

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Aleksandar Vojta

**Učestalost i raspodjela polimorfnih biljega CCG i
 $\Delta 2642$ u genu *HD* za Huntingtonovu bolest**

Diplomski rad

Zagreb, 2002.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Učestalost i raspodjela polimorfnih biljega CCG i Δ 2642 u genu *HD* za Huntingtonovu bolest

Aleksandar Vojta

Zavod za molekularnu medicinu,
Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, Zagreb

Sažetak

U ovom radu predstavljani su prvi podaci o genetičkom porijeklu Huntingtonove bolesti u Hrvatskoj. Analizirani su polimorfizmi CCG i Δ 2642 u genu *HD*. Na kromosomima oboljelih prevladavali su aleli sa 7 tripleta CCG i delecijom Δ 2642. Osim toga, normalni aleli sa slijedom CCG od 7 tripleta i delecijom Δ 2642 bili su povezani s većom prosječnom duljinom slijeda CAG u odnosu na ostale normalne alele. To potvrđuje pretpostavku da su upravo aleli sa 7 tripleta CCG i Δ 2642 nestabilni i da prijenosom iz generacije u generaciju na njima dolazi do produljenja slijeda CAG, odgovornog za nastanak Huntingtonove bolesti. Učestalosti biljega CCG i Δ 2642 u populaciji Hrvatske slične su onima u populaciji Zapadne Europe, što upućuje na zajedničko porijeklo mutacije gena *HD*. Prema tome, do sada utvrđena manja stopa pojave Huntingtonove bolesti u istraživanoj populaciji nego u populaciji Zapadne Europe upućuje na velik broj pogrešno dijagnosticiranih ili neprepoznatih slučajeva.

Rad je pohranjen u Centralnoj biblioteci Biološkog odsjeka, Rooseveltov trg 6

Ključne riječi: Huntingtonova bolest / polimorfizam / populacija Hrvatske

Voditelji: Dr. sc. Jasminka Pavelić, prof.
Dr. sc. Biserka Nagy, prof.

Ocjenjivači: Dr. sc. Biserka Nagy, prof.
Dr. sc. Jasminka Pavelić, prof.
Dr. sc. Mirjana Kalafatić, prof.
Dr. sc. Ivan Bašić, prof.

Rad prihvaćen: 19. 06. 2002.

(32 stranice, 10 slika, 2 tablice, 22 literaturna navoda, hrvatski jezik)

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Frequency and Distribution of CCG and $\Delta 2642$ Polymorphisms in the *HD* Gene for Huntington's disease

Aleksandar Vojta

Division of Molecular Medicine,
Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, Zagreb

Abstract

In this work first data are presented on the genetic background of Huntington's disease in Croatia. Polymorphisms CCG and $\Delta 2642$ were analyzed in the *HD* gene. Alleles with CCG length of 7 triplets and presence of $\Delta 2642$ were overrepresented on the affected chromosomes. In addition, normal alleles with sequence of 7 CCG triplets and $\Delta 2642$ deletion were associated with longer CAG triplet repeats compared to normal alleles. This supports the hypothesis that alleles with CCG 7 and $\Delta 2642$ become unstable and develop CAG triplet repeat expansion through multiple transmissions. Frequencies of CCG and $\Delta 2642$ markers in the Croatian population are similar to those reported for Western European populations, indicating a common genetic origin of the *HD* gene mutation. Therefore, the observed lower prevalence of Huntington's disease in Croatia compared to Western European populations indicates the possibility of a large number of misdiagnosed or unrecognized cases.

Thesis deposited in Department of Biology Central Library, Rooseveltov trg 6

Keywords: Huntington's disease / polymorphism / Croatian population

Supervisors: Dr. Jasminka Pavelić, Prof.
Dr. Biserka Nagy, Prof.

Reviewers: Dr. Biserka Nagy, Prof.
Dr. Jasminka Pavelić, Prof.
Dr. Mirjana Kalafatić, Prof.
Dr. Ivan Bašić, Prof.

Thesis Accepted: 19. 06. 2002.

(32 pages, 10 figures, 2 tables, 22 references, original in Croatian)

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. Jasminke Pavelić.

Zahvaljujem prof. dr. Jasminki Pavelić na susretljivosti i pomoći prilikom pripreme rukopisa ovog rada.

Zahvaljujem dr. Silvi Hećimović na pomoći i korisnim savjetima tijekom eksperimentalnog rada. Posebno zahvaljujem na strpljivosti, razumijevanju i dragocjenom vremenu koje mi je posvetila.

Sadržaj

1. Uvod	
1.1 Klinička slika Huntingtonove bolesti	1
1.2 Molekularno-genetička osnova Huntingtonove bolesti.....	1
1.2.1 Gen <i>HD</i>	1
1.2.2 Polimorfne regije CCG i $\Delta 2642$	3
1.2.3 Nasljeđivanje Huntingtonove bolesti	4
1.2.4 Nove mutacije i mehanizam produljenja slijeda CAG.....	5
1.2.5 Protein huntingtin	6
1.3 Populacijska genetika Huntingtonove bolesti	9
1.4 Cilj istraživanja	10
2. Materijali i metode	
2.1 Ispitanici	11
2.2 Materijali.....	11
2.3 Metode	13
2.3.1 Izolacija genomske DNA iz leukocita periferne krvi	13
2.3.2 Lančana reakcija polimeraze za ispitivanje polimorfizma slijeda CCG u genu <i>HD</i>	14
2.3.3 Lančana reakcija polimeraze za ispitivanje polimorfizma $\Delta 2642$ u genu <i>HD</i>	16
2.3.4 Nativna elektroforeza u gelu poliakrilamida	16
2.3.5 Bojanje gela poliakrilamida srebrom	18
2.4 Statistička obrada podataka	19
3. Rezultati	
3.1 Ispitivanje učestalosti polimorfnog biljega CCG	20
3.2 Raspodjela alela CCG s obzirom na broj tripleta CAG u genu <i>HD</i> kod zdravih osoba	20
3.3 Ispitivanje učestalosti polimorfnog biljega $\Delta 2642$	22
3.4 Raspodjela alela $\Delta 2642$ s obzirom na broj tripleta CAG u genu <i>HD</i> kod zdravih osoba	22
4. Rasprava.....	25
5. Zaključak	28
6. Literatura	29

1. Uvod

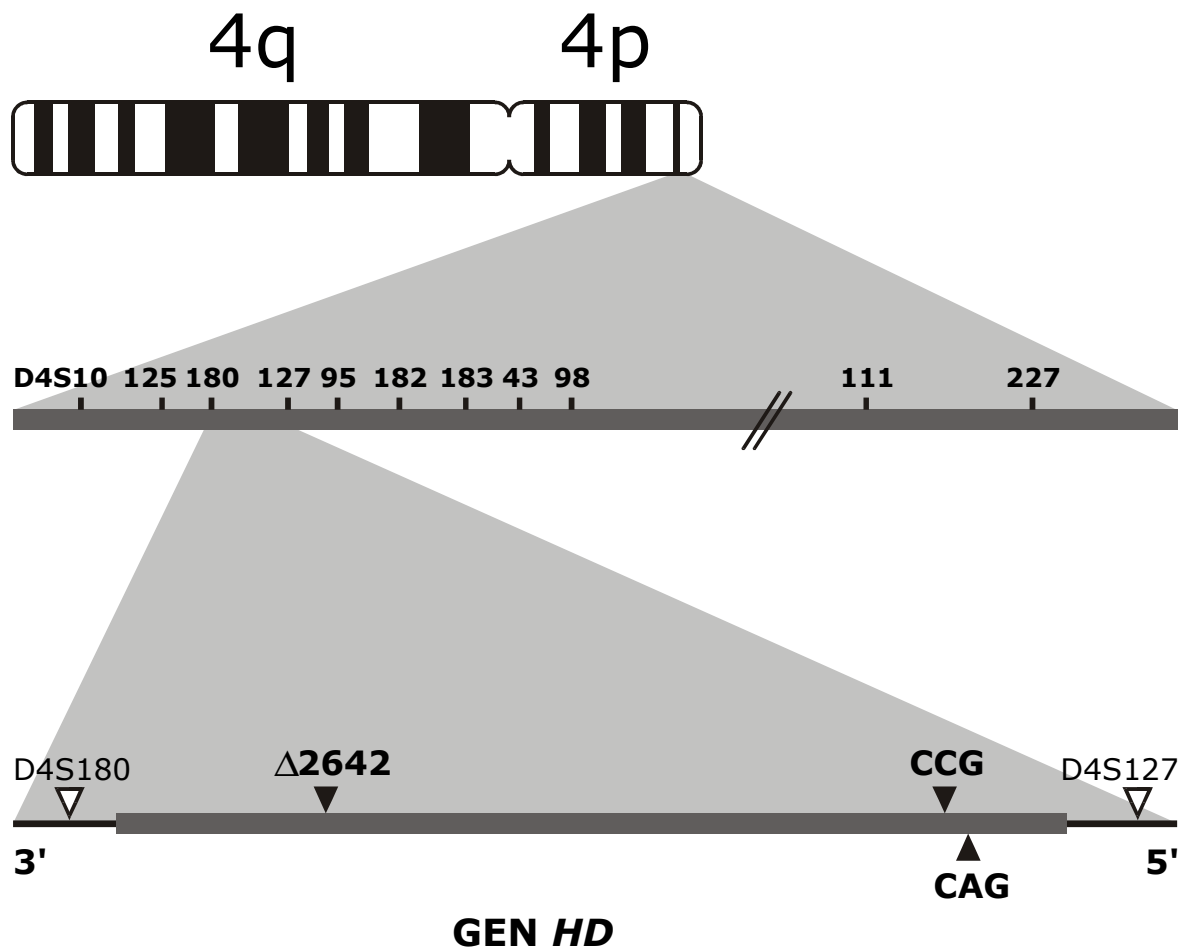
1.1 Klinička slika Huntingtonove bolesti

