

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo

BLAŽ MUHIČ

**PROUČEVANJE VPLIVA S-
ADENOZILMETIONINA NA ALOENCIME
TIOPURIN-S-METILTRANSFERAZE**

**THE INFLUENCE OF S-
ADENOSYLMETHIONIN ON ALLOZYMES
OF THIOPURINE-S-
METHYLTRANSFERASE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Irene Mlinarič Raščan, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Mihe Mileka, univ. dipl. biokem.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Ireni Mlinarič Raščan, mag. farm., za izkazano zaupanje, pripravljenost za sodelovanje in pomoč pri nastajanju diplomskega dela.

Iskrena zahvala somentorju asist. dr. Mihi Mileku, univ. dipl. biokem., za strokovno vodstvo pri delu v laboratoriju, neizmerno pomoč pri vrednotenju rezultatov in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo za pomoč in prijetno delovno vzdušje v laboratoriju.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Irene Mlinarič Raščan, mag. farm., in somentorja asist. dr. Mihe Mileka, univ. dipl. biokem.

Blaž Muhič

Ljubljana, 2011

Vsebina

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Uvod..... | 1 |
| 1.1 | Tiopurini..... | 1 |
| 1.1.1 | Uporaba tiopurinov..... | 1 |
| 1.1.2 | Mehanizem delovanja tiopurinov in njihova presnova..... | 2 |
| 1.2 | Tiopurin-S-metiltransferaza..... | 4 |
| 1.2.1 | Aktivnost TPMT..... | 5 |
| 1.2.2 | Genetski polimorfizmi TPMT..... | 5 |
| 1.2.3 | Ujemanje med genotipom in fenotipom..... | 8 |
| 1.2.4 | Vpliv TPMT na zdravljenje s tiopurini..... | 9 |
| 1.3 | S-adenozilmetionin..... | 10 |
| 1.3.1 | Metabolizem SAM..... | 10 |
| 1.3.2 | Vpliv SAM na aktivnost TPMT..... | 12 |
| 1.3.3 | Vplivi na SAM..... | 12 |
| 2 | Namen dela..... | 14 |
| 3 | Materiali in metode..... | 15 |
| 3.1 | Kemikalije..... | 15 |
| 3.2 | Aparature..... | 16 |
| 3.3 | Določanje aktivnosti TPMT v hemolizatih z metodo RP-HPLC..... | 17 |
| 3.3.1 | Priprava reagentov, standardnih raztopin, delovnih raztopin in mobilne faze... .. | 17 |
| 3.3.2 | Priprava hemolizatov..... | 18 |
| 3.3.3 | Priprava vzorcev..... | 18 |
| 3.3.4 | Analiza s HPLC in kromatografski pogoji..... | 18 |
| 3.4 | Določanje koncentracije SAM z metodo RP-HPLC..... | 19 |
| 3.4.1 | Priprava vzorcev..... | 19 |
| 3.4.2 | Analiza s HPLC in kromatografski pogoji..... | 19 |
| 3.5 | Modelni in vitro sistemi za proučevanje aloencimov TPMT na celičnem nivoju..... | 20 |
| 3.6 | Gojenje stabilnih linij COS-7 celic..... | 21 |
| 3.6.1 | Štetje celic..... | 21 |
| 3.7 | Gojenje stabilnih celičnih linij v mediju z metioninom in mediju brez metionina ... | 21 |
| 3.8 | Plazmidi..... | 22 |
| 3.9 | Transfekcija COS-7 celic..... | 22 |
| 3.10 | Aktivnost β -galaktozidaze..... | 24 |
| 3.11 | Merjenje aktivnosti TPMT v celicah..... | 24 |
| 3.12 | SDS-PAGE in western prenos..... | 25 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.13 | Stabilne celične linije | 26 |
| 3.13.1 | Izolacija RNA | 26 |
| 3.13.2 | Reverzna transkripcija | 27 |
| 3.13.3 | RT-PCR | 27 |
| 4 | Rezultati | 29 |
| 4.1 | Vpliv koncentracije SAM na aktivnost TPMT v hemolizatih | 29 |
| 4.1.1 | Aktivnost TPMT | 29 |
| 4.1.2 | Koncentracija SAM | 30 |
| 4.1.3 | Korelacija med genotipom in fenotipom | 31 |
| 4.1.4 | Ugotavljanje povezave med koncentracijo SAM in aktivnostjo TPMT | 32 |
| 4.2 | Vpliv koncentracije SAM na aktivnost TPMT na prehodno transficiranih celicah .. | 32 |
| 4.2.1 | B-galaktozidaza | 33 |
| 4.2.2 | Izražanje TPMT na proteinskem nivoju-Western prenos | 33 |
| 4.2.3 | Aktivnost TPMT izmerjena z metodo HPLC | 35 |
| 4.3 | Vpliv koncentracije SAM na aktivnost TPMT pri stabilnih celičnih linijah | 37 |
| 4.3.1 | RT-PCR | 37 |
| 4.3.2 | Aktivnost TPMT | 38 |
| 4.3.3 | Western prenos | 39 |
| 5 | Razprava | 41 |
| 5.1 | Določanje vpliva SAM na aktivnost TPMT v hemolizatih zdravih preiskovancev .. | 41 |
| 5.2 | Določanje vpliva SAM na prehodno transficirane celice | 42 |
| 5.3 | Določanje vpliva SAM na izražanje TPMT v stabilnih celičnih linijah | 44 |
| 6 | Sklep | 46 |
| 7 | Literatura | 47 |
| 8 | Kazalo preglednic | 52 |
| 9 | Kazalo slik | 53 |

Povzetek

Tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT) ima velik vpliv na metabolizem tiopurinskih učinkovin. Njena visoka aktivnost poveča deaktivacijo tiopurinov in to zmanjša pojavnost nevarnih neželenih učinkov. Gen za TPMT je polimorfen in heterozigoti in homozigoti za mutiran alel imajo znižano aktivnost TPMT in s tem povečano tveganje za pojav neželenih učinkov. Genotipizacija za mutirane alele TPMT je relativno hiter in enostaven farmokogenetski test, ki omogoča optimacijo posameznikove terapije s tiopurini. Vendar ujemanje med genotipom in fenotipom ni popolno in to omejuje uporabnost genotipizacije v klinični praksi.

Zato smo v raziskavi preverili vpliv koncentracije S-adenozilmetionina (SAM) na aktivnost različnih aloencimov TPMT. Raziskavo smo opravili z merjenjem aktivnosti TPMT in koncentracije SAM v eritrocitih zdravih preiskovancev z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Drugi del raziskave je bil opravljen na COS-7 celicah, v katere smo vnesli plazmide z zaporedji za najpogostejše aloencime TPMT*1, TPMT*2, TPMT*3A in TPMT*3C. Celice smo gojili v prisotnosti in odsotnosti metionina, ki kot prekurzor SAMa vpliva na njegovo koncentracijo. Z metodo HPLC in z western prenosom smo preverili kakšen vpliv ima znižanje znotrajcelične koncentracije SAM na TPMT.

S statistično analizo smo dokazali, da imajo posamezniki z nižjo koncentracijo SAM tudi nižjo aktivnost TPMT v eritrocitih. Na COS-7 celicah smo dokazali, da vpliva znižanje znotrajcelične koncentracije SAM na znižanje aktivnosti in količine TPMT. Domnevamo, da gre za posttranslacijsko uravnavanje aktivnosti TPMT z vezavo SAM na protein in posledično stabilizacijo njegove strukture. Med seboj smo primerjali različne aloencime in ugotovili, da ima TPMT*3C večjo aktivnost od TPMT*2 in TPMT*3A in ob znižanju koncentracije SAM se aktivnost najbolj zniža aloencimu TPMT*3C. To lahko razložimo z ohranitvijo vezavnega mesta za SAM pri TPMT*3C medtem, ko vezavno mesto spremenjeno pri TPMT*2 in TPMT*3A.

Naša raziskava nakazuje možnost uporabe koncentracije SAM oziroma polimorfizmov v genih, ki so vpleteni v njegovo biosintezo, kot nove biološke označevalce pri individualizacije terapije s tiopurini.

Abstract

Thiopurine-S-methyltransferase (TPMT) has a great impact on the metabolism of thiopurine drugs. Its high activity leads to greater deactivation of thiopurines and decreases the life threatening side effects. TPMT is coded by polymorphic gene which exhibits polymorphisms. Heterozygous and homozygous individuals for mutant alleles have decreased TPMT activity and increased risk for experiencing side effects. Genotyping analysis of TPMT mutant alleles represents relatively fast and simple pharmacogenetic test for determination the optimal treatment for specific patient. The fact that the correlation between genotype and phenotype is incomplete limitates its clinical application.

In the present study we have determined influence of S-adenosylmethionine (SAM) concentration on activity of different TPMT allozymes. In study we measured the concentration of SAM and TPMT activity in erythrocytes of healthy individuals using high-performance liquid chromatography (HPLC). Second part was conducted on COS-7 cells with inserted plasmids for the most common TPMT allozymes: TPMT*1, TPMT*2, TPMT*3A and TPMT*3C. Cells were grown in the presence and absence of methionine which is precursor for SAM and therefore it influences concentration of SAM. With methods HPLC and Western blot have we determined what is the influence of decreased intracellular concentration of SAM on the TPMT.

With statistic analysis we determined that individuals with lower concentration of SAM had lower TPMT activity in erythrocytes. On COS-7 cells we showed that lower intracellular concentration of SAM results in decreased activity and quantity of TPMT. This is probably due to posttranslational regulation of TPMT activity by binding SAM and consequent stabilization of protein structure. By comparing different allozymes we determined that the activity of TPMT*3C is greater than TPMT*2 and TPMT*3A and the influence of decreased SAM concentration is greater on TPMT*3C. Explanation can be that the TPMT*3C structural changes have no effect on SAM binding site compared to the TPMT*2 and TPMT*3A.

Our study indicates the potential application of SAM or polymorphisms of enzymes, involved in its biosynthesis, as new biomarkers in the individualization of thiopurine therapy.

Seznam okrajšav

| OKRAJŠAVA | RAZLAGA |
|-------------|---|
| 5,10-Me-THF | 5,10-metilen-tetrahidrofolat |
| 5-Me-THF | 5-metiltetrahidrofolat |
| 6-MMP | 6-metilmerkaptopurin |
| 6-MP | 6-merkaptopurin |
| 6-MTG | 6-metiltiogvanin |
| 6-TG | 6-tiogvanin |
| ALL | akutna levkoblazna levkemija |
| AO | aldehidna oksidaza |
| AP | alopurinol |
| AZA | azatioprin |
| BHMT | betain-homocistein-metiltransferaza |
| cDNA | komplementarna deoskiribonukleinska kislina |
| CI | interval zaupanja (ang. confidence interval) |
| DMSO | dimetilsulfoksid |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| DNPS | biosinteza purinov <i>de novo</i> (ang. de novo purine synthesis) |
| dNTP | deoksitrifosfo nukleotidi |
| dTGTP | deoksi-6-tiogvanozin-5'-trifosfat |
| DTT | D,L-ditiotreitol |
| FBS | fetusni serum goveda (ang. fetal bovine serum) |
| GMPS | gvanozinmonofosfat-sintetaza |
| Hb | hemoglobin |
| HGPRT | hipoksantin-gvanin fosforibosil transferaza |
| HPLC | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. high performance liquid chromatography) |
| huCYC | humani ciklofilin |
| IMPDH | inozinmonofosfat-dehidrogenaza |
| KP-pufer | kalijev fosfatni pufer |
| Met | metionin |
| MeTIMP | 6-metiltioinozin-5'-monofosfat |
| mRNA | informacijska ribonukleinska kislina |
| MTA | metiltioadenozin |
| MTHFR | 5,10-metilentetrahidrofolat-reduktaza |
| NT | netransficirane celice |
| PBS | izotonični fosfatni pufer (ang. phosphate buffered saline) |
| RBC | eritrociti (ang. red blood cells) |
| RLB | 1×reporter lysis buffer |
| RNA | ribonukleinska kislina |
| ROC | ang. receiver-operating characteristic |

| | |
|----------|--|
| SAH | S-adenozil-L-homocistein |
| SAM | S-adenozilmetionin |
| SDS-PAGE | poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata |
| SLB | nanašalni pufer s SDS (ang. SDS loading buffer) |
| TGMP | 6-tiogvanozin-5'-monofosfat |
| TGN | tiogvaninski nukleotidi |
| TGTP | 6-tiogvanozin-5'-trifosfata |
| TIMP | 6-tioinozin-5'-monofosfat |
| TPMT | tiopurin-S-metiltransferaza |
| TYMS | timidilat-sintaza |
| VNTR | spremenljivo število tandemskih ponovitev |
| XO | ksantin-oksidaza |
| ZU | zdravilna učinkovina |
| β-ME | beta merkaptoetanol |

1 Uvod

Učinki zdravilnih učinkovin (ZU) so odvisni od izražanja številnih genov v genomu, ki vplivajo na farmakokinetiko in farmakodinamiko ZU. S preučevanjem vpliva genetskih faktorjev na odziv posameznika na ZU lahko prilagodimo terapijo z namenom optimizacije učinkovitosti zdravljenja in zmanjšanja neželenih učinkov. Ker na učinke ZU vpliva večje število genov posamezni farmakogenetski označevalci pogosto ne napovedo dovolj natančno kakšna bo učinkovitost terapije in pojavnost neželenih učinkov. Zato so potrebni poligenetski modeli, ki bi bolj natančno opisali vpliv genoma delovanje na ZU, v povezavi z drugimi negenetskimi vzroki inter-individualih razlik v odzivu na ZU (1). Odkrivanje novih genetskih označevalcev bo pripomoglo k boljšemu razumevanju kompleksnosti človeškega telesa in k doseganju večje učinkovitosti zdravljenja in zmanjševanju pojava neželenih učinkov.

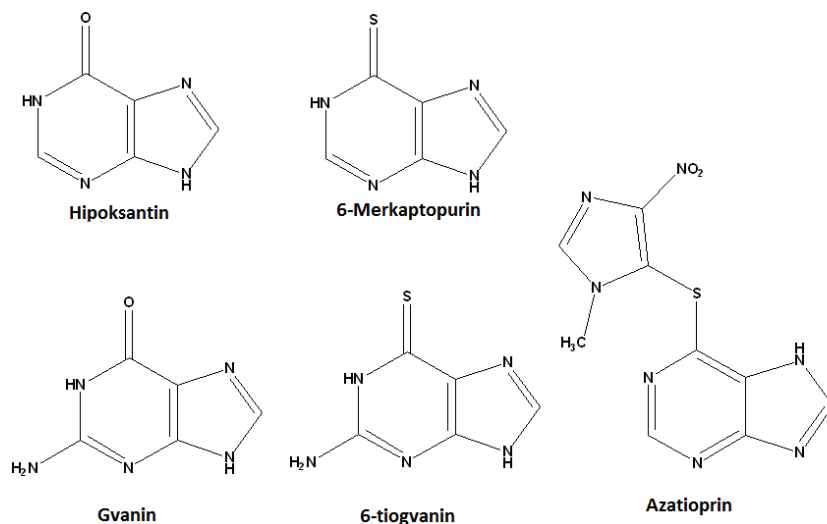
1.1 Tiopurini

1.1.1 Uporaba tiopurinov

Tiopurini so prezdravila, ki potrebujejo znotrajcelično aktivacijo, da pride do njihovega citotoksičnega učinka. Strukturno so analogi purinskih baz in mednje spadajo 6-merkaptopurin (6-MP), 6-tiogvanin (6-TG) in azatioprin (AZA) (slika 1). Uporabljajo se za zdravljenje širokega spektra bolezni, kot je akutna limfoblastna levkemija (ALL), avtoimune bolezni kot tudi pri transplantacijah (2). Tiopurini se uporabljajo tudi za zdravljenje kroničnih vnetnih bolezni kot so ulcerativni colitis, Chronova bolezen in revmatoidni artritis. Pri zdravljenju vnetnih bolezni uporabljamo nižje dozmerke kot pri rakavih bolnikih, vendar pa samo zdravljenje traja dalj časa (3). ALL je najpogostejše maligno obolenje v otroštvu, ki povzroči nenadzorovano in nepravilno dozorevanje limfocitov in ima za posledico zavrtje normalne hematopoeze. Zdravljenje poteka večinoma s tiopurini, ki imajo ozek terapevtski indeks (2) zato se lahko pojavijo s tiopurini povezani stranski učinki, ki so lahko tudi živlensko nevarni. Najresnejši stranski učinek je mielosupresija, ki se pojavlja pri 1,4-5 % bolnikov in se odraža kot levkopenija, trombocitopenija in anemija. Pogostejši stranski učinki so hepatitis, infekcije in redkeje pankreatitis, slabost, bruhanje in izguba apetita (4). Stranske učinke, predvsem živlensko ogrožujočo supresijo kostnega mozga, v splošnem pripisujejo pomankanju encima TPMT (3). Stranskim učinkom se poskušamo izogniti z določanjem aktivnosti TPMT in prilagoditvijo terapije, vendar pa stranskih učinkov kot so alergijske

reakcije, hepatotoksičnost, pankreatitis, slabost in bruhanje ne moremo predvideti z določanjem TPMT (5).

6-MP se uporablja za zdravljenje ALL, uporaba AZA pa se opušča, ker so opazne številne povezave z povečanim številom malignih obolenj. Mednarodna agencija za raziskave raka (International Agency for Research on Cancer) je AZA uvrstila na seznam karcinogenov (6).



Slika 1: Strukturna podobnost ZU in endogenih baz

6-Merkaptopurin je tiolni analog hipoksantina, 6-tiogvanin pa tiolni analog gvanina. Azatioprin je predzdravilo 6-merkaptopurina (6).

1.1.2 Mehanizem delovanja tiopurinov in njihova presnova

Tiopurini so neaktivna predzdravila, ki potrebujejo presnovno aktivacijo za svoje delovanje. Za svojo aktivacijo potrebujejo encim hipoksantin-gvanin fosforibosil transferazo (HGPRT). 6-tiogvanin (6-TG) se po aktivaciji s kinazami in reduktazami pretvori v tiogvaninske nukleotide (TGN), ki se vgradijo v DNA in sprožijo apoptozo (3, 7) (slika 2).

6-TG se z encimom HGPRT neposredno pretvori v 6-tiogvanozin-5'-monofosfat (TGMP), nadaljna pretvorba vodi v nastanek 6-tiogvanozin-5'-trifosfata (TGTP), ki se vgradi v RNA, ali pa se reducira v deoksi-6-tiogvanozin-5'-trifosfat (dTGTP), ki se vgradi v DNA (7).

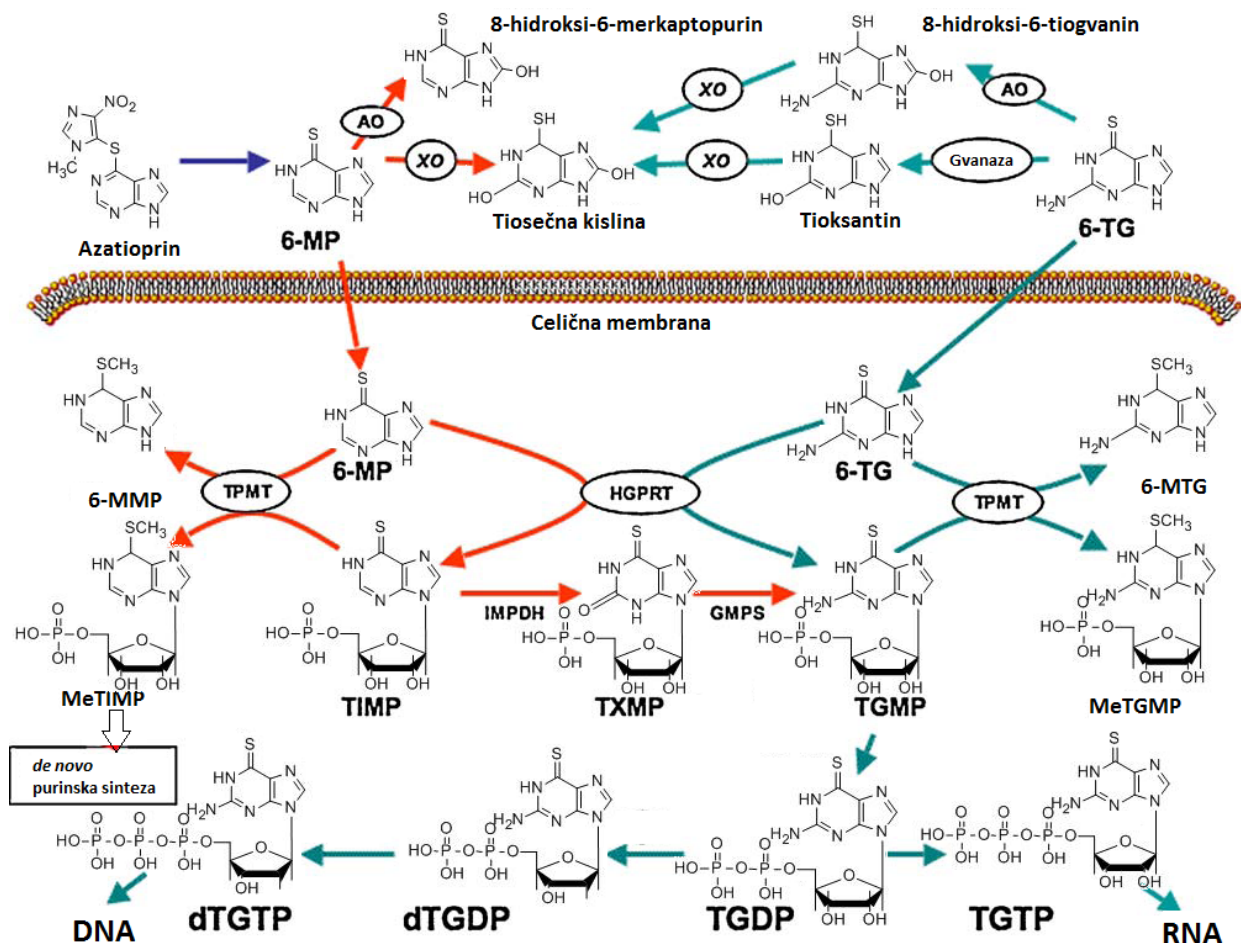
6-merkaptopurin (6-MP) in njegovo predzdravilo azatioprin (AZA) se prav tako v celici pretvorita v tiogvaninske nukleotide (TGN), a je pot večstopenjska, saj vključuje dodatne encime. Ti encimi ustvarijo dodatne metabolite, ki inhibirajo *de novo* biosintezo purinov (DNPS) (3, 7).

