



Medicinski fakultet  
Sveučilište u Zagrebu

Znanstveni poslijediplomski studiji  
u području medicine i zdravstva

Magistarski studij: Medicinske znanosti  
Doktorski studij: Medicinske znanosti

*Priručnik*

# Metode molekularne biologije u medicini ●

*Akademski godina 2000./2001.*

*Uredništvo:*

*Drasko Šeremeta*

*Anto Šimigajski - Benčina*

*Leopoldina Šušter*

*Eleonora Čuček - Jelić*



MEDICINSKA  
NAKLADA

## Sadržaj

UNESCO – Koichiro Matsuura: Univerzalna deklaracija o ljudskom genomu i ljudskim pravima. Od teorije do prakse . . . . .	1
Draško Šerman – Prijedlog Internacionalnom bioetičkom povjerenstvu IBC-UNESCO . . . . .	10
UNESCO – Federico Mayor – NE kloniranju čovjeka! . . . . .	11
Molekularna biologija na početku 21. stoljeća: organizacija genoma (Draško Šerman) . . . . .	12
Genska terapija (Zdravko Lacković) . . . . .	36
Protoonkogeni, onkogeni i geni supresori tumora (Floriana Bulić-Jakuš) . . . . .	44
Molekularna genetika tumora (Nives Pećina-Šlaus, Floriana Bulić- Jakuš) . . . . .	54
SDS poliakrilamid gel elektroforeza (Maja Vlahović) . . . . .	59
Genomski imprinting (Maja Vlahović) . . . . .	62
Implantacija i placencija (Ljiljana Šerman, Alan Šerman, Draško Šerman) . . . . .	66
Prijenos na membranu (Western analiza) (Ljiljana Šerman) . . . . .	78
Stvaranje miša sa željenom genetskom promjenom (Srećko Gajović) . . . . .	79
Izolacija i analiza RNA (Ana Marušić, Vedran Katavić, Danka Grčević) . . . . .	82
Primjena imunohistokemije i elektronske mikroskopije u molekularnoj biologiji (model: neplodni testis) (Davor Ježek) . . . . .	87
Metoda komete (Gel elektroforeza DNA pojedinačnih stanica) (Aleksandra Fučić, Floriana Bulić-Jakuš) . . . . .	90
<b>Sudska medicina</b>	
Primjena analize DNA u sudskomedicinskoj praksi (Milovan Kubat, Ivana Furač, Slavica Marketin) . . . . .	97
Metode analize genomske DNA u sudskoj medicini (Irena Drmić, Šimun Anđelinović, Dragan Primorac) . . . . .	105
<b>Molekularna genetika</b>	
Rekombinantna DNA tehnologija; nasljedne bolesti (Jadranka Sertić, Ana Stavljenić Rukavina) . . . . .	113
<i>Postupci u molekularnoj dijagnostici</i>	
Molekularna dijagnostika malignih hematoloških bolesti (Renata Zadro) . . . . .	123
Molekularne metode u kliničkoj mikrobiologiji (Vanda Plečko, Božica Rebrović, Smilja Kalenić) . . . . .	128
Genetičko komplementiranje (Ana Stavljenić Rukavina, Ksenija Fumić) . . . . .	133
Farmakogenetika (Nada Božina, Inja Tramišak) . . . . .	138

Mjerenje proliferacije stanica s pomoću analize sadržaja DNA protočnom citometrijom (Drago Batinić, Branka Užarević, Mirna Golemović, Maja Rudolf) . . . . .	145
Fluorescentna in situ hibridizacija u kliničkoj dijagnostici (Ružica Lasan, Vlasta Hitrec) . . . . .	153
Značenje kromosomskih promjena u zloćudnim hematološkim bolestima (Sanja Mrsić) . . . . .	164
Patofiziološki aspekti genskog izražaja (Zdenko Kovač) . . . . .	181
Molekularni mehanizam nastanka osteogenesis imperfecte (OI) (Dragan Primorac) . . . . .	188
Discovery and clinical application of bone morphogenetic proteins (Slobodan Vukičević, Ana Stavljenić, Marko Pećina) . . . . .	196
<b>Bioetičke dvojbe</b>	
Draško Šerman: Why mammalian embryo? . . . . .	215
Davor Solter: Cloning and Embryonic Stem Cells: a New Era in Human Biology and Medicine . . . . .	221
Declaration on the Production and the Scientific and Therapeutic Use of Human Embryonic Stem Cells . . . . .	235
<b>ZAŠTO FALI 125 STRANICA DVE KNJIGE . . . . .</b>	<b>236</b>