Huntingtonova bolest (HD) je nasljedni progresivni neurodegenerativni poremećaj, čiji su karakteristični simptomi koreja, nepravilnosti u kretanjama očiju, psihološki i kognitivni poremećaji te progresivna demencija (11). Simptomi su posljedica gubitka neurona iz pojedinih dijelova mozga. U početku je zahvaćen neostriatum, i to uglavnom nucleus caudatus, putamen i globus pallidus, a u uznapredovaloj fazi bolesti odumiru i neuroni kore velikog mozga, najviše u slojevima III, V i VI, te u manjim razmjerima i sloju IV. Bolest se nasljeđuje prema Mendelovim zakonima kao autosomno dominantno svojstvo. Nasljeđivanje je potpuno dominantno, jer nema nikakve razlike između fenotipa homozigota i heterozigota. Prvi simptomi se najčešće pojavljuju oko četrdesete godine života, nakon čega slijedi period postupnog pogoršavanja simptoma koji traje 10-20 godina i dovodi do smrti. Prvi simptomi se ponekad (oko 6% slučajeva) mogu pojaviti prije 20. godine života. Opaženo je da se u slučajevima pojave simptoma u mladosti alel odgovoran za nastanak bolesti uglavnom nasljeđuje od oca.

1.2 Molekularno-genetička osnova Huntingtonove bolesti

1.2.1 Gen *HD*

Gen čija mutacija uzrokuje Huntingtonovu bolest nalazi se na vrhu kraćeg kraka četvrtog kromosoma (4p16.3). Kada je 1993. bio otkriven označen je kao *IT15*, a današnji naziv je *HD*. Gen *HD* sastoji se od 67 eksona i zauzima 180 kb između biljega D4S127 i D4S180 (slika 1.1); nije homologan niti jednom poznatom genu. U prvom eksonu otvorenog okvira čitanja nalazi se ponavljajući slijed trinukleotida CAG, koji se prepisuje i prevodi, a kodira za niz glutamina (22). U pravilu je predzadnji triplet slijeda CAG promijenjen u CAA. Broj ponavljanja tripleta CAG je u rasponu od 9 do 35 u zdravih osoba, dok je kod oboljelih



Slika 1.1 Položaj slijeda CAG i polimorfizama CCG i $\Delta 2642$ na genu *HD*, te položaj gena *HD* na četvrtom kromosomu (4p16.3).

nađeno 36-121 ponavljanja. Zbog toga je broj ponavljanja slijeda CAG visoko specifičan biljeg za dijagnostiku Huntingtonove bolesti (21).

Opaženo je da se prvi simptomi pojavljuju ranije u osoba s duljim slijedom CAG. Duljina slijeda odgovorna je za oko 50% varijacija. Brojna istraživanja nisu uspjela pokazati vezu između duljine slijeda CAG i vrste simptoma (7).

Prepisivanjem gena *HD* nastaju transkripti veličine 10,3 i 13,6 kb koji se razlikuju u 3' regiji koja se ne prevodi, a nastaju različitom poliadenilacijom. Oba transkripta mogu se naći po cijelom tijelu, iako njihov omjer ovisi o vrsti tkiva. Transkript od 13,6 kb nalazi se pretežno u mozgu.

1.2.2 Polimorfne regije CCG i Δ 2642 u genu *HD*

Kada je kloniran gen *HD* otkrivena su dva genetička polimorfizma u blizini slijeda CAG. Prvi je duljina slijeda tripleta CCG nizvodno od slijeda CAG, a drugi je prisustvo ili odsustvo delecije jednog od četiri uzastopna kodona GAG za glutaminsku kiselinu na pozicijama od 2642 do 2645. Ova delecija se zbog jednostavnosti naziva Δ 2642. Navedeni biljezi su polimorfni i na normalnim kromosomima i na kromosomima oboljelih. Analize haplotipova pokazale su genetičku povezanost mutacije za Huntingtonovu bolest i obje polimorfne regije. Dulji sljedovi CCG češće su vezani uz zdravi gen, a Δ 2642 uz mutirani gen *HD*.

Do sada analizirani sljedovi CCG imaju između 7 i 12 kopija ovog tripleta. Uz zdravi gen najčešće se vežu sljedovi sa 7 (67%) i 10 kopija (30%) tripleta CCG. Kod oboljelih većinom (93%) nalazimo alel sa 7 ponavljanja, dok ostatak gotovo isključivo čini alel s 10 tripleta CCG (4).

Delecija tripleta GAG ($\Delta 2642$) znatno je češća na mutiranom nego na normalnom genu. Iako postojanje delecije ne korelira s vrstom simptoma, pokazalo se da uzrokuje njihovo ranije pojavljivanje (12).

1.2.3 Nasljeđivanje Huntingtonove bolesti

Nekoliko činjenica upućuje na zaključak da Huntingtonovu bolest ne uzrokuje inaktivacija produkta gena HD (2). Osim toga, utvrđeno je da osobe s delecijom dijela četvrtog kromosoma koji sadrži gen *HD* ne pokazuju fenotip koji bi odgovarao Huntingtonovoj bolesti. Kod heterozigota oba se alela prepisuju jednakim intenzitetom. Sve to pokazuje da produljeni poliglutaminski slijed uvjetuje novu ili promijenjenu funkciju mutiranog proteina, što rezultira selektivnim odumiranjem neurona.

Rezultati mnogih istraživanja pokazuju jaku negativnu korelaciju između duljine slijeda CAG i dobi u kojoj se pojavljuju prvi simptomi. Najveća produljenja u pravilu se nalaze u osoba kod kojih se simptomi javljaju u mladosti (3, 8). Sljedovi tripleta CAG s manje od 30 ponavljanja nasljeđuju se stabilno, dok kod alela koji izazivaju bolest dolazi do produljenja slijeda tripleta iz generacije u generaciju. Rezultat toga je javljanje simptoma u sve mlađih osoba i uklanjanje mutiranog alela iz zalihe gena. Budući da učestalost mutiranih alela ostaje stalna, smatra se da je gubitak tih alela zbog rane pojave bolesti uravnotežen novim mutacijama (5).

Do podataka o novim mutacijama dolazi se analizom obitelji u kojima se one pojavljuju. Nove mutacije nastaju uglavnom od normalnih alela s 30 i više tripleta CAG. Aleli s ovim rasponom tripleta mogu se nasljeđivati stabilno, ali se mogu i značajno povećati prijelazom iz generacije u generaciju, čime nastaje alel odgovoran za Huntingtonovu bolest. Ovakvo produljenje tripleta često je kod alela naslijeđenog od oca, što je u skladu s opažanjem da su

velika produljenja, koja rezultiraju pojavom simptoma u mladosti, u pravilu porijeklom od očevog alela.

1.2.4 Nove mutacije i mehanizam produljenja slijeda CAG

Prije identifikacije gena *HD* smatralo se da je stopa nastanka novih mutacija vrlo niska. Ova činjenica, kao i zemljopisna rasprostranjenost Huntingtonove bolesti, upućivali su na malen broj početnih mutacija koje su se kasnije proširile u populaciji. Analize biljega u blizini gena *HD* otkrile su haplotipove koji su potvrđivali hipotezu o samo nekoliko izvora mutacije gena *HD*. Obitelji s novim mutacijama su, naprotiv, navele na zaključak da novi aleli, s produljenjem tripleta u rasponu koji dovodi do bolesti, nastaju stalno i utječu na zalihu gena. Naizgled kontradiktorni podaci nametnuli su pitanje kako je moguće da postoje specifični haplotipovi ako stalno nastaju nove mutacije. Najvjerojatnije objašnjenje je da su neki kromosomi skloniji produljenju nego drugi, čime se može objasniti poveznost određenih haplotipova s mutiranim alelima (19).

Analiza kromosoma *HD* je pokazala da su dva haplotipa, s obzirom na biljege u neposrednoj blizini gena *HD*, najzastupljenija na normalnim kromosomima s velikim brojem ponavljanja tripleta CAG (1, 20). Takvi su normalni kromosomi često nestabilni i na njima dolazi do produljenja u granične alele *HD*, koji tada vrlo brzo prelaze u punu mutaciju. Dakle, postojanje malog broja haplotipova s mutacijom *HD* nije dokaz postojanja samo nekoliko njezinih izvora, nego pokazuje da su određeni kromosomi posebno podložni produljenju tripleta CAG, zbog čega ih pretežno nalazimo kod oboljelih.

