

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJA LONČAR

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJA LONČAR

**MOLEKULARNO GENETSKA ANALIZA GENA *KCNH2* PRI BOLNIKI S
SINDROMOM PODALJŠANE DOBE QT**

**MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF *KCNH2* GENE IN PATIENTS WITH
LONG QT SYNDROME**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Pediatrični kliniki v Službi za specialno laboratorijsko diagnostiko (Laboratorij za genetiko) pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Maruše Debeljak, univ. dipl. biol.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Barbari Ostanek, mag. farm. in somentorici asist. dr. Maruši Debeljak, univ. dipl. biol. za strokovno pomoč, nasvete in pregled magistrske naloge.

Zahvalila bi se tudi vsem zaposlenim Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko (Laboratorij za genetiko) na Pediatrični kliniki, ki so mi ves čas prijazno pomagali in mi dajali praktične nasvete.

Hvala tudi vsem mojim najbližjim, ki so me vzpodbujali in podpirali tekom ustvarjanja magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Maruše Debeljak, univ. dipl. biol.

Ljubljana, november 2014

Tadeja Lončar

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Član komisije: doc. dr. Tomaž Vovk

Kazalo vsebine

Povzetek	I
Abstract.....	II
Seznam okrajšav	III
1. Uvod	1
1.1 Srce	1
1.1.1. Zgradba.....	1
1.1.2 Električna aktivnost srca.....	2
1.1.3 Elektrokardiogram (EKG)	4
1.2 Sindrom podaljšane dobe QT (LQTS).....	6
1.2.1 Genetske osnove	6
1.2.2 Dejavniki tveganja za nastanek srčnih incidentov.....	7
1.2.3 Zdravljenje.....	8
1.3 Gen <i>KCNH2</i>	9
1.3.1 Protein HERG.....	10
1.3.2 Spremembe nukleotidnega zaporedja gena <i>KCNH2</i>	11
1.3.3 Vpliv sprememb nukleotidnega zaporedja na HERG.....	12
1.4 Diagnostika LQTS.....	13
1.4.1 Genetsko testiranje	14
2. Namen dela	16
3. Materiali in metode.....	17
3.1 Splošna navodila.....	17
3.2 Priprava vzorcev	17
3.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	18
3.3.1 Reagenti	19
3.3.2 Instrumenti in oprema.....	20

3.3.3 Potek dela	20
3.4 Preverjanje dolžine pomnoženih odsekov z agarozno elektroforezo	27
3.4.1 Reagenti	27
3.4.2 Instrumenti in oprema.....	27
3.4.3 Priprava 2 % agaroznega gela	28
3.4.4 Izvedba elektroforeze	28
3.5 Visokoločljivostna talilna analiza (HRM).....	29
3.5.1 Reagenti	31
3.5.2 Instrumenti in oprema.....	31
3.5.3 Potek dela	31
3.5.4 Analiza rezultatov HRM.....	33
3.6 Sekvenciranje po Sangerju	35
3.6.1 Priprava sekvenčne reakcije	35
3.6.2 Precipitacija produktov sekvenčne reakcije	36
3.6.3 Analiza odsekov na genetskem analizatorju ABI 3500.....	37
3.7 Interpretacija rezultatov sekvenciranja in izvid.....	37
4. Rezultati in razprava.....	38
4.1 Priprava vzorcev	38
4.2 Verižna reakcija s polimerazo	39
4.2.1 Oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov.....	39
4.2.2 Optimizacija pogojev PCR.....	40
4.3 Preverjanje uspešnosti pomnoževanja z agarozno elektroforezo	43
4.4 Rezultati analize HRM	44
4.4.1 Optimizacija pogojev metode HRM.....	44
4.4.2 Analiza talilnih krivulj.....	45
4.5 Rezultati sekvenciranja po Sangerju	47
4.5.1 Sekvenčna reakcija	47

4.5.2 Analiza odsekov na genetskem analizatorju ABI 3500.....	47
4.6 Interpretacija rezultatov (elektroferogramov)	48
4.6.1 p.Arg148Gln.....	48
4.6.2 p.Arg176Trp	49
4.6.3. p.Arg328Cys.....	50
4.6.4 p.Ala430fs	51
4.6.5 p.Ile489=.....	52
4.6.6 p.Phe513=	52
4.6.7 p.Ile521=.....	52
4.6.8 p.Leu564=	53
4.6.9 p.Tyr652=	53
4.6.10 p.Lys897Thr	53
4.6.11 p.Arg1047Leu.....	54
5. Sklep	56
6. Literatura	57