Dr. sc.  
Klinika  
Kliničk  
Kišpati

Prof. d  
Zavod  
Kliničk  
Spinčić

Doc. d  
Kliničk  
Kliničk  
Kišpat

Mr. sc  
Kliničk  
Kliničk  
Šalata

Doc. c  
Zavod  
Medic  
Šalata

Prof.  
Kliničk  
Kliničk  
Kišpa

Mr. s  
Zavo  
Klini  
Spini

Dr. s  
Insti

Ksav

Dr. :  
Klin  
Klin  
Kišp

Mjerenje proliferacije stanica s pomoću analize sadržaja DNA protočnom citometrijom (Drago Batinić, Branka Užarević, Mirna Golemović, Maja Rudolf) . . . . .	145
Fluorescentna in situ hibridizacija u kliničkoj dijagnostici (Ružica Lasan, Vlasta Hitrec) . . . . .	153
Značenje kromosomskih promjena u zloćudnim hematološkim bolestima (Sanja Mrsić) . . . . .	164
Patofiziološki aspekti genskog izražaja (Zdenko Kovač) . . . . .	181
Molekularni mehanizam nastanka osteogenesis imperfecte (OI) (Dragan Primorac) . . . . .	188
Discovery and clinical application of bone morphogenetic proteins (Slobodan Vukičević, Ana Stavljenić, Marko Pećina) . . . . .	196
<b>Bioetičke dvojbe</b>	
Draško Šerman: Why mammalian embryo? . . . . .	215
Davor Solter: Cloning and Embryonic Stem Cells: a New Era in Human Biology and Medicine . . . . .	221
Declaration on the Production and the Scientific and Therapeutic Use of Human Embryonic Stem Cells . . . . .	235

Dr. sc.  
Klinika  
Kliničk  
Kišpati

Prof. d  
Zavod  
Kliničk  
Spinčić

Doc. d  
Kliničk  
Kliničk  
Kišpat

Mr. sc  
Kliničk  
Kliničk  
Šalata

Doc. c  
Zavod  
Medic  
Šalata

Prof.  
Kliničk  
Kliničk  
Kišpa

Mr. s  
Zavo  
Klini  
Spinčić

Dr. s  
Insti

Ksav

Dr. :  
Klin  
Klin  
Kišp

# Metode molekularne biologije u sudskoj medicini

Irena Drmić, Šimun Andelinović i Dragan Primorac

## UVOD

Otkako je 1985.g. prvi put primijenjena u praksi, značenje i primjena DNA tehnologije u sudskoj medicini i dalje neprekidno raste. U svijetu je analiza DNA korištena u više od 50 000 slučajeva dosad, i svakako je postala dodatni "znanstveni dokaz" na sudovima. Jedna od važnijih joj primjena je nedvojbeno za utvrđivanje identiteta osoba, bilo živih bilo umrlih. U Hrvatskoj je, stjecanjem ratnih okolnosti, narasla potreba za korištenjem DNA tehnologije zbog identifikacije

posmrtnih ostataka žrtava Domovinskog rata, kako vojnika tako i civila.

U ovom poglavlju dat ćemo kratki pregled najvažnijih metoda koje se koriste u identifikaciji skeletnih ostataka, a nisu obuhvaćene drugdje: a) izolacija DNA iz uzorka kosti, b) spektrofotometrijsko određivanje količine nukleinskih kiselina u uzorku, te kao izdvojeni dio analizu polimorfizma Y kromosoma (c), za kojeg se čini da će i dalje predstavljati izazov i u sudskoj medicini i u antropologiji.