AZA se v jetrih neencimsko pretvori v 6-MP (6). 6-MP se z encimom HGPRT pretvori v 6-tioinozin-5'-monofosfat (TIMP) in se nato z encimoma inozinmonofosfat-dehidrogenazo

(IMPDH) in gvanozinmonofosfat-sintetazo (GMPS) pretvori v TGMP. TIMP pa se lahko tudi metilira s tiopurin-S-metiltransferazo (TPMT) do 6-metiltioinozin-5'-monofosfata (MeTIMP), ki je močan inhibitor DNPS (7).

Glavni encimi, ki tekmujejo s HGPRT za presnovo 6-TG in 6-MP so TPMT, aldehydna oksidaza (AO) in ksantin-oksidaza (XO), katerih produkti imajo malo ali nič citotoksične aktivnosti. Pri reakciji s XO nastane tiosečna kislina in pri reakciji z AO nastane 8-hidroksi derivati. Zaradi teh dveh encimov ima 6-MP *per os* biološko uporabnost med 5-37 % in 6-TG 14-46 %.

TPMT pretvarja 6-MP v 6-metilmerkaptopurin (6-MMP) in 6-TG v 6-metiltiogvanin (6-MTG) in predstavlja glavno deaktivacijsko pot v hematopoetskem tkivu ter v največji meri vpliva na biološko uporabnost citotoksičnih TGN (8).



Slika 2: Presnova tiopurinov

6-MP: 6-merkaptopurin, 6-TG: 6-tiogvanin, AO: aldehydna-oksidadza, XO: ksantin-oksidadza, 6-MMP: 6-metilmerkaptopurin, 6-MTG: 6-metiltiogvanin, HGPRT: hipoksantin-gvanin-fosforiboziltransferaza, TPMT:

tiopurin-S-metiltransferaza, MeTIMP: 6-metiltioinozin-5'-monofosfat, MeTGMP: 6-metiltiogvanozin-5'-monofosfat, TIMP: 6-tioinozin-5'-monofosfat, IMPDH: inozinmonofosfat-dehidrogenaza, TXMP: 6-tioksantin-5'-monofosfat, GMPS gvanozinmonofosfat-sintetaza, TGMP: 6-tiogvanozin-5'-monofosfat, TGDP: 6-tiogvanozin-5'-difosfat, TGTP: 6-tiogvanozin-5'-trifosfat, dTGDP: deoksi-6-tiogvanozin-5'-difosfat, dTGTP: deoksi-6-tiogvanozin-5'-trifosfat (6).

1.1.2.1 Glavni encimi presnove tiopurinov

Glavni encimi, ki vplivajo na presnovo tiopurinov so hipoksantin-gvanin-fosforiboziltransferaza (HGPRT), inozinmonofosfat-dehidrogenaza (IMPDH), gvanozinmonofosfat-sintetaza (GMPS), ksantin oksidaza (XO) in TPMT (slika 2).

HGPRT aktivira začetni korak v pretvorbi 6-MP in 6-TG do 6-TGN (9). Njegova aktivnost je lahko zelo variabilna, a to ne vpliva bistveno na učinkovitost in toksičnost tiopurinov, ker je za zadostno aktivacijo tiopurinov zadostna že zelo nizka aktivnost encima HGPRT (10).

IMPDH je ključni encim v *de novo* sintezi gvaninskih nukleotidov in sicer katalizira pretvorbo inozin-monofosfata v ksantozin-monofosfat. Ima tudi pomembno vlogo v presnovni pretvorbi tiopurinov, kjer pretvarja 6-tioinozin-5'-monofosfat (TIMP) v 6-tioksantin-5'-monofosfat. Vpliva na hitrost pretvorbe 6-TGN iz tiopurinov in njegova koncentracija pozitivno korelira z 6-TGN (9). Tako naj bi večja koncentracija tega encima pomenila intenzivnejšo aktivacijo tiopurinov in višjo toksičnost ter učinkovitost terapije. Korelacija med aktivnostjo IMPDH in rezistenco na tiopurine pa do danes še ni bila dokazana, niti v *in vitro* niti v *in vivo* poskusih (9).

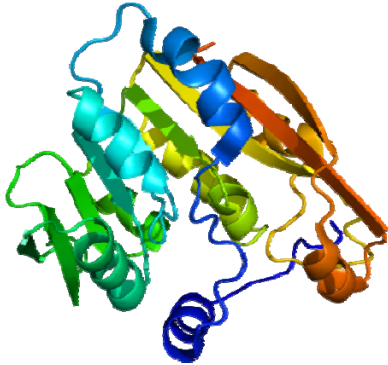
GMPS ima podobno endogeno vlogo kot IMPDH. Sodeluje pri sintezi gvaninskih nukleotidov, vendar njegove vloge v povezavi z učinkovitostjo tiopurinov še niso podrobneje raziskali. Aktivnost XO se med posamezniki razlikuje tudi do desetkrat. Ni bilo še ugotovljeno, ali so za razlike odgovorni genetski polimorfizmi in kakšen vpliv ima to na zdravljenje s tiopurini (11).

Najpomembnejši vpliv na zdravljenje s tiopurini ima encim TPMT, ki je opisan v nadaljevanju.

1.2 Tiopurin-S-metiltransferaza

Tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT; EC 2.1.1.67) je citosolni encim (Slika 3) in spada v družino od S-adenozilmetionina odvisnih metiltransferaz. Ima molekulsko maso 28kDa in je sestavljen iz 246 aminokislin (12). Prisoten je v večini tkiv med drugim v srcu, krvnih celicah, placenti, pankreasu in črevesju (12). Katalizira S-metiliranje citotoksičnih in

imunosupresivnih tiopurinskih učinkovin kot tudi drugih aromatičnih in heterocikličnih sulfhidrilnih spojin (13). Kot donor metilne skupine sodeluje pri reakciji kosubstrat S-adenozilmetionin (SAM), ki se pretvori v S-adenozil-L-homocistein (SAH).



Slika 3: Struktura humanega TPMT

Od drugih metiltransferaz se razlikuje po prisotnosti N-terminalnega dela. Tridimenzionalna struktura TPMT še ni znana, ker je v topni obliki možno pridobiti le protein brez N-terminalnega dela (14,15).

1.2.1 Aktivnost TPMT

Najpogostejša variacija alela v kavkazijski populaciji je TPMT*3A (16). Kavkazijci imajo trimodalno frekvenčno porazdelitev TPMT in sicer jih ima 89-94 % visoko aktivnost, 6-11 % srednjo aktivnost in 0,33 % ima nizko ali odsotno aktivnost (12). Variacija alela TPMT*3C je najpogostejša v vzhodni Aziji (16). Frekvenčna porazdelitev pri Kitajcih in drugih azijskih narodih je unimodalna.

Glede vpliva spola na aktivnost TPMT so si rezultati nasprotujoči, nekateri so dokazali povišano aktivnost pri ženskah (17), drugi pri moških (18), tretji niso opazili razlike med spoloma (19). Prav tako se raziskave razlikujejo glede vpliva starosti.

Na aktivnost TPMT poleg genetskih vzrokov vplivajo tudi drugi faktorji. Učinkovine, kot so aspirin, sulfasalazin, olfasalazin, furosemid, triklormetazid, so znani inhibitorji TPMT (20, 21). Nedavna transfuzija krvi lahko poviša aktivnost TPMT, kadar jo določamo v eritrocitih. Terapija s tiopurini lahko privede do indukcije aktivnosti encima (12), kar poviša aktivnost za 30-35 % (2).

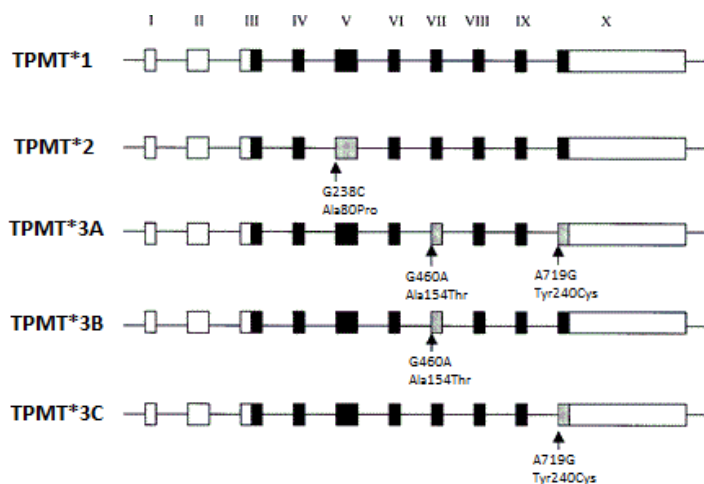
1.2.2 Genetski polimorfizmi TPMT

Humani TPMT gen kodira 34 kilobaznih (kb) parov, vsebuje 10 eksonov, 9 intronov in se nahaja na kromosomu 6 na mestu p22.3. V humanem genomu obstaja tudi procesirani

pseudogen TPMT, ki je lociran na kromosomu 18 na mestu q21.1 (12). Aktivnost TPMT se deduje avtosomno, nepopolno dominantno (12).

Poznanih je 29 genetskih polimorfizmov TPMT, od katerih mnogi povzročijo hitrejšo razgradnjo, preko ubikvintiliranja ter proteasomske poti in/ali agregacijo proteina (22, 23). Večina polimorfizmov je mononukleotidnih, kar pomeni da se zamenja en nukleotid z drugim. To povzroči nastanek drugosmiselnih ali nesmiselnih kodonov. Posledica tega je zamenjava ene aminokislina z drugo ali pa prekinitvev tvorbe encima (16). Velike razlike v aktivnosti TPMT pri ljudeh so posledica prisotnosti najpogostejših mononukleotidnih polimorfizmov, in sicer TPMT*2, *3A in *3C. Visoko aktivnost TPMT imajo ljudje, ki so homozigoti za divji tip gena (TPMT*1), srednja aktivnost ustreza heterozigotnemu genotipu medtem, ko imajo nizko aktivnost homozigotini posamezniki za mutirana alela. Razdelitev posameznikov glede na omenjene genotipe v grobem ustreza frekvenčni porazdelitvi aktivnosti TPMT, a povezava ni popolna (24).

Trije najpogostejši aleli, ki so odgovorni za ~95% prirojenega pomanjkanja TPMT, so TPMT*2 (A80P), TPMT*3A (A154T/Y240C) in TPMT*3C (Y240C) (slika 4).



Slika 4: Shema človeškega TPMT gena in štirih njegovih najpogostejših alelov

Pravokotniki prikazujejo eksone in črte introne, velikosti niso v sorazmerju. Temni deli so ekseni, ki se prepisujejo v funkcionalni encim in sivi deli označujejo mutacije.

Pri alelu TPMT*2 pride do zamenjave aminokislina na mestu 80 in sicer se alanin zamenja s prolinom, kar povzroči spremembo v heliksu α_3 , ki meji na aktivno mesto encima, in prekinitvev večih interakcij v encimu, zato nastane v proteinu reža (25). Mutacija povzroči pospešeno proteasomsko razgradnjo preko ubikvintiliranja zaradi česar je aktivnost v primerjavi z nemutiranim proteinom 100-krat nižja (26).

Pri alelu TPMT*3B pride do zamenjave aminokislina alanina v treonin na mestu 154. Zamenjava A154T je locirana na vezavnem mestu za kosubstrat in poveča izpostavljenost topilu, kar lahko skupaj s pospešeno agregacijo in razgradnjo pojasni popolno pomanjkanje aktivnosti encima (25, 27).

Mutacija TPMT*3C zamenja tirozin s cisteinom na mestu 240. Ta sprememba je locirana na β -ravlini 9, ki je oddaljena od aktivnega mesta. Izgubi se povezava stranske verige preko mesta 240 s helksom $\alpha 8$ (25). Encim je podvržen hitrejši agregaciji in razgradnjikot divji tip. Posledica je zmanjšanje encimske aktivnosti, a manj kot pri mutacijah TPMT*2 in TPMT*3A, ker je aktivno mesto encima še vedno ohranjeno. V poskusu pri katerem so citosol kvasovk, ki so izražale TPMT*3C, inkubirali pri 37 °C v 0,1M Tris HCl (pH=7,5) z ali brez dodanega 1mM SAM je bila aktivnost TPMT*3C ob dodanem SAM po 4 h še vedno blizu 100 %, medtem ko je v primeru, ko pufri ni bil dodan SAM, aktivnost padla na 0 % že po 2h (28). Iz tega lahko sklepamo, da vezava SAM poveča stabilnost proteina in njegovo aktivnost. V primeru encima TPMT*2 pa SAM ni ohranil njegove aktivnosti (26,27).

TPMT*3A mutacija privede do zamenjave dveh aminokislina in sicer alanina v treonin na mestu 154 ter tirozina v cistein namestu 240. Dvojna mutacija ima za posledico sploščeno, rahlo popačeno strukturo proteina in povečano dostopnost topila do aktivnega mesta (25).

Mutacija povzroči nastanek agresomov, ki je eden od načinov odstranjevanja nepravilno zviti encimov. Mutiran protein je tudi podvržen ubikvitiniliranju, ki je 72-krat hitrejši kot pri nemutiranem in v se to prispeva k temu, da je aktivnost nezaznavna (26, 27).

Dve varianti alela, ki imata za posledico najhitrejšo razgradnjo proteina sta TPMT*2 in TPMT*3A (25).

Poleg eksonskih polimorfizmov so našli tudi polimorfizme v promotorski regiji. Promotorska regija vključuje spremenljivo število tandemske ponovitve (VNTR) dolgih 17-18 baznih parov, ki se ponovijo štiri do osemkrat. Ti polimorfizmi lahko vplivajo na aktivnost TPMT, vendar je njihov vpliv manjši (29).

Učinek in toksičnost tiopurinskih učinkovin korelira s koncentracijo 6-TGN v eritrocitih ta pa se med posamezniki zdravljenimi z enakimi koncentracijami tiopurinov razlikuje (29). Na razliko v veliki meri vplivajo genetski polimorfizmi TPMT. Pri bolnikih z nizko aktivnostjo TPMT je deaktivacija tiopurinov manj učinkovita in zato nastane več toksičnih 6-TGN, ki so odgovorni za resne neželene učinke. Pacienti z nizko aktivnostjo TPMT zdravljeni z standardnimi odmerki imajo skoraj 100 % tveganje za razvoj resne mielosupresije (30). Pri homozigotnih otrocih z ALL se zato priporoča samo 6-10 % standardnega odmerka in 65 %

odmerka za heterozigotne bolnike (31). Pri takih bolnikih je odzivnost na terapijo večja, a je hkrati večja tudi možnost pojava sekundarnih malignih obolenj.

1.2.3 Ujemanje med genotipom in fenotipom

Za določanje statusa TPMT lahko uporabimo genotipizacijo ali izmerimo aktivnost encima (5). Na osnovi genotipa lahko napovemo nizko, srednjo ali visoko oz. normalno aktivnost encima. Genotipska napoved se ujema z dejansko aktivnostjo pri 76-99 % posameznikov (32). To ujemanje je najnižje pri skupini, ki ima srednjo encimsko aktivnost. Eden od verjetnih vzrokov je, da v večini raziskav izvedejo genotipizacijo le za najpogostejše štiri alele. Drugih variant alelov pri taki genotipizaciji ne zaznajo in jih opredelijo kot homozigotne posameznike z divjim tipom alelov, čeprav imajo ti posamezniki mutiran encim in s tem verjetno znižano aktivnost TPMT. Manjši vpliv na aktivnost TPMT ima tudi VNTR (2) oziroma različno število tandemskih ponovitev GCC (26) v 5' promotorski regiji TPMT gena vendar je njihov vpliv na neskladnost med genotipom in fenotipom verjetno majhen (24). Obstajajo dokazi, da se aktivnost encima uravnava tudi posttranslacijsko z biokemijskimi faktorji kot so SAM, metionin, homocistein in drugi endogenimi metaboliti in kofaktorji (33). Poleg vsega tega je potrebno upoštevati tudi vplive okolja in posebnosti uporabljene analitske metode (24).

Neujemanje med genotipom in fenotipom je posledica tudi različnega določanja mejnih vrednosti za encimsko aktivnost med posameznimi raziskavami. Mejne vrednosti se določajo statistično glede na uporabljeno metodo merjenja aktivnosti in se precej razlikujejo med raziskavami kar otežuje medsebojno primerjavo (34).

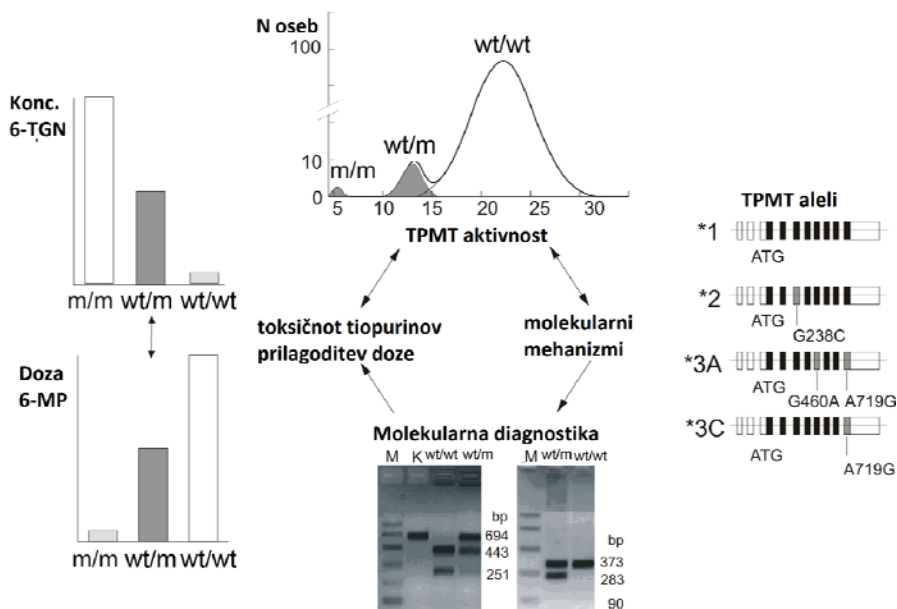
Določanje genotipa ima tako pomanjkljivosti, saj lahko spregledamo neznano mutacijo oz. mutacijo, ki jo ne določamo in predvidimo previsoko aktivnost encima, kar ima za posledico neustrezno terapijo. Med homozigotnimi posamezniki za divji tip alelov pa obstajajo tudi do štirikratne razlike v aktivnosti, ki jih z genotipizacijo ne moremo zaznati (35).

Po drugi strani pa ima določanje genotipa prednosti pred fenotipskim merjenjem aktivnosti TPMT. Encimske aktivnosti ne moremo meriti pri bolnikih, ki so v zadnjih 2-3 mesecih prejeli transfuzijo, ker meritve ne odražajo resničnega stanja. Pri otrocih, nedavno diagnosticiranih za ALL, je aktivnost znižana v primerjavi z referenčno populacijo, kar je posledica nižje aktivnosti v starejših RBC, ki jih je pri teh otrocih zaradi anemije v povprečju več (36). Prav tako lahko na meritve aktivnosti TPMT vplivajo razne ZU, ki so inhibitorji tega

encima (20, 21). Tiopurini pa so znani induktorji TPMT, katero aktivnost lahko povečajo za 30-35 % in je zato v tem primeru bolj primerno določiti genotip (2).

1.2.4 Vpliv TPMT na zdravljenje s tiopurini

S testiranjem genotipa TPMT in določanjem njegove aktivnosti identificirajo posameznike z nizko ali srednjo aktivnostjo TPMT, kar omogoča prilagoditev zdravljenja in izognitev strankim učinkom, ki so posledica zmanjšane aktivnosti TPMT (30) (slika 5). Pri pacientih z večjo aktivnostjo TPMT pride do večje deaktivacije tiopurinov in zato nastaja manj 6-TGN, zaradi česar je verjetnost za pojav neželenih učinkov manjša. Vendar je pri njih možnost, za ponovitev bolezni po standardni terapiji s tiopurini večja (12).



