

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**SABINA VEHAR**

**DIPLOMSKA NALOGA**

**VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE  
BIOMEDICINE**

**Ljubljana, 2009**

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



**Sabina Vehar**

**ISKANJE ŠE NEODKRITIH MUTACIJ V GENU ZA  
UDP-GALAKTOZA-4-EPIMERAZO V SLOVENSKI POPULACIJI**

**IDENTIFICATION OF NEW MUTATIONS IN THE  
UDP-GALACTOSE-4-EPIMERASE GENE IN SLOVENIAN  
POPULATION**

**Diplomska naloga**

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Jane Lukač Bajalo, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Irene Prodan Žitnik, mag. farm.

### **Zahvala**

Za strokovno pomoč, vodenje in vzpodbudo pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorici prof. dr. Jani Lukač Bajalo in somentorici asist. dr. Ireni Prodan Žitnik.

Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem vsem sodelavcem Katedre za klinično biokemijo.

Za vso podporo se zahvaljujem tudi fantu Mateju.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Jane Lukač Bajalo, univ. dipl. kem. in somentorstvom asist. dr. Irene Prodan Žitnik, mag. farm.

Sabina Vehar

Ljubljana, 2009

Predsednica diplomske komisije:izr. prof. dr. Janja Marc

Član diplomske komisije: asist. dr. Simon Žakelj

## Kazalo vsebine

POVZETEK

SEZNAM OKRAJŠAV

SEZNAM SLIK

SEZNAM PREGLEDNIC

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 GALAKTOZA.....	1
1.1.1 ABSORBCIJA IN VLOGA GALAKTOZE V ČLOVEŠKEM ORGANIZMU .....	1
1.1.2 PRESNOVA GALAKTOZE.....	2
1.2 ENCIM UDP-GALAKTOZA-4-EPIMERAZA ( EC 5.1.3.2.) .....	5
1.2.1 STRUKTURA ENCIMA .....	6
1.2.2 REAKCIJA GALE .....	7
1.2.3 GALE GEN.....	8
1.3 GALAKTOZEMIJE .....	9
1.3.1 MOTNJE PRESNOVE GALAKTOZE ZARADI OKVARE GALE.....	9
1.3.1.1 Generalizirana oblika.....	9
1.3.1.2 Periferna oblika.....	10
1.3.1.3 Vmesna oblika .....	10
1.3.2 DIAGNOSTIKA.....	11
1.3.3 MERJENJE KONCENTRACIJE GALAKTOZE IN NJENIH PRESNOVKOV V URINU IN KRVI .....	12
1.3.3.1 Galaktoza v urinu.....	12
1.3.3.2 Galaktoza v krvi.....	12
1.3.3.3 Galaktitol v urinu .....	13
1.3.3.4 Galaktoza-1-fosfat v krvi .....	13
1.3.3.5 UDP-glukoza .....	13
1.3.4 MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI GALE .....	14
1.3.5 MOLEKULSKA DIAGNOSTIKA GENA ZA GALE.....	14

<b>2. NAMEN DELA.....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>16</b>
3.1 PREISKOVANCI .....	16
3.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR) .....	16
3.2.1 PRINCIP METODE VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO .....	16
3.2.2 PRAKTIČNA IZVEDBA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO.....	19
3.2.2.1 Aparature in pribor.....	19
3.2.2.2 Reagenti in kemikalije .....	19
3.2.3 POSTOPEK PCR REAKCIJE .....	21
3.3 OPTIMIZACIJA PCR POGOJEV.....	23
3.3.1 POSTOPEK PCR REAKCIJE Z GC-RICH SISTEMOM.....	25
3.3.2 UPORABA GC-RICH PCR SISTEMA .....	28
3.4 UGOTAVLJANJE USPEŠNOSTI VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO – AGARozNA GELSKA ELEKTROFOREZA .....	29
3.4.1 PRINCIP METODE AGARozNE GELSKE ELEKTROFOREZE.....	29
3.4.2 PRAKTIČNA IZVEDBA AGARozNE ELEKTROFOREZE PO VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO .....	30
3.4.2.1 Aparature in pribor za pripravo agaroznega gela.....	30
3.4.2.2 Aparature in pribor za agarozno gelsko elektroforezo.....	30
3.4.2.3 Reagenti in kemikalije za pripravo agaroznega gela .....	31
3.4.2.4 Reagenti in kemikalije za agarozno gelsko elektroforezo .....	31
3.4.2.5 Priprava agaroznega gela .....	31
3.4.2.6 Agarozna gelska elektroforeza.....	32
3.5 SEKVENČNA ANALIZA PCR PRODUKTOV .....	33
3.5.1 PRINCIP:.....	33
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>36</b>
4.1 REZULTATI PCR REAKCIJE .....	36
4.2 REZULTATI ISKANJA ŠE NEODKRITIH MUTACIJ V GENU ZA GALE MED POSAMEZNIKI Z NIZKO AKTIVNOSTJO GALE.....	36
4.2.1 MUTACIJA G.404C>T.....	37

4.2.2	MUTACIJE G.2358C>A (IVS4+168C>A), G.2376G>C (IVS4+186G>C), G.3228C>G (IVS6+118C>G) IN G.4309G>A (IVS10+13G>A) .....	37
4.2.3	MUTACIJI G.2587G>T (A84S) IN G.2602G>T (A89S).....	39
4.2.4	MUTACIJA G.4073G>A (A254T).....	40
4.2.5	MUTACIJA G.4601G>A (S312N) .....	41
4.2.6	MUTACIJI G.5034G>A IN G.5185-5187INSTAA .....	41
<b>5.</b>	<b>SKLEP.....</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>44</b>

## **POVZETEK**

Galaktozemije so skupina dednih presnovnih bolezni, za katere je značilna onemogočena ali zmanjšana presnova galaktoze. Vzrok zanje so mutacije v genih za GALK, GALT ali GALE. Okvare GALE so redkejše in manj pogoste kot okvare GALT. Generalizirana in periferna oblika sta dve glavni vrsti galaktozemij zaradi okvare GALE. Pri generalizirani obliki gre za redko in obenem hudo obliko bolezni, pri kateri je aktivnost tega encima odsotna v vseh tkivih. Edina do sedaj odkrita mutacija, ki povzroča to obliko je V94M. Periferna oblika pa je bolj pogosta in blažja. Aktivnost encima je odsotna le v krvnih celicah, v drugih tkivih pa je normalna. Za to obliko je značilnih 8 mutacij, ki so klinično benigne. Možen je tudi pojav vmesne oblike, pri kateri je aktivnost GALE odsotna v krvnih celicah, v ostalih tkivih pa je aktivnost različno znižana.

Da bi poiskali še neodkrite mutacije v genih za GALE v slovenski populaciji smo pri 28-ih posameznikih z znižano aktivnostjo GALE pomnožili celoten GALE gen z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR). 7 bolnic z rakom jajčnikov in 8 zdravih preiskovank ter 13 moških je imelo aktivnost encima GALE znižano za več kot eno standardno deviacijo pod povprečjem aktivnosti GALE v slovenski populaciji. Sklepali smo, da je znižanje aktivnosti encima posledica mutacij v genu za GALE in želeli smo ugotoviti, za katere mutacije gre. Dobljene PCR produkte smo analizirali z metodo DNA sekvenčne analize, da bi določili nukleotidno zaporedje pomnoženih fragmentov. Odkrili smo 11 še neodkritih mutacij. Vse odkrite mutacije so bile v heterozigotni obliki.

## SEZNAM OKRAJŠAV

A - adenin

Å – enota resolucije

Aa - heterozigotni aleli

aa – homozigotni alali

Ala - alanin

AR – aldozna reduktaza

ATP – adenzin-trifosfat

bp – bazni par

C - citozin

cDNA – komplementarna DNA

Cys –cistein

Da- Dalton

dATP – deoksiadenozin trifosfat

ddNTP – dideoksinukleozid trifosfat

dCTP – deoksicitozin trifosfat

dGTP – deoksigvanozin trifosfat

DMSO – dimetil sulfoksid

dNTP – deoksinukleozid trifosfat

DNA – deoksiribonukleinska kislina

DTT - ditiotreitol

dTTP – deoksitimidin trifosfat

*E.coli* – *Escherichia coli*

EDTA – etilendiamin-tetraocetna kislina

eGALE – GALE encim *E.coli*



Erci – eritrociti

EtBr – etidijev bromid

F – smerni oligonukleotidni začetnik

G - gvanin

GALE – UDP-galaktoza-4'-epimeraza

GALK – galaktokinaza

GALM – galaktoza-mutarotaza

GalOx – galaktoza oksidaza

GALT – galaktoza-1-fosfat-uridiltransferaza

GC – plinska kromatografija

GD, GADH – galaktoza-dehidrogenaza

GLUT2 – glukozni prenašalec 2

Gly – glicin

Hb - hemoglobin

hGALE – človeška oblika encima GALE

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

$k_{cat}$  – katalitična konstanta

$K_M$  – Michaelisova konstanta

log - logaritem

Lys – lizin

m, marker – označevalec velikosti DNA fragmentov

M – molekulska masa

Met – metionin

mRNA – informacijska ribonukleinska kislina

MS – masna spektrometrija

NAD – nikotinamid dinukleotid

NADH – nikotinamid dinukleotid

NADP – nikotinamid dinukleotid fosfat

NADPH – nikotinamid dinukleotid fosfat

NMR – nuklearna magnetna resonanca

PCR – verižna reakcija s polimerazo

PMG – fosfoglukomutaza

Pi – fosfat

POX - peroksidaza

PPi – pirofosfat

Pro – prolin

R – protismerni oligonukleotidni začetnik

RNA – ribonukleinska kislina

Ser - serin

SDR – superdružina kratko verižnih dehidrogenaz/reduktaz

SGLT1 – glukozni prenašalec 1

sl – slepi vzorec

T - timin

TAE – pufer sestave: Tris baza, očetna kislina, EDTA, H<sub>2</sub>O

*Taq - Thermus aquaticus*

Thr – treonin

T<sub>m</sub> – temperatura tališča

Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

Tyr – tirozin

UDP – uridil-difosfat

UDP-GalNAc – UDP-N-acetilgalaktozemin

UDP-Glc – UDP-glukoza

UDP-GlcNAc - UDP-N-acetilglukozamin

UDP-GluDH – UDP-glukoza-dehidrogenaza

UGP – UDP-glukoza-pirofosforilaza

UGGT – UDP-galaktoza-galaktoziltransferaza

UTP – uridil-difosfat

UTR – neprevedljiva regija

UV – ultravijolična svetloba

V – enota Volt

## SEZNAM SLIK

**Slika 1:** D-galaktoza

**Slika 2:** Absorpcija glukoze v kri.

**Slika 3:** Presnova galaktoze v telesu.

**Slika 4:** Tridimenzionalna struktura hGALE. N-terminalna domena je obarvana z modro barvo, C-terminalna domena pa z rdečo.

**Slika 5:** GALE reakcija.

**Slika 6:** Potek PCR reakcije.

**Slika 7:** Prikaz postopka DNA sekvenčne analize.

**Slika 8:** Kapilarna elektroforeza pri DNA sekvenčni analizi.

**Slika 9:** Agarozna gelska elektroforeza PCR produktov pri pomnoževanju fragmenta GALE 1 z GC-RICH (m = označevalec velikosti DNA fragmentov, od zgoraj navzdol: 1000, 750, 500, 300, 150, 50 bp; sl = slepa kontrola). Velikost fragmenta je 817 bp.

**Slika 10:** Mutacija g.404C>T v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – modrega (C) in rdečega (T).

**Slika 11:** Mutacija IVS4+168C>A v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – modrega (C) in zelenega (A).

**Slika 12:** Mutacija IVS4+186G>C v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – modrega (C) in črnega (G).

**Slika 13:** Mutacija IVS6+118C>G v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – modrega (C) in črnega (G).

**Slika 14:** Mutacija IVS10+13G>A v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – črnega (G) in zelenega (A).

**Slika 15:** Mutacija A84S v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – rdečega (T) in črnega (G).

**Slika 16:** Mutacija A89S v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – rdečega (T) in črnega (G).

**Slika 17:** Mutacija A254T v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – črnega (G) in zelenega (A).

**Slika 18:** Mutacija S312N v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – črnega (G) in zelenega (A).

**Slika 19:** Mutacija g.5185-5187insTAA v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, od katerega naprej opazimo prekrivanje vrhov.

**Slika 20:** Mutacija g.5034G>A v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – črnega (G) in zelenega (A).

## SEZNAM PREGLEDNIC

**Preglednica I:** Pomen sekvenčnega motiva YXXXXK.

**Preglednica II:** Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov za posamezne fragmente

**Preglednica III:** Sestava reakcijske zmesi za en vzorec (25 $\mu$ L) za fragment GALE 3.

**Preglednica IV:** Sestava reakcijske zmesi za en vzorec (25  $\mu$ L) za fragment GALE 4.

**Preglednica V:** Sestava reakcijske zmesi za en vzorec (25 $\mu$ L) za fragment GALE 8.

**Preglednica VI:** Pogoji PCR reakcij za fragmente GALE 3, GALE4 in GALE 8.

**Preglednica VII:** Sestava prvega master mix-a (MM1) za en vzorec za fragmente GALE 1, GALE 2, GALE 5 in GALE 6.

**Preglednica VIII:** Sestava drugega master mix-a (MM2) za en vzorec za fragmente GALE 1 in GALE 2.

**Preglednica IX:** Sestava drugega master mix-a (MM2) za en vzorec za fragment GALE 5 in GALE 6.

**Preglednica X:** Sestava prvega master mix-a (MM1) za en vzorec za fragment GALE 7.

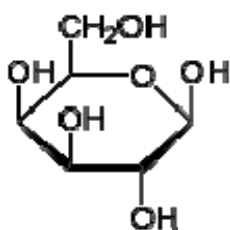
**Preglednica XI:** Sestava drugega master mix-a (MM2) za en vzorec za fragment GALE 7.

