

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA: JUČER – DANAS – SUTRA

Karmela BARIŠIĆ, Zagreb

Povijesni pogled na molekularnu dijagnostiku

Molekularna dijagnostika bavi se analizom nukleinskih kiselina u dijagnostičke svrhe. U akademskom i znanstvenom pogledu molekularna dijagnostika izborila se za svoj status kao interdisciplinarno područje, a kao stručno područje profilirala se u medicinsko-biokemijskoj djelatnosti. Molekularna dijagnostika baštinik je razvoja molekularne biologije, genetike i genomike (strukturne i funkcionalne) u spoznajnom i metodološkom smislu.

larne biologije, genetike i genomike (strukturne i funkcionalne) u spoznajnom i metodološkom smislu.

Povijest razvoja ovoga znanstvenog područja temelji se na dostignućima koja su postignuta od 19. stoljeća na ovamo u području genetike, biologije, biokemije, molekularne biologije i medicine. Spomenimo samo neke: Mendelovi zakoni nasljeđivanja*, identifikacija DNA kao molekule koja može transformirati stanice†, rasvjetljavanje strukture DNA‡, sinteza oligonukleotida in vitro§, restriksijske endonukleaze¶, lančana rekacija polimerazom** i DNA čipovi††. Današnji i budući ra-

Tablica 1. Metode koje se često rabe u molekularno-dijagnostičke svrhe

ANALIZA CILJANA NA POZNATE MUTACIJE	DETEKCIJA NEPOZNATIH MUTACIJA	DETEKCIJA VARIJACIJA U BROJU KOPIJA
Southern blot / Polimorfizam duljina restriksijskih fragmenata (RFLP)	Gradijentna gel-elektroforeza	Southern blot
Test ligacije oligonukleotida	Konformacijski polimorfizam jednolančane DNA (SSCP)	MLPA – multipla ligacija uz amplifikaciju sonde
Sekvenciranje	Analiza heterodupleksa	SNP čip
Pirosekvenciranje	Denaturirajući HPLC	
Lančana rekacija polimerazom u stvarnom vremenu		

* Gregor Mendel obrazložio je principe nasljeđivanja u predavanju Versuche über Pflanzen-Hybriden (Experiments on Plant Hybridisation) koje je održao u dva dijela 8. i 9. veljače 1865. godine u Brnu u tamošnjem prirodoslovnom društvu.

† Oswald Avery i sur. su 1944. godine eksperimentalno utvrdili da je »transformirajući princip«, na koji je prethodno u svojim pokusima ukazao Frederick Griffitha (poznati pokusi ispitivanja virulentnosti dva, R i S, soja pneumokoka), molekula DNA.

‡ Strukturu DNA rasvijetlili su 1953. godine Francis Crick i James Watson.

§ Sa sintezom oligonukleotida započelo se sredinom prošloga stoljeća, a od 80-ih godina prošloga stoljeća moguće je sintetizirati dulje oligonukleotide.

¶ Smith, Kelly i Wilcox izolirali su 1970. godine restriksijsku endonukleazu iz klase II, HindII iz *Haemophilus influenzae*.

** K. Mullis, F. Faloon, S. Scharf, R. Saiki, G. Hom, H. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 1986, 51 Pt 1:263–273.

†† Stephen P. A. Fodor i suradnici razvili su tehniku za pripremu minijaturnih nizova bioloških molekula. Na njihovom radu utemeljen je prvi DNA-čip, temeljna tehnika za genomske studije velikoga opsega.

zvoj molekularne dijagnostike neodvojiv je, s jedne strane, od razvoja navedenih znanstvenih disciplina, a s druge strane, od razvoja moćnih tehnologija analize genoma.

Molekularna dijagnostika u kliničkim laboratorijima bilježi svoj uzlet u posljednja dva desetljeća. Početci su bili obilježeni prijenosom tehnika analize genskih mutacija iz istraživačkih laboratorija u kliničko okruženje. Analize nukleinskih kiselina ponajprije su bile upotrijebljene za analizu genskih mutacija kod bolesti poput hemoglobinopatije i cistične fibroze, a sam postupak temeljio se na neizravnoj detekciji genskih mutacija. Taj pristup zahtijevao je velike količine pacijentove DNA te detaljne informacije o području genoma koje se analizira. Često su rezultati bili komplicirani za interpretaciju.

S otkrićem lančane reakcije polimeraze (engl. polymerase chain reaction, PCR) bilo je omogućeno umnažanje specifičnih dijelova molekule DNA u uvjetima *in vitro* te analiza i izravna detekcija mutacija. Veliki broj metoda koje se od tada koriste u molekularnoj dijagnostici temelji se na analizi DNA umnožene PCR-om, a ne na analizi genomske DNA. U Tablici 1. prikazane su neke od metoda koje se često rabe u molekularno-dijagnostičke svrhe.

