

# Aneuploidija - trisomija kromosoma 21

---

**Baričević, Andreja**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2009**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:814316>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-05**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK**

**ANEUPLOIDIJA – TRISOMIJA KROMOSOMA 21**

**ANEUPLOIDY – TRISOMY OF THE 21 CHROMOSOME**

**SEMINARSKI RAD**

Andreja Barišević  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: Prof.dr.sc. Mirjana Pavlica

Zagreb, 2009.

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	3
2. PODRIJETLO FENOTIPA TRISOMIJE 21 .....	4
3. PRENATALNO DIJAGNOSTICIRANJE DOWN-OVOG SINDROMA.....	5
4. PODRIJETLO DODATNOGA KRAKA KROMOSOMA HSA21.....	6
5. FENOTIPSKA VARIJABILNOST KOD DS.....	7
6. PROGNOZA TRAJANJA ŽIVOTA.....	8
7. U ESTALOST POJAVE DS.....	9
8. GENOMSKI SASTAV HSA21.....	9
9. GENOMSKA VARIJABILNOST.....	11
10. MIŠJI MODELI I FENOTIP.....	12
11. EKSPRESIJA GENA KOD TRISOMIJE 21.....	15
12. TRAŽENJE GENA ODGOVORNIH ZA FENOTIP DS.....	15
13. STARE I NOVIJE METODE ZA DIJAGNOZU BOLESTI.....	16
14. PRIMJERI ZA POJAVU NERAVNOTEŽE ZBOG OVEREKPRESIJE PROTEINA.....	17
15. SMJERNICE ZA DALJNJA ISTRAŽIVANJA.....	18
16. TERAPIJA ZA TRISOMIJU 21.....	19
17. LITERATURA .....	20
18. SAŽETAK.....	22
19. SUMMARY.....	22

## 1.) UVOD

Aneuploidija je pojava abnormalnog broja kopija genomskih regija i jedan je od najčešćih primjera genetičkih poremećaja kod ljudi. Pojam obuhvaća trisomije – povećan broj kopija cijeloga kromosoma i monosomije - odsustvo jednoga kromosoma, te delecije i duplikacije subkromosomalnih regija.

S obzirom na veličinu, tj. dužinu utrostruene genomske regije, trisomije se mogu podijeliti u 4 kategorije: potpune trisomije ili trisomije cijeloga kromosoma, djelomične trisomije, mikrotrisomije i triplikacije ili utrostruena jednog gena ili jednog funkcionalnog genskog elementa. Trisomije cijeloga kromosoma su uobičajene u ljudi. Nastaju kao posljedica nepravilnog razdvajanja kromosoma prilikom mitoze ili mejoze.

esto se proučava njihova pojavnost kod spontanih pobaćaja. Tako je npr. trisomija 16 pronađena kod jednog od 16, a trisomija 21 kod jednog od 43 spontana pobaćaja. U ovu vrstu trisomija spada trisomija kromosoma 21 (HSA21), koja je posljedica Down-ovog sindroma (DS) (Antonarakis i sur. 2004). Djelomične, segmentalne trisomije zahvaćaju više od jedne kromosomske vrpce, obično veće od 5 Mb; mnogo su rjeđe od trisomija cijeloga kromosoma, a nastaju zbog abnormalne mejoze i segregacije kromosoma. Mikrotrisomije (duplikacije segmenta) su djelomične trisomije genskog segmenta, kraće od 3-5 Mb. Ne mogu se detektirati visokokvalitetnom rutinskom citogenetičkom analizom. Većinom nastaju zbog nejednakih crossing-overa u mejozi, koje uzrokuju interkromosomski duplikoni, tzv. LCR-ovi („Low Copy Repeats“). LCR-ovi čine oko 5% ljudskoga genoma. Mikroduplikacije se javljaju u mnogim primjerima Charcot–Marie–Tooth bolesti tipa 1 (CMTA1), kao i npr. kod SHFM3 („ectrodactyly“, ili tzv. „jastog–pandža“ sindroma; oboljeli imaju malformacije šaka i /ili stopala). Duplikacije pojedina nog gena ili jedne funkcionalne genetičke jedinice također mogu biti patogene. Tako npr. duplikacija gena *PLP1* uzrokuje Pelizaeus–Mertsbacher bolest, a duplikacija *PMP22* uzrokuje, već ranije spomenutu, CMT1A bolest. Duplikacije koje zahvaćaju navedene gene, zahvaćaju i još neke kodirajuće sekvence, no istraživanja na transgenim miševima gdje su bili prikazani duplikoni pojedina nih gena su pokazala da te kodirajuće sekvence nemaju ulogu u nastanku bolesti, što nam pokazuje da abnormalni fenotip može prouzročiti promjena broja kopija samo jednog jedinog gena.

Neravnoteža u broju gena esto se javlja u somatskim tumorskim stanicama i uzrokuje mnoge trisomije i monosomije, što je povezano s napredovanjem rasta tumora. U ovom u se seminaru fokusirati na konstitutivne trisomije, tj. one koje su prisutne u svim stanicama, a u koje spada i trisomija kromosoma 21, ija je posljedica bolest Down-ov sindrom.