**Preglednica XII:** Pogoji GC-RICH PCR reakcije za fragmente GALE 1, GALE 2, GALE 5, GALE 6 in GALE 7.

# 1. UVOD

## 1.1 GALAKTOZA

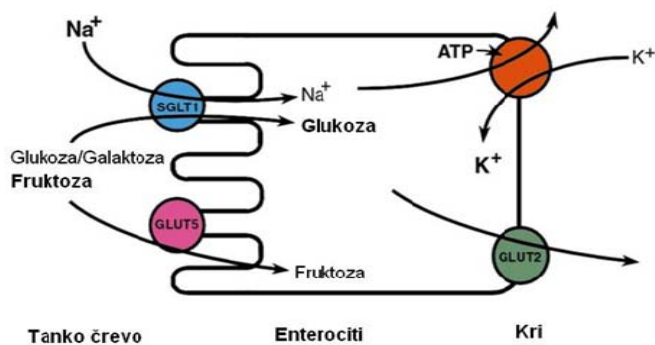
Galaktoza je aldozni monosaharid s šestimi ogljikovimi atomi in molekulska formulo  $C_6H_{12}O_6$ . Je optični izomer glukoze in se od nje razlikuje le v konfiguraciji hidroksilne skupine na četrtem ogljikovem atomu (1, 2). Podobna je glukozi, ima obliko belih kristalov in je v primerjavi z njo manj sladka in slabše topna (1, 3). V naravi se pojavlja kot prosta galaktoza, vezana v večje molekule (galaktan, agar, pektin,...) ter vezana z glukozo v disaharid laktozo (1, 4).



Slika 7: D-galaktoza

### 1.1.1 ABSORPCIJA IN VLOGA GALAKTOZE V ČLOVEŠKEM ORGANIZMU

Absorpcija galaktoze poteka v tankem črevesu s pomočjo natrij – glukoznega prenašalca 1 (SGLT1) s kotransportom natrijevih ionov. Galaktoza tekmuje z glukozo za vezavo na ta prenašalec, ki omogoča vstopanje v enterocite. Iz črevesnih celic preide v ekstracelularno tekočino preko glukoznega prenašalca 2 (GLUT2), ki je del bazolateralne membrane. Temu sledi še prehod v kapilare s procesom difuzije (5, slika 2).



Slika 8: Absorpcija glukoze v kri.

Galaktoza ima v organizmu pomembno vlogo:

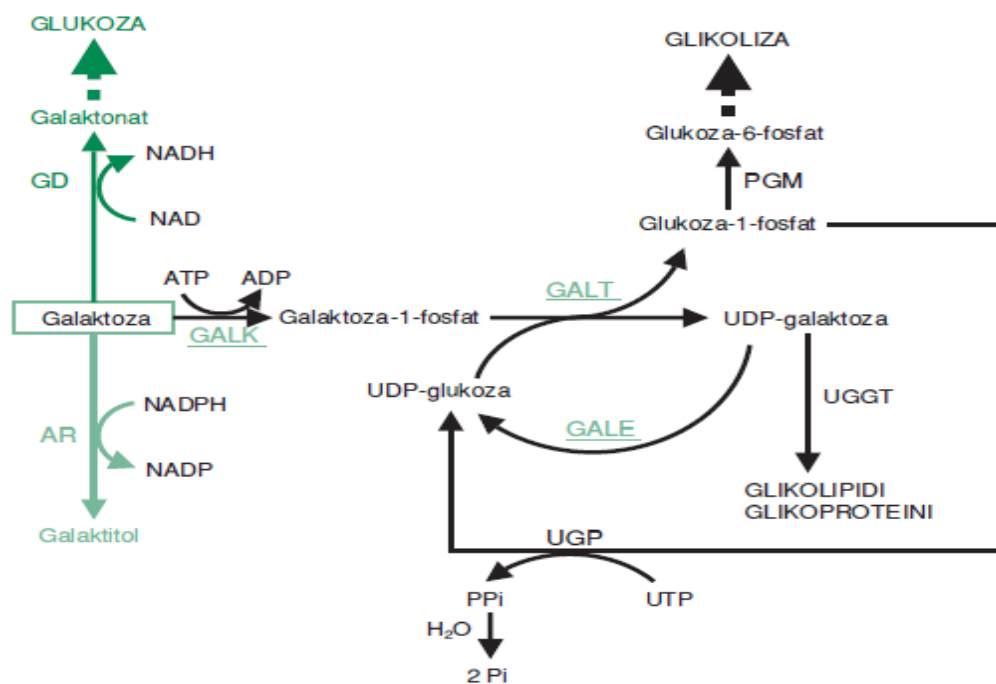
- Je pomemben vir energije v neonatalnem obdobju. Povezana z glukozo preko glikozidne vezi tvori disaharid laktozo, ki je prevladujoč ogljikov hidrat v mleku sesalcev. Hidrolizo laktoze katalizira encim laktaza ( $\beta$ -galaktozidaza) v tankem črevesu (1). Galaktoza se v Leloirjevem ciklu lahko pretvori v glukozo. Študije na psih in miših so pokazale, da je galaktoza mogoče prednostni vir energije pri novorojenih sesalcih, saj naj bi se lažje vgrajevala v glikogen kot glukozo (6).
- Galaktoza je tudi sestavni del kompleksnih polisaharidov, ki so vgrajeni v glikoproteine in glikolipide. Glikolipidi so del lipidnega dvosloja na zunanji strani celične membrane. Kemijsko so lipidi povezani z eno ali več sladkornih enot. Če imajo nase vezan monosaharid jih imenujemo cerebrozidi (npr. galaktocerebrozidi in glukocerebrozidi). V primeru, da je na lipid vezana oligosaharidna veriga gre za globozide, če je vezana polisaharidna veriga pa za gangliozide. Glikolipidi so pomembni strukturni elementi centralnega živčnega sistema, saj sestavljajo mielin in sivo možganovino (7, 8). Glikoproteini so proteini na katere so preko O- ali N-glikozidne vezi vezani monosaharidi ali oligosaharidi. V telesu kot hormoni, encimi, protitelesa in sestavni deli celične membrane sodelujejo v mnogih bioloških procesih, npr. pri imunskem odgovoru, pri medceličnem prepoznavanju in strjevanju krvi (2).

Poleg mleka in mlečnih izdelkov so viri galaktoze tudi nekatere vrste sadja in zelenjave (9).

### 1.1.2 PRESNOVA GALAKTOZE

V prebavilih absorbirana galaktoza se v jetrih pretvori iz  $\beta$ -D galaktoze v presnovno bolj uporabno glukozo-1-fosfat. Ta sistem pretvorbe je prvič predstavil argentinski zdravnik in biokemik Luis Federico Leloir s svojimi sodelavci. Po njem danes imenujemo cikel presnove galaktoze (10, 11). Leloirjev cikel sestavljajo štiri glavni encimi: galaktoza-mutarotaza (GALM), galaktokinaza (GALK), galaktoza-1-fosfat-uridiltransferaza (GALT) in UDP-galaktoza-4-epimeraza (GALE) (12).





**Slika 9:** Presnova galaktoze v telesu (11).

Prvi korak presnovne poti je epimerizacija  $\beta$ -D-galaktoze v  $\alpha$ -D-galaktozo, ki jo katalizira encim galaktoza-mutarotaza. Preoblikovani  $\alpha$ -anomer ima v naslednji stopnji vlogo substrata. Ta reakcija poteka z encimom GALK in vključuje od ATP odvisno fosforilizacijo  $\alpha$ -D-galaktoze do galaktoza-1-fosfata. Tretjo stopnjo presnovnega cikla katalizira encim GALT. Gre za premik uridil-monofosfatne skupine iz UDP-glukoze, ki sodeluje kot kofaktor, na galaktozo-1-fosfat. Pri tem nastane glukoza-1-fosfat in UDP-galaktoza. Zadnja - četrto stopnjo pa katalizira encim GALE, ki epimerizira UDP-galaktozo v UDP-glukozo. Ta se lahko regenerira tudi v reakciji, ki jo iz glukoze-1-fosfata katalizira encim UDP-glukoza-pirofosforilaza (UGP). Nastala UDP-glukoza je vir glukozilne enote v biosintezi glikogena (10).

Za pretvorbo galaktoze v metabolno bolj uporabno glukozo-1-fosfat se porabi le ena molekula ATP. Nastala glukoza-1-fosfat se pretvori v glukozo-6-fosfat pod vplivom encima fosfoglukomutaze (PMG), kar omogoča vstop glukoze v proces glikolize. Nastala UDP-galaktoza se skupaj z encimom UDP-galaktoza-galaktoziltransferaza (UGGT) lahko vgrajuje v kompleksne polisaharide, ki so del glikoproteinov in glikolipidov (10, 11).

Poleg Leloirjeve metabolne poti so znane še tri dodatne poti za presnovo galaktoze. Gre za alternativne presnovne poti, ki normalno niso prisotne ali pa potekajo v manjši meri. V ospredje stopijo, kadar gre za okvaro enega izmed štirih glavnih encimov Leloirjevega cikla (11). To velja predvsem za zadnji dve metabolni poti.

Pirofosforilazna pot je pot reverzibilne fosforilazne reakcije, ki pretvori galaktozo-1-fosfat in UTP v UDP-glukozo in pirofosfat. Reakcijo katalizira encim UDP-galaktoza-pirofosforilaza (UGP) (6). Galaktoza se po tej presnovni poti metabolizira s hitrostjo, ki je enaka 1% hitrosti presnove po Leloirjevi poti. Aktivnost poti narašča v večini tkiv s starostjo. Največja je v jetrih odraslih, kjer doseže 5% jeterne aktivnosti GALT. Najpomembnejša funkcija pirofosforilazne poti je tvorba UDP-galaktoze in UDP-glukoze za vgraditev v glikoproteine in glikolipide (13).

Druga alternativna presnovna pot je redukcija galaktoze do galaktitola. Reakcijo katalizira encim aldozna reduktaza (AR) v prisotnosti NADPH. Nastali galaktitol se slabo metabolizira, zato se akumulira v celicah. To povzroča osmotska neravnovesja in s tem kopičenje vode v celicah. Galaktitol je s tega vidika toksičen metabolit galaktoze, ki lahko privede do disfunkcije in smrti celic. Predvsem galaktitol je tisti metabolit, ki je odgovoren za nastanek katarakt. Toksični učinki se najbolj izražajo v tkivih, ki imajo visoko vsebnost encima aldozna reduktaza (renalne papile ledvic, očesni leči, srce, možgani, Schwannove celice perifernih živcev,...) (6, 9). Presežek galaktitola se izloči z urinom (13).

Zadnja, tretja, pot pa je oksidacija galaktoze do galaktonata v prisotnosti encima galaktoza-dehidrogenaza (GD). Kot kofaktor je prisoten  $\text{NAD}^+$ . Galaktonat se nato oksidira do  $\beta$ -ketogalaktonske kisline, ta pa se dekarboksilira do D-ksiluloze. Slednja nato vstopa v nadaljne oksidativne poti presnove glukoze (6, 13). Nastali metaboliti se prav tako izločajo z urinom (14). Produkti te presnovne poti niso toksični, zato imajo bolniki s povečano oksidacijo galaktoze manj izražene simptome bolezni in s tem boljšo dolgoročno prognozo kar se tiče poznih zapletov (11).

Encimi Leloirjevega cikla so prisotni v številnih tkivih in vrstah celic, vključno z eritrociti (14).

## 1.2 ENCIM UDP-GALAKTOZA-4-EPIMERAZA ( EC 5.1.3.2.)

GALE je četrti in s tem končni encim Leloirjeve presnovne poti galaktoze in katalizira pretvorbo UDP-galaktoze v UDP-glukozo (15, 16). Encim, ki je bil prvotno znan kot galaktowaldenaza, je prvi izoliral Maxwell leta 1957. Visoka aktivnost UDP-galaktoza-4-epimeraze je bila dokazana v krvi, jajčnikih, jetrih, očesu, možganih, ledvicah, placenti in pljučih. Prisotnost encima je izražena tudi v drugih celicah in tkivih (12, 6).

Glavna funkcija epimeraze je pretvorba enega izomera (UDP-galaktoza) v drugega (UDP-glukoza) s prenosom hidroksilne skupine znotraj molekule. GALE tako katalizira prenos te skupine na četrtem ogljikovem atomu molekule glukoze (2).

Encim GALE, ki ga kemijsko uvrščamo med izomeraze, spada v superdružino kratko verižnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR). Prisoten je tako v človeškem organizmu kot tudi v bakterijah (*E. coli*), kvasovkah (*Saccharomyces cerevisiae*) in tripanosomah. GALE je homodimer, pri čemer vsaka podenota vsebuje po eno tesno vezano molekulo  $\text{NAD}^+$ , ki deluje kot redoks kofaktor v GALE reakciji (12, 16).

Encimi dehidrogenazno/reduktazne skupine, v katero uvrščamo tudi epimerazo, so v naravi zelo razširjeni. Vključujejo se v številne fiziološke procese, vključno z običajno in metastatsko rastjo, plodnostjo in tudi hipertenzijo (17). Encime te vrste običajno sestavlja približno 250 aminokislinskih ostankov in vsebujejo dve značilni zaporedji. Prvi je YXXXXK motiv, v katerem tirozin igra ključno vlogo pri katalizi. Drugi sekvenčni motiv pa je GXXXGXXG, ki pa se nahaja v bližini vezavnega mesta za kofaktor. Encimi epimeraze imajo ohranjen prvi sekvenčni zapis oziroma tako imenovani Tyr-X-X-X-Lys zapis, ki je del katalize (18). Pomen prvega sekvenčnega motiva je predstavljen v preglednici I.

**Preglednica I:** Pomen sekvenčnega motiva YXXXXK.

Kratica	Pomen kratice
Y	Tyr 157
X	Gly, Lys, Ser
K	Lys 161

V drugem sekvenčnem motivu pa kratica G pomeni glicin, X pa katerokoli aminokislino.