Stabilnost slijeda CAG ovisi o njegovoj duljini, pri čemu veća duljina uvjetuje manju stabilnost. Osim toga, pokazano je da polimorfizmi CCG i $\Delta 2642$ neovisno utječu na stabilnost slijeda CAG. Mehanizam njihovog djelovanja je najvjerojatnije fizikalni utjecaj na strukturu DNA ili ometanje replikacije stvaranjem sekundarnih struktura, što rezultira

zaustavljanjem enzima na slijedu CAG te produljenjem slijeda tripleta. Opisan je model osnovan na strukturi DNA, koji bi mogao objasniti mnoge aspekte mehanizma produljenja. Slijed trinukleotida CAG može stvoriti stabilnu ukosnicu. Upravo sposobnost slijeda da stvori ukosnicu veće stabilnosti od kritične (-48,0 kcal/mol) dovodi do produljenja tripleta u raspon koji izaziva bolest. Samo određeni sljedovi mogu stvoriti ukosnicu kritične stabilnosti, a posebno je važno da se takve strukture sastoje od regija CAG i CCG gena *HD*. Istraživanja su pokazala (10) da dvije nezavisne točkaste mutacije u ovim regijama, koje mijenjaju energiju stvaranja ukosnice od -48,0 kcal/mol na -53,2 kcal/mol, povećavaju vjerojatnost velikog produljenja od krajnje nevjerojatnog događaja do oko 5% vjerojatnosti. Sljedovi CAG koji nisu prekinuti tripletima CAA i CCA pokazuju veću sklonost produljenju. Mutacije koje uklanjaju te triplete omogućavaju lakše stvaranje ukosnice (slika 1.2). Duljina neprekinutog slijeda CAG određuje energiju stvaranja sekundarne strukture ukosnice, o čemu ovisi vjerojatnost produljenja.

1.2.5 Protein huntingtin

Povećan broj tripleta CAG u genu *HD* rezultira stvaranjem produljenog proteina huntingtina s povećanom poliglutaminskom regijom. Ovaj protein, nepoznate funkcije, nalazi se u mnogim tipovima stanica i to ne samo u živčanom sustavu. Do sada nije utvrđena povezanost razmjera odumiranja neurona i količine mutiranog huntingtina.

U mozgu oboljelih pronađene su unutarstanične uklopine huntingtina i ubikvitina smještene u neuronima striatuma i kore velikog mozga, ali ne i u moždanom deblu, talamusu i leđnoj moždini. Ovakav raspored huntingtina nađen je i u transgeničnih miševa s produljenim slijedom CAG (16). Regije u kojima dolazi do gubitka neurona podudaraju se sa mjestima stvaranja uklopina, što pokazuje da one na neki način mogu uzrokovati smrt stanice (13).

Razgradnja mnogih proteina u stanici uključuje njihovu konjugaciju s ubikvitinom i enzimsku razgradnju do aminokiselina u proteasomu. Smatra se da uklopine u jezgri nastaju zbog poremećene razgradnje produljenog huntingtina, pri čemu dolazi do transporta huntingtina, ubikvitina i dijelova proteasoma u jezgru (slika 1.3). Iako veza između stvaranja uklopina i smrti stanice nije poznata, sigurno je da neuroni umiru apoptozom (18).

Raspodjela normalnog i mutiranog huntingtina je jednaka kroz cijeli živčani sustav, i nije ograničena samo na neurone zahvaćene bolešću. Ova činjenica ide u prilog hipotezi prema kojoj sam produljeni huntingtin nije dovoljan da izazove smrt neurona. Druga istraživanja su pokazala slabiju ekspresiju huntingtina u neuronima srednje veličine koje bolest najviše pogađa, dok su u istim dijelovima mozga veliki neuroni ostali pošteđeni i pokazivali normalnu ekspresiju huntingtina.

Kod miševa transgeničnih za 5' kraj gena *HD* čovjeka, koji sadrži 115 – 150 jedinica CAG, opažen je neurološki fenotip koji odgovara Huntingtonovoj bolesti kod ljudi, a uključuje koreju, stereotipne pokrete, tremor i napade epilepsije. U mozgu ovih životinja pronađene su izrazite unutarstanične uklopine huntingtina i ubikvitina, koje se pojavljuju prije nastanka neurološkog fenotipa. Ovakve uklopine nalaze se u većini neurona striatuma, ali ne i u kolinergičnim interneuronima, što odgovara uzorku odumiranja stanica kod Huntingtonove bolesti.

Protein HAP-1 (*od engl. huntingtin-associated protein*) pronađen je kod čovjeka i štakora. Slabo se veže na normalni, a znatno jače za mutirani huntingtin. Za razliku od huntingtina čija ekspresija je neselektivna s obzirom na vrstu tkiva, HAP-1 se eksprimira selektivno i to najjače u područjima nucleus caudatus i kore velikog mozga. Međudjelovanjem huntingtina i proteina HAP-1 mogao bi se objasniti raspored odumiranja neurona kod Huntingtonove bolesti.

Nekoliko je različitih neurodegenerativnih bolesti, čiji simptomi se javljaju u odrasloj dobi, uzrokovano produljenjem slijeda CAG u kodirajućoj regiji gena. Kod svih takvih bolesti sličan je i raspon broja ponavljanja tripleta; zdrave osobe imaju ih manje od 30, dok kod oboljelih obično nalazimo 40 i više ponavljanja. Zbog toga se smatra da je poliglutaminska regija koja nastaje prevođenjem slijeda CAG odgovorna za međudjelovanje s ostalim proteinima. Istraživanja su pokazala (9) da se normalni huntingtin poliglutaminskom regijom, koja na razini tercijarne strukture proteina tvori jasno određenu domenu, veže na enzim gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH). Sintetski poliglutaminski peptidi također se vežu na ovaj enzim. Upravo bi međudjelovanje huntingtina s GAPDH moglo objasniti neurodegenerativne procese. Enzim GAPDH ima važnu ulogu u glikolizi, a poremećaji u energetsom metabolizmu često se spominju kao vjerojatni uzrok odumiranja neurona kod Huntingtonove bolesti (6, 17). Mutirani i normalni huntingtin se različito vežu s GAPDH, što može utjecati na njegove enzimske funkcije. Osim toga, veći poliglutaminski sljedovi imaju jači učinak na međudjelovanja, čime se može objasniti ranije pojavljivanje prvih simptoma kod osoba s većim produljenjem slijeda CAG.

Međudjelovanjem s GAPDH može se objasniti i preuzimanje nove funkcije mutiranog huntingtina, koje ima za posljedicu dominantan način nasljeđivanja Huntingtonove bolesti.

1.3 Populacijska genetika Huntingtonove bolesti

Epidemiološka istraživanja Huntingtonove bolesti pokazala su znatne razlike učestalosti između populacija. U većini zapadnoeuropskih zemalja te u SAD i Kanadi Huntingtonova bolest pogađa 5-10 osoba na 100000, dok je oboljelih znatno manje među afričkim crncima te u Kini, Japanu i Finskoj. Detaljnija genetička istraživanja biljega unutar i oko gena *HD* upućuju na mogućnost da su za bolest, osim duljine slijeda CAG, odgovorni i različiti drugi čimbenici.

Analiza slijeda CCG i delecije tripleta GAG na poziciji 2642 u genu *HD* pokazala je značajnu razliku u učestalosti ovih polimorfizama kod populacija različitog porijekla. Za razliku od populacija zapadne Europe gdje na normalnim kromosomima prevladavaju aleli CCG sa 7 ponavljanja, kod populacija Azije i Afrike nalazimo veću učestalost alela CCG s 10 ponavljanja. Osim toga, analiza raspodjele veličine slijeda CAG pokazala je da su normalni aleli sa 7 tripleta CCG češći na kromosomima s duljim sljedovima CAG (>20), dok je alel s 10 tripleta prevladavao u kombinaciji s manjim (≤ 20) slijedom CAG. Delecija tripleta GAG na poziciji 2642 (alel B) pronađena je na 10,3% kontrolnih kromosoma zapadnoeuropskog porijekla, dok je nije bilo na kromosomima porijeklom iz populacija Kine, Japana i Afrike. I normalni kromosomi s alelom B povezani su s dužim sljedovima CAG, što upućuje na zaključak da su alel CCG sa 7 ponavljanja i delecija kodona GAG na poziciji 2642 čimbenici odgovorni za evoluciju HD-mutacije.

Ovi podaci podržavaju model postepenog razvoja mutacije koja dovodi do Huntingtonove bolesti, od normalnih kromosoma sa specifičnim haplotipom i većim brojem tripleta CAG. Analize polimorfizma $\Delta 2642$ također su pokazale da je delecija zastupljenija na HD-kromosomima nego na normalnim, te da utječe na raniju pojavu prvih simptoma.