Slika 5: Vpliv genetskih polimorfozmov na zdravljenje s tiopurini

Distribucija aktivnosti TPMT v kavkazijcih je trimodalna z 90 % visoke aktivnosti (wt/wt), 11 % srednje (wt/m) in 0,3 % nizke (m/m). Aktivnost vpliva na količino nastalih 6-TGN, katerih prekomerna koncentracija lahko povzroči življensko nevarno mielosupresijo. Glavni aleli, ki vplivajo na zmanjšanje aktivnosti TPMT so TPMT*2, TPMT*3A in TPMT*3C.

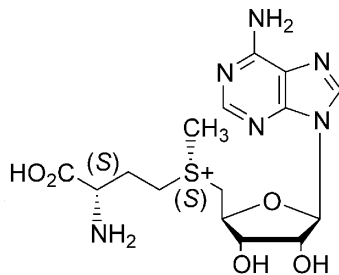
Poznavanje aktivnosti TPMT pacienta omogoča prilagoditev odmerka tiopurinov in izboljša uspešnost zdravljenja. Vendar pa lahko mielosupresijo povzročijo tudi drugi dejavniki kot so virusi in interakcije med zdravili, zato poznavanje aktivnosti TPMT pojasni le okoli 30 % mielosupresije pri bolnikih. Prav tako ne moremo predvideti neželenih učinkov, ki niso v povezavi z TPMT, kot so alergične reakcije, pankreatitis, bruhanje, slabost (4). Ti

neželeni učinki so lahko posledica polimorfizmov v genu za inozin-trifosfat-pirofosfatazo, ki pretvarja TIMP v 6-tioinozin-trifosfat, ki je potencialno toksičen (37). Poleg tega imajo na metabolizem tiopurinov vpliv tudi drugi encimi, vendar je njihov vpliv slabo raziskan.

1.3 S-adenozilmationin

S-adenozilmationin se nahaja v vseh živih celicah, saj je donor metilne skupine v množici biokemičnih procesov. Je prekursorska molekula v treh poteh: prenosu metilne skupine (transmetilaciji), prenosu tiolne skupine (transulfuraciji) in prenosu aminopropilne skupine (aminopropilaciji) (38). Sodeluje pri metiliranju proteinov, nukleinskih kislin, fosfolipidov in nevrotansmitorjev (39). Na ta način se uravnava replikacijski, transkripcijski in translacijski mehanizmi, epigenetske modifikacije, popravljanje in remodulacija kromatina (39). Zaradi svoje široke vpletenosti ima SAM vpliv na celično proliferacijo, uravnavanje celičnega cikla in apoptozo.

Njegove znižane koncentracije, najpogosteje kot posledica pomanjkanja folne kisline, vodijo v nastanek bolezni. Številne študije so dokazale, da je pri teh stanjih učinkovito dodajanje SAM. Učinkovit je pri depresiji, nevroloških motnjah, osteoartritisu, boleznih jeter. Zato je marsikje dostopen kot prehransko dopolnilo (38).



Slika 6: Struktura SAM

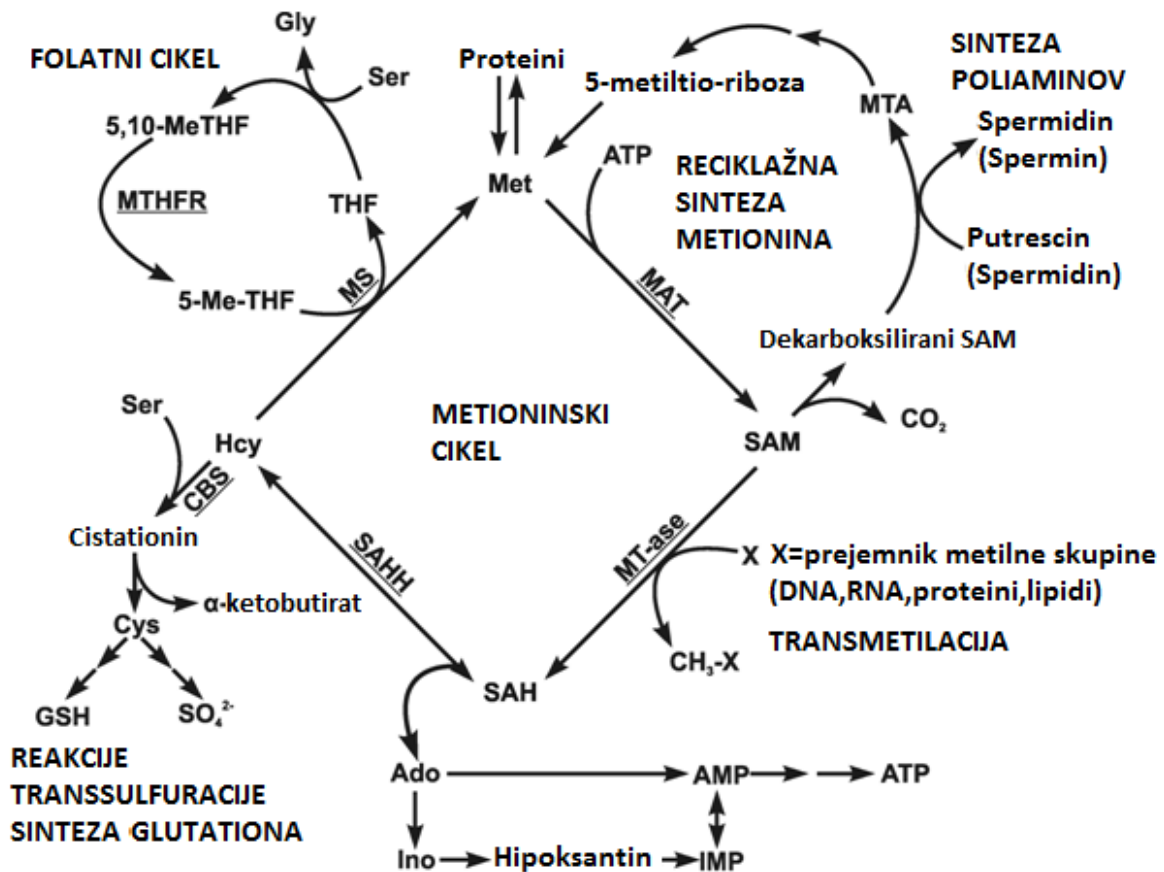
Biosinteza poteče iz metionina in ATP z encimom metionin-adenoziltransferaza, ki na metionin veže adenozilno skupino iz molekule ATP(38).

1.3.1 Metabolizem SAM

V homeostazi S-adenozilmationina igrajo jetra centralno vlogo, saj so glavno mesto njegove sinteze in razgradnje. Sintetizira se iz aminokisline metionina in ATP s pomočjo encima metionin-adenoziltransferaze. Metionin vnašamo s hrano, poleg tega pa se v telesu resintetizira oz. obnavlja z reciklažno sintezo metionina in z metiliranjem homocisteina. Substrat pri metilaciji je 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF), ki ga tvori 5,10-metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR) iz 5,10-metilen-tetrahidrofolata (5,10-Me-THF).

Z doniranjem metilne skupine se SAM pretvori v S-adenozil-homocistein (SAH). SAH je pomemben kompetitivni inhibitor reakcij transmetilacije, na katere vpliva tako povečanje koncentracije SAH kot znižanje koncentracije SAM. SAH se nadalje presnavlja do homocisteina in adenoзина z encimom SAH-hidrolaza (40, 41). Homocistein se ob pomoči vitamina B₆ pretvori v cistationin. To je prva stopnja reakcij transulfuracije, ki vodi do tvorbe glutationa, pomembnega celičnega antioksidanta. Homocistein lahko nastopa tudi kot akceptor metilni skupine pri reakciji s metionin-sintazo, ki ga pretvori nazaj v metionin.

SAM ima pomembno vlogo pri aminopropilaciji, kjer se pretvori do dekarboksiliranega-SAM, aminopropilna skupina pa se prenese na putrescin. Dalje se tvorita spermidin in spermin, ki imata vlogo pri procesih celične rasti. Pri tem procesu se tvori metiltioadenozin (MTA), ki se pretvori nazaj v metionin. Na ta način celice varčujejo z metioninom in odstranjuje MTA, ki je močan inhibitor S-adenozilhomocistein-hidrolaze (38).



Slika 7: Presnova S-adenozilmetionina

5-Me-THF: 5-metiltetrahidrofolat; 5,10-MeTHF: 5,10-metilentetrahidrofolat; Ado: adenzin; AMP: adenzin-monofosfat; ATP: adenzin-trifosfat; CBS: cistation- β -sintaza; Cys: cistein; Gyl: glicin; GSH: glutation; IMP: inozin-monofosfat; Ino: inozin; MAT: metionin-adenoziltransferaza; MS: metionin-sintaza; MTA: 5'-metiltioadenozin; MTHFR: 5,10-metiltetrahidrofolat-reduktaza; SAH: S-adenozilhomocistein; SAHH: S-

adenozilhomocistein-hidrolaza; Ser: serin; THF: tetrahidrofolat.

1.3.2 Vpliv SAM na aktivnost TPMT

Vpliv SAM na aktivnost TPMT se kaže pri molekularnih študijah aloencimov TPMT in tridimenzionalnih strukturnih študijah. Dodatek eksogenega SAM ohrani stabilnost in katalitično aktivnost TPMT*3C, medtem ko dodatek SAM takšnega vpliva na TPMT*2 nima. Ta študija je bila opravljena na lizatih kvasovk, ki so jih prehodno transficirali s plazmidi z zaporednji za različne aloencime TPMT. Lizate so inkubirali pri 37 °C v 0,1M Tris HCl (pH=7,5) z dodatkom 1mM SAM ali brez njega in nato izmerili aktivnost TPMT s HPLC. V primeru encima TPMT*3C je bila ob dodatku SAM ohranjena aktivnost encima, brez dodatka SAM pa je aktivnost po 2h padla na 0 % (28).

To potrjuje tudi študija vezave sinefungina (analog SAM) na bakterijski ortologni protein TPMT. V študiji so pokazali, da vezava sinefungina stabilizirana periferne strukturne elemente in stabilizira nativno strukturo proteina preko zmanjšanja entropije (42).

V študiji na MOLT F4 celičnih linijah je dodatek eksogenega SAM zmanjšal citotoksičnost 6-MP in zakasnil začetek apoptoze. Ob hkratnem dajanju SAM in 6-MP je bila koncentracija toksičnih derivatov 6-MP 6-TGN in MeTIMP nižja kot ob dodajanju le 6-MP. Dodatek SAM ohrani visoko aktivnost TPMT, kar se odrazi v večjem tvorjenju netoksičnih metabolitov 6-MP. Da SAM ne vpliva na gen za TPMT kaže podatek, da je število kopij mRNA v obeh primerih podobno (44).

1.3.3 Vplivi na SAM

MTHFR je edini encim, ki katalizira pretvorbo 5,10-Me-THF v 5-Me-THF, substrat za resintezo metionina. Gen za MTHFR je polimorfen z najpogostejšima aleloma C677T in A1298C. Prisotnost C677T je povezana z nižjo aktivnostjo encima in zato je prisotna povečana koncentracija homocisteina v plazmi. A1298C ima manjši vpliv na aktivnost encima in zato imajo posamezniki s to varianto imajo pogosto normalne koncentracije homocisteina (50). Posledica nižje aktivnosti MTHFR je manjša pretvorba 5,10-Me-THF v 5-Me-THF kar zmanjša pretvorbo homocisteina v metionin, kar negativno vpliva na koncentracijo SAM (45). Mutacija C677T v genu za MTHFR povzroči tudi znižanje serumske koncentracije folatov. Vendar je moč ta učinek izničiti z zadostnim vnosom folatov.

Encim timidilat-sintaza (TYMS) je ključen v procesu replikacija DNA in katalizira metilacijo deoksiuridilata v deoksitimidilat. Pri reakciji je 5,10-Me-THF kosubstrat in z

njegovo porabo ga ostaja manj za MTHFR. Tako ima povečana aktivnost TYMS za posledico manj 5-Me-THF in to zmanjša nastajanje metionina (33).

Encim betain-homocistein-metiltransferaza (BHMT) tvori iz homocisteina metionin in pri reakciji je metilni donor betain. Višja aktivnost BHMT pomeni višjo koncentracijo metionina in posledično SAM. V promotorju za gen BHMT so vezavna mesta za hormone kot so progesteron, estrogen in androgen. Aktivnost encima BHMT je višja pri moških kot pri ženskah, poleg tega se pri ženskah več homocisteina pretvori do cistationina (33).

2 Namen dela

Encim TPMT pretvarja tiopurine v netoksične metabolite in s tem tekmuje s procesi pretvorbe v toksične metabolite, ki so odgovorni za učinek terapije in tudi za neželene učinke, kot je mielosupresija. Gen je polimorfen in encimi, ki se preprišejo z mutiranih različic gena imajo znižano aktivnost. Bolniki z visoko aktivnostjo TPMT terapijo s tiopurini dobro prenašajo medtem, ko imajo bolniki z nizko aktivnostjo večjo verjetnost za pojav neželenih učinkov. Odmerek lahko prilagodimo s pomočjo genotipizacije gene za TPMT, ki je hiter in razmeroma enostaven farmakogenetski test, a ujemanje med genotipom in aktivnostjo TPMT ni popolno. Zato je potrebno določiti dodatne dejavnike, ki vplivajo na aktivnost TPMT. Eden od možnih je SAM, kosubstrat TPMT.

Namen diplomske naloge je preveriti vpliv SAM na aktivnost mutiranih aloencimov TPMT. Na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo smo že opravili merjenje koncentracije SAM in aktivnosti TPMT v hemolizatih zdravih preiskovalcev. To raziskavo bomo nadaljevali in poleg tega pa še preverili vpliv SAM v celicah.

Z metodo HPLC bomo merili aktivnost TPMT in koncentracijo SAM v hemolizatih in rezultate združili z dosedanjim delom na Katedri. Z uporabo statističnih metod bomo ugotavljali povezavo med SAM in TPMT, povezavo med genotipom in fenotipom in poskušali neujemanja pojasniti s koncentracijo SAM. Vpliv SAM bomo preučili na celicah, ki jih bomo prehodno transficirali s plazmidi, ki bodo vsebovali zaporedje cDNA za divji TPMT in njegove najpogostejše mutirane alele. Poskus bomo nadaljevali na stabilnih celičnih linijah. Celice bomo gojili v normalnem mediju in mediju brez metionina. Ker poteka biosinteza SAM v celicah iz metionina, ima njegovo pomanjkanje v mediju za posledico nižjo celično koncentracijo SAM. S HPLC bomo preverili, kakšna je celotna aktivnost TPMT v celicah, western prenosom pa kakšna je količina rekombinatnega in endogenega TPMT v celicah. S temi poskusi želimo pokazati, da ima koncentracija SAM pomemben vpliv na aktivnost TPMT in posledično na zdravljenje s tiopurini. Pri potrditvi domneve vpliva SAM na TPMT bi lahko SAM oziroma polimorfizme v genih za encime, ki vplivajo na njegovo koncentracijo, uporabili kot biokemijske oz. farmakogenetske označevalce pri individualizaciji terapije s tiopurini.

3 Materiali in metode

3.1 Kemikalije

- Kalijev klorid, KCl (čistota $\geq 99,0$ %); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 (čistota $\geq 99,0$ %); Fluka Chemie, Buchs, Švica
- Kalijev hidrogenfosfat, K_2HPO_4 (čistota $\geq 99,0$ %); Riedel-de Hën AG, Nemčija
- Metanol: LiChrosolv Methanol for liquid chromatography, MeOH (čistota $\geq 99,8$ %); Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (čistota $\geq 99,0$ %); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Natrijev klorid, NaCl (čistota: 99,5 %); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Fosforjeva kislina, 85 %, H_3PO_4 ; J.T. Baker B.V., Phillipsburg NJ
- Dimetilsulfoksid: Chromasolv Dimethyl sulfoxide for high-performance liquid chromatography, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ (čistota min. 99,7 %); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- 6-merkaptopurin monohidrat, $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ (čistota min. 98 %); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Alopurinol, $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- 6-metilmerkaptopurin, $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{S}$ (čistota ≥ 98 %); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- D,L- ditiotreititol, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ (čistota ≥ 99 %); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Klorova(VII) kislina, 70% HClO_4 (čistota ≥ 70 %); Fluka Chemie, Buchs, Švica
- Cos-7 celice; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, Nemčija
- Dulbecco's modified Eagle's medium; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- 10% fetal bovine serum, Invitrogen, USA
- L-glutamin Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Penicilin/streptomycin ,100U/ml Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- 0.25 % trypsin/1 mM EDTA, Gibco
- Tripan blue, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- β -galactosidase Enzyme Assay System, Promega, Wisconsin, USA
- Trizol, Invitrogen, USA
- Super Signal West Femto Substrate, Thermo Scientific
- Omniscript RT kit, Qiagen, USA
- TPMT-specific Taqman Gene Expression assay, Applied Biosystems

3.2 Aparature

- Sistem HPLC Agilent 1100 Series; Agilent Tehnologies Inc., Palo Alto, CA, ZDA

V sestavi:

- G1379A MicroVacuum Degasser
- G1311A Quaternary Pump
- G1313A Standard Autosampler
- G1215B Diode Array Detector (DAD)
- Programska oprema ChemStation for LC 3D (Rev.A.10.01(1635))
- Obratno fazna C18 HPLC kolona Agilent ZORBAX ODS, (velikost kolone 4.6×250mm, velikost delcev 5µm); Agilent technologies Inc., Palo Alto, CA, ZDA
- Obratno fazna C18 HPLC predkolona Agilent ZORBAX ODS Analytical Guard Column, (velikost kolone 4.6×12,5mm, velikost delcev 5µm); Agilent technologies Inc., Palo Alto, CA, ZDA
- pH-meter Mettler Toledo SevenEasy S20; Columbus, Ohio, ZDA
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5804R; Hamburg, Nemčija
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415R; Hamburg, Nemčija
- Aparat za pripravo ultra čiste vode Labwater Purelab™ Classic UF (upornost vode 18,2 MΩ×cm); ELGA, Marlow, Velika Britanija
- Tehnica Exacta 300 EB, Slovenija
- Zamrzovalnik Forma Scientific -86°C Freezer (delovna temperatura: -70°C); Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, ZDA
- Vodna kopel Water Thermostat-bath WB-4MS; BioSan, Riga, Latvija
- Analitska tehnica Acculab Atilon; Sartorius AG, Göttingen, Nemčija
- Elektroporator Amaxa Nucleofector Kit R, Lonza
- Avtomatiziranim čitalcem mikroploščic, Tecan Safire2, Avstrija
- G:BOX, Syngene, Cambridge, UK
- ND-1000 spektrofotometer, Nanodrop Technologies, Wilmington, USA
- ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied biosystems

3.3 Določanje aktivnosti TPMT v hemolizatih z metodo RP-HPLC

Določanje aktivnosti TPMT z metode RP-HPLC je potekalo po že opisanem postopku (48), vendar je bila metoda nekoliko prirejena in optimizirana.

3.3.1 Priprava reagentov, standardnih raztopin, delovnih raztopin in mobilne faze

Tabela 1: Priprava reagentov za HPLC

| Reagent | Priprava | Hramba |
|--|--|----------------------|
| 150 mM kalijev fosfatni (KP) pufer s pH 7,50 | 0,259 g KH_2PO_4 in 2,26 g K_2HPO_4 raztopi v 100ml ultra čiste vode Vrednost pH uravnaj z 2 M H_3PO_4 | Hladilnik na 4°C |
| 500 mM D,L-ditiotreitol (DTT) | Natehtaj med 2,5 in 4,5 mg DTT in ga raztopi v ustreznem volumnu (med 32,4 μl in 58,3 μl) 150 mM KP-pufra | Pripravljaj sproti |
| 40 mM alopurinol | 54,44 mg alopurinola raztopi v 10 ml DMSO | Na -20°C |
| 67 mM 6-merkaptopurin | 38,26 mg 6-MP $\times\text{H}_2\text{O}$ raztopi v 3 ml DMSO | Na -20°C |
| 100 mM 6-metilmerkaptopurin | 83,1 mg 6-MMP raztopi v 5 ml DMSO | Na -20°C |
| 4 M K_2HPO_4 | 696,72 mg K_2HPO_4 raztopi v 1 ml ultra čiste vode | Na -20°C |
| 8 M HClO_4 | 690 μl 70 % HClO_4 (c= 11,6M) dodaj 310 μl ultra čiste vode | Na -20°C |
| 2 M H_3PO_4 | 7ml 85,5 % H_3PO_4 raztopi v 43ml ultra čiste vode | Na sobni temperaturi |
| 10 \times izotonični fosfatni pufer (PBS) | V 800ml destilirane vode raztopi 80 g NaCl, 2 g KCl, 36,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\times 12\text{H}_2\text{O}$ in 2,4 g KH_2PO_4 . Z NaOH uravnaj pH raztopine na 7,4 | Na sobni temperaturi |
| 100 mM SAM | 12,5 mg SAM (80 % čistota) raztopi v 25 μl 1 \times PBS (10 \times PBS redči 1:10) | Na – 70°C |

Priprava standardov: Standardne raztopine 6-MMP so bile pripravljene iz osnovne raztopine s koncentracijo 400 μM . Z ustreznim redčenjem z raztopino za pripravo standardov (0,5 mM DTT v 150 mM KP-pufri) smo pripravili standardne raztopine 6-MMP z naslednjimi koncentracijami: 4 μM ; 2 μM ; 1 μM ; 0,5 μM ; 0,25 μM

Priprava delovnih raztopin:

Delovna raztopina A: 150 mM KP-pufer s pH 7,50

Delovna raztopina D: 67 mM 6-MP v DMSO

Delovna raztopina B: 750 μM SAM, 300 μM alopurinol in 0,05 M DTT v KP-pufri. Za 200 μl raztopine B rabimo 177 μl KP-pufra, 20 μl 0,5M DTT, 1,50 μl 100 mM SAM, 1,50 μl alopurinola.

