

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA AVBERŠEK

**MOLEKULARNA ANALIZA 3. IN 6. EKSONA GENA ZA β -KATENIN KOT
KANDIDATNEGA GENA ZA RAZVOJ OSTEOPOROZE**

**MOLECULAR ANALYSIS OF 3rd AND 6th EXONS IN β -CATENIN GENE AS
CANDIDATE GENE FOR OSTEOPOROSIS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani na Katedri za klinično biokemijo. Meritve mineralne gostote kosti so opravili na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Kliničnega centra v Ljubljani. Sekvenčno analizo so opravili pri MWG Biotech, Ebersberg, Nemčija.

Zahvaljujem se mentorici, izr. prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorju asist. dr. Zoranu Troštu, mag. farm. Za pomoč pri izvedbi diplomske naloge in številne strokovne nasvete se zahvaljujem mladi raziskovalki asist. Simoni Mencej, mag. farm., prav tako pa tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo.

Za podporo in vzpodbudo v času študija pa gre zahvala mojim staršem, Aljažu in Juretu.

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc in somentorstvom asist. dr. Zorana Trošta.

Ljubljana, maj 2008

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar

Član diplomske komisije: doc. dr. Andrej Umek

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	1
POVZETEK.....	iii
ABSTRACT.....	iv
SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC.....	v
SEZNAM OKRAJŠAV.....	vii
1 UVOD.....	1
1.1 KOSTNINA.....	1
1.1.1 Zgradba kostnine.....	1
1.1.2 Kostna remodelacija.....	2
1.1.3 Nastanek, razvoj in vloga osteoblastov.....	4
1.2 SIGNALNA POT WNT / β -KATENIN.....	6
1.2.1 β -katenin.....	9
1.2.2 Gen CTNNB1.....	10
1.3 VLOGE β -KATENINA.....	10
1.3.1 Vloga β -katenina pri kostni tvorbi.....	10
1.3.2 Vloga β -katenina v citoplazmi.....	11
1.3.3 Vloga β -katenina v jedru.....	12
1.4 OSTEOPOROZA.....	13
1.4.1 Zdravljenje osteoporoze.....	15
1.4.2 Genetika osteoporoze.....	16
1.4.2.1 Identifikacija kandidatnih genov za razvoj osteoporoze.....	17
1.4.2.2 Kandidatni geni za razvoj osteoporoze.....	18
2 NAMEN DELA.....	20
3 MATERIALI IN METODE.....	21
3.1 OPIS PREISKOVANK.....	21
3.2 IZOLACIJA DNA.....	21
3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO.....	21
3.3.1 Pomnoževanje začetnega dela 3. eksona gena CTNNB1.....	22
3.3.2 Pomnoževanje celotnega 6. eksona gena CTNNB1.....	24
3.3.3 Izvedba reakcij PCR.....	25
3.3.4 Preverjanje uspešnosti reakcij PCR z agarozno gelsko elektroforezo.....	28

3.4	ANALIZA DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV	31
3.4.1	RFLP analiza mutacij 94 G>T in 101 G>T v 3. eksonu gena CTNNB1	31
3.4.1.1	Rsa I – RFLP analiza.....	31
3.4.1.2	Xmn I – RFLP analiza.....	34
3.4.2	RFLP analiza mutacije 860 A>G v 6. eksonu gena CTNNB1	36
3.4.2.1	Dde I – RFLP analiza	36
3.4.3	Analiza produktov restrikcije z agarozno gelsko elektroforezo.....	38
3.5	SEKVENČNA ANALIZA	40
3.5.1	Čiščenje pred sekvenčno analizo.....	40
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	43
4.1	OPTIMIZACIJA PCR.....	43
4.1.1	Sestavine reakcijske zmesi	43
4.1.2	Pogoji pomnoževanja	45
4.1.3	Optimizacija pomnoževanja 483 bp dolgega odseka gena CTNNB1	46
4.1.4	Optimizacija pomnoževanja 409 bp dolgega odseka gena CTNNB1	47
4.2	OPTIMIZACIJA IN REZULTATI ANALIZ RFLP	49
4.2.1	Optimizacija in rezultati Rsa I – RFLP analize.....	49
4.2.2	Optimizacija in rezultati Xmn I – RFLP analize.....	50
4.2.3	Optimizacija in rezultati Dde I – RFLP analize	52
4.3	SEKVENČNA ANALIZA	53
4.4	KLINIČNI POMEN MUTACIJ 94 G>T, 101 G>T IN 860 A>G	56
5	SKLEP.....	59
6	LITERATURA.....	60
7	PRILOGE	63
7.1	PRILOGA 1: OPIS PREISKOVANK.....	63
7.2	PRILOGA 2: REZULTATI GENOTIPIZACIJE.....	66

POVZETEK

Protein β -katenin je komponenta signalne poti Wnt / β -katenin, ki z aktivacijo osteoblastov spodbuja kostno tvorbo. Na tvorbo kostnine vpliva preko različnih mehanizmov, s katerimi deluje neposredno na osteoblaste in njihove prekursorske celice. Poleg spodbujanja kostne tvorbe posredno zavira tudi kostno resorpcijo, saj stimulira ekspresijo OPG (osteoprotegerin), ki deluje kot inhibitor diferenciacije in aktivacije osteoklastov. Konstantna aktivnost signalne poti Wnt / β -katenin bi tako pomenila manjšo verjetnost za izgubljanje kostne mase, ki je pomemben dejavnik pri razvoju osteoporoze.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti vpliv treh mutacij (94 G>T, 101 G>T in 860 A>G) v genu za β -katenin na osteogenezo. Mutaciji 94 G>T in 101 G>T se nahajata v 3. eksonu gena CTNNB1, mutacija 860 A>G pa v njegovem 6. eksonu. Vse te mutacije so doslej povezali le z razvojem različnih tumorjev (hepatoblastom, hepatocelularni in kolorektalni karcinom).

Za razvoj tumorjev so odgovorne aktivirajoče mutacije v genu CTNNB1, ki povzročijo konstantno prisotnost β -katenina v jedru, kjer vpliva na ekspresijo tarčnih genov. Glede na učinke aktivacije Wnt / β -katenin signalne poti v kosteh bi zato v teh primerih lahko pričakovali povečano kostno tvorbo.

Da bi ocenili vpliv mutacij 94 G>T, 101 G>T in 860 A>G na kostno tvorbo, smo želeli ugotoviti njihovo pogostnost in vpliv na MGK v slovenski populaciji 117 žensk, med katerimi so bile tudi osteoporozne bolnice. V ta namen smo razvili dve reakciji PCR, s katerima smo pomnožili del 3. in del 6. eksona gena CTNNB1, znotraj katerih se nahajajo preučevane mutacije. Tako smo pridobili zadostne količine DNA za genotipizacijo vzorcev z metodo analize dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP). Produkta PCR posameznih vzorcev smo inkubirali z različnimi restrikcijskimi endonukleazami in sicer z *Rsa* I za ugotavljanje mutacije 94 G>T, z *Xmn* I za ugotavljanje mutacije 101 G>T in z *Dde* I za ugotavljanje mutacije 860 A>G.

Kljub temu, da so vsa preučevana mesta v objavljenem nukleotidnem zaporedju gena CTNNB1 označena kot polimorfna, naši rezultati tega ne potrjujejo. Možno je, da so preučevne mutacije zelo redke in jih zato v naši skupini 117-ih preiskovank nismo zajeli. Ker pa prav tako nismo odkrili nobenega heterozigotnega genotipa lahko rečemo, da preučevane mutacije v slovenski ženski populaciji niso prisotne. Zanimiva bi bila primerjava s študijo na moški populaciji ali pa v tujini, kjer bi genotipizacijo izvedli na osebah druge rase.

ABSTRACT

β -catenin is a component of the Wnt / β -catenin signaling pathway, which activates osteoblasts and stimulates bone formation. The Wnt signaling increases bone mass through a number of mechanisms, including the stimulation of preosteoblasts replication and the induction of osteoblastogenesis. The Wnt signaling also inhibits bone resorption with the stimulation of OPG (osteoprotegerin) expression, which inhibits osteoclasts activation and differentiation. Constitutively active Wnt / β -catenin signaling pathway may reduce bone loss, which is important factor for osteoporosis development.

The goal of this thesis was to assess the effect of the three mutations (94 G>T, 101 G>T and 860 A>G) within the CTNNB1 gene on osteogenesis. The mutations 94 G>T and 101 G>T are in the 3rd exon of the CTNNB1 gene and mutation 860 A>G is within its 6th exon. All of these mutations have already been identified in different tumors (hepatoblastoma, hepatocellular carcinoma and colorectal cancer). In the development of these tumors are crucial activating mutations in the CTNNB1 gene. These mutations lead to the increased stability of β -catenin. The β -catenin is constantly present in the nucleus, where it affects the target genes' expression. Considering the effects of the Wnt / β -catenin signaling pathway activation in bone, in these cases an increased bone formation could be expected.

Our goal was to determine the frequency of these mutations and their connection to BMD in a Slovenian population of 117 women including osteoporotic patients to assess the effect of these mutations on bone formation.

We amplified the mutations containing regions with polymerase chain reaction (PCR) to gain the sufficient amount of DNA to determine the genotype by using restriction fragment length polymorphism (RFLP). The multiplied fragments were incubated with restriction endonuclease *Rsa* - I to reveal the mutation of 94 G>T, *Xmn* - I to reveal the mutation of 101 G>T and *Dde* - I to reveal the mutation of 860 A>G.

Although in the published sequence of the CTNNB1 gene all studied places are marked as polymorphic, we did not discover any. It is possible that the studied mutations are very rare and that our sample was too small. We also did not discover any heterozygous genotype. We could say that in Slovenian female population these mutations are not present. It would be interesting to compare our findings to the findings of a research on the male population and to the findings of other researched groups abroad.

SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC

Slika 1: Signali, ki usmerjajo mezenhimske prekursorje v diferenciacijo v osteoblaste in pri osteoblastih spodbujajo kostno tvorbo.

Slika 2: Vpliv transkripcijskih dejavnikov *runx2* in *osterix* ter β -katenina na osteoblastogenezo.

Slika 3: Shematski prikaz signalne poti Wnt / β -katenin.

Slika 4: Shematski prikaz strukture β -katenina.

Slika 5: Spreminjanje kostne mase glede na starost in spol.

Slika 6: Shematski prikaz strukture DNA in razmerja intron / ekson v delu gena *CTNNB1*, kjer se nahajata mutaciji 94 G>T in 101 G>T.

Slika 7: Zaporedje nukleotidov v pomnoženem 483 bp dolgem odseku gena za β -katenin.

Slika 8: Shematski prikaz strukture DNA in razmerja intron / ekson v delu gena *CTNNB1*, kjer se nahaja mutacija 860 A>G.

Slika 9: Zaporedje nukleotidov v pomnoženem 409 bp dolgem odseku gena za β -katenin.

Slika 10: Prikaz cepitve 483 bp dolgega odseka gena *CTNNB1* v prisotnosti mutacije 94 G>T.

Slika 11: Prikaz cepitve 483 pb dolgega odseka gena *CTNNB1* v primeru odsotnosti mutacije 101 G>T.

Slika 12: Prisotnost mutacije 860 A>G v 6. eksonu gena *CTNNB1*.

Slika 13: Optimizacija koncentracije $MgCl_2$.

Slika 14: Primer agarozne elektroforeze 409 bp dolgih produktov reakcije PCR.

Slika 15: Rezultati *Rsa* I - RFLP analize 483 bp dolgega fragmenta na 2 % agaroznem gelu.

Slika 16: Titracija restriktivske endonukleaze *Xmn* I za RFLP analizo.

Slika 17: Rezultati *Xmn* I - RFLP analize 483 bp dolgega fragmenta na 3 % agaroznem gelu.

Slika 18: Rezultati *Dde* I - RFLP analize 409 bp dolgega fragmenta na 3 % agaroznem gelu.

Slika 19: Rezultati sekvenčne analize 3. eksona gena *CTNNB1* (vzorec 10).

Slika 20: Rezultati sekvenčne analize 3. eksona gena *CTNNB1* (vzorec 35).

Slika 21: Rezultati sekvenčne analize 3. eksona gena *CTNNB1* (vzorec 84).

Slika 22: Rezultati sekvenčne analize 6. eksona gena *CTNNB1* (vzorec 10).

Slika 23: Rezultati sekvenčne analize 6. eksona gena *CTNNB1* (vzorec 35).

Slika 24: Rezultati sekvenčne analize 6. eksona gena *CTNNB1* (vzorec 84).

Preglednica I: Ocenjena dednost fenotipov, ki so povezani z razvojem osteoporoze.

Preglednica II: Nekateri najpogosteje preučevani kandidatni geni, ki so jih povezali z MGK in drugimi z osteoporozo povezanimi fenotipi.

Preglednica III: Zaporedje in lastnosti oligonukleotidnih začetnikov bKAT-Y32DF in bKAT-Y32DR.

Preglednica IV: Zaporedje in lastnosti oligonukleotidnih začetnikov bKAT-S287NF in bKAT-S287NR.

Preglednica V: Sestava reakcijske zmesi za PCR enega vzorca.

Preglednica VI: Pogoji reakcije PCR za pomnoževanje 483 bp dolgega odseka, ki obsega del 3. eksona in 409 bp dolgega odseka, ki med drugim zajema celoten 6. ekson gena CTNNA1.

Preglednica VII: Sestava reakcijske zmesi za en vzorec za *Rsa* I – RFLP analizo.

Preglednica VIII: Sestava reakcijske zmesi za en vzorec za *Xmn* I – RFLP analizo.

Preglednica IX: Sestava reakcijske zmesi za en vzorec za *Dde* I – RFLP analizo.

Preglednica X: Opis preiskovank (starost, teža, višina, ITM, MGK v predelu ledvenih vretenc, vratu stegenice in kolka).

Preglednica XI: Rezultati genotipizacije za vseh 117 preiskovank na vseh treh preučevanih polimorfnihih mestih.

SEZNAM OKRAJŠAV

BMP	kostni morfogeni proteini
bp	bazni par
BRU	kostna remodelacijska enota
BSA	goveji serumski albumin
ddNTP	zmes dideoksinukleotidtrifosfatov
dNTP	zmes deoksinukleotidtrifosfatov
ER	estrogenski receptor
ETBr	etidijev bromid
GH	rastni hormon
GSK-3 β	3 β kinaza glikogenske sintaze
IGF-1	insulinu podoben rastni dejavnik 1
kb	kilobaza
kDa	kilodalton
LRP5/6	LDL-receptorju soroden protein 5 ali 6
M-CSF	makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
MGK	mineralna gostota kosti
OPG	osteoprotegerin
PBM	višek kostne mase
PCR	veržina reakcija s polimerazo
PTH	paratiroidni hormon
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RFLP	analiza dolžin restrikcijskih fragmentov
SD	standardna deviacija
SNP	enonukleotidni polimorfizem
Ta	temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov
Tm	temperatura tališča
VDR	receptor vitamina D

1 UVOD

1.1 KOSTNINA

1.1.1 Zgradba kostnine

Okostje daje telesu oporo in ščiti življenjsko pomembne organe; služi kot nasadišče za mišice; je prostor, v katerem je shranjen kostni mozeg; zagotavlja primerno zalogo kalcija za vzdrževanje normalnega notranjega okolja. Kosti so sestavljene iz kortikalnega in trabekularnega dela, razmerje med njima pa je v posameznih delih skeleta različno. Kortikalna kost je kompaktna in ima manjšo specifično površino. Nahaja se v diafizah dolgih kosti in subperiostalno. Trabekularna, gobasta kost ali spongioza pa sestavlja predvsem ploščate kosti, vretenca in epifize dolgih kosti. Površina kortikalne kosti je 8 do 10-krat manjša od površine trabekularne, čeprav kortikalna kost predstavlja 3/4 mase celotnega skeleta. Prav zaradi večje specifične površine se metabolni procesi hitreje in bolj izrazito odražajo na trabekularni kot na kortikalni kosti (1, 2).

Biokemično je kost zgrajena iz organskih in anorganskih sestavin.

Organske sestavine kosti so beljakovine, mukopolisaharidi in kostne celice. Glavna beljakovina je kolagen tipa I, ki predstavlja kar 90 – 95 % vseh organskih snovi. Kot nekolagenski del organskega matriksa sta pomembnejša predvsem glikoprotein osteokalcin (kostni GLA protein) in fosfoprotein osteonektin, ki omogočata vezavo Ca^{2+} in s tem pospešujeta mineralizacijo. Vloga mukopolisaharidov (proteoglikanov) ni raziskana. Kostne celice so osteoblasti, osteoklasti in osteociti. Osteoblasti se preko preosteoblastov razvijejo iz mezenhimske celice in tvorijo organski matriks, sodelujejo pri mineralizaciji kosti in uravnavajo razvoj in delovanje osteoklastov. Osteoklasti so velike mnogojedrne celice, ki nastanejo z združitvijo enojedrnih predhodnikov, ki izvirajo iz hematopoetskih prekurzorjev monocitno - makrofagne vrste. Njihova vloga je resorpcija kosti. Na njihovo diferenciacijo in aktivnost vplivajo številni rastni dejavniki, citokini in hormoni, med katerimi so nekateri produkti osteoblastov. Tako je za začetne faze osteoklastogeneze pomemben M-CSF (makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik, *angl.* macrophage colony-stimulating factor), za njihovo diferenciacijo, zorenje in delovanje pa RANKL (ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB , *angl.* receptor activator of nuclear factor κB ligand), ki deluje preko interakcij z receptorjem RANK (receptor za aktivacijo jedrnega

dejavnika κ B, *angl.* receptor activator of nuclear factor κ B), ki se nahaja na površini osteoklastov. Osteoblasti poleg RANKL in M-CSF izločajo tudi topen receptor OPG (osteoprotegerin), ki prepreči interakcije med RANKL in RANK in s tem resorpcijo kosti. Osteociti so preoblikovani osteoblasti. Nastanejo po mineralizaciji proteinov organskega matriksa, ki jih izločajo osteoblasti in jih imenujemo osteoid. Osteociti so tako zagotavljeni med kostne lamele znotraj mineralizirane kosti. Med seboj in s površino kosti so trdno povezani preko izrastkov. So najštevilčnejše kostne celice, ki imajo lastnosti osteoblastov in osteoklastov. Omogočajo hitro sproščanje kalcija iz kosti in tako zagotavljajo potrebno uravnoteženost notranjega okolja. Delujejo tudi kot mehanosenzorji, ki signale preko številnih povezav, ki jih omogočajo izrastki, posredujejo osteoblastom in njihovim predhodnikom na površini kosti in na ta način sodelujejo pri kostni remodelaciji (1, 2, 3).

Anorganski del kosti, ki predstavlja 65 % kostne mase, sestavljajo pretežno kalcij in fosfati. V kosteh je tako uskladiščenega kar 99 % vsega kalcija in 90 % fosforja, ki sta vezana v obliki kalcijevega fosfata. Le-ta se v kosteh nahaja v dveh oblikah, kot amorfni kalcijev fosfat ali kot kristalni hidroksiapatit. V amorfem kalcijevem fosfatu je kalcij labilno vezan in se stalno izmenjuje s kalcijem, ki se nahaja v telesnih tekočinah. V kristalih hidroksiapatita pa je kalcij vezan stabilno, kar pomeni, da se sprošča le v fazi resorpcije v procesu kostne remodelacije (1,3).

1.1.2 Kostna remodelacija

Skelet odraslega človeka je v stalni dinamiki razgradnje stare in gradnje nove kosti. Usklajeno razgradnjo in gradnjo kosti s skupnim imenom imenujemo kostna premena. Odvija se na površini trabekularne kosti, pri kortikalni kosti pa endostalno in v haverzijanovem sistemu. Regulirana je s številnimi sistemskimi in lokalnimi dejavniki, ki uravnavajo aktivnost osteoblastov in osteoklastov in s tem omogočajo vzdrževanje konstantne kostne mase. Bistveno vlogo pri uravnavanju presnove kosti imajo paratiroidni hormon, kalcitonin in vitamin D₃. To so hormoni, ki hkrati zagotavljajo stalno raven kalcija v plazmi. Drugi sistemski dejavniki so še rastni hormon, insulin, glukokortikoidi, ščitnični in spolni hormoni. Pri uravnavanju kostne premene imajo posebno vlogo tudi lokalni dejavniki in tkivni hormoni (citokini in prostaglandini), saj omogočajo prostorsko omejene spremembe remodelacijskih procesov na mestu manjših ali večjih poškodb.