## 2.) PODRIJETLO FENOTIPA TRISOMIJE 21

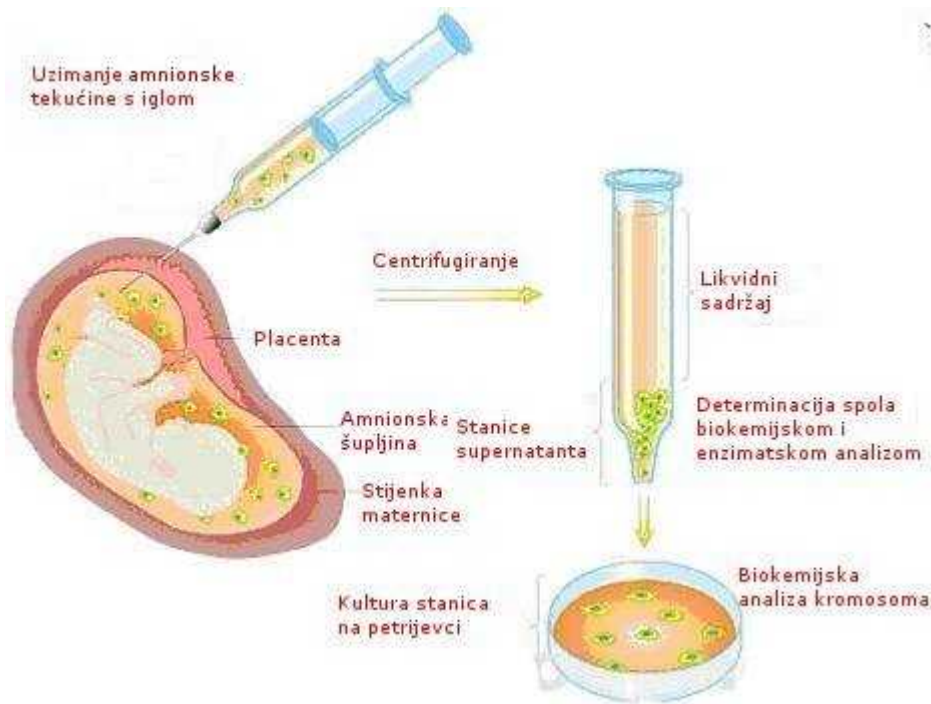
Pretpostavlja se da postoje 2 kategorije gena na kromosomu 21 (HSA21) – geni kod kojih abnormalan broj kopija utje e na fenotip, tj. uzrokuje fenotip karakteristi an za DS, te druga vrsta gena, koji nisu „koli inski osjetljivi“, tj. ne utje u na fenotip. To se može odnositi na protein-kodiraju e gene kao i na nekodiraju e RNA (nc RNA) gene.

Tako er, utjecaj nekih „koli inski osjetljivih“ gena na fenotip bi mogao biti alelnu specifi an – što zna i da odre ene kombinacije gena mogu prouzro iti odre eni fenotip, a druge ga ne uzrokuju. Utjecaj tih kombinacija može biti kvalitativan - nastaju razli ite aminokiseline, i kvantitativan - razlikuju se po ja ini ekspresije gena. Ekspresija to no odre enih kombinacija alela e prouzro ite fenotip karakteristi an za DS, i to samo ako dosegne kriti nu vrijednost, tj. ako do e do overekspresije tih gena. „Koli inski osjetljivi geni“ mogu direktno ili indirektno utjecati na fenotip. Do indirektnog utjecaja dolazi uslijed interakcije gena na HSA21 ili genskih produkata sa drugim genima i njihovim produktima. Navedene interakcije mogu biti alelnu – specifi ne pa samo odre ene kombinacije alela koji ina e ne utje u na pojavu DS, mogu utjecati na fenotip oboljelih osoba. Dakle, individualna geneti ka podloga, tj. geni za razli ite osobine koji ovise o naslje u, a koji su stoga razli iti kod razli itih jedinki, mogu doprinjeti raznolikosti fenotipa osoba oboljelih od DS.

Triplikati odre enih CNG-a („conserved functional non-genic sequences“) u kromosomu HSA21, kao i u cijelome genomu, mogu, kao i triplikati nekih drugih funkcionalnih, ali nekonzerviranih genomskih regija, utjecati na fenotip DS. Molekularni mehanizam neravnoteže kod te vrste lokusa je još uvijek nepoznat, no vjerojatno e biti istražen kada se otkrije funkcija CNG-a i drugih važnih genomskih elemenata.

### 3.) PRENATALNO DIJAGNOSTICIRANJE DS

Prenatalno dijagnosticiranje DS moguće je izvršiti amniocentezom (Slika1.). Danas liječnici trudnicama od 35 godina ili starijim preporučuju amniocentezu u 16. tjednu trudnoće. Amniocenteza je zahvat kojim se uzima mala količina amnijske tekućine iz vodenjaka koji okružuje fetus, tj. to je uzimanje plodne vode iz maternice. U toj se tekućini nalaze stanice fetusa i njom se analizom u laboratoriju, izradom kariograma, i drugim metodama, mogu dobiti genetičke informacije i otkriti genetičke poremećaje. Tekućina može dati informacije i o zdravlju fetusa (<http://www.medicina.hr/clanci/amniocenteza.htm>).



**Slika1.** Prikaz postupka amniocenteze.

(<http://www.desprecopii.com/Images/Upload/amniocenteza2.jpg>)

Druga mogućnost dijagnosticiranja je izravna citogenetska analiza stanica korionskih resica posteljice dobivenih biopsijom već od 10. tjedna trudnoće. Nedavno se

pojavio novi prenatalni test za otkrivanje trisomije 21 koji je, prema istraživanju napravljenom u SAD-u, manje riskantan od amniocenteze. Za novu metodu potreban je samo uzorak krvi majke iz kojeg se geneti kom analizom otkrivaju anomalije kromosoma, poput onih trisomije 21. Nova metoda koristi fragmente fetalne DNA iz maj ine krvi pa je mnogo je sigurnija od drugih, do sad korištenih metoda. U Hrvatskoj su u uporabi tzv. dvostruki i trostruki test iz krvi na koje lije nici upu uju trudnice, me utim, ti testovi samo ukazuju na rizik pojave odre enih genskih pogreški kod fetusa (<http://www.medicina.hr/clanci/downov%20sindrom.htm>).

#### 4.) PODRIJETLO DODATNOGA KRAKA KROMOSOMA HSA21

U 92% slu ajeva Down-ova sindroma radi se o uobi ajenom tipu bolesti kod kojeg dijete u svim somatskim stanicama ima trisomiju 21 - tri kromosoma 21 umjesto normalno dva. Trisomija nastaje zbog nerazdvajanja kromosoma 21 prilikom mejoze zametnih prastanica majke, a samo u 10% slu ajeva u mejozi zametnih prastanica oca, zbog ega 90% oboljelih ima dva maj ina i jedan o ev kromosom 21. Kod ~3% djece s DS postoji kromosomski mozaik, miksoploidija, što zna i da postoje dvije linije stanica - jedna linija ima trisomiju 21, a druga je normalna. U ovim slu ajevima nerazdvajanje kromosoma je nastalo nakon oplodnje, klini ka slika je blaža, a njena težina ovisi o tome koja linija stanica prevladava. Oko 5% djece s Down-ovim sindromom ima tzv. "translokacijski" tip bolesti gdje je u stanicama normalan broj kromosoma, 46, ali postoji višak kromosomske mase zbog nebalansiranog prijelaza kromosomskog materijala (<http://www.medicina.hr/clanci/downov%20sindrom.htm>). Dodatni kromosom u HSA21 determiniran je korištenjem polimorfnih markera u DNA roditelja i onoj od potomka sa DS. DNA markeri u blizini centromera, ozna ili su stadij mejoze tijekom kojeg se desila pogreška u segregaciji kromosoma. Ako su svi markeri na 21q (dugom kraku kromosoma HSA21) homozigotni, to ukazuje na post-zigotnu pogrešku jer se tokom mejoze homologni krakovi kromosoma nisu razdvojili.