## Izdvajanje DNA iz uzorka kosti

**Laboratorij za kliničku i sudsku genetiku, KB Split:** Modificirani protokol, prema: Armed Forces DNA Identification Laboratory, prezentiran na First Intensive Course in PCR Based Clinical and Forensic Testing, Split, Hrvatska, 1997)

opere sa vrućom vodom i četkom koja se umače u otopinu hipoklorita.

## PRINCIP

Kost, dobro očišćena i smrvljena u prah, podvrgne se djelovanju ekstrakcijskog pufera (sadrži SDS), digestiji s proteinazom K, ekstrakciji sa smjesom fenol/kloroform/izomamilni alkohol i n-butanolom. Uzorak se koncentrira u microcon tubama, i višekratno ispire TE puferom.

## ČIŠĆENJE UZORKA

Sve kosti se trebaju očistiti od ostatnog mekog tkiva (uključujući i ostatke koštane srži), kao i od ostataka iz tla. Potom se kost

## MATERIJAL

- Pribor za preuzimanje kosti - K9 Foot Control Unit, tip 900 (KaVo Elektronisches Werk, Leutkirch, Germany; grinder)
- Mikrotube
- 5%-tna otopina hipoklorita (7 mM natrijev hipoklorit)
- Tekući dušik
- Centrifuga (npr. Beckmann GPR ili sl.)
- Ekstrakcijski pufer (1M Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0.5%-tni SDS)
- Proteinaza K (20 mg/ml)
- Centricon 100 tube
- Fenol-Tris zasićen

- Fenol/ kloroform/ izoamilni alkohol (25:24:1)
- N-butanol
- 80%-tni etanol
- Agarozna (DNA grade)
- Etidijev bromid
- Nabojni pufer za agarozni gel (50% glicerol, 1.5 mM bromfenol plavilo, 100 mM EDTA)
- 1XTBE (89 mM Tris HCl, pH 8.3; 89 mM borna kiselina; 2 mM EDTA)
- TE pufer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5)
- Sterilna deionizirana voda

## POSTUPAK

1. Iz duge cjevaste kosti/zuba uzme se dio koji se čini najzdraviji. Opere se toplom vodom i otopinom 5 %-tnog klora. Osušiti, te mikrobrusilicom (KaVo, Foot Contol Unit) odstraniti površinski sloj (do približno 2-3 mm). Važno je napomenuti da trajanje bušenja u jednom mjestu na kosti ne smije prelaziti 3 sekunde, jer dolazi do pregrijavanja i oštećenja DNA, na mjestu čišćenja. Dobije se približno 2-3 g uzorka kosti.

2. Tako pripremljena kost stavi se u konusnu tubu od 50 ml, napunjenu s 5%-tnom otopinom hipoklorita i ispere se protresivanjem (10-15 sekundi). Postupak ispiranja se nastavlja s deioniziranom vodom (dva puta), te konačno u 80%-tnom etanolu (dva puta)

3. Fragmente očišćene kosti pohrane se u označenu ladu za vaganje, i ostave sušiti 24 sata u komori s laminarnim protokom zraka.

4. Uzorak kosti se prenese u čeličnu "komoricu" i usitni u prah. I uzorak kosti i grinder se urone u tekući dušik, da bi se što bolje usitnio uzorak.

5. Uzorku dodati 3 ml ekstrakcijskog pufera i dobro promiješati. Dodati 100  $\mu$ l Proteinaze K. Paralelno provesti kroz postupak i slijepu probu (samo reagensi). Lagano pro-

mućkati i ostaviti u vodenoj kupelji 15-18 sati, na 56<sup>o</sup> C. Nakon 1 sat, ponovo protresti uzorak.

6. Poslije 18 sati dodati još 50  $\mu$ l Proteinaze K, 1-2 ml ekstrakcijskog pufera, te još 3 sata inkubirati na 56<sup>o</sup> C.

7. U uzorak dodati 3 ml smjese fenol/kloroform/izoamilni alkohol (25:24:1). Promiješati, pa 3 minute centrifugirati na 4950 x g. Gornji sloj prebaciti u novu, označenu tubu od 15 ml. Ponoviti postupak ekstrakcije još jedanput.