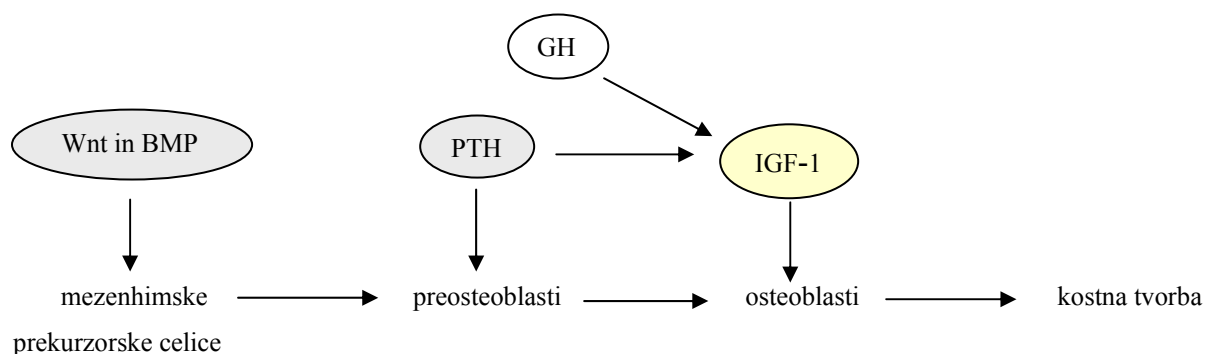
Faze remodelacije kosti:

- **Faza mirovanja:** Na kostni površini se nahajajo mirujoči neaktivni sploščeni osteoblasti.
- **Faza aktivacije:** Neaktivni osteoblasti se razmaknejo in razgalijo kostno površino. Od števila aktiviranih mest na kostni površini (BRU, *ang.* bone remodeling unit) sta odvisna obseg in hitrost remodelacije. Paratiroidni hormon in ščitnični hormoni spodbujajo odpiranje novih aktiviranih mest na kostni površini, spolni hormoni in kalcitonin pa njihovo število zmanjšujejo.
- **Faza pridobivanja osteoklastov:** Razgaljena kost privabi osteoklaste.
- **Faza resorpcije:** Osteoklasti se polarizirajo, njihova membrana se naguba in jim omogoči tesen stik s površino kosti. Na ta način se ustvari izolirano mikrookolje, v katerem poteka razgradnja kostnine. Osteoklasti v ta prostor preko H^+ -ATP-aze izločajo kislino, ki omogoča raztapljanje hidroksiapatita, in proteaze, ki razgrajujejo proteine organskega matriksa. Pri razgradnji nastajajo resorpcijske votlinice, ki jih imenujemo Howshipove lakune.
- **Faza preobrata:** Osteoklasti se odmaknejo, dno votlinice očistijo mononuklearni fagociti in ga obložijo s cementno plastjo. Navadno traja 1 – 2 tedna. To je čas med končano resorpcijo in začetkom tvorbe nove kostnine.
- **Faza pridobivanja osteoblastov in tvorbe osteoida:** V Howshipovi lakuni se namestijo osteoblasti in tvorijo osteoid, ki je sestavljen iz lamelarno razvrščenega kolagena in se kasneje mineralizira. Količina novo nastale nemineralizirane kosti je odvisna od števila in aktivnosti osteoblastov.
- **Faza mineralizacije:** Začne se nekaj dni po sintezi novega osteoida. Pri mineralizaciji sodeluje alkalna fosfataza, ki jo osteoblasti tvorijo in izločajo v ekstracelularno tekočino, pospešujejo pa jo tudi drugi proteini organskega matriksa (osteokalcin, osteonektin).
- **Faza mirovanja:** Med mineralizacijo se osteoblasti sploščijo in prekrijejo novo nastalo kostno tkivo.

Proces tvorbe nove kosti traja približno 3 mesece, osteoklastična razgradnja pa le nekaj dni (1, 2, 4).

1.1.3 Nastanek, razvoj in vloga osteoblastov

Osteoblasti nastanejo iz mezenhimskih prekursorskih celic, ki so pluripotentne in se lahko razvijejo v mioblaste, adipocite, hondroците in osteoblaste ter osteocite (4). Na diferenciacijo mezenhimskih celic v preosteoblaste vplivajo kostni morfogeni proteini in proteini Wnt, ki aktivirajo signalno pot Wnt / β -katenin. Na preosteoblaste deluje paratiroidni hormon, ki stimulira njihovo pomnoževanje. Paratiroidni hormon skupaj z rastnim hormonom inducira tudi sintezo insulinu podobnega rastnega dejavnika 1, ki je regulator funkcije osteoblastov in s tem tvorbe kosti (5).

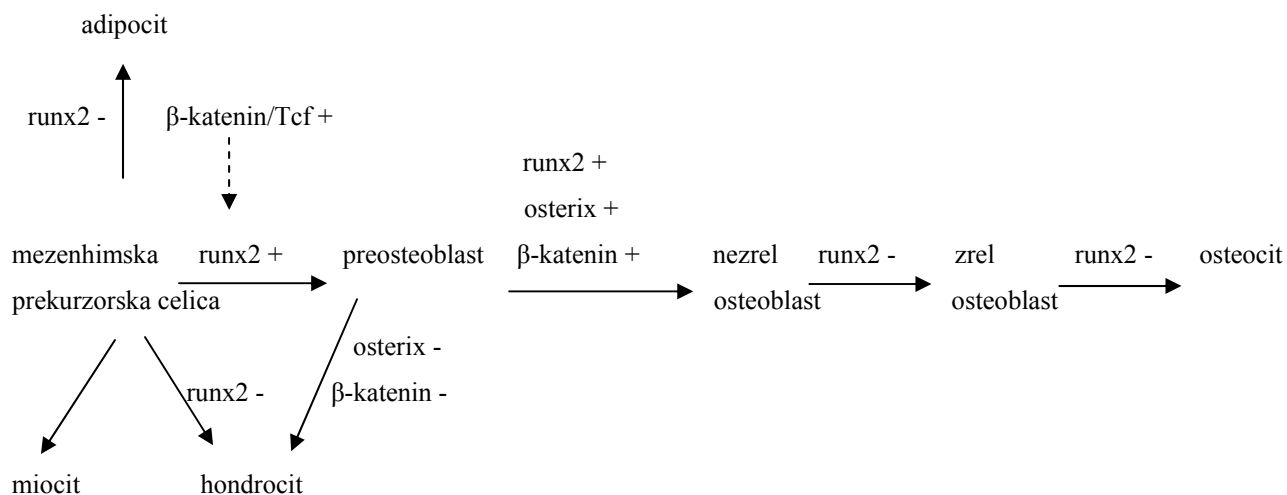


Slika 1: Signali, ki usmerjajo mezenhimske prekursorjev v diferenciacijo v osteoblaste in pri osteoblastih spodbujajo kostno tvorbo.

Legenda: BMP – kostni morfogeni proteini (*angl.* bone morphogenic proteins), PTH – paratiroidni hormon, GH – rastni hormon (*angl.* growth hormone), IGF-1 – insulinu podoben rastni dejavnik 1 (*angl.* insulin-like growth factor 1).

Za diferenciacijo prekursorskih celic v osteoblaste so nujni tudi transkripcijski dejavniki runx2, osterix in β -katenin. Runx2 usmerja pluripotentne mezenhimske celice v razvoj preosteoblastov in inhibira njihovo diferenciacijo v hondroците in adipocite, skupaj s transkripcijskima dejavnikoma osterix in β -kateninom pa stimulira nadaljnjo diferenciacijo preosteoblastov v nezrele osteoblaste. S poskusi na miškah in *in vitro* so dokazali, da odsotnost teh treh transkripcijskih dejavnikov zavre kostno tvorbo zaradi pomanjkanja diferenciranih osteoblastov. Odsotnost runx2 vodi v spontano diferenciacijo mezenhimskih celic v hondroците in adipocite, inaktivacija β -katenina in transkripcijskega faktorja osterix pa povzroči diferenciacijo preosteoblastov v hondroците (6). Runx2 regulira tudi izražanje mnogih proteinov, ki jih izločajo osteoblasti - osteopontin, kostni sialoprotein, kolagen tipa I, osteokalcin, RANKL in tudi transkripcijskega dejavnika osterix (3). Izražanje teh genov

sproži že na zgodnji stopnji diferenciacije. Celice na ta način pridobijo fenotip osteoblastov, runx2 pa jih nato z zaviranjem nadaljnje diferenciacije zadržuje na stopnji aktivnih osteoblastov. Končna faza razvoja osteoblastov so osteociti, ki so zagodeni med kostne lamele in ne proizvajajo več proteinov organskega matriksa (6).



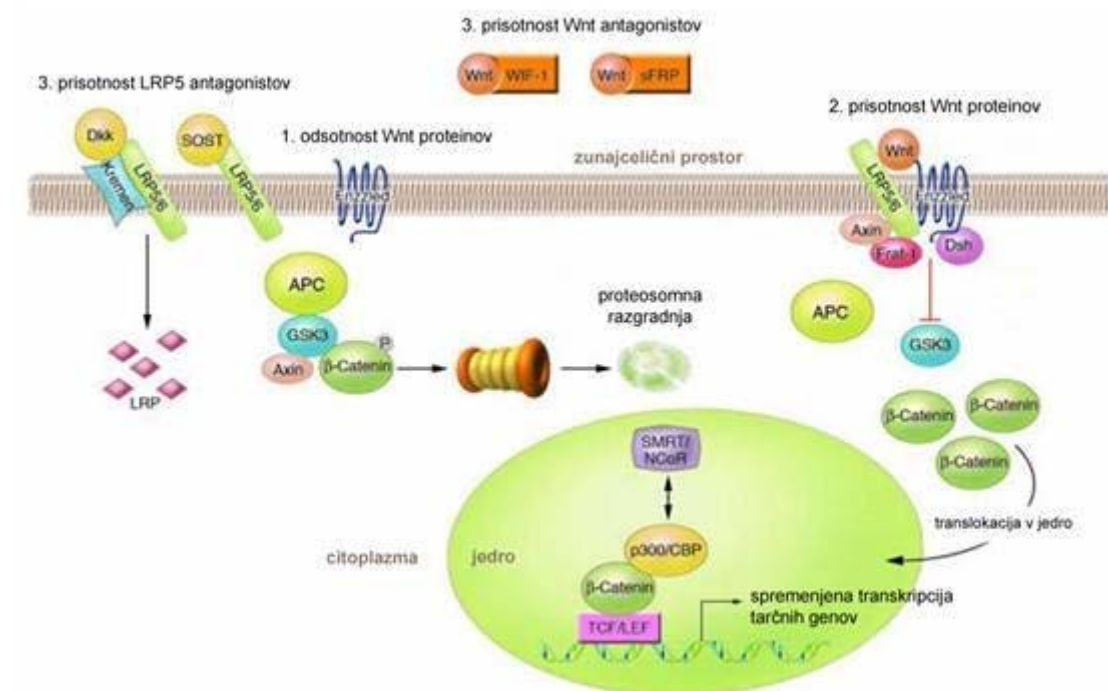
Slika 2: Vpliv transkripcijskih dejavnikov runx2, osterix in β-katenina na osteoblastogenezo.

Legenda: + označuje stimulatívno, - pa inhibítorno delovanje posameznega transkripcijskega dejavnika.

Glavna funkcija osteoblastov je, da s sintezo proteinov organskega matriksa omogočajo kostno tvorbo. Proteinski matriks, ki ga imenujemo tudi osteoid, vsebuje večinoma kolagen tipa I in manjše količine nekolagenih proteinov kot so osteokalcin, osteopontin, kostni sialoprotein ter osteonektin. Osteoid je osnova za mineralizacijo, ki je nujna za nastanek zrele kosti. Poleg kostne tvorbe pa osteoblasti sodelujejo tudi v začetni fazi kostne resorpcije. Izločajo namreč M-CSF, ki spodbuja osteoklastogenezo in RANKL, ki stimulira diferenciacijo monocitov v zrele osteoklaste in njihovo kasnejše delovanje. Osteoblasti sintetizirajo tudi nevtralno proteazo, ki z razgradnjo osteoida pripravi kostno površino za delovanje osteoklastov (4).

1.2 SIGNALNA POT WNT / β -KATENIN

Wnt so glikoproteini, ki preko interakcij z receptorji na celični površini aktivirajo signalne poti za regulacijo genske ekspresije, celične rasti, delovanja, migracije in apoptoze. Proteini Wnt so nujni med embriogenezo, prav tako pa so aktivni v tkivih, ki se v odrasli dobi intenzivno obnavljajo (limfatično tkivo, kolon, koža, lasni folikli, kosti) (7, 8). Z vezavo na receptor aktivirajo štiri različne signalne poti, med katerimi je najbolj raziskana Wnt / β -katenin signalna pot, ki je regulator zgodnje embriogeneze in razvoja skeleta, pri odraslih pa ima pomembno vlogo pri vzdrževanju kostne mase in fiziološkem odgovoru kosti na mehanske obremenitve (9). Ima pomemben vpliv na delovanje osteoblastov in tako na regulacijo kostne gostote, saj stimulira nastanek osteoblastov in obnavljanje njihovih prekursorskih celic, inducira osteoblastogenezo ter inhibira apoptozo osteoblastov in osteocitov (8). Odkritje, da signalna pot Wnt / β -katenin sodeluje pri postnatalni tvorbi kosti je novejša, njeno vlogo pri embrionalnem razvoju in razvoju malignih bolezni pa so do sedaj že intenzivno preučevali (7). Poleg vloge signalne molekule, ki ob aktivaciji Wnt / β -katenin signalne poti omogoča prenos signala v jedro, ima β -katenin pomembno vlogo tudi v citoplazmi, kjer kot komponenta adherentnih stikov sodeluje pri medsebojnem povezovanju sosednjih celic (12).



Slika 3: Shematski prikaz signalne poti Wnt / β -katenin (10).

Legenda: 1. odsotnost proteinov Wnt privede do fosforilacije in proteosomne razgradnje β -katenina, 2. vezava proteinov Wnt na koreceptorski kompleks omogoči aktivacijo signalne poti Wnt / β -katenin, katere rezultat je vpliv na ekspresijo tarčnih genov, 3. prisotnost zunajceličnih antagonistov inhibira signalno pot Wnt / β -katenin.

1. Signalna pot Wnt / β -katenin v odsotnosti proteinov Wnt

V odsotnosti proteinov Wnt je znotrajcelična koncentracija β -katenina v ravnotežnem stanju. Vsaka presežna molekula β -katenina, ki ne sodeluje v pritrdjevanju kadherina na citoplazemski aktin in s tem v medsebojnem povezovanju sosednjih celic preko adherentnih stikov, je podvrežena proteosomni razgradnji, ki poteče po fosforilaciji β -katenina z GSK-3 β (3 β kinaza glikogenske sintaze, *angl.* glycogen synthase kinase-3 β). Fosforilacija je omogočena, ko se presežna molekula β -katenina ujame v proteinski kompleks, ki ga sestavljajo APC (*angl.* adenomatous polyposis coli), Axin in GSK-3 β (7, 10). GSK-3 β pa fosforilira tudi Axin in APC in tako poveča njuno afiniteto do β -katenina (9).

2. Signalna pot Wnt / β -katenin v prisotnosti proteinov Wnt

Za aktivacijo signalne poti Wnt / β -katenin, ki povzroči znotrajcelično kumulacijo β -katenina, je nujna vezava proteina Wnt na koreceptorski kompleks, ki ga sestavljata LRP5/6 (*angl.* low-density lipoprotein receptor-related protein) in Fz (*angl.* frizzled) (9). Fz je transmembranski protein, ki sedemkrat preide membrano. V zunajceličnem delu ima s cisteinom bogat predel, ki omogoča vezavo proteinov Wnt, v celico pa je zasidran s citoplazemskim repom. Wnt koreceptorja LRP5/6 spadata med lipoproteine z nizko gostoto (LDL, *angl.* low-density lipoproteins). Sta prav tako transmembranska proteina, ki membrano preideta le enkrat. Zunajcelični del je odgovoren za vezavo proteina Wnt, znotrajcelični pa za prenos signala (8).

Po vezavi Wnt na koreceptorski kompleks se s kinazo fosforilira citoplazemski del LRP5/6 in s tem ustvari vezavno mesto za Axin. Pri prenosu signala sodelujeta še Dsh (Disheveled) in Frat-1. Axin z vezavo na fosforiliran znotrajcelični del LRP5/6 onemogoči nastanek kompleksa APC / Axin / GSK-3 β . Z izključitvijo GSK-3 β iz proteinskega kompleksa je inhibirana njena aktivnost in s tem preprečena fosforilacija in proteosomna razgradnja β -

katzenina. β -katzenin se kopiči v citoplazmi, nekatere molekule pa preidejo v jedro, kjer vplivajo na ekspresijo tarčnih genov (7).

Najbolj znana tarča β -katzenina v jedru je transkripcijski dejavnik Tcf/LEF1. β -katzenin po vstopu v jedro z direktno vezavo na Tcf/LEF1 omogoči zamenjavo transkripcijskih korepresorjev (NCoR, korepresor jedrnega receptorja, *angl.* nuclear receptor corepresor) s transkripcijskimi koaktivatorji (p300) in na ta način stimulira ekspresijo genov, ki so vključeni v napredovanje celičnega cikla (ciklin D1) in celično preživetje (c-myc). β -katzenin in Tcf/LEF1 pa izražanje določenih genov tudi zavirata (7, 8).

3. Signalna pot Wnt / β -katzenin v prisotnosti antagonistov

Nekateri zunajcelični in znotrajcelični proteini lahko blokirajo signalno pot Wnt / β -katzenin in tako spodbujajo proteosomno razgradnjo β -katzenina. Med zunajcelične antagoniste, ki delujejo na LRP5/6 koreceptor, sodi sklerostin in Dkk (Dickkopf) / Kremen kompleks (7). Nastanek trimolekularnega kompleksa Dkk / Kremen / LRP5/6 povzroči njegovo internalizacijo in lizosomno razgradnjo. Dkk tudi sam deluje kot LRP5/6 antagonist, vendar pa Kremen z vezavo nanj poveča njegovo kapaciteto za inhibicijo signalne poti Wnt / β -katzenin, saj je posledica internalizacije in lizosomne razgradnje zmanjšano število LRP5/6 koreceptorjev na površini celice (11). Zunajcelični antagonisti so tudi sFRPs (*angl.* secreted frizzled related proteins) in WIF-1 (*angl.* Wnt inhibitory factor-1). Te molekule se vežejo direktno na proste proteine Wnt in tako preprečijo njihove interakcije s koreceptorskim kompleksom Fz / LRP5/6 (8). V citoplazmi kot znotrajcelični antagonisti delujejo APC, Axin in GSK-3 β , saj so vključeni v kompleks, ki omogoča fosforilacijo in s tem razgradnjo β -katzenina. Tudi v jedru so številni regulatorji transkripcijske aktivnosti β -katzenina. Tu delujejo transkripcijski represorji, ki preprečijo interakcije β -katzenina s Tcf/LEF1 in inhibitorji, ki preprečijo od β -katzenina odvisno transkripcijo (11).

Signalno pot Wnt / β -katzenin so v zvezi s kostno tvorbo začeli preučevati po odkritju dveh mutacij v koreceptorju LRP5. Aktivirajoča mutacija v LRP5, ki povzroči njegovo neodzivnost na Dkk, vodi v povečano kostno gostoto. Mutacija, ki se kaže kot izguba funkcije LRP5, pa povzroča ostopenijo s pogostimi zlomi. Po spoznanju, da se LRP5 izraža v osteoblastih kot komponenta signalne poti Wnt / β -katzenin, ki regulira

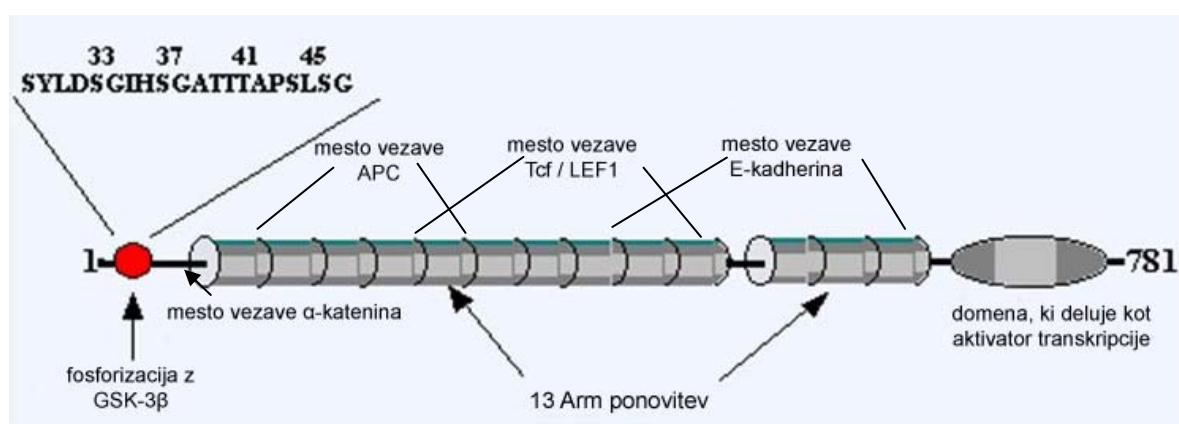
diferenciacijo, proliferacijo, aktivnost in preživetje osteoblastov, je le-ta postala nova tarča v raziskavah anabolnih sredstev za zdravljenje osteoporoze (9).

1.2.1 β -katenin

β -katenin je 88 kDa produkt gena CTNNB1. Imenujejo ga tudi protein povezan s kadherinom, saj β -katenin povezuje E-kadherin z aktinskim citoskeletom in na ta način sodeluje pri vzpostavljanju adherentnih stikov med celicami (7, 12). Kot komponenta adherentnih stikov se tako nahaja v citoplazmi, najdemo ga pa tudi v jedru, kjer tvori kompleks s transkripcijskim dejavnikom Tcf/LEF1 in tako vpliva na izražanje tarčnih genov (13).

Zgradba β -katenina

Humani β -katenin sestavlja 781 aminokislin. N-terminalni konec proteina vsebuje 130 aminokislin in je pomemben za regulacijo stabilnosti, saj v tem delu poteka fosforilacija β -katenina s GSK-3 β . Sledi 13 armadillo ponovitev, vsako pa sestavlja približno 40 aminokislin. Armadillo ponovitve vsebujejo mnogi proteini, ki sodelujejo v znotrajcelični signalizaciji in regulaciji citoskeleta. To je precej konzervativna regija znotraj živalskega kraljestva, najdemo pa jo lahko tudi v nekaterih višjih rastlinah. V tem delu β -katenina so vezavna mesta za APC, Axin, Tcf/LEF1 in E-kadherin. C-terminalno domeno, ki deluje kot aktivator transkripcije, gradi 100 aminokislin (13, 14).



Slika 4: Shematski prikaz strukture β -katenina (13).

1.2.2 Gen CTNNB1

Gen CTNNB1, katerega produkt je β -katenin, se pri človeku nahaja na 3. kromosomu (3p22-p21.3) (7). Velikost celotnega gena znaša 23.2 kb. Vsebuje 16 eksonov, ki so med seboj ločeni z introni. Prvi ekson je nekodirajoči.

3. ekson gena CTNNB1

3. ekson gena CTNNB1 vsebuje 228 bp in med drugim kodira tudi celoten 20 aminokislinski dolgi N-terminalni konec proteina, kjer poteka fosforilacija β -katenina z GSK-3 β . Mutacije v tem eksonu lahko preprečijo fosforilacijo in tako stabilizirajo β -katenin. Pogoste so pri različnih tumorjih (14, 15).

6. ekson gena CTNNB1

6. ekson gena CTNNB1 vsebuje 202 bp in kodira del β -katenina, kjer so armadillo ponovitve ter vezavna mesta za ligande, kot so APC in Tcf/LEF1 (14, 15, 16).