### 1.2.1 STRUKTURA ENCIMA

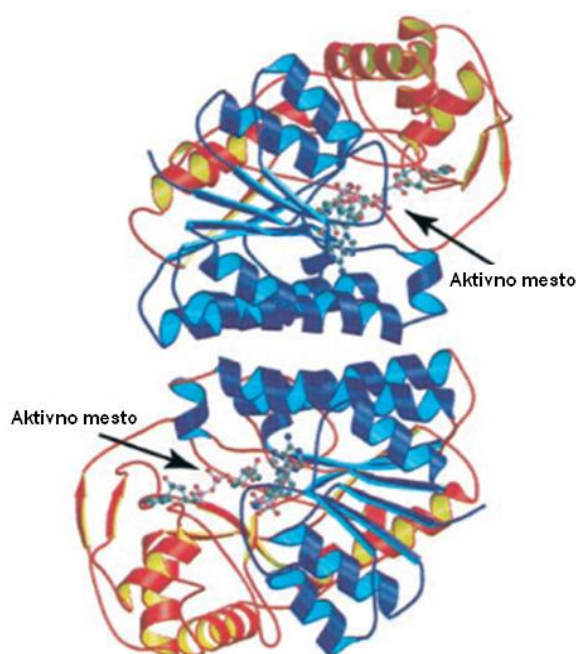
Struktura GALE je med vsemi encimi Leloirjevega cikla najbolj poznana. Njeno aminokislinsko zaporedje je evolucijsko visoko ohranjeno (15, 17). Ohranjenega je kar 51% zaporedja cDNA med človeškim encimom in encimom bakterije *E.coli* (7).

Tridimenzionalna struktura encima, izoliranega iz *E.coli* je bila pojasnjena leta 1996 (19). Encim GALE je homodimer. Vsaka podenota vsebuje 338 aminokislinskih ostankov. Vsaka podenota ima trdno vezano eno molekulo nikotinamid-adenin dinukleotida in je razdeljena na N-terminalno ter C-terminalno regijo (20, 21). Večja N-terminalna regija je odgovorna za vezavo nukleotidov ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ) in je sestavljena iz približno 180 aminokislinskih ostankov. Ta terminalna domena vsebuje sedem sklopov vzporednih  $\beta$ -verig v sredini, ki jih obdajajo stranice s šestimi  $\alpha$ -verigami. Struktura C-terminalne domene pa je preprostejša. Vsebuje tri sklope  $\beta$ -verig in dve veliki  $\alpha$ -verigi ter eno spiralno vrsto (20, 22). Na C-terminalno domeno se veže substrat (UDP-galaktoza ali UDP-glukoza) (17). V vsaki podenoti obstajata dve vzporedni  $\alpha$ -verigi, ki ju sestavljajo aminokisliline Pro 93 do Met 111 in Pro 148 do Ala 166, in ki zagotavljata strukturni okvir podenote (22).

Encim UDP-galaktoza-4-epimeraza (hGALE) je prisoten tudi v človeškem telesu, kjer je poleg za epimerizacijo UDP-galaktoze v UDP-glukozo odgovoren tudi za pretvorbo UDP-N-acetilgalaktozamina v UDP-N-acetilglukozamin (23). Humani encim prav tako sestavljata dve identični podenoti, ki sta sestavljeni iz 348 aminokislinskih ostankov. Tudi tukaj je vsaka podenota razdeljena na N- in C-terminalno regijo. N-terminalno domeno sestavljajo aminokisliline Met 1 do Thr 189, C-terminalno domeno pa aminokisliline Gly 190 do Ala 348. N-terminalna domena ostaja ista kot pri eGALE, C-terminalno domeno pa v hGALE sestavlja šest sklopov  $\beta$ -verig in pet  $\alpha$ -verig. Značilen je sekvenčni motiv YXXXXK, ki je lociran na domeni Try 157-Gly-Lys-Ser-Lys 161 (18). Raziskave kristalnih struktur so pokazale, da je aktivno mesto hGALE za približno 15% večje kot je v encimu *E.coli*. Vzrok temu naj bi bila zamenjava Tyr 299 v eGALE, ki ustreza mestu 307 v hGALE s cisteinom (17, 18). Večje aktivno mesto omogoča vezavo velike molekule UDP-N-acetilgalaktozamina (12).

Try 157, ki je del aktivnega mesta encima se v strukturi le tega nahaja na 3,1 Å od C-4 nikotinamidnega obroča. Glede na rezultate številnih eksperimentov ta tirozin najverjetneje deluje kot katalitska baza encima (17).

S pomočjo mnogih analiz *E.coli* pa tudi drugih bakterij so dokazali, da sta aminokislinska ostanka Try 157 in Ser 132 (hGALE) ali Try 149 in Ser 124 (eGALE) bistvena za katalizo katerega koli substrata. Aminokislinski ostanek Cys 307 v hGALE ali Tyr 299 v eGALE pa nima poglobitnega pomena pri katalizi in določa velikost aktivnega mesta in s tem sposobnost epimerizacije večjih molekul (UDP-GalNAc/UDP-GlcNAc) (18, 19, 21). Humani encim ima molekulsko maso 38282 Da (24).

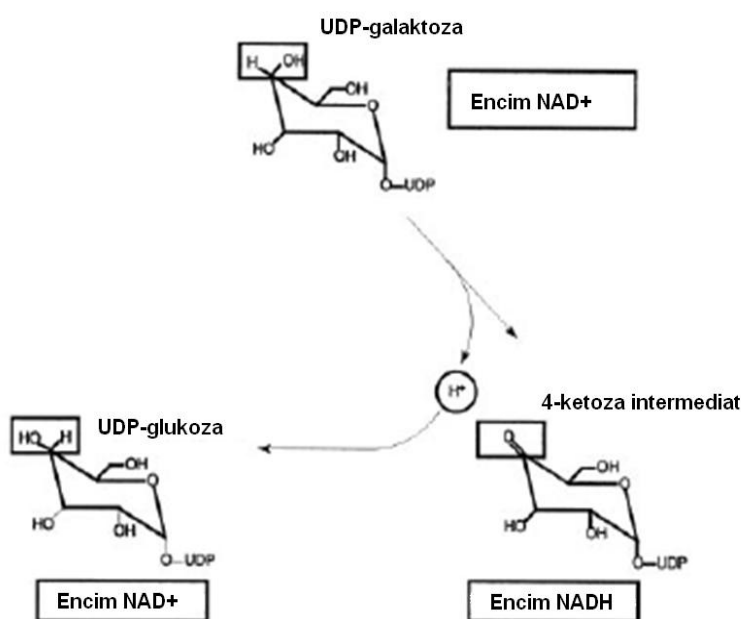


**Slika 10:** Tridimenzionalna struktura hGALE. N-terminalna domena je obarvana z modro barvo, C-terminalna domena pa z rdečo (17).

### 1.2.2 REAKCIJA GALE

Reakcija, ki jo katalizira encim GALE je reverzibilna. Gre za interkonverzijo UDP galaktoze in UDP-glukoze (20). Človeška oblika encima pa katalizira tudi pretvorbo UDP-GalNAc v UDP-GlcNAc. GALE reakcija poteka v treh stopnjah. Prva poteka z odvzemom 4'-OH skupine z ohranjeno tirozinsko osnovo (Try 149 eGALE/ Try 157 hGALE) in

hidridni prenos iz C-4 sladkorja na nikotinamidni obroč  $\text{NAD}^+$ .  $\text{NAD}^+$  molekula ima v reakciji epimerizacije vlogo koencima. Z molekulo encima je močno povezana z vodikovo vezjo. Druga stopnja je rotacija molekule za približno  $180^\circ$ , tretja pa prenos hidridne skupine iz  $\text{NADH}$  nikotinamidnega obroča nazaj na C-4 sladkor in reprotonizacija C-4 kisika s pomočjo tirozina (10, 17, 18, 19). V reakciji poleg tirozina sodeluje tudi aminokislina Ser 124 eGALE oziroma Ser 132 hGALE (19).



Slika 11: GALE reakcija.

### 1.2.3 GALE GEN

Gen za encim UDP-galaktoza-4-epimeraza imenujemo gen *GALE*. Nahaja se na kromosomu 1p36-p35. Organiziran je v 11 eksonov. Dolžina gena je 5205 bp (24, 25).

## 1.3 GALAKTOZEMIJE

Galaktozemije so skupina dednih presnovnih bolezni, za katere je značilna onemogočena ali zmanjšana presnova galaktoze. Mutacije v genih za GALK, GALT in GALE povzročajo spremembe na encimih, ki onemogočajo normalno presnovo galaktoze (12, 26). Zaradi sprememb pride do zmanjšane ali odsotne aktivnosti encima. Takšno stanje privede do kopičenja galaktoze in njenih presnovkov (galaktitol, galaktoza-1-fosfat) pa tudi do pomanjkanja galaktoznih metabolitov (UDP-galaktoza) v različnih tkivih. Pri omenjenih okvarah v ospredje stopijo tudi alternativni mehanizmi presnove, ki običajno niso prisotni ali pa potekajo v manjši meri (11, 12). Galaktozemije se dedujejo avtosomno recesivno (26). Pri takšni obliki dedovanja se bolezen popolnoma izrazi le pri homozigotih (aa), heterozigoti (Aa) pa imajo le vlogo prenašalca. V primeru, da sta mati in oče prenašalca alela za galaktozemijo, je 25% možnosti, da bo otrok homozigot in se mu bo galaktozemija izrazila (27).

Okvare GALE so redkejše in manj pogoste kot okvare GALT. Obstajata dve glavni vrsti galaktozemij zaradi okvare GALE. To sta generalizirana in periferna oblika (7, 16).

### 1.3.1 MOTNJE PRESNOVE GALAKTOZE ZARADI OKVARE GALE

Okvare GALE uvrščamo v tretjo skupino presnovnih motenj galaktoze (pred njo sta še okvara GALK in GALT) (28). Do danes je znanih 22 mutacij v genu za GALE, ki vplivajo na aktivnost encima (12, 19).

#### 1.3.1.1 GENERALIZIRANA OBLIKA

Gre za redko in obenem hudo obliko bolezni, pri kateri je aktivnost GALE odsotna v vseh tkivih. Znanih je le nekaj primerov (12, 29). Edina do sedaj odkrita mutacija, ki povzroča generalizirano obliko je V94M (12, 28).

#### Klinični znaki

Klinični znaki popolnega pomanjkanja GALE aktivnosti so: bruhanje, driska, zlatenica in hepatomegalija, pojav sive mreže (katarakte) v zgodnjih letih, ireverzibilne poškodbe jeter,

ledvic in možganov, motnje v rasti in razvoju, težave s spominom in koncentracijo. Opaženi simptomi so posledica kopičenja nastalih metabolitov v telesu (26, 29,30).

### 1.3.1.2 PERIFERNA OBLIKA

Ta vrsta okvare GALE je bolj pogosta in blažja (29). Motnja je bila prvič omenjena kot benigno stanje, ki prizadane predvsem eritrocite in levkocite (Gitzelmann in Steimann 1972/1973) (28). Aktivnost encima je odsotna le v krvnih celicah, v drugih tkivih pa je normalna. Okvara se pogosteje pojavlja v določenih etničnih skupinah oz. državah kot sta Kavkaz in Pakistan (30, 31). Pogostost pojava periferne oblike galaktozemije je 1 : 7000 (32). Značilnih je sedem različnih mutacij. To so: N34S, G90E, D103G, L183P, K257R, L313M in G319E (30). Nekoliko kasneje so odkrili še mutacijo R335H. Vse omenjene mutacije so bile funkcionalno opredeljene s pomočjo modela kvasovk. Mutaciji K275R in G319E sta zelo pogosti pri afriško-ameriški populaciji (12, 32). Pri eni od kinetičnih analiz so ugotovili, da imata encima z mutacijo G90E (800-krat manj) ali V94M (30-krat manj) močno spremenjeno  $v_{k_{cat}}$  in  $v_{k_{cat}/K_M}$ , medtem ko so pri mutacijah N34S in G319E ugotovili le manjše spremembe v teh parametrih. Pri analizi občutljivosti na proteolizo so ugotovili, da so nekoliko bolj dovzetni encimi z mutacijami L183P, N34S, G90E in D103G. To ni nič presenetljivega, saj se spremenjene aminokisliline nahajajo na površini encima, kar lahko vpliva na stabilnost encima (16).

### Klinični znaki

Periferna oblika epimerazne pomanjkljivosti je klinično benigna, kar pomeni, da bolniki ne kažejo simptomov bolezni (30). Še vedno so mnogi negotovi glede te oblike, pri kateri je aktivnost zmanjšana le v krvnih celicah. Ena od možnih razlag je ta, da obstaja razlika v stopnji izražanja GALE gena v krvi in v drugih tkivih (12).

### 1.3.1.3 VMESNA OBLIKA

Pri tej obliki gre za delno pomanjkanje aktivnosti encima hGALE v neperifernih tkivih. Aktivnost GALE je odsotna v krvnih celicah, v ostalih tkivih pa je aktivnost različno znižana. GALE mutacije, ki povzročajo vmesno obliko bolezni so S81R, T150M in P293L mutacije (12, 29). Rezultati različnih študij so pokazali, da imajo lahko bolniki oz. njihove



celice zaradi vmesne oblike pomanjkljivosti neobičajno visoke vrednosti galaktoze-1-fosfata (Gal-1-P) v prisotnosti galaktoze in nenormalno visoko vrednost UDP-galaktoze in nizko vrednost UDP-Glc celo v odsotnosti galaktoze (28).

### **Klinični znaki:**

Nekateri bolniki s to obliko pomanjkljivosti imajo slabo diagnosticirano ali celo nimajo dokazane te presnovne motnje. To lahko vodi v nevarnost dolgoročnih zapletov, pojav katarakt in motnje v telesnem in duševnem razvoju (29).