8. Supernatantu dodati 3 ml n-butanola. Snažno promućkati, i centrifugirati 3 minute, promućkati, pa ponovo centrifugirati 10 minuta.

9. Odstraniti cijeli gornji sloj n-butanola, a donji pažljivo prebaciti u označene Centricon 100 tube. Pri prebacivanju vodenog sloja u centricon tubice, pobrinuti se da ni jedna kap butanola ne dospije u tubice, pa pri svakom pipetiranju mijenjati nastavak, a nastavak obrisati čistim Kim Wipe papirom.

10. Centrifugirati približno 30 minuta, na 1000xg (2600 rpm). Odvoji filtrat i dodaj 2 ml TE pufera. Ponovo centrifugirati približno 30 minuta, na 1000xg (2600 rpm). Ovaj postupak ponoviti najmanje dva puta.

11. Ostatak tekućine na membrani repipetirati nekoliko puta i prenijeti ga u čistu, označenu Eppendorf tubicu. Okrenuti tubicu i isprati je sa TE puferom, da bi konačni volumen bio približno 100  $\mu$ l.

12. Uzorak pohraniti na 4<sup>o</sup>C (do 3 tjedna), a za dugotrajnu pohranu na -20<sup>o</sup>C.

Ako je potrebno, a uzorka ima dovoljno može se provesti postupak sa NaOH, kako bi se uklonili inhibitori Taq polimeraze, a koji bi mogli ometati izvodjenje PCR-a. Nakon provedene izolacije kvalitete izolirane DNA može se provjeriti na 1%-tnom agaroznom gelu.

Važno je napomenuti da je vrlo često teško kvantificirati DNA nakon njenog izdavanja iz skeletnih ostataka. Stoga se obično pri umnažanju molekula DNA koriste posebno razrađeni protokoli umnažanja DNA, no uglavnom usklađeni s protoko-

lima proizvođača (Profiler, Profiler Plus, PowerPlex16).

Umnožena DNA podvrgne se elektroforezi te se nakon toga analizira koristeći

posebne programe. Vjerojatnost pozitivne identifikacije utvrđuje se statistički i to u slučaju da ne postoji isključenje između uspoređivanih uzoraka.

## Spektrofotometrijsko određivanje količine nukleinskih kiselina u uzorku

### Princip:

Za određivanje stupnja čistoće i količine nukleinskih kiselina u uzorku mjeri se apsorbanacija uzorka na određenim valnim duljinama. Mjerenje se provodi na **260 i 280 nm**, a omjer apsorbanacija na ovim valnim duljinama pokazatelj je čistoće nukleinskih kiselina. Apsorbanacija izmjerena na **325 nm** ukazuje na nečistoću kivete, a apsorbanacija na **230 nm** ukazuje na zaostale proteine ili fenol.

### Materijal:

Destilirana voda (ili prikladan pufer, npr. 1X TE)

Otopina standarda poznate koncentracije DNA

Kvarcne semi-mikro kivete za spektrofotometriju

Spektrofotometar (raspon UV-vidljivi spektar)

### Postupak:

1. Pipetirati destiliranu vodu ili pufer u kivetu. Izmjeriti apsorbanaciju na **325 nm**, i namjestiti instrument na nulu. Očitati. Po-

noviti postupak mjerenja na **280, 260 i 230 nm**.

*Napomena: vrlo je važno da DNA bude otopljena u istoj otopini kao i slijepa proba.*

2. Za određivanje količine DNA pripraviti razrijeđenje 1:100, te očitati apsorbanaciju uzorka na 260 nm i 280 nm, za određivanje količine DNA. Apsorbanacija 1.00 na 260 nm ukazuje da je u otopini koncentracija dvolančane DNA 50 µg/ml, približno 37 µg/ml jednolančane DNA ili 40 µg/ml jednolančane RNA.

$$C_{DNA} = A_{260} \times 50 \times R \text{ (razrjeđenje)}$$

$$C_{RNA} = A_{260} \times 40 \times R \text{ (razrjeđenje)}$$

*Omjeri  $A_{260}$  i  $A_{280}$  od 1.8 do 1.9 (DNA) i od 1.9 do 2.0 (RNA) ukazuju na uzorke vrlo visoke čistoće. Kontaminanti koji apsorbiraju svjetlost na 280 nm (npr. proteini) snižavaju ovaj omjer.*