Priprava mobilne faze: Kot mobilni fazo smo uporabili 50 mM KP-pufer v 25 % mentolu s pH 7,50 (MF_{TPMT})

V litrsko posodo smo natočili približno 700 ml ultra čiste vode in v njej raztopili 7,30 g K_2HPO_4 in 1,09 g KH_2PO_4 in nato dodali 250 ml metanola. Vrednost pH smo uravnali na 7,50 z dodatkom 2 M H_3PO_4 . Dopolnili smo z ultra čisto vodo do 1 litra.

3.3.2 Priprava hemolizatov

Polno kri smo centrifugirali (1000 g, 5 min, 25 °C) in odstranili plazmo in levkocite. Peleti RBC smo dodali 1×PBS do 10 ml in narahlo premešali z obračanjem epruvete. Centrifugirali smo pri 1000 g, 5 min, 25 °C, odpipetirali supernatant in ponovili postopek spiranja s PBS ter centrifugiranje. Ponovno smo odpipetirali supernatant.

Postopek lize RBC smo začeli z dodatkom 6 ml ledeno mrzle vode peleti RBC. Zmes smo močno premešali in pustili na ledu 10 min. Odpipetirali smo štiri alikvote in jih centrifugirali (14000 g, 10 min, 4 °C). Iz vsakega alikvota smo odpipetirali po 1 ml v dve krio viali (skupaj 4 ml) in shranili na -80 °C do izvedbe analize.

3.3.3 Priprava vzorcev

Iz zmrzovalnika smo vzeli vzorce (hemolizate) in jih na počasi odtalili. Ustreznemu volumnu hemolizata (volumen smo izračunali tako, da je bilo v inkubacijski zmesi vedno enako število RBC in sicer $2,16 \times 10^8$) smo dodali 15 μ l raztopine B, 8 μ l raztopine D in dopolnili do 225 μ l z raztopino A. Vzorce smo inkubirali 2 h na vodni kopeli (37 °C). Reakcijo smo prekinili z dodatkom ledeno mrzle 8 M $HClO_4$ (11,3 μ l) in pustili na ledu 10 min. Vzorce smo centrifugirali (11000 g, 10 min, 4 °C). Supernatante smo nevtralizirali s 4 M K_2HPO_4 (22,6 μ l) in pustili na ledu 10 min. Nevtralizirane vzorce smo ponovno centrifugirali (11000 g, 10 min, 4 °C). Končni volumen je bil 215 μ l. Tako pripravljene vzorce smo razdelili v dve paralelki in uporabili za analizo s HPLC. V primeru, da analiza ni bila opravljena še isti dan, smo vzorce shranili na -20 °C za največ en dan.

3.3.4 Analiza s HPLC in kromatografski pogoji

Za analizo vzorcev smo uporabili sistem HPLC Agilent 1100 Series in obratnofazno C18 kolono Agilent ZORBAX ODS. Kolona je bila zaščitena s predkolono Agilent ZORBAX ODS Analytical Guard Column. Pred začetkom smo spirali kolono z MF_{TPMT} toliko časa, da smo dosegli nespremenljiv delovni tlak okoli 240 barov in konstantno bazno linijo absorbance. Elucija je potekala izokratsko z MF_{TPMT} pri pretoku 1,5 ml/min in delovnem tlaku med 230 do 240 bari. Analiza posameznega vzorca je trajala 12 min, volumen vbrizganega vzorca je bil 90 μ l. Posamezne vzorce smo analizirali v dveh paralelkah skupaj s

standardi. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 290 nm (referenčna valovna dolžina je bila 400 nm). Po koncu posamezne serije smo kolono spirali 1 h s 40 % metanolom. S pomočjo umeritvene premice, pridobljene iz površin kromatografskih vrhov standardov, smo iz površine kromatografskih vrhov izračunali nastalo množino 6-MMP.

Encimsko aktivnost smo izračunali po enačbi:

$$\text{aktivnost} = \frac{n6 - \text{MMP}(\text{nmol}) \times V_{\text{superna tan ta}} (258,9 \mu\text{l})}{V_{\text{hemolizata}} (\mu\text{l}) \times t_{\text{inkubacije}} (2\text{h}) \times \text{konc.Hb} (\text{g} / \text{l}) \times V_{\text{vbrizganega superna tan ta}} (100 \mu\text{l})}$$

In jo izrazili v enoti $\frac{\text{nmol}6 - \text{MMP}}{\text{gHb} \times \text{h}}$

3.4 Določanje koncentracije SAM z metodo RP-HPLC

Priprava standardov: Standardne raztopine SAM smo pripravili iz osnovne raztopine s koncentracijo 100 mM, ki smo jo redčili z vodo, da smo dobili vmesni standard s koncentracijo 125 μM katerega smo shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iz vmesnega standarda smo z ustreznim redčenjem z 0,5 M HClO_4 pripravili naslednje koncentracije standardov: 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,625 μM , 0,3125 μM .

Priprava mobilnih faz: Mobilna faza B ($\text{MF}_{\text{SAM-B}}$): 50 mM NaH_2PO_4 in 10 mM natrijev 1-heptansulfonat v 20 % metanolu. V litrsko posodo smo natočili 650 ml ultra čiste vode in v njej raztopili 10,14 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ter 2,02 g natrijevega 1-heptansulfonata. Dodali smo 200 ml metanola in uravnali pH na 3,00 z dodajanjem 2 M H_3PO_4 . Nato smo dopolnili z ultra čisto vodo do 1 litra. Mobilna faza C ($\text{MF}_{\text{SAM-C}}$): 42 mM NaH_2PO_4 in 8,3 mM natrijev 1-heptansulfonat v 40 % metanolu. 250 ml mobilne faze B dodamo 50 ml metanola.

3.4.1 Priprava vzorcev

Hemolizate smo na ledu počasi odtalili. Alikvotu (200 μl) smo dodali 9 μl 70 % HClO_4 . Nato smo vorteksirali in inkubirali na ledu 10 min. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali (11000 g, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant smo odpipetirali in ponovno centrifugirali pod istimi pogoji. Vzorce smo v nekaterih primerih do analize zamrznili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.2 Analiza s HPLC in kromatografski pogoji

Za analizo vzorcev smo uporabili sistem HPLC Agilent 1100 Series in obratnofazno C18 kolono Agilent ZORBAX ODS. Kolona ni bila zaščiten s predkolono. Pred začetkom smo spirali kolono z $\text{MF}_{\text{SAM-B}}$ toliko časa, da smo dosegli nespremenljiv delovni tlak okoli 140

barov in konstantno bazno linijo absorbance. Eluacija je potekala z naslednjim gradientom mobilnih faz.

Tabela 2: Gradient mobilnih faz pri merjenju koncentracije SAM

| Čas | Mobilna faza |
|-------------|----------------------------|
| 0-6 min | 100% MF _{SAM-B} |
| 6-6,5 min | 0-100% MF _{SAM-C} |
| 6,5-18 min | 100% MF _{SAM-C} |
| 18-18,5 min | 0-100% MF _{SAM-B} |
| 18,5-27 min | 100% MF _{SAM-B} |

Pretok je bil 1 ml/min, volumen vbrizganega vzorca je bil 100 µl. Posamezne vzorce smo analizirali v dveh paralelkah skupaj s standardi. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 254 nm (referenčna valovna dolžina je bila 300 nm). Po koncu posamezne serije smo kolono spirali 1 h s 40% metanolom. S pomočjo umeritvene premice smo izračunali koncentracijo SAM v hemolizatu po enačbi:

$$\text{koncentracija SAM} = \frac{n\text{SAM (nmol)} \times V_{\text{superna tanja}}}{V_{\text{hemolizata}} (200 \mu\text{l}) \times \text{konc. Hb (g/l)} \times V_{\text{vbrizganega}} (100 \mu\text{l})}$$

In jo izrazili v enoti $\frac{\text{nmol SAM}}{\text{g Hb}}$

3.5 Modelni in vitro sistemi za proučevanje aloencimov TPMT na celičnem nivoju

Starševske ali prejemne celice so ledvične celice afriške zelene opice (*Cercopithecus aethiops*) imenovane CV-1. COS-7 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ) so pripravljene s transformacijo starševske CV-1 celične linije s SV-40 virusom z nedelujočim mestom *ori*. Virus je nepatogen za celice COS-7 in celice virusa tudi ne izločajo. Celice niso sposobne preživetja izven nadzorovanega okolja in ustreznih hranilnih medijev.

Pričakovano število celic je $2-3 \times 10^6/80 \text{ cm}^2$, saturacijska gostota je $2-3 \times 10^6/80 \text{ cm}^2$.

Celice so podobne fibrinoblastom in rastejo v monosloju. Celice moramo gojiti pri 37 °C in 5 % CO₂ in v ustreznem mediju. Medij je potrebno zamenjati na 2-3 dni.

Medij: Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) z 10 % FBS (Invitrogen), 2 mM L-glutamina in 1 % antibiotikom/antimikotikom (100 U/ml penicilin/streptomycin) (Sigma).

3.6 Gojenje stabilnih linjih COS-7 celic

Število celic COS-7 se podvoji po približno 35 do 48 h in zato je bilo potrebno na vsaka dva do tri dni celice razredčiti, da ni prišlo do preraščanja oz. prekomerne konfluentnosti.

Najprej smo odstranili ves medij in dodali ustrezno količino 0,25 % tripsina/1mM EDTA (Gibco) (300 μ l, ker smo jih gojili v plošči s 6 vdolbnicami) in inkubirali na 37 °C in 5 % CO₂ dokler nismo pod mikroskopom opazili, da so se odlepili od podlage. Po tem smo dodali celicam medij (600 μ l za ploščo s 6 vdolbnicami), s čimer smo inaktivirali tripsin, za kar je zaslužen FBS v mediju. Nato smo celice redčili v razmerju 1:3 do 1:5, in sicer tako, da smo na novo gojišče prenesli le eno petino do eno tretjino (200-300 μ l) skupnega volumna tripsina in medija. Na gojišče smo nato dodali še medij, količina dodanega medija je odvisna od gojišča, za ploščo s 6 vdolbnicami je končni volumen 3 ml.

3.6.1 Štetje celic

Celice smo odlepili od podlage, jih prenesli v falkonke in centrifugirali 5 min pri 1300 rpm. Odstranili smo supernatant in dodali 1 ml medija in premešali s pipeto. V epico smo napipetirali 20 μ l 0,4 % (v/v) tripanskim modrilom in dodali 20 μ l celic iz falkonke. Končni volumen je bil 40 μ l s 0,2 % (v/v) tripanskega modrila. Del te raztopine smo prenesli na merilno objektno steklo in prešteli celice pod mikroskopom. Prešteli smo celice v štirih 4×4 kvadratih in izračunali število celic po formuli:

$$\frac{\text{št.celic}}{\text{ml}} = \frac{N}{4} \times Fr \times 10^4 = \frac{N}{4} \times \frac{Vor + Vrr}{Vor} \times 10^4 = \frac{N}{4} \times 2 \times 10^4$$

3.7 Gojenje stabilnih celičnih linij v mediju z metioninom in mediju brez metionina

Celice smo odlepili od podlage z uporabo tripsina in jih prenesli v falkonke in centrifugirali (1300 rpm, 5 min). Odstranili smo supernatant, resuspendirali celice v mediju in jih prešteli.

Vsako celično linijo smo gojili pod dvema pogojema v plastenkah T25: v mediju z metioninom (Met), mediju brez Met. Za gojenje v Met uporabimo 1×10^5 celic in za gojenje brez Met 2×10^5 celic. Prvih 24 h smo celice gojili v normalnem mediju, da so se ponovno prilepile na podlago. Po 24 h smo odstranili medij in sprali z 1×PBS (Sigma) in nato odpipetirali na eno gojišče medij z Met in na drugo medij brez Met. Po 24 h smo z uporabo tripsina celice odlepili, jim dodali 1,5 ml medija brez Met in jih prenesli v falkonke ter centrifugirali pri 13000 rpm 5 min. Odstranili smo supernatant, resuspendirali celice v 1 ml

1×PBS in jih prešteli. Celoten volumen PBS s celicami smo prenesli v epice in ponovno centrifugirali (13000 rpm, 5 min). Odstranili smo supernatant in jih zamrznili na -80 °C.

3.8 Plazmidi

COS-7 celice smo transficirali s pomočjo elektroporacije (Lonza, Amaxa). Kot vektor smo uporabili plazmid pcDNA3.1 (Invitrogen Carlsbad, CA). Vektor pcDNA3.1 je velik 5,4 kb in izpeljan iz vektorja pcDNA3 z namenom učinkovitega stabilnega in prehodnega izražanja izbranega proteina. Vektor pcDNA3.1 vsebuje:

- Klonirajoče mesto (MCS), kamor vstavimo vključek.
- CMV promotor, ki omogoča ekspresijo vključka v evkariontskih celicah.
- T7 promotor in mesto vezave začetnih oligonukleotidov.
- BGH poliadenilacijsko zaporedje in mesto vezave začetnih oligonukleotidov.
- SV40 poliadenilacijsko zaporedje, ki signalizira konec transkripcije v evkariontskih celicah.
- Gena za rezistenco na neomicin in ampicilin Neo^R/Amp^R
- pUC mesto *ori*.
- SV40 zgodnji promotor, ki omogoča izražanje Neo^r v evkariontskih celicah in s tem selekcijo transficiranih evkariontskih celic z G418.
- fl mesto začetka pomnoževanja
- SV40 mesto začetka pomnoževanja oz. episomsko replikacijo v evkariontskih celicah, ki za funkcionalnost zahteva ekspresijo SV40 T antigena.

V novo nastalem organizmu ostane celotni vektor. V vektor smo vstavili vključke, ki izvirajo iz človeka in predstavljajo kodirajoče regije gena za tiopurin-S-metiltransferazo. Vključki se razlikujejo po mutacijskem statusu. TPMT*1 ustreza nemutiranemu zaporedju divjega tipa, medtem ko vključki TPMT*2, TPMT*3A in TPMT*3C ustrezajo najpogostejšim alelom TPMT (TPMT*2 mutacija 238G>C, TPMT*3A mutaciji 460G>A in 719A>G, TPMT*3C mutacija 719A>G).

3.9 Transfekcija COS-7 celic

Na štiri platenke T150 smo prenesli po 4×10^6 celic in jih pustili rasti do naslednjega dne. Drugi dan smo celice odlepili od podlage z dodatkom 2-3 ml 0,25 % tripsina/1 mM, dodali 8 ml medija in vse prenesli v štiri falkonke (približno 2 ml v vsako). Centrifugirali smo 5 min pri 1300 rpm, odstranili supernatant in celice resuspendirali v 1 ml medija. Vse celice smo

nato združili v eni falkonki (dobili smo 4 ml medija s celicami) in jih prešteli (za štetje smo jih redčili 30×). V šest epice smo prenesli po 2×10^6 celic in centrifugirali 5 min pri 1200 rpm, odstranili supernatant in celice resuspendirali v 100 μ l reakcijske zmesi, ki smo jo pripravili iz 82 μ l raztopine Nucleofector (Lonza, Walkersville, MD) in 18 μ l suplementa (za šest vzorcev 492 μ l+108 μ l). Suspenziji celic (100 μ l) smo dodali 4,5 μ g plazmida pcDNA3.1 oziroma pcDNA3.1 z vključki TPMT in 0,5 μ g plazmida pcDNAHygro/lacZ.

Tabela 3: Plazmidi za transfekcijo

| Plazmidi | Koncentracija(μ g/ μ l) |
|-----------------|----------------------------------|
| pcDNA3.1 | 2,97834 |
| pcDNA3.1-TPMT1 | 2,53593 |
| pcDNA3.1-TPMT2 | 2,46224 |
| pcDNA3.1-TPMT3A | 2,988 |
| pcDNA3.1-TPMT3C | 2,37521 |
| pcDNAHygro/lacZ | 0,500 |

Tabela 4: Plazmidi dodani posameznim celicam

| Oznaka | Dodan plazmid | Dodan plazmid |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|
| UT- ne transficirane | -brez | -brez |
| pcDNA | 1,51 μ l pcDNA3.1 | 1,00 μ l pcDNAHygro/lacZ |
| 1 | 1,77 μ l pcDNA3.1-TPMT1 | 1,00 μ l pcDNAHygro/lacZ |
| 2 | 1,83 μ l pcDNA3.1-TPMT2 | 1,00 μ l pcDNAHygro/lacZ |
| 3A | 1,51 μ l pcDNA3.1-TPMT3A | 1,00 μ l pcDNAHygro/lacZ |
| 3C | 1,89 μ l pcDNA3.1-TPMT3C | 1,00 μ l pcDNAHygro/lacZ |

Suspenzijo s celicami in plazmidi smo prenesli v kiveto za elektroporacijo, jo vstavili v Nucleofector in pognali optimiziran program za COS-7 celic (W-001). Po končanem programu smo na sobni temperaturi inkubirali 10 min. Nato smo dodali 0,5 ml medija in vse nežno preneseli v epico in iz nje odpipetirali po 300 μ l v dve platenki T25 kamor smo predhodno že dodali 3,7 ml medija. Na koncu smo tako dobili 12 platenk T25 s po 1×10^6 celicami. Pustili smo rasti čez noč v inkubatorju s 37 °C in 5 % CO₂.

Naslednji dan smo zamenjali medij, in sicer smo dodali v eno platenko T25 4 ml medija z Met v drugo T25 z enakimi celicami pa 4 ml medija brez Met (medij brez metionina z 10 % FBS, 1 % ml antibiotik/antimikotik, 2 mM L-glutamin in 200 μ M cistein) ter pustili rasti čez noč. Naslednji dan smo odlepili celice s podlage in jih prenesli v falkonke in centrifugirali 5 min pri 1300 rpm. Odstranili smo supernatant in resuspendirali v 1 ml 1×PBS ter prešteli celice. Pripravili smo po štiri epice za vsako vrsto celic in v dve odpipetirali po 1×10^5 celic in v dve po 3×10^5 celic. Epice smo centrifugirali 5 min pri 1300 rpm, odstranili supernatant in zamrznili pri -80 °C. Celicam smo nato določili aktivnost β -galaktozidaze, aktivnost TPMT z HPLC in določili izražanje proteina TPMT s pomočjo western prenosa.

3.10 Aktivnost β -galaktozidaze

Peleti, ki vsebuje 1×10^5 celic smo dodali 50 μ l 1 \times reporter lysis buffer(RLB) na kratko vorteksirali in sonicirali in pustili 15 min na ledu. Po 15 minutnem centrifugiranju pri 4 °C in 14000 rpm smo na ploščici s 96 vdolbinicami zmešali 20 μ l (oz. 15 μ l, kjer ga ni bilo dovolj) supernatanta in 20 μ l 2 \times assay buffer (Promega, Madison, WI) (200 mM natrijev fosfatni pufer s pH 7,3; 2 mM $MgCl_2$; 100 mM 2-merkaptioetanol; 1,33 mg/ml o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidaze=substrat). Ploščico smo inkubirali pri 37 °C 30 min. Reakcijo smo prekinili z dodatkom 60 μ l 1 mM natrijevega karbonata (Sigma). Izmerili smo absorbanco produkta (o-nitrofenol) pri 420 nm z avtomatiziranim čitalcem mikroploščic (Tecan, Safire2).

Pripravili smo tudi slepi vzorec, pri katerem smo namesto supernatanta dodali 20 μ l RLB in standarde β -galaktozidaze od 0,125 mU do 1,5 mU. Standardi so bili pripravljene iz osnovne raztopine z 1 U/ μ l in redčeni najprej 160 \times (1 μ l z 159 μ l RLB) in nato 50 \times (2 μ l z 98 μ l RLB), da smo dobili 0,125 mU/ μ l, nato pa smo primeren volumen te raztopine dali na ploščico in redčili z RLB do končnega volumna 20 μ l.

Tabela 5: Priprava standardov beta-galaktozidaze

| Standard (mU) | Volumen st. 0,125 mU/ μ l (μ l) | Volumen RLB (μ l) |
|---------------|--|------------------------|
| 0,125 | 1 | 19 |
| 0,25 | 2 | 18 |
| 0,5 | 4 | 16 |
| 1 | 8 | 12 |
| 1,5 | 12 | 8 |

Aktivnost smo izračunali po formuli:

$$aktivnost = \frac{A_{av} - A_{blank}}{k_{umeritvenepremice}} \times V_{SN} \\ \frac{V_{odpipetirano} \times N_{št.celic}}$$

In jo izrazili v enotah: $\frac{mU}{10^5 celic}$

3.11 Merjenje aktivnosti TPMT v celicah

Zamrznjeni peleti z 3×10^5 celic smo dodali 50 μ l raztopine A, 50 μ l raztopine C in 1 μ l raztopine E. Raztopine A je bila 150 mM kalijev fosfatni pufer, pH 7,5; raztopina C je bila 100 μ M SAM, 500 μ M DTT in 40 μ M alopurinol v 150 mM kalijevem fosfatnem pufru; raztopina E je bila 225 mM 6-MP v DMSO. Vzorce smo vorteksirali, na kratko sonificirali in kratko centrifugirali. Inkubirali smo jih 2 h na 37 °C. Dodali smo 5 μ l ledeno mrzle 8 M

HClO₄ in takoj dali na led za 10 min. Centrifugirali smo 10 min pri 14000 g in 4 °C. Supernatant smo nevtralizirali z 10 µl 4 M K₂HPO₄ in dali na led za 10 min. Ponovno smo centrifugirali 10 min pri 14000 g in 4 °C. Supernatant (90 µl odpipetiranih za analizo) smo analizirali s HPLC. Pogoji HPLC so bili enaki kot pri merjenju TPMT v hemolizatih, kakor tudi priprava standardov.