Ugotovljene mutacije gena CTNNB1

Do sedaj odkrite mutacije gena CTNNB1 so zaenkrat povezali le z razvojem različnih tumorjev. Mutacije D32Y, D32G, S33Y, S33F, G34E, S37C, S37F in T41I so odkrili v nekaterih primerih pilomatrikoma, mutaciji S33Y in T41A pri kolorektalnem karcinomu, v povezavi s hepatoblastomom in hepatocelularnim karcinomom pa omenjajo mutacije T41A, S45F in S45P (17). Vse te mutacije se nahajajo v znotraj 3. eksona gena CTNNB1, ki kodira del β -katenina, kjer poteka njegova fosforilacija z GSK-3 β .

1.3 VLOGE β -KATENINA

1.3.1 Vloga β -katenina pri kostni tvorbi

Signalna pot Wnt / β -katenin spodbuja kostno tvorbo preko različnih mehanizmov, ki vključujejo stimulacijo obnavljanja prekurzorskih celic, pomnoževanja preosteoblastov, indukcijo osteoblastogeneze in aktivnosti osteoblastov ter inhibicijo apoptoze osteoblastov in osteocitov (10).

S poskusi na miškah so dokazali, da odsotnost β -katenina pri mezenhimskih prekurzorjih ustavi kostno tvorbo, kar se pokaže v znižanih nivojih vseh relevantnih markerjev

osteogeneze. β -katenin je tako nujen za zgodnjo fazo osteoblastogeneze, saj njegova odsotnost usmerja mezenhimske celice v razvoj adipocitov in hondrocitov (7). Njegova vloga v tej fazi je posredna in poteka preko transkripcijskega dejavnika runx2. β -katenin preko svojega povišanega znotrajceličnega nivoja in prehoda v jedro, kjer tvori kompleks s Tcf/LEF1, stimulira izražanje runx2 v mezenhimijskih celicah in tako regulira preklon med hondroblastogenezo in osteoblastno diferenciacijo. Neposreden vpliv na diferenciacijo osteoblastov dobi β -katenin na stopnji preosteoblastov, kjer stimulira njihov razvoj v nezrele osteoblaste (6). Njegovo vlogo pri zrelih osteoblastih so preučevali na miškah s konstantno aktivnim β -kateninom. Te so razvile osteopetrozni fenotip, vendar brez sprememb v kostni tvorbi in aktivnosti osteoblastov. Otežena je bila osteoklastogeneza in kostna resorpcija zaradi povečane ekspresije OPG (osteoprotegerin), ki prepreči interakcije med RANK in RANKL in s tem resorpcijo kosti. Pomanjkanje β -katenina pri zrelih osteoblastih pa povzroči povečano število osteoklastov in kostno resorpcijo zaradi zmanjšane ekspresije OPG. Ta odkritja so potrdila, da β -katenin regulira diferenciacijo osteoblastov, prav tako pa tudi osteoklastogenezo, saj vpliva na ekspresijo OPG, ki deluje kot inhibitor diferenciacije in aktivacije osteoklastov (7). Tako aktivacija signalne poti Wnt / β -katenin poleg spodbujanja kostne tvorbe preko inhibicije diferenciacije in aktivacije osteoklastov posredno zavira tudi razgradnjo kostnine (10).

1.3.2 Vloga β -katenina v citoplazmi

V odsotnosti proteinov Wnt se vsaka molekula β -katenina, ki se nahaja prosta v citoplazmi, fosforilira in proteosomno razgradi. V citoplazmi je tako β -katenin prisoten le kot sestavni del kompleksa, ki povezuje transmembranski protein E-kadherin z α -kateninom in aktinskim citoskeletom in na ta način tvori adherentne stike med celicami. Preko tako vzpostavljenih adherentnih stikov se aktinski citoskelet celice poveže z aktinskim citoskeletom sosednjih celic. Kot komponenta adherentnih stikov ima β -katenin vlogo regulatorja medceličnega povezovanja. Pomemben je pri apoptozi, kjer ga cepi citoplazemski encim kaspaza, kar povzroči razpad kompleksa E-kadherin / α -katenin / β -katenin / aktinski citoskelet in s tem prekine povezav z aktinskim citoskeletom sosednjih celic. Apoptoza je pomembna pri embrionalnem razvoju, saj omogoča oblikovanje telesnih votlin, ločevanje prstov ter preoblikovanje kosti in spolnih organov. Bistvenega pomena je tudi pri vzdrževanju homeostaze, saj omogoča odstranitev 99.9 % vseh odvečnih celic.

Adherentni stiki, katerih komponenta je β -katenin, pa imajo pomembno vlogo tudi pri kontaktni inhibiciji (12).

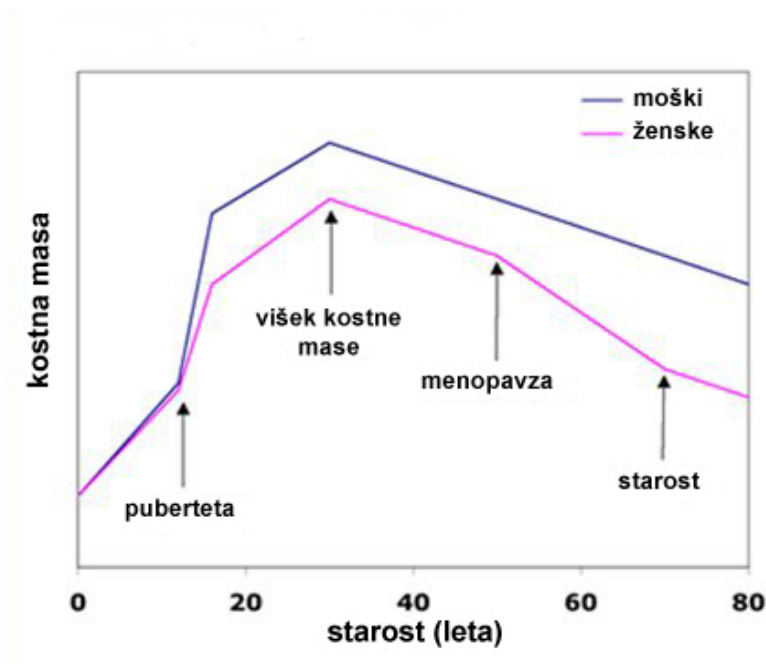
1.3.3 Vloga β -katenina v jedru

Prisotnost proteinov Wnt in njihova vezava na koreceptorski kompleks prepreči fosforilacijo in proteosomno razgradnjo β -katenina. Ta zaradi kopičenja v citoplazmi prehaja v jedro, kjer se veže na transkripcijske dejavnike Tcf/LEF1. Ti so pomembni med embriogenezo, pri odraslih pa je njihova ekspresija omejena na mitotsko aktivne celice v tkivih, ki se obnavljajo. Aktivnost Tcf/LEF1 je tako znatno povečana na področju kostnih remodelacijskih enot, kjer poteka proliferacija osteoblastov. Ko je proliferacija končana, se ekspresija Tcf/LEF1 zmanjša, pri diferenciranih celicah pa dokončno izgine (7).

Transkripcijski dejavniki Tcf/LEF1 so regulatorji genske ekspresije. V odsotnosti Wnt proteinov so Tcf/LEF1 vezani na transkripcijske korepresorje (NCoR, SMRT), ob njihovi prisotnosti pa β -katenin z direktno vezavo na Tcf/LEF1 omogoči zamenjavo transkripcijskih korepresorjev s transkripcijskimi koaktivatorji (p300, CBP) (7). To vodi v ekspresijo tarčnih genov, med katerimi je tudi protoonkogen *myc*, ki kodira jedrne beljakovine, ki sodelujejo pri podvajanju in prepisovanju DNA (18). V primeru stalne prisotnosti β -katenina v jedru pride do konstantne ekspresije tega gena in s tem neprestane delitve celic. Tarčni gen signalne poti Wnt / β -katenin je tudi gen za ciklin D, ki sodeluje pri uravnavanju celičnega ciklusa. V normalni celici ciklini nastajajo le v določeni fazi celičnega cikla, zato njihova koncentracija ciklično narašča in upada, posledica tega pa je prehod celice iz ene v drugo fazo ($G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$). Stalna prisotnost β -katenina v jedru lahko povzroči njihovo prekomerno aktivnost in s tem nenadzorovano proliferacijo (7, 18). Tako je signalna pot Wnt / β -katenin lahko vpletena v tumorogenezo. Znana sta dva mehanizma, ki vodita v stabilizacijo in citoplazemsko kumulacijo β -katenina. Prvi je inaktivirajoča mutacija APC gena, drugi pa so mutacije v 3. eksonu gena za β -katenin. Slednje lahko spremenijo mesto fosforilacije in tako GSK-3 β preprečijo fosforilacijo. β -katenin ima tako ključno vlogo pri razvoju pilomatrikoma, kolorektalnega in hepatocelularnega karcinoma, mutacije v genu CTNNB1 pa so odkrili tudi pri hepatoblastomu in karcinomu ovarijev (13).

1.4 OSTEOPOROZA

Kostna masa se od rojstva do približno 30. leta starosti povečuje, saj v tem obdobju kostna tvorba prevladuje nad kostno resorpcijo. Višek kostne mase (PBM *angl.* peak bone mass) dosežemo 10 let po končani telesni rasti. Naslednjih nekaj let so procesi gradnje in razgradnje kosti uravnoteženi. Po 40. letu življenja se prične fiziološko propadanje kostnega tkiva, ki traja do konca življenja. Proces fiziološkega manjšanja kostne mase je začetnih nekaj let enako intenziven pri obeh spolih, po menopavzi pa ženske zaradi prenehanja delovanja jajčnikov in s tem padca količine estrogenov prvih 10 let kostno maso pospešeno izgubljajo. Ženske takrat, ko odpade fiziološka zavora resorpcije kosti, izgubljajo 3 % kostne mase letno, moški pa 0.3 %. Na hitrost izgubljanja poleg pomanjkanja spolnih hormonov vpliva tudi zmanjšana telesna dejavnost ter pomanjkanje kalcija in vitamina D. V 80. letu starosti je kostna masa tako približno za polovico manjša od največje, ki jo dosežemo v mladosti (1, 2).



Slika 5: Spreminjanje kostne mase glede na starost in spol (19).

Osteoporoza je kronična sistemska bolezen skeleta, ki jo označujejo nizka kostna masa in spremembe v mikroarhitekturi kostnega tkiva, kar vodi do povečane lomljivosti kosti. Najpogostejši osteoporotični zlomi so zlomi vretenc, kolka in zapestja. Svetovna

zdravstvena organizacija priporoča oceno stanja kosti in definicijo osteoporoze na osnovi neinvazivnega merjenja mineralne gostote kosti (MGK) in prisotnosti zlomov:

- normalna kost: MGK ni več kot 1 SD pod povprečjem za mlado odraslo osebo,
- osteopenija: MGK je med 1 in 2,5 SD pod povprečjem za mlado odraslo osebo,
- osteoporoza: MGK je več kot 2,5 SD pod povprečjem za mlado odraslo osebo,
- napredovana osteoporoza: definirana je na osnovi prisotnosti osteoporotičnega zloma, neodvisno od MGK.

Za postavitev diagnoze osteoporoze je tako merjenje MGK obvezno. Najpogostejša metoda za merjenje MGK je dvoenergetska rentgenska absorpciometrija (DEXA, *angl.* dual-energy x-ray absorptiometry), ki je neboleča, nenevarna, hitra, zanesljiva in dobro ponovljiva (2). Na mestu merjenja (običajno kolk in/ali ledveni del hrbtenice) aparat izmeri količino kalcijevega fosfata, ki je odvisna od velikosti skeleta. Da bi se izognili interindividualnim razlikam v velikosti, se izmerjena količina deli s površino na mestu merjenja. MGK se zato izraža kot površinska gostota kosti v g/cm^2 . MGK je signifikantno povezana s tveganjem za osteoporotični zlom. Merjenje MGK na določenem mestu lahko tako najboljše napove tveganje za zlom na tem mestu (2, 20).

Ločimo dve vrsti osteoporoze:

- primarna osteoporoza: involutivna (tip I - pomenopavzalna, tip II - senilina), juvenilna in idiopatična,
- sekundarna osteoporoza.

Sekundarna osteoporoza se razvije kot posledica različnih bolezni (bolezni endokrinih žlez, prebavil, kostnega mozga) ali zaradi delovanja nekaterih zdravil (glukokortikoidi, antikonvulzivi, antacidi, heparin). Juvenilna in idiopatična osteoporoza se pojavljata pri mlajših in sta redki. Mnogo pogostejša je involutivna osteoporoza. Involutivna osteoporoza tipa I je pomenopavzalna in se pojavlja predvsem pri ženskah med 50. in 70. letom starosti. Vzrok za njen nastanek je večinoma pomanjkanje estrogenov, ki vodi do povečane resorpcije kosti in s tem do neto izgube MGK. Zanja so značilni kompresijski zlomi vretenc, reber, medenice, torej kosti, ki vsebujejo več trabekularne kostnine. Involutivna osteoporoza tipa II je senilna osteoporoza, ki se pojavlja po 70. letu starosti in v večjem številu zajame tudi moške. Kompresijskim zlomom vretenc in ploščatih kosti se pridružijo tudi zlomi dolgih kosti, predvsem kolka. Vzrok za njen nastanek naj bi bila manjša absorpcija kalcija iz črevesja zaradi sprememb na črevesni sluznici in zmanjšane tvorbe

aktivne oblike vitamina D₃ v starostno spremenjenih ledvicah (1). Vse to privede do prehodne hipokalcemije, ki spodbudi izločanje paratiroidnega hormona, ki v prebitku povzroči hitrejšo resorpcijo kosti, predvsem njenega kortikalnega dela (2).

Dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze so genski (družinska anamneza, bela in azijska rasa, ženski spol, svetli lasje in oči, nežna telesna zgradba in menopavza pred 45. letom) in zunanji. Med zunanje dejavnike uvrščamo prehrano z malo kalcija, izogibanje telesni dejavnosti in sončni svetlobi, kajenje, prekomerno uživanje alkohola in kofeina ter uživanje nekaterih zdravil. Kalcij in vitamin D sta pomembna že v otroštvu in zgodnji odrasli dobi, saj skupaj s telesno aktivnostjo omogočata, da dosežemo višek kostne mase, ki je pri posamezniku gensko pogojen. Dodatno ogroženi so ljudje z laktozno intoleranco, saj so pomanjkanje laktaze ugotovili pri kar 30 % bolnikov z osteoporozo. Premajhna telesna dejavnost in tudi imobilizacija vodi do izgube kostne mase, saj sta kostna in mišična masa neposredno medsebojno odvisni. Izgubo kostne mase povzroča tudi kajenje in pitje večjih količin kave. Pri moških je eden glavnih dejavnikov tveganja za osteoporozo uživanje alkohola, ki z zaviranjem delovanja osteoblastov deluje neposredno na kost (2).

1.4.1 Zdravljenje osteoporoze

Sredstva, ki zavirajo resorpcijo kosti

Za zdravljenje osteoporoze se večinoma uporabljajo zdravila, ki upočasnijo kostno remodelacijo in na ta način upočasnijo kostno resorpcijo (20). Tako preprečujejo osteoporotične zlome, kar je cilj vseh preventivnih in terapevtskih posegov pri osteoporozi. Resorpcijo kosti tako zavira kalcij in vitamin D, hormonsko nadomestno zdravljenje pri ženskah po menopvzi z estrogeni ali selektivnimi modulatorji estrogenih receptorjev (SERM) in bisfosfonati. Jemanje teh zdravil je priporočljivo tudi pri osteopeniji. Za zdravljenje napredovane osteoporoze s svežimi zlomi pa se uporablja kalcitonin, ki preko centralnega živčnega sistema deluje protibolečinsko, hkrati pa z vezavo na osteoklaste zavira njihovo delovanje. Ker je kalcitonin varno zdravilo, je omejitev pri njegovi uporabi zgolj dejstvo, da je njegov učinek na MGK viden največ 24 mesecev (2).

Sredstva, ki pospešujejo gradnjo nove kosti

Novejši terapevtski pristop pri zdravljenju osteoporoze je anabolni. Tarče sredstev, ki spodbujajo kostno tvorbo, so osteoblasti, možnosti njihovega delovanja pa različne: povečujejo lahko število mezenhimskih prekursorjev, stimulirajo njihovo diferenciacijo v osteoblaste ali spodbujajo njihovo delovanje in preživetje (5). Ker je signalna pot Wnt / β -katenin pomembna pri osteoblastogenezi, so njene komponente zanimive kot tarče potencialnih anabolnih sredstev. Z *in vivo* študijo so dokazali, da inhibitor GSK-3 β spodbuja diferenciacijo osteoblastov in s tem kostno tvorbo. Inhibicija GSK-3 β namreč vodi v stabilizacijo β -katenina, ta pa je neposredno vpleten v osteoblastogenezo. Anabolni učinek na kosti in s tem manjše tveganje za zlom so ugotovili tudi pri študiji na ljudeh, kjer so kot inhibitor GSK-3 β uporabljali litij. GSK-3 β pa ni le komponenta signalne poti Wnt / β -katenin, ampak kot ključni regulator deluje še v mnogih drugih signalnih poteh in celičnih procesih. Kot tarči anabolnih sredstev sta tako primernejša Dkk1 in sklerostin, ki delujeta kot antagonista LRP5/6 in sta specifična za kosti, saj je njuna ekspresija omejena skoraj izključno na osteoblaste in osteocite. Če bi bil vzrok znižane kostne mase inhibicija signalne poti Wnt / β -katenin zaradi prekomerne sinteze sklerostina ali Dkk1, bi lahko s sistemsko aplikacijo njunih antagonistov dosegli aktivacijo signalne poti Wnt / β -katenin le v kosteh. Na ta način bi bilo mogoče spodbuditi kostno tvorbo ne da bi vplivali na signalno pot Wnt / β -katenin v drugih organih. Sistemska aktivacija signalne poti Wnt / β -katenin namreč lahko vodi v razvoj različnih tumorjev (11, 21).

V terapiji se kot pospeševalec tvorbe kosti uporablja paratiroidni hormon (PTH) v nizkih odmerkih. Učinek PTH na metabolizem kosti je odvisen od režima odmerjanja: njegova stalno zvišana serumska koncentracija ima katabolni, občasno zvišane koncentracije pa anabolni učinek. Slednjega lahko delno pojasni dejstvo, da PTH inhibira ekspresijo sklerostina in tako aktivira signalno pot Wnt / β -katenin (5).

1.4.2 Genetika osteoporoze

Osteoporoza je sistemska bolezen skeleta, ki je močno gensko pogojena. Sodi med poligenske in multifaktorske bolezni pri katerih na izražanje fenotipskih in patoloških značilnosti vplivajo zapletene interakcije med geni na številnih lokusih kromosomov in različnimi dejavniki okolja. Na razvoj osteoporoze vplivajo številni geni z majhim individualnim vplivom. Posamezen gen naj bi bil odgovoren za manj kot 5 % raznolikosti

v populaciji. Dejavniki okolja lahko vplivajo na ekspresijo vpletenih genov in s tem določajo obseg genske predispozicije. Ocenjena dednost fenotipskih lastnosti, ki so povezane z osteoporozo, je prikazana v preglednici I. Ker so podatke pridobivali s študijami dvojčkov, so dobljene vrednosti morda nekoliko previsoke, saj dvojčki poleg skupnih genov delijo tudi prostor in razmere v maternici kot tudi kasneje pri odraščanju. Tako so v oceno dednosti delno zajeti tudi dejavniki okolja, vendar je kljub temu dednost fenotipov, ki prispevajo k razvoju osteoporozne in tveganju za zlome, visoka (21, 22).

Preglednica I: Ocenjena dednost fenotipov, ki so povezani z razvojem osteoporozne (22).

Fenotip	Dednost (%)
MGK	50 - 80
kostna remodelacija / biokemija	40 - 70
kostna geometrija	70 - 85
višina	80 - 90
starost ob menopavzi	60
indeks telesne mase (ITM)	60 - 70
tveganje za zlom kolka	3 - 68
tveganje za zlom zapestja	54

1.4.2.1 Identifikacija kandidatnih genov za razvoj osteoporozne

Pri iskanju in identifikaciji genov, ki vplivajo na razvoj osteoporozne, se najpogosteje uporabljajo asociacijske študije, študije vezanega dedovanja in modelni organizmi. Asociacijske študije temeljijo na identifikaciji polimorfizmov kandidatnih genov in nadaljnem ugotavljanju povezanosti posameznega alela pri določenem polimorfizmu z MGK ali tveganjem za osteoporozni zlom. Izbor kandidatnih genov temelji na poznavanju kostne fiziologije in biologije. Primerni so geni, ki vplivajo na kostni metabolizem in tudi geni, ki so mutirani pri redkih monogenih boleznih s spremenjenim fenotipom kosti. Asociacijske študije se izvajajo pri nesorodnih osebah, kar v primerjavi s študijami vezanega dedovanja omogoča enostavnejši in številčnejši nabor vzorcev. Omogočajo tudi identifikacijo genov z majhnim individualnim vplivom, kar je še posebno pomembno pri kompleksnih poligenih boleznih, kamor uvrščamo tudi osteoporozo (21, 23).

Študije vezanega dedovanja v družinah temeljijo na določitvi fenotipa za določeno lastnost (npr. MGK) in nadaljnem ugotavljanju povezave genetskih markerjev z dednostjo

izbranega fenotipa. Študije vezanega dedovanja so se izkazale kot izjemno uspešne pri identifikaciji genov, ki so odgovorni za redke monogenske kostne bolezni, manj primerne pa so pri poligenških boleznih, ker imajo manjšo sposobnost identifikacije genov z majhnim individualnim vplivom.

Modelni organizmi se že dolgo uporabljajo za identifikacijo genov, ki so odgovorni za razvoj kompleksnih bolezni. Študije temeljijo na parjenju miši z nasprotnimi fenotipi (npr. nizko in visoko MGK). Prva generacija potomcev ima povprečno MGK zaradi dedovanja enega alela od starša z nizko in enega alela od starša z visoko MGK. Parjenje bratov in sester prve generacije pa zaradi rekombinacije med starševskimi kromosomi daje potomce z različnimi vrednostmi MGK. Analiza genoma te druge generacije omogoča lokalizacijo genetskih variant, ki regulirajo MGK (23).