*Apsorbanacija na 230 nm ukazuje na onečišćenja u uzorku kao što su fenol, urea i sl., dok apsorbanacija na 325 nm ukazuje na onečišćenja kivete ili druge čestice.*

## Analiza polimorfizma Y-kromosoma u sudskoj medicini

Genetička varijabilnost uočena u autosomnoj, mitohondrijskoj (mt) i DNA spolnih kromosoma posljedica je različitih evolucijskih čimbenika, a dijelom i njihov odraz. Mikrosateliti ili lokusi s kratko ponavljajućim nizovima (STR) od velikog su značenja i za mapiranje gena povezanih s nastankom

neke bolesti, kao i za uspostavljanje filogenetičkih odnosa između populacija. Ono što još uvijek nedostaje u ljudskom evolucijskom stablu jesu dobro analizirani visoko polimorfni lokusi na Y-kromosomu. Opisan je čitav niz fenotipova povezanih s Y-kromosomom: statura, duljina zubiju, cerebral-

na asimetrija, ovisnost o alkoholu, a u miševa agresivnost. Prije razmatranja mogućih implikacija Y-kromosoma u suvremenoj medicini, bilo bi od esencijalnog značenja upoznati se s detaljima genetičke strukture ovog kromosoma.

Y-kromosom je drugi najmanji ljudski kromosom, čija se veličina procjenjuje na približno 60 megabaza (Mb). On je jedinstven među kromosomima jer se nasljeđuje isključivo očinskom stranom. Određuje sve muške karakteristike uvjetujući razvoj testisa u ranoj embriogenezi, a nasljeđuje se haploidno. Zbog haploidnog načina nasljeđivanja, veći dio kromosoma ne podliježe rekombinaciji u mejozi, uz iznimku kratkih pseudoautosomnih dijelova (PAR1 i PAR2) na krajevima kromosoma (slika 1). Ovi slijedovi su homologni slijedovima na X kromosomu i podliježu normalnoj rekombinaciji sa X-kromosomom.

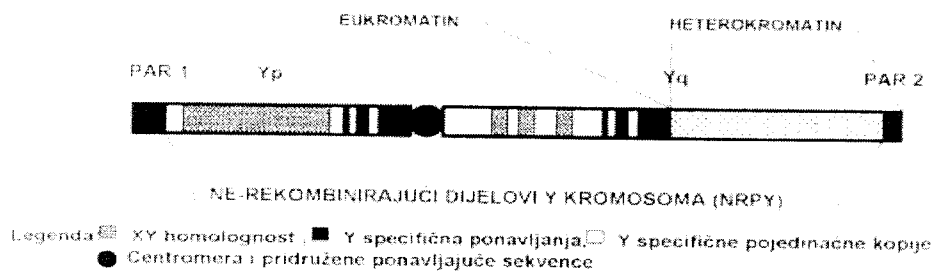
Citološki promatrano, ljudski Y-kromosom se sastoji od heterokromatinskih i eukromatinskih regija. Heterokromatinska regija Y kromosoma, koja se nalazi na distalnom kraju dugog kraka (Yq), u fenotipski normalnih muškaraca varira u veličini od gotovo nedetektibilnih duljina do onih koji zauzimaju više od pola Y-kromosoma. Eukromatinska regija (približne duljine 28 Mb), u normalnih je muškaraca konstantne duljine, zauzima kratki krak kromosoma (Yp), centromere i proksimalni dio dugog kraka.

Do sada je poznato više od 50 gena smještenih na Y-kromosomu. Najpoznatiji i najbolje proučeni lokus je SRY (prema engl. *sex-determining region*). Drugi Y-vezani sustavi koji imaju značajnu ulogu vezanu za razvoj muških osobina i spermatogenezu uključuju obitelj gena za testis-specifični protein Y (TSPY), lokus AZF (prema engl. *azoospermic factor*), obitelj gena RBM (prema engl. *RNA binding motif*; prije zvan YRRM od engl. *Y-borne RNA recognition motif*), te također kandidatni gen za faktor azoospermije (DAZ, prema engl. *deleted in azoospermia*). Drugi geni od mogućeg značenja za medicinu i antropologiju uključuju lokuse povezane s Turnerovim sindromom (TS), GCY (prema engl. *growth control on the Y*), te lokus LAL (*lymphedema associated locus*).