Aktivnost TPMT smo izračunali po formuli:

$$\frac{\text{Area} \times V(115 \mu\text{l})}{k_{\text{umeritvene premice}} \times t(2\text{h}) \times N_{\text{št.celic}} \times \text{aktivnost}_{\beta\text{-gal}}} \quad \text{V enotah: } \frac{\text{pmol6-MMP}}{\text{mU} \times \text{h}}$$

3.12 SDS-PAGE in western prenos

Med stekelci smo vlili ločevalni (angl.separating) gel, približno 8 ml za en gel. Dodali smo tri kapljice izobutanola (Sigma) (levo, desno in na sredino), ko se je gel strdil smo splaknili z vodo in do vrha vlili zbiralni (angl.stacking) gel in vanj vstavili glavniček. Ko se je strdil smo odstranili glavniček in splaknili žepke z vodo. Stekleca z gelom smo vstavili v nosilec za elektroforezo ga vstavili v kadičko in nalili 1× Tris glycine EF buffer (Sigma). Peleto s 3×10⁵ celic smo raztopili v 40 µl 1×PBS, sonificirali in 10 µl nato prenesli v 26 µl pufru sestave: 1×SLB (Sigma), 5 % brom fenol modro (Sigma) in 5 % β-merkaptioetanol (Sigma) in v žepke nanесли po 30 µl. Na gel smo nanесли tudi 5 µl markerja kaleidoscope v prvi in zadnji žepok. Dolili smo 1× Tris glycine EF buffer (Sigma) povsem do vrha in namestili elektrodi. Napetost smo nastavili na 100 V in tok na 400 mA in pustili približno 2 h, da poteče elektroforeza.

Tabela 6: Priprava gelov za elektroforezo

| Separating gel (20ml) | Stacking gel (5ml) |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 7,9ml H ₂ O | 3,4ml H ₂ O |
| 6,7ml 30% akrilamid/bisakrilamid | 830µl 30% akrilamid/bisakrilamid |
| 5ml 1,5M Tris pufer (ph=8,8) | 630µl 1,0M Tris pufer (ph=6,8) |
| 200µl 10%SDS | 50µl 10%SDS |
| 200µl 10% amonijev persulfat | 50µl 10% amonijev persulfat |
| 8µl TEMED | 5µl TEMED |

Po končani elektroforezi smo prenesli vzorce iz gela na nitrocelulozno membrano z uporabo iBlot-a. Membrano smo potem sprali s 1×TTBS (50 ml 10×TBS (Sigma) smo dodali vodo do 500 ml in temu dodali 0,5 ml Tweena 20 (Sigma)). Nadalje smo membrano inkubirali 1 h v 5 % (m/v) mleku (2,5 g mleka v prahu smo raztopili v 50 ml čiste vode) temu je sledilo spiranje 2× po 5min z 1×TTBS. Membrano inkubirali v 15 ml raztopine primarnih protiteles (redčili smo jih 1:500 v 3 % (m/v) BSA) pri 4 °C čez noč. Sledilo je spiranje 3× po 5 min s

1×TTBS in inkubacija (1 h) v 15 ml raztopine sekundarnih protiteles (kozja anti-mišja igG protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo, Millepore) v 5% mleku (redčimo jih 1:2000) pri sobni temperaturi. Po spiranju s 1×TTBS smo membrano 5 min inkubirali s po 750 µl reagentov A (pufer) in B (luminol, substrat za peroksidazo, Femto ThermoScientific). Prenesli smo jo v G-BOX (Syngene, Cambridge, UK) in posneli svetlobo, ki nastane pri reakciji luminola s peroksidazo. Membrano smo prenesli v pufer za odstranjevanje protiteles (angl. stripping buffer) (2 % SDS, 62,5 mM Tris Cl, 100 mM β-ME) in mešali 1 h pri 50 °C v digestoriju. Ponovili smo postopek naveden zgoraj, le da smo inkubirali v 1,5 ml primarne raztopine protiteles proti aktinu (1:3000 v 5 % (m/v) mleku) in redčenje sekundarnih je bilo 1:1000.

3.13 Stabilne celične linije

Stabilnim celičnim linijam smo poleg merjenja aktivnosti TPMT s HPLC in westren prenosa z RT-PCR določili še kolikšna količina zaporedja mRNA TPMT se je izražala v celicah.

3.13.1 Izolacija RNA

Celice ($5-6 \times 10^6$) smo lizirali v 1 ml Trizolu (Invitrogen) na celic in jih inkubirali 5 min na sobni temperaturi. Dodali smo 0,2 ml kloroforma na 1 ml Trizola in inkubirali nadaljne 2-3 minute. Centrifugirali smo pri 12000 g 15 min na 4 °C. Prišlo je do ločitve raztopine v spodnjo rdečo fenol-kloroformno fazo (vsebuje proteine), belo interfazo (vsebuje DNA) in brezbarvno zgornjo vodno fazo (vsebuje RNA). Volumen zgornje faze je bil približno 600 µl od katere smo 400 µl prenesli v svežo epico. Dodali smo enak volumen 70 % etanola in dobro premešali z vorteksiranjem in dispergirali morebitni precipitat. Na kolono za čiščenje RNA (RNA Spin Cartridge) smo nanesele 700 µl vzorca. Centrifugirali smo 15 s pri 12000 g na sobni temperaturi in zavrgli eluat in dvakrat ponovili (prvič smo dodali 700 µl Wash Buffer I in drugič 350 µl). Kolonco smo prenesli v čisto RNA Wash Tube in dodali 500 µl Wash Buffer II. Nato smo dvakrat centrifugirali in zavrgli eluat. Centrifugirali smo na 12000 g 1 min pri sobni temperaturi, da se membrana kolone z vezano RNA osuši. Zbirno mikrocentrifugirko smo zavrgli in vstavili kolono v mikrocentrifugirko za zbiranje RNA (RNA Recovery Tube) dodali 50 µl vode brez RNAaze in inkubirali 1 min pri sobni temperaturi. Centrifugirali smo na 12000 g 2 min pri sobni temperaturi, odpipetirali alikvot po 5 µl in jih postavili na led največ za nekaj ur, ostalo pa shranili pri -80 °C. V alikvotih

smo določili koncentracijo RNA z ND-1000 spektrofotometrom (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) (na aparatu smo nanegli po 2 μ l vzorca).

3.13.2 Reverzna transkripcija

Za reverzno transkripcijo smo uporabili Omniscript RT kit (Qiagen, USA). Pripravili smo matično raztopino, ki vsebuje na en vzorec: 2 μ l 10 \times RT buffer; 0,8 μ l 25 \times dNTP; 2 μ l 10 \times oligonukleotidov; 1 μ l RTaza; 1 μ l inhibitor RNAze. Preračunali smo volumen raztopine z RNA, ki ga potrebujemo, da dobimo na koncu koncentracijo RNA 10ng/ μ l. Dodali smo toliko RNAaza proste vode, da je bil končni volumen 20 μ l. V vsako epice smo dali najprej 6,8 μ l matične raztopine nato RNAaza prosto vodo in na koncu raztopino RNA (200 ng RNA v končnem volumnu). Poleg vzorcev smo pripravili še kontrolo brez matrice (no template control), ki ni vseboval raztopine RNA. Vzorce smo vstavili v aparat (za pogoje glej tabelo 8) in pustili, da se je RNA prepisala v cDNA.

Tabela 7: Pogoji reverzne transkripcije

| | 1.korak | 2.korak | 3.korak | 4.korak |
|-----------------|---------|---------|---------|----------|
| Temperatura(°C) | 25 | 37 | 85 | 4 |
| Čas | 10min | 2h | 15s | ∞ |

3.13.3 RT-PCR

TPMT mRNA količino smo kvantificirali z uporabo kompleta za določanje ekspresije gena TPMT s specifično Taqman sondo (Applied Biosystems) relativno glede na ekspresijo humanega ciklofilina (huCYC). Pripravili smo dve matični raztopini eno za določanje zaporedja za TPMT in drugo za določanje zaporedja »hišnega« gena huCYC.

Tabela 8: Priprava mixov za RT-PCR

| Zmes za TPMT | Na en vzorec V(μ l) | Zmes za huCYC | Na en vzorec V(μ) |
|----------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|
| MM, 2x | 10 | MM, 2x | 10 |
| TPMT zmes, 20x | 1 | huCYC zmes, 20x | 1 |
| Voda | 7 | Voda | 7 |

MM je bila raztopina polimeraze, TPMT zmes je vsebovala 2 specifična začetna oligonukleotida za pomnoževanje amplikona TPMT in specifični reporterski oligonukleotid označen z fluorescenčnim barvilom FAM, huCYC zmes je vsebovala 2 specifična začetna oligonukleotida za pomnoževanje amplikona huCYC in specifični reporterski oligonukleotid

označen z fluorescenčnim barvilom FAM. Za umeritveno krivuljo in določitev učinkovitosti pomnoževanja smo pripravili redčitve vzorca cDNA pripravljenega iz celic 1/1:

Tabela 9: Redčitve za umeritveno krivuljo RT-PCR

| R1 | R0,5 | R0,25 | R0,125 | R0,0625 |
|---------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 20µl raztopine cDNA | 10µl RNAaze free vode | 10µl RNAaze free vode | 10µl RNAaze free vode | 10µl RNAaze free vode |
| | Prenesemo 10 µl raztopine R1 | Prenesemo 10 µl raztopine R0,5 | Prenesemo 10 µl raztopine R0,25 | Prenesemo 10 µl raztopine R0,125 |

Delali smo na ploščici z 96 vdolbinicami. Za vsak vzorec in redčitev smo pripravili dve paralelki za merjenje TPMT zaporedja in enako za merjenje huCYC. V žepek smo prenesli 18 µl matične raztopine in nato dodali 2 µl vzorca. Poleg tega smo pripravili še kontrolo brez matrice in vodo. Ploščico smo centrifugirali pri 1900 g 2 min in jo nato preneseli v aparaturo (ABI Prism 7000 Sequence Detection System). Aparatura je opravila 50 ciklov.

Tabela 10: RT-PCR pogoji

| | |
|-------|------|
| 2min | 50°C |
| 10min | 95°C |
| 15s | 95°C |
| 1min | 60°C |

Kot rezultat smo dobili prazni cikel (Ct) pri katerem je bila količina podvojene DNA večja od signala, ki sta ga dajala kontrola brez matrice in voda. Iz redčitev celic TPMT*1/1 smo dobili umeritveni premici za gen TPMT in za gen huCYC in iz njunega naklona izračunali E_{TPMT} in E_{huCYC} po formuli $E = 10^{\frac{-1}{naklon}}$. Nato smo izračunali razmerje med količino mRNA v celicah brez vnešenega zaporedja TPMT (pcDNA) in ostalimi celicami po formuli:

$$razmerje = \frac{E_{TPMT}^{\Delta Ct_{TPMT}(pcDNA-vzorec)}}{E_{huCYC}^{\Delta Ct_{huCYC}(pcDNA-vzorec)}}$$

4 Rezultati

4.1 Vpliv koncentracije SAM na aktivnost TPMT v hemolizatih

Domnevo o vplivu SAM na aktivnost TPMT smo preverili z merjenjem aktivnosti TPMT in koncentracijo SAM na 205 hemolizatih zdravih preiskovancev in uporabili še podatke za 159 vzorcev, ki so bili izmerjeni predhodno (49).

Tabela 11: Vrednosti aktivnosti TPMT in koncentracij SAM (povprečna vrednost in SD) glede na genotip

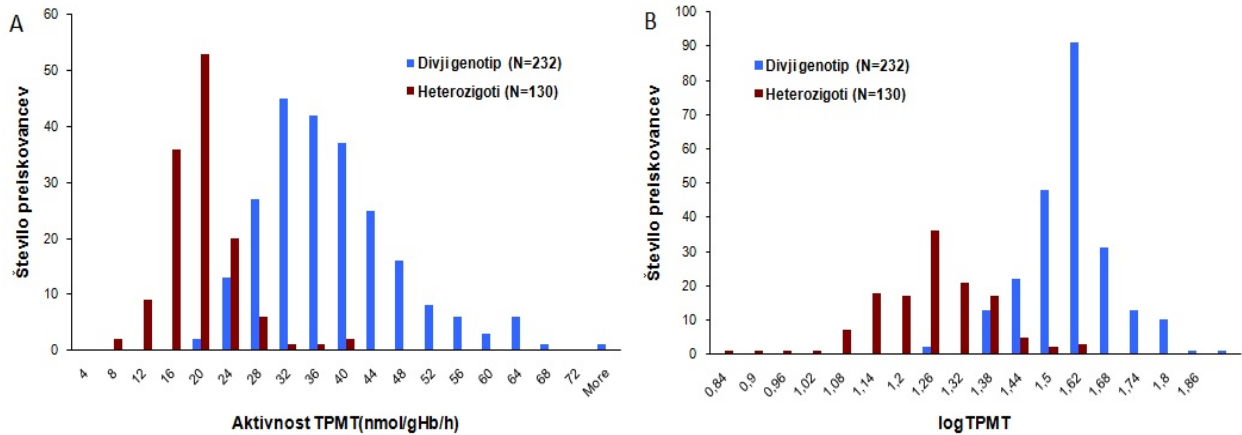
| Genotip | N | Odstotek(%) | Aktivnost TPMT (nmol/gHb/h) | Koncentracija SAM (nmol/gHb) | |
|--------------|---------|-------------|-----------------------------|------------------------------|--------------|
| Divji tip | *1/*1 | 232 | 56,6 | 36,28 ± 9,54 | 13,47 ± 7,07 |
| Heterozigoti | *1/*3A | 119 | 40,1 | 17,67 ± 5,07 | 18,43 ± 9,50 |
| | *1/*3C | 11 | 2,4 | 16,24 ± 3,19 | 14,03 ± 8,32 |
| | *1/*3 | 130 | 42,5 | 17,55 ± 4,94 | 18,06 ± 9,46 |
| Homozigoti | *3A/*3A | 1 | 0,5 | 2,44 | 32,36 |
| | *3A/*3C | 1 | 0,5 | 2,07 | 35,45 |
| | *3/*3 | 2 | 0,9 | 2,25 ± 0,26 | 33,91 ± 2,19 |
| Skupaj | | 364 | | 29,40 ± 12,30 | 15,22 ± 8,39 |

4.1.1 Aktivnost TPMT

Povprečna aktivnost TPMT pri divjem genotipu je bila 36,28±9,54 nmol/gHb/h v razponu 16,86 – 75,80 nmol/gHb/h. Pri heterozigotih je bila povprečna aktivnost 17,55±4,94nmol/gHb/h v razponu 6,14 – 36,72 nmol/gHb/h. Pri mutiranih homozigotih je bila povprečna aktivnost 2,25±0,26 nmol/gHb/h.

Normalnost porazdelitve aktivnosti TPMT za skupino z divjim genotipom in skupino heterozigotov smo preverili s Kolmogorov-Smirnovim in Shapiro-Wilkovim testom. Normalnost ni v nobeni skupini potrdil ne Kolmogorov-Smirnov ne Shapiro-Wilkov test. Zato smo izvedli logaritemsko transformacijo aktivnosti TPMT ($f(x)=\log(x)$). Po transformaciji je normalnost porazdelitve potrdil Kolmogorov-Smirnov test pri obeh skupinah ($p_{wt} > 0,10$; $p_{mut} > 0,10$), Shapiro-Wilkovim test pa je normalnost potrdil le pri skupini z divjim genotipom ($p=0,6916$), pri skupini heterozigotov ($p= 0,0489$) pa normalnosti ni potrdil (slika 8).

Neparni t-test je pokazal signifikantno razliko med aktivnostjo TPMT med skupinama z divjim genotipom in skupino heterozigotov (razlika= 0,2693; 95% interval zaupanja= 0,2343-0,3043; $p < 0,0001$)



Slika 8: Histograma frekvenčne porazdelitve aktivnosti TPMT in logTPMT glede na genotip

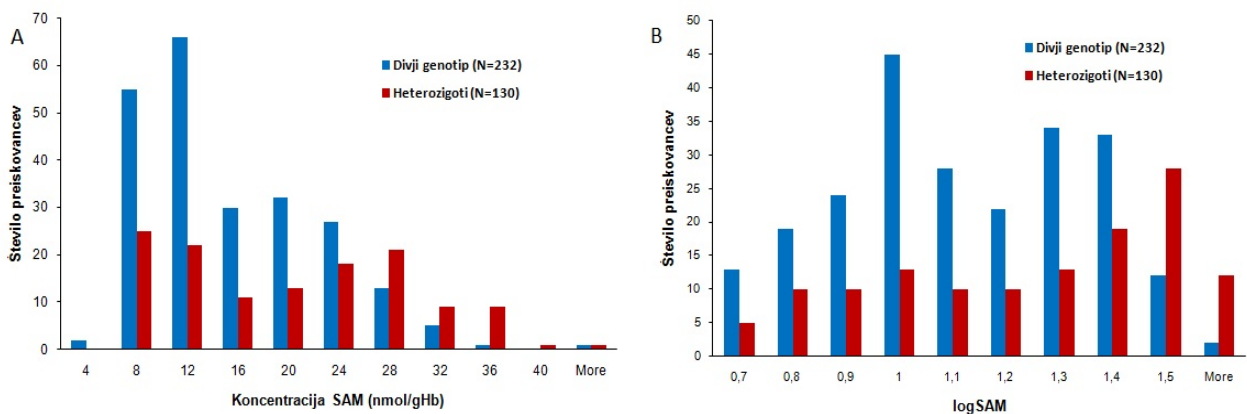
A: Aktivnost TPMT se v obeh skupinah preiskovancev ni porazdeljevala normalno.

B: Po logaritamski transformaciji je bila porazdelitev v obeh skupinah normalna.

4.1.2 Koncentracija SAM

Povprečna koncentracija SAM v skupini z divjim genotipom je bila $13,47 \pm 7,07$ nmol/gHb in v skupini heterozigotov $18,06 \pm 9,46$ nmol/gHb. Kolmogorov-Smirnov in Shapiro-Wilkov test nista potrdila normalnosti porazdelitve koncentracije SAM v nobeni skupini ($p_{wt} < 0.0001$; $p_{mut} < 0.0001$). Tudi po logaritamski transformaciji sta testa pokazala nenormalnosti porazdelitve v obeh skupinah (slika 9).

Mann-Whitneyev test je pokazal, da je razlika v logSAM med skupinama ($p < 0.0001$) statistično signifikantna. Statistično signifikantno razliko je pokazal tudi Studentov t-test za logSAM ($\Delta=0,1156$; CI: 0.06241- 0.1688; $p < 0.0001$).



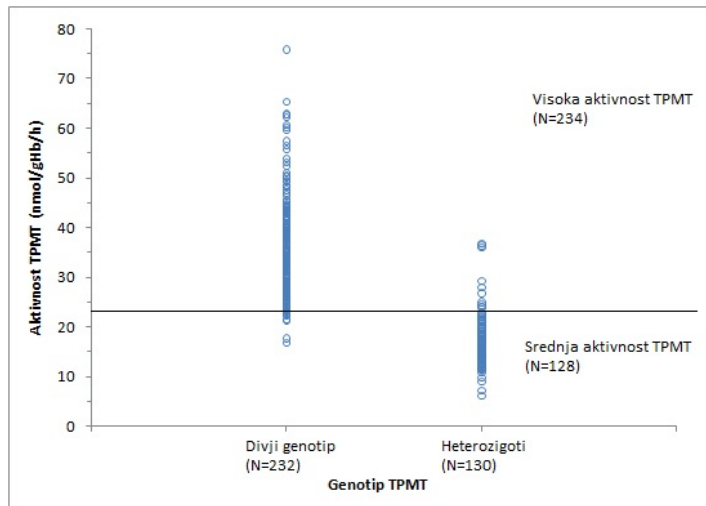
Slika 9: Histogram frekvenčne porazdelitve koncentracije SAM in logSAM glede na genotip

A: Koncentracija SAM se v skupini z divjim genotipom in v skupini heterozigotov ni porazdeljevala normalno

B: Tudi po logaritamski transformaciji koncentracije SAM ni bila porazdelitev v nobeni skupini normalna

4.1.3 Korelacija med genotipom in fenotipom

Aktivnost TPMT smo razdelili v dve skupini s pomočjo ROC analize, s katero smo arbitrarno določili mejo med obema skupinama pri 22,91 nmol/gHb/h. Pri tej meji je bil fenotipski test za določanje posameznih genotipov specifičnost 96,12 % in občutljivost 91,54 %. Vse posameznike z aktivnost pod mejo smo razvrstili v skupino s srednjo aktivnostjo TPMT (N=128) in vse posameznike z aktivnost nad mejo smo razvrstili v skupino z visoko aktivnostjo TPMT (N=234). Devet vzorcev z divjim genotipom (2,5 % vseh vzorcev) je bilo uvrščenih v skupino z srednjo aktivnostjo TPMT (vrednosti vzorcev od 22,53 do 16,86 nmol/gHb/h) in enajst vzorcev s heterozigotnim genotipom (3,0 % vseh vzorcev) je bilo uvrščenih v skupino z visoko aktivnostjo (od 23,91 do 36,72 nmol/gHb/h) (slika 10). Mann Whitney test je pokazal, da med vzorci s heterozigotnimi genotipom s srednjo aktivnostjo TPMT ($\log\text{SAM} \pm 95\% \text{CI} = 1,18 \pm 0,05$; N=119) in heterozigotnimi vzorci z visoko aktivnostjo TPMT ($\log\text{SAM} \pm 95\% \text{CI} = 1,17 \pm 0,21$; N=11) ni bilo statistično signifikantne razlike ($p=0,8869$) v $\log\text{SAM}$. Tudi ni bilo statistično značilne razlike v $\log\text{SAM}$ ($p=0,6376$) med vzorci z divjim genotipom s visoko aktivnostjo TPMT ($\log\text{SAM} \pm 95\% \text{CI} = 1,07 \pm 0,03$; N=223) in vzorci z divjim genotipom in srednjo aktivnostjo TPMT ($\log\text{SAM} \pm 95\% \text{CI} = 1,02 \pm 0,18$; N=9).