## 5.) FENOTIPSKA VARIJABILNOST KOD DS

Kod osoba oboljelih od DS prouavaju se dvije vrste fenotipa – onaj karakterističan za sve oboljele, te neke fenotipske karakteristike koje nisu nužno prisutne kod svih oboljelih (Slika 2.). Djeca s Downovim sindromom imaju mentalnu zaostalost različitog stupnja, a uz to postoji znatan zastoje u tjelesnom razvoju i rastu za vrijeme trudnoće ali i nakon rođenja. Glava je smanjena opsega, a zatiljak plosnat. Oči su kosopoložene i šire razmaknute (hipertelorizam), na unutrašnjem okonjatu postoji nabor kože (epicanthus), a uz obod šarenice bijele pjege (Brushfieldove pjege). Nos i usta su maleni, uške malene i loše oblikovane. Zglobovi su vrlo pokretljivi i savitljivi, a miši i mlohavi. Šake su široke i kratke, s kratkim prstima. Peti prst (“mali prst”) je kraći, sa zadnjim prstom lagano svinutim prema četvrtom prstu (klinodaktilija). Na dlanovima postoji brazda koja se proteže iznad četiri prsta. Oko 40% djece s Down-ovim sindromom ima prirođenu srčanu manu (najčešće nedostatak dijela pregrade koja dijeli desni od lijevog dijela srca). Postoje suženja ili potpuni prekid prohodnosti probavnog sustava (suženje jednjaka, gušterača prstenastog oblika, nepostojanje otvora stražnjeg crijeva), poremećaj živčanih vlakana debelog crijeva (zbog čega nastaje Hirschprungova bolest - proširenje dijela crijeva gdje nedostaju živci, a suženje na dijelu ispod). Nešto češće u ovoj populaciji ovi bolesnici obole od akutne leukemije a imaju i smanjenu otpornost prema infekcijama (<http://www.medicina.hr/clanci/downov%20sindrom.htm>):





**Slika 2.** Dijete oboljelo od DS

(<http://ipedia.net/wp-content/uploads/2009/07/downsyndrome.jpg>)

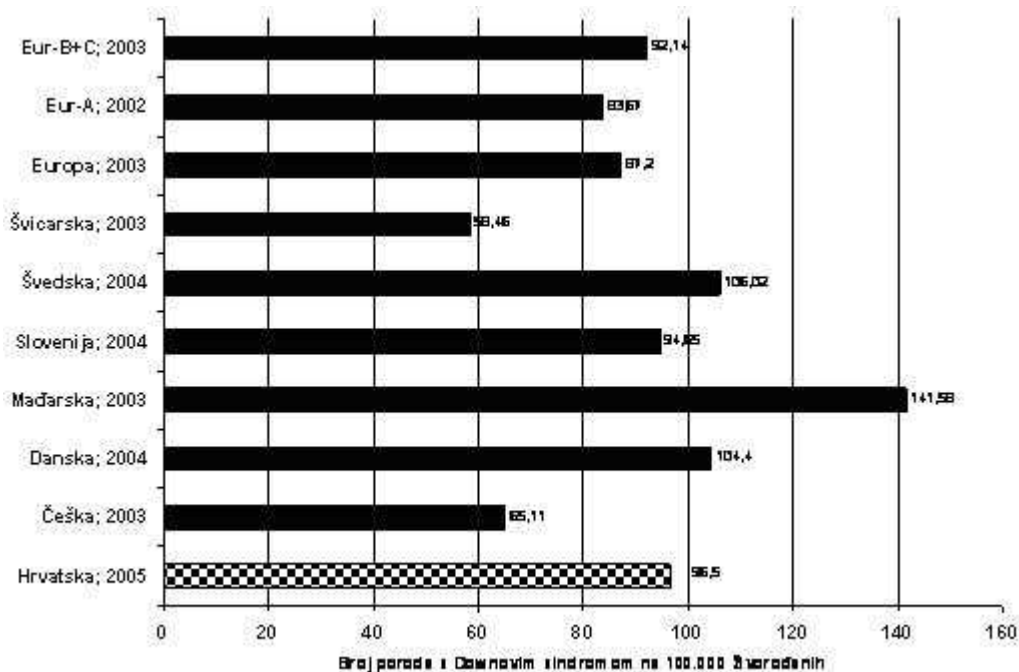
## 6.) PROGNOZA ŽIVOTNOG VIJEKA

Životni vijek je u prosjeku smanjen na polovicu, a u pojedinog djeteta uglavnom ovisi o zahvaćenosti organskih sustava i vitalnih organa (srce, probavni trakt), te o životnim uvjetima djeteta (izloženosti infekcijama). Većina djece koja preživi prvu godinu života doživi stariju dob. Dijete nikad ne dosegne mentalne sposobnosti zdrave djece, a osobito nedostaje sposobnost apstraktnog mišljenja. Većina nije sposobna za normalno školovanje i ostaje socijalno ovisna cijelog života. Dječaci su poslije puberteta

neplodni, a djevojice mogu zanijeti i iznijeti dijete (<http://www.medicina.hr/clanci/downov%20sindrom.htm>).

## 7.) U ESTALOST POJAVE DS

U populaciji se rađaju prosječno 1 dijete s Downovim sindromom na 650 porođaja (0.15%). Značajan utjecaj na učestalost Downova sindroma ima životna dob majke pri rađanju, pa je pojavnost ovog sindroma kod majki mlađih od 30 godina 1:2000 porođaja (Slika 3.).