Y-kromosom razmjerno veličini sadržava mnoštvo polimorfizama različitih vrsta. Čak i ako bismo se fokusirali samo na one kopije koje je moguće analizirati lančanom reakcijom polimeraze (PCR), broj polimorfizama bi još uvijek bio impresivan, no ti visoko ponavljajući slijedovi nisu zastupljeni u velikom broju kopija.

Biljezi na Y kromosomu mogu se podijeliti u dvije velike kategorije:

**multialelni biljezi**, s nešto višom stopom mutacija ( $\mu \sim 0.2\%$  po generaciji), u osnovi su višestruki mikrosateliti (npr. DYS19, DYS389I i II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393) i minisatelit, MSY1



Slika 1.



**bialelni biljezi**, s vrlo niskom stopom mutacija, jedinstveni su ili približno jedinstveni događaj u ljudskoj evoluciji (primjer su pojedinačni nukleotidni polimorfizmi, SNPs i neke *Alu* insercije).

Iako su istraživači bili djelomično uspješni u traganju za Y-specifičnim mikrosatelitima, čini se da još uvijek veliki broj mikrosatelita ostaje neotkriven. Na osnovi podataka iz kozmidnih knjižnica za očekivati je postojanje trinukleotidnih ponavljanja jednom na svakih 180 kb duljine, odnosno 170 mikrosatelitnih lokusa, a uočeno ih je znatno manje, no to ne umanjuje interes za njihovim daljnjim istraživanjem. Jedan od razloga manjeg broja polimorfizama Y-kromosoma mogla bi biti njegova manja veličina, a drugi mogući razlog je smanjena učestalost rekombinacije.

Kako su veliku većinu kriminalnih djela počinili muškarci, analiza polimorfizma Y kromosoma bila je stoga od velikog značenja u sudskoj medicini. Primjena ove analize bi mogla naći posebno mjesto u dvojbennim slučajevima, kao što su miješani uzorci (silovatelj, žrtva), te u utvrđivanja očinstva muškom djetetu. Poznato je da je PCR postupkom moguće analizirati male ulomke specifičnih slijedova, pa bi analiza mikrosatelita na Y-kromosomu mogla biti posebno od koristi pri analizi degradiranih uzoraka DNA, koji se često susreću u svakodnevnoj sudsko-medicinskoj praksi.

Uz mogućnost velike primjene analize Y-kromosoma postoji i niz limita, koji su posljedica posebnih svojstava ovog kromosoma. Iako je substrukturiranje populacija znatno manji problem među europskim nego li američkom populacijom, još uvijek ostaje pitanje sličnosti DNA slijedova na Y-kromosomu u muških srodnika počinitelja kriminalnog djela. Posebno interesantno područje analize Y-kromosoma je i u utvrđivanju migracija pojedinih naroda. Tako je u nedavno objavljenom radu pokazano da gotovo 80% europskih muškaraca posjeduje genske biljege karakteristične za paleolitsko doba dok 20% europskih muškaraca «vuče» gene iz neolitskog razdoblja.