Slika 10: Aktivnost TPMT glede na genotip

Mejna vrednost med visoko in srednjo aktivnostjo TPMT je bila 22,91 nmol/gHb/h. V skupino s srednjo aktivnostjo TPMT je bilo razvrščenih 128 vzorcev od tega 9 z divjim genotipom in v skupino z visoko aktivnostjo TPMT pa 234 vzorcev od tega 11 heterozigotov.

4.1.4 Ugotavljanje povezave med koncentracijo SAM in aktivnostjo TPMT

S statistično analizo smo želeli tudi preveriti koncentracija SAM vpliva na aktivnost TPMT ali gre za obratno povezavo.

Vzorci smo razdelili v šest skupin glede na genotip TPMT*1/1, TPMT*1/3A in TPMT*1/3C in glede na visoko ali nizko koncentracijo SAM. Meja med visoko in nizko koncentracijo SAM je bila arbitrarno postavljena na povprečno vrednost logSAM zmanjšano za eno standardno deviacijo ($\log\text{SAM}_{\text{mejna vrednost}}=0,83463$)

Neparni t-test je pokazal, da razlika v aktivnosti TPMT med heterozigoti TPMT*1/3A z visoko koncentracijo SAM (povpr. $\log\text{TPMT}= 1,23 \pm 0,13$; N=106) in heterozigoti z nizko koncentracijo SAM (povpr. $\log\text{TPMT}= 1,24 \pm 0,09$; N=13) ni statistično signifikantna ($p=0,6356$). Test tudi ni pokazal signifikantne razlike ($p= 0,7796$) med heterozigoti TPMT*1/3C z visoko koncentracijo SAM (povpr. $\log\text{TPMT}= 1,19 \pm 0,08$; N=8) in heterozigoti z nizko koncentracijo SAM (povpr. $\log\text{TPMT}= 1,23 \pm 0,09$; N=3). Pri vzorcih z genotipom TPMT*1/1 s visoko koncentracijo SAM (povpr. $\log\text{TPMT}= 1,56 \pm 0,11$; N=195) in vzorcih z nizko koncentracijo SAM (povpr. $\log\text{TPMT}= 1,48 \pm 0,07$; N=37) pa je bila razlika statistično signifikantna ($\Delta=0,076$; $p< 0,0001$; CI=0,03863-0,1136).

Rezultati dobljeni za genotip TPMT*1/1 kažejo, da ima koncentracija SAM pozitiven vpliv na aktivnost TPMT. Tega nismo dobili pri heterozigotih, vendar je razlog za to lahko majhno število vzorcev.

4.2 Vpliv koncentracije SAM na aktivnost TPMT na prehodno transficiranih celicah

Celice transficirane z plazmidi z zaporedji za različne variante TPMT smo gojili ob prisotnosti metionina in brez njega. Ker je metionin prekurzor SAM njegova odsotnost v mediju za gojenje celic zniža znotrajcelično koncentracijo SAM. Tako smo z primerjavo med celicami gojenimi v različnih pogojih videli kakšno razliko povzroči pomanjkanje SAM.

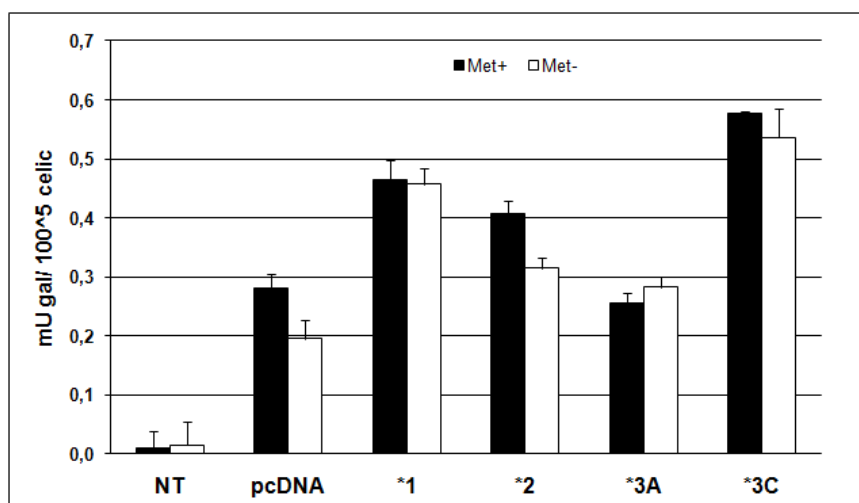
V COS-7 celice smo vgradili pet različnih plazmidov, ene pa smo imeli za kontrolo (NT=netransficirane). Vgradili smo štiri plazmide z cDNA zaporedji za različne alele TPMT, enega z divjim genotipom (*1) in tri z mutiranim TPMT genotipom (*2,*3A,*3C) in en plazmid brez zaporedja TPMT (pcDNA). Eno paralelko celic smo gojili v mediju z metioninom (Met+) in drugo v mediju brez metionina (Met-).

4.2.1 B-galaktozidaza

Izražanje tega encima služi kot kontrola učinkovitosti transfekcije in določanjem njegove aktivnosti v celičnih lizatih odpravimo razlike, ki nastanejo zaradi različne učinkovitosti transfekcije med vzorci.

Vse celice, ki smo jih transficirali z lacZ plazmidom, imajo veliko višjo aktivnost β -galaktozidaze kot netransficirane celice (NT). To pomeni, da je bila transfekcija uspešna. Z pomočjo aktivnosti β -galaktozidaze normaliziramo nadaljne rezultate. Največjo aktivnost imajo celice TPMT*3C gojene v metioninu (0,5774 mU gal/10⁵ celic) in najmanjšo celice pcDNA gojene brez metionina (0,1952 mU gal/10⁵ celic).

Gojenje v prisotnosti metionina oziroma brez metionina ne vpliva na aktivnosti β -galaktozidaze. Pri celicah z divjim genotipom TPMT je pri obeh paralelkah podobna aktivnost, pri celicah z genotipom TPMT*3A je višja aktivnost pri gojenju brez metionina in pri genotipih TPMT*2, TPMT*3C in brez TPMT zaporedja je višja aktivnost pri gojenju v metioninu (slika 11).



Slika 11: Aktivnost β -galaktozidaze v prehodno transficiranih COS-7 celicah

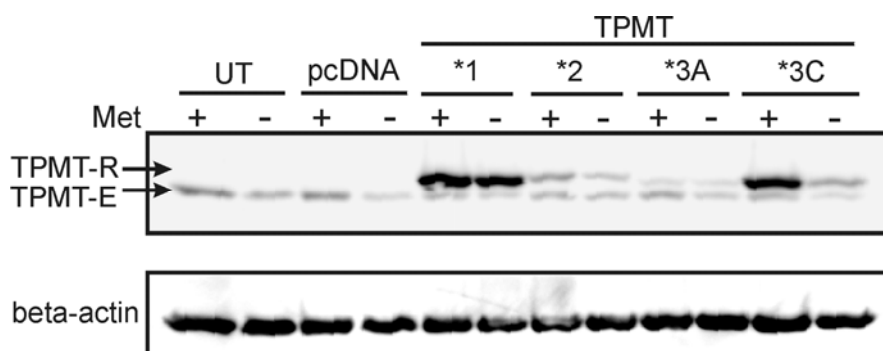
NT:ne transficirane celice; pcDNA:brez TPMT zaporedja; *1:divji genotip; *2,*3A,*3C:mutiran alel; Met+:gojenje v metioninu; Met-:gojenje v odsotnosti metionina.

Aktivnost β -galaktozidaze kaže učinkovitost transfekcije in posledično na količino vnesenega gena v celice. V nadaljnjih rezultatih jo uporabimo za normalizacijo.

4.2.2 Izražanje TPMT na proteinskem nivoju-Western prenos

S to metodo smo želeli relativno primerjati količine proteina TPMT v različnih celicah. S pomočjo SDS PAGE smo zaradi molekulske mase lahko dosegli ločitev med endogenim

TPMT in eksogenim TPMT in smo tako lahko primerjali samo aloencime med seboj ter kakšen je vpliv SAM na njihovo razgradnjo (slika 12).



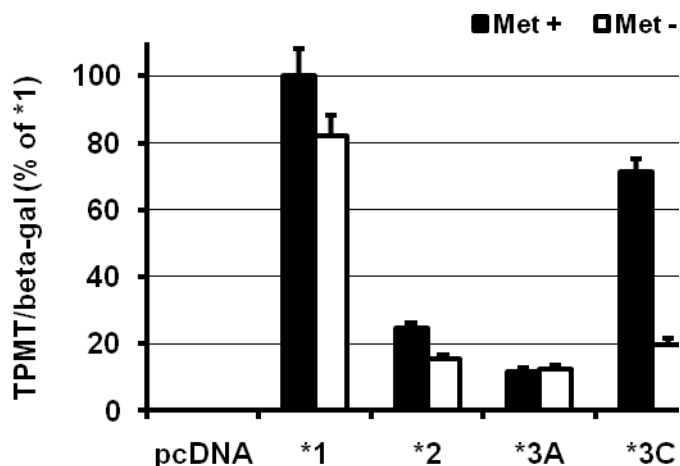
Slika 12: Western prenos prehodno transficiranih celic gojenih v metioninu oziroma brez metionina

Celice smo 24 h gojili v prisotnosti (+) ali odsotnosti (-) metionina (Met). pcDNA: celice s plazmidom brez vključka TPMT ; *1,*2,*3A in *3C : s plazmidom z vključki za različne aloencime TPMT

UT: ne transficirane celice; TPMT-R:rekombinantni protein; TPMT-E:endogeni protein

Dobimo ločeni lisi za endogeni TPMT in eksogeni TPMT in tako lahko primerjamo aloencime med seboj in vpliv znotrajcelične koncentracije SAM nanje. Po določitvi TPMT smo membrano sprali in določili β -aktin, ki služi kot merilo enakomernosti nanosa vzorcev v žepke gela za SDS-PAGE. Pri UT in pcDNA celicah ni rekombinantnega TPMT saj ga nismo vnesli s plazmidi. Največ rekombinantnega TPMT je vidnega pri obeh TPMT*1 in pri TPMT*3C gojenjih v metioninu. Pri TPMT*2 in TPMT*3C je vidna tudi razlika med celicami gojenimi v Met in celicami gojenjih brez Met, kjer je manj proteina.

Največja količina proteina TPMT je v primeru aloencima TPMT*1, temu sledi TPMT*3C, v primeru aloencimov TPMT*2 in TPMT*3A pa je količina precej manjša kot pri TPMT*1. Ob znižanju koncentracije SAM pride v vseh primerih do zmanjšanja količine encima razen pri TPMT*3A, kjer ostane količina podobna. To potrjuje domnevo, da SAM stabilizira proteinsko strukturo in na ta način upočasni razgradnjo. Ker je v primeru TPMT*2 in TPMT*3A mutacija blizu vezavnega mesta za SAM se verjetno ne veže veliko SAM na protein tudi, ko je njegova koncentracija visoka in zato je količina teh dveh aloencimov nizka in se ne spremeni dosti ob znižanju koncentracije SAM. V primeru TPMT*3C mutacija ni blizu vezavnega mesta SAM in zato je ob zadostni koncentraciji SAM njegova količina še vedno precejšna in ob znižanju koncentracije SAM pa drastično pade. SAM ima torej največji vpliv na TPMT*3C in njegova zadostna koncentracija lahko precej upočasni razgradnjo in ohrani dobršen delež količine v primerjavi s TPMT*1.



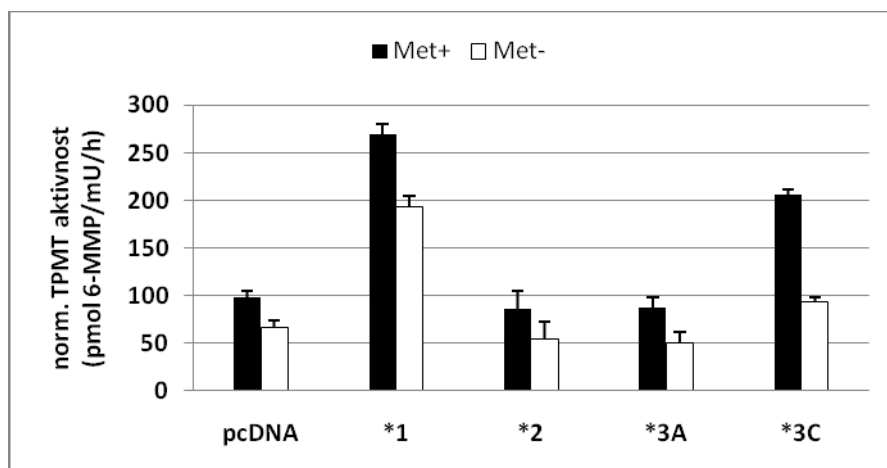
Slika 13: Količina rekombinantnega TPMT v prehodno transfeciranih celicah

Dobljene rezultate smo delili z aktivnostjo β -galaktozidaze v posameznih celicah ter nato vse delili z vrednostjo dobljeno pri celicah TPMT*1. Količina je izražena v odstotkih količine v celicah TPMT*1 gojenimi v metioninu. Vidimo, da je količina proteina nižja pri gojenju brez metionina, razen pri celicah TPMT*3A kjer je podobna. Prav tako je vidno, da je najmanj proteina pri celicah TPMT*2 in TPMT*3A, pri katerih mutacija najbolj pospeši razgradnjo. Pri celicah TPMT*3C gojenimi v metioninu je količina proteina precej velika v primerjavi z drugima dvema mutacijama, je pa viden največji padec v količini proteina pri gojenju brez metionina. Pomankanje metionina vodi do znižanja znotrajcelične koncentracije SAM in s tem se izgubi tudi stabilizacija strukture encima, ki je zato podvržen hitrejši razgradnji.

Količina rekombinantnega TPMT je izražena kot odstotek količine TPMT pri celicah z divjim genotipom TPMT*1 gojenimi v metioninu, pri katerih je bilo največ proteina (100 %). Pri drugih genotipih gojenjih v metioninu je bila količina TPMT nižja: pri TPMT*3C 71,3 %, TPMT*2 24,6 %, TPMT*3A 11,7 %. Pri celicah gojenjih v mediju brez metionina je bila količina proteina, glede na gojene v metioninu nižja: TPMT*1 82,2 %, TPMT*3C 19,8 %, TPMT*2 15,4 % oziroma podobna TPMT*3A 12,4 % (slika 13). Razlog za nižjo količino TPMT*2 in TPMT*3A je pospešena razgradnja proteina zaradi njegove nepravilne strukture.

4.2.3 Aktivnost TPMT izmerjena z metodo HPLC

Celokupna aktivnost TPMT je vsota aktivnosti endogenega TPMT in rekombinantnega TPMT, ki se dodatno izraža zaradi vnešenega plazmida. Z merjenjem vidimo kakšne so razlike med različnimi aloencimi TPMT in koliko na posamezne aloencime vpliva znižanje koncentracije SAM oz. gojenje v odsotnosti Met.



Slika 14: Normalizirana aktivnost TPMT v prehodno transficiranih celicah

Z HPLC smo izmerili aktivnost TPMT v celicah, ki smo jih transficirali z plazmidi z zaporedji za različne aloencime TPMT. Celice so bile razdeljene v dve paralelki ene gojene v normalnih pogojih in druge v odsotnosti metionina, kar ima za posledico znižanje znotrajcelične koncentracije SAM.

Primerjava med celicami gojenimi v metioninu in celicami gojenimi brez metionina kaže, da je v odsotnosti metionina aktivnost TPMT nižja. Vidno je tudi, da je aktivnost pri genotipu TPMT*2 in TPMT*3A nezaznavna oziroma podobna celicam pcDNA. Največji vpliv ima pomankanje metionina na genotip TPMT*3C pri katerem se SAM veže na TPMT, stabilizira strukturo in upočasni proteolizo. Brez SAM pa ni stabilizacije in zato se razgradnja pospeši in je zaradi mutacije hitrejša kot pri divjem tipu.

Izmerjena aktivnost je vsota aktivnosti endogenega TPMT, ki je produkt celičnega genoma, ter rekombinantnega TPMT, ki smo ga vnesli s transfekcijo s plazmidi z genom za TPMT. Najvišja aktivnost je pri divjem genotipu TPMT*1, druga najvišja aktivnost je pri genotipu TPMT*3C. Pri genotipih TPMT*2 in TPMT*3A je aktivnost podobna pcDNA, kjer v plazmidu ni bilo zaporedja za TPMT. To kaže, da je aktivnost rekombinantnega proteina TPMT*2 in TPMT*3A minimalna oz. je skoraj ni.

Pri vseh celicah gojenih v mediju brez metionina je bila aktivnost nižja kot pri celicah gojenih v metioninu. Največja razlika je bila pri celicah z genotipom TPMT*3C: 206,56 pmol 6-MMP/mU/h v mediju z metioninom in 93,43 pmol 6-MMP/mU/h brez metionina (zmanjšanje za 55%). Zmanjšanje pri pcDNA je 32 % (Met+: 97,44 pmol 6-MMP/mU/h; Met-: 66,27 pmol 6-MMP/mU/h) pri divjem tipu TPMT*1 je 28 % (Met+: 269,34 pmol 6-MMP/mU/h; Met-: 193,68 pmol 6-MMP/mU/h) pri genotipu TPMT*2 je 38 % (Met+: 86,24 pmol 6-MMP/mU/h; Met-: 53,82 pmol 6-MMP/mU/h) in pri genotipu TPMT*3A je 42 % (Met+: 86,98 pmol 6-MMP/mU/h; Met-: 50,59 pmol 6-MMP/mU/h) (slika 14).

Ti rezultati so skladni z rezultati western prenosa oz. izmerjena aktivnost s sklada z izmerjeno količino proteina. Najvišjo aktivnost ima TPMT*1, ki mu sledi TPMT*3C,

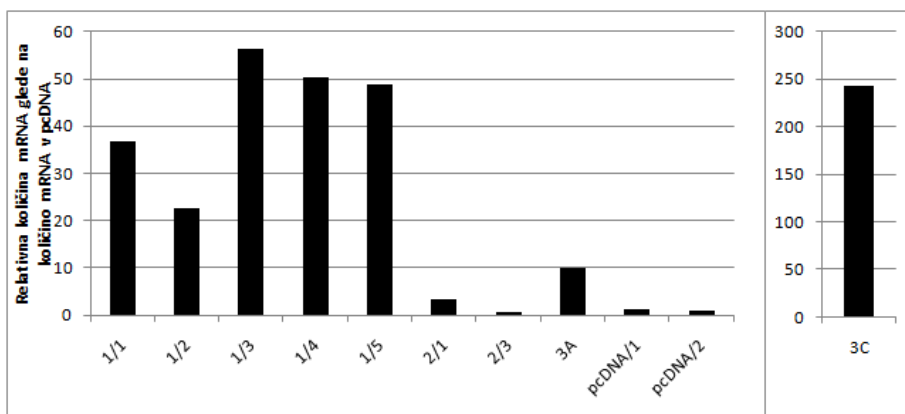
aktivnost TPMT*2 in TPMT*3A pa je minimalna. Ob znižanju koncentracije SAM se zniža aktivnost pri vseh aloencimih. V primeru TPMT*2 in TPMT*3A je tu padec večji kot padec količine določen z western prenosom. To je posledica tega, da največji delež k aktivnosti prispeva endogeni encim TPMT*1, kar je vidno iz tega, da je aktivnost v teh primerih podobna aktivnosti pri pcDNA. Kakor je bil pri western prenosu največji padec v količini pri TPMT*3C, je tudi tu vidno največje znižanje aktivnosti encima. Učinek SAM na stabilizacijo strukture in ohranitev aktivnosti je očitno največji pri aloencimu TPMT*3C.