**Slika 3.** Broj djece rođene s Down-ovim sindromom na 100 000 živorođenih u nekim državama Europe (<http://ipedia.net/health/down-syndrome/>)

## 8.) GENOMSKI SASTAV HSA21

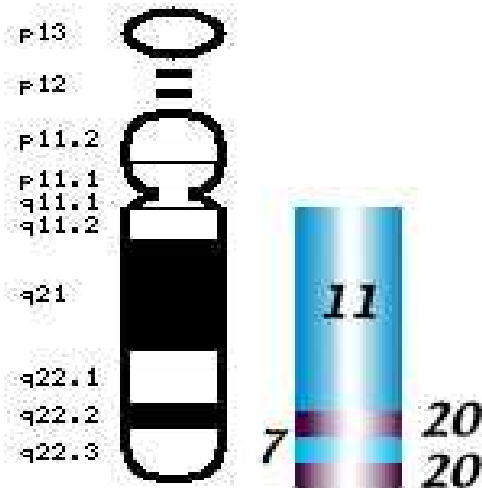
HSA21 spada u najmanje ljudske kromosome (Slika 4.). Njegov 33,6 Mb dugi krak čini 1% od cijele sekvence. Kada je objavljena početna sekvenca 21q, sekvencionirano je bilo 225 gena. 35% od tih gena bilo je homologno genima vrste

*Drosophila melanogaster*, 35% genima vrste *Caenorhabditis elegans* i 17% genima vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Analiza koja je uslijedila nakon toga, temeljila se na raznim metodama, EST sekvenciranju, i komparativnoj genomskoj analizi. Tako se sekvenciralo 261–364 protein - kodiraju ih gena. Dosad je na HSA21 visokom preciznošću u sekvencirano 33 546 361 bp. Tako je otkriveno čak 99,7% sekvence 21q. Na kratkom kraku kromosoma HSA21, 21p, sekvencirana je samo regija od 281 116 bp. Ukupni broj gena (protein-kodiraju ih i nekodiraju ih) na 21q, još nije definitivno određen. Sekvencirati treba još 100 Kb kromosoma ([http://hgp.gsc.riken.go.jp/index.php/Sequence\\_Data](http://hgp.gsc.riken.go.jp/index.php/Sequence_Data)).

Na 21q postoje regije koje su bogate i one koje su siromašne genima, što je povezano sa sadržajem G-C parova. Tzv. L-izohori kojima je sadržaj G–C parova manji od 43% imaju po jedan gen na ~ 300 Kb, dok H3 izohori, koji imaju G-C parova više od 48%, sadrže više gena- ~1 gen na 58 Kb.

Sekvenca HSA21 se još dosta mora istraživati da bi se dobio potpun zapis - i to pogotovo pojedini eksoni, nekodirajuće RNA i rijetki transkripti. Raznim analizom je utvrđeno da na 21q postoji 5 mikroRNA (miRNA), no njihova funkcija i moguća povezanost sa DS još nije poznata. Komparativnom analizom sekvenci ljudskih i drugih genoma, posebice mišjih, otkriveni su novi geni i potvrđeni već postojeći i transkripti.

Kako bi se ubrzalo i poboljšalo otkrivanje funkcije HSA21, proučava se transkripcijska aktivnost cijeloga kromosoma. U jednoj studiji su korištene oligonukleotidne grupe koje su sadržavale probe udaljene prosječno 35 bp i tako pokrile cijeli 21q, kako bi se otkrila ekspresija 11 različitih vrsta tumorskih stanica kod ljudi. 9,7% proba je pokazalo pozitivne hibridizacijske signale u 5 od 11 vrsta tumorskih stanica, što je upućivalo na to da je genom koji se prepisuje ~10 zavoja već i od postojećeg genskog zapisa. Taj transkripcijski potencijal bi mogao biti prisutan zbog nekih još neidentificiranih gena na kromosomu, RNA transkripata koji nisu protein-kodirajućih, alternativnih RNA-izofornih već poznatih gena, te nefunkcionalnih, “illegitimate”, transkripata. Analiza tih podataka je pokazala da je 49% od promatranih hibridizacijskih signala (transkripcije), izvan poznatoga zapisa. 65% od tih transkripata je umnožen metodom RT-PCR. Rezultat je doveo do zaključka da je zapis sekvence HSA21 još daleko od potpunog (Antonarakis i sur. 2004).



**Slika 4. HSA21**

(<http://ratmap.gen.gu.se/GAPP2/human/images/Comp21.JPG>)

## 9.) GENOMSKA VARIJABILNOST

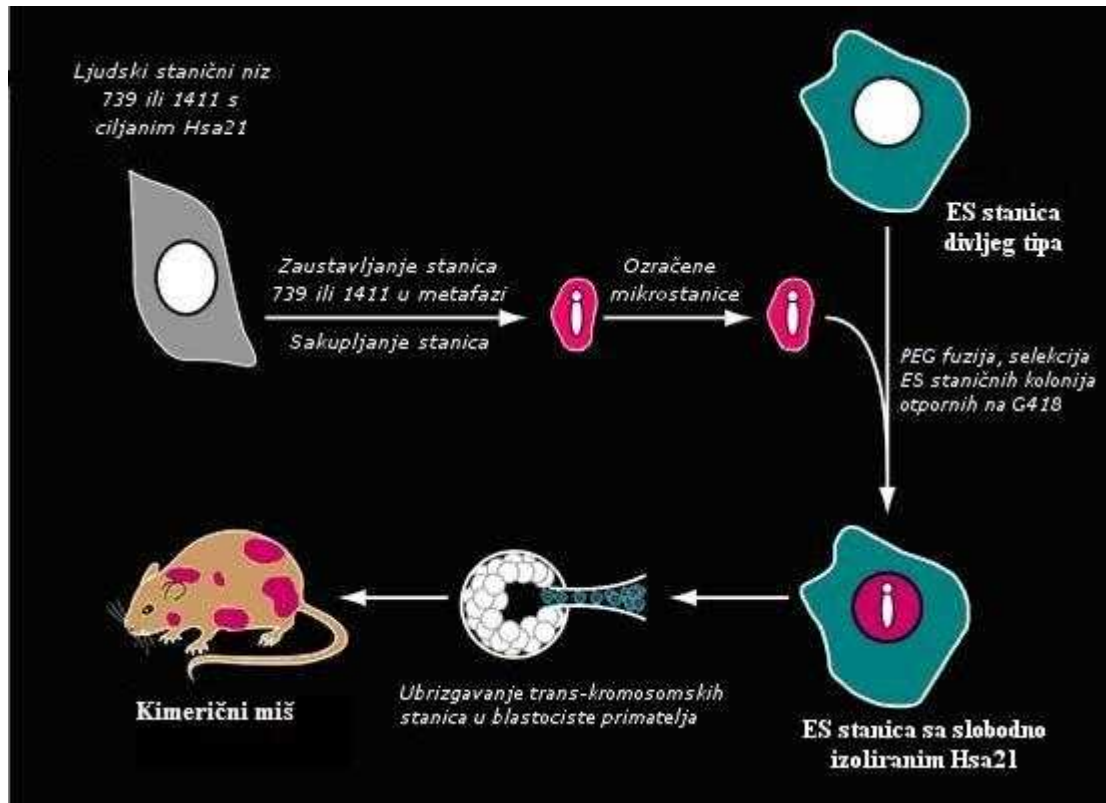
Varijabilnost HSA21 vjerojatno ima utjecaja na različite fenotipove osoba s DS. Zbog toga je nužno determinirati uobičajene i rijetke inačice DNA na ovom kromosomu. Kratke ponavljajuće sekvence koje bi mogle biti polimorfne čine oko 1,26% HSA21, nadalje, identificirano je 105 334 mjesta na kojima su vjerojatno SNP-ovi (“single nucleotide polymorphisms” – DNA sekvence koji se razlikuju samo po jednom nukleotidu, npr. u jedinki iste vrste) ([http://en.wikipedia.org/wiki/Single-nucleotide\\_polymorphism](http://en.wikipedia.org/wiki/Single-nucleotide_polymorphism)).