Pri odkrivanju kandidatnih genov, ki vplivajo na razvoj osteoporoze, so vse pomembnejše na celotni genom razširjene asociacijske študije, ki omogočajo analizo več tisoč polimorfizmov naenkrat, funkcijska genomika, ki se ukvarja z ekspresijo genov ter študije, s katerimi preučujejo interakcije med geni ter interakcije med geni in okoljem (21, 23).

1.4.2.2 Kandidatni geni za razvoj osteoporoze

Številni geni so bili identificirani in preučevani kot kandidatni geni za regulacijo kostne mase na podlagi njihove vloge pri kostni remodelaciji in metabolizmu kalcija. Najpogosteje preučevani kandidatni geni so predstavljeni v preglednici II. Za mnoge kandidatne gene pa povezava njihovih polimorfizmov z MGK in drugimi z osteoporozo povezanimi fenotipi ni bila dokazana ali pa je mehanizem povezave slabo poznan (23). Problem študij kandidatnih genov je tudi v nasprotujočih rezultatih, ki jih dajejo. Neskladja rezultatov rešujejo z uporabo meta-analiz, s katerimi še enkrat ovrednotijo rezultate pridobljene iz posameznih študij in tako ocenijo dejanski vpliv polimorfizma na večjem vzorcu. Meta-analize so tako že potrdile povezavo polimorfizmov v genih VDR, ER in COL1A1 z MGK ter tveganjem za zlom (21, 22).

Preglednica II: Nekateri najpogosteje preučevani kandidatni geni, ki so jih povezali z MGK in drugimi z osteoporozo povezanimi fenotipi (23).

Hormoni in receptorji	Regulatorni dejavniki osteoblastov
androgeni receptor aromataza estrogenski receptor α estrogenski receptor β paratiroidni receptor tipa 1 paratiroidni hormon receptor vitamina D receptor za kalcitonin	Alox12 in Alox15 insulinu podobni rastni dejavnik 1 kostni morfogeni protein 2 kostni morfogeni protein 4 lipoproteinu soroden receptor 5 in 6 sklerostin transformirajoči rastni dejavnik β vezavni dejavnik A1
Citokini in receptorji	Z osteoklasti povezani geni
antagonist interleukin-1 receptorja dejavnik tumorske nekroze interleukin-1 α in β interleukin-6 receptor dejavnika tumorske nekroze 2	katapsin K kloridni kanal 7 osteoprotegerin RANK RANKL
Ostali	Sestavine kostnega matriksa in encimi za razgradnjo
apolipoprotein E HLA razred II metil tetrahidrofolat reduktaza	α HS2 glikoprotein kolagen tipa 1 α I osteokalcin

2 NAMEN DELA

β -katenin je komponenta signalne poti Wnt / β -katenin, ki s svojo aktivnostjo inducira osteoblastogenezo, stimulira pomnoževanje preosteoblastov in aktivnost osteoblastov ter inhibira apoptozo osteoblastov in osteocitov. Preko različnih mehanizmov torej spodbuja kostno tvorbo. Gen za β -katenin, gen CTNNB1, je tako primeren kandidatni gen, ki bi lahko vplival na nivo kostne mase.

Naš namen je ugotoviti pogostnost in klinični pomen treh mutacij v genu CTNNB1. V 3. eksonu gena bomo analizirali mutaciji 94 G>T (Rs28931588) in 101 G>T (Rs28931589), v 6. eksonu pa mutacijo 860 A>G (Rs35288908). Ob eventualni prisotnosti mutacij bomo ocenili njihov vpliv na mineralno kostno gostoto in s tem klinični pomen.

V ta namen bomo:

1. Optimizirali reakciji PCR, s katerima bomo pomnožili del 3. in 6. eksona gena CTNNB1 pri 117 vzorcih. Tako bomo pripravili zadostno količino dovolj specifičnih odsekov gena CTNNB1, ki bodo predmet nadaljnje analize.
2. Z metodo RFLP bomo ugotavljali prisotnost treh mutacij. Tako bomo določili genotip na treh polimorfnihih mestih za vsako preiskovanko in nato ocenili njegov vpliv na mineralno gostoto kosti.
3. Trem naključno izbranim vzorcem bomo s sekvenčno analizo določili nukleotidno zaporedje in ga primerjali z znanim zaporedjem, ki je shranjeno v genski banki.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS PREISKOVANK

V raziskavo je bilo vključenih 117 naključno izbranih žensk, od katerih je bilo 48 premenopavznih, 13 perimenopavznih, 42 pomenopavznih in 14 osteoporoznih bolnic, ki pa se predhodno niso zdravile. Povprečna starost preiskovank je bila 50 let, najmlajša preiskovanka je imela 38, najstarejša pa 64 let. Njihova povprečna teža je znašala 68 kg, višina 163 cm. MGK so preiskovankam izmerili z dvoenergetsko rentgensko absorpciometrijo (angl. dual energy x-ray absorptiometry, DEXA) na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Kliničnega centra v Ljubljani. MGK so določili v predelu ledvenih vretenc, vratu stegenice ter v celotnem predelu kolka.

Podatki za posamezno preiskovanko so navedeni v prilogi 1.

3.2 IZOLACIJA DNA

Preiskovankam so odvzeli kri za izolacijo DNA ter izmerili MGK na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Kliničnega centra v Ljubljani. Genomska DNA je bila izolirana iz levkocitov venske krvi po Millerjevem postopku s pomočjo izsoljevanja. Kvaliteto izolirane DNA so preverili z elektroforezo na agaroznem gelu (fragmentiranost DNA) in spektrofotometrično z NanoDropom[®].

3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, *angl.* polymerase chain reaction) je visoko specifična in selektivna *in vitro* metoda za sintezo nukelinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij izbranega odseka DNA.

Reakcijsko zmes za PCR sestavlja vzorec DNA, ki služi kot matrica, dva oligonukleotidna začetnika, s katerima omejimo odsek, ki ga želimo pomnožiti, vsi štirje deoksinukleozid-trifosfati, ki predstavljajo gradnike nove verige DNA, Mg²⁺ ioni, reakcijski pufer in

termostabilna DNA-polimeraza. PCR poteka v več korakih. Začetni denaturaciji celotne DNA sledi 20 - 40 ciklov, vsak cikel pa je sestavljen iz treh stopenj:

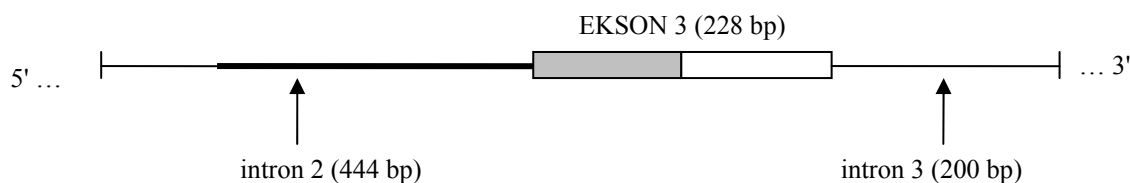
1. denaturacija – s segrevanjem na 94 - 95 °C razklenemo verigi DNA in tako iz dvoverižne dobimo dve enoverižni DNA,
2. prileganje oligonukleotidnih začetnikov na komplementarno mesto enoverižne DNA poteka pri 40 - 60 °C,
3. podaljševanje verige DNA s *Taq* DNA polimerazo poteka pri 72 °C, kar je optimum za delovanje te termostabilne polimeraze.

DNA, ki nastane v prvem ciklu, služi kot dodatna matrica za izgradnjo novih kopij v drugem ciklu. V vsakem naslednjem uspešnem ciklu se število kopij pomnoževanega odseka DNA podvoji. Po končani PCR reakciji tako teoretično dobimo 2^n kopij izbranega odseka, če kot n označimo število ciklov.

Po končanem zadnjem ciklu sledi faza končnega podaljševanja verig DNA pri 72 °C (24, 25).

3.3.1 Pomnoževanje začetnega dela 3. eksona gena CTNNB1

Za preučevanje mutacij 94 G>T in 101 G>T, ki se nahajata v 3. eksonu gena za β -katenin, smo s PCR pomnožili 483 bp dolg odsek DNA. Začetnih 307 bp pripada intronu 2, ostalih 176 bp pa se nahaja v 3. eksonu.



Slika 6: Shematski prikaz strukture DNA in razmerja intron / ekson v delu gena CTNNB1, kjer se nahajata mutaciji 94 G>T in 101 G>T.

Legenda: krepko in senčeno je označen 483 bp dolg odsek gena CTNNB1, ki smo ga pomnoževali z reakcijo PCR.

Pomnoževani odsek gena CTNNB1 smo omejili z oligonukleotidnima začetnikoma bKAT-Y32DF in bKAT-Y32DR.

Preglednica III: Zaporedje in lastnosti oligonukleotidnih začetnikov bKAT-Y32DF in bKAT-Y32DR.

Legenda: F - "forward", R - "reverse", Tm - temperatura tališča, GC - G/C nukleotidi.

Oligonukleotidni začetnik	Zaporedje	Dolžina (bp)	Tm (°C)	GC (%)
bKAT-Y32DF	5'-CCTCCTAATGGCTTGGTGAA-3'	20	60,4	50
bKAT-Y32DR	5'-CAGGACTTGGGAGGTATCCA-3'	20	62,45	55

Nukleotidno zaporedje pomnoženega 483 bp dolgega odseka gena CTNNB1 prikazuje slika 7.

5'-...

g t t t g t g t c a t t a a a t c t t t a g t t a c t g a a t t g g g g c t c t g c t t c g t t g c c a t t a a g c c a
g t c t g g c t g a g a t c c c c c t g c t t t c c t c t c c c c t g c t t a c t t g t c a g g c t a c c t t t t g c
t c a t t t t c t g c t c a c t c c t c c t a a t g g c t t g g t g a a a t a g c a a c a a g c c a c c a g c a g g
a a t c t a g t c t g g a t g a c t g c t t c t g g a g c c t g g a t g c a g t a c c a t t c t t c c a c t g a t t c a
g t g a g t a a c t g t t a g g t g g t t c c c t a a g g g a t t a g g t a t t t c a t c a c t g a g c t a a c c c t g
g c t a t c a t t c t g c t t t t c t t g g c t g t c t t t c a g a t t t g a c t t t a t t t c t a a a a a t a t t t c
a a t g g g t c a t a t c a c a g a t t c t t t t t t t t a a a t t a a g t a a c a t t t c c a a t c t a c t a a t
g c t a a t a c t g t t t c g t a t t t a t a g C T G A T T T G A T G G A G T T G G A C A T G G C C A T G G A A C C A G A
C A G A A A G C G G C T G T T A G T C A C T G G C A G C A A C A G T C T T A C C T G C A C T C T G C A A T C C A T T C T
G G T G C C A C T A C C A C A G C T C C T T C T C T G A G T G G T A A A G G C A A T C C T G A G G A A G A G G A T G T G G
A T A C C T C C C A A G T C C T G T A T G A G T G G G A A C A G G G A T T T T C T C A G T C C T T C A C T C A A G A A C A
A G T A G C T G

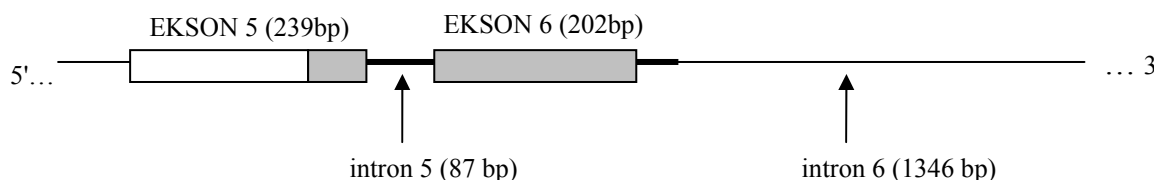
...'-3

Slika 7: Zaporedje nukleotidov v pomnoženem 483 bp dolgem odseku gena za β -katenin (26).

Legenda: z malimi tiskanimi črkami je prikazan celoten intron 2, z velikimi tiskanimi črkami pa celoten 3. ekson, podčrtan je 483 nukleotidov dolg odsek, ki smo ga pomoževali s PCR, senčena pa sta 20 nukleotidov dolga odseka, kamor se prilegata oligonukleotidna začetnika bKAT-Y32DF in bKAT-Y32DR, z modro barvo je označeno polimorfno mesto 94 G>T, z zeleno pa polimorfno mesto 101 G>T.

3.3.2 Pomnoževanje celotnega 6. eksona gena CTNNB1

Za preučevanje mutacije 860 A>G, ki se nahaja v 6. eksonu gena CTNNB1, smo pomnožili 409 bp dolg fragment. Poleg celotnega 6. eksona, ki vsebuje 202 bp, smo v tem primeru pomnoževali tudi končnih 76 bp eksona 5, celoten 87 bp velik intron 5 ter začetnih 44 bp introna 6.



Slika 8: Shematski prikaz strukture DNA in razmerja intron / ekson v delu gena CTNNB1, kjer se nahaja mutacija 860 A>G.

Legenda: krepko in senčeno je označen 483 bp dolg odsek gena CTNNB1, ki smo ga pomnoževali z reakcijo PCR.

Pomnoževani odsek gena CTNNB1 smo omejili z oligonukleotidnima začetnikoma bKAT-S287NF in bKAT-S287NR.

Preglednica IV: Zaporedje in lastnosti oligonukleotidnih začetnikov bKAT-S287NF in bKAT-S287NR.

Legenda: F - "forward", R - "reverse", Tm - temperatura tališča, GC - G/C nukleotidi.

Oligonukleotidni začetnik	Zaporedje	Dolžina (bp)	Tm (°C)	GC (%)
bKAT-S287NF	5'-ACCTTCCCATCATCGTGAG-3'	20	60,4	50
bKAT-S287NR	5'-TGTCCAATGCTCCATGAAAA-3'	20	56,3	40

Nukleotidno zaporedje pomnoženega 409 bp dolgega odseka gena CTNNB1 prikazuje slika 9.

5'-...

CACGCTATCATGCGTTCTCCTCAGATGGTGTCTGCTATTGTACGTACCATGCAGAATACA
 AATGATGTAGAAACAGCTCGTTGTACCGCTGGGACCTTGCATAACCTTTCCCATCATCGT
 GAGGGCTTACTGGCCATCTTTAAGTCTGGAGGCATTCCTGCCCTGGTGAAAATGCTTGG
 gtaagaaaacatgtcagaatgcttgaagctaaaaagtagaagagtatactcacaatattt
 ctgatgaggcttttttcttcttcccagTTCACCAGTGGATTCTGTGTTGTTTTATGCCATT
 ACAACTCTCCACAACCTTTTATTACATCAAGAAGGAGCTAAAATGGCAGTGCGTTTAGCTG
 GTGGGCTGCAGAAAATGGTTGCCTTGCTCAACAAAACAAATGTTAAATTCTTGGCTATTAC
 GACAGACTGCCTTCAAATTTTAGCTTATGGCAACCAAGAAAGCAAGgtaagagaattattc
 tttatgtgggttttcatggagcattggacacctccagtgatgtcattccatgcagtggtc
 ctaacctttttggcaccagggaccagtttctgtggaaaacagtttttccatgaatggggtgtg
 gggaatggtttc

...'-3

Slika 9: Zaporedje nukleotidov v pomnoženem 409 bp dolgem odseku gena za β -katenin (26).

Legenda: z malimi tiskanimi črkami je prikazan celoten intron 5 in začetni del introna 6, z velikim tiskanimi črkami pa končni del 5. eksona in celoten 6. ekson, podčrtan je 409 nukleotidov dolg odsek, ki smo ga pomoževali s PCR, senčena pa sta 20 nukleotidov dolga odseka, kamor se prilegata oligonukleotidna začetnika bKAT-S287NF in bKAT-S287NR, rumena barva označuje polimorfno mesto 860 A>G.

3.3.3 Izvedba reakcij PCR

Priprava reakcijske zmesi

Reakcijska zmes za PCR vsebuje:

- pufer za vzdrževanje ustreznega pH in ionske moči,
- dva oligonukleotidna začetnika (preglednici III in IV), s katerima omejimo odsek, ki ga pomnožujemo,
- zmes štirih doeksinukleozid trifosfatov (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ki so gradniki novo sintetiziranih verig DNA,
- Mg^{2+} ione, ki so potrebni za ustrezno aktivnost *Taq* polimeraze,

- termostabilno *Taq* DNA polimerazo, ki po principu baznih parov v smeri 5'-3' na osnovi enoverižne matrične DNA sintetizira njej komplementarno verigo,
- ultra čisto vodo.

V predhodno očiščeni komori za PCR smo pripravili skupno reakcijsko zmes (*angl.* master mix) za največ 9 vzorcev in negativno kontrolo. Skupna reakcijska zmes je vsebovala vse sestavine razen DNA. Ostale sestavine smo v predhodno izračunanih količinah dodajali v skupno mikrocentrifugirko po vrstnem redu, ki je podan v preglednici V. Pripravljeno reakcijsko zmes smo premešali in jo v označene mikrocentrifugirke odpipetirali po 18,5 μL . V vsako mikrocentrifugirko smo dodali še 1,5 μL vzorčne DNA, zmes premešali in centrifugirali. V negativno kontrolo nismo dali DNA, saj nam le-ta služi kot dokaz, da med pripravo reakcijske zmesi ni prišlo do kontaminacije reagentov.

Preglednica V: Sestava reakcijske zmesi za PCR enega vzorca.

Sestavine	483 bp (3. ekson)	409 bp (6. ekson)
	Volumen (μl)	Volumen (μl)
pufer 10x	2,0	2,0
bKAT-F istosmerni (5 μM)	2,0	2,0
bKAT-R protismerni (5 μM)	2,0	2,0
dNTP (2 mM)	2,0	2,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,6	2,4
<i>Taq</i> polimeraza (5 U/ μL)	0,1	0,1
ultra čista voda	8,8	8,0
DNA	1,5	1,5
volumen reakcijske zmesi	20,0	20,0

Potek reakcije PCR

Pripravljene vzorce in negativno kontrolo smo v dobro zaprtih mikrocentrifugirkah vstavili v ciklični termostat, ki po predhodno nastavljenem programu s spreminjanjem temperature izvaja posamezne stopnje reakcije PCR. Po končanem pomnoževanju smo uspešnost PCR preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Uspele produkte PCR smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

Preglednica VI: Pogoji reakcije PCR za pomnoževanje 483 bp dolgega odseka, ki obsega začetni del 3. eksona in 409 bp dolgega odseka, ki med drugim zajema celoten 6. ekson gena CTNNB1.

Stopnje PCR reakcije	483 bp (3. ekson)		409 bp (6. ekson)	
	T (°C)	Čas	T (°C)	Čas
začetna denaturacija	95	10 min	95	10 min
denaturacija	95	40 s	95	40 s
prileganje	57	40 s	54	40 s
podaljševanje	72	40 s	72	40 s
končno podaljševanje	72	7 min	72	7 min
shranjevanje	8		8	

Reagenti in kemikalije:

- ultra čista voda,
- 10 × PCR Gold pufer (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, ZDA),
- 2 mM raztopina dNTP: raztopino smo pripravili iz 100 mM osnovnih raztopin dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Promega Corporation, Madison, ZDA). Priprava: v mikrocentrifugirko odpipetiramo po 10 µL vsake od osnovnih raztopin in dodamo 460 µL ultra čiste vode,
- 25 mM raztopina MgCl₂ (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, ZDA),
- 5 µM oligonukleotidni začetniki bKAT-Y32DF in bKAT-Y32DR ter bKAT-S287NF in bKAT-S287NR (Operon Biotechnologies GmbH, Cologne, Germany). Osnovno 100 µM raztopino posameznega oligonukleotidnega začetnika pred uporabo redčimo v razmerju 1:20,
- AmpliTaq Gold® DNA polimeraza (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, ZDA),
- delovne raztopine DNA, ki jih pripravimo z redčenjem izolata v razmerju 1:10.

Aparature in pribor:

- avtoklavirani nastavki za pipete,
- avtoklavirane mikrocentrifugirke (0,5 mL),
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 µL, 2-20 µL, 20-200 µL),
- komora PCR (DNA/RNA UV-Cleaner, Biosan),
- centrifuga in mešalnik (Combi-Spin, Biosan),

- ciklični termostat (Personal Cyclor, Biometra).

POSEBNA OPOZORILA

Reakcija PCR je visoko občutljiva *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin. Njena bistvena prednost pred ostalimi tehnikami molekularne biologije je v tem, da potrebujemo le majhno količino vzorca (eno samo molekulo DNA). Ravno zaradi tega pa je potrebna tudi velika pazljivost pred kontaminacijo. Vsaka DNA, ki predstavlja nečistoto (DNA iz prejšnjih vzorcev, naša lastna DNA) prav tako služi kot matrica, kar pa vodi do lažno pozitivnih rezultatov ali do nastanka nespecifičnih produktov. Da bi se vnosu nečistot izognili, smo izvajali naslednje previdnostne ukrepe:

- pred začetkom dela smo komoro za PCR in ves pribor, ki ga bomo uporabili, očistili s 3 % raztopino natrijevega hipoklorita in komoro 15 minut obsevali z UV svetlobo,
- uporabljali smo sveže rokavice in čisto haljo,
- delovne raztopine reagentov smo hranili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pred uporabo smo jih odtalili in dobro premešali,
- delovne raztopine DNA smo hranili v hladilniku pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- *Taq* polimerazo smo iz zamrzovalnika vzeli tik pred dodatkom v reakcijsko zmes in jo nato takoj vrnili nazaj, da je bila sobni temperaturi izpostavljena čim krajši čas.

3.3.4 Preverjanje uspešnosti PCR reakcij z agarozno gelsko elektroforezo

Elektroforeza je separacijske metoda, ki temelji na potovanju nabitih molekul v električnem polju. Molekule DNA, ki so pri nevtralnem pH negativno nabite, v električnem polju potujejo proti pozitivni anodi. Hitrost potovanja skozi pore agaroznega gela je obratnosorazmerna velikosti odsekov DNA – manjši odseki potujejo hitreje, daljši pa počasneje (27).

Elektroforezo smo izvajali na 2 % (m/V) agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom (ETBr).

Priprava 2 % agaroznega gela

Za pripravo 2 % (m/V) agaroznega gela z 90 žepki (20 x 15 x 0,5 cm) smo uporabili:

- 2,75 g agaroze,
- 115 mL 1x TAE pufra (delovna raztopina tris-acetat EDTA pufra),
- 6 μ L ETBr (10 mg/mL).