4.3 Vpliv koncentracije SAM na aktivnost TPMT pri stabilnih celičnih linijah

Dobljene rezultate s prehodno transficiranih celic smo želeli potrditi še na stabilnih celičnih linijah v katere smo vgradili plazmide z zaporedji za divji genotip TPM*1 in mutaranimi zaporedji TPMT*2, TPMT*3A in TPMT*3C. Kot kontrolo smo imeli celice v katere smo vgradili plazmid brez zaporedja za TPMT označen kot pcDNA. Vzgojili smo pet linij z divjim genotipom TPMT*1/1-5 dve za TPMT*2 (TPMT*2/1 in TPMT*2/3), po eno za mutaciji 3A in 3C in dve kontroli (pcDNA/1 in pcDNA/2).

4.3.1 RT-PCR

Z uporabo PCR smo določili kakšno je relativno izražanje mRNA za TPMT glede na celice pcDNA, ki jim s plazmidi nismo vnesli dodatnega zapordje za TPMT. Pričakovano je bilo, da bo količina mRNA vsaj nekajkrat višja kot pri pcDNA, kar je dokaz, da je TPMT zaporedje stabilno vgrajeno v genom in se tudi prepisuje (slika 15).



Slika 15: Količina mRNA v stabilnih celičnih linijah

Iz stabilnih celičnih linij smo najprej izolirali RNA in nato za vse linije enako količino RNA prepisali v cDNA in nato smo z RT-PCR določili količino zaporedja za TPMT. Količina mRNA je razen pri celičnih linijah TPMT*2/3 povsod večja od celične linije pcDNA, ki ni imela vgrajenega zaporedja za rekombinantni TPMT.

Količino mRNA z zaporedjem za TPMT v stabilnih celičnih linijah smo primerjali glede na količino izraženo v celicah pcDNA/1 in pcDNA/2, pri katerih ni bilo vnešenega zaporedja za TPMT z plazmidom. Količina mRNA v celicah pcDNA ima tako relativno vrednost okoli 1. Pri ostalih celičnih linijah dobljena vrednost pove kolikokrat je količina mRNA večja kot v pcDNA. Razmerje med količino mRNA v celicah pcDNA in ostalimi smo izračunali po formuli

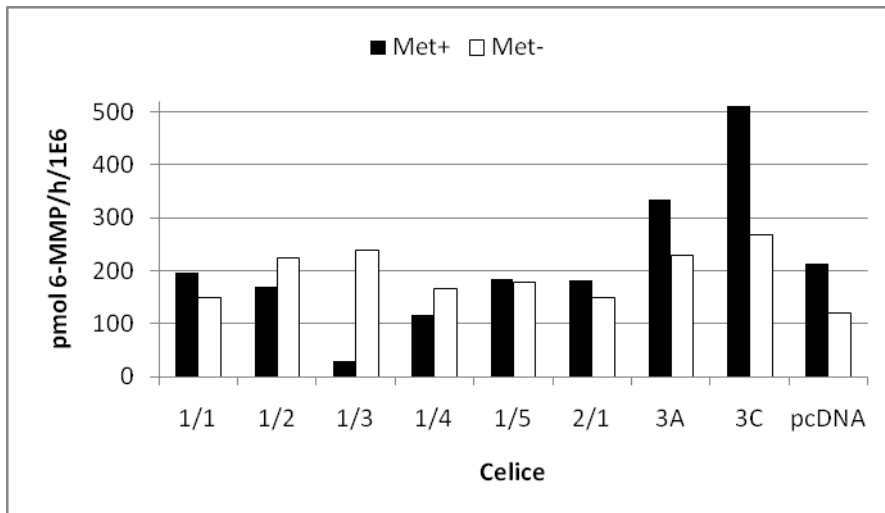
$$\text{razmerje} = \frac{E_{TPMT}^{\Delta C_{iTPMT}(\text{pcDNA-vzorec})}}{E_{huCYC}^{\Delta C_{thuCYC}(\text{pcDNA-vzorec})}}$$

V večini primerov razen pri TPMT*2/3 je bilo izražanje mRNA povišano in s tem tudi potrjeno, da je zaporednje TPMT vgrajeno v genom in se pripisuje. Med vsemi vzorci izstopa predvsem TPMT*3C pri katerem je prepisovanje največje in s tem verjetno tudi nastajanje proteina.

Največ je mRNA v celicah TPMT*3C (razmerje=242,5). Pozitivni so tudi vzorci TPMT*1/1 (razmerje=36,6), TPMT*1/2 (razmerje=22,5), TPMT*1/3 (razmerje=56,2), TPMT*1/4 (razmerje=50,1) TPMT*1/5 (razmerje=48,7) TPMT*3A/1 (razmerje=10,1). Najmanj mRNA je v TPMT*2/1 (razmerje=3,3). V celicah TPMT*2/3 (razmerje=0,6) ni nič več mRNA kot v kontrolnih celicah pcDNA (slika 15).

4.3.2 Aktivnost TPMT

Poskus smo izvedli enako kot na prehodno transficiranih celicah in smo zato tudi pričakovali podobne rezultate. Pričakovano je bilo, da bodo aktivnosti pri celicah gojenjih brez metionina povsod nižje. Najvišjo aktivnost TPMT smo pričakovali pri divjem tipu nato mutaciji TPMT*3C in najnižjo pri TPMT*2, TPMT*3A in pcDNA (slika 16).



Slika 16: Aktivnost TPMT pri stabilnih celičnih linijah izmerjena s HPLC

Merjenje aktivnosti TPMT je potekalo enako kot pri prehodno transficiranih celicah.

Pričakovano je bilo, da bo aktivnost pri gojenju brez metionina povsod nižja kot pri gojenju z metioninom. A rezultati tega ne potrjujejo, ker je pri celicah TPMT*1/5 aktivnost podobna in pri celicah TPMT*1/2, *1/3, *1/4 celo višja pri gojenju brez metionina.

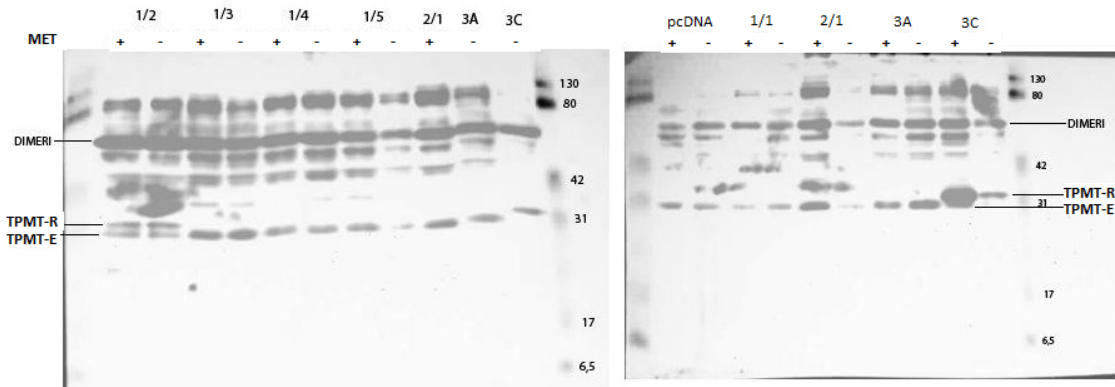
Aktivnost je glede na pcDNA višja le pri celicah TPMT*3C in malo višja pri TPMT*3A, medtem ko je pri celicah TPMT*1 in TPMT*2 primerljiva s pcDNA (slika 16).

Dobljeni rezultati ne kažejo pričakovanega znižanja aktivnosti TPMT pri celicah gojenimi v mediju brez metionina glede na celice gojene v metioninu. Nižjo aktivnost TPMT, pri celicah gojenjih brez metionina, dobimo pri celičnih linijah TPMT*1/1, TPMT*2/1, TPMT*3A, TPMT*3C in pcDNA. Pri celicah TPMT*1/5 dobimo podobni vrednosti medtem, ko pri TPMT*1/2, TPMT*1/3 in TPMT*1/4 dobimo višje aktivnosti TPMT pri celicah gojenih v mediju brez metionina.

Rezultat dobljen pri prehodno transficiranih celicah smo v primeru stabilnih celičnih linij potrdili le v primeru TPMT*3C. Tudi tu je bila aktivnost encima precej višja kot aktivnost pri pcDNA in je ob znižani koncentraciji SAM prišlo do znižanja aktivnosti TPMT*3C.

4.3.3 Western prenos

Ker pri merjenju aktivnosti TPMT s HPLC nismo dobili pričakovanih rezultatov smo izvedli še Western prenos. S to metodo ne merimo aktivnosti TPMT, ampak le njeno količino. Ker smo z metodo RT-PCR dokazali, da je zaporedje TPMT uspešno vgrajeno in se prepisuje, lahko s to metodo vidimo ali je napaka pri translaciji in encim ne nastaja ali pa je kaj drugega krivo, da encim nima pričakovane aktivnosti.



Slika 17: Western prenos stabilnih celičnih linij

TPMT-R:rekombinantni , TPMT-E: endogeni TPMT, MET:metionin +/-:gojenje z/brez metionina

Metodo je bila enaka kot pri prehodno transficiranih in z njo vidimo ločena endogeni TPMT in eksogeni.

Liso rekombinantnega TPMT vidimo le celicah TPMT*1/2 in TPMT*3C. Največ rekombinantnega proteina je pri celicah TPMT*3C, kjer je vidna tudi razlika pri gojenju z ali brez metionina.

Vidimo, da pri večini celic ni prišlo do izražanja rekombinantnega proteina.

Edino pri celicah TPMT*1/2 in TPMT *3C vidimo liso, ki ustreza rekombinantnemu TPMT vnešenim s plazmidom. Pri ostalih celicah vidimo le liso, ki ustreza endogenemu proteinu. Pri vseh celicah pa dobimo tudi močno pozitiven rezultat za protein, ki ima približno dvakrat večjo molekulsko maso, zato domnevamo, da je to dimer TPMT (slika 17).

Najbolj pozitiven rezultat za rekombinantni TPMT dobimo pri celicah TPMT*3C. Količina proteina je bistveno višja pri gojenju v Met in se precej zniža ob gojenju brez Met. To ustreza izmerjeni aktivnosti s HPLC s padcem aktivnosti TPMT*3C ob znižanju koncentracije SAM. Količina proteina je največja pri TPMT*3C, pri katerem je bilo tudi največje izražanje mRNA kar pomeni, da je količina TPMT odvisna od količine mRNA oz. od hitrosti prepisovanja gena za TPMT.

5 Razprava

5.1 Določanje vpliva SAM na aktivnost TPMT v hemolizatih zdravih preiskovancev

Merjenje SAM in TPMT smo izvedli na 364 hemolizatih zdravih preiskovancev. Med temi vzorci je bilo 56,6 % homozigotnih za divji tip, 42,5 % heterozigotnih in 0,9 % homozigotnih za mutiran alel. To ne ustreza splošni populaciji, kjer je 89 % homozigotnih za divji tip, 11 % heterozigotnih in 0,33 % mutiranih homozigotov (12), ker smo želeli zajeti čim širši razpon aktivnosti encima. Frekvenčna distribucija je imela trimodalno obliko, ki je pričakovana v kavkazijski populaciji (12).

Aktivnost TPMT je bila precej višja pri skupini homozigotnih za divji genotip kot pri heterozigotih ($36,28 \pm 9,54$ nmol/gHb/h proti $17,55 \pm 4,94$ nmol/gHb/h) in homozigotnih za mutiran genotip ($36,28 \pm 9,54$ nmol/gHb/h proti $2,25 \pm 0,26$ nmol/gHb/h). Tak rezultat je bil pričakovan, saj mutacija povzroči hitrejšo razgradnjo proteina (46).

Osnovna statistična analiza je pokazala, da se koncentracija SAM bistveno razlikuje med posamezniki homozigoti za divji genotip in heterozigotnimi posamezniki. Koncentracija SAM je bila višja pri heterozigotnih posameznikih ($18,06 \pm 9,46$ nmol/gHb proti $13,47 \pm 7,07$ nmol/gHb).

Raziskave *in vitro* na modelnih celičnih linijah so pokazale, da se v celicah s povečano aktivnostjo TPMT poveča tudi poraba SAM (51). Iz tega sledi, da je pri posameznikih homozigotnih za divji genotip, ki imajo višjo aktivnost TPMT koncentracija SAM nižja. Temu so naši rezultati tudi ustrezali.

Vzorci smo tudi razdelili glede na nizko in visoko koncentracijo SAM. Meja je bila eno standardno deviacijo pod povprečno koncentracijo SAM celotnega vzorca in primerjali smo jih glede na aktivnost TPMT. Primerjali smo posameznike homozigotne za divji tip med seboj, skupino heterozigotnih pa smo razdelili glede na mutacijo TPMT*3A in *3C. Pri homozigotih smo dobili statistično signifikantno razliko in sicer je bila pri skupini z visoko koncentracijo SAM tudi višja aktivnost TPMT. Pri heterozigotih pa razliki med skupinami nista bili signifikantni.

Heterozigotnih z mutacijo TPMT*3C je bilo samo 11 vzorcev in je bila zato skupina premajhna, da bi lahko videli razliko, če je obstajala. Pri mutaciji TPMT*3A je bila skupina precej večja, a je imelo nizko koncentracijo SAM samo 13 vzorcev proti 106 z visoko koncentracijo. Iz rezultatov homozigotov lahko sklepamo, da ima koncentracija SAM pozitiven vpliv na aktivnost TPMT. Vendar ima takšen način pomankljivost zaradi arbitrarno

postavljene meje, ki ne temelji na teoretičnih predpostavkah oziroma na predhodno določenih kriterijih.

Glavna omejitev genotipizacije kot metode za napovedovanje aktivnosti TPMT je slabša korelacija med genotipom in fenotipom. Pri naši raziskavi je bila korelacija med njima 96,12 %. Razlog za razhajanje bi bil lahko v tem, da smo genotipizirali le mutacije TPMT*3A, TPMT*3B in TPMT*3C. Vzorce, ki niso imeli te mutacije smo opredelili kot homozigote za divji tip alelov. Vendar odstaja še precej mutacij, ki so sicer v kavkazijski populaciji redke, najpogostejša je mutacija TPMT*2 z frekvenco 0,2-0,8 % (32). V raziskavi na estonski populaciji so identificirali dva posameznika z aleloma TPMT*9 in TPMT*12 slednji od njiju naj bi zmanjšal aktivnost TPMT na okoli 70 % divjega tipa (47). Z določitvijo celotnega zaporednja gena za TPMT bi najverjetneje pojasnili določena odstopanja med genotipom in fenotipom. Del variabilnosti lahko pripišemo tudi variacijam v VNTR promotorski regiji, katerih vpliv pa naj bi bil majhen (35).

Glavna ugotovitev je, da imajo posamezniki z genotipom *1/*1 in visoko aktivnostjo TPMT tudi višjo koncentracijo SAM v primerjavi s posamezniki z nizko aktivnostjo TPMT. To kaže, da povišana koncentracija SAM vpliva na povišanje aktivnosti TPMT. SAM verjetno uravnava aktivnost TPMT na posttranslacijskem nivoju, kar so posredno dokazali že na modelnih celičnih linijah (44) in neposredno pri študijah vpliva SAM na stabilnost proteinskega ogrodja TPMT (42). Višja koncentracija SAM omogoči vezavo več molekul SAM na TPMT in upočasni njegovo razgradnjo s povečano stabilizacijo strukture proteina.

5.2 Določanje vpliva SAM na prehodno transficirane celice

COS-7 celice smo transficirali s plazmidi, ki so vsebovali zaporedja za TPMT. Uporabili smo zaporedja za divji tip TPMT in njegove najpogostejše mutacije TPMT*2, TPMT*3A in TPMT*3C. Kot kontrolo smo uporabili plazmid brez zaporedja za TPMT. TPMT se je v celicah izražal na dva načina: kot endogeni protein, ki se izraža zaradi zaporednja TPMT na celičnem genomu in kot produkt zaporedja na transficiranem plazmidu.

Gojili smo jih v mediju z metioninom in mediju brez metionina. Ker je metionin prekurzor SAM, njegovo pomanjkanje zniža znotrajcelično koncentracijo SAM pri celicah gojenih brez metionina glede na celice gojene v metioninu. Z uporabo metod HPLC in western prenosa smo preverili, kakšen je vpliv koncentracije SAM na različne aloencime TPMT.

Z western prenosom smo določili kakšna je bila količina TPMT pri posameznih celicah. S to metodo smo ločili endogeni encim in in rekombinantni TPMT, ki je bil produkt plazmida. Pri celicah pcDNA smo tako videli le lisi, ki ustrezata endogenemu TPMT. Količine

rekombinantnega TPMT smo relativno primerjali med seboj glede na količino pri celicah TPMT*1 gojenimi prisotnosti metionina, kjer je bilo največ encima. Ob normalni koncentraciji SAM je bilo tako največ aloencima TPMT*1, sledil je TPMT*3C z 71 % količine TPMT*1 in nato TPMT*2 z 24 % in TPMT*3A z 11 %. Te razlike v količini lahko razložimo z spremembo strukture zaradi mutacije in s stabilizacijskim učinkom vezave SAM na encim (42). Mutacija TPMT*2 povzroči zamenjavo aminokislina v bližini aktivnega mesta in nastanek velikih strukturnih sprememb, zaradi česar je močno ovirana encimska reakcija, prav tako pa se pospeši proteasomska razgradnja (25, 26). Mutacija TPMT*3A povzroči zamenjavo dveh aminokislina ena od njiju je blizu vezavnega mesta za SAM (25, 27) in zato je afiniteta vezave SAM na encim manjša. Dvojna zamenjava povzroči tudi strukturne spremembe v encimu, ki dobi sploščeno obliko in je zato podvržen nastajanju agresomov in pospešeni proteasomski razgradnji (29). Ker je mutacija pri teh dveh aloencimih na vezavnem mestu SAM, je njegoa vezava verjetno minimalna in zato nima velikega vpliva na stabilizacijo strukture TPMT. Vse to je verjeten vzrok, da je količina pri TPMT*2 celicah in TPMT*3A celicah majhna.

Mutacija TPMT*3C je oddaljena od aktivnega mesta in vezavnega mesta za SAM. Mutacija povzroči spremembo v strukturi encima in pospešeno razgradnjo, ki pa je počasnejša kot pri mutacijah TPMT*2 in TPMT*3A. Strukturna sprememba je pri tej mutaciji najmanjša in se zgodi v heliksu $\alpha 8$, ki je oddaljen od aktivnega mesta. Zaradi tega je vezava SAM možna in prispeva k stabilizaciji, kar ohrani precejšen del količine v primerjavi z divjim aloencimom (26, 28). Pri primerjavi med celicami gojenimi v metioninu in brez metionina je bilo opaziti znižanje količine encima ob gojenju brez metionina. Razlika je bila največja pri TPMT*3C, velika tudi pri TPMT*1 medtem, ko je bila pri TPMT*2 majhna in pri TPMT*3A je bila količina celo malo višja. Te rezultate lahko razložimo z stabilizacijskim učinkom kosubstrata SAM na TPMT in upočasnitev razgradnje. Zaradi mutacij je pri TPMT*2 in TPMT*3A vezava SAM močno zmanjšana in SAM se ne veže na encim tudi, če ga je dovolj in zato ni stabilizacija encima veliko večja ob višji koncentraciji SAM. Pri mutacijah TPMT*2 in TPMT*3A je zato količina TPMT nizka že pri normalni koncentraciji SAM in se ob znižanju koncentracije ne spremeni veliko. Ker sprememba pri TPMT*2 ni na vezavnem mestu SAM, je verjetno njegoa vezava na ta aloencim malo boljše in je zato opazna sprememba v količini. Mutacija pri aloencimu TPMT*3C je najmanjša, nima vpliva na vezavno mesto za SAM in aloencim je strukturno najbolj podoben TPMT*1 (25). Zaradi tega je verjetno afiniteta vezave SAM na encim podobna kot pri TPMT*1. Z vezavo SAM se delno odpravi strukturna sprememba aloencima in aloencim postane bolj podoben TPMT*1 (29) in bi tako

imel tudi podobno hitrost razgradnje (25). Zaradi tega je ob višji koncentraciji SAM, v primerjavi z divjim aloencimom še vedno ohranjen precejšen delež encima. Ob pomanjkanju SAM pa količina TPMT*3C pade na podoben nivo kot TPMT*2 in TPMT*3A, čeprav je še vedno malo več. Če domnevamo, da vezava SAM na TPMT*3C povzroči konformacijsko spremembo, ki stabilizira strukturo proteina, bi se s pomanjkanjem SAM izgubil stabilizacijski učinek in posledica bi bila hitrejša razgradnja encima.