Povzetek

Sindrom podaljšane dobe QT je genetska bolezen, za katero je značilna okvara ionskih kanalčkov srčnih celic, ki so odgovorni za uravnavanje trajanja srčnega akcijskega potenciala. Bolniki s to boleznijo imajo zapoznelo repolarizacijo prekatnih srčnih celic, ki se klinično kaže kot podaljšana doba QTc, ki predstavlja dobo QT standardizirano na srčno frekvenco. Prisotne so lahko hude posledice, kot je srčna odpoved ali celo srčna smrt. Zapis za alfa podenoto hitrega napetostnega kalijevega kanala v miocitih nosi gen *KCNH2*, ki je eden izmed treh najpogostejše okvarjenih genov, ki povzročajo sindrom podaljšane dobe QT.

Namen magistrske naloge je bil vpeljati genetsko preiskavo gena *KCNH2* pri bolnikih s sindromom podaljšane dobe QT v klinično prakso. Najprej smo postavili metodo za sekvenciranje, tako da smo oblikovali oligonukleotidne začetnike ter optimizirali pogoje pomnoževanja z metodo verižne reakcije s polimerazo za vseh 16 eksonov gena. Za vpeljano optimizirano genetsko preiskavo smo napisali standardni operativni postopek, ki ga bodo uporabljali v kliničnem laboratoriju.

Z vpeljano metodo smo izvedli molekularno genetsko analizo vseh eksonov in pripadajočih eksonsko-intronskih regij gena *KCNH2* na vzorcih 43 bolnikov. Potrdili smo 11 različnih sprememb nukleotidnega zaporedja, od katerih 2 dosedaj še nista bili opisani. Opredelili smo klinični pomen vseh odkritih nukleotidnih sprememb ter bolnikom napisali izvide. Pri 4 bolnikih smo lahko z odkrito nukleotidno spremembo potrdili klinično sliko LQTS2.

V raziskovalni namen smo poizkusili optimizirati metodo visokoločljivostne talilne analize kot presejalne metode, ki bi predstavljala predstopnjo sekvenciranja. S to metodo smo uspešno pomnožili le 6 eksonov.

Ključne besede: *KCNH2*; sindrom podaljšane dobe QT; genetska analiza

Abstract

Long QT syndrome is a genetic disorder characterised by the dysfunction of ion channels which are responsible for the regulation of the cardiac action potential duration. Patients with such condition experience late repolarization of ventricular myocytes which is shown by prolonged QTc period. QTc is QT period standardized to a heart frequency. The disorder can manifest with serious outcomes such as sudden heart failure or even death. *KCNH2* gene encoding the α subunit of fast potassium current channel represents one of the three most commonly mutated genes causing long QT syndrome.

The aim of our work was to implement the genetic analysis of *KCNH2* gene into clinical practise. To develop the method for DNA sequencing oligonucleotide primers were designed and, the amplification of all 16 exons with polymerase chain reaction was optimised. Standard operational procedure for the clinical laboratory was written for the developed method. The method was subsequently used for the analysis of all exons and exon-intron regions of *KCNH2* gene in 43 patients. Eleven nucleotide sequence variations were detected and two of them have not been described yet. We described clinical significance of all discovered nucleotide sequence variations and patients were also given our findings. With the discovered nucleotide changes we were able to confirm clinical picture of LQTS2 in four patients.

We tried to optimize high resolution melting analysis as a screening method that would be used to preselect samples for DNA sequencing. However, only 6 exons could be successfully amplified .