Nukleinske kiseline

U molekularno-dijagnostičke svrhe analizira se genomska DNA ili njezini specifični dijelovi. Kod čovjeka to je makromolekula smještena u staničnoj jezgri (naziva se i nuklearna DNA) koju čini oko 3 milijarde parova nukleotida u stanicama s haploidnim genomom (spolne stanice). DNA se u svim eukariotima nalazi u kompleksu sa specifičnim proteinima. Taj se kompleks naziva kromatin. Kromatin se tijekom stanične diobe strukturira u kromosome (23 para kod čovjeka). Genomsku DNA čovjeka predstavlja oko 25 do 30 tisuća gena.

Kod čovjeka je osim genomske DNA prisutna i mitohondrijska DNA. Mitohondrijska DNA je kružna molekula, veličine oko 16,5 tisuća nukleotidnih parova koja nosi informacije za dio mitohondrijskih proteina. Mitohondrijska DNA zanimljiva je za molekularnu dijagnostiku u onim slučajevima kada se sumnja na bolesti povezane s varijantama mitohondrijskoga genoma. S obzirom na to da se mitohondrijska DNA isključivo nasljeđuje od majke, njezina analiza često se rabi u forenzici. Općenito, kad se radi o molekuli DNA, onda se metodama koje se koristi za molekularnu dijagnostiku utvrđuje izravno (sekvenciranje) ili neizravno (temeljem veličine restrikcijskih fragmenata nakon digestije restrikcijskim endonukleazama ili hibridizacijom sa sljedno-specifičnim sondama).

Osim molekule DNA, bilo nuklearne ili mitohondrijske, za molekularnu dijagnostiku važne su molekule RNA, i to one

koje pripadaju klasi glasničkih RNA molekula (mRNA). One prenose informaciju pohranjenu u genomu do sustava za sintezu proteina, osiguravajući tako sintezu proteina po uputama pohranjenim u genima. Kad se radi o molekulama mRNA, za molekularnu dijagnostiku važna je informacija o količini određene mRNA. Količina mRNA govori o genskoj ekspresiji i često je ključna informacija u dijagnostici tumorskih bolesti, odnosno praćenju učinkovitosti antitumorske terapije. U tom kontekstu analizira se ekspresija onkogenskih RNA, RNA molekula tumorskih supresorskih gena ili RNA za fuzijske proteine koji nastaju genskim translokacijama (primjerice bcr-abl kod mijeloidne leukemije). Osim prethodno navedenih, u novije vrijeme sve veće dijagnostičko značenje daje se posebnoj klasi molekula RNA koje imaju regulatornu funkciju, takozvanim mikroRNA.

Osim staničnih nukleinskih kiselina, nuklearne i mitohondrijske DNA te molekula RNA, u molekularnoj dijagnostici koriste se i nukleinske kiseline prisutne u cirkulaciji, tzv. cirkulirajuće nukleinske kiseline. Njihova prisutnost u cirkulaciji rezultat je raspada stanica, ali i drugih procesa, zahvaljujući kojima dospijevaju u cirkulaciju.

Dijagnostika i procjena terapije

U nastavku će biti navedene neke od bolesti za čiju se dijagnostiku koristi analiza nukleinskih kiselina. Cistična fibroza najčešća je genska bolest bijelaca (jedan slučaj na oko 2500 novorođenčadi). Nasljeđuje se autosomno recesivno. Bolest pogađa egzokrine žljezde, a ponajprije se manifestira problemima u funkciji dišnog i probavnog sustava. Bolest je u oko 70 % slučajeva rezultat mutacije F508 (delecija od tri nukleotida koja kodiraju fenilalanin) u genu CFTR. Preostalih oko 30 % slučajeva odnosi se na više od 1200 različitih mutacija u navedenom genu. Gen CFTR kodira kloridni kanal, protein odgovoran za transport kloridnih iona kroz staničnu membranu.

Mišićne distrofije su bolesti skeletnih mišića. Uzrokovane su mutacijama koje se nasljeđuju autosomno dominantno, autosomno recesivno ili spolno vezano. Mutacije su prisutne u različitim genima koji kodiraju proteine izvanstaničnoga matriksa, transmembranske proteine i proteine sarkoleme, citoplazmatске proteaze te proteine jezgrine membrane. Najčešća su dva oblika mišićnih distrofija, Duchennova i Beckerova. One su rezultat cijeloga spektra različitih mutacija, delecija, duplikacija, točkastih mutacija ili mutacija prekrajanja, u genu za distrofin, što ima za posljedicu potpuni izostanak ili male količine distrofina smanjene funkcije.

Sindrom fragilnoga x-kromosoma posljedica je dinamične mutacije u genu FMR1, koja podrazumijeva promijenjeni broj tripleta nukleotida CGG u regulatornom dijelu navedenoga gena

TKO JE AUTORICA OVOGA ČLANKA?

Dr. sc. Karmela Barišić je redovita profesorica u trajnom zvanju na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u izvođenju kolegija Biokemija, Molekularna dijagnostika, Farmakogenetika, Molekulske osnove bolesti i terapije na diplomskim studijima te u nastavi na doktorskom i specijalističkim poslijediplomskim studijima. Znanstveni interes usmjeren joj je na istraživanje stresnih proteina, apoptoze, signalnih putova, staničnog skeleta te biološkog i dijagnostičkog značenja regulacijskih RNA molekula. Aktivna je članica Hrvatskoga društva za biokemiju i molekularnu biologiju. U dva mandata (2001.–2005.) obnašala je dužnost predsjednice Društva. Također, u razdoblju 2009.–2013. bila je članica Odbora za edukaciju federacije europskih biokemijskih društava (FEBS).