Z metodo HPLC smo tudi preverili kakšna je aktivnost encima v celicah. S to metodo smo merili produkt reakcije s TPMT: 6-MMP. SAM sodeluje pri reakciji kot kofaktor, ki donora metilno skupino, katero TPMT pripne na 6-MP in ga tako pretvori v 6-MMP. Kot rezultat dobimo celokupno aktivnost endogenega TPMT*1 in aloencima s plazmida. Pri gojenju z metioninom je imel najvišjo aktivnost aloencim TPMT*1/*1, sledil je aloencim TPMT*3C, aktivnost pa je bila najnižja pri aloencimih TPMT*2, TPMT*3A in pcDNA. Ob gojenju brez metionina smo opazili znižanje aktivnosti encima pri vseh celicah. To ustreza rezultatom pridobljenimi z western prenosom, kjer je bilo opaziti podobno sliko v količinah encima. Tako je pri celicah z zaporednjem TPMT*1 gojenimi brez metionina ohranjene 72 % aktivnosti v primerjavi z gojenjem v metioninu, pri TPMT*2 je 62 %, TPMT*3A 58 %, TPMT*3C 45 % in pri kontroli 68 %. Največji padec aktivnosti smo opazili v primeru aloencima TPMT*3C. To nakazuje, da ima SAM največji vpliv na aloencim TPMT*3C, pri katerem je ohranjeno njegovo vezavno mesto in možnost njegove vezave, s čimer se stabilizira struktura TPMT in upočasni razgradnja. Ob znižanju koncentracije SAM se zato zmanjša stabilizacija TPMT in posledica je velik padec aktivnosti. Pri TPMT*2 in TPMT*3A je aktivnost že pri normalni koncentraciji SAM precej manjša in je podobna kot pri pcDNA. To nakazuje, da je izmerjena aktivnost v teh dveh primerih predvsem aktivnost endogenega encima. Opazen padec aktivnosti je v zato največji meri verjetno posledica padca aktivnosti endogenega TPMT*1.

5.3 Določanje vpliva SAM na izražanje TPMT v stabilnih celičnih linijah

Rezultate dobljene na prehodno transficiranih celicah smo želeli potrditi še na stabilnih celičnih linijah. V prvi stopnji smo želeli ugotoviti, ali se vgrajeno zaporedje izraža. To smo preverili s RT-PCR, kjer smo izmerili količino prenašalne RNA, z vgrajenim zaporedjem TPMT. Med celičnimi linijami smo dobili velike razlike od linije TPMT*3C, ki je imela 242-kratno količino mRNA kot linija pcDNA do linije TPMT*2/3, ki je imela 0,6-kratno količino. Za linijo TPMT*2/3 tako nismo dobili pozitivnega rezultata in smo jo zato izločili iz nadaljnjih poskusov. Ostale celične linije smo gojili v mediju z Met in mediju brez Met in nato

določili aktivnosti TPMT s HPLC in količino TPMT z western prenosom. Aktivnost TPMT*1 je bila primerljiva z mutacijo TPMT*2 in kontrolno linijo pcDNA in ob znižani koncentraciji SAM ni bilo opaznega znižanja aktivnosti. Rezultate dobljene pri prehodno transficiranih celicah smo potrdili le pri TPMT*3C. Ob normalni koncentraciji SAM je bila aktivnost TPMT*3C precej višja kot pri pcDNA in ob znižani koncentraciji SAM je bil opazen padec aktivnosti encima. Po analizi imunoblota smo ugotovili, da imata le liniji TPMT*3C in TPMT*1/2 lise, ki ustrezajo rekombinantnemu TPMT in pri TPMT*3C je bilo opazno zmanjšanje količine encima ob znižani koncentraciji SAM. Pri vseh pa smo tudi opazili močne lise, ki ustrezajo proteinu s precej večjo molekulkso maso. Naša domneva je, da bi te lise lahko ustrezale dimerom TPMT. Encim v stabilnih celičnih linijah bi bil lahko podvržen neobičajnim posttranslacijskim spremembam in zaradi dimerizacije bi se izgubila aktivnost encima in to bi lahko bil eden od vzrokov za rezultate meritev s HPLC.

Pri TPMT*3C smo izmerili največjo količino mRNA in zaradi tega bi bil negativen rezultat pri ostalih aloencimih lahko tudi posledica prenizkega izražanja gena za TPMT. Razlog v nižjem izražanju gena za TPMT bi bil lahko v načinu priprave celičnih linij. Plazmidi so bili v celice vnešeni s pomočjo elektroporacije in nato selekcionirane z gojenjem v prisotnosti antibiotika, po določenem času pa smo gojenje v antibiotiku prekinili. Z elektroporacijo nismo mogli nadzorovati, koliko plazmida se bo dejansko vgradilo v celice. Možno je, da je potrebna za odpornost na antibiotik manjša količina plazmida, kot je potrebna za uspešno nastajanje TPMT in smo s selekcijo dobili celice z zelo majhno količino zaporedja za TPMT. Temu v prid je zelo nizko izražanje mRNA v celičnih linijah TPMT*2/1 in TPMT*2/3.

V naši raziskavi smo dokazali vpliv koncentracije SAM na aktivnost TPMT. Povišana koncentracija SAM poviša aktivnost TPMT in tako posredno vpliva tudi na terapijo s tiopurini. Ob višji koncentraciji SAM je tako inaktivacija tiopurinov večja in to ima za posledico zmanjšanje stranskih učinkov povezanih s koncentracijami toksičnih produktov tiopurinov (tiogvaninskih nukleotidov) in tudi zmanjšanje učinkovitosti terapije, za katero so odgovorni isti produkti tiopurinov (3). SAM bi zato lahko uporabili kot biološki označevalec pri individualizaciji terapije s tiopurini. Vendar koncentracija SAM, zaradi njegove široke vpletenosti v biološke procese in vpliva številnih faktorjev (38), ni najbolj primeren biološki označevalec. Večjo uporabo bi imelo določanje polimorfizmov v genih za encime, ki imajo vpliv na sintezo SAM. Te bi skupaj z genotipom TPMT in drugimi kliničnimi podatki (uporaba drugih zdravil) uporabili pri načrtovanju terapije s tiopurini in določitvi optimalnega odmerka za posameznika. Tak način bi zmanjšal pogostost stranskih učinkov in izboljšal učinkovitost zdravljenja, kar bi povečalo preživetje bolnikov z ALL.

6 Sklep

V tej diplomski smo določili aktivnost TPMT in koncentracijo SAM v hemolizatih zdravih preiskovancev in preverili vpliv znižane koncentracije SAM na izražanje najpogostejših aloencimov TPMT v COS-7 celicah. Metoda HPLC nam je omogočala določanje aktivnosti TPMT z kvantifikacijo 6-MMP in določanje koncentracije SAM. Dodatno nam je analiza western prenosa omogočila relativno primerjavo med količinami različnih aloencimov izraženimi v celicah.

S pomočjo statističnih metod smo v naši raziskavi dokazali pozitivno korelacijo med aktivnostjo TPMT in koncentracijo SAM v hemolizatih preiskovancev. Ob višji koncentraciji SAM so imeli vzorci tudi višjo aktivnost TPMT in obratno. Te rezultate so potrdili tudi podatki dobljeni na celicah. Ob znižanju koncentracije SAM je bil opazen padec aktivnosti vseh aloencimov TPMT. Razlika je bila največja pri aloencimu TPMT*3C, kar nakazuje, da ima SAM največji vpliv na ta aloencim. Z western prenosom smo dokazali, da se aktivnost TPMT ujema z njegovo količino. To nakazuje, da so razlike v aktivnosti med aloencimi posledica različne hitrosti razgradnje TPMT. Ker je ob večji koncentraciji SAM večja tudi količina encima to potrjuje pozitiven vpliv SAM na stabilizacijo proteinske strukture in upočasnitev razgradnje. Zaradi oddaljenosti mutacije TPMT*3C od vezavnega mesta SAM je vezava SAM pri tem aloencimu večja kot pri aloencimih TPMT*2 in TPMT*3A in posledica je večja stabilizacija TPMT*3C, ki se odraža v precej večji količini in aktivnosti encima in v večji spremembi ob znižanju koncentracije SAM, kakor je pri TPMT*2 in *3A.

Rezultati te raziskave nakazujejo na možnost uporabe SAM oz. polimorfizmov v genih, ki imajo vpliv na njegovo koncentracijo, kot potencialne nove biološke označevalce, ki bi skupaj s genotipom TPMT in kliničnimi podatki omogočili boljšo individualizacijo terapije s tiopurini. Tak pristop bi glede na dosedanji empirični način zdravljenja omogočil izboljšanje kvalitete zdravljenja in zmanjšal pogostost stranskih učinkov ter povečal preživetje bolnikov z ALL in jim izboljšal kvaliteto življenja.

7 Literatura

1. Cheok MH, Pottier N, Kager L, Evans WE: *Pharmacogenetics in Acute Lymphoblastic Leukemia*. Semin Hematol, 2009. **46** (1): 39–51
2. Weinshilboum R: *Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase*. The American Society for Pharmacol and Experimental Therapeutics DMD, 2001. **29**: 601–605
3. Stocco G, Martelossi S, Decorti G, Alessando V, Malusa N, Bartoli F, Giraldi T: *Pharmacogenetics of thiopurines: can posology be guided by laboratory data?* Radiol Oncol, 2004. **38** (2): 101-9
4. Elske van der Akeer-van M., Gurwitz D., Detmar SB, Enzing CM, Hopkins MM, Gutierrez de Mesa E, Ibarreta D: *Cost-effectivness of pharmacogenomics in clinical practic: a case study of thiopurine methyltransferase genotyping in acute lymphoblastic leukemia in Europe*. Pharmacogen, 2006. **7** (5): 783-792.
5. Higgs JE, Payne K, Roberts C, Newman WG: *Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications?* Pharmacoge, 2010. **11** (2): 177–188
6. Fotoohi AK, Sally A, Coulthard S, Albertioni F: *Thiopurines: Factors influencing toxicity and response*. Biochem Pharmacol, 2010. 1211–1220
7. Cara CJ, Pena AS, Sans M, Rodrigo L, Guerrero-Esteo M, Hinojosa J, García-Paredes J, Luis G, Guijarro LG: *Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: Towards a new paradigm in clinical practice*. Med Sci Monit, 2004. **10** (11): 247-254
8. Coulthard S, Hogarth L: *The thiopurines: An update*. Investigational New Drugs, 2005. **23**: 523–532
9. Haglund S, Taipalensuu J, Peterson C, Almer S: *IMPDH activity in thiopurine-treated patients with inflammatory bowel disease – relation to TPMT activity and metabolite concentrations*. Br J Pharmacol, 2008. **65** (1): 69-77
10. Lennard L, Hale JP, Lilleyman JS: *Red blood cell hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity measured using 6-mercaptopurine as a substrate: a population study in children with acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Clin Pharmacol, 1993. **36** (4): 277-284
11. Ansari A, Aslam Z, De Sica A, Smith M, Gilshenan K, Fairbanks L, Marinaki A, Sanderson J, Duley J: *Influence of xanthine oxidase on thiopurine metabolism in Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2008. **28** (6): 749-757
12. Zhou S: *Clinical Pharmacogenomics of Thiopurine S-methyltransferase*. Current Clin Pharmacol, 2006. **1**: 119-128

13. Tai HL, Krynetski EY, Yates CY, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, Evans WE: *Thiopurine S-Methyltransferase Deficiency: Two Nucleotide Transitions Define the Most Prevalent Mutant Allele Associated with Loss of Catalytic Activity in Caucasians*. Am J Hum Genet, 1996. **58**: 694-702
14. Wu H, Horton JR, Battaile K, Allali-Hassani A, Martin F, Zeng H, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Plotnikov AN, Cheng X: *Structural Basis of Allele Variation of Human Thiopurine-S-methyltransferase*. Proteins, 2007. **67** (1): 198-208.
15. RCSB Protein Data Bank. *Amino-terminal Truncated Thiopurine S-Methyltransferase Complexed with S-Adenosyl-L-Homocysteine* Citirano 15.3.2011; Dostopno: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2h11>
16. Wang L, Weinshilboum R: *Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions*. Oncogene, 2006. **25**: 1629–1638
17. Jang IJ, Shin SG, Lee KH: *Erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a Korean population*. Br J Clin Pharmacol, 1996. **42**: 638-641.
18. Indjova D, Atanasova S, Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M, Svinarov D. *Phenotypic and genotypic analysis of thiopurine smethyltransferase polymorphism in the bulgarian population*. Ther Drug Monit, 2003. **25**: 631-636.
19. Park-Hah JO, Klemetsdal B, Lysaa R, Choi KH, Aarbakke J: *Thiopurine methyltransferase activity in a Korean population sample of children*. Clin Pharmacol Ther, 1996. **60**: 68-74.
20. Oselin K, Anier K: *Inhibition of Human Thiopurine S-Methyltransferase by Various Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Vitro: A Mechanism for Possible Drug Interactions*. Drug Metab Dispos, 2007. **35** (9): 1452-1454
21. Xin HW, Fischer C, Schwab M, Klotz U: *Thiopurine S -methyltransferase as a target for drug interactions*. Eur J Clin Pharmacol, 2005. **61** (5-6): 395-398
22. Garat A, Cauffiez C, Renault N, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, Houdret N, Chavatte P, Lorient MA, Gala JL, Broly F: *Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants*. Biochem Pharmacol, 2008. **76** (3): 404-415
23. Scheuermann TH, Lolis E, Hodsdon ME: *Tertiary Structure of Thiopurine Methyltransferase from Pseudomonas syringae, a Bacterial Orthologue of a Polymorphic, Drug-metabolizing Enzyme*. J Mol Biol, 2003. **333**: 573-585
24. Serpe L, Calvo PL, Muntoni E, D'Antico S, Giaccone M, Avagnina A, Baldi M, Barbera C, Curti F, Pera A, Eandi M, Zara GP, Canaparo R: *Thiopurine-S-methyltransferase pharmacogenetics in a large scale Italian-Caucasian population: difference in enzyme activity*. Pharmacogen, 2009. **10** (11): 1753-1765

25. Rutherford K, Daggett V: *Four Human Thiopurine S-Methyltransferase Alleles Severely Affect Protein Structure and Dynamics*. J Mol Biol, 2008. **379** (4): 803–814.
26. Roberts RL, Gearry RB, Bland MV, Sies CW, George PM, Burt M, Marinaki AM, Arenas M, Barclay ML, Kennedy MA: *Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra high enzyme activity*. Pharmacogenet Genomics, 2008. **18** (5): 434-438
27. Wang L, Nguyen TV, McLaughlin RW, Sikkink LA, Ramirez-Alvarado M, Weinshilboum R: *Human thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: Variant allozyme misfolding and aggregates formation*. The National Academy of Sciences, 2005. 9394-9399
28. Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE: *Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity*. Proc Natl Acad Sci, 1997. **94**: 6444-6449
29. Scheuermann TH, Keeler C, Hodsdon ME: *Consequences of Binding an S-Adenosylmethionine Analogue on the Structure and Dynamics of the Thiopurine Methyltransferase Protein Backbone*. Biochem, 2004. **43** (38): 12198-12209
30. Teml A, Schaeffeler E, Schwab M: *Pretreatment determination of TPMT – state of the art in clinical practice*. Eur J Clin Pharmacol, 2009. **65** (3): 219–221
31. Marsh S, Van Booven DJ: *The Increasing Complexity of Mercaptopurine Pharmacogenomics*. Clinical Pharmacol Ther, 2009. **85** (2): 139-141
32. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M: *Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants*. Pharmacogen, 2004. **14** (7): 407-417
33. Karas-Kuzelicki N, Mlinaric-Rascan I: *Individualization of thiopurine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond*. Pharmacogen, 2009. **10** (8): 1309-1322
34. Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, Bruneau B, Pineau A, Fenneteau O, Bourin M, Jacqz-Aigrain E: *Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age*. Eur J Clin Pharmacol, 2004. **60** (2): 89–96
35. Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, Lo Guidice JM, Chevalier D, Brique S, Motte K, Colombel JF, Turck D, Noel C, Flipo RM, Pol A, Lhermitte M, Lafitte JJ, Libersa C, Broly F: *Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population*. Br J of Pharmacol, 1998. **125** (4): 879-887
36. Lennard L, Chew TS, Lilleyman JS: *Human thiopurine S-methyltransferase activity varies with red blood cell age*. Br J Clin Pharmacol, 2001. **52** (5): 539-546

37. Sahasranaman S, Howard D, Roy S: *Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines*. Eur J Clin Pharmacol, 2008. **64** (8): 753-767
38. Bottiglieri T: *S-Adenosyl-L-methionine (SAME): from the bench to the bedside-molecular basis of a pleiotropic molecule*. Am J Clin Nutr, 2002. **76**: 1151-1157.
39. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP: *S-adenosylmethionine and methylation*. Fabes J, 1996. **10** (4): 471-480
40. Wang W, Kramer PM, Yang S, Pereira MA, Tao L: *Reversed-phase high-performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and the effect of methionine on their concentrations*. J of Chromatograp B, 2009. **762**: 59–65
41. Martinov MV, Vitvitsky VM, Banerjee R, Ataulakhanov FI: *The logic of the hepatic methionine metabolic cycle*. Biochimica et Biophysica Acta, 2010. **1804**: 89–96
42. Scheuermann TH, Keeler C, Hodsdon ME: *Consequences of Binding an S-Adenosylmethionine Analogue on the Structure and Dynamics of the Thiopurine Methyltransferase Protein Backbone*. Biochemistry, 2004. **43** (38): 12198-12209
43. Stet EH, De Abreu RA, Bokkerink JP, Blom HJ, Lambooy LH, Vogels-Mentink TM, de Graaf-Hess AC, van Raay-Selten B, Trijbels FJ: *Decrease in S-adenosylmethionine synthesis by 6-mercaptopurine and methylmercaptopurine ribonucleoside in Molt F4 human malignant lymphoblasts*. Biochem J, 1994. **304** (Pt.1): 163-168
44. Milek M, Kuzelički NK, Šmid A, Mlinarič-Raščan I: *S-adenosylmethionine regulates thiopurine methyltransferase activity and decreases 6-mercaptopurine cytotoxicity in MOLT lymphoblasts*. Biochem Pharmacol, 2009. **77** (12): 1854-1853
45. Curtin K, Bigler J, Slattery ML: *MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms : Diet, Estrogen, and Risk of Colon Cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004. **13**: 285-292
46. Li F, Wang L, Burgess RJ, Weinshilboum RM: *Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: autophagy as a mechanism for variant allozyme degradation*. Pharmacogenet Genomics, 2008. **18** (12): 1083-1094
47. Tamm R, Oselin K, Kallassalu K, Magi R, Anier K, Remm M, Metspalu A: *Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) pharmacogenetics: three new mutations and haplotype analysis in the Estonian population*. Clin Chem Lab Med, 2008. **46** (7): 974-979
48. Keizer-Garritsen JJ, Brouwer C, Lambooy LH, Ter Riet P, Bokkerink JP, Trijbels FJ, De Abreu RA: *Measurement of thiopurine S-methyltransferase activity in human blood samples based on high-performance liquid chromatography: reference values in erythrocytes from children*. Ann Clin Biochem, 2003. **40** (Pt 1): 86-93

49. Lorbek G.: *Ugotavljanje vpliva S-adenozilmetinina na aktivnost tiopurin-S-metiltransferaze v eritrocitih zdravih preiskovancev*. Diplomski naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010.
50. Žager U: *Farmakogenetska analiza polimorfizma 677 C>T v genu za 5,10-metilentetrahidrofolatno reduktazo pri otrocih z akutno limfoblastno levkemijo*. Diplomski naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
51. Milek M: *Farmakogenetika tiopurin-S-metiltransferaze*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, 2008.

8 Kazalo preglednic

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Priprava reagentov za HPLC..... | 17 |
| Tabela 2: Gradient mobilnih faz pri merjenju koncentracije SAM..... | 20 |
| Tabela 3: Plazmidi za transfekcijo | 23 |
| Tabela 4: Plazmidi dodani posameznim celicam | 23 |
| Tabela 5: Priprava standardov beta-galaktozidaze..... | 24 |
| Tabela 6: Priprava gelov za elektroforezo..... | 25 |
| Tabela 8: Pogoji reverzne transkripcije..... | 27 |
| Tabela 9: Priprava mixov za RT-PCR..... | 27 |
| Tabela 10: Redčitve za umeritveno krivuljo RT-PCR | 28 |
| Tabela 12: RT-PCR pogoji..... | 28 |
| Tabela 13: Vrednosti aktivnosti TPMT in koncentracij SAM (povprečna vrednost in SD) glede na genotip | 29 |

9 Kazalo slik

| | |
|---|----|
| Slika 1: Strukturna podobnost ZU in endogenih baz | 2 |
| Slika 2: Presnova tiopurinov | 3 |
| Slika 3: Struktura humanega TPMT | 5 |
| Slika 4: Shema človeškega TPMT gena in štirih njegovih najpogostejših alelov | 6 |
| Slika 5: Vpliv genetskih polimorfozmov na zdravljenje s tiopurini | 9 |
| Slika 6: Struktura SAM | 10 |
| Slika 7: Presnova S-adenozilmetionina | 11 |
| Slika 8: Histograma frekvenčne porazdelitve aktivnosti TPMT in logTPMT glede na genotip | 30 |
| Slika 9: Histogram frekvenčne porazdelitve koncentracije SAM in logSAM glede na genotip | 30 |
| Slika 10: Aktivnost TPMT glede na genotip | 31 |
| Slika 11: Aktivnost β -galaktozidaze v prehodno transfeciranih COS-7 celicah | 33 |
| Slika 12: Western prenos prehodno transfeciranih celic gojenih v metioninu oziroma brez metionina | 34 |
| Slika 13: Količina rekombinantnega TPMT v prehodno transfeciranih celicah | 35 |
| Slika 14: Normalizirana aktivnost TPMT v prehodno transfeciranih celicah | 36 |
| Slika 15: Količina mRNA v stabilnih celičnih linijah | 37 |
| Slika 16: Aktivnost TPMT pri stabilnih celičnih linijah izmerjena s HPLC | 39 |
| Slika 17: Western prenos stabilnih celičnih linij | 40 |