Key words: *KCNH2*; long QT syndrome; genetic analysis

Seznam okrajšav

A	adenin
bp	bazni par
C	citozin
ddNTP	dideoksiribonukleotid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EKG	elektrokardiogram
G	gvanin
HERG	okr. angl. human ether-a-go-go-related gene; protein gena <i>KCNH2</i>
HRM	visokoločljivostna talilna analiza
KCNH2	okr. angl. potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2; gen, ki nosi zapis za alfa podenoto hitrega napetostnega kalijevega kanala
LQT	podaljšana doba QT
LQTS	sindrom podaljšane dobe QT
LQTS1	sindrom podaljšane dobe QT z mutacijo v genu <i>KCNQ1</i>
LQTS2	sindrom podaljšane dobe QT z mutacijo v genu <i>KCNH2</i>
LQTS3	sindrom podaljšane dobe QT z mutacijo v genu <i>SCN5A</i>
PCA	metoda glavnih komponent
PCR	verižna reakcija s polimerazo
QTc	doba QT standardizirana na srčno frekvenco
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov
T	timin
T_m	temperatura tališča

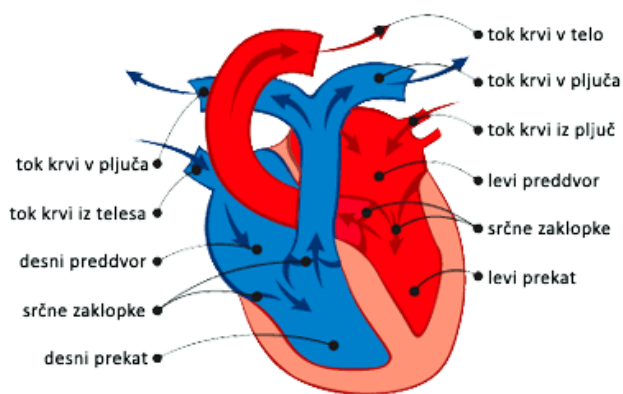
1. Uvod

1.1 Srce

Srce je mišična črpalka, ki ustvarja tlačno razliko za tok krvi po žilah. Kri poganja po žilah tako, da se votline srca izmenično krčijo in raztezajo. Kri je transportni medij, ki zagotavlja stalen dotok hranilnih snovi in kisika ter odstranjuje odpadne snovi iz celic ter tako zagotavlja njihov obstoj (1).

1.1.1. Zgradba

Srce je zgrajeno iz dveh preddvorov (atrijev) in dveh prekatov (ventriklov). Med vsakim preddvorom in prekatom ter med prekatom in veliko arterijo (bodisi pljučnim deblom ali aorto) je zaklopka (skupaj so torej 4 zaklopke), ki preprečuje vzvratni tok krvi, kar vidimo na sliki 1. Srčna mišica spada med prečno-progaste mišice. Podlaga za mehanično dejavnost srca je njegova avtonomna električna aktivnost. Električno vzdraženje namreč povzroči krčenje mišične celice. Sosednje srčno-mišične celice se stikajo s presledkovnimi stiki, ki zagotavljajo nemoteno električno povezavo med njimi in prenos akcijskih potencialov (1).



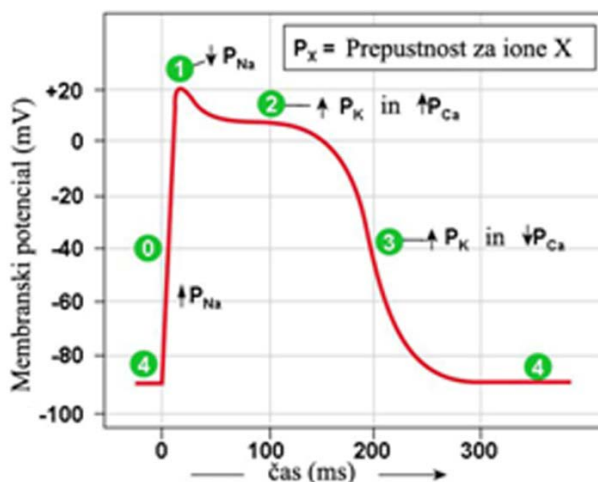
Slika 1: Zgradba srca (2).