1.4. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je predočiti prve podatke o genetičkom porijeklu Huntingtonove bolesti u populaciji Hrvatske. U tu svrhu analizirani su polimorfizmi CCG i $\Delta 2642$ u zdravih osoba i oboljelih. Odabrane regije gena *HD* umnožene su lančanom reakcijom polimeraze, nakon čega su aleli utvrđeni elektroforezom u gelu poliakrilamida. Dobiveni rezultati mogli bi pomoći ispravnijoj procjeni udjela oboljelih u populaciji, a također i pridonijeti razumijevanju mehanizma nastanka mutacije gena *HD*.

2. Materijali i metode

2.1 Ispitanici

Za istraživanje je, na osnovi prethodno utvrđene mutacije produljenja slijeda CAG u genu *HD*, odabrano 37 nesrodnih osoba s Huntingtonovom bolesti. U analizu je uključeno i 85 zdravih nesrodnih osoba kojima je prethodno utvrđen normalni status gena *HD* na oba kromosoma.

2.2 Materijali

¹ pufer RCLB (Red Cell Lysis Buffer):

10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM NaCl (Kemika, Zagreb), pH 7,6; steriliziran autoklaviranjem i čuvan na +4°C

² pufer SE:

75 mM NaCl, 25 mM Na₂EDTA (Kemika, Zagreb), pH 8,0; steriliziran autoklaviranjem

³ SDS (natrijev laurilsulfat, Sigma, SAD):

izvorna otopina je 20%-tni SDS

⁴ proteinaza K, 20 mg/ml (Boehringer Mannheim, Njemačka), čuvana na -20°C

⁵ NaCl 5M (Kemika, Zagreb), steriliziran autoklaviranjem

⁶ 2-propanol (Kemika, Zagreb)

⁷ etanol (Kemika, Zagreb)

⁸ TE pufer:

10 mM Tris-HCl, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 8,0

⁹ agaroz (Type I-A, Low EQ, Sigma, SAD)

¹⁰ etidij bromid, 1 µg/ml (Sigma, SAD)

¹¹ dNTP 2,5 mM čini smjesa:

100 mM dATP, 100 mM dGTP, 100 mM dTTP i 100 mM dCTP (Boehringer Mannheim, Njemačka)

¹² pufer PCR 10X (Perkin Elmer, SAD):

100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3

¹³ MgCl₂ 25 mM (Perkin Elmer, SAD)

¹⁴ glicerol, redestiliran (Kemika, Zagreb)

¹⁵ *AmpliTaq* polimeraza 5 U/μl (Perkin Elmer, SAD)

¹⁶ *N,N'*-metilenbisakrilamid, akrilamid, visoko pročišćeni (Serva, Njemačka)

¹⁷ TBE pufer (5X):

0,45 M Tris-borat (tris i borna kiselina), 0,01 M Na₂EDTA (Kemika, Zagreb), pH~8,3

¹⁸ amonij persulfat (Kemika, Zagreb)

¹⁹ TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametilenpersulfat, Sigma, SAD)

²⁰ pufer za nanošenje na gel (6X):

30% glicerola (redestiliran, Kemika, Zagreb), 0,25% bromfenol plavo, 0,25%

ksilencijanolo FF (Bio-Rad Laboratories, SAD), čuvan na +4°C.

²¹ HNO₃, AgNO₃, Na₂CO₃ (Kemika, Zagreb)

²² formalin 37% (Sigma, SAD)

²³ octena kiselina (Kemika, Zagreb)

²⁴ *Expand Long Template* PCR kit (Boehringer Mannheim, Njemačka) sadrži:

Expand Long smjesa enzima *Taq* i *Pwo* polimeraze (3,5 U/μl)

Pufer 1 (10X): 500 mM Tris-HCl, 160 mM (NH₄)₂SO₄, 17,5 mM MgCl₂, pH 9,2

2.3 Metode

2.3.1 Izolacija genomske DNA iz leukocita periferne krvi

Genomska DNA izolirana je iz uzoraka krvi volumena 5-10 ml. Krv je sakupljena u epruveti s antikoagulansom EDTA te odmah korištena za izolaciju DNA ili pohranjena na -20°C .

Za izolaciju DNA iz krvi korištena je metoda Millera i suradnika (14), za koju je značajno da se taloženje proteina postiže isoljavanjem.

Uzorku krvi dodan je trostruki volumen pufera RCLB¹ za lizu eritrocita. Smjesa je ostavljena na ledu 15 minuta uz povremeno miješanje. Zatim je uzorak centrifugiran 10 minuta na 800 g pri temperaturi 4°C (Eppendorf centrifuga 5403). Dobiveni talog leukocita ispran je u puferu RCLB i ponovo centrifugiran. Ispiranje i centrifugiranje je ponavljano sve dok talog nije postao blijedožute boje, odnosno potpuno ispran od eritrocita. Isprani talog je resuspendiran u puferu SE², nakon čega je dodana otopina SDS³ do 1% i proteinaza K⁴ do konačne koncentracije od 0,1 mg/ml. Smjesa je inkubirana u vodenoj kupelji na 37°C preko noći.

Nakon inkubacije proteini i ostaci stanica uklonjeni su isoljavanjem, koje je provedeno dodavanjem 1/3 volumena 5 M NaCl⁵ na jedan volumen suspenzije, snažnim miješanjem i centrifugiranjem 15 minuta na 800 g pri sobnoj temperaturi (Eppendorf centrifuga 5403). Ako supernatant nije bio bistar centrifugiranje je ponovljeno. Supernatantu je nakon toga dodan jednak volumen hladnog 2-propanola⁶. Blagim okretanjem epruvete istaložena je DNA i zatim isprana u 70%-tnom etanolu⁷. Isprana DNA je otopljena u puferu TE⁸ na sobnoj temperaturi i pohranjena na $+4^{\circ}\text{C}$.

Koncentracija otopine DNA određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na 260 nm (A_{260} iznosi 1 pri koncentraciji DNA od 50 $\mu\text{g/ml}$). Čistoća otopine DNA s

obzirom na zaostale proteine provjerena je iz omjera vrijednosti apsorbancija na 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280} treba biti u rasponu 1.7-2.0). Kvaliteta izolirane genomske DNA dodatno je ispitana elektroforezom 1 μ g DNA u 1%-tnom gelu agaroze⁹ koji je sadržavao etidij bromid¹⁰ (slika 2.1).

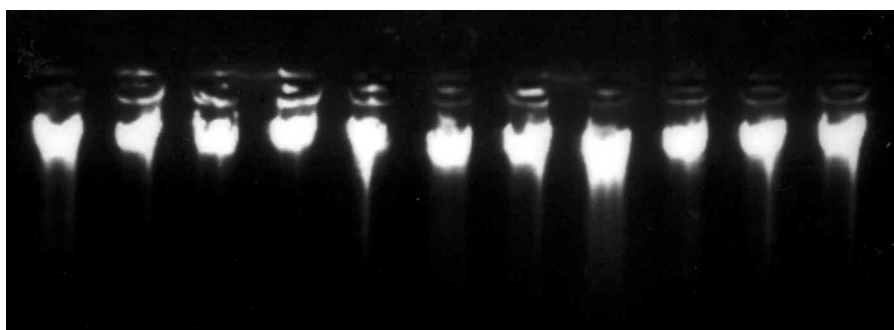
2.3.2 Lančana reakcija polimeraze za ispitivanje polimorfizma slijeda CCG u genu *HD*

Regija gena *HD* s polimorfizmom slijeda CCG umnožena je lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Korišten je *Expand Long*²⁵ sistem koji sadrži smjesu *Taq* i *Pwo* DNA polimeraze. Ova kombinacija enzima se pokazala posebno pogodnom za umnažanje regija bogatih CG-nukleotidima. Oligonukleotidne početnice bile su HD419X i HD482X (4).

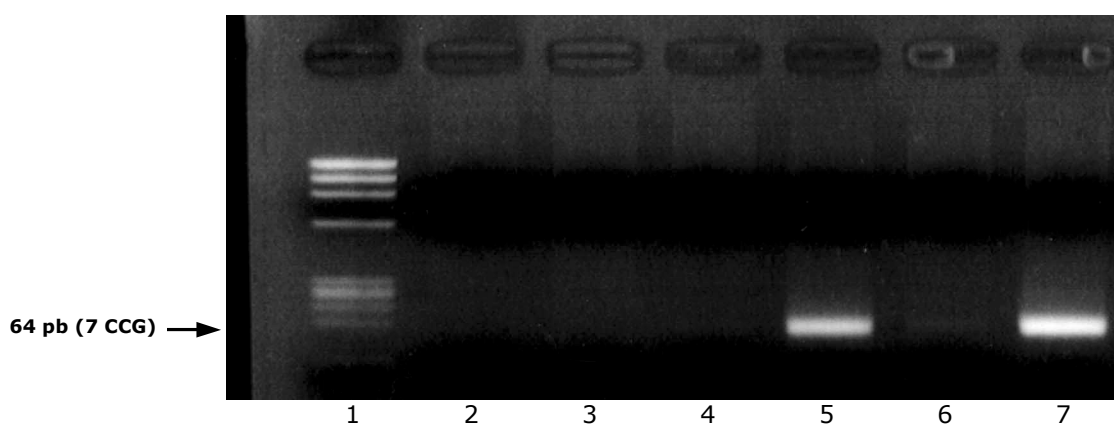
Reakcijska smjesa ukupnog volumena 15 μ l sadržavala je: 100 ng genomske DNA, 350 μ M svake oligonukleotidne početnice, 200 μ M svakog dNTP¹¹, *Expand Long Buffer I*²⁵, 5% glicerola¹⁴ i 0,35 U *Expand Long* polimeraze²⁵. Ovakva reakcijska smjesa se pokazala optimalnom (slika 2.2).

