Drinković i sur., 2007).

CFTR modulirajući lijekovi koji djeluju na određenu CFTR mutaciju danas su najprihvatljivija opcija u liječenju CF. Izraz "modifikacija bolesti" često se primjenjuje na lijekove koji moduliraju CFTR, zbog njihovog učinka na sam prijenos klorida od strane CFTR proteina. Budući da ti lijekovi djeluju na abnormalnu CFTR funkciju, oni su također specifični za mutaciju, što znači da su učinkoviti samo za određeni CFTR mutacije. Ivakaftor i lumakaftor su lijekovi koji se najčešće koriste. Djeluju na ciljanu mutaciju G551D (glicin je na mjestu 551 zamijenjen s asparaginskom kiselinom) koja omogućava proteinu da dođe do stanične membrane, ali spriječava transport klora. Ivakaftor poboljšava transport klora. U budućnosti će se terapija oslanjati na Druge terapije se također predlažu za popravak neispravnih mRNA pomoću sintetičkih antisense oligonukleotida QR-010. Upravo takvi molekularni RNA ili DNA mehanizmi popravka te zamjene gena mogu u budućnosti dovesti do uspješnog liječenja CF (Paranjape i sur., 2017).

3. ZAKLJUČAK

Mutacije su nasljedne promjene genetičkog materijala koje imaju pozitivan, negativan ili neutralan utjecaj na ljudski organizam. Mnoge bolesti kao što su Huntingtonova bolest, cistična fibroza te gluhoća posljedica su mutacije u određenom genu koja kao rezultat ima promjene u funkciji i strukturi proteina kojeg taj gen kodira. Većina tih proteina ima važnu ulogu u različitim staničnim procesima kao što su transkripcija, signalizacija i transport proteina koji su neophodni

za normalno funkcioniranje organizma. Sintezom nefunkcionalnih proteina, dolazi do narušavanja homeostaze organizma te prekidanja važnih biokemijskih procesa u stanicama, što u konačnici rezultira pojavom bolesti. Bolest je popraćena različitim simptomima te može biti uzrokovana mutacijom jednog ili više gena. Proučavanjem ljudskog genoma postignut je veliki napredak u pogledu otkrivanja glavnih uzroka velikog spektra bolesti te mehanizama koji dovode do njih. Nove spoznaje omogućit će znanstvenicima otkrivanje i razvijanje alternativnih metoda liječenja kako čestih i rijetkih bolesti povezanih s mutacijama gena.

4. LITERATURA

- Anglada-Huguet M., Vidal-Sancho L., Cabezas-Llobet N., Alberch J., Xifró X. 2017. Pathogenesis of Huntington's Disease: How to Fight Excitotoxicity and Transcriptional Dysregulation. In: Huntington's Disease-Molecular Pathogenesis and Current Models. InTech. Medicine » "Huntington's Disease - Molecular Pathogenesis and Current Models" edited by Nagehan Ersoy Tunali, ISBN 978-953-51-3050-5.
- Barišić I, Sansović I, Knežević J, Pavelić J. 2004. Genetički uzroci oštećenja sluha. Paediatrica Croatica 48: 123–130.
- Baysal E., Bayazit Y., Ceylaner S., Alatas N., Donmez B., Ceylaner G., San I. 2008. GJB2 and mitochondrial A1555G gene mutations in nonsyndromic profound hearing loss and carrier frequencies in healthy individuals. Journal of Genetics 87: 53-57.
- Brinar V., Klepac N., Habek M. 2009. Huntingtonova koreja. Neurologija za medicinare. pp 296-298.
- Cummings JL. 1995. Behavioral and psychiatric symptoms associated with Huntington's disease. Advances in Neurology 65:179-186.
- Hyde S. C., Emsley P., Hartshorn M. J., Mimmack M. M., Gileadi U., Pearce S. R., Higgins C. F. 1990. Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature 346(6282): 362-365.

Kerem B. S., Rommens J. M., Buchanan J. A., Markiewicz D., Cox T. K., Chakravarti A., Tsui L. C. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Trends in Genetics* 5: 363-363.

Kikuchi T., Kimura R. S., Paul D. L., Adams J. C. 1995. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anatomy and embryology* 191(2): 101-118.

Martínez A. D., Acuña R., Figueroa V., Maripillan J., Nicholson, B. 2009. Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. *Antioxidants & redox signaling* 11(2): 309-322.

Paranjape S. M., Mogayzel Jr P. J. 2017. Cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Paediatric Respiratory Reviews*. In press.

Pogledić I., Relja M. 2012. Huntington's disease. *Liječnički Vjesnik* 134: 346-350.

Sadri-Vakili G., Cha J. H. J. 2006. Histone deacetylase inhibitors: a novel therapeutic approach to Huntington's disease (complex mechanism of neuronal death). *Current Alzheimer Research* 3(4): 403-408.

Srinivas M., Verselis V. K., White T. W. 2017. Human diseases associated with connexin mutations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. In press

Steffan J. S., Kazantsev A., Spasic-Boskovic O., Greenwald M., Zhu Y. Z., Gohler H., Thompson L. M. 2000. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(12): 6763-6768.

Telarović S., Čelić I., Ljubić H., Sertić J. 2015. Huntingtonova bolest. *Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi* 150-154.

Tješić-Drinković D., Tješić-Drinković D., Vraneš J., Votava-Raić A., Kelečić J., Gagro A. 2005. Imunološki aspekt plućne bolesti u cističnoj fibrozi. *Paediatrica Croatica* 49(Supl 1): 139-144.

Tješić-Drinković D., Tješić-Drinković D., Kelečić J., Votava-Raić A., Gagro A., Vraneš, J. 2007. Cistična fibroza: patogeneza plućne bolesti. *Paediatrica Croatica* 51(Supl 1): 59-36.

Tješić-Drinković D., Tješić-Drinković D. 2015. Neishranjenost u cističnoj fibrozi–više od insuficijencije gušterače. *Paediatrica Croatica* 59(2): 69-72.

van Eyken E., van Laer L., Fransen E., Topsakal V., Hendrickx J.J., Demeester K., van de Heyning P. 2007. The contribution of GJB2 (Connexin 26) 35delG to age-related hearing impairment and noise-induced hearing loss. *Otology & neurotology:official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society and European Academy of Otology and Neurotology* 28 (Connexin 26): 970-975.

Wagner C. 2008. Function of connexins in the renal circulation. *Kidney international*, 73(5): 547-555.

Zaputović S. 2007. Clinical and Genetic screening of congenital deafness. *Gynaecologia et Perinatologia* 16(2): 73-78.

Web izvori:

WEB 1 <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/>

WEB 2 <https://ghr.nlm.nih.gov/>

WEB3 <http://www.cfgenetherapy.org.uk/>

WEB 4 http://www.cfgenetherapy.org.uk/cysticfibrosis/article/CFTR_Protein_Structure