1.1.2 Električna aktivnost srca

Električna aktivnost srca je pogoj, da srce lahko črpa kri, saj dražljaj sproži akcijski potencial in prične kontrakcijo srčnomišičnih vlaken. Prevodni sistem srca sestavljajo skupki specializiranih celic v steni srčnih votlin (sinoatrialni in atrioventrikularni vozeli) in posebne povezave med njimi in mišičnimi celicami v steni prekatov. Za normalen srčni ritem skrbi sinoatrialni vozeli, ki ritmično proži akcijske potenciale. Posebnost teh celic je, da njihov membranski potencial ne miruje, temveč ves čas spontano valuje tako, da se v njih ritmično prožijo akcijski potenciali vsakič, ko depolarizacija doseže prag. Za spontano električno aktivnost so odgovorne prevodne lastnosti njihove membrane. Urejeno hitro širjenje akcijskega potenciala po vlaknih prevodnega sistema in skozi srčno mišico povzroči krčenje mišičnih celic preddvorov in prekatov v naslednjem vrstnem redu: depolarizacija preddvorov povzroči njihovo skrčenje, temu pa sledita depolarizacija in skrčenje prekatov (1).

1.1.2.1 Akcijski potencial

Vzrok za pojav akcijskega potenciala je sprememba prepustnosti membrane za posamezne ione. Dražljaj povzroči odpiranje in zapiranje ustreznih ionskih kanalčkov, kar omogoči pretok ionov in spremembo membranskega potenciala. V stanju mirovanja se prek celične membrane vzdržuje mirovni membranski potencial. V tem stanju je razlika v električni napetosti med zunanjo in notranjo stranjo celične membrane -90 mV . Notranja površina celične membrane je elektronegativna glede na zunanjo površino in to pomeni, da je membrana polarizirana. V celici je višja koncentracija K^+ , zunaj celice pa je višja koncentracija Na^+ in Cl^- . Membrana je v stanju mirovanja najbolj prepustna za K^+ (3).



Slika 2: Akcijski potencial kontraktilne srčne celice (4).

Faza 0: Na^+ kanali odprti

Faza 1: Na^+ kanali zaprti

Faza 2: Ca^{2+} kanali odprti; počasni K^+ kanali odprti

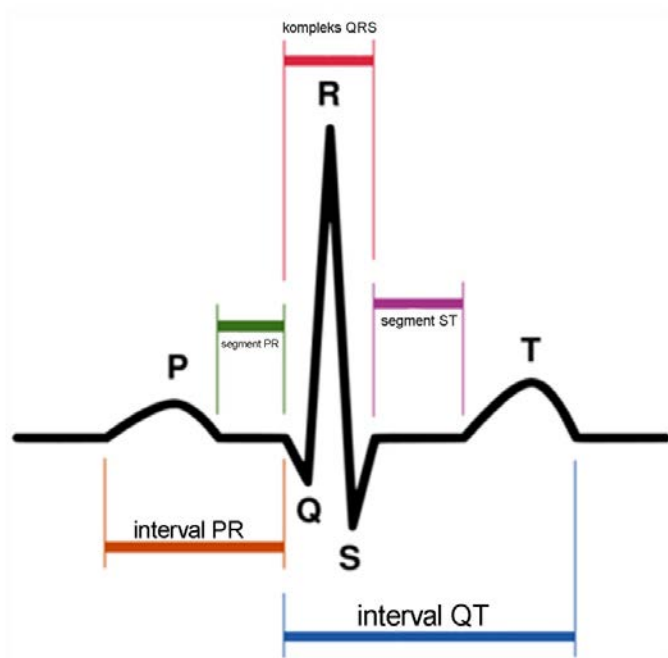
Faza 3: Ca^{2+} kanali zaprti; vsi tipi K^+ kanalov odprti