V erlenmajerico smo natehtali agarozo, dodali 1x TAE pufra, premešali, pokrili z urnim steklom in na tehtnici vse skupaj starirali. Agarozo smo s segrevanjem v mikrovalovni pečici raztapljali toliko časa, da je nastala bistra raztopina brez mehurčkov. Po končanem segrevanju smo nadomestili izparelo vodo, ohladili raztopino na približno 60 °C, nato pa v digestoriju dodali ETBr. Vse skupaj smo premešali in vlili v pripravljen model s tremi glavnički, ki omogočajo tvorbo 90 žepkov. Gel smo zaščiten pred svetlobo pustili strjevati 30 minut, nato pa previdno odstranili glavničke in gel iz modela prenesli v plastično vrečko, da bi preprečili njegovo izsušitev. Do uporabe smo gel hranili v hladilniku pri 4 °C.

Reagenti in kemikalije:

- agarosa (Agarose for routine use, SIGMA-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija),
- 1x TAE puffer, redčenje 1:50
Sestava 50x TAE pufra: 242,0 g Tris baze, 57,1 g 100% očetne kisline, 100 mL 0,5 M raztopine Na₂EDTA s pH 8,0 in bidestilirana voda do končnega volumna 1000 mL,
- etidijev bromid, 10 mg/mL (SIGMA-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija),
- destilirana voda.

Aparature in pribor:

- elektronska tehtnica Exacta 300 EB (TEHTNICA, Železniki, Slovenija),
- erlenmajerica s širokim vratom (200 mL),
- merilni valj (100 mL),
- urno steklo,
- mikrovalovna pečica,
- polavtomatska pipeta (2-20 μ L),

- nastavki za pipete,
- nosilec za vlivanje gela,
- glavnički za tvorbo žepkov v gelu za detekcijo produktov PCR.

Potek elektroforeze in detekcija produktov PCR

2 % agarozni gel smo potopili v elektroforezno kadičko, napolnjeno z 1x TAE pufrom. Gel mora biti v celoti potopljen in v vodoravnem položaju. V žepke smo nanесли označevalec dolžin odsekov DNA (PCR marker), produkte PCR in negativno kontrolo. Pred nanosom smo vsako od naštetih komponent ($V = 2\mu\text{L}$) na parafilmu pomešali z 2 μL nanašalnega pufru. Nanašalni pufer vsebuje barvilo ksilencianol, ki obarva vzorec in s tem olajša njegov nanos, poleg tega pa v električnem polju potuje proti anodi z določeno hitrostjo, kar nam omogoča spremljanje poteka elektroforeze. Vloga nanašalnega pufru je tudi povečanje gostote vzorca in s tem omogočanje učinkovitejšega usedanja v žepke (28).

Elektroforeza je potekala 20 minut pri stalni napetosti 100 V. Po končani ločbi smo gel postavili pod UV lučko transluminatorja in z UV dokumentacijskim sistemom ($\lambda = 302\text{nm}$) detektirali produkte PCR. To omogoča ETBr, ki se vgradi med bazne pare dvojnovijačne DNA in v taki obliki pri izpostavitvi UV svetlobi fluorescira močneje kot v prosti obliki.

Iz položaja in jakosti lis smo razbrali velikost in količino produkta in s tem uspešnost reakcije PCR (28).

Reagenti in kemikalije:

- označevalec velikosti DNA, ki vsebuje fragmente velikosti 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 bp (PCR Markers G316A, Promega Corporation, Madison, ZDA),
- nanašalni pufer s ksilencianolom
Sestava: 0,025 g ksilencianola (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švica), 3,78 g glicerola in 7 mL destilirane vode,
- 1× TAE pufer.

Aparature in pribor:

- kadička za elektroforezo Wide Mini-Sub Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA),
- usmernik Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA),
- polavtomatska pipeta (2-20 μL),

- parafilm,
- avtoklavirani nastavki za pipete,
- dokumentacijski sistem za slikanje gela UVI Pro in program UVI Photo (Uvitec Ltd).

POSEBNA OPOZORILA

ETBr je mutagen, zato smo z njim delali v digestoriju in ves čas uporabljali rokavice. Ker na svetlobi razpada, ga shranjujemo v temni steklenički, prav tako pa pred svetlobo zavarujemo tudi agarozni gel, v katerega je ETBr vgrajen.

3.4 ANALIZA DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV

Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP, *angl.* restriction fragment length polymorphism) se uporablja za potrjevanje znanih sprememb v nukleotidnem zaporedju s pomočjo restrikcijskih endonukleaz. To so encimi, ki prepoznajo štiri do osem nukleotidov dolgo zaporedje v molekuli DNA in ga cepijo. Če je prišlo v tem zaporedju do spremembe le enega baznega para, kratke delecije ali insercije, je posledično vezavno mesto encima izgubljeno in do cepitve ne pride. Mutacija pa lahko restrikcijsko mesto tudi uvede. Produkti cepitve DNA z restrikcijskimi endonukleazami so različno dolgi odseki, ki jih na osnovi velikosti ločimo z agarozno gelsko elektroforezo. Glede na položaj in število lis lahko genotipiziramo vzorec (29).

3.4.1 RFLP analiza mutacij 94 G>T in 101 G>T v 3. eksonu gena CTNNB1

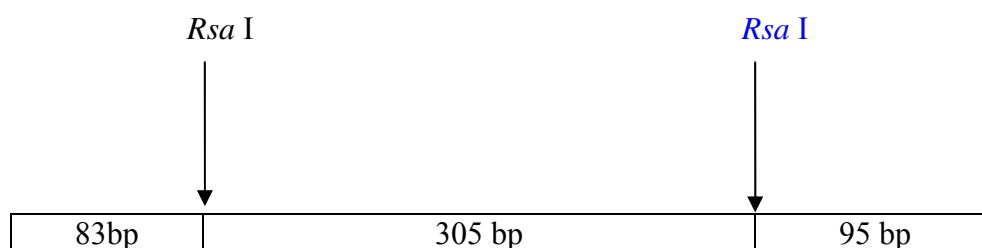
Za analizo 483 bp dolgega odseka, ki obsega tudi začetni del 3. eksona gena CTNNB1, kjer se nahajata mutaciji 94G>T in 101G>T, smo uporabili restrikcijski endonukleazi *Rsa I* in *Xmn I*.

3.4.1.1 *Rsa I* – RFLP analiza

Restrikcijska endonukleaza *Rsa I* je izolirana iz bakterije *E. coli*, ki je nosilka *Rsa I* gena iz *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Zaporedje nukleotidov, ki ga prepozna *Rsa I* (30):



Z *Rsa* I - RFLP analizo smo ugotavljali prisotnost mutacije 94 G>T v 3. eksonu gena CTNNB1. Restriksijska endonukleaza *Rsa* I ne glede na prisotnost mutacije prepozna in cepi eno restriksijsko mesto. To je konstitutivno cepitveno mesto, kjer *Rsa* I 483 bp dolg produkt PCR razcepi na dva dela, dolga 83 in 400 bp. To nam služi kot kontrola, da je restrikcija res potekla. Prisotnost mutacije 94 G>T pa uvede novo restriksijsko mesto za *Rsa* I. Po končani restrikciji tako dobimo pri homozigotih s prisotno mutacijo 3 dele in 4 dele pri heterozigotih (31).



Slika 10: Prikaz cepitve 483 bp dolgega odseka gena CTNNB1 v prisotnosti mutacije 94 G>T.

Legenda: modra barva označuje restriksijsko mesto, ki ga v 3. eksonu uvede mutacija 94 G>T, črna barva pa konstitutivno cepitveno mesto, ki se nahaja v intronu 2.

Priprava reakcijske zmesi

Za serijo vzorcev smo pripravili skupno reakcijsko zmes, ki je vsebovala vse sestavine, navedene v preglednici VII, razen produkta PCR. V vsako od predhodno označenih mikrocentrifugirk smo odpipetirali po 10 μ L dobro premešane reakcijske zmesi in nato vsaki dodali še 5 μ L produkta PCR, premešali in centrifugirali.

Preglednica VII: Sestava reakcijske zmesi za en vzorec za *Rsa* I – RFLP analizo.

Sestavine	Volumen (μL)
10 \times pufer NEB1	1,5
<i>Rsa</i> I	0,15
ultra čista voda	8,35
produkt PCR	5,0
končni volumen zmesi	15,0

Pogoji restrikcije

Dobro zaprte mikrocentrifugirke s končnim volumnom 15 μL smo čez noč inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi 37 °C.

Reagenti in kemikalije:

- 10 \times pufer NEB1 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Beverly, MA, ZDA),
- restrikcijska endonukeaza *Rsa* I, 10000 U/mL (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Beverly, MA, ZDA),
- ultra čista voda.

Aparature in pribor:

- avtoklavirani nastavki za pipete,
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 μL , 2-20 μL , 20-200 μL),
- avtoklavirane 1,5 mL mikrocentrifugirke,
- vortex - genie 2,
- centrifuga Centric 150 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija),
- vodna kopel,
- plavajoči nosilec.

POSEBNA OPOZORILA

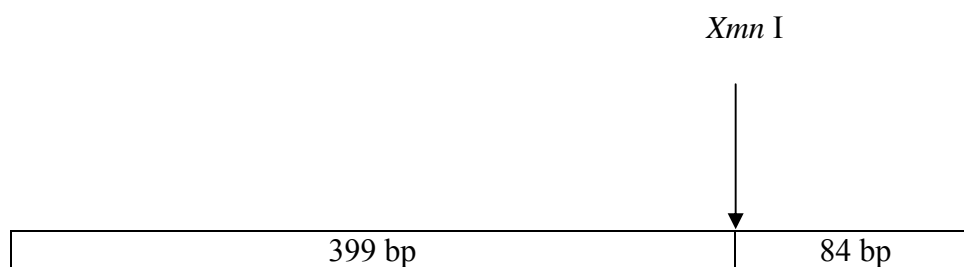
Encim *Rsa* I in zanj ustrezen pufer NEB1 hranimo v zamrzovalniku pri – 20 °C. Pufer pred uporabo odmrznemo, restrikcijsko endonukleazo pa iz zamrzovalnika vzamemo tik pred uporabo in jo nato takoj vrnemo nazaj, da je sobni temperaturi izpostavljena čim krajši čas.

3.4.1.2 Xmn I – RFLP analiza

Restriksijska endonukleaza *Xmn* I je izolirana iz bakterije *E. Coli*, ki je nosilka *Xmn* I gena iz *Xanthomonas manihotis*. Zaporedje nukleotidov, ki jih prepozna *Xmn* I (32):

```
5'...GAANNNNTTC...3'
3'...CTTNNNNAAG...5'
```

Z *Xmn* I – RFLP analizo smo ugotavljali prisotnost mutacije 101 G>T, ki se nahaja v 3. eksonu gena CTNNB1. V primeru, ko mutacija ni prisotna, *Xmn* I prepozna restriksijsko mesto in cepi produkt PCR na dva dela, dolga 399 in 84 bp. Prisotnost mutacije pa povzroči, da *Xmn* I zaradi transverzije G v T ne prepozna več vezavnega mesta in do cepitve ne pride. Tako dobimo v primeru homozigotov s prisotno mutacijo nerazcepljen 483 bp dolg fragment in tri fragmente, dolge 483, 399 in 84 bp v primeru heterozigotnih oseb (30).



Slika 11: Prikaz cepitve 483 pb dolgega odseka gena CTNNB1 v primeru odsotnosti mutacije 101 G>T. V primeru odsotnosti mutacije restriksijska endonukleaza prepozna vezavno mesto in cepi produkt PCR na dva dela. Prisotnost mutacije v tem primeru pomeni izgubo cepitvenega mesta.

Priprava reakcijske zmesi

Iz dobro premešane skupne reakcijske zmesi smo v vsako predhodno označeno mikrocentrifugirko odpipetirali po 10 μ L in nato dodali še po 5 μ L produkta PCR, premešali in centrifugirali. Sledila je inkubacija.

Preglednica VIII: Sestava reakcijske zmesi za en vzorec za *Xmn* I – RFLP analizo.

Sestavine	Volumen (μL)
10 \times pufer NEB2	1,5
BSA	0,15
<i>Xmn</i> I	0,15
ultra čista voda	8,2
produkt PCR	5,0
končni volumen zmesi	15,0

Pogoji restrikcije

Vzorci smo čez noč inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C. Poleg temperature je za optimalno delovanje encima potreben tudi ustrezen pH in sestava reakcijske zmesi, kar omogoča izbran pufer. V reakcijsko zmes pa je v primeru uporabe restrikcijske endonukleaze *Xmn* I potrebno dodati tudi BSA. To je goveji serumski albumin, ki stabilizira encim med reakcijo ter preprečuje adhezijo encima na mikrocentrifugirke in nastavke za pipete in s tem zmanjša njegove izgube (33).

Reagenti in kemikalije:

- 10 \times pufer NEB2 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Beverly, MA, ZDA),
- restrikcijska endonukleaza *Xmn* I, 20000 U/mL (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Beverly, MA, ZDA),
- BSA – goveji serumski albumin, 100 $\mu\text{g/mL}$ (Purified BSA, 100 \times , NEW ENGLAND BioLabs Inc., Beverly, MA, ZDA),
- ultra čista voda.

Aparature in pribor:

- avtoklavirani nastavki za pipete,
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 μL , 2-20 μL , 20-200 μL),
- avtoklavirane 1,5 mL mikrocentrifugirke,
- vortex – genie 2,
- centrifuga Centric 150 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija),
- vodna kopel,
- plavajoči nosilec.

POSEBNA OPOZORILA

Restriksijsko endonukleazo *Xmn* I, pripadajoči pufer NEB2 in BSA hranimo v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pufer in BSA pred uporabo odmrzujemo, encim pa iz zamrzovalnika vzamemo tik pred uporabo in ga nato čimprej vrnemo nazaj.

3.4.2 RFLP analiza mutacije 860 A>G v 6. eksonu gena CTNNB1

Za analizo 409 bp dolgega fragmenta, ki med drugim obsega tudi celoten 6. ekson gena CTNNB1 smo uporabili restriksijsko endonukleazo *Dde* I.

3.4.2.1 *Dde* I – RFLP analiza

Restriksijska endonukleaza *Dde* I je izolirana iz bakterije *E. Coli*, ki je nosilka *Dde* I gena iz *Desulfovibrio desulfuricans*. Nukleotidno zaporedje, ki ga prepozna *Dde* I (34):



Z *Dde* I – RFLP analizo smo ugotavljali prisotnost mutacije 860 A>G, ki se nahaja v 6. eksonu gena za β -katenin. V primeru odsotnosti mutacije restriksijska endonukleaza ne prepozna vezavnega mesta in restrikcija na poteče. Ob prisotnosti mutacije pa tranzicija A v G uvede restriksijsko mesto za *Dde* I. 409 bp dolg produkt PCR je zato pri homozigotih z mutacijo razcepljen na dva dela, dolga 285 in 124 bp. Pri heterozigotih, ki imajo restriksijsko mesto uvedeno le na enem alelu, pa poleg cepljenega vidimo tudi nerestringiran 409 bp dolg fragment (31).



Slika 12: Prisotnost mutacije 860 A>G v 6. eksonu gena CTNNB1. Ob prisotnosti mutacije tranzicija A v G uvede restriksijsko mesto za *Dde* I, ki 409 bp dolg fragment razcepi na dva dela.

Priprava reakcijske zmesi

V vsako predhodno označeno mikrocentrifugirko smo iz dobro premešane skupne reakcijske zmesi odpipetirali po 10 μL , dodali po 5 μL produkta PCR, premešali in centrifugirali. Sledila je inkubacija čez noč.

Preglednica IX: Sestava reakcijske zmesi za en vzorec za *Dde* I – RFLP analizo.

Sestavine	Volumen (μL)
10 \times pufer NEB3	1,5
<i>Dde</i> I	0,15
ultra čista voda	8,35
produkt PCR	5,0
končni volumen zmesi	15,0

Pogoji restrikcije

Vzorci smo čez noč inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C.

Reagenti in kemikalije:

- 10 \times pufer NEB3 (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Beverly, MA, ZDA),
- restrikcijska endonukleaza *Dde* I, 10000 U/mL (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Beverly, MA, ZDA),
- ultra čista voda.

Aparature in pribor:

- avtoklavirani nastavki za pipete,
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 μL , 2-20 μL , 20-200 μL),
- avtoklavirane 1,5 mL centrifugirke,
- vortex – genie 2,
- centrifuga Centric 150 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija),
- vodna kopel,
- plavajoči nosilec.

POSEBNA OPOZORILA

Encim *Dde* I in zanj ustrezen pufer NEB3 hranimo v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pufer pred uporabo odmrzujemo, restrikcijsko endonukleazo pa iz zamrzovalnika vzamemo tik pred uporabo in jo v najkrajšem možnem času vrnemo nazaj.

3.4.3 Analiza produktov restrikcije z agarozno gelsko elektroforezo

Po končani inkubaciji v vodni kopeli smo vzorce centrifugirali. Produkta restrikcije smo analizirali z elektroforezo na agaroznem gelu. Po restrikciji z encimom *Rsa* I smo za elektroforezo uporabili 2% gel, ki je po sestavi enak gelu za preverjanje uspešnosti reakcije PCR. Produkta po restrikciji z *Xmn* I in *Dde* I smo detektirali na 3% agaroznem gelu.

Priprava 3% agaroznega gela z ETBr (mali nosilec):

- 2,25 g agaroze za RFLP,
- 75 mL $1\times$ TAE pufra,
- 4 μL ETBr.

Postopek priprave gela je enak kot pri 2% agaroznem gelu in je opisan v poglavju 3.3.4 (prav tako tudi sestava 2% gela).

Reagenti in kemikalije:

- agarosa (Agarose, Wide range / standard 3:1, SIGMA-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija),
- $1\times$ TAE pufer, redčenje v razmerju 1:50
Sestava $50\times$ TAE pufra: 242,0 g Tris baze, 57,1 g 100% očetne kisline, 100 mL 0,5 M raztopine Na_2EDTA s pH 8,0 in bidestilirana voda do končnega volumna 1000 mL,
- ETBr, 10 mg/mL (SIGMA-Aldrich, Chemie GmbH),
- destilirana voda.

Aparature in pribor:

- elektronska tehnica Exacta 300 EB (TEHTNICA, Železniki, Slovenija),
- erlenmajerica s širokim vratom (200 mL),

- merilni valj (100 mL),
- urno steklo,
- mikrovalovna pečica,
- polavtomatska pipeta (2-20 μ L),
- nastavki za pipete,
- nosilec za vlivanje gela,
- glavnički za tvorbo žepkov v gelu.

Potek elektroforeze in detekcija produktov restrikcije

V prvi žepok agaroznega gela smo nanegli 2 μ L označevalca dolžin DNA, ki smo ga predhodno na parafilmu pomešali z 2 μ L nanašalnega pufra s ksilencianolom (Xc). V naslednje žepke smo nanegli produkte restrikcije, ki smo jih pomešali z 2 μ L istega nanašalnega pufra. V končni žepok pa smo nanegli 3 μ L produkta PCR, ki ni bil podvržen restrikciji in nam tako služi kot negativna kontrola. Tudi nerestringiran PCR produkt smo pred nanosom na parafilmu pomešali z 2 μ L nanašalnega pufra s ksilencianolom.

Elektroforeza je po restrikciji z *Rsa* I, *Xmn* I in *Dde* I potekala pod enakimi pogoji. Izvajali smo jo 40 minut pri stalni napetosti 100 V. Po končani ločbi smo gel z vgrajenim ETBr postavili pod UV lučko transluminatorja ($\lambda = 302$ nm) in detektirali rezultate. Glede na položaj in število lis smo določili genotip posameznega vzorca.

Reagenti in kemikalije:

- označevalec velikosti DNA, ki vsebuje fragmente velikosti 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 bp (PCR Markers G316A, Promega Corporation),
- nanašalni pufer s ksilencianolom
Sestava: 0,025 g ksilencianola (Fluka Chemie GmbH), 3,78 g glicerola in 7 mL destilirane vode,
- 1 \times TAE pufer.

Aparature in pribor:

- kadička za elektroforezo Wide Mini-Sub Cell (Bio-Rad Laboratories),
- usmernik Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories),
- polavtomatska pipeta (2-20 μ L),
- parafilm,

- avtoklavirani nastavki za pipete,
- dokumentacijski sistem za slikanje gela UVI Pro in program UVI Photo (Uvitec Ltd).

3.5 SEKVENČNA ANALIZA

Sekvenčno analizo so izvedli pri MWG Biotech, Ebersberg, Nemčija z Value Read Service. Uporabili so avtomatizirano metodo po Sangerju z dideoksinukleotidnimi verižnimi terminatorji. Analizirali so 483 bp dolg odsek, ki se nahaja deloma v intronu 2 (307 bp), deloma pa v 3. eksonu (176 bp) ter 409 bp dolg fragment, ki se začne v 5. eksonu (76 bp), nadaljuje v celotnem intronu 5 (87 bp) in 6. eksonu (202 bp), konča pa se v intronu 6 (44 bp). V analizo smo poslali po tri izbrane vzorce iz skupine 117 preiskovank za vsak posamezen analiziran odsek. Ti vzorci so bili: 10, 35 in 84.

Metoda po Sangerju

DNA, ki jo želimo sekvenirati, služi kot šablona za sintezo *in vitro* z DNA polimerazo. Reakcija poteka v štirih ločenih epruvetah, v vsaki pa se poleg osnovne DNA, polimeraze, enega nukleotidnega začetnika (F ali R) in zmesi običajnih dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) nahaja tudi en od ddNTP (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP). Vsak izmed dideoksinukleozid trifosfatov je markiran s specifičnim fluorescentnim barvilom. ddNTP v fazi podaljševanja z dNTP tekmujejo za vezavo na DNA. Na mestu, kjer se namesto dNTP vgradi ddNTP, se sinteza konča, saj ddNTP nima 3'-OH skupine, ki je potrebna za tvorbo nove fosfodiesterne vezi. Tako dobimo različno dolge odseke DNA, ki so na koncih označeni z različnimi barvili, ki jih zazna sekvenčni analizator na osnovi kapilarne elektroforeze in jih pretvori v nukleotidno zaporedje (35).