Po etna procjena vjerojatnosti da se neki istovrsni aleli pojave jedni blizu drugih u istome haplotipu obavljena je tako da je izvršeno resequenciranje 20 haploidnih ljudskih genoma različitih etničkih grupa ljudi korištenjem označenih oligonukleotida na frakciji 21q. Za ovu studiju HSA21 je izdvojen u somatskim hibridnim stanicama, a uz pomoć PCR-a su stvorene haploidne DNA hibridizacijske probe. Na taj je način identificirano 24 386 SNP-ova zajedno sa rijetkim alelima koji su bili uobičajeni barem

dvaput, te još čak 11 603 nukleotidnih varijanti koje su bile uočene samo jednom. Takva nam studija pomaže u determinaciji SNP-ova koji utječu na ekspresiju gena i time i na manifestaciju uobičajenih i onih rjeđih fenotipova koji se javljaju kod osoba oboljelih od DS (Antonarakis i sur., 2004).

## 10.) MIŠJI MODELI I FENOTIP

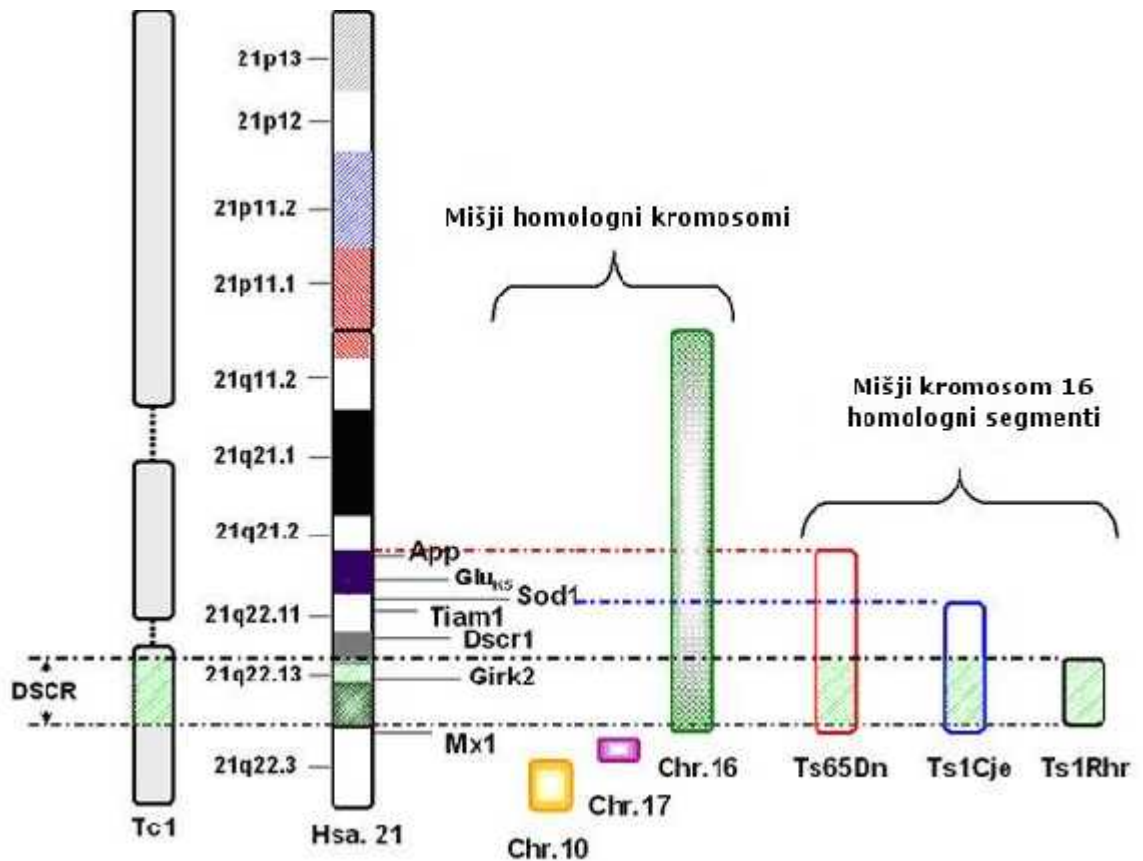
HSA21 je homologan kromosomskim regijama miša koje se protežu kroz tri različita kromosoma. Distalni segment mišjeg kromosoma 16 je homologan sa gotovo cijelim dugim krakom HSA21. Od 21cen do 21qter na HSA21 oko 23,2 Kb je homologno MMU16, a proteže se od gena *Mrpl39* do *Znf295*; 1,1Mb je homologno MMU17 i 2,3Mb je homologno MMU10. Tako možemo stvoriti tri različita mišja modela sa trisomijama na navedenim segmentima, od kojih, abnormalnosti najslabije nije onima kod ljudi sa DS, ima model sa trisomijom 16, koji se još naziva i Ts65Dn. Taj model je ujedno i najbolje proučeno, a smatra se da su ~132 gena, koja se protežu kroz 16 Kb, homologna onima kod HSA21. Dodatne djelomične trisomije za MMU16 se protežu od *Sod1* do *Znf295* (85 poznatih gena) te od *App* do *Sod1* (46 poznatih gena). Rade se također i kimerični mišji modeli kod kojih veliki broj stanica nosi HSA21 (Slika 5.) (Antonarakis i sur. 2004).