Enzim je dodan tek nakon početne denaturacije na 98°C u trajanju od 10 minuta, čime je postignuto odvajanje lanaca vrlo stabilne CG-nukleotidima bogate regije. Slijedilo je 35 ciklusa koji su se sastojali od 35 sekundi denaturacije pri 98°C te 1 minute sparivanja početnica i produljivanja pri 70°C. Posljednje produljivanje trajalo je 7 minuta na 72°C. Reakcije su provedene u aparatu Perkin Elmer GeneAmp 2400.

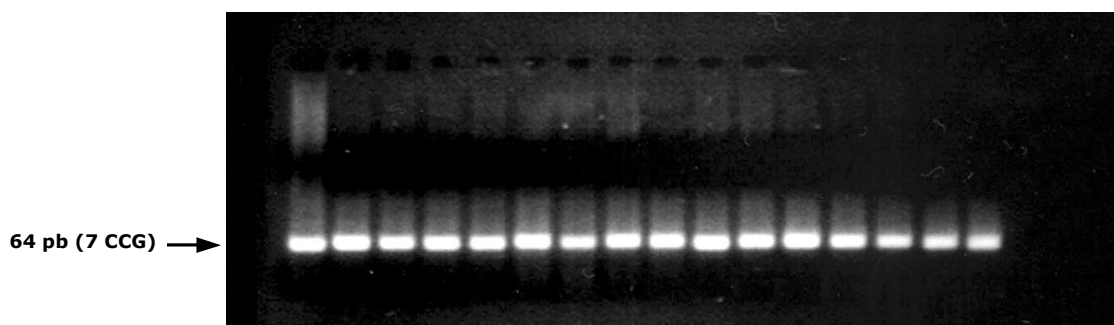
Uspješnost umnažanja provjerena je elektroforezom produkta u 2%-tnom gelu agaroze⁹ dimenzija 8 x 12 cm koji je sadržavao etidij bromid¹⁰ (slika 2.3). Korišteno je električno polje jakosti 10 V/cm. Produkt reakcije vizualiziran je UV transiluminatorom (Pharmacia) uz pobudnu svjetlost valne duljine 320 nm.



Slika 2.1 Provjera kvalitete izolirane genomske DNA. Elektroforeza 1 μ g DNA u 1% gelu agaroze. DNA pokazuje kompaktan signal, što znači da je zadovoljavajuće kvalitete.



Slika 2.2 Odabir optimalne reakcijske smjese za umnažanje polimorfizma CCG u genu *HD* lančanom reakcijom polimeraze. Linije predstavljaju: 1. biljeg (Φ X174 DNA – *Hae* III); 2. reakcijska smjesa bez dodataka, *Taq* polimeraza; 3. u reakcijsku smjesu dodano 10% DMSO, *Taq* polimeraza; 4. dodano 5% glicerola, *Taq* polimeraza; 5. bez dodataka, *Expand Long* polimeraza; 6. dodano 10% DMSO, *Expand Long* polimeraza; 7. dodano 5% glicerola, *Expand Long* polimeraza. Optimalnom se pokazala smjesa s 5% glicerola i *Expand Long* polimerazom (linija 7).



Slika 2.3 Provjera uspješnosti lančane reakcije polimeraze za polimorfizam CCG elektroforezom produkta u 2%-tnom gelu agaroze. Prisutnost vrpce s očekivanim produktom od 64 pb pokazuje uspješnost umnažanja.

2.3.3 Lančana reakcija polimeraze za ispitivanje polimorfizma $\Delta 2642$ u genu *HD*

Za utvrđivanje genotipa polimorfizma $\Delta 2642$ lančanom reakcijom polimeraze kao početnice su upotrijebljeni oligonukleotidi $\Delta 2642-1$ (*sense*) i $\Delta 2642-2$ (*antisense*) (12). Očekivani produkt je bio odsječak gena *HD* duljine 112 ili 109 parova baza, ovisno o postojanju delecije.

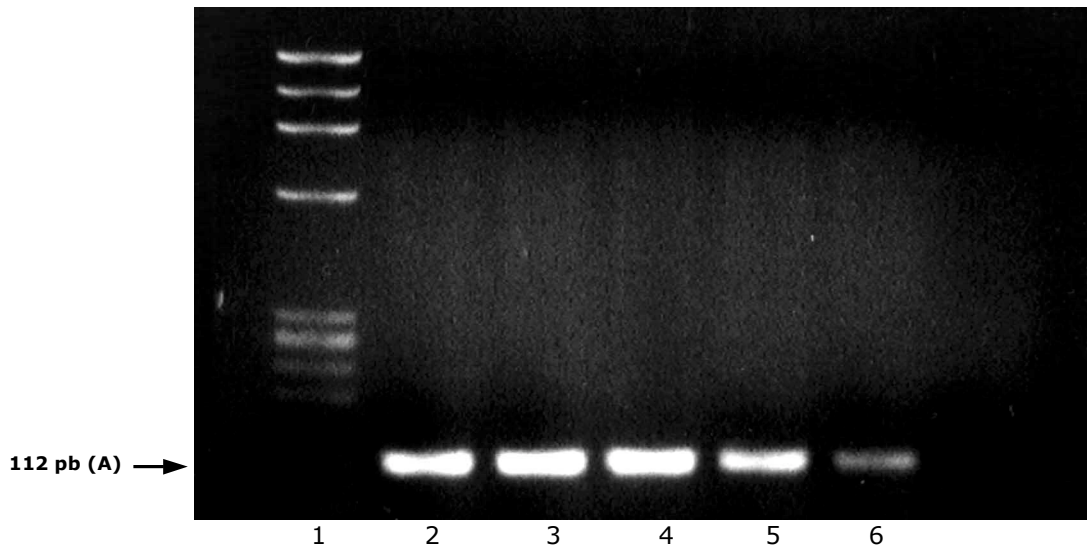
Za pripremu optimalne (slika 2.4) reakcijske smjese, volumena 20 μ l, korišteno je: 200 ng genomske DNA, 300 nM svake oligonukleotidne početnice, 200 μ M svakog dNTP¹¹, PCR pufer¹², 1,5 mM MgCl₂¹³, 5% glicerola¹⁴ i 0,5 U *AmpliTaq* polimeraze¹⁵.

Uvjeti reakcije bili su: 5 minuta predenaturacija na 95°C, zatim 35 ciklusa umnažanja koji su se sastojali od 30 sekundi denaturacije na 95°C, 30 sekundi sparivanja početnica pri 61°C i 30 sekundi produljivanja na 72°C. Posljednje produljivanje trajalo je 7 minuta na 72°C. Reakcije su provedene u aparatu Perkin Elmer GeneAmp 2400.

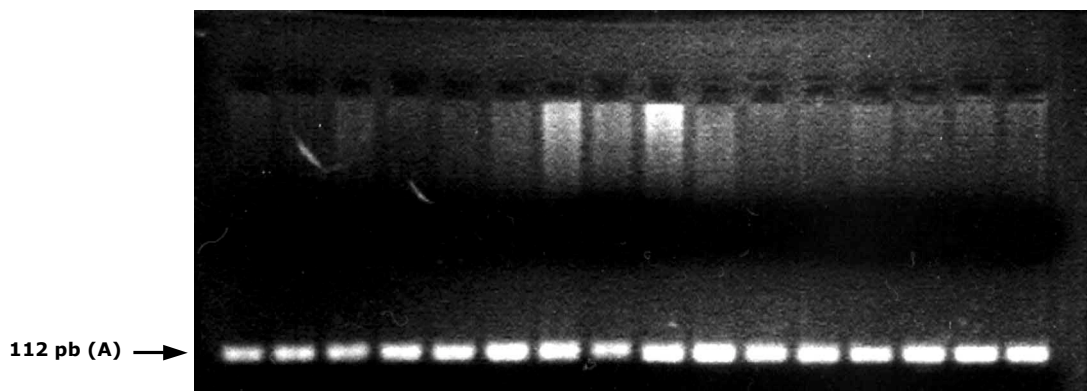
Uspješnost umnažanja provjerena je elektroforezom u 2%-tnom gelu agaroze⁹ (8 x 12 cm) koji je sadržavao etidij bromid¹⁰ (slika 2.5), pri jakosti električnog polja od 10 V/cm. Vrpce DNA vizualizirane su pomoću UV transiluminatora (320 nm, Pharmacia).