što se reflektira na opseg njegove ekspresije. Sindrom je povezan s mentalnom retardacijom i smatra se da je značajno povezan s autizmom.

Huntingtonova bolest teška je neurodegenerativna bolest uzrokovana dinamičnom mutacijom u genu za protein huntingtin. Radi se o promjeni broja tripleta nukleotida CAG u kodirajućoj regiji gena. Zahvaljujući promijenjenom broju navedenih tripleta nastali protein ima više aminokiseline glutamina što utječe na njegova svojstva i funkciju i posljedično dovodi do neurodegenerativnih promjena.

Molekularna dijagnostika bitan je dio sveukupne prenatalne dijagnostike. Iz korionskih resica ili amnijske tekućine moguća je izolacija nukleinskih kiselina i potom njihova analiza s ciljem utvrđivanja nasljednih bolesti.

Područja medicine u kojima je analiza nukleinskih kiselina zauzela značajno mjesto svakako su dijagnostika malignih bolesti i praćenje uspješnosti antitumorske terapije. Ilustrativan je primjer kronične mijeloidne leukemije. Kod te bolesti, u oko 95 % slučajeva, prisutan je takozvani Philadelphia-kromosom nastao razmjenom genetskoga materijala kromosoma 9 i 22. Ova translokacija dijelova kromosoma dovodi do nastanka fuzijskoga gena BCR-ABL1 koji kodira konstitutivno aktivnu tirozinsku kinazu. Analizom DNA odnosno specifičnih transkripata (molekula RNA) može se dijagnosticirati bolest, ali se može utvrditi pravilna terapija (primjerice imatinibom, poznat pod komercijalnim imenom Gleevec) te pratiti njezina učinkovitost.

Analiza nukleinskih kiselina važna je i za područje kliničke mikrobiologije te transfuzijske medicine (utvrđivanje virusnih nukleinskih kiselina u uzorcima krvi dobrovoljnih davatelja).

U brojnim recentnim razmatranjima o individualnoj prilagodbi terapije kao jednom od aspekata personalizirane medicine

značajan se naglasak stavlja na farmakogenetička testiranja. Ona obuhvaćaju analizu genskih varijanti za one proteine koji moduliraju djelovanje lijekova, bilo kao njihovi receptori, prenositelji ili metabolizirajući enzimi. U tom području posebice su istražene i u kliničkoj praksi korištene informacije o genskim varijantama gena za enzime citokroma P40 (CYP). CYP-enzimi sudjeluju u metabolizmu velikoga broja lijekova, a njihove varijante mogu djelovati tako da ubrzavaju ili usporavaju metabolizam određenih lijekova. Ako je neka osoba s obzirom na utvrđenu gensku varijantu odgovarajućega CYP-enzima iznimno brzi metabolizator, prosječnom dozom lijeka kod te osobe neće se postići željena terapijska koncentracija. U suprotnom slučaju, kod osobe koja je spori metabolizator, prosječnom dozom lijeka moguće je postići koncentracije lijeka koje ulaze u područje toksičnih, odnosno veliki je rizik od neželjenih nuspojava lijeka.

Budućnost molekularne dijagnostike

Područja znanosti poput proteomike, genomike, transkriptomike i različitih drugih »omika« intenzivno se razvijaju zahvaljujući, između ostaloga, i moćnim tehnologijama koje već danas omogućuju brzu analizu pojedinačnoga proteoma, genoma ili transkriptoma. Uključivanje znanstvenih postignuća ovih disciplina u kliničkoj laboratorijskoj praksi bit će i dalje obrazac po kojem će se razvijati molekularna dijagnostika. U tom kontekstu u bliskoj budućnosti za očekivati je da pretraživanje cjelokupnih individualnih genoma zamijeni analize diskretnih dijelova genoma te da se dijagnostički i terapijski postupci individualno dimenzioniraju.

Literatura

1. S. A. Kidd i sur. Fragile X syndrome: a review of associated medical problems. *Pediatrics* 134 (5) (2014) 995–1005.
2. L. Buckingham, *Molecular Diagnostics Fundamentals, Methods, and Clinical Applications*. 2012, 2nd ed., Philadelphia: F. A. Davis Co., str. 35
3. T. Ong, B. W. Ramsey. Update in Cystic Fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192 (6) (2014) 669–675.
4. F. O. Walker, *Huntington's disease*. *Lancet* 369 (9557) (2007) 218–228.
5. M. W. Moore, D. Babu, P. D. Cotter. Companion diagnostics and personalized medicine: A review of molecular diagnostics applications, *Current Topics in Genetics* 5 (2012) 23–30.
6. W. E. Evans, M. V. Relling, Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics, *Nature* 429 (2004) 464–468.
7. R. Kuzmanić Šamija, Mišićne distrofije – dijagnostika i terapija, *Pediatr. Croat.* 57 Supl. 1 (2013) 57–6.