**Slika 5.** Prikaz dobivanja kimeri nih miševa sa HSA21 kromosomom. Ciljanjem gena unešen je gen otporan na Neomicin u ljudski kromosom 21 (Hsa21), u ljudsku stani nu liniju. Stanice koje nose ciljani hsa21 zaustavljene su u metafazi i centrifugirane do izoliranih mikrostanica koje sadrže jedan ili samo par kromosoma. Mikrostanice su spojene sa murinskim embrionalnim matnim stanicama (ES) koje su nakon toga selektirane sa G418 kako bi primile gen za otpornost na Neomicin i kako bi se ustanovilo koji stani ni nizovi nose Hsa21. Ti ES nizovi ubrizgani su u mišju blastocistu kako bi stvorili kimeri nog miša koji je uzgojen kako bi se ustanovio Tc1 soj miševa koji nose slobodno izoliran Hsa21 ([http://www.nimr.mrc.ac.uk/immcellbiol/tybulewicz/images/ds1\\_full.gif](http://www.nimr.mrc.ac.uk/immcellbiol/tybulewicz/images/ds1_full.gif)).

Kod djelomi ne trisomije može se istraživati utjecaj utrostru enja pojedina nih gena na fenotip miša, na na in da se deletira jedna kopija odre enoga gena. Takvo je istraživanje i ra eno sa genima *Ifngr* i *Ifnar2* (Mauroun i sur. 2000). Dobiveni je miš imao trisomiju 16, no umjesto tri kopije gena *Ifngr*, koji kodira za interferon delta i tri kopije *Ifnar2* gena, koji kodira za interferon alfa, imao je po dvije kopije. Fetalni je rast toga miša bio znatno ve i, a poboljšana mu je bila i vijabilnost kortikalnih živaca. Postoji i direktniji pristup ovoj vrsti istraživanja, u kome se stvaraju transgeni ni miševi koji

overekspimiraju jedan gen koji je ortologan HSA21. Jedan od takvih miševa je nosio *SOD1* transgene. Da bi dobili rezultate relevantne za DS, transgen treba potjecati od miša, imati vlastite regulatorne elemente, a ekspimirati bi se trebala samo jedna kopija. Ukupni nivo transkripcije bi trebao biti ~1,5 puta ve i od normalnoga. Overekspresija transgena sa egzogenim promotorom nam tako er može omogu iti otkrivanje njegove funkcije, ali ne nužno i njegove uloge u DS (Antonarakis i sur. 2004).



**Slika 6.** Mapa ljudskoga kromosoma 21 (HSA 21) pokazuje regije kriti ne za Down-ov sindrom (the Down syndrome critical region- DSCR), kao i povezanost razli itih gena sa kromosomskim segmentima trisomalnog mišjeg modela. Pokazalo se da homologni segmenti mišjih kromosoma 10, 16 i 17 odgovaraju analognim dijelovima HSA21. Zabilježeni geni su: amyloid precursor protein (App), glutamate receptor subunit-5 kainate subtype (GluK5), superoxide dismutase-1 (Sod1), T-lymphoma invasion and metastasis-1(Tiam1), Down syndrome candidate region-1 (Dscr1), G-protein coupled inward rectifying potassium channel subunit-2 (Girk2), myxovirus (influenza virus) resistance-1 (Mx1) (<http://www.cellscience.com/reviews7/Galdzicki1.gif>).

## 11.) EKSPRESIJA GENA KOD TRISOMIJE 21

Još se od otkrića DS, 1959. god. smatralo da su geni koji su prisutni u tri kopije, overekspimirani 1,5 puta u odnosu na normalno, euploidno stanje. Tu su hipotezu znanstvenici tek nedavno testirali na mišu sa Ts65Dn djelomičnom trisomijom, oboljelom od DS (Kahlem 2004, Lyle i sur. 2004). U jednoj studiji se proučavalo 78 gena na MMU16, koji su bili prisutni u tri kopije i testirani kvantitativnom RT-PCR analizom u 6 mišjih tkiva u dva razvojna stadija (30 dana i 11 mjeseci starosti). Rezultati su pokazali da samo 37% gena pokazuje ekspresiju 1,5 puta veću u odnosu na normalnu, nivo transkripcije za 45% gena je bio nešto niži od 1,5 puta, 9% gena nije pokazivalo značajnu overekspresiju, a 18% gena je imalo ekspresiju veću u odnosu na 1,5 puta (Lyle i sur. 2004). U drugoj studiji, koja je napravljena na 9 odraslih tkiva gotovo svi triplicirani geni su imali povišeni nivo transkripcije u većini tkiva u kojima su bili ekspimirani; nekoliko ih je pokazivalo ekspresiju nižu od uobičajene, kompenzaciju ili pak vrlo jaku ekspresiju u specifičnim tkivima. Ovi podaci nam pokazuju koji geni vjerojatno pridonose fenotipu DS, a također i rasvijetljavaju kompleksnu regulaciju ekspresije gena povezanu sa neravnotežom količine pojedinih gena (Kahlem 2004, Lyle i sur. 2004). Detaljni i sistematski prikazi ekspresije gena na HSA21 ali i na ostalim kromosomima bi trebali biti prioritet pri funkcionalnoj analizi našega genoma.

## 12.) TRAŽENJE GENA ODGOVORNIH ZA FENOTIP DS

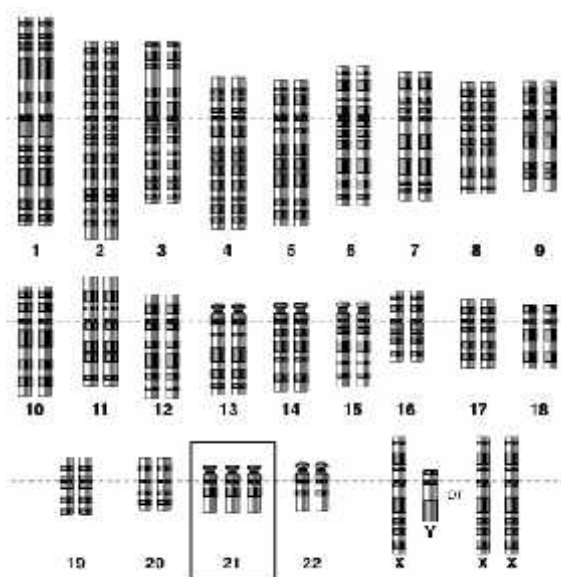
Kako bi pronašli gene koji doprinose fenotipu DS, znanstvenici promatraju ekspresiju pojedinih gena. Tako se pretpostavlja da geni čija ekspresija varira u jedinkama iste vrste jako varira, pridonose varijabilnosti fenotipa DS, dok su oni čija je ekspresija ista kod svih jedinki s DS, odgovorni za fenotip koji je redovito karakterističan za sve oboljele. Istražuje se također i pozicija gena odgovornih za fenotip DS na HSA21. Zahvaljujući studijama na bolesnicima koji imaju djelomičnu trisomiju 21, mogu se detektirati genomske regije koje sadrže gene odgovorne za neke od fenotipova tipičnih za DS. Tako je npr. identificirana regija kromosoma odgovorna za srčanu manu, stoga su