## Literatura

1. Gunby P. Medical team seeks to identify human remains from mass graves of war in former Yugoslavia. *JAMA* 1994; 272:1804-6.
2. Primorac D, Andelinović Š, Definis Gojanović M, Drmić I et al. Identification of war victims from mass graves in Croatia, Bosnia and Herzegovina by use of standard forensic methods and DNA typing. *J Forensic Sci* 1996;41:891-4.
3. Armed forces DNA Identification Laboratory. Extraction of DNA from Dried Skeletal Remains. Proceedings of the First European-American Intensive Course in PCR Based Clinical and Forensic Testing, Split, Croatia September 23-October 3, 1997.
4. Bourke TM, Scherzinger AC, Ladd C, Lee HC. NaOH Treatment to Neutralize Inhibitors of Taq Polymerase. *J Forensic Sci* 1999;44:1046-50.
5. Keys KM, Budowle B, Andelinović Š, Definis Gojanović M, Drmić I, Marcikić M and Primorac D. Northern and Southern Croatian Population Data on Seven PCR-Based Loci. *Forensic Sci Int* 1996;81:191-9.
6. Drmić I, Andelinović Š, Schanfield MS, Galavotti R, Primorac D and Pignatti PF. Allele and Genotype Frequencies of Six DNA Polymorphisms in the Croatian Population. *Human Biology* 1998;70:949-57.
7. Primorac D, Schanfield SM, Primorac D. Application of Forensic DNA in the legal system. *Croatian Medical Journal* 2000; 41:33-47.
8. Primorac D, Andelinović Š. Identification of human remains from mass graves found in Croatia and Bosnia and Herzegovina. In: Zabit C, editor. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Symposium on Human Identification; 1999 Sep 29-Oct 2; Lake Buena Vista, Florida, USA. Madison, Wisconsin: Pro-mega Corporation 2000.
9. Jobling MA, Tyler-Smith C. Father and sons: the Y chromosome and human evolution. *TIG* 1995;11:449-56.
10. Hammer MF, Zegura SL. The Role of the Y-chromosome in Human Evolutionary Studies. *Evol Anthropol* 1996;5:116-34.
11. Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C. The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med* 1997;110: 118-24.

12. de Knijff P, Kayser M, Caglia A et al. Chromosome Y microsatellites: population genetics and evolutionary aspects. *Int J Legal Med* 1997;110: 134-40.
13. Prinz M. Experience with using Y chromosome specific STRs in forensic casework. In: Zabit C, editor. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Symposium on Human Identification*; 1999 Sep 29-Oct 2; Lake Buena Vista, Florida, USA. Madison, Wisconsin: Promega Corporation; 2000. In press.
14. Jobling MA, Tyler-Smith C. New uses for new haplotypes-the human Y chromosome, disease and selection. *TIG* 2000;16:356-62.
15. Semino O, Passarino G, Oefner JP, Lin AA, Arbuzova S, Beckman EL, De Benedictis G, Francalacci P, Kouvatsi A, Limborska S, Marcikic M, Mika A, Mika B, Primorac D, Santachiara-Benerecetti AS, Cavalli-Sforza LL, Underhill AP. The Genetic Legacy of Paleolithic *Homo sapiens sapiens* in Extant Europeans: A Y Chromosome Perspective. *Science* 2000; 290: 1155-1159.

# Molekularni mehanizam nastanka osteogenezis imperfekte (OI)

Dragan Primorac

*Osteogenesis imperfecta* (OI), je nasljedna bolest vezivnog tkiva, koja se klinički očituje prijelomima kostiju, raznim deformitetima skeleta, i velikim brojem promjena na kostima koje podsijecaju na osteoporozu. Drugim riječima *osteogenesis imperfecta* je najčešći genetski uzrok osteoporoze. Iako je Malebranche prvi opisao osteogenezis imperfektu još 1684. godine, tek su 1975. godine Pentinen i sur. prvi primjetili da kod ovih bolesnika postoji poremećen metabolizam kolagena u kulturi izoliranih fibroblasta (1, 2). Povećana lomljivost kosti, kao i brojni deformiteti nastaju kao posljedica nesposobnosti osteoblasta da sintetiziraju dovoljno strukturnog koštanog matriksa. Klinički oblici OI variraju od letalnih pri rođenju, do onih blagih, koji fenotipski nalikuju na postmenopauzalnu osteoporozu. Gledajući s molekularnog aspekta, danas sa sigurnošću možemo tvrditi da su mutacije na COL1A1 ili COL1A2 genima u više od 95% slučajeva razlog nastanka OI (3). Glorieux i suradnici su nedavno na primjeru 7 bolesnika s kliničkom dijagnozom osteogenezis imperfekta pokazali da su COL1A1 i COL1A2 u potpunosti intaktni potvrđujući time davnu postavku da su zasigurno i neki drugi geni uključeni u patogenezu ove bolesti (4).