Pred časom je razlikovanje med različnimi oblikami epimerazne pomanjkljivosti povzročalo nemalo težav. Ta problem so kasneje začeli reševati z različnimi molekularnimi metodami. hGALE pomanjkljivost so sprva določali v kulturah levkocitov in limfocitov pri bolnikih s periferno obliko bolezni. Omenjene celice so stimulirali s fitohemaglutininom. Takšne celice so zagotavljale dolgoročno limfoblastno linijo z normalno epimerazno aktivnostjo (30). To so preverjali z uporabo Michaeli-rove kinetične konstante ( $K_M$ ), ki je merilo za afiniteto encima do substrata in elektroforetsko mobilnostjo (2). Nato je sledilo kloniranje zaporedja človeške cDNA in gena, ki kodira hGALE. Ta analiza pa je omogočila pridobitev alelnih značilnosti hGALE, in tega se poslužujemo še danes (30).

### **1.3.2 DIAGNOSTIKA**

V mnogih državah je diagnostika galaktozemij vključena v nacionalne programe presejalnih testov novorojenčkov. Pomembno je, da se ta presnovna motnja odkrije čim prej in se s tem prepreči obolenja in posledično možno smrtnost. Teste običajno izvajajo nekje v petem dnevu življenja. Najpogostejša vzorca za izvajanje presejalnega testa sta urin in kri. V urinu je določitev enostavna in smiselna, saj je galaktoza reducirajoči sladkor, ki se zlahka izloča v urin, v katerem lahko potem določamo reducirajoče snovi (14). Diagnostika poteka stopenjsko. Najprej se ob kliničnem sumu na možnost te presnovne motnje s presejalnimi testi določa koncentracijo galaktoze in njenih patoloških presnovkov v urinu in krvi. Če so koncentracije teh povečane, sledi nadaljnja stopnja merjenja aktivnosti encima GALT. Če je aktivnost GALT normalna sledi merjenje aktivnosti GALE. Osebam, ki imajo znižano aktivnost encima GALE se išče mutacije, ki povzročajo okvaro gena GALE. Najprej se iščejo najpogostejše mutacije. Če so le te

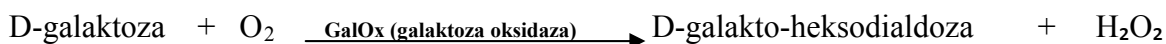
odsotne, se išče manj pogoste ali neznane mutacije. Presejalni testi se v razvitih deželah izvajajo s tandemsko masno spektrometrijo kot tudi s pomočjo encimske in genetične diagnostike. Ob potrjeni diagnozi omogoča uspešno zdravljenje primerna prehrana, ki ne vsebuje galaktoze. Tako so pri majhnih otrocih potrebni posebni pripravki na osnovi sojinega mleka oziroma hidrolizatov (13, 26).

### 1.3.3 MERJENJE KONCENTRACIJE GALAKTOZE IN NJENIH PRESNOVKOV V URINU IN KRVI

Meri se koncentracija galaktoze v urinu in krvi, koncentracija galaktitola v urinu in koncentracija galaktoze-1-fosfata in UDP-galaktoze v krvi.

#### 1.3.3.1 GALAKTOZA V URINU

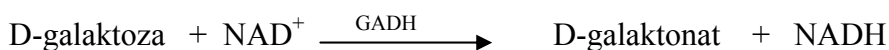
Uporablja se galaktoza-oksidadni test.



Namesto homovanilinske kisline lahko uporabimo tudi katero drugo kislino, npr. p-hidroksifenilacetilna kislina. Njena vloga pri reakciji peroskidacije je donor vodika. Nastane obarvan produkt, ki ga merimo fotometrično (33, 34).

#### 1.3.3.2 GALAKTOZA V KRVI

Referenčne vrednosti galaktoze v krvi pri novorojenčkih so 0,01-0,18 mmol/L. Za analizo se uporablja galaktoza-dehidrogenazni test ali Paigenov test. Galaktoza-dehidrogenazni test :



Pri tem testu merimo absorbanco nastalega NADH, ki povzroča dvig absorbance pri valovni dolžini 340 nm (13).

Paigenov test:

Test je bil razvit za odkrivanje povečane koncentracije galaktoze v krvi novorojenčkov. Je presejalni mikrobiološki test. Postopek začnemo z nanosom vzorca krvi na gojišče z mutiranim sevom bakterij *E.coli*. Sev *E.coli* postane odporen na bakteriofage C21 v prisotnosti galaktoze. Tako prisotna galaktoza v krvi ohrani rast bakterij ob prisotnosti bakteriofaga, kar pomeni večje razmnoževanje bakterij in s tem večjo koncentracijo galaktoze v krvi preiskovancev. Premer cone rasti je sorazmeren s koncentracijo galaktoze v krvi (35).

### 1.3.3.3 GALAKTITOL V URINU

Galaktitol v urinu določamo s plinsko kromatografijo (GC) / masno spektrometrijo (MS). Referenčne vrednosti tega metabolita v urinu so 0,1 – 2,47  $\mu\text{mol/kg}$  telesne teže na dan (36).

### 1.3.3.4 GALAKTOZA-1-FOSFAT V KRVI

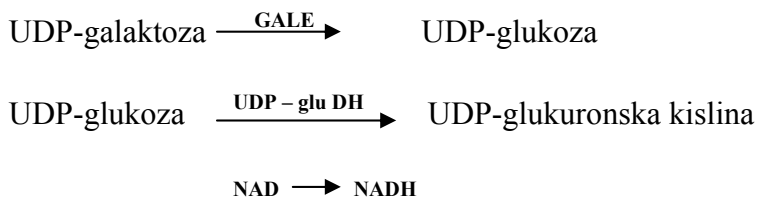
Ta metabolit določamo z dvostopenjsko reakcijo Beutlerjevega testa. Najprej se galaktoza-1-fosfat pod vplivom fosfoglukomutaze pretvori v galaktoza-6-fosfat. Ta se naprej pretvori v galaktolakton pod vplivom galaktoza-6-fosfat-dehidrogenaze (galaktoza-dehidrogenazni test). Na koncu druge reakcije nastane NADH, ki ga merimo fluorimetrično. Referenčne vrednosti znašajo  $< 1 \text{ mg/100ml}$  eritrocitov (Erci). Možno je tudi določanje z metodo HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) (13).

### 1.3.3.5 UDP-GLUKOZA

Za analizo UDP-glukoze se najbolj uporablja metoda HPLC pa tudi validirana primerjalna NMR metoda. Za laboratorijski vzorec običajno uporabimo eritrocite ali pa kultivirane fibroblaste (13, 37).

### 1.3.4 MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI GALE

Encimsko aktivnost GALE najpogosteje določamo z uporabo spektrofotometrične metode. Merimo nastali NADH, ki povzroča dvig absorbance pri valovni dolžini 340 nm (13).



Referenčne vrednosti za slovensko populacijo, izmerjene v našem klinično biokemičnem laboratoriju so 10 - 23 U/g Hb. Drugi dve možni metodi za določanje aktivnosti GALE sta še fluorimetrična in radioaktivna metoda.

### 1.3.5 MOLEKULSKA DIAGNOSTIKA GENA ZA GALE

Na splošno so mutacije v genu za GALE redke. Sprva preverjamo prisotnost osmih najpogostejših mutacij. To so mutacije generalizirane in periferne oblike. Najprej pomnožimo želeni odsek gena, kjer naj bi se mutacija nahajala. Za analizo uporabimo metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Mutacije vmesne oblike okvare GALE so še manj pogoste in jih preverjamo v primeru, ko mutacije generalizirane in perifernih oblik niso prisotne. Za iskanje redkih ali celo novih mutacij uporabljamo DNA sekvenčno analizo, s katero ugotovimo nukleotidno zaporedje DNA fragmenta, ki smo ga predhodno pomnožili s PCR metodo. Dobljene rezultate analize nato primerjamo z nemutiranim zaporedjem preiskovanega DNA fragmenta. V primeru, da odkrijemo nove mutacije, temu sledijo analize ugotavljanja pogostosti, načinov dedovanja in načinov izražanja. Ugotavljamo pa tudi njihovo povezavo s spremembo fenotipa.

## 2. NAMEN DELA

Naš namen v tem diplomskem delu je iskanje še neodkritih mutacij v genu za GALE v zdravi slovenski populaciji in pri bolnicah z ovarijskim karcinomom.

V ta namen bomo:

- optimirali pogoje PCR reakcije
- z metodo verižne reakcije s polimerazo pri 28-ih posameznikih z znižano aktivnostjo GALE pomnožili celoten GALE gen v osmih fragmentih
- iskali nove mutacije v PCR produktih s pomočjo DNA sekvenčne analize.

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 28 oseb, od tega je bilo 13 moških in 15 žensk, ki niso bili v sorodstvenem razmerju. Od tega jih je bilo 21 zdravih, ostalih 7 bolnic pa je imelo ovarijski karcinom. DNA smo izolirali iz polne krvi.

### 3.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

#### 3.2.1 PRINCIP METODE VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO

Verižna reakcija s polimerazo je nadvse uporabna tehnika, ki je v kratkem času postala ena najbolj razširjenih metod molekularne biologije. Je razmeroma hitra, cenovno ugodna in preprosta. Gre za metodo *in vitro*, s katero pomnožimo točno določen fragment DNA do želenega števila kopij. Izbrani fragment je lahko dolg od 50 bp do približno 10 kbp. Za PCR reakcijo potrebujemo ustrezne komponente (38, 39, 40):

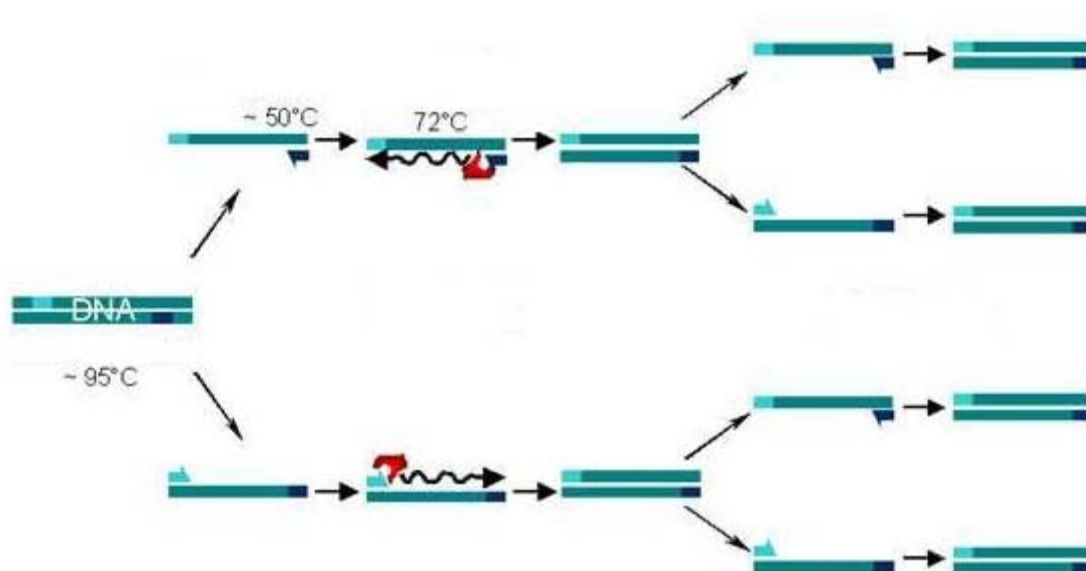
- **DNA matrica**, katere fragment želimo pomnožiti.
- **Oligonukleotidni začetniki oz. primerji**. Uporabljamo dve vrsti primerjev in sicer smerne (ang. forward) in protismerne (ang. reverse) primerje, ki morajo biti komplementarni vsak enemu koncu fragmenta. To pomeni, da ima smerni začetnik komplementarno zaporedje začetnemu (ali 5') delu fragmenta, protismerni začetnik pa je komplementaren končnemu (ali 3') delu fragmenta. Naloga oligonukleotidnih začetnikov je omejitev odseka, ki ga želimo pomnožiti. Primerji so običajno dolgi od 18 do 25 nukleotidov. Vsebovati morajo vsaj od 40-60% G in C nukleotidov. S temi pogoji dosežemo dovolj visoko temperaturo vezave oligonukleotida, pri čemer je nespecifična vezava zato manj verjetna. Prav tako moramo upoštevati tudi temperaturo tališča ( $T_m$ ) obeh oligonukleotidov, ki si morata biti podobni. Če se  $T_m$  obeh primerjev razlikujeta za več kot 5°C, zopet ne dosežemo njihove optimalne vezave. Temperaturo tališča lahko enostavno izračunamo po pravilu Theina in Wallaca (1986):  $T_m = 2^\circ\text{C} (A+T) + 4^\circ\text{C} (G+C)$ .

Pomembno je, da poznamo vrednost  $T_m$ , saj le tako lahko določimo primerno temperaturo pri reakciji prileganja primerjev. Ta naj bi bila približno 5°C manjša od  $T_m$ . Pri izbiri oligonukleotidov moramo paziti tudi, da si nista 3'-konca izbranega para komplementarna. V takem primeru bi se v stopnji vezave med seboj povezala in prišlo bi do podvojevanja oligonukleotidnega dimera in ne izbrane DNA.