daljnja istraživanja gena i genskih varijanti koje pridonose spomenutom fenotipu bila najviše usmjerena na tu regiju. Brojni istraživači su opisali “regiju kritičnu za DS” (DSCR regiju) (Slika 6.), koja sadrži gene koji doprinose kognitivnom defektu, kao i nekim drugim obilježjima karakterističnim za DS. Međutim, to na definiciju i granicu te regije je sporna jer postoje pacijenti sa djelomičnim triplicacijama koje su izvan granica te regije, koji također imaju neka obilježja karakteristična za DS. Također miševi kod kojih je utrostručena samo DSCR regija, ne pokazuju abnormalnosti povezane sa kraniofacijalnim karakteristikama. I za neke gene drugih kromosoma (gene koji nisu na HSA21), a za koje je utrostručena značajna razlika u ekspresiji kod zdravih osoba i osoba oboljelih od DS, se smatra da pridonose fenotipu DS, te da bi u budućnosti mogli biti ciljna mjesta za potencijalne terapijske intervencije (Antonarakis i sur. 2004).

### 13.) STARE I NOVIJE METODE ZA DIJAGNOZU BOLESTI

Obično se, za otkrivanje trisomije 21, ali i drugih aneuploidija i translokacija, koristi citogenetička analiza kromosoma u metafazi, gdje se u prikazu kariograma jasno mogu uočiti tri, umjesto dvije kopije kromosoma (Slika 7.). U proteklih 10 godina razvile su se neke nove metode za brzu detekciju trisomije 21, kako u fetalnom stadiju, tako i nakon rođenja djeteta.



**Slika7.** Prikaz ljudskog kariotipa sa trisomijom na HSA21.

([http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6f/Trisomie\\_21\\_Genom-Schema.gif](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6f/Trisomie_21_Genom-Schema.gif))

Jedna od takvih, trenutno najraširenijih metoda otkrivanja je metoda FISH-a (fluorescencijska hibridizacija *in situ*) jezgara u interfazi. U ovoj se metodi koriste specifične označene probe za HSA21, ili se pak cijeli HSA21 obilježi bojom. Druga metoda koja se danas koristi u nekim zemljama je kvantitativni fluorescentni PCR (QF-PCR). Ovdje se za utvrđivanje prisutnosti tri različita alela HSA21, koriste DNA polimorfni markeri, mikrosateliti. Uspješnost metode ovisi o markerima i dostupnosti roditeljske DNA. Od ostalih metoda koristi se još i MAPH (“multiple amplifiable probe hybridization” – hibridizacija sa mnogo umnoženih proba), MLPA (“multiplex probe ligation assay”), PSQ (“paralogous sequences quantification”), koja koristi paralogne sekvence za određivanje broja kopija HSA21, te komparativna genomska hibridizacija *in situ* koja se koristi za detekciju potpunih monosomija i trisomija, ali i djelomičnih (segmentalnih) aneuploidija (Antonarakis i sur. 2004).

U radu na kojemu se temelji ovaj seminar (Antonarakis i sur. 2004) znanstvenici su koristili dvije sekvence - za HSA21 i HSA5, koje se razlikuju po jednom nukleotidu - kod HSA21 imamo T, a kod HSA5 imamo C. Te su sekvence umnožili i sekvencirali kako bi odredili broj različitih nukleotida kod trisomije 21, kod djeteta i kod roditelja. Prepostavili su da će se obje paralogne sekvence umnožiti sližno - sa omjerom HSA21/HSA5 od 0,5 za dva različita nukleotida kod zdravoga roditelja, te s omjerom od 1,5 kod djeteta sa trisomijom 21. Prema rezultatima, kod roditelja je bilo 51% T i 49% C, a kod djeteta s DS 59% T i 41% C, tj, kao što vidimo, kod roditelja je omjer HSA21/HSA5 bio ~1, što je dvostruko više od očekivanoga, a kod djeteta s DS je bio ~1,44, što je sukladno očekivanom rezultatu.

#### 14.) PRIMJERI ZA POJAVU NERAVNOTEŽE ZBOG OVEREKPRESIJE PROTEINA

Ovdje ćemo navesti neke primjere zašto tri kopije normalnoga alela rezultira pojavom abnormalnog fenotipa. Transportne molekule kao što su one koje pripadaju

transmembranskoj ABC obitelji tako će ovisiti o stabilnosti ekspresije odgovarajućih gena. ABCA1 transporter utječe na unutarstanični transport kolesterola. Patogena mutacija na tom locus bi uzrokovala veliki nedostatak lipoproteina tipa 1. Transgeni miš sa kopijom viška ABCA1 ima značajno povećan priljev kolesterola u različita tkiva, zbog čega podiže razinu HDL kolesterola. Duplikacija regulatornih elemenata bi mogla rezultirati promjenama u ekspresiji gena što bi moglo dovesti do pojave specifičnih patoloških fenotipova (Singaraja i sur. 2001).

## 15.) SMJERNICE ZA DALJNJA ISTRAŽIVANJA

U budućim istraživanjima svakako nužno utvrditi razlike u ekspresiji gena u različitim tkivima. Trebalo bi identificirati gene koji pokazuju značajne varijacije u ekspresiji pojedinih alela u populaciji. Ti aleli su vjerojatno odgovorni za alelno-specifičan doprinos specifičnom fenotipu DS. Istovremeno, geni koji ne pokazuju polimorfnu varijabilnost u ekspresiji, vjerojatno doprinose fenotipu DS na alelno-nespecifičan način. Nadalje, geni kod kojih dolazi do značajnih preklapanja u ekspresiji RNA kod normalnih tkiva i tkiva u kojima stanicama imamo trisomiju, najvjerojatnije nemaju utjecaja na DS, te ih treba isključiti iz daljnjih analiza i istraživanja.