2.3.4 Nativna elektroforeza u gelu poliakrilamida

Za razlikovanje alela umnoženih lančanom reakcijom polimeraze korištena je nativna gel elektroforeza. Za ispitivanje polimorfizma CCG korišten je 10%-tni gel poliakrilamida, dok je za polimorfizam $\Delta 2642$ korišten 10%-tni gel. Dimenzije gela su u oba slučaja bile 35 x 40 cm. Koncentracije poliakrilamida su odabrane za optimalno razlučivanje očekivanih produkata lančane reakcije polimeraze. Za pripremu 10%-tnog gela napravljena je smjesa od 50 ml otopine 30% akrilamida:bisakrilamida¹⁶ (29:1), 30 ml 5xTBE¹⁷ pufera i 70 ml



Slika 2.4 Odabir optimalne reakcijske smjese za umnažanje polimorfizma $\Delta 2642$ u genu *HD* lančanom reakcijom polimeraze. Linije predstavljaju: 1. biljeg ($\Phi X174$ DNA – *Hae* III); 2. reakcijska smjesa u koju je dodano 10% glicerola; 3. dodano 5% glicerola; 4. dodano 5% DMSO; 5. dodano 10% DMSO; 6. reakcijska smjesa bez dodataka. Optimalnom se pokazala reakcijska smjesa s 5% glicerola (linija 3).



Slika 2.5 Provjera uspješnosti lančane reakcije polimeraze za polimorfizam $\Delta 2642$ elektroforezom produkta u 2%-tnom gelu agaroze. Prisutnost vrpce s očekivanim produktom od 112 pb pokazuje uspješnost umnažanja.

destilirane vode. Za 12%-tni gel smjesa je sadržavala 60 ml otopine 30% akrilamida:bisakrilamida¹⁶ (29:1), 30 ml 5xTBE¹⁷ pufera i 60 ml destilirane vode. Polimerizacija je započeta dodatkom 1 ml 10%-tne otopine amonijevog persulfata (APS)¹⁸ i 50 μ l otopine TEMED¹⁹-a.

Na gel je nanoseno po 6-8 μ l produkta lančane reakcije polimeraze pomiješanog s puferom za nanošenje na gel²⁰. Elektroforeza je trajala ~18h na 400 V u aparatu za vertikalnu elektroforezu (Pharmacia) uz pufer TBE¹⁷. Vrpce DNA vizualizirane su bojanjem gela srebrom.

2.3.5 Bojanje gela poliakrilamida srebrom

Nakon završetka elektroforeze gel je fiksiran inkubacijom u 10%-tnom etanolu⁷ 5 minuta uz povremeno protresanje. Zatim je gel stavljen u 1%-tnu HNO₃²¹ 3-5 minuta nakon čega je dobro (barem dva puta) ispran destiliranom vodom. Nakon toga gel je inkubiran u otopini 12 mM AgNO₃²¹ 25-30 minuta uz povremeno protresanje i dobro ispran destiliranom vodom.

Tako obrađenom gelu dodana je otopina za razvijanje, koja se sastoji od 0,28 M Na₂CO₃²¹ i 0,02% formalina²². Djelovanjem otopine na gel pojavljuju se smeđe vrpce DNA na koju se vezalo srebro. Brzina razvijanja raste s temperaturom razvijaača, koji se obično koristi hladan. Kada je postignut zadovoljavajući intenzitet obojenja, razvijanje se prekida dodavanjem 10%-tne octene kiseline²³. Obojani gel se može konzervirati otopinom koja sadrži 10% octene kiseline²³ i 10% glicerola¹⁴.

2.4 Statistička obrada podataka

Povezanost polimorfnih biljega s mutacijom HD ispitana je χ^2 testom (prema potrebi su korišteni Yatesovi ispravci). Usporedba grupa s obzirom na srednju veličinu slijeda CAG na normalnim kromosomima provedena je jednosmjernom analizom varijance s *posthoc* testiranjem prema Turkeyu. Podaci su obrađeni programom SPSS for Windows, verzija 8.00 (Chicago, SPSS Inc, 1997).

3. Rezultati

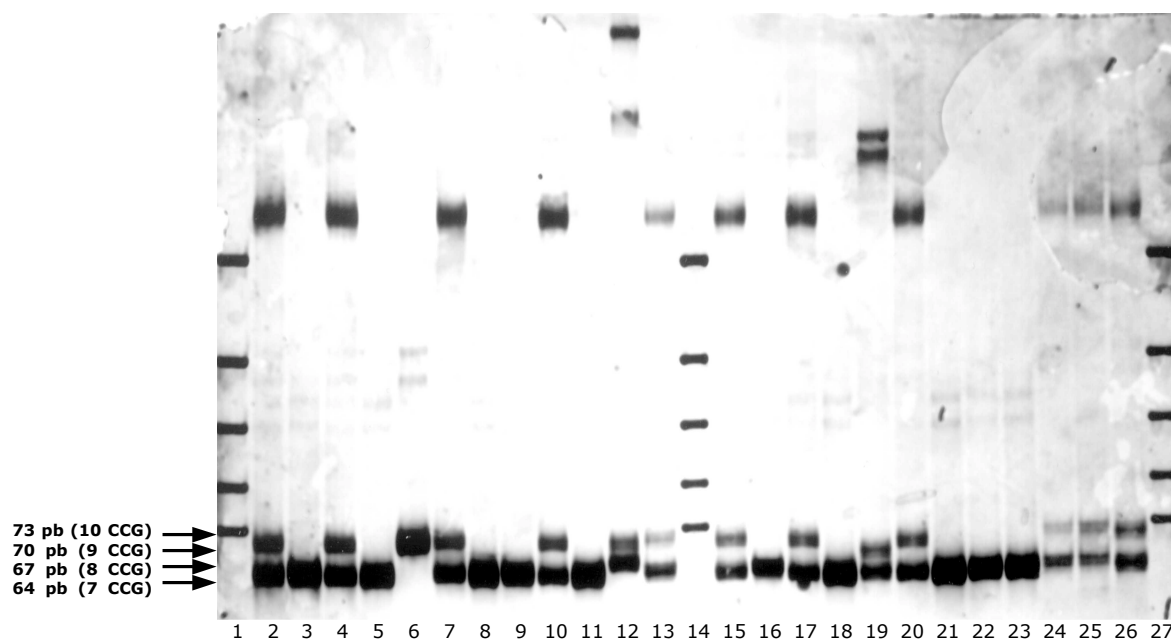
3.1 Ispitivanje učestalosti polimorfnog biljega CCG

Polimorfizam CCG je analiziran kod 37 nesrodnih oboljelih i 85 zdravih osoba (tablica 3.1). Alel ovog polimorfizma određen je prema rezultatima elektroforeze produkta lančane reakcije polimeraze u 10%-tnom gelu poliakrilamida, usporedbom s produktima poznate veličine (slika 3.1). Među 170 normalnih kromosoma pronađena su četiri alela CCG. Najzastupljeniji je bio alel sa 7 ponavljanja ovog tripleta (66,5%), a potom alel s 10 ponavljanja (25,3%). Slijedili su aleli sa 8 i 9 ponavljanja (4,7% i 3,5%). Utvrđena je heterozigotnost 0,42. U istraživanoj populaciji nisu pronađeni aleli CCG sa 11 i 12 tripleta.

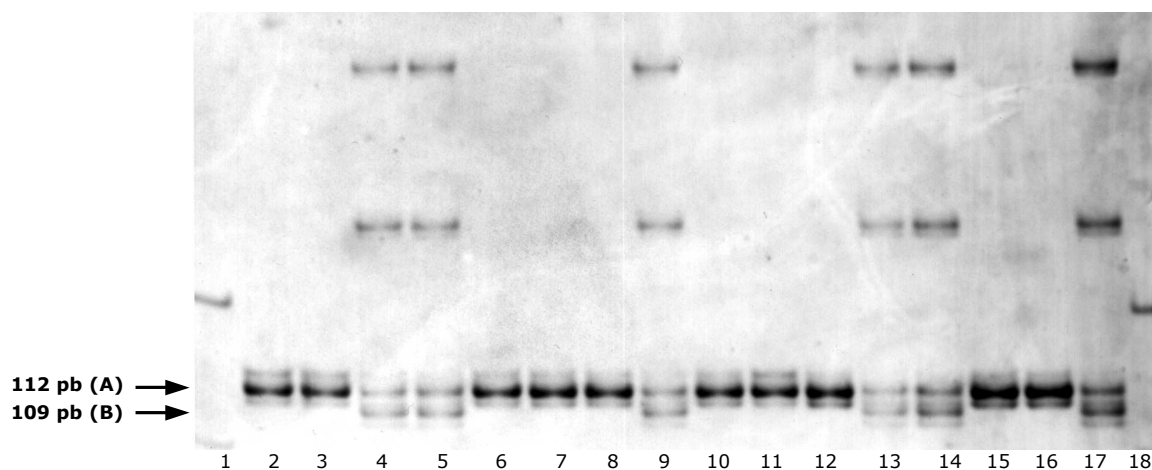
Na 37 kromosoma oboljelih pronađena su samo dva alela: sa 7 (94,6%) i 10 (5,4%) ponavljanja tripleta CCG. Ovakvi rezultati upućuju na porijeklo HD-kromosoma od alela sa 7 tripleta CCG.