- **Taq DNA-polimeraza** je termostabilen encim, ki katalizira sintezo komplementarne DNA. Proizvajajo jo termofilne bakterije *Thermus aquaticus*, ki nimajo 3'-eksonukleazne aktivnosti, kar dopušča možnost napačno vgrajenega nukleotida. Taq polimeraza pa ima še eno slabo lastnost. To je dodatek enega nukleotida (običajno je to A) na 3'-koncu produkta, po koncu matične DNA. Zaradi temperaturne obstojnosti, lahko reakcijo izvajamo pri visoki temperaturi, kot je npr. inkubacija pri 95°C. Optimalna temperatura delovanja encima pa je 72°C.
- **MgCl<sub>2</sub>** je kofaktor Taq DNA-polimeraze. Optimalno koncentracijo Mg<sup>2+</sup> ionov moramo določiti za vsako reakcijo posebej, saj je odvisna od kombinacije oligonukleotidov, tarčne DNA in encima, ki jih uporabljamo. Primerna koncentracija Mg<sup>2+</sup> ionov lahko vpliva na vezavo primerjev, na temperaturo denaturacije, na specifičnost produkta, na nastanek oligonukleotidnih dimerov ter na encimsko aktivnost.
- **4 deoksiribonukleozid trifosfate (dNTP)**, ki so gradniki DNA. To so: dATP, dGTP, dCTP in dTTP. Koncentracija vseh štirih v reakcijski zmesi mora biti enaka in ne previsoka. S tem še zmanjšamo verjetnost napačnega vgrajevanja nukleotidov v PCR produkt.
- **Pufer**, ki zagotavlja ustrezno reakcijsko okolje za optimalno aktivnost in stabilnost Taq-polimeraze.
- **Ultra čista voda.**

Poleg ustrezne reakcijske zmesi pa so za PCR pomembni tudi ustrezni reakcijski pogoji. PCR reakcija je sestavljena iz 30-40 ciklov temperaturnih in časovnih sprememb. Najprej reakcijsko zmes v fazi začetne denaturacije (ang. hot-start)

segrevamo 12 minut pri 95°C. To vodi v denaturacijo matrične dvoverižne DNA. Ta stopnja segrevanja je prva in se izvrši samo enkrat na reakcijo. Sledi faza denaturacije, ki poteka na začetku vsakega novega cikla. Poteka le 30 sekund pri temperaturi 94°C. Temu sledi ohlajanje reakcijske zmesi na temperaturo od 50-60°C oz. pod temperaturo tališča vezave obeh oligonukleotidov. Pri tej temperaturi t.i. temperaturi prileganja (ang. annealing temperature) poteka vezava začetnih oligonukleotidov oz. primerjev na komplementarno zaporedje enoverižne DNA. Običajno poteka od 30 sekund do 1 minute. Začetna oligonukleotida sta na matrici orientirana tako, da sta njuna 3'-konca usmerjena drug proti drugemu. Zadnji korak vsakega posameznega cikla pa je faza podaljševanja, ki predstavlja sintezo nove dvovijačne DNA verige, ki poteka približno 1 minuto pri temperaturi 72°C. Ta temperatura je optimalna za delovanje encima Taq DNA-polimeraza. Po vseh končanih ciklih sledi stopnja končnega podaljševanja, ki praktično poveča specifičnost reakcije. Poteka 6 minut pri temperaturi 72°C. Reakcija se ustavi z ohlavitvijo produkta na 4°C. Ta stopnja naj bi v aparaturi potekala vsaj 6 minut, da se reakcijska zmes res dobro ohladi, in je primerna za nadaljno obdelavo (40,41).



**Slika 12:** Potek PCR reakcije.



Z enim krogom reakcije dobimo iz ene tarčne molekule DNA dve molekuli. Z vsakim naslednjim ciklom število molekul eksponentno narašča, npr. iz ene molekule dobimo v desetih ciklih  $2^{10}$  molekul. Nastanek nove molekule DNA vedno poteka v smeri od 5'-konca (fosfatni del) proti 3'-koncu (hidroksilni del) (39, 41).

### **3.2.2 PRAKTIČNA IZVEDBA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO**

#### **3.2.2.1 Aparature in pribor**

- rokavice iz lateksa
- polavtomatske pipete Eppendorf (0,1-2,5 $\mu$ L, 2-20 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L)
- predhodno avtoklavirani nastavki za pipete Eppendorf
- avtoklavirane 0,2 mL in 0,5 mL epruvete s pokrovčkom Brand
- avtoklav A-21 Kambič
- PCR komora za pipetiranje Biosan
- centrifuga Combi-Spin, Biosan
- PCR aparat Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems
- PCR aparat Personal Cycler, Biometra

#### **3.2.2.2 Reagenti in kemikalije**

- 3% hipoklorid za čiščenje komore
- ultra čista voda
- 10x pufer PCR brez MgCl<sub>2</sub> (Gold buffer, Roche)
- 2 mM raztopina dNTP ( dATP, dGTP, dCTP in dTTP)
- 25 mM raztopina MgCl<sub>2</sub>
- 5  $\mu$ M oligonukleotidni začetnik F ( Invitrogen)
- 5  $\mu$ M oligonukleotidni začetnik R (Invitrogen)

- AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> DNA-polimeraza (5 U/ $\mu$ L), Applied Biosystems
- Raztopina DNA (konc. 40-60 ng/ $\mu$ L)

Oligonukleotidni začetniki morajo biti specifični za fragment, ki ga želimo pomnožiti.

**Preglednica II:** Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov posameznih fragmentov.

Fragment	Smer	Nukleotidno zaporedje	Proizvajalec
GALE1	F	5'-CCC GAG TGA CAT GTT TCC TT-3'	Invitrogen
	R	5'-TAC CAG GCA CTT TTG CAT GA-3'	
GALE2	F	5'-GGG CAA CTG TTT CAC CTC TC-3'	Invitrogen
	R	5'-CCA GAC TGG CTC AGA AGT CA-3'	
GALE3	F	5'-CAA AGC CTA AGG CCA GAA AG-3'	Invitrogen
	R	5'-ACC ACA GGT ATG GGC TAC CA-3'	
GALE4	F	5'-AGC CCT ACA GCG TCT CTT CA-3'	Invitrogen
	R	5'-ACA GCT TGG GCT CTG TGT TT-3'	
GALE5	F	5'-CAG CTT CTG GAG GTG AGA GG-3'	Invitrogen
	R	5'-TCC TCC TTA GTG GGG GTG TT-3'	
GALE6	F	5'-CCA CTG ATC GAT GGA CTC CT-3'	Invitrogen
	R	5'-TGC TCT GTT GCT GAG AGC TG-3'	
GALE7	F	5'-GCC TCT GGG AAG AAG GTA GG-3'	Invitrogen
	R	5'-GCT TTT CCT GGT CCT TGG TA-3'	
GALE8	F	5'-CAG GGA GGG GCT AAA TCA G-3'	Invitrogen
	R	5'-AAT TGC TTC CTC AAC GCT CA-3'	

### 3.2.3 POSTOPEK PCR REAKCIJE

Najprej smo s 3% hipokloritom očistili PCR komoro in pribor ter prižgali UV lučko za približno 30 minut. S tem smo preprečili možno kontaminacijo reagentov in pribora. Vse reagente smo dobro premešali. V PCR komori smo s pipetiranjem pripravili reakcijsko zmes vseh reagentov, razen raztopine DNA za več vzorcev hkrati (angl. master mix). Ustrezne količine reagentov, ki so odvisne od števila vzorcev DNA in slepega vzorca, smo odpipetirali v skupno epruvetko in nato dobro premešali. Iz slednje smo za vsak vzorec odpipetirali po 24  $\mu\text{L}$  mešanice v ločeno epruvetko. K vsaki mešanici smo nato dodali po 1  $\mu\text{L}$  raztopine DNA, v epruvetko s slepim vzorcem pa smo odpipetirali 1  $\mu\text{L}$  ultračiste vode. Po končanem pipetiranju smo reakcijsko zmes dobro premešali in epruvete vstavili v PCR aparaturo in zagnali program z ustreznimi pogoji.

Sestava reakcijskih zmesi za en vzorec so navedene v preglednicah od III do V, programi z ustreznimi pogoji PCR reakcij pa v preglednici VI.

**Preglednica III:** Sestava reakcijske zmesi za en vzorec (25  $\mu\text{L}$ ) za fragment GALE 3.

Reagent	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
ultračista voda	14,9
pufer	2,5
raztopina dNTP	2,5
raztopina $\text{MgCl}_2$	2
primer F (5)	1
primer R (5)	1
DNA-polimeraza	0,1
raztopina DNA	1

**Preglednica IV:** Sestava reakcijske zmesi za en vzorec (25  $\mu$ L) za fragment GALE 4.

<b>Reagent</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>
ultračista voda	15,4
pufer	2,5
raztopina dNTP	2,5
raztopina MgCl <sub>2</sub>	3
primer F (6)	0,5
primer R (6)	0,5
DNA-polimeraza	0,1
raztopina DNA	0,5

**Preglednica V:** Sestava reakcijske zmesi za en vzorec (25 $\mu$ L) za fragment GALE 8.

<b>Reagent</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>
ultračista voda	15,9
pufer	2,5
raztopina dNTP	2,5
raztopina MgCl <sub>2</sub>	2
primer F (11)	0,5
primer R (11)	0,5
DNA-polimeraza	0,1
raztopina DNA	1

**Preglednica VI:** Pogoji PCR reakcij za fragmente GALE 3, GALE4 in GALE 8.

FRAGMENT	GALE 3		GALE 4		GALE 8	
PROGRAM	T	čas	T	čas	T	čas
začetna denaturacija	95°C	12 min	95°	12 min	95°	12 min
denaturacija	94°C	30 s	94°	30 s	94°	30 s
prileganje primerjev	58,5°C	30 s	57°	30 s	55°	30 s
podaljševanje	72°C	1 min 15 s	72°	50 s	72°	1min
končno podaljševanje	72°C	7 min	72°	7 min	72°	7 min
ustavitev reakcije	4°C	vsaj 6 min	4°	vsaj 6 min	4°	vsaj 6 min
število ciklov	35		35		40	

### 3.3 OPTIMIZACIJA PCR POGOJEV

PCR produkta, ki ga naprej uporabimo za sekvenčno analizo PCR produktov, mora biti dovolj, da so lise na agaroznem gelu dovolj močne in specifične za odčitavanje rezultata. Ta dva pogoja pri nekaterih vzorcih z obstoječimi pogoji PCR reakcije nista bila dosegljiva, zato smo morali pogoje optimizirati (40). Temu smo se posluževali različno, glede na posamezen fragment. Uporabljali smo naslednje ukrepe:

Specifičnost PCR reakcije smo povečali s/z:

- spremembo reakcijske zmesi: povečanjem koncentracije  $MgCl_2$ , zmanjšanjem koncentracije dNTP, zmanjšanjem koncentracije začetnih oligonukleotidov, zmanjšanjem koncentracije Taq-polimeraze, zmanjšanjem koncentracije raztopine DNA;
- prilagoditvijo časa podaljševanja DNA verige glede na velikost odseka;

- zmanjšanjem števila reakcijskih ciklov;
- povečanje temperature prileganja začetnih oligonukleotidov;

Večjo količino PCR produkta pa dosežemo s/z:

- spremembo reakcijske zmesi: povečanjem količine raztopine DNA, povečanjem koncentracije začetnih oligonukleotidov, povečanjem koncentracije Taq-polimeraze;
- zmanjšanjem temperature prileganja oligonukleotidnih začetnikov;
- povečanjem števila ciklov;
- dodatek raztopine DMSO, uporaba 5% in 10% raztopine dimetil sulfoksida. Dodatek te raztopine je pri nekaterih PCR produktih zmanjšalo nastanek motečih sekundarnih struktur in nastalo je več produkta (42). Pogoji in komponente PCR reakcije ostanejo enaki, zaradi dodatka te raztopine se zmanjša le volumen vode.
- združitvijo dveh fragmentov, npr. GALE 1 + GALE 2. Z združitvijo dveh fragmentov dobimo daljši produkt, zato se tudi lažje in v večjem številu pomnoži. Pogoji in komponente ostanejo enake, le da vzamemo primer F od GALE 1, primer R pa od GALE 2.
- sekundarnimi produkti PCR-ja; za raztopino DNA vzamemo predhodno narejen PCR produkt.
- GC-RICH PCR sistemom. Ustrezne komponente za potek PCR reakcije s kitom proizvajalca Roche za GC-RICH so:
  1. GC-RICH polimeraza. Raztopino encima sestavljajo: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Tween 20(v/v), 0,5% Nonidet P40 (v/v), 50% glicerol (v/v). Epruveta ima vijolično etiketo na pokrovčku.
  2. GC-RICH reakcijski pufer (5x konc.). Vsebuje 7,5 mM MgCl<sub>2</sub> (končno 1,5 mM) in DMSO. Epruveta ima rumeno etiketo na pokrovčku.

3. resolucijska raztopina GC-RICH (5 M). Sestava je neznana. Epruveta ima rdečo etiketo na pokrovčku.
4. raztopina MgCl<sub>2</sub> (25 mM). Epruveta ima modro etiketo na pokrovčku.
5. Voda, z brez barvno etiketo na pokrovčku.

### 3.3.1 POSTOPEK PCR REAKCIJE Z GC-RICH SISTEMOM

Poleg teh komponent potrebujemo še raztopino dNTP in primerje F in R, ki so enaki kot pri običajni PCR reakciji. Pri delu s kitom za GC-RICH PCR reakcijo vedno delamo na ledu, da preprečimo morebiten razpad reagentov na sobni temperaturi. Postopek priprave reakcijske zmesi je podoben običajni PCR reakciji, le da tu pripravimo dve reakcijski zmesi oz. dva master mix-a. Za prvi master mix (MM1) odpipetiramo ustrezne količine vode, dNTP, oligonukleotidna začetnika F in R ter resolucijsko raztopino GC-RICH. Drugi master mix (MM2) pa pripravimo s pipetiranjem ustreznih količin vode, pufru, polimeraze in MgCl<sub>2</sub>. Iz prvega master mix-a za vsak vzorec odpipetiramo po 16,5 µL mešanice, iz drugega pa po 7,5 µL mešanice. Nato dodamo v vsako epruvetko po 1 µL raztopine DNA, v slepi vzorec pa po 1 µL vode. Sestava obeh reakcijskih zmesi za en vzorec je navedena v preglednicah od VII do XI, pogoji PCR reakcije pa v preglednici XII.