3.5.1 Čiščenje pred sekvenčno analizo

Začetni del sekvenčne analize je čiščenje pripravljenih produktov PCR, da odstranimo morebitne nezreagirane presežne reagentne (oligonukleotidne začetnike, pufer, dNTP, polimerazo), ki bi lahko motili sekveniranje. Za čiščenje smo uporabili komplet GenElute™ PCR Clean-Up Kit.

Postopek čiščenja:

1. Kolono z membrano smo vstavili v centrifugirko. V vsako kolono smo odpipetirali po 0,5 mL raztopine za pripravo kolone (Column Preparation Solution), ki poveča vezavo DNA na membrano. Sledilo je centrifugiranje pri $12000 \times g$ 1 minuto. Raztopino, ki je pritekla skozi membrano kolone, smo zavrgli.
2. K 18 μL produkta PCR smo dodali 90 μL raztopine za vezavo (Binding Solution), premešali in zmes prenesli na kolono. Sledilo je centrifugiranje pri $12000 \times g$ 1 minuto. Tekočino, ki je pritekla skozi membrano kolone, smo zavrgli, kolono pa smo ponovno vstavili v centrifugirko.
3. Na kolono smo nanegli 0,5 mL razredčene raztopine za izpiranje (Wash Solution) in centrifugirali pri $12000 \times g$ 1 minuto. Tekočino, ki je pritekla skozi kolono, smo zavrgli, kolono pa vstavili nazaj v centrifugirko.
4. Ne da bi ponovno dodali tekočino za izpiranje, smo kolono centrifugirali pri $12000 \times g$ še 3 minute. Tako smo se dokončno znebili etanola, ki je sestavina raztopine za izpiranje. Tokrat smo skupaj z odvečno tekočino, ki pritekla skozi membrano kolone, zavrgli tudi centrifugirko.
5. Kolono smo prenesli v čisto 2 mL centrifugirko. Na sredino membrane v posamezni koloni smo nanegli 25 μL vode in vse skupaj inkubirali pri sobni temperaturi 1 minuto.
6. S centrifugiranjem pri $12000 \times g$ 3 minute smo eluirali DNA. Produkt PCR, ki je prisoten v eluatu, je očiščen in kot tak uporaben za encimske reakcije, kloniranje in v našem primeru za sekveniranje (36).

Reagenti in kemikalije:

- raztopina za pripravo kolone (Column Preparation Solution),
- raztopina za vezavo (Binding Solution),
- razredčena raztopina za izpiranje, ki jo pripravimo z redčenjem koncentrirane raztopine (Wash Solution Concentrate) z 48 mL 100% etanola,
- ultra čista voda.

Vsi reagenti (razen vode) so del kompleta GenElute™ PCR Clean-Up Kit, NA 1020, SIGMA-Aldrich.

Aparature in pribor:

- 1,5 mL kolona z membrano,
- 2 mL avtoklavrne centrifugirke,
- polavtomatske pipete,
- avtoklavirani nastavki za pipete,
- centrifuga Centric 150 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA PCR

Reakcija PCR je občutljiva *in vitro* metoda, na katero vplivajo številni znani in neznani dejavniki. Da bi dosegli čim večjo specifičnost in zadostno količino produkta PCR je potrebno optimizirati pogoje reakcije. Optimalne pogoje je za pomnoževanje posameznega odseka DNA potrebno določiti eksperimentalno. Pri optimizaciji reakcije PCR tako spreminjamo sestavo reakcijske zmesi ter pogoje pomnoževanja (temperaturo in čas trajanja posameznih stopenj v fazi cikličnega pomnoževanja).

4.1.1 Sestavine reakcijske zmesi

Pufer

S pufrom vzdržujemo ustrezen pH in ionsko moč reakcijske zmesi. Sestave puфра ne spreminjamo, saj pufer, ki ga dobimo v kompletu s polimerazo, omogoča njeno optimalno delovanje. Uporabljali smo 10× Gold pufer, ki vsebuje 150 mM Tris-HCl, 500 mM KCl in ima pH 8.0. Zmerne koncentracije KCl v reakcijski zmesi izboljšajo prileganje oligonukleotidnih začetnikov, višje koncentracije (nad 50 mM) pa inhibirajo aktivnost *Taq* polimeraze.

Oligonukleotidni začetniki

Z oligonukleotidnimi začetniki, ki so navadno dolgi od 18 do 28 bp, omejimo odsek DNA, ki ga nameravamo pomnožiti. Pri izbiri se izogibamo komplementarnosti baz znotraj posameznega oligonukleotidnega začetnika kot tudi komplementarnosti med istosmernim in protismernim oligonukleotidnim začetnikom. Tako zmanjšamo možnosti za tvorbo dimerov, ki znižujejo količino želenega PCR produkta. Za posamezen oligonukleotidni začetnik je priporočljiva 50 – 60 % vsebnost G/C nukleotidov. Par oligonukleotidnih začetnikov, ki ga uporabimo, mora imeti podobno temperaturo tališča (T_m med 55 in 80 °C), kar v praksi pomeni približno enako temperaturo prileganja (T_a). V splošnem velja, da je 0,1 – 0,5 $\mu\text{mol/L}$ optimalna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov. Višje koncentracije lahko vodijo v prileganje na ne povsem komplementarnih mestih, kar

posledično pomeni nastanek nespecifičnih produktov. Nespecifični produkti pa so prav tako kot dimeri tudi sami substrat za PCR in tako s pravimi produkti tekmujejo za encim, dNTP in oligonukleotidne začetnike. Vse to pa vodi v manj želenega produkta PCR.

dNTP-ji

Optimalno ravnotežje med količino produkta ter specifičnostjo in natančnostjo PCR reakcije zagotavljajo koncentracije dNTP med 20 in 200 μM . Pomembno je, da uporabimo enake, ne previsoke koncentracije vseh štirih dNTP, saj tako zmanjšamo možnost napačnega vgrajevanja baz.

MgCl₂

Prosti Mg²⁺ ioni so kofaktor *Taq* polimeraze in tako vplivajo na aktivnost encima. Prenizke in tudi previsoke koncentracije MgCl₂ zmanjšujejo aktivnost *Taq* polimeraze in tako vodijo v majhne količine produkta PCR. Koncentracija Mg²⁺ vpliva tudi na prileganje oligonukleotidnih začetnikov, na temperaturo disociacije verig dvojnovijačne DNA (vzorčne in tudi produktov PCR), na specifičnost produkta in tvorbo dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Ustrezna koncentracija Mg²⁺ je odvisna od sestave reakcijske zmesi, predvsem od koncentracije dNTP in prisotnosti drugih kelatorjev (EDTA), ki lahko vežejo Mg²⁺. Ob skupni 800 μM koncentraciji dNTP je priporočljiva koncentracija MgCl₂ med 1 in 4 mmol/L. Ustrezno koncentracijo je potrebno določiti empirično.

Taq polimeraza

Taq DNA polimeraza je termostabilen encim, ki prenese ponavljajočo se izpostavljenost visokim temperaturam, ki so potrebne za razklenitev dvojne vijačnice. Njena vloga je dodajanje dNTP-jev na 3'-OH konec polinukleotidne verige in s tem izgradnja komplementarne verige, ki poteka po pravilu baznega parjenja v smeri 5' – 3'. Za pravilno delovanje encima je potrebno zagotoviti kar se da optimalne pogoje, saj *Taq* DNA polimeraza nima 3' – 5' eksonukleazne aktivnosti (popravljalnega mehanizma). Priporočene koncentracije encima so 1 – 2,5 enot na 100 μL reakcijske zmesi. Prenizke koncentracije ne dajejo zadostne količine produkta, previsoke pa povzročijo nastanek nespecifičnih produktov.

DNA

Bistveno prednost reakcije PCR pred klasičnimi tehnikami molekularne biologije predstavlja dejstvo, da za izvedbo PCR potrebujemo zelo malo vzorca – zadošča že ena sama nepoškodovana molekula DNA, ki vsebuje odsek, ki ga želimo namnožiti. Pomembna pa je kvaliteta izolirane DNA. Morebitne prisotne nečistote, ki lahko predstavljajo inhibitorje *Taq* polimeraze, morajo biti dovolj razredčene, da ne vplivajo na aktivnost encima in s tem na izkoristek reakcije (25, 37, 38).

4.1.2 Pogoji pomnoževanja

Temperatura in čas denaturacije DNA

Najpogostejši vzrok neuspešne reakcije PCR je nepopolna denaturacija dvojnoverižne DNA (vzorčne ali že produktov PCR). Priporočeni pogoji denaturacije so 95 °C 30 sekund ali 97 °C 15 sekund. Prenizka temperatura vodi do nepopolne denaturacije in renaturacije, tako da oligonukleotidni začetniki nimajo dostopa do vezavnega mesta. Previsoka temperatura pa prav tako kot predolg čas denaturacije znižuje aktivnost *Taq* polimeraze.

Temperatura in čas prileganja oligonukleotidnih začetnikov

Temperatura in trajanje te stopnje zavisi od dolžine, sestave in koncentracije oligonukleotidnih začetnikov. Pri določanju temperature si pomagamo s smernico, da naj bi bila temperatura prileganja (T_a) 5 °C nižja od temperature tališča (T_m) oligonukleotidnih začetnikov. Dobre rezultate lahko pričakujemo, če je temperatura prileganja med 55 in 72 °C. Nižje temperature vodijo v nespecifično prileganje oligonukleotidnih začetnikov, pri previsoki temperaturi pa je prileganje manj učinkovito. Z rahlim višanjem temperature prileganja (kolikor še dopušča T_m) lahko povečamo specifičnost produktov.

Čas podaljševanja nastajajoče verige DNA

Čas podaljševanja oligonukleotidnih začetnikov je odvisen od dolžine in koncentracije pomnoževanega odseka ter od temperature. Običajno poteka pri 72 °C, saj je ta temperatura za aktivnost *Taq* polimeraze optimalna.

Število ciklov

Ko imamo optimizirane ostale parametre, je število ciklov odvisno predvsem od začetne koncentracije vzorčne DNA. Premalo ciklov znižuje izkoristek reakcije, preveč pa poveča količino nespecifičnih produktov (37).

4.1.3 Optimizacija pomnoževanja 483 bp dolgega odseka gena CTNNB1

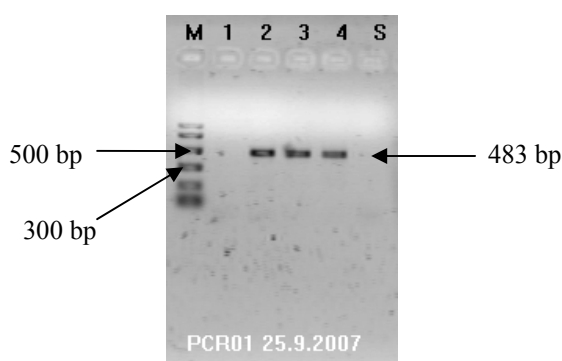
Pomnoževali smo 483 bp dolg fragment, pri katerem se začetnih 307 bp nahaja v intronu 2, ostalih 176 bp v 3. eksonu gena CTNNB1. Namen pomnoževanja tega odseka je bil pridobiti dovolj produkta PCR za nadaljnjo analizo RFLP, s katero smo ugotavljali genotip za mutaciji 94 G>T in 101 G>T, ki se nahajata v 3. eksonu.

Oligonukleotidna začetnika smo na osnovi objavljenega zaporedja oblikovali s pomočjo računalniškega programa Primer3. Njune značilnosti so predstavljene v preglednici III.

Pri sestavi reakcijske zmesi smo upoštevali smernice, ki so navedene v poglavju 4.1.1. Uporabili smo 10× Gold pufer, ki omogoča optimalno delovanje *Taq* polimeraze in ga za 20 µL končni volumen reakcijske zmesi dodali 2 µL. V zmesi smo tako imeli 50 mM KCl, kar še ne deluje inhibitorno na *Taq* polimerazo. V reakcijsko zmes smo dodali po 2 µL vsakega oligonukleotidnega začetnika, kar ustreza končni koncentraciji 0,5 µmol/L in 2 µL dNTP, kar pomeni 200 mmol/L posameznega dNTP v končnem volumnu 20 µL. Da bi dobili zadostne količine produkta PCR, smo v reakcijsko zmes dodali največjo priporočeno količino *Taq* polimeraze, in sicer 0,1 µL oziroma 0,5 enote encima. Za posamezno reakcijo PCR smo uporabili 1,5 µL vzorčne DNA. Količino MgCl₂ smo določili empirično. Glede na skupno koncentracijo dNTP, ki znaša 800 µM, smo pripravili štiri reakcijske zmesi in ob konstantnih koncentracijah ostalih sestavin spreminjali koncentracijo MgCl₂ od 1 do 4 mmol/L. V reakcijske zmesi smo tako dodali 0,8, 1,6, 2,4 in 3,2 µL MgCl₂ in glede na končni volumen 20 µL prilagodili volumen ultra čiste vode.

Pri pogojih pomnoževanja je bilo potrebno določiti le temperaturo prileganja oligonukleotidnih začetnikov, saj denaturacija običajno poteka pri 95 °C, podaljševanje nastajajoče verige pa pri 72 °C, kjer je delovanje *Taq* polimeraze optimalno. Glede na priporočila, opisana v poglavju 4.1.2, smo za prileganje oligonukleotidnih začetnikov določili temperaturo 57 °C.

Uspešnost reakcije PCR smo za določeno sestavo reakcijske zmesi in izbrane pogoje pomnoževanja preverili z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu z vgrajenim ETBr. Negativno nabite molekule DNA pod vplivom električnega toka potujejo proti pozitivni anodi. Ob srečanju z molekulo ETBr se le-ta zaradi svoje planarne strukture vgradi med bazne pare dvojne vijačnice. Pod UV svetlobo valovne dolžine 302 nm interkalirani etidijev ion emitira oranžno svetlobo bolj intenzivno od prostega. Z UV dokumentacijskim sistemom lahko tako detektiramo intenziteto in položaj lis, kar nam pove količino nastalega produkta PCR in morebitno prisotnost nespecifičnih produktov.



Slika 13: Optimizacija koncentracije $MgCl_2$. 1 mM koncentracija $MgCl_2$ je prenizka in ne omogoča poteka reakcije, 2, 3 in 4 mM koncentracije pa dajejo ustrezne PCR produkte.

Legenda: M - označevalec dolžin fragmentov DNA, ki vsebuje fragmente velikosti 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 bp, S – negativna kontrola (slepi vzorec brez DNA), 1, 2, 3, 4 – številke označujejo koncentracijo $MgCl_2$ v posamezni reakcijski zmesi.

Za nadaljnje reakcije PCR smo izbrali sestavo reakcijske zmesi, v kateri je 1,6 μ L oziroma 2 mmol/L $MgCl_2$ in temu ustrezna količina ultra čiste vode. Pogojev pomnoževanja nismo spreminjali, saj smo z izbranimi dosegli dober rezultat.

Končna sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje 483 bp dolgega odseka je prikazana v preglednici V, pogoji pomnoževanja pa v preglednici VI v poglavju 3.3.3.

4.1.4 Optimizacija pomnoževanja 409 bp dolgega odseka gena CTNNB1

Pomnoževali smo 409 bp dolg fragment, ki se začne v 5. eksonu in obsega njegovih zadnjih 76 bp, celoten intron 5, ki je dolg 87 bp ter celoten 6. ekson, ki vsebuje 202 bp. Konča se v intronu 6 in obsega njegovih začetnih 44 bp. Namen pomnoževanja tega

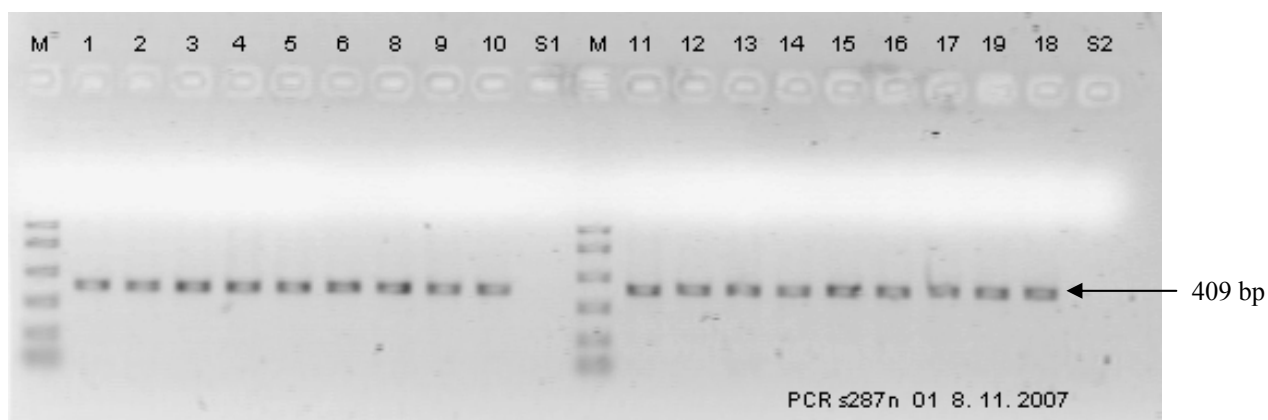
odseka je bil pridobiti dovolj produkta PCR za nadaljnjo analizo RFLP, s katero smo ugotavljali prisotnost mutacije 860 A>G, ki se nahaja v 6. eksonu gena za β -katenin.

Oligonukleotidna začetnika smo na osnovi objavljenega zaporedja oblikovali s pomočjo računalniškega programa Primer3. Njune značilnosti so predstavljene v preglednici IV. Kljub nekoliko večji razliki v njihovih T_m nismo imeli težav pri pomnoževanju.

Pri določanju sestave reakcijske zmesi smo upoštevali priporočila, ki so predstavljena v poglavju 4.1.1. Prav tako kot pri pomnoževanju 483 bp dolgega odseka je bil končni volumen reakcijske zmesi 20 μ L. Enaka je bila tudi sestava reakcijske zmesi. Empirično smo določali le koncentracijo $MgCl_2$. V tem primeru smo izbrali 3 mM oziroma 2,4 μ L $MgCl_2$ in temu ustrezno količino ultra čiste vode.

Pogoji pomnoževanja se razlikujejo le v nekoliko nižji temperaturi prileganja oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jo določili glede na njihovi T_m . Prileganje oligonukleotidnih začetnikov je potekalo pri 54 °C, kar je nižja temperatura od splošno priporočene, vendar se je izkazala za primerno, saj ni bilo opaznih nespecifičnih produktov, količina pomnoževanega fragmenta pa je bila zadovoljiva.

Končna sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje 409 bp dolgega odseka gena CTNNB1 je prikazana v preglednici V, pogoji pomnoževanja pa v preglednici VI v poglavju 3.3.3.



Slika 14: Primer agarozne gelske elektroforeze 409 bp dolgih produktov reakcije PCR.

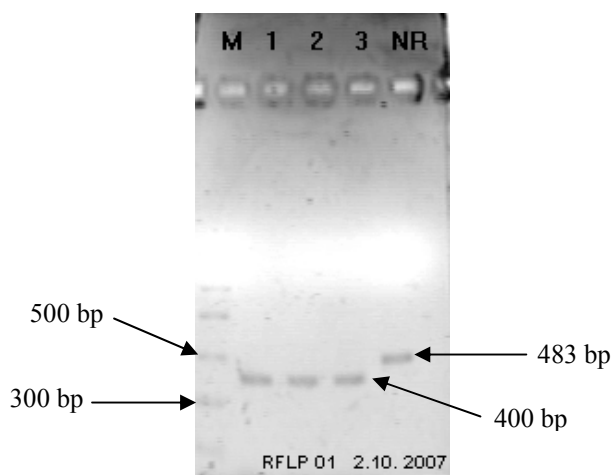
Legenda: M – označevalec velikosti odsekov DNA, ki vsebuje fragmente velikosti 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 bp, S – negativna kontrola (slepi vzorec brez DNA).

4.2 OPTIMIZACIJA IN REZULTATI ANALIZ RFLP

Ustrezno restrikcijsko endonukleazo za posamezno genotipizacijo smo izbrali s pomočjo računalniškega programa NEBcutter V2.0. Optimalne pogoje za delovanje vsakega encima (ustrezen pufer, dodatek BSA, temperatura in čas inkubacije) poda proizvajalec.

4.2.1 Optimizacija in rezultati *Rsa* I – RFLP analize

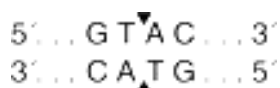
Optimizacija ni bila potrebna, saj smo s prvotno določeno sestavo reakcijske zmesi in pogoji elektroforeze dosegli dobro ločljivost posameznih lis. Sestava reakcijske zmesi je prikazana v preglednici VII v poglavju 3.4.1.1. Elektroforezna ločba na 2 % agaroznem gelu z vgrajenim ETBr je potekala 40 minut pri stalni napetosti 100 V.



Slika 15: Rezultati *Rsa* I - RFLP analize 483 bp dolgega fragmenta na 2 % agaroznem gelu.

Legenda: M – označevalec velikosti odsekov DNA, ki vsebuje fragmente velikosti 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 bp, NR – nerazcepljen produkt PCR (produkt PCR, ki ni bil izpostavljen delovanju restrikcijske endonukleaze), 1, 2, 3 – oznake vzorcev.

Rsa I prepozna naslednje zaporedje nukleotidov in ga na označenih mestih cepi (30):



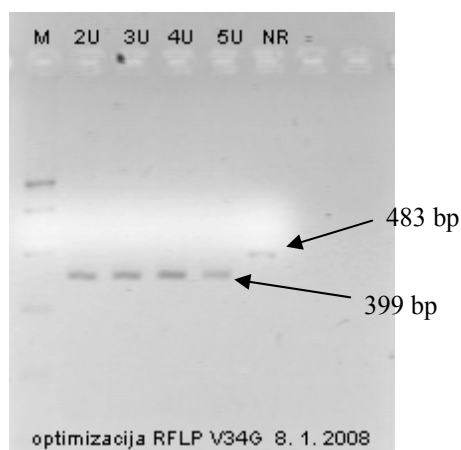
Ne glede na prisotnost mutacije 94 G>T restriksijska endonukleaza *Rsa* I razcepi 483 bp dolg odsek na dva dela, saj je v intronu 2 prisotno konstitutivno cepitveno mesto, ki se ne spreminja in je prisotno pri vseh ljudeh. Cepitev odseka na 400 in 83 bp dolga fragmenta je tako interna kontrola, da je restrikcija res potekla.