3.2 Raspodjela alela CCG s obzirom na broj tripleta CAG u genu *HD* kod zdravih osoba

Ispitano je 170 nesrodnih normalnih kromosoma za koje su već bile utvrđene duljine regije CAG. Opažena je značajna razlika u raspodjeli veličine slijeda CAG između alela sa 7 i 10 tripleta CCG. Uz normalne alele sa 7 tripleta CCG pronađen je puni raspon veličina slijeda CAG (između 10 i 34 tripleta), dok je taj broj kod alela sa 10 jedinica CCG bio ≤ 20 (između 9 i 20). Srednja vrijednost veličine slijeda CAG značajno se razlikovala između ove dvije grupe (tablica 3.1). Alel sa 7 tripleta CCG nalazio se uz CAG-sljedove srednje duljine od $19,1 \pm 3,9$, dok je duljina za normalne kromosome s 10 tripleta CCG bila manja i iznosila $17,0 \pm 1,8$. Ovi podaci pokazuju da je alel 7 povezan s duljim sljedovima CAG na normalnim kromosomima, dok je alel 10 bio ograničen na manji broj ponavljanja CAG (≤ 20).



Slika 3.1 Utvrđivanje genotipa za polimorfizam CCG elektroforezom produkta lančane reakcije polimeraze u 10%-tnom gelu poliakrilamida. Linije 1, 14, 27: biljeg (pBR322 DNA – *Hae* III); linije 3, 5, 8, 9, 11, 16, 18, 21, 22, 23: genotip CCG 7/7; linije 2, 4, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 24, 25, 26: genotip CCG 7/10; linija 12: genotip CCG 8/9; linija 19: genotip CCG 7/9; linija 6: genotip CCG 10/10. Iznad vrpce heterozigota uočavaju se vrpce koje odgovaraju nastalim heterodupleksima.



Slika 3.2 Utvrđivanje genotipa za polimorfizam $\Delta 2642$ elektroforezom produkta lančane reakcije polimeraze u 12%-tnom gelu poliakrilamida. Linije 1, 18: biljeg (pBR322 DNA – *Hae* III); linije 2, 3, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 16: genotip A/A; linije 4, 5, 9, 13, 14, 17: genotip A/B. Iznad vrpce heterozigota uočavaju se vrpce koje odgovaraju nastalim heterodupleksima.

3.3 Ispitivanje učestalosti polimorfnog biljega $\Delta 2642$

Učestalost alela za polimorfizam glutaminske kiseline $\Delta 2642$ ispitana je za 170 kromosoma zdravih osoba i 37 kromosoma s mutiranim genom *HD* nesrodnih oboljelih osoba (tablica 3.2). Alel za ovaj polimorfizam utvrđen je elektroforezom produkta lančane reakcije polimeraze u 12%-tnom gelu poliakrilamida, usporedbom s produktima PCR poznate veličine (slika 3.2). Delecija kodona GAG (alel B) pronađena je u 17 (10%) kontrolnih kromosoma. Ovaj alel je znatno češći na kromosomima s mutiranim genom *HD* (40,5% ili 15/37; $p < 0,000003$; $\chi^2 = 21,69$). Od 15 osoba s Huntingtonovom bolesti dvije su bile homozigoti za alel B. Nije pronađena značajna razlika u porijeklu kromosoma oboljelih s obzirom na alel B između populacija Hrvatske i Zapadne Europe ($p < 0,46$; $\chi^2 = 0,54$, tablica 3.2).

3.4 Raspodjela alela $\Delta 2642$ s obzirom na broj tripleta CAG u genu *HD* kod zdravih osoba

Raspodjela veličine slijeda CAG između alela s $\Delta 2642$ polimorfizmom utvrđena je na 170 kromosoma nesrodnih zdravih osoba: na 153 kromosoma utvrđen je alel A, a na 17 alel B. Opažene su značajne razlike u raspodjeli veličine slijeda CAG na kromosomima s alelom A u odnosu na one s alelom B.

Na ukupno 88,2% (15/17) kromosoma s alelom B nađeno je 20 ili više tripleta CAG. Kromosomi s alelom A su većinom (88,9% ili 136/153) imali slijed CAG s 20 ili manje ponavljanja. Srednja veličina slijeda CAG kromosoma s alelom A bila je $17,9 \pm 3,0$ (medijan 19), za razliku od $23,4 \pm 3,6$ ponavljanja (medijan 24) na kromosomima s alelom B ($t = 6,8$; $p < 0,001$ – tablica 3.2).

Tablica 3.1 Analiza polimorfizma CCG na normalnim (N) i mutiranim (HD) kromosomima.

CCG	Broj N kromosoma (%)		Srednja veličina slijeda CAG		Raspon veličine slijeda CAG	
	Hrvatska	Zap. Europa	Hrvatska	Zap. Europa	Hrvatska	Zap. Europa
7	113 (66,5)	325 (68,0)	19,1±3,9	19,3±3,8	10-34	11-35
8	8 (4,7)	2 (0,4)	18,3±2,5	16,0	17-24	16
9	6 (3,5)	21 (4,4)	17,3±0,8	15,8±3,5	17-19	8-20
10	43 (25,3)	130 (27,2)	17,0±1,8	16,7±2,5	9-20	10-26
Ukupno N	170 (100)	478 (100)	18,5±3,5	18,4±3,7	9-34	8-35
CCG	Broj N kromosoma (%)		Srednja veličina slijeda CAG		Raspon veličine slijeda CAG	
	Hrvatska	Zap. Europa	Hrvatska		Hrvatska	
7	35 (94,6)	168 (94,4)	45,1±5,2		39-66	
10	2 (5,4)	10 (5,6)	44,0±1,4		43-45	
Ukupno HD	37 (100)	178 (100)	45,1±5,0		39-66	

Podaci za populaciju Zapadne Europe preuzeti su iz (1).

Tablica 3.2 Analiza polimorfizma $\Delta 2642$ na normalnim (N) i mutiranim (HD) kromosomima.

$\Delta 2642$	Normalni kromosomi				HD kromosomi			
	n (%)		Srednja veličina slijeda CAG		n (%)		Srednja veličina slijeda CAG	
	Hrvatska	Zap. Europa	Hrvatska	Zap. Europa	Hrvatska	Zap. Europa	Hrvatska	Zap. Europa
A	153 (90)	244 (89,7)	17,9±3,0	17,5±3,2	22 (59,5)	86 (67,7)	44,3±3,4	44,9±4,9
B	17 (10)	28 (10,3)	23,4±3,6	23,4±5,2	15 (40,5)	41 (32,3)	46,2±6,7	44,4±4,5
Ukupno	170 (100)	272 (100)	18,5±3,5		37 (100)	127 (100)	45,1±5,0	

Podaci za populaciju Zapadne Europe preuzeti su iz (1).

Analiza polimorfizma $\Delta 2642$ na 37 kromosoma s mutacijom gena *HD* nesrodnih oboljelih osoba pokazala je sličan broj ponavljanja slijeda CAG kod alela A i B. Srednja duljina slijeda CAG uz alel A bila je $44,3 \pm 3,4$ (medijan 43), slično kao i kod alela B gdje je iznosila $46,2 \pm 6,7$ (medijan 43). Osim toga, nije opažena razlika u raspodjeli duljina slijeda CAG između alela A i B na kromosomima oboljelih.

4. Rasprava

Prethodna istraživanja su pokazala značajnu razliku u učestalosti i raspodjeli polimorfnih biljega CCG i $\Delta 2642$ između populacija Zapadne Europe (osim Finske) i Azije. Zbog toga su, s ciljem otkrivanja genetičkog porijekla Huntingtonove bolesti, ovi polimorfizmi ispitani u zdravih osoba i oboljelih u populaciji stanovnika Hrvatske.

Pronađena je i povezanost rasprostranjenosti Huntingtonove bolesti u različitim populacijama s određenim polimorfnim alelima na normalnim kromosomima, što upućuje na različite izvore mutacije HD (5, 15, 20). Pokazalo se da u populaciji Zapadne Europe, gdje je Huntingtonova bolest češća, nalazimo veću učestalost alela sa 7 tripleta CCG, dok u populacijama s manjim brojem oboljelih (Afrika, Azija i Finska) prevladava alel s 10 ponavljanja tripleta CCG. Osim toga, značajna je i razlika u učestalosti alela B (delecija kodona GAG) za polimorfizam $\Delta 2642$. Alel B nije pronađen u populacijama Azije i Afrike, dok je znatno više zastupljen kod oboljelih u populaciji Zapadne Europe (5).

U istraživanoj populaciji najčešći aleli polimorfizma CCG bili su sa 7 i 10 ponavljanja. Iako je dodatno provedena analiza haplotipa pokazala snažnu genetičku povezanost alela sa 7 tripleta CCG i mutacije HD, razlika u raspodjeli alela 7 i 10 između HD i normalnih kromosoma nije bila statistički značajna ($\chi^2=5,14$; $df=2$; $p<0,05$). Ovi rezultati slažu se s rezultatima istraživanja polimorfizma CCG provedenog na populaciji Indije (15), i pokazuju da vjerojatno ne postoji povećana vjerojatnost produljenja slijeda CAG na kromosomima sa 7 tripleta CCG, suprotno rezultatima nekih ranijih radova (1, 20).