**Preglednica VII:** Sestava prvega master mix-a (MM1) za en vzorec za fragmente GALE 1, GALE 2, GALE 5 in GALE 6.

Reagent (MM1)	Volumen (µL)
voda (5)	9,5
dNTP	2,5
primer F	1
primer R	1
raztopina GC-RICH (3)	2,5
raztopina DNA	1
skupaj (µL)	17,5

**Preglednica VIII:** Sestava drugega master mix-a (MM2) za en vzorec za fragmente GALE 1 in GALE 2.

Reagent	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
voda (5)	1,5
pufer (2)	5
GC-RICH polimeraza (1)	0,5
$\text{MgCl}_2$ (4)	0,5
skupaj ( $\mu\text{L}$ )	7,5

**Preglednica IX:** Sestava drugega master mix-a (MM2) za en vzorec za fragment GALE 5 in GALE 6.

Reagent	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
voda (5)	1,7
pufer (2)	5
GC-RICH polimeraza (1)	0,3
$\text{MgCl}_2$ (4)	0,5
skupaj ( $\mu\text{L}$ )	7,5

**Preglednica X:** Sestava prvega master mix-a (MM1) za en vzorec za fragment GALE 7.

Reagent (MM1)	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
voda (5)	10,5
dNTP	2,5
primer F	0,5
primer R	0,5
raztopina GC-RICH (3)	2,5
raztopina DNA	1
skupaj ( $\mu\text{L}$ )	17,5



**Preglednica XI:** Sestava drugega master mix-a (MM2) za en vzorec za fragment GALE 7.

Reagent	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
voda (5)	0,7
pufer (2)	5
GC-RICH polimeraza (1)	0,3
$\text{MgCl}_2$ (4)	1,5
skupaj ( $\mu\text{L}$ )	7,5

**Preglednica XII:** Pogoji GC-RICH PCR reakcije za fragmente GALE 1, GALE 2, GALE 5, GALE 6 in GALE 7.

FRAGMENT	GALE 1		GALE 2		GALE 5	
PROGRAM	T	čas	T	čas	T	čas
začetna denaturacija	95°C	3 min	95°	3 min	95°	3 min
denaturacija	95°C	30 s	95°	30 s	95°	30 s
prileganje primerjev	52°C	30 s	57°	30 s	58°	50 s
podaljševanje	72°C	45 s	72°	1 min	72°	1 min
končno podaljševanje	72°C	7 min	72°	7 min	72°	7 min
ustavitev reakcije	4°C	vsaj 6 min	4°	vsaj 6 min	4°	vsaj 6 min
število ciklov	38		39		37	

FRAGMENT	GALE 6		GALE 7	
PROGRAM	T	čas	T	čas
začetna denaturacija	95°C	3 min	95°	3 min
denaturacija	95°C	30 s	95°	30 s
prileganje primerjev	58°C	50 s	56°	30 s
podaljševanje	72°C	1 min	72°	45 s
končno podaljševanje	72°C	7 min	72°	7 min
ustavitev reakcije	4°C	vsaj 6 min	4°	vsaj 6 min
število ciklov	35		39	

### 3.3.2 UPORABA GC-RICH PCR SISTEMA:

Uporaba sistema je smiselna pri tistih nukleinskih kislinah oz. primerjih, ki imajo visoko vsebnost nukleotida gvanina (G) in citozina (C). Sistem omogoča lažjo in večjo prepoznavo nukleotidov, bogatih z G in C, ki jih bi z običajnimi metodami težko dokazali. Z uporabo le tega dosežemo večje količine PCR produkta (43). Z G in C bogata nukleotidna zaporedja so rezultat številnih neželjenih sekundarnih struktur, ki se v poteku PCR reakcije nepopolno denaturirajo. Posledično pa prihaja tudi do nepravilnega prileganja primerjev (ang. annealing) (44).

### 3.4 UGOTAVLJANJE USPEŠNOSTI VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO – AGAROSNA GELSKA ELEKTROFOREZA

#### 3.4.1 PRINCIP METODE AGAROSNE GELSKE ELEKTROFOREZE

Agarozna elektroforeza je separacijska tehnika, ki se uporablja za ločevanje fragmentov DNA po dolžini. Temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Takšna metoda nam omogoča ocenitev uspešnosti PCR reakcije. Molekula dvoverižne DNA je negativno nabita, zato v električnem polju potuje od negativno nabite katode proti pozitivno nabiti anodi. Hitrost potovanja v elektroforeznem pufri je odvisna od dolžine oz. velikosti, oblike in celokupnega naboja fragmentov. Razmerje med dolžino in nabojem je pri vseh DNA fragmentih enako, zato se le-ti ločujejo le na podlagi velikosti. Manjše molekule DNA potujejo hitreje, saj se zaradi manjšega trenja lažje prebijajo skozi pore v gelu. Večje molekule pa potujejo počasneje. Hitrost potovanja linearnih dvoverižnih DNA je obratno sorazmerno z  $\log M$  (39). Hitrost potovanja fragmentov pa je poleg tega odvisna tudi od premreženosti gela oz. koncentracije agaroze in električne prevodnosti. V gelu z visoko koncentracijo agaroze se molekule gibajo počasneje. Večje molekule DNA zato ločujemo v gelih z nižjo koncentracijo agaroze (39). V ta namen uporabljamo agarozne gele ustrezne sestave in stalno električno napetost. Po elektroforezi izvedemo detekcijo DNA s fluorescenčno metodo. Agaroznemu gelu je dodano fluorescenčno barvilo etidijev bromid (EtBr), ki se interkelira med verigi DNA, kar povzroča dvig fluorescence. Pod UV lučjo (310 nm) interkeliran EtBr oddaja oranžno svetlobo z valovno dolžino 590 nm. V molekulo DNA vpleteni etidijevi ioni fluorescirajo boljše kot nevezani. Na gelu torej na mestih fragmentov DNA zaznamo lise. Velikost fragmentov pa lahko ugotovimo s primerjavo DNA lise fragmenta z lisami fragmentov znanih dolžin označevalca velikosti fragmentov (PCR marker).

Nukleotidno zaporedje fragmentov DNA ne vpliva na hitrost potovanja v gelu. Prav tako na hitrost ne vpliva temperatura, pri kateri teče elektroforeza. Paziti moramo le, da ne presežemo temperature tališča gela. Pozorni moramo biti tudi na pravilno sestavo in ionsko jakost elektroforeznega pufra. Če v pufri ni ionov, skozi gel ne teče tok in molekule se ne premikajo. V primeru, da je ionov preveč, se sprostijo veliko toplote in gel se lahko stopi (39).

### **3.4.2 PRAKTIČNA IZVEDBA AGAROSNE ELEKTROFOREZE PO VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO**

#### **3.4.2.1 Aparature in pribor za pripravo agaroznega gela**

- erlenmajerica (200 mL)
- merilni valj (100 mL)
- tehtnica Exacta 300 EB
- urno steklo
- mikovalovna pečica Optiquick compact Y52
- polavtomatska pipeta Eppendorf (2-20  $\mu$ L)
- nastavki za pipete Eppendorf
- digestorij
- kalup za agarozni gel, nosilec in 2 glavnička za tvorbo nanašalnih žepkov
- rokavice Safeskin Purple Nitrile, Kimberly Clark

#### **3.4.2.2 Aparature in pribor za agarozno gelsko elektroforezo**

- kadička za elektroforezo Biorad
- vir napetosti PowerPac Biorad
- polavtomatske pipete Eppendorf (2-20  $\mu$ L)
- nastavki za pipete Eppendorf
- parafilm
- rokavice Safeskin Purple Nitrile, Kimberly Clark
- dokumentacijski sistem za slikanje gelov UVI TEC
- program za slikanje gelov UVI Photo

### 3.4.2.3 Reagenti in kemikalije za pripravo agaroznega gela

- agaroz za rutinsko uporabo, Sigma
- Tris-acetatni EDTA (TAE) pufer (1:50)
- ultračista voda
- etidijev bromid (EtBr) 10 mg/mL, Sigma

### 3.4.2.4 Reagenti in kemikalije za agarozno gelsko elektroforezo

- nanašalni pufer bromfenol modro, ksilen cianol
- elektroforezni pufer: Tris acetat EDTA (TAE) – pripravimo ga iz 50x pufra, sestava: 242 g Tris baze, 57,1 g očetne kisline, 100 mL 0,5 M EDTA in ultračista voda do 1000 mL
- označevalec velikosti DNA fragmentov (dolžine fragmentov: 1000, 750, 500, 300, 150 in 50 bp), PCR marker Promega
- PCR produkti

### 3.4.2.5 PRIPRAVA AGAROZNEGA GELA

Agaroz je linearni polimer s ponavljajočim dimerom D-galaktoze in 3,6-anhidro-L-galaktoze. Za oceno uspešnosti PCR reakcije smo uporabili 2% agarozni gel. Za pripravo le tega smo natehtali 1,5 g trdne agaroze za rutinsko uporabo in dodali 75 mL 1x pufra TAE. Erlenmajerico z vsebino smo starirali in pokrili z urnim steklom. Nato smo to segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se agaroz ni popolnoma raztopila. Erlenmajerico smo postavili na tehtnico in dopolnili z destilirano vodo do začetne teže. V digestoriju smo k raztopini agaroze odpipetirali 4  $\mu$ L etidijevega bromida, dobro premešali in zmes vlili v kalup za pripravo gela. V kalup smo pred tem namestili še 2 glavnička za tvorbo nanašalnih žepkov. Odstranili smo še zračne mehurčke in pustili stati približno 20 minut pokrito v temi, da se je gel strdil. Gel je potrebno ohlajati in shranjevati v temnem, ker etidijev bromid na svetlobi razpada. Na koncu smo odstranili glavničke za tvorbo

nanašalnih žepkov, vzeli gel iz kalupa in ga položili v kadičko za elektroforezo ali pa ga shranili v hladilnik (4°C) do uporabe.

Ker smo pri pripravi gela in poteku elektroforeze delali z etidijevim bromidom, je bila tu nujno potrebna posebna previdnost. Etidijev bromid je močan mutagen in kancerogen. Pri rokovanju z njim je potrebno uporabljati posebne rokavice z nitrilom in ob morebitnem stiku s kožo takoj sprati z veliko količino vode.

#### **3.4.2.6 AGARozNA GELSKA ELEKTROFOREZA**

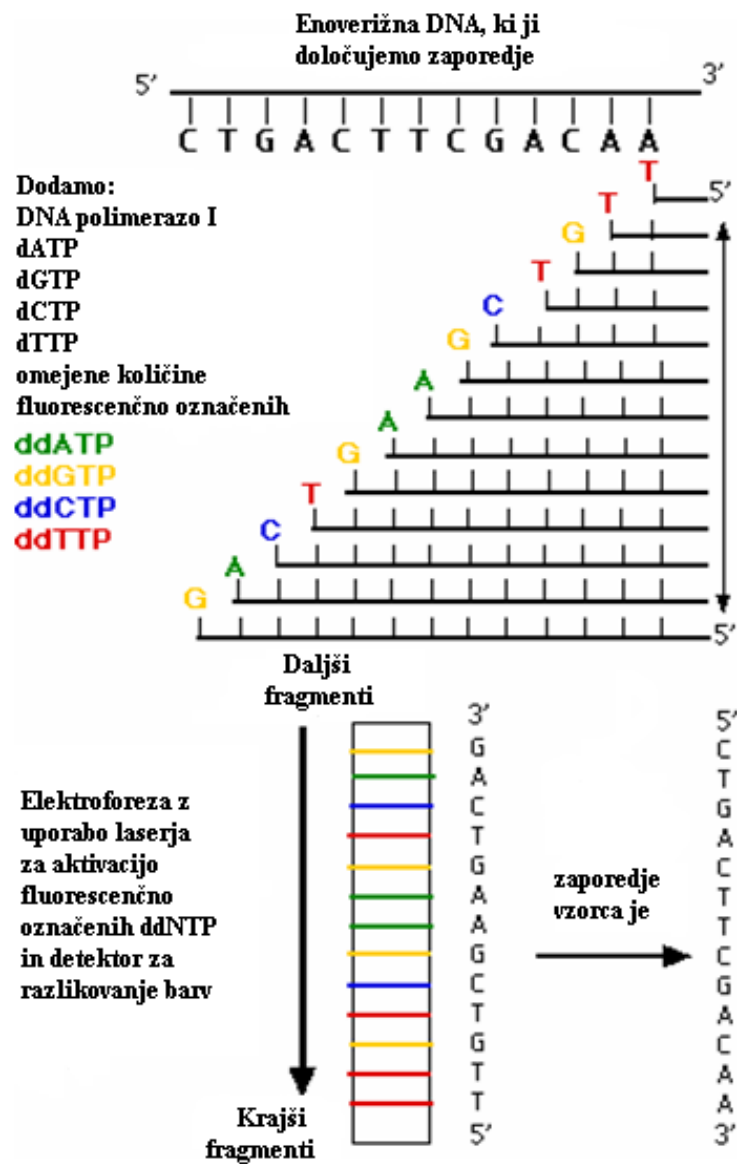
Pripravljen 2% agarozni gel z etidijevim bromidom smo prenesli v kadičko napolnjeno z elektroforeznim TAE pufrom. Na trak parafilma smo napipetirali majhne kapljice nanašalnega pufra. Eni izmed kapljic smo dodali 2  $\mu\text{L}$  PCR označevalca velikosti ostalim pa po 2,5  $\mu\text{L}$  PCR produkta ter slepega vzorca. Vsako kapljico smo dobro premešali in jih s pipeto nanесли v ustrezne žepke na gelu. Nato smo gel poravnali in kadičko pokrili ter priključili na vir napetosti. Elektroforeza je potekala 25 minut pri napetosti 100 V. Po končanem postopku je sledilo še slikanje gela pod UV lučjo. Na gelu smo pri uspešni reakciji videli lise označevalca velikosti in lise produktov PCR reakcije. Na liniji nanosa slepega nanosa pa je morala biti lisa odsotna, kar je potrjevalo dejstvo, da noben reagent PCR reakcije ni bil kontaminiran z DNA. V nasprotnem primeru bi bilo treba reakcijo PCR ponoviti.