Pri homozigotnih osebah brez mutacije (genotip GG) poteče restrikcija le na konstitutivnem cepitvenem mestu in tako dobimo dva fragmenta, dolga 400 in 83 bp. Pri heterozigotih (genotip TG) je dodatno restriksijsko mesto, ki ga uvede mutacija 94 G>T, prisotno le na enem alelu. Po restrikciji dobimo zato štiri fragmente, dolge 400, 305, 95 in 83 bp. Homozigoti z mutacijo (genotip TT) imajo dodatno restriksijsko mesto na obeh alelih in rezultat restrikcije so trije fragmenti, dolgi 305, 95 in 83 bp.

Dejstvo, da odseki velikosti 95 in 83 bp niso vidni, ker pri izbranih pogojih elektroforeze že zapustijo gel, ne moti analize. Genotip lahko pravilno določimo že glede na prisotnost 400 in 305 bp dolgih fragmentov.

4.2.2 Optimizacija in rezultati *Xmn* I – RFLP analize

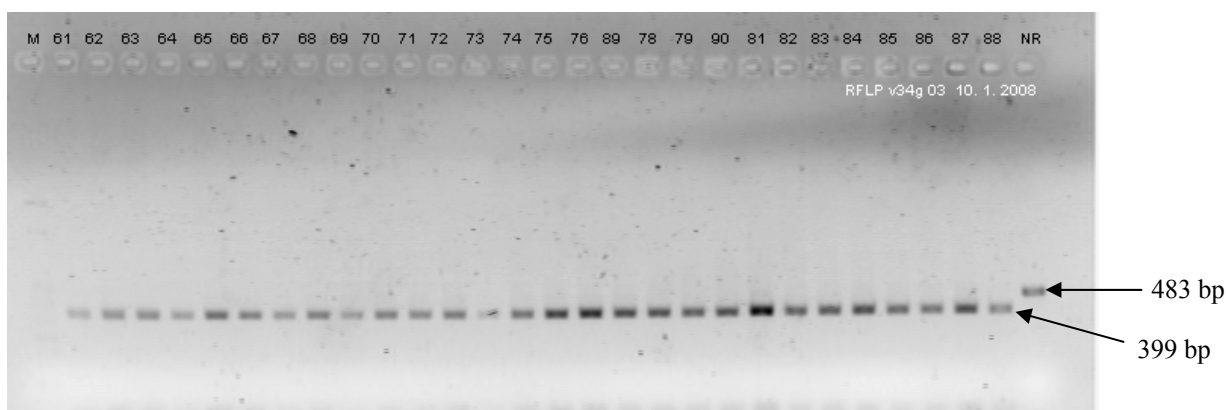
Z optimizacijo sestave reakcijske zmesi smo želeli določiti najnižjo koncentracijo encima, ki še omogoča popolno restrikcijo. V štiri različne mikrocentrifugirke smo ob konstantni količini pufru NEB2, BSA in produkta PCR istega vzorca, dodajali različne koncentracije encima (2 – 5 enot) in temu primerne količine vode. Titracija encima je pokazala, da so primerne 2, 3 ali 4 enote restriksijske endonukleaze *Xmn* I v posamezni reakcijski zmesi. Izbrana končna sestava je prikazana v preglednici VIII v poglavju 3.4.1.2. Elektroforezna ločba na 3 % agaroznem gelu z vgrajenim ETBr je potekala 40 minut pri stalni napetosti 100 V.



Slika 16: Titracija restrikcijske endonukleaze *Xmn* I za analizo RFLP.

Legenda: M – označevalec velikosti odsekov DNA, ki vsebuje fragmente velikosti 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 bp, NR – nerazcepljen produkt PCR, 2U, 3U, 4U in 5U – enote encima, ki ustrezajo 0.1 μ L, 0.15 μ L, 0.2 μ L in 0.25 μ L encima.

Lise produktov restrikcije in nerestringiranega vzorca so se dobro ločile, vendar pa je produkt PCR, ki ni bil podvržen encimu in nam je služil kot negativna kontrola, pri pogojih elektroforeze v 40 minutah prepotoval podobno pot kot barvilo v nanašalnem pufu. Lise ksilencianola bi tako prekrivale lise nerestringiranih vzorcev, kar bi lahko motilo določanje genotipov. Zato smo namesto ksilencianola v nanašalnem pufu v nadaljnjih analizah uporabljali bromfenol modro.



Slika 17: Rezultati *Xmn* I - RFLP analize 483 bp dolgega fragmenta na 3 % agaroznem gelu.

Legenda: M – označevalec velikosti odsekov DNA, ki vsebuje fragmente velikosti 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 bp, NR – nerazcepljen produkt PCR (produkt PCR, ki ni bil izpostavljen delovanju restrikcijske endonukleaze), 61-89 – oznake vzorcev.

Xmn I prepozna naslednje zaporedje nukleotidov in ga na označenih mestih cepi (32):

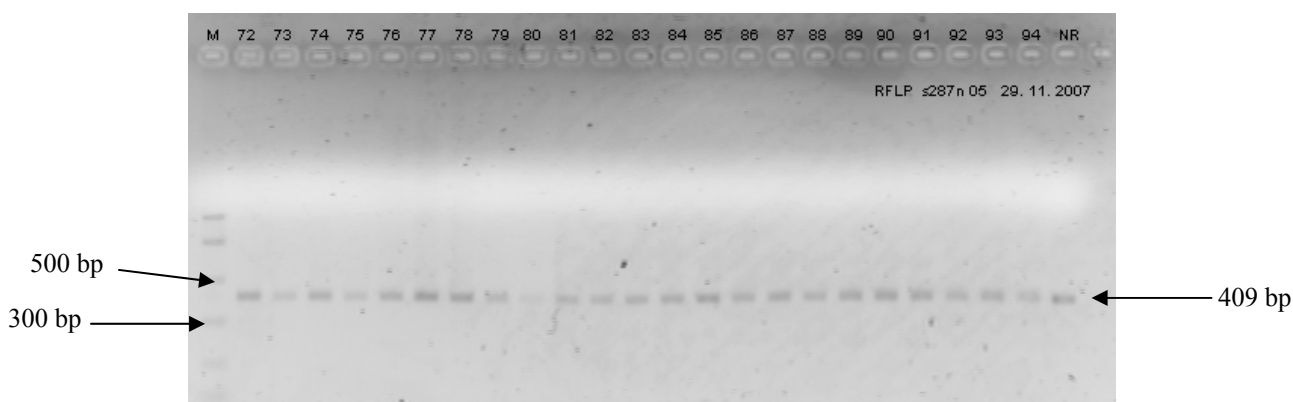


V primeru odsotnosti mutacije 101 G>T restriksijska endonukleaza *Xmn* I prepozna restriksijsko mesto in cepi 483 bp dolg odsek na dva dela, dolga 399 in 84 bp. Če je mutacija prisotna pa *Xmn* I zaradi transverzije G v T ne prepozna več vezavnega mesta in do cepitve ne pride. Pri homozigotnih osebah brez mutacije (genotip GG), ki imajo restriksijsko mesto prisotno na obeh alelih, kot rezultat analize RFLP pričakujemo dva fragmenta, dolga 399 in 84 bp. Heterozigoti (genotip GT) imajo restriksijsko mesto le na enem alelu, zato po restrikciji poleg fragmentov dolgih 399 in 84 bp dobimo tudi nerazcepljen odsek velikosti 483 bp. Pri homozigotnih osebah z mutacijo (genotip TT), pri katerih je zaradi transverzije G v T vezavno mesto za restriksijsko endonukleazo *Xmn* I neprepoznavno na obeh alelih, pa je rezultat analize RFLP ena lisa, nerazcepljen produkt PCR velikosti 483 bp.

Tudi pri analizi RFLP z restriksijsko endonukleazo *Xmn* I so najmanjši fragmenti velikosti 84 bp slabo vidni, saj pri pogojih elektroforeze po 40 minutah že zapuščajo gel. Poleg tega pa prepotujejo podobno razdaljo kot barvilo bromfenol modro v nanašalnem puftru. Kljub temu pa lahko določimo genotip posameznega vzorca, saj je za pravilno genotipizacijo dovolj, če vidimo odseka velikosti 399 in 483 bp.

4.2.3 Optimizacija in rezultati Dde I – RFLP analize

Optimizacija ni bila potrebna, saj smo s prvotno določeno sestavo reakcijske zmesi in pogoji elektroforeze dosegli zadovoljivo ločljivost posameznih lis. Sestava reakcijske zmesi je prikazana v preglednici IX v poglavju 3.4.2.1. Elektroforezna ločba na 3 % agaroznem gelu z vgrajenim ETBr je potekala 40 minut pri stalni napetosti 100 V.



Slika 18: Rezultati *Dde* I-RFLP analize 409 bp dolgega fragmenta na 3 % agaroznem gelu.

Legenda: M – označevalec velikosti odsekov DNA, ki vsebuje fragmente velikosti 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 bp, NR – nerazcepljen produkt PCR (produkt PCR, ki ni bil izpostavljen delovanju restrikcijske endonukleaze), 72-94 – oznake vzorcev.

Dde I prepozna naslednje zaporedje nukleotidov in ga na označenih mestih cepi (34):



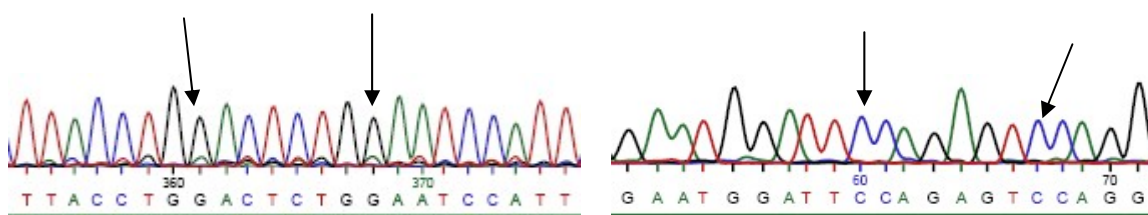
Prisotnost mutacije 860 A>G v 6. eksonu gena za β -katenin uvede restrikcijsko mesto za *Dde* I, ki razcepi 409 bp dolg fragment na odseka velikosti 285 in 124 bp. Rezultat analize RFLP ob odsotnosti mutacije pa je nerazcepljen 409 bp dolg PCR produkt. Pri homozigotnih osebah brez mutacije (genotip AA) po restrikciji tako dobimo le eno liso, ki predstavlja nerazcepljen 409 bp dolg odsek. Pri heterozigotih (genotip AG), ki imajo zaradi tranzicije A v G na enem alelu uvedeno restrikcijsko mesto za encim *Dde* I, po končani RFLP analizi dobimo tri fragmente velikosti 409, 285 in 124 bp. Homozigotne osebe z mutacijo (genotip GG) pa zaradi cepitvenega mesta, ki je uvedeno na obeh alalih, kot rezultat restrikcije dajo dva fragmenta, dolga 285 in 124 bp.

Rezultati vseh analiz RFLP z restrikcijskimi endonukleazami *Rsa* I, *Xmn* I in *Dde* I pri 117 preiskovankah so prikazani v prilogi 2. Pri nobeni analizi ni bila odkrita nobena mutacija. Vse preiskovanke imajo torej enak genotip na vseh treh polimorfnih mestih, ki smo jih preučevali.

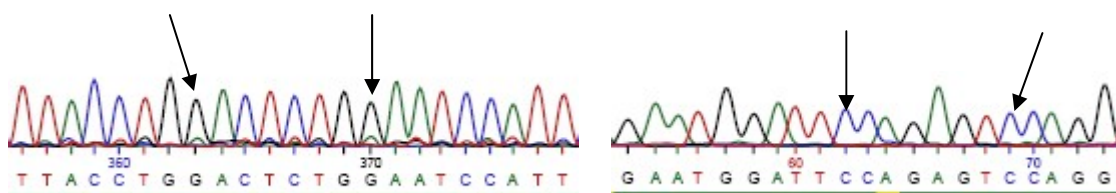
4.3 SEKVENČNA ANALIZA

Trem vzorcem, označenim s številkami 10, 35 in 84, smo z reakcijo PCR pomnožili preučevana odseka gena CTNNB1 in jim s sekvenčno analizo (poglavje 3.5) določili nukleotidno zaporedje. Za ta namen smo reakcijo PCR izvedli v dvojnikih – v reakcijsko zmes za pomnoževanje 483 bp dolgega odseka za molekularno analizo mutacij v 3. eksonu smo ločeno dodali istosmerni oligonukleotidni začetnik bKAT-Y32DF in protismerni oligonuklotidni začetnik bKAT-Y32DR. Tudi pri pomnoževanju 409 bp dolgega

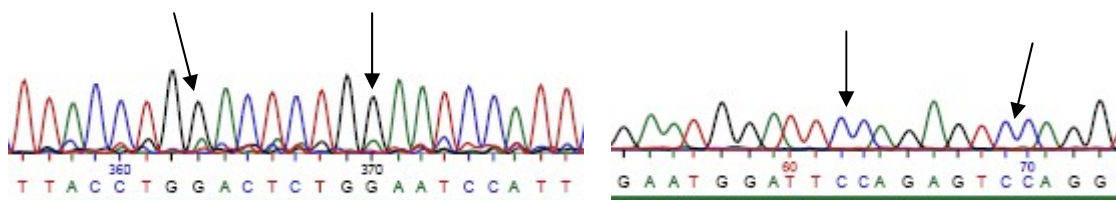
fragmenta, ki omogoča molekularno analizo mutacije v 6. eksonu, smo v posamezno reakcijsko zmes dodali samo istosmerni bKAT-S287NF oziroma protismerni oligonukleotidni začetnik bKAT-S287NR. Rezultate sekvenčne analize smo primerjali z zaporedjem, ki je shranjeno v genski banki in naj bi veljalo za zdravega človeka. Objavljeno zaporedje gena CTNNB1 označuje mesti 94 in 101, ki se nahajata v 3. eksonu, kot polimorfni. Tu je tako lahko prisoten G (gvanin) ali T (timin). S sekvenčno analizo smo potrdili prisotnost 94 G in 101 G na obeh alelih pri vseh treh vzorcih. S tem smo poleg potrditve, da smo z reakcijo PCR pomnoževali pravi odsek DNA, dobili tudi delno potrditev ustreznosti genotipizacije z analizo RFLP. Prav tako je polimorfno mesto v objavljenem nukleotidnem zaporedju tudi 860. mesto v 6. eksonu gena CTNNB1. Tu je lahko A (adenin) ali pa G (gvanin). Spet smo pri vseh treh vzorcih, na katerih so izvedli sekveniranje, potrdili ustreznost pomnoževanega zaporedja in tudi analize RFLP, s katero smo vsem preiskovankam določili enak genotip.



Slika 19: Rezultati sekvenčne analize 3. eksona gena CTNNB1 (vzorec 10).

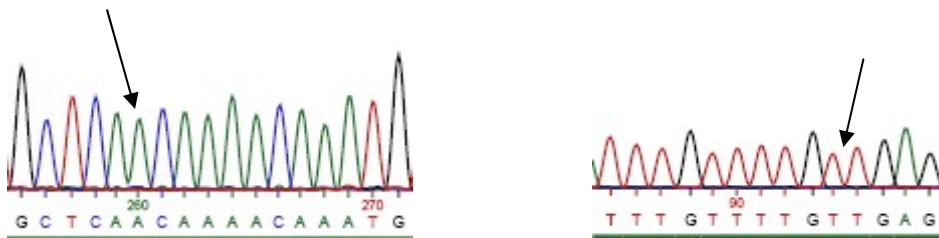


Slika 20: Rezultati sekvenčne analize 3. eksona gena CTNNB1 (vzorec 35).

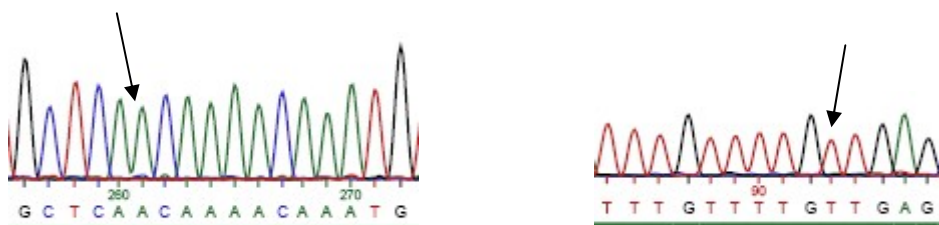


Slika 21: Rezultati sekvenčne analize 3. eksona gena CTNNB1 (vzorec 84).

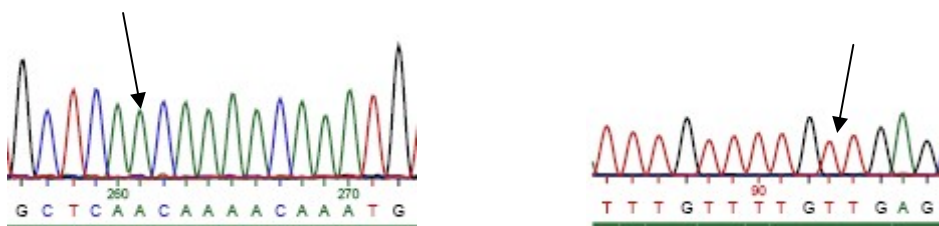
Legenda: Slike na levi strani prikazujejo rezultate sekvenčne analize v primeru uporabe istosmerne oligonukleotidnega začetnika bKAT-Y32DF, slike na desni strani pa rezultate sekvenčne analize ob uporabi protismerne oligonukleotidnega začetnika bKAT-Y32DR. Puščice prikazujejo preučevani polimorfni mesti 94 in 101 v 3. eksonu gena za β -katenin.



Slika 22: Rezultati sekvenčne analize 6. eksona gena CTNNB1 (vzorec 10).



Slika 23: Rezultati sekvenčne analize 6. eksona gena CTNNB1 (vzorec 35).



Slika 24: Rezultati sekvenčne analize 6. eksona gena CTNNB1 (vzorec 84).

Legenda: Slike na levi strani prikazujejo rezultate sekvenčne analize v primeru uporabe istosmerne oligonukleotidnega začetnika bKAT-S287NF, slike na desni strani pa rezultate sekvenčne analize ob uporabi protismerne oligonukleotidnega začetnika bKAT-S287NR. Puščice prikazujejo preučevano polimorfno mesto 860 v 6. eksonu gena za β -katenin.

4.4 KLINIČNI POMEN MUTACIJ 94 G>T, 101 G>T IN 860 A>G

V okviru diplomskega dela smo izvedli molekularno analizo 3. in 6. eksona gena za β -katenin. β -katenin je komponenta signalne poti Wnt / β -katenin, ki s svojo aktivnostjo preko različnih mehanizmov spodbuja razmnoževanje in dozorevanje osteoblastov. Gen CTNNB1, ki kodira β -katenin, bi tako lahko vplival na nivo kostne mase in je zato primeren kandidatni gen za preučevanje kostnih bolezni. Ugotavljali smo prisotnost dveh SNP v 3. in enega SNP v 6. eksonu tega gena. Zamenjave nukleotidov spremenijo aminokislinsko zaporedje β -katenina, in sicer: transverzija 94 G>T v 3. eksonu gena zamenja asparaginsko kislino s tirozinom na 32. mestu (D32Y), transverzija 101 G>T povzroči zamenjavo glicina z valinom na 34. mestu (G34V) ter tranzicija 860 A>G zamenjavo asparagina s serinom na 287. mestu (N287S).

Mutaciji D32Y in G34V se nahajata v predelu β -katenina, kjer poteka njegova fosforilacija z GSK-3 β in lahko to fosforilacijo preprečijo. Posledica je stabilizacija β -katenina in njegova konstantna prisotnost v jedru, kar vpliva na ekspresijo tarčnih genov, npr. protoonkogen *myc* in gena za ciklin D. Protoonkogen *myc* kodira jedrne beljakovine, ki sodelujejo pri podvajanju in prepisovanju DNA. Ob stalni prisotnosti β -katenina v jedru pride do konstantne ekspresije tega gena in s tem do neprestane delitve celic. Tarčni gen signalne poti Wnt / β -katenin je tudi gen za ciklin D. Ciklin D sodeluje pri uravnavanju celičnega ciklusa in omogoča prehod celice iz ene v drugo fazo ($G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$). Stalna prisotnost β -katenina v jedru lahko povzroči njegovo prekomerno aktivnost in s tem nenadzorovano proliferacijo (18).

Dokazali so, da mutaciji D32Y in G34V lahko vodita v nastanek različnih tumorjev. Prisotnost mutacij 94 G>T in 101 G>T v 3. eksonu gena CTNNB1 so tako potrdili pri nekaterih primerih hepatoblastoma in hepatocelularnega karcinoma ter pilomatrikoma (13, 17). Obe mutaciji, 94 G>T (D32Y) in 101 G>T (G34V), so odkrili pri hepatoblastomu pri dojenčkih in tudi v nekaterih primerih pilomatrikoma. Mutacija D32Y je bila prisotna pri 1 od 16 (6,25 %) preučevanih primerov pilomatrikoma, mutacija G34V pa pri 3 od 11 (27, 3 %) preučevanih pilomatrikomov (17).

Glede na dejstvo, da gre pri nastanku tumorjev za aktivirajoče mutacije, katerih posledica je stabilizacija β -katenina, bi lahko glede na učinke, ki jih ima signalna pot Wnt / β -katenin v kosteh, sklepali, da prisotnost teh istih mutacij povzroča tudi pospešeno kostno

tvorbo. Tega pa z našo študijo nismo mogli potrditi, saj nismo odkrili nobene od teh mutacij pri nobeni od preiskovank.

V primeru tranzicije 860 A>G v 6. eksonu gena CTNNB1 bi se v β -katenin na mestu 287 namesto asparagina vgradil serin (N287S). Ta sprememba v aminokislinskem zaporedju se nahaja znotraj 4. armadillo ponovitve, kjer je vezavno mesto za APC. Mutacija N287S je bila odkrita pri kolorektalnem karcinomu in sicer pri 1 od 124 (0,8 %) preučevanih primerov, vendar pa je bila prisotna tudi pri 3 izmed 483 (0,6 %) zdravih preiskovancev v kontrolni skupini (39).