Ispitivanje učestalosti alela B (delecija kodona GAG) za polimorfizam $\Delta 2642$ pokazalo je značajnu ($\chi^2=21,69$; $p<0,000003$) razliku u zastupljenosti na normalnim (10%) i HD (40,5%) kromosomima. Veća zastupljenost alela B na kromosomima oboljelih upućuje na mogućnost njegovog sudjelovanja u nastanku mutacije gena *HD*. Iako nije potpuno jasan mehanizam kojim bi takva promjena uzrokovala nestabilnost slijeda CAG, ovi rezultati potvrđuju pretpostavku da osim same regije CAG i druge sekvence mogu utjecati na njeno

produljenje. Za takve se sekvence smatra da doprinose stvaranju sekundarnih struktura koje povećavaju ili smanjuju stabilnost slijeda CAG, a time i vjerojatnost njegovog produljenja koje predstavlja mutaciju HD (5, 20).

Pronalazak alela A za polimorfizam $\Delta 2642$ na većini (59,9%) kromosoma HD u skladu je s pretpostavkom da se prvobitna mutacija dogodila na kromosomu s alelom A, dok je veća zastupljenost alela B na HD-kromosomima, u odnosu na kontrolu, u istraživanoj populaciji, kao i u populaciji Zapadne Europe, vjerojatno rezultat relativno nove mutacije specifične za Europu (1, 12, 21).

Dodatno ispitivanje raspodjele CCG- i $\Delta 2642$ -alela prema veličini slijeda CAG na normalnim kromosomima pokazalo je da aleli sa 7 tripleta CCG ili delecijom kodona GAG u genu *HD* imaju veću prosječnu veličinu slijeda CAG nego ostali (tablice 3.1 i 3.2). Navedeno potvrđuje pretpostavku da bi upravo na ovim normalnim kromosomima mogli biti aleli koji postaju nestabilni nizom malih pomjena u veličini CAG. Kada se slijed CAG tako poveća do raspona od 29-35 ponavljanja postaje izrazito nestabilan i u slijedećim generacijama dolazi do sve većih i naglih produljenja, koja ubrzo stvaraju potpunu HD-mutaciju. Raspodjela polimorfizama CCG i $\Delta 2642$ potvrđuje i rezultate prethodno provedene analize haplotipova, koje su pokazale da ova dva biljega u genu *HD* neovisno doprinose varijaciji u veličini slijeda CAG. Osim toga, u oboljelih s alelom B za polimorfizam $\Delta 2642$ opaženo je pojavljivanje prvih simptoma u nešto ranijoj dobi, a to potvrđuju i druga istraživanja (12, 21). To pokazuje da slijed CAG, iako je osnovni uzrok bolesti, nije jedini genetički čimbenik odgovoran za kliničke simptome Huntingtonove bolesti i vrijeme njihovog prvog pojavljivanja. Ipak, još nije potpuno jasno kakav je cjelokupni učinak ovih cis-djelujućih čimbenika na mutaciju HD i tijek bolesti.

Utvrđena je velika sličnost između istraživane populacije i populacije Zapadne Europe s obzirom na učestalost genetičkih biljega CCG i $\Delta 2642$ na normalnim i HD-kromosomima. Na temelju toga očekivala bi se pojava Huntingtonove bolesti kod 5-10 osoba na 100000, kao što je slučaj u drugim europskim populacijama. Prema 58 pronađenih slučajeva Huntingtonove bolesti u populaciji Hrvatske procijenjeno je da se bolest pojavljuje kod 1,3 na 100000 stanovnika. Manji opaženi broj oboljelih u odnosu na populaciju za koju je utvrđeno slično genetičko porijeklo mutacije HD može se objasniti još uvijek velikim brojem pogrešno dijagnosticiranih ili neprepoznatih slučajeva Huntingtonove bolesti u Hrvatskoj.

5. Zaključak

1. Na normalnim kromosomima pronađeni su aleli sa 7, 8, 9 i 10 ponavljanja tripleta CCG. Najučestaliji aleli bili su sa 7 i 10 tripleta. Alel sa 7 tripleta bio je znatno zastupljeniji. Navedeno upućuje na porijeklo mutacije HD od alela sa 7 tripleta CCG.
2. Alel sa 7 tripleta CCG pronađen je uz dulje sljedove CAG, što upućuje na vjerojatnu ulogu alela CCG sa 7 tripleta u mehanizmu produljenja slijeda CCG.
3. Delecija kodona GAG ($\Delta 2642$) češća je u oboljelih nego zdravih osoba, što pokazuje moguću povezanost ove delecije i nestabilnosti slijeda CAG. Odsustvo delecije $\Delta 2642$ kod većine oboljelih pokazuje da se prvobitna mutacija koja se najviše proširila u populaciji vjerojatno dogodila na kromosomu bez delecije.
4. Uz deleciju $\Delta 2642$ pronađeni su dulji sljedovi CAG, što pokazuje da i ovaj polimorfizam utječe na nestabilnost slijeda CAG i povećava vjerojatnost njegovog produljenja.
5. S obzirom na genetičke biljege CCG i $\Delta 2642$ postoji velika sličnost između populacije Hrvatske i Zapadne Europe. Ove populacije, prema tome, najvjerojatnije imaju zajedničko genetičko porijeklo, te je za očekivati da imaju podjednak udio oboljelih. Znatno manji opaženi udio oboljelih u populaciji Hrvatske upućuje na velik broj pogrešno dijagnosticiranih ili neprepoznatih slučajeva Huntingtonove bolesti.

6. Literatura

1. Almqvist E, Spence N, Nichol K, Andrew SE, Vesa J, Peltonen L, Anvret M, Goto J, Kanazawa I, Goldberg YP, Hayden MR: Ancestral differences in the distribution of the $\Delta 2642$ glutamic acid polymorphism is associated with varying CAG repeat lengths on normal chromosomes: insight into the genetic evolution of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 207-214.
2. Ambrose CM, Duyao MP, Barnes G, Bates GP, Lin CS, Srinidhi J, Baxendale S, Hummerich H, Lehrach H, Altherr M, Wasmuth J, Buckler A, Church D, Housman D, Berks M, Micklem G, Durbin R, Dodge A, Read A, Gusella J, MacDonald ME: Structure and expression of Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Som Cell Mol Genet* 1994; **20**:27-38.
3. Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA: The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature Genet* 1993; **4**: 398-403.
4. Andrew SE, Goldberg YP, Theilmann I, Zeisler J, Hayden MR: A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the Huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 65-67.
5. Andrew SE, Hayden MR: Origins and evolution of Huntington disease chromosomes. *Neurodegeneration* 1995; **4**: 239-244.
6. Beal MF: Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 1992; **31**:119-130.

7. Brandt J, Bylsma FW, Gross R, Stine OC, Ranen N, Ross CA: Trinucleotide repeat length and clinical progression in Huntington's disease. *Neurology* 1996; **46**: 527-531.
8. Brinkman RR, Mezei MM, Theilmann J, Almqvist E, Hayden MR: The likelihood of being affected with Huntington disease by particular age, for a specific CAG size. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 1202-1210.
9. Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, Jou YS, Myers RM, Roses AD, Vance JM, Strittmatter WJ: Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nature Med* 1996; **2**:347-350.
10. Goldberg YP, McMurray CT, Zeisler J, Almqvist E, Sillence D, Richards F, Gacy AM, Buchanan J, Telenius H, Hayden MR: Increased instability of intermediate alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediate alleles in the general population. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 1911-1918.
11. Huntington's Disease Collaborative Research Group: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; **72**: 971-983.
12. Lucotte G, Gérard N, Roubertoux P, Schmitt I, Riess O: Relationships of the 2642 deletion polymorphism (Δ 2642) in the Huntingtin gene with the CAG repeat expansion length and age at onset of the disease. *Genet Couns* 1996; **7**: 297-302.
13. Martin JB: Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med* 1999; **340**:1970-1980.

14. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 1215.
15. Pramanik S, Basu P, Gangopadhaya PK, Sinha KK, Jha DK, Sinha S, Das SK, Maity BK, Mukherjee SC, Roychoudhuri S, Majumder PP, Bhattacharyya NP: Analysis of CAG and CCG repeats in Huntingtin gene among HD patients and normal populations of India. *Eur J Hum Genet* 2000; **8**: 678-682.
16. Quinn NP, Schrag A: Huntington's disease and other choreas. *J Neurol* 1998; **245**:709-716
17. Rubinsztein DC, Leggo J, Chiano M, Dodge A, Norbury G, Rosser E, Craufurd D: Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:3872-3876.
18. Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME: Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 1998; **95**:55-66.
19. Snell R, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, Macdonald ME, Gusella JF, Harper PS, Shaw DJ: Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nature Genet* 1993; **4**:393-397.
20. Squitieri F, Andrew SE, Goldberg YP *et al*: DNA haplotype analysis of Huntington diseases reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 2103-2114.

21. Vuillaume I, Vermersch P, Destée A, Petit H, Sablonnière B: Genetic polymorphisms adjacent to the CAG repeat influence clinical features at onset in Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; **64**: 758-762.
22. Warner JP, Barron LH, Brock DJH: A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosomes. *Mol Cell Probes* 1993; **7**: 235-239.