## 3.5 SEKVENČNA ANALIZA PCR PRODUKTOV

### 3.5.1 PRINCIP

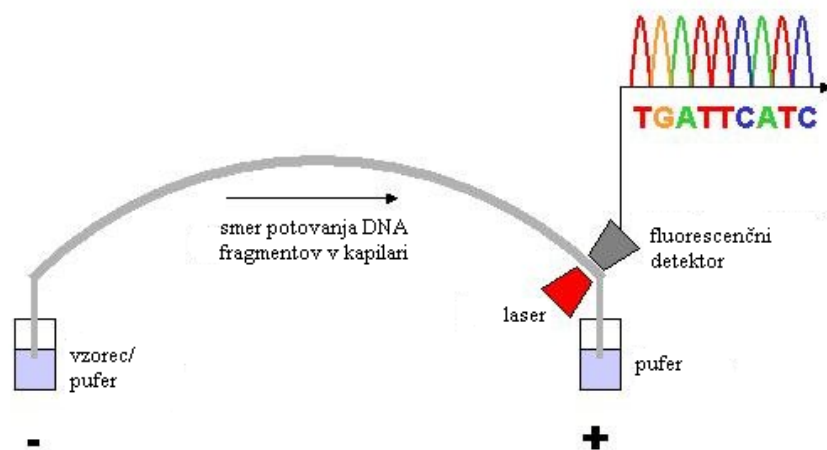
DNA sekvenčno analizo uporabljamo za določitev nukleotidnega zaporedja DNA fragmentom, ki jih predhodno pomnožimo z metodo PCR. Reakcijska zmes vsebuje enovijačno DNA (ki ji določimo zaporedje), oligonukleotidni začetnik, dNTP (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), DNA polimerazo, ddNTP (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP). Vsak izmed ddNTP je označen z drugim fluorescenčnim barvilom, ki fluorescira pri specifičnih valovnih dolžinah. Ko poteka sinteza komplementarne verige, se le-ta ustavi, ko se v nastajajočo verigo veže ddNTP, ker le-ta nima 3'-OH skupine za naslednjo fosfodiestersko vez in tako se na nastajajočo verigo ne more vezati naslednji nukleotid. Posledično nastanejo različno dolgi fragmenti DNA, ki se vsi končajo z enim izmed fluorescenčno označenih ddNTP (slika 7) (45). Nukleotidno zaporedje nato določimo s pomočjo kapilarne elektroforeze. Ločitev DNA fragmentov v kapilari temelji na elektroforezni mobilnosti v električnem polju, in sicer manjši fragmenti potujejo hitreje. Kapilaro osvetlimo z laserjem (vir svetlobe), nato pa s pomočjo detektorja določimo nukleotidno zaporedje. Dobimo štiri krivulje različnih barv, vsaka barva predstavlja en ddNTP (A, T, C ali G) (slika 8) (46).

Vsem PCR produktom smo z metodo DNA sekvenčne analize določili nukleotidno zaporedje. Sekvenčno analizo je opravilo podjetje MCLab Inc., San Francisco, ZDA. Prav tako je isto podjetje opravilo čiščenje PCR produktov, saj je pred sekvenčno analizo potrebno iz vzorcev odstraniti ostanke PCR reagentov. Uporabljen sekvenator je bil ABI 3730XL. Zahtevana koncentracija PCR produktov je bila najmanj 10 ng/ $\mu$ L. Zahtevana koncentracija primerjev pa je bila 5  $\mu$ mol/L.



Slika 7: Prikaz postopka DNA sekvenčne analize.



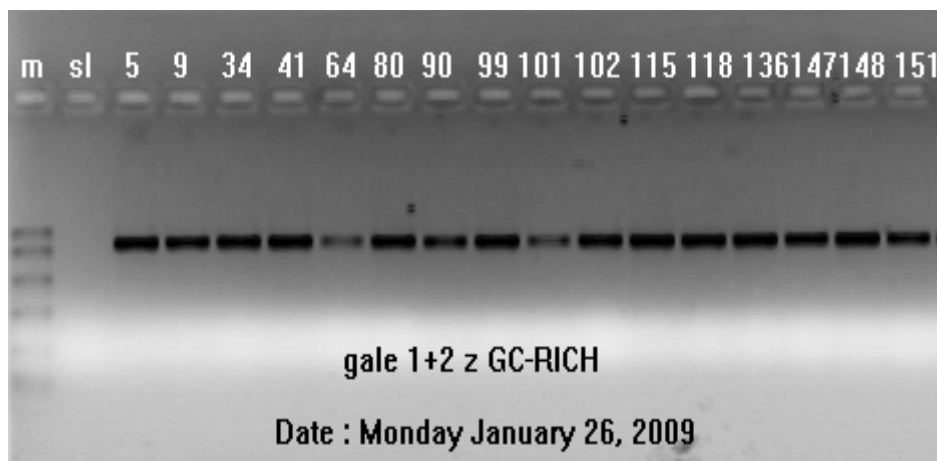


**Slika 8:** Kapilarna elektroforeza pri DNA sekvenčni analizi.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 REZULTATI PCR REAKCIJE

Pri pomnoževanju GALE gena smo dobili fragmente različnih dolžin. Dobljeni produkti so bili pri uporabi osnovnih oz. optimiziranih pogojev PCR reakcije dovolj specifični za nadaljno sekvenčno analizo.



**Slika 9:** Agarozna gelska elektroforeza PCR produktov pri pomnoževanju fragmenta GALE 1 z GC-RICH (m = označevalec velikosti DNA fragmentov, od zgoraj navzdol: 1000, 750, 500, 300, 150, 50 bp; sl = slepa kontrola). Velikost fragmenta je 817 bp.

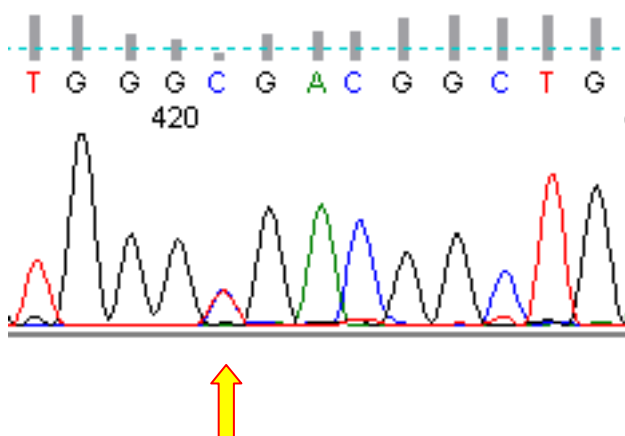
### 4.2 REZULTATI ISKANJA ŠE NEODKRITIH MUTACIJ V GENU ZA GALE MED POSAMEZNIKI Z NIZKO AKTIVNOSTJO GALE

7 bolnic z rakom jajčnikov in 8 zdravih preiskovank je imelo aktivnost encima GALE znižano za več kot eno standardno deviacijo pod povprečjem aktivnosti GALE v slovenski populaciji. Sklepali smo, da je znižanje aktivnosti encima posledica mutacij v genu za GALE in želeli smo ugotoviti, za katere mutacije gre. Vse do sedaj odkrite mutacije v genu za GALE so redke in se pojavljajo samo v omejenih populacijah ali celo samo znotraj posameznih družin, zato pri posameznikih z nizko GALE nismo preverjali prisotnosti teh mutacij, ampak smo želeli najti mutacije, značilne za slovensko populacijo. V ta namen

smo z metodo reakcije verižne polimerizacije pomnožili celotni GALE gen v 8 fragmentih in določili nukleotidno zaporedje pomnoženih fragmentov z DNA sekvenčno analizo. Poleg bolnic in zdravih preiskovank z znižano aktivnostjo GALE smo v raziskavo vključili še 13 zdravih moških, z aktivnostjo GALE za več kot eno standardno deviacijo nižjo od povprečja v slovenski populaciji.

#### 4.2.1 MUTACIJA G.404C>T

Pri štirih preiskovancih smo odkrili mutacijo g.404C>T v heterozigotni obliki. Mutacija se nahaja v 5' neprevedljivi regiji (5' UTR), ki se prepiše v mRNA, vendar se ne prevede v protein. 5' UTR ima pomembno vlogo pri uravnavanju translacije, saj v tej regiji najdemo številna regulatorna zaporedja, kot npr. vezavna mesta za proteine, ki vplivajo na stabilnost ali translacijo mRNA, RNA stikala in zaporedja, ki vplivajo na začetek translacije (47). Preiskovanci z mutacijo g.404C>T so imeli aktivnost encima znižano na od 57-75 % povprečja v slovenski populaciji.

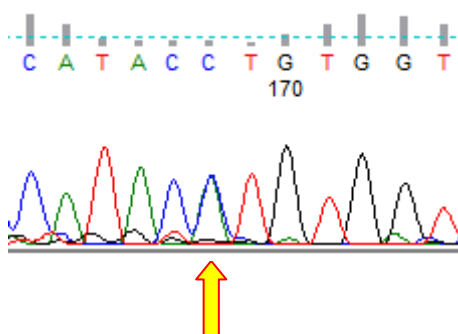


**Slika 10:** Mutacija g.404C>T v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – modrega (C) in rdečega (T).

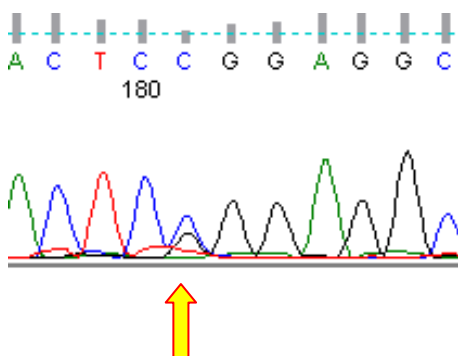
#### 4.2.2 MUTACIJE G.2358C>A (IVS4+168C>A), G.2376G>C (IVS4+186G>C), G.3228C>G (IVS6+118C>G) IN G.4309G>A (IVS10+13G>A)

Intronski mutaciji g.2358C>A (IVS+168C>A) in g.2376G>C (IVS4+186G>C) smo odkrili vsako pri enem preiskovancu, mutacijo g.3228C>G (IVS6+118C>G) pri petih in mutacijo

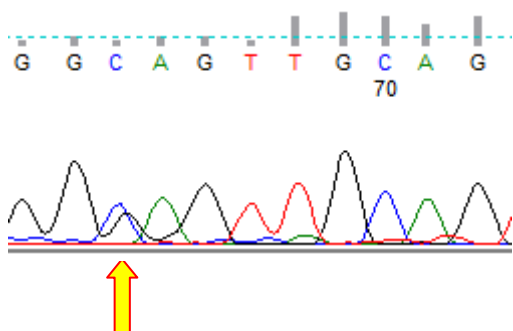
g.4309G>A (IVS10+13G>A) pri treh preiskovancih, vse v heterozigotni obliki. Intronske mutacije lahko vplivajo na ekspresijo genov, čeprav se ne prepisejo v mRNA. Introni in njihovo izrezovanje lahko vplivajo na prepisovanje gena, na popravljanje in poliadenilacijo pre-mRNA, na transport mRNA iz jedra, na translacijo in na stabilnost mRNA (48).



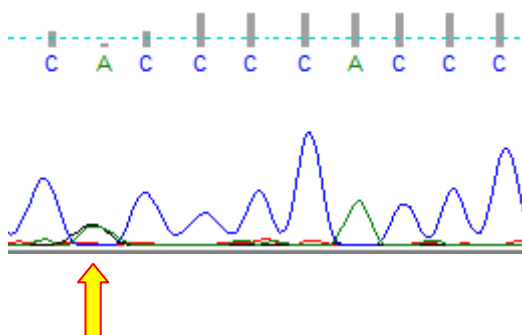
**Slika 11:** Mutacija IVS4+168C>A v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – modrega (C) in zelenega (A).



**Slika 12:** Mutacija IVS4+186G>C v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – modrega (C) in črnega (G).



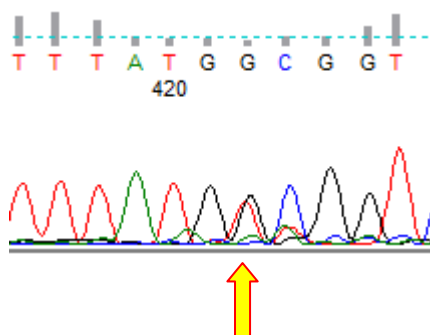
**Slika 13:** Mutacija IVS6+118C>G v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – modrega (C) in črnega (G).



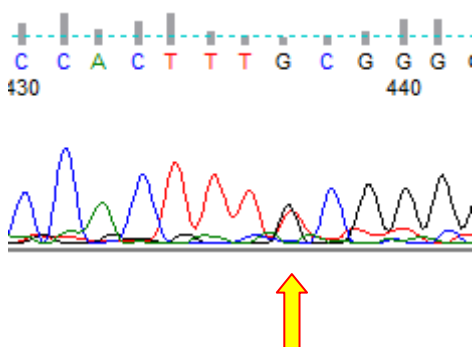
**Slika 14:** Mutacija IVS10+13G>A v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – črnega (G) in zelenega (A).

#### 4.2.3 MUTACIJI G.2587G>T (A84S) IN G.2602G>T (A89S)

Obe mutaciji se nahajata v petem eksonu in spremenita kodon GCG v TCG ter s tem povzročita zamenjavo alanina na mestih 84 in 89 s serinom. Mutaciji se ne nahajata v bližini vezavnih mest za  $\text{NAD}^+$  ali UDP-galaktozo in naj ne bi vplivali bistveno na stabilnost encima (49), zato je vprašanje v kolikšni meri prizadeneta katalitsko aktivnost GALE. Preiskovanec z mutacijama je imel aktivnost GALE znižano na približno 65 % povprečne aktivnosti v slovenski populaciji, vendar je imel poleg mutacij A84S in A89S še mutacijo v 3' UTR (g.5034G>A), zato je težko ugotoviti, kakšen je vpliv posamezne mutacije na aktivnost.



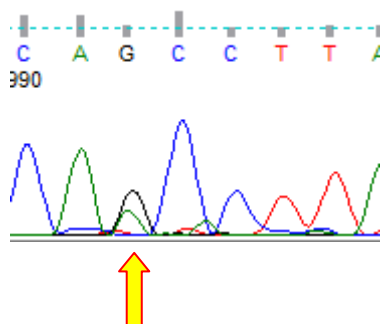
**Slika 15:** Mutacija A84S v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – rdečega (T) in črnega (G).