Faza 4: Mirovni potencial

Na sliki 2 je prikazano spreminjanje membranskega potenciala v odvisnosti od časa. Na grafu so označene faze akcijskega potenciala (od 0 do 4), ki prikazujejo odprto oz. zaprto stanje različnih kanalov in s tem tudi različno prepustnost za posamezne ione. Ko se membrana depolarizira do določene prazne vrednosti, se sproži akcijski potencial. Prevodnost membrane se močno poveča za Na^+ , ki potem prehaja v celico. Napetostna razlika se spremeni in notranjost postane bolj pozitivna kot zunanost. Potem v celico prehaja Ca^{2+} in celica se začne krčiti. Nazadnje iz celice izhaja K^+ (1, 3). Sodelujejo 3 različne skupine kalijevih kanalov in sicer K_1 , K_S in K_R (ali HERG). V fazi 2 je odprt samo K_S , v fazi 3 pa so odprti vsi 3 tipi kalijevih kanalov in se zato v tej fazi prepustnost za K^+ močno poveča (5). Akcijski potencial se začne z hitro depolarizacijo, ki ima vrh pri +20 mV (faza 0), nadaljuje se s hitro, delno repolarizacijo (faza 1), ki ji sledi podaljšano obdobje počasne repolarizacije (faza 2 ali faza platoja), konča pa se s hitro fazo repolarizacije (faza 3). Akcijski potencial potuje vzdolž membrane, ker sprememba napetosti ob akcijskem potencialu povzroči depolarizacijo sosednjih delov membrane. Potuje samo v eno smer, ker membrana po akcijskem potencialu postane prehodno neobčutljiva ali refraktarna, zato ker se Na^+ kanalčki začasno inaktivirajo (1, 6, 3).

1.1.3 Elektrokardiogram (EKG)

Ker se akcijski potencial, kot val depolarizacije, prevaja iz enega predela srca v drugega, nastajajo napetostne razlike med posameznimi predeli v srcu, ki jih lahko zaznamo na površini telesa z elektrokardiografom. Elektrokardiograf je sestavljen iz snemalnih elektrod, pretvornika, ojačevalnika in pisalnega mehanizma. Snemalne elektrode namestimo na standardna mesta na površini telesa, saj je oblika zapisa odvisna od tega, kam postavimo elektrode. Tako lahko dogodke v srcu vedno opazujemo na enak način in zapise med seboj primerjamo. Časovni zapis napetostnih razlik v srcu imenujemo elektrokardiogram (EKG). EKG ima velik pomen za ugotavljanje sprememb v delovanju srca, ki se izražajo v njegovi električni aktivnosti. Opazujemo lahko frekvenco bitja srca, ritmičnost utripa, zadebelitev miokarda in spremembe prevajanja ob propadu dela miokarda zaradi srčnega infarkta (1, 3). Na EKG-ju vidimo različne vrste odklonov, ki jih prikazuje slika 3.

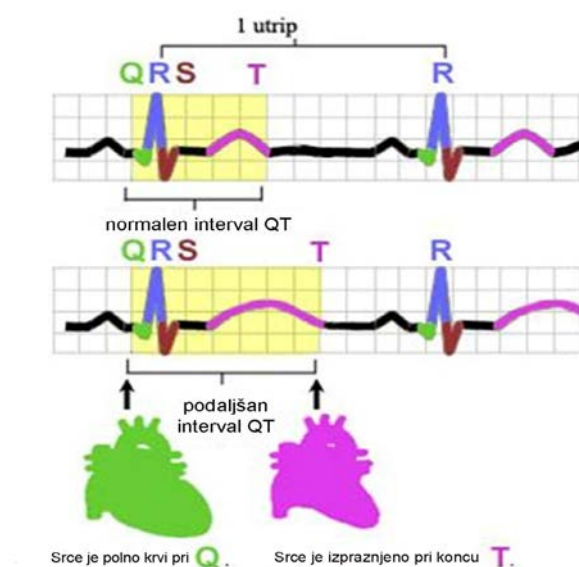


Slika 3: Zapis električne aktivnosti srca – EKG (8).

- val P: depolarizacija preddvorov
- segment PR: izoelektrično področje; prevajanje od atrioventrikularnega vozla do mišičnih celic v steni prekatov
- interval PR: čas med začetkom aktivacije preddvorov in začetkom aktivacije prekatov; traja med 0,12 in 0,2 s

- kompleks QRS: depolarizacija prekatov, ki prekriva repolarizacijo preddvorov (zato tega odklona ne vidimo); običajno traja med 0,06 in 0,1 s; abnormalno podaljšanje trajanja kompleksa QRS nakazuje blokado v normalnem prevajanju po prekatih
- segment ST: izoelektrično področje; trenutek popolne depolarizacije prekatov
- val T: repolarizacija prekatov, faza obnovitve mirovnega membranskega potenciala
- **interval QT**: imenujemo ga tudi obdobje električne sistole prekatov; prikazuje trajanje akcijskega potenciala v prekatnih miokardnih celicah; traja približno 0,4 s, spreminja pa se inverzno s srčno frekvenco (1, 7)