## KOLAGEN TIPA I

Kolagen tipa I, (jedan od 19 do danas opisanih tipova kolagena) najzastupljeniji je od svih tkivnih proteina, i čini 90% ukupnog kolagena u organizmu. Ubraja se u grupu fibrilarnih kolagena i produkt je dvaju različitih gena: COL1A1, smještenog na 17.

kromosomu (17q21.3-q22) i COL2A1 smještenog na 7. kromosomu (7q21.3-q22) (1). Prilikom sinteze normalnog kolagena tipa I važno je istaknuti da se gen u cijelosti prvo prepíše u tzv. glasničku ili mRNA, koja se nakon potpune obrade u jezgri ("splicing") izvede u citoplazmu gdje se odvijaju procesi konačne sinteze novih kolagenskih molekula. Upravo su poremećaji ispravnog prepisivanja gena, obrade mRNA, njezin transport iz jezgre u citoplazmu, te posttranslacijske modifikacije prokolagena najčešći razlozi nastanka OI. Premda je duljina COL1A2 gena 38 kb (38 000 parova baza), a COL1A1 gena, svega 18 kb, oba gena sadrže po 52 egzona (funkcionalni dio gena koji se sačuva nakon obrade mRNA), pa im je konačna duljina nakon obrade mRNA gotovo identična. Tkivno specifičan kolagen tipa I sudjeluje u građi kostiju, kože, ligamenta, tetiva i dentina, a u vrlo maloj količini prisutan je i u plućima, krvnim žilama te ostalom vezivnom tkivu. Nadalje, kolagen tipa I direktno sudjeluje u organogenezi, a važan je čimbenik i u svakodnevnim fiziološkim procesima u organizmu kao npr. agregaciji trombocita (5).

Molekula kolagena tipa I (Mr 285 kDa) sastoji se od tri uzvojita polipeptidna međusobno povezana lanca. Svaka molekula posjeduje dva  $\alpha 1(I)$  i jedan  $\alpha 2(I)$  lanac, te tvori 300 nm dugačke i 1,4 nm široke "štapice" koji izgrađuju mikrofibrile, osnovne građevne jedinice kolagena. Još uvijek nije jasno zašto COL1A1 gen proizvodi dvostruko više molekula kolagena nego COL1A2 gen. Strukturno gledajući kolagen je protein sastavljen od tri uzvojita polipeptidna lanca pri čemu svaki lanac sadrži po

navljajući triplet aminokiseline gdje su X i Y bilo koje dvije (najčešće prolin i hidrokiselin) ima vrlo važnu ulogu u pravljanju trostrukog uzvojnica što je ključna funkcija i stabilnost molekula. Upravo zato mutacije koje do izmjene glicina nekoj od aminokiselina dovode to teškoj OI.

## Mutacije na kolagen bolesnika s OI

Na osnovi genetičkih notipskih kriterija, Siller i suradnici analizirali sve oblike OI u Royal Children's Hospitalu. Utvrdili su četiri skupine OI u tekstu posebno ćemo se baviti lekularnim mehanizmom nastanka svake od četiri oblika OI.

Mutacije su promjene u sekvenci mRNA i većim dijelom nezamijećene. Do danas je opisano 150 različitih mutacija na COL1A2 genu koji kodiraju kolagen tipa I. Najčešće mutacije s kojom se zamjenjuje jedan od četiri nukleotida (adenin, gvanin, citozin, timin). Obzirom da se mutacije odražavaju na sekvenci direktno reflektiraju na kolagen lako je razumljivo njihova važnost. Mnogi teži klinički oblici OI (III i IV) najčešće razvijaju kolagen tipa I s glicinom nekom drugom aminokiselinom.

Dva su osnovna tipa OI: 1) strukturno negativne mutacije i 2) "null allele" mutacije.

## Strukturne mutacije

Strukturne mutacije mijenjaju sekvencu kolagena i uzrokuju sintezu oštećenog kolagena se drastično narušavajući strukturu kolagena.