Ker gre pri nastankih tumorjev za aktivirajoče mutacije, ki povzročajo citoplazemsko kumulacijo β -katenina in posledično njegovo translokacijo v jedro, lahko sklepamo, da spremenjeno zaporedje aminokislin onemogoči tvorbo kompleksa APC / Axin / β -katenin / GSK-3 β in na ta način prepreči fosforilacijo in proteosomno razgradnjo β -katenina. Če kompleks ne nastane, je namreč inhibirana aktivnost GSK-3 β . Tudi ta mutacija torej privede do stalne prisotnosti β -katenina v jedru in poveča ekspresijo tarčnih genov ter stimulira proliferacijo celic. Po istem principu bi mutacija 860 A>G v 6. eksonu gena CTNNB1 lahko povečala razmnoževanje osteoblastov in s tem kostno tvorbo.

Če bi potrdili povezanost teh treh mutacij s pospešeno kostno tvorbo, bi se odprle možnosti za anabolno terapijo osteoporoze, saj bi z aktivacijo signalne poti Wnt / β -katenin lahko spodbudili kostno tvorbo. Vendar pa je sistemska aktivacija Wnt / β -katenin signalne poti problematična zaradi nevarnosti nastanka različnih tumorjev. Da bi se izognili neželenim učinkom v drugih tkivih, bi morala biti njena aktivacija omejena na kosti. Temu cilju so se zaenkrat najbolj približali z uporabo monoklonskih protiteles proti Dkk in sklerostinu, ki sta zunajcelična inhibitorja signalne poti Wnt / β -katenin, njuna ekspresija pa je omejena skoraj izključno na osteoblaste in osteocite. Učinkovitost protiteles so že vrednotili s predkliničnimi študijami, v terapiji osteoporoze pa se zaenkrat uporabljajo večinoma samo zdravila, ki zavirajo resorpcijo kosti (5).

Aktivacija signalne poti Wnt / β -katenin poleg spodbujanja kostne tvorbe posredno zavira tudi razgradnjo kostnine, saj stimulira ekspresijo OPG (osteoprotegerina), ki deluje kot inhibitor diferenciacije in aktivacije osteoklastov. Če bi preučevane mutacije res povzročile konstantno aktivacijo signalne poti Wnt / β -katenin, bi lahko bile zaradi povečane ekspresije OPG onemogočene interakcije med RANK in RANKL, ki so nujne za osteoklastogenezo (7, 10). Poleg spodbujene kostne tvorbe bi na ta način prišlo tudi do zaviranja kostne

resorpcije. Ob prisotnosti mutacij D32Y, G34V in N287S bi tako bila manjša verjetnost za izgubljanje kostne mase, kar pa je pomemben faktor za razvoj osteoporoze.

Vendar pa pri našem delu nismo odkrili nobene izmed mutacij 94 G>T, 101 G>T ali 860 A>G. V računalniški bazi podatkov SNP Database so vsa analizirana mesta označena kot polimorfna, vendar frekvenca pojava polimorfizmov ni znana. Polimorfnost preučevanih mest so dokazale tudi študije teh mutacij v primerih različnih tumorjev.

Možno je, da so te mutacije zelo redke in da jih zato v naši skupini 117-ih preiskovank nismo zajeli. Če pa upoštevamo dogovor, da je neko mesto polimorfno, če se pojavlja na dveh alelih pri vsaj 1 % populacije, na enem alelu pa pri 2 %, bi v preučevani populaciji lahko pričakovali 1 do 3 preiskovanke z vsaj eno mutacijo vsaj v heterozigotnem stanju. Zanimiva bi bila primerjava s študijo na moški populaciji in s podobnimi študijami v tujini, predvsem s tistimi, ki bi analizirale osebe druge rase.

5 SKLEP

Namen našega dela je bila molekularna analiza dela 3. eksona gena za β -katenin, kjer smo preučevali prisotnost mutacij 94 G>T (D32Y) in 101 G>T (G34V) in dela 6. eksona, znotraj katerega smo preučevali mutacijo 860 A>G (N287S). Želeli smo določiti pogostnost preučevanih mutacij ter njihov vpliv na mineralno gostoto kosti in s tem klinični pomen za razvoj osteoporoze.

V raziskavo smo vključili 117 preiskovank, med katerimi so bile premenopavzne, perimenopavzne in pomenopavzne ženske ter osteoporozne bolnice. Razvili in optimirali smo reakciji PCR, s katerima smo nato pomnožili oba preučevana odseka gena CTNNB1. Na ta način smo pridobili zadostno količino DNA za nadaljnje analize RFLP. Z *Rsa* I - RFLP analizo smo nato vsem preiskovankam določili genotip 94 GG, z *Xmn* I - RFLP analizo smo pri vseh določili genotip 101 GG in z *Dde* I - RFLP analizo vsem genotip 860 AA. Pri nobeni preiskovanki nismo odkrili nobene mutacije, čeprav so v objavljenem nukleotidnem zaporedju gena za β -katenin vsa preiskovana mesta označena kot polimorfna in bi jih tako v vzorcu 117 preiskovank morali zajeti. Pravilnost analiz smo potrdili s sekvenčno analizo na izbranih vzorcih. Tudi v primeru morebitne prisotnosti polimorfizmov je možnost za njihovo povezanost z mineralno kostno gostoto majhna, saj imajo enak genotip tako zdrave preiskovanke kot tudi osteoporozne bolnice.

Zanimivo bi bilo primerjati naše rezultate z izsledki podobnih študij v tujini, še posebno pa z analizami DNA oseb drugih ras. Morebitne nasprotujoče si rezultate bi tako lahko vključili v meta-analizo, s katero bi vse rezultate ponovno ovrednotili, saj je na večji populaciji lažje dokazati majhen vpliv posameznega polimorfizma.

6 LITERATURA

1. Kocijančič A: Metabolne bolezni kosti. V: Kocijančič A, Mravlje F: Interna medicina, EWO d.o.o., Ljubljana, 1993: 653-676.
2. Kocijančič A: Osteoporoza: Diagnostika in zdravljenje. V: Farmacevtski vestnik, 1999; 50: 1-6.
3. Bringhurst FR, Demay MB, Krane SM, Kronenberg HM: Bone and mineral metabolism in health and disease. V: Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Jameson JL, Kasper DL, Longo DL: Harrison's principles of internal medicine, 16th Edition, McGraw-Hill, Medical Publishing Division, New York, 2005: 2238-2249.
4. Morgan EF, Barnes GL, Einhorn TA: The Bone Organ System: Form and Function. V: Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ: Osteoporosis, 3rd Edition, Volume I; Elsevier Academic Press, London, 2008: 3-17.
5. Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP: Mechanisms of Anabolic Therapies for Osteoporosis. *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE* 2007; 357: 905-916.
6. Komori T: Regulation of Osteoblast Differentiation by Transcription Factors. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006; 99: 1233-1239.
7. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM: Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004; 341: 19-39.
8. Johnson ML, Recker RR: Wnt Signaling in Bone. V: Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ: Osteoporosis, 3rd Edition, Volume I; Elsevier Academic Press, London, 2008: 467-481.
9. Koay AM, Brown MA: Genetic disorders of the LRP5 - Wnt signalling pathway affecting the skeleton. *TRENDS in Molecular Medicine* 2005; 11: 129- 137.
10. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA: Regulation of bone mass by Wnt signaling. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116: 1202-1209.
11. Baron R, Rawadi G: Minireview: Targeting the Wnt/beta-Catenin Pathway to Regulate Bone Formation in the Adult Skeleton. *Endocrinology* 2007; 148: 2635-2643.
12. Gregorc U: Vloga membransko vezanih gvanilatnih kinaz v apoptozi. <http://pelin.mf.uni-lj.si/theses-mf/available/etd-02282003-143348/unrestricted/2-gregorc-uvod.pdf>, 24.308

13. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.
<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CTNNB1ID71.html>, 6.3.08
14. Hoover BA: Beta-catenin Mediated Wnt Signaling as a Marker for Characterization of Human Bone Marrow-Derived Connective Tissue Progenitor Cells.
<http://www.jyi.org/research/re.php?id=190>, 6.3.08
15. Ensembl Genome Browser.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/exonview?db=vega;transcript=OTTHUMT00000264256, 31.1.08
16. Polakis P: Wnt signaling and cancer.
<http://www.stanford.edu/~rnusse/arm/bcatmut.html>, 26.3.08
17. OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=116806>, 14.4.08
18. Finderle NČ: Kancerogeneza. V: Ribarič S: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, Ljubljana, 2003: 92-113.
19. Human Nutriton Research: Bone Health.
http://www.mrc-hnr.cam.ac.uk/research/bone_health/pbm.html, 13.3.08
20. Lindsay R, Cosman F: Osteoporosis. V: Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Jameson JL, Kasper DL, Longo DL: Harrison's principles of internal medicine, 16th Edition, McGraw-Hill, Medical Publishing Division, New York, 2005: 2238-2249.
21. Huang QY, Wai Chee Kung A: Genetics of osteoporosis. *Molecular Genetics and Metabolism* 2006; 88: 295-306.
22. Uitterlinden AG, Rivadeneira F, van Leeuwen HPTM, van Meurs JBJ, Pols HAP: Genetic Determinants of Osteoporosis. V: Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ: Osteoporosis, 3rd Edition, Volume I; Elsevier Academic Press, London, 2008: 760-793.
23. Ralston SH, de Crombrughe B: Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes & Development* 2006; 20: 2492-2506.
24. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnost uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55: 215-220.
25. Saiki RK: Amplification of genomic DNA. V: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, 1990: 13-20.
26. Ensembl Genome Browser.

[http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/exonview?db=vega&exon=&transcript=OTTHU
MT00000264256&flanking=50&sscon=25&fullseq=yes&submit=Go](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/exonview?db=vega&exon=&transcript=OTTHU
MT00000264256&flanking=50&sscon=25&fullseq=yes&submit=Go)

27. Kuhelj R: Biokemija v praksi: Načela in tehnike, 2. izdaja, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 1998: 63-82.

28. Agarose Gel Electrophoresis. V: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 6.3-6.19.

29. Restriction and DNA Methylation Enzymes. V: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 5.3-5.13.

30. New England BioLabs: Products, Restriction Endonucleases, *Rsa* I.

www.neb.com/nebecomm/products/productR0167.asp, 5.2.08

31. New England BioLabs: NEBCutter V2.0.

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>, 5.2.08

32. New England BioLabs: Products, Restriction Endonucleases, *Xmn* I.

www.neb.com/nebecomm/products/productR0194.asp, 5.2.08

33. New England BioLabs: Products, Buffers and Supplements.

www.neb.com/nebecomm/products/faqcategory63.asp, 6.2.08

34. New England BioLabs: Products, Restriction Endonucleases, *Dde* I.

www.neb.com/nebecomm/products/productR0175.asp, 7.2.08

35. Štrukelj B. Metodologija in tehnike rekombinantne DNK. Farm vestn 1996; 47: 127-138.

36. SIGMA, ProductInformation, GenElute™ PCR Clean-Up Kit,

<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/na1020bul.pdf>, 18.2.08

37. Optimization of PCR (Modified after Optimization of PCRs from Michael A. Innis and David H. Gelfand in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications 1990)

<http://uwp.edu/~pham/bios453/10pcrintr.pdf>, 24.1.08

38. Applied Biosystems, PCR optimization.

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042520.pdf, 29.1.08

39. Mutation data of the CTNNB1 gene.

<http://mutview.dmb.med.keio.ac.jp/MutationView/jsp/mutview/html/ctnnb1.html>, 16.4.08

7 PRILOGE

7.1 PRILOGA 1: OPIS PREISKOVANK

Preglednica X: Opis preiskovank (starost, teža, višina, ITM, MGK v predelu ledvenih vretenc, vratu stegenice in kolka).

št. vzorca	STAROST	TEŽA	VIŠINA	ITM	BMD L2-L4	BMD NECK	BMD TOT
001	58	67	159	26,5	0,807	0,678	0,847
002	45	65	170	22,5	1,228	0,8	0,897
003	39	51	163	19,2	0,97	0,738	0,918
004	59	54	154	22,8	0,635	0,664	0,82
005	42	56	161	21,6	0,923	0,705	0,829
006	61	63	156	25,9	0,788	0,693	0,878
007	51	72	160	28,1	1,029	0,781	0,968
008	39	67	170	23,2	1,005	0,779	1,037
009	53	71	161	27,4	0,91	0,827	0,944
010	52	94	151	41,2	0,962	0,822	0,981
011	57	103	163	38,8	1,016	0,725	0,861
012	64	92	158	36,9	0,841	0,661	0,823
013	59	90	159	35,6	1,014	0,763	0,891
014	57	64	160	25,0	0,997	0,705	0,829
015	63	63	150	28,0	0,851	0,616	0,784
016	58	67	160	26,2	0,854	0,817	1,021
017	56	78	157	31,6	0,787	0,626	0,825
018	57	70	152	30,3	0,915	0,612	0,749
019	52	54	164	20,1	0,963	0,775	0,823
020	63	66	170	22,8	0,914	0,855	0,995
021	54	80	165	29,4	0,88	0,76	0,934
022	39	81	169	28,4	1,102	0,964	1,086
023	48	59	163	22,2	1,093	0,777	0,967
024	59	83	155	34,5	0,855	0,726	0,907
025	54	55	154	23,2	0,902	0,686	0,87
026	63	54	166	19,6	0,937	0,618	0,668
027	50	68	161	26,2	0,986	0,899	1,048
028	61	65	153	27,8	0,946	0,772	0,922
029	38	54	169	18,9	0,989	0,728	0,837
030	41	62	158,5	24,5	0,913	0,724	0,872
031	42	51	158	20,4	0,99	0,767	0,874
032	51	66,5	164	24,7	1,11	0,872	1,047
033	54	91	163	34,3	0,925	0,723	0,993
034	46	63	168	22,3	0,927	0,833	0,881
035	57	77,5	165	28,5	1,076	0,776	1,014
036	48	77	172	26,0	1,22	1,059	1,27
037	49	55	151	24,1	0,877	0,854	0,944

št. vzorca	STAROST	TEŽA	VIŠINA	ITM	BMD L2-L4	BMD NECK	BMD TOT
038	48	48	155	20,0	0,805	0,712	0,775
039	53	61	157	24,7	0,878	0,751	0,892
040	49	64	158	25,6	1,026	0,759	0,901
041	41	54	161	20,8	0,887	0,604	0,681
042	53	68	163	25,6	1,084	0,845	1,068
043	47	62	162	23,6	0,919	0,839	0,985
044	54	73	169	25,6	0,933	0,719	0,91
045	51	64	?		0,786	0,686	0,85
046	48	103	171	35,2	0,855	0,759	0,882
047	50	62	166	22,5	1,075	0,773	0,931
048	55	75	164	27,9	0,712	0,667	0,866
049	54	86	174	28,4	1,028	0,737	0,918
050	58	64	160	25,0	0,787	0,653	0,808
051	40	65	159	25,7	1,038	0,786	0,946
052	53	54	164	20,1	1,169	0,708	0,845
053	50	85	166	30,8	1,038	1,034	1,279
054	55	72	157	29,2	0,916	0,618	0,856
055	51	89	166	32,3	1,152	0,805	0,983
056	42	63	166	22,9	0,781	0,809	0,929
057	45	62	167	22,2	0,938	0,64	0,837
058	43	51	157	20,7	0,902	0,714	0,916
059	50	59	165	21,7	0,937	0,816	0,918
060	55	79	170	27,3	0,861	0,67	0,879
061	49	80	167	28,7	1,078	0,941	1,064
062	42	71	171	24,3	1,064	0,894	1,068
063	44	64	161	24,7	1,126	0,825	0,996
064	52	70	160	27,3	0,845	0,83	0,966
065	47	77	160	30,1	1,078	0,832	1,036
066	46	59	162	22,5	0,885	0,664	0,825
067	51	71	164	26,4	0,939	0,78	0,966
068	40	51	150	22,7	1,021	0,751	0,941
069	44	67	162	25,5	1,207	0,838	0,91
070	53	57	156	23,4	0,838	0,552	0,739
071	46	59	167	21,2	0,96	0,78	0,939
072	51	56	171	19,2	0,989	0,792	0,932
073	51	75	156	30,8	0,9	0,706	0,887
074	51	59	151	25,9	0,851	0,692	0,845
075	48	70	156	28,8	1,051	0,783	0,927
076	55	80	176	25,8	1,291	1,031	1,254
077	54	102	159	40,3	1,058	0,969	1,138
078	49	63	153	26,9	1,152	0,85	0,983
079	57	71	156	29,2	0,998	0,823	0,981
080	59	54	149	24,3	0,621	0,726	0,942
081	56	73	163	27,5	0,865	0,686	0,805
082	48	69	163	26,0	1,032	0,825	0,957
083	51	82	171	28,0	0,962	0,798	0,892
084	41	58	163	21,8	1,074	0,761	0,926
085	40	70	167	25,1	0,921	0,638	0,787
086	55	74	164	27,5	1,063	0,737	0,937

št. vzorca	STAROST	TEŽA	VIŠINA	ITM	BMD L2-L4	BMD NECK	BMD TOT
087	52	60	165	22,0	0,957	0,61	0,783
088	53	64	161	24,7	0,954	0,792	0,961
089	56	64	165	23,5	1,065	0,702	0,787
090	51	88	168	31,2	1,317	0,955	1,173
091	55	57	156	23,4	1,173	0,775	0,917
092	57	65	162	24,8	0,904	0,659	0,813
093	53	62	167	22,2	0,995	0,646	0,79
094	50	53	160	20,7	0,855	0,608	0,69
095	58	69	163	26,0	1,145	0,829	0,921
096	59	63	167	22,6	0,829	0,741	0,851
097	39	55	164	20,4	1,063	0,781	0,91
098	50						
099	39	68	175	22,2	1,026	0,794	0,933
100	40	78	177	24,9	0,946	0,764	0,855
101	51	54	160	21,1	0,971	0,844	1,005
102	50	69	174	22,8	1,144	0,835	0,986
103	58	95	157	38,5	0,962	0,77	0,971
104	41	63	173	21,0	1,018	0,726	0,854
105	39	53	166	19,2	1,004	0,79	0,86
106	47	70	163	26,3	1,184	0,821	0,92
107	54	96	173	32,1	1,1	0,852	0,959
108	48	66	164	24,5	0,844	0,801	0,88
109	40	79	173	26,4	1,321	0,909	1,168
110	40	61	164	22,7	1,15	0,852	0,972
111	47	57	160	22,3	1,281	1,001	1,123
112	48	64	166	23,2	1	0,828	1,042
113	47	73	174	24,1	0,832	0,631	0,767
114	49	65	168	23,0	1,033	0,685	0,826
115	42	89	173	29,7	0,963	0,742	0,887
116	44	67	164	24,9	1,093	0,786	0,902
117	45	53	164	19,7	0,989	0,701	0,866

7.2 PRILOGA 2: REZULTATI GENOTIPIZACIJE

Preglednica XI: Rezultati genotipizacije za vseh 117 preiskovank na vseh treh preučevanih polimorfnihih mestih.

št. vzorca	genotip na mestu 94	genotip na mestu 101	genotip na mestu 860
1	GG	GG	AA
2	GG	GG	AA
3	GG	GG	AA
4	GG	GG	AA
5	GG	GG	AA
6	GG	GG	AA
7	GG	GG	AA
8	GG	GG	AA
9	GG	GG	AA
10	GG	GG	AA
11	GG	GG	AA
12	GG	GG	AA
13	GG	GG	AA
14	GG	GG	AA
15	GG	GG	AA
16	GG	GG	AA
17	GG	GG	AA
18	GG	GG	AA
19	GG	GG	AA
20	GG	GG	AA
21	GG	GG	AA
22	GG	GG	AA
23	GG	GG	AA
24	GG	GG	AA
25	GG	GG	AA
26	GG	GG	AA
27	GG	GG	AA
28	GG	GG	AA
29	GG	GG	AA
30	GG	GG	AA
31	GG	GG	AA
32	GG	GG	AA
33	GG	GG	AA
34	GG	GG	AA
35	GG	GG	AA
36	GG	GG	AA
37	GG	GG	AA
38	GG	GG	AA

št. vzorca	genotip na mestu 94	genotip na mestu 101	genotip na mestu 860
39	GG	GG	AA
40	GG	GG	AA
41	GG	GG	AA
42	GG	GG	AA
43	GG	GG	AA
44	GG	GG	AA
45	GG	GG	AA
46	GG	GG	AA
47	GG	GG	AA
48	GG	GG	AA
49	GG	GG	AA
50	GG	GG	AA
51	GG	GG	AA
52	GG	GG	AA
53	GG	GG	AA
54	GG	GG	AA
55	GG	GG	AA
56	GG	GG	AA
57	GG	GG	AA
58	GG	GG	AA
59	GG	GG	AA
60	GG	GG	AA
61	GG	GG	AA
62	GG	GG	AA
63	GG	GG	AA
64	GG	GG	AA
65	GG	GG	AA
66	GG	GG	AA
67	GG	GG	AA
68	GG	GG	AA
69	GG	GG	AA
70	GG	GG	AA
71	GG	GG	AA
72	GG	GG	AA
73	GG	GG	AA
74	GG	GG	AA
75	GG	GG	AA
76	GG	GG	AA
77	GG	GG	AA
78	GG	GG	AA
79	GG	GG	AA
80	GG	GG	AA
81	GG	GG	AA
82	GG	GG	AA
83	GG	GG	AA
84	GG	GG	AA

št. vzorca	genotip na mestu 94	genotip na mestu 101	genotip na mestu 860
85	GG	GG	AA
86	GG	GG	AA
87	GG	GG	AA
88	GG	GG	AA
89	GG	GG	AA
90	GG	GG	AA
91	GG	GG	AA
92	GG	GG	AA
93	GG	GG	AA
94	GG	GG	AA
95	GG	GG	AA
96	GG	GG	AA
97	GG	GG	AA
98	GG	GG	AA
99	GG	GG	AA
100	GG	GG	AA
101	GG	GG	AA
102	GG	GG	AA
103	GG	GG	AA
104	GG	GG	AA
105	GG	GG	AA
106	GG	GG	AA
107	GG	GG	AA
108	GG	GG	AA
109	GG	GG	AA
110	GG	GG	AA
111	GG	GG	AA
112	GG	GG	AA
113	GG	GG	AA
114	GG	GG	AA
115	GG	GG	AA
116	GG	GG	AA
117	GG	GG	AA