**Slika 16:** Mutacija A89S v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – rdečega (T) in črnega (G).

#### 4.2.4 MUTACIJA G.4073G>A (A254T)

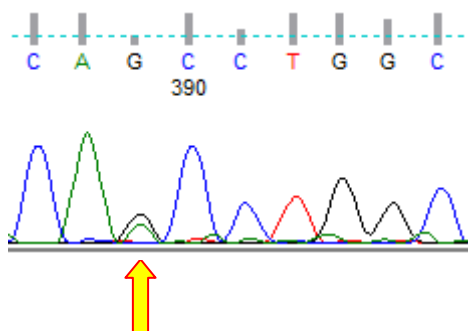
Mutacijo smo našli pri enem preiskovancu v heterozigotni obliki. V 9. eksonu povzroči spremembo kodona 254 iz GCC v ACC in s tem zamenjavo alanina na mestu 254 s treoninom. Mutacija se ne nahaja v bližini vezavnih mest za  $\text{NAD}^+$  ali UDP-galaktozo in naj ne bi vplivala bistveno na stabilnost encima (49), zato je vprašanje v kolikšni meri prizadene katalitsko aktivnost GALE. Preiskovanec z mutacijo A254T je imel aktivnost GALE znižano na približno 75 % povprečne aktivnosti v slovenski populaciji.



**Slika 17:** Mutacija A254T v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – črnega (G) in zelenega (A).

#### 4.2.5 MUTACIJA G.4601G>A (S312N)

Mutacijo smo našli pri enem preiskovancu v heterozigotni obliki. Nahaja se v eksonu 11, kjer povzroči spremembo kodona 312 iz AGC v AAC in s tem zamenjavo serina na mestu 312 z asparaginom. Mutacija ne leži v bližini aktivnega mesta encima. Preiskovanec z mutacijo je imel aktivnost GALE znižano na približno 70 % povprečja v slovenski populaciji.

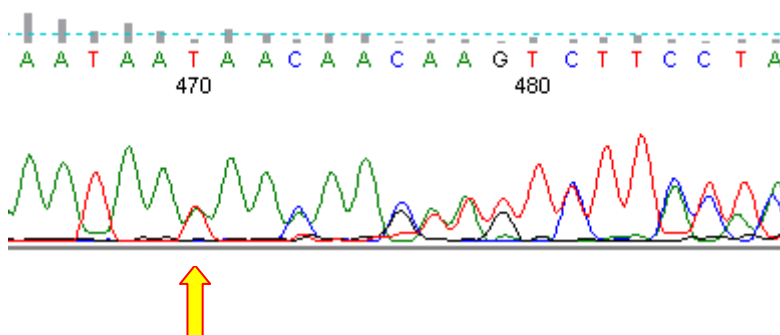


**Slika 18:** Mutacija S312N v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – črnega (G) in zelenega (A).

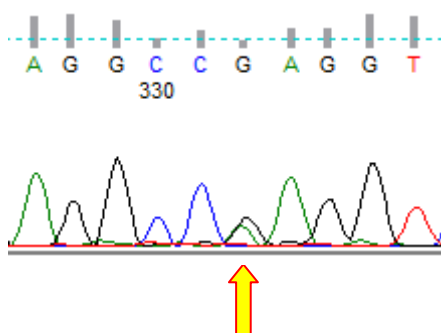
#### 4.2.6 MUTACIJI G.5034G>A IN G.5185-5187INSTAA

Mutaciji se nahajata v 3' neprevedeni regiji (3' UTR). Vsako smo našli pri enem preiskovancu, v heterozigotni obliki. Raziskave kažejo, da je 3' UTR območje pomembno

za uravnavanje ekspresije genov. 3' UTR sodeluje pri prenosu mRNA iz jedra, pri poliadenilaciji mRNA molekule in subceličnem ciljanju (»subcellular targeting«) ter vpliva na raven translacije in na stabilnost mRNA.



**Slika 19:** Mutacija g.5185-5187insTAA v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, od katerega naprej opazimo prekrivanje vrhov.



**Slika 20:** Mutacija g.5034G>A v heterozigotni obliki. Puščica kaže mesto mutacije, kjer opazimo prekrivanje dveh vrhov – črnega (G) in zelenega (A).



## 5. SKLEP

Pomnoženim vzorcem DNA smo z metodo DNA sekvenčne analize določili nukleotidno zaporedje DNA fragmentov. Ugotovili smo:

- Metodi PCR in DNA sekvenčna analiza predstavljata ustrezni metodi za odkrivanje novih mutacij v genu za GALE v slovenski populaciji.
- Odkrili smo 11 novih mutacij, ki so vse v heterozigotni obliki.
- Našli smo 4 intronske mutacije: G.2358C>A, G.2376G>C, G.3228C>G in G.4309G>A.
- Našli smo 2 mutaciji, ki se nahajata v 5. eksonu: G.2587G>T in G.2602G>T ter eno mutacijo G.4073G>A v 9. eksonu in še eno mutacijo G.4601G>A v 11. eksonu.
- Našli smo eno mutacijo, ki se nahaja v 5' neprevedljivi regiji (5' UTR): G.404C>T.
- Našli smo dve mutaciji, ki se nahajata v 3' neprevedeni regiji (3' UTR): G.5034G>A in G.5185-5187insTAA, pri čemer gre pri zadnji za insercijo.
- Večino mutacij smo odkrili pri zdravih preiskovancih, le pri dveh bolnicah z ovarijskim karcinomom smo našli intronsko mutacijo G.4309G>A (IVS10+13G>A).
- Večina preiskovancev je imela pri določenih mutacijah aktivnost GALE znižano na približno od najmanj 57% pa do največ 75% povprečja v slovenski populaciji.

## 6. LITERATURA

1. Galactose – Wikipedia, the free encyclopedia: <http://en.wikipedia.org/wiki/Galactose>
2. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, zbirka Scripta, Ljubljana 2005.
3. Medicinski rječnik, Galaktoza:  
<http://www.onlinerjecnik.com/medicinski.php?gt=Galaktoza&id=4403>
4. Gropper SS, Weese SJ, West PA, Gross KC: Free galactose content of fresh fruit and strained fruit and vegetable baby foods: More foods to consider for the galactose – restricted diet. J Am Diet Assoc 2005; 100 (5): 573 – 575.
5. Wright EM: Genetic Disorders of Membrane Transport, I. Glucose Galactose Malabsorbtion. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 1998; 275: 879 – 882.
6. Leslie ND: Insights into the pathogenesis of galactosemia. Annu Rev Nutr 2003; 23: 59-80
7. Petry KG, Reichardt JKV: The fendamental importance of human galactose metabolism: lessons from genetics and biochemistry. TIG 1998; 14 (3): 98-102
8. Glycolipid – Wikipedia, the free encyclopedia: <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycolipid>
9. Liu G, Hale GE, Hughes CL: Galactose matabolism and ovarian toxicity. Reprod Toxicol Sep-Oct 2000 ; 14 (5): 377-384.
10. Frey PA: The Leloir pathway: a mechanich imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. FASEB J, Mar 1996, 10: 461-470.
11. Karas Kuželički N: Toksični vidiki galaktoza – je mleko res zdrava hrana v vseh življenskih obdobjih? Farm Vestn, Mar 2008, 59: 3-7.

12. Timson DJ: The structural and molecular biology of Type III Galactosemia. IUBMB Life 2006 Feb; 58 (2): 83-89.
13. Scriver B: The metabolic and Molecular Bases of inherited disease, 8<sup>th</sup> Ed., McGraw-Hill Book Company, 2001, 1: 1553-1577.
14. Boshc A: Classical galactosemia revisited. J Inherit Metab Dis 2006; 29: 516-525.
15. Wasilenko J, Fridovich-Keil JL: Relationship between UDP-Galactose 4'-Epimerase Activity and Galactose Sensitivity in Yeast. J Biol Chem, 2006, Mar 31; 281 (13): 8443-8449.
16. Timson DJ: Functional analysis of disease-causing mutations in human UDP-galactose 4-epimerase. FASEB J 2005, 272: 6170-6177.
17. Holden HM, Rayment I, Thoden JB: Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. J Biol Chem 2003, Nov 7, 278 (45): 43885-43888.
18. Thoden JB, Wohlers TM, Fridovich-Keil JL, Holden HM: Human UDP-galactose 4-Epimerase . J Biol Chem 2001, May 4, 276 (18): 15131-15136.
19. Schulz JM, Watson AL, Sanders R, Ross KL, Thoden JB, Holden HM, Fridovich-Keil JL: Determinants of Function and Substrate Specificity in Human UDP-Galactose 4'-Epimerase. J Inherit Metab Dis 2004, July 30; 279 (31): 32796-32803.
20. Thoden JB, Frey PA, Holden HM: Crystal Structures of the Oxidized and Reduced Forms of UDP-galactose 4-Epimerase Isolated from *Escherichia coli*. Biochemistry 1996; 35: 2557-2566.
21. Thoden JB, Frey PA, Holden HM: Molecular Structure of the NADH/UDP-galactose Abortive Complex of UDP-galactose 4-Epimerase from *Escherichia coli*: Implications for the Catalytic Mechanism. Biochemistry 1996; 35: 5137-5144.
22. Thoden JB, Frey PA, Holden HM: High resolution X-ray structure of UDP-galactose 4'-epimerase complexed with UDP-fenol. Protein Science 1996; 5: 2149-2161.

23. Alano A, Almashanu S, Chinsky JM, Costeas P et al: Molecular characterization of a unique patient with epimerase-deficiency galactosemia. *J Inher Metab Dis* 1998 Jun; 21 (4): 341-350.
24. GALE Gene-GeneCards/ GALE Protein/ GALE Antibody:  
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=gale>
25. Ensembl genome browser 54: H. sapiens – Marked – up sequence – Gene: GALE (ENSG00000117308):  
[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000117308;r=1:23994676-23999881;t=ENST00000374497](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000117308;r=1:23994676-23999881;t=ENST00000374497)
26. Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D: *Interna medicina*, 3. Izdaja; Ljubljana 2005, 777-778.
27. MGM31ID840: <http://www.e-um.si/lessons/840/>
28. Openo KK, Schulz JM, Vargas CA, Orton SC, Epstein MP, Schnur RE, Scaglia F et al: Epimerase-Deficiency Galactosemia is not a Binary Condition. *Am J Hum Genet*, Jan 2006; 78: 89-102.
29. Chhy JS, Vargas CA, McCorvie TJ, Fridovich-Keil JL, Timson DJ: Analysis of UDP-galactose 4'-Epimerase mutations associated with the intermediate form of type III galactosemia. *J Inher Metab Dis* 2008; 31: 108-116.
30. Wohlers TM, Christacos NC, Harreman MT, Fridovich-Keil JL: Identification and Characterization of a Mutation in the Human UDP-Galactose-4-Epimerase Gene, Associated with Generalized Epimerase Deficiency Galactosemia. *AM J Hum Genet*, Jan 1999; 64: 462-470.
31. Quimbly BB, Alano A, Almaschanu S, DeSandro AM, Cowman TM, Fridovich-Keil JL: Characterization of Two Mutations Associated with Epimerase-Deficiency Galactosemia, by Use of a Yeast Expression System for Human UDP-Galactose-4-Epimerase. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 590-598.

32. Henderson JM, Huguenin SM, Cowman TM, Fridovich-Keil JL: A PCR-based method for detecting known mutations in the human UDP-galactose-4'-epimerase gene associated with epimerase deficiency galactosemia. *Clin Genet* 2001; 60: 350-355.
33. Henderson JM, Fales FW: Continuous-Flow Fluorometry of Low Galactose Concentrations in Blood or Plasma. *Clin Chem* 1980; 26 (2): 282-285.
34. Mason GA, Summer GK, Dutton HH, Schwaner RC: Automated Fluorometric Analysis of Galactose in Blood. *Clin Chem* 1977; 23 (6): 971-974.
35. Paigen K, Pacholec F, Lewy HL: A new method of screening for inherited disorders of galactose metabolism. *J Lab Clin Med*, Jun 1982; 99 (6): 895-907.
36. Chen J, Yager CT, Reynolds RA, Segal S: Identification of galactitol and galactonate in red blood cells by gas chromatography/mass spectrometry. *Clin Chem Acta* 2002; 322: 37-41.
37. Xu YK, Kaufman FR, Donnell GN, Giudici T, Alfi O: HPLC analysis of uridine diphosphate sugars: decreased concentrations of uridine diphosphate galactose in erythrocytes and cultured skin fibroblasts from classical galactosemia patients. *Clin Chem Acta* 1995; 240: 21-33.
38. Sambrook J, Russell DW: *Molecular cloning a laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> Ed. 2001, Chapter 8; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
39. Hercog-Velikonja B, Gruden K: *Praktikum iz molekularne biologije-Teoretični del*, Zbirka skripta.
40. Roux KH: Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Method and Application* 1995; 4: 185-194.
41. Polymerase chain reaction-Wikipedia, the free encyclopedia.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Polimerase\\_chain\\_reaction](http://en.wikipedia.org/wiki/Polimerase_chain_reaction)
42. Dymethyl sulfoxide-Wikipedia, the free encyclopedia:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Dymethyl\\_sulfoxide](http://en.wikipedia.org/wiki/Dymethyl_sulfoxide)

43. Roche molecular Biochemical Contents: GC-RICH PCR System. Biochemica 1999, 1:10-11.
44. Hube´ F, Reverdian P, Iochmann S, Gruel Y: Improved PCR Method for Amplification of GC-Rich DNA Sequences. Molecular Biotechnology 2005; 31:81-84.
45. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Biochemistry, 5<sup>th</sup> Ed., W.H. Freeman and Company, New York; 2001.
46. DNA sequencing-Wikipedia, the free encyclopedia:  
<http://en.wikipedia.org/wiki/DNAsequencing>
47. Pickering, B. and A. Willis. The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. 2005: Elsevier.
48. Le Hir, H., A. Nott, and M. Moore, How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. Trends in Biochemical Sciences, 2003. 28(4): p. 215-220.
49. ExpASy ProtParam tool: <http://au.expasy.org/cgi-bin/protparam>.