Važno je utvrditi funkciju brojnih CNG-ova ("conserved functional non-genic sequences"). Identifikacija CNG-ova sa potencijalnom funkcijom u regulaciji gena bi mogla otkriti gene odgovorne za neravnotežu u količini gena. Trisomija nekih CNG-ova ili nekih njihovih genetičkih varijanti bi tako mogla biti povezana sa određenim fenotipovima, povezanim sa DS. Potrebno je determinirati i ne-HSA21 gene, tj. nekodirajuće sekvence koje također utječu na fenotip DS, provjeriti raspon djelomične trisomije HSA21 i njihovu povezanost sa prisutnim fenotipskim karakteristikama DS. Treba identificirati i relevantne miRNA i druge nekodirajuće RNA, procijeniti razlike u ekspresiji kod trisomije i eusomije u ljudskim stanicama i tkivima. Zapravo, nužno je identificirati sve funkcionalne genomske elemente na HSA21, pa tako i krajeve i krake kromosoma, iako je to možda biti vrlo teško ili čak i nemoguće zbog brojnih ponavljanja njihovih sljedova i homogenizacije kratkoga kraka akrocentričnih kromosoma.

## 16.) TERAPIJA ZA TRISOMIJU 21

Patogeneza Downovog sindroma na molekularnom nivou je danas još uvijek prilično slabo istražena i nerazumljiva, zbog čega se pronalazak prikladne terapije za liječenje ove bolesti ne očekuje u narednih desetak, pa i više godina.

Istraživanja koja će se i dalje raditi na modelnim organizmima i stanicama u kulturi mogla bi se temeljiti na smanjivanju ukupnog nivoa transkripcije za “količinski osjetljive” gene (gene za koje se smatra da njihova overekspresija uzrokuje fenotip DS), i to pomoću siRNA (“small interfering RNA”) molekula. Druga bi opcija mogla biti da se lijekovima pokuša utjecati na poremećene metaboličke puteve ili molekule koje su ključne za fenotipske karakteristike DS. Nadalje, tumačenje posljedica genske neravnoteže na fenotip DS bi moglo dati nove ideje za terapijske intervencije u liječenju DS (Antonarakis i sur, 2004).

## LITERATURA

Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S., Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to Patophysiology. *Nature publishing group* 725-738 (2004).

Kahlem, P i sur., Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of down syndrome. *Genome res.* **14**, 1258-1267 (2004).

Lyle, R., Gehrig, C., Neergaard-Henrichsen, C., Deutsch, S. & Antonarakis, S.E., Gene expression from the aneplouid chromosome in a trisomy mouse model of Down syndrome. *Genome Res.* **14**, 1268-1274 (2004).

Maroun, L. E., Heffernan, T.N. & Hallam, D.M., Partial IFN- / and IFN- receptor knockout trisomy 16 mouse fetuses show improved growth and cultured neuron viability. *J. Interferon Cytokine Res.* **29**, 197-203 (2004).

Singaraja, R. R., Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAI-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron1. *J.Biol.Chem.* **276**, 33969-33979 (2001).

[http://en.wikipedia.org/wiki/Single-nucleotide\\_polymorphism](http://en.wikipedia.org/wiki/Single-nucleotide_polymorphism)

<http://www.cellscience.com/reviews7/Galdzicki1.gif>

<http://www.ichg2006.com/abstract/970.htm>

<http://www.medicina.hr/clanci/amniocenteza.htm>

<http://www.medicina.hr/clanci/downov%20sindrom.htm>

[http://www.nimr.mrc.ac.uk/immcellbiol/tybulewicz/images/ds1\\_full.gif](http://www.nimr.mrc.ac.uk/immcellbiol/tybulewicz/images/ds1_full.gif)

<http://www.scitopics.com/getobject?documentid=10903&objectid=500>

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6f/Trisomie\\_21\\_Genom-Schema.gif](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6f/Trisomie_21_Genom-Schema.gif)

<http://wikipedia.net/health/down-syndrome/>

## 17.) SAŽETAK

Trisomija kromosoma 21 je vrsta aneuploidije, tj. geneti ki poreme aj koji uzrokuje bolest pod nazivom Down-ov sindrom (DS). Karakteristi na obilježja te bolesti su mentalna zaostalost, zastoj u fizi kom rastu i razvoju, te karakteristi an izgled glave djeteta. O ekivani životni vijek djece je u prosjeku smanjen za polovicu. Na u estalost pojave Down-ova sindroma kod djece utjecaj ima životna dob majki pri za e u, pa je pojavnost ovoga sindroma eš a kod starijih trudnica. Bolest se može otkriti ve u prenatalnoj fazi pomo u razli itih postupaka, kao što su npr. biopsija i amniocenteza, a u posljednje su se vrijeme javili i neki novi, manje riskantni, postupci. Postoje i razli iti testovi za prenatalnu detekciju bolesti koji nisu preterano pouzdani. Bolest i njeni uzroci i posljedice se uvelike istražuju, no još uvijek se o njoj premalo zna, te se otkrivanje lijeka ili pogodne terapije za lije enje ne o ekuje u narednih desetak godina, pa i više. Pojava mišjih modela sa DS je stvorila nove mogu nosti za daljnja istraživanja i razumijevanje uzroka genskih poreme aja.

## 18.) SUMMARY

Chromosome trisomy 21 is a type of aneuploidy (a genetic disorder) which causes Down syndrome (DS). This disease has specific symptoms such as mental retardation, slower mental and physical development and distinctive facial and head features. The life expectancy of mongoloid children is in average one half shorter than at normal life expectancy. The age of the mother at conception has an effect on the frequency of Down syndrome, therefore, an older mother is more likely than a younger mother to have a baby with the syndrome. The disease can be detected at the prenatal stage with the help of different procedures such as biopsy and amniocentesis. Some new and less risky procedures were recently developed. There are also several tests for prenatal detection of the disease which are not so reliable. The disease and its causes are being studied but the number of information is still too small to expect finding the cure or an appropriate method of treatment in the next ten years or even longer. New possibilities for further

research and understanding of the disorder have been created with the emersion of mouse models with DS.