Utripanje srca je posledica električnega vzdraženja, ki ga nadzoruje prevodni sistem srca. Pri utripanju srca ločimo fazo krčenja (sistola) in fazo raztezanja (diastola). V fazi sistole srce iztiska kri v obtok, pri tem se skrčita prekata, desni prekat črpa kri v pljučni krvni obtok, levi pa v sistemski krvni obtok. V fazi diastole se srce napolni s krvjo, pri tem se prekata sprostita, skrčita se preddvora, ki črpata kri v prekata. Sistola je normalno krajša od diastole. Če to dogajanje povežemo z EKG-jem, lahko na sliki 4 vidimo, da je srce najbolj polno krvi pri Q, torej ob koncu diastole, izrazni pa se pri koncu T-vala, torej pri koncu sistole (1).



Slika 4: Na prvem EKG-ju je prikazan normalen interval QT, na drugem EKG-ju pa je prikazan podaljšan interval QT, poleg tega pa je na EKG-ju prikazano še, kdaj je srce polno krvi in kdaj je izpraznjeno (9).

1.2 Sindrom podaljšane dobe QT (LQTS)

Prirojeni sindrom podaljšane dobe QT (LQTS) je genetska bolezen, ki okvari delovanje ionskih kanalčkov srčnih celic, ki so odgovorni za regulacijo trajanja srčnega (prekatnega) akcijskega potenciala, zato ga uvrščamo med prirojene srčne kanalopatije. Glavna značilnost te bolezni je zapoznena repolarizacija srčnih celic, ki se kaže kot podaljšanje dobe QT standardizirane na srčno frekvenco (dobe QTc) v strukturno normalnem srcu (10). Poleg s podaljšano dobo QTc, se lahko izrazi še:

- z nenormalnimi T-valovi
- s povečanim tveganjem za sinkopo (začasna izguba zavesti) in nenadno srčno smrt
- z značilno aritmijo (polimorfno ventrikularno tahikardijo s *torsades de pointes* (TdP) morfologijo, ki ima komplekse QRS s konicami obrnjenimi v različne smeri, nepravilnih oblik, frekvenca je od 100 do 180 utripov na minuto) (8, 9).

LQTS ima zelo heterogeno penetranco, zaradi česar je možno, da se kljub okvarjenemu genu bolezenski fenotip ne pojavi. Tako so lahko nekateri vse življenje brez simptomov, druga skrajnost pa je nenadna smrt v otroštvu (13). Bolezen se vedno ne izrazi klinično, zaradi vpliva drugih genov in dejavnikov iz okolja (14). LQTS je glavni vzrok za nenadno srčno smrt pri mladih (13). V Združenih državah Amerike je zaradi LQTS 3000 do 4000 nenadnih srčnih smrti pri mladih na leto (15). LQTS lahko pripišemo več kot 20 % na obdukciji negativnih oz. nepojasnenih smrti in 10 % nenadnih smrti novorojencev (12, 13). Pri kavkazijcih oz. belcih je incidenca genetsko dokazljive LQTS 1:2500, kar dokazuje, da bolezen ni tako redka (18). Najverjetneje je incidenca še višja, saj je kar 10 do 35 % bolnikov tako imenovanih nemih nosilcev z normalnim intervalom QTc, poleg tega pa še vedno za 15 do 20 % primerov bolezni ne poznamo mutacij (13,19).

Obstaja tudi z zdravili povzročen LQTS, ki je samo iatrogen odgovor na zdravilo in posnema prirojeno LQTS. Mutacijo v enem izmed genov, značilnih za prirojeno LQTS, ima manj kot 10 % takih pacientov (20).

1.2.1 Genetske osnove

Trenutno je znanih 13 genov, povezanih z LQTS. 75 % primerov LQTS je posledica mutacij v enem od naslednjih genov:

- *KCNQ1* (sindrom podaljšane dobe QT z mutacijo v genu *KCNQ1* (LQTS1), 30 % - 35 %)
- *KCNH2* (sindrom podaljšane dobe QT z mutacijo v genu *KCNH2* (LQTS2), 25 % - 40 %)
- *SCN5A* (sindrom podaljšane dobe QT z mutacijo v genu *SCN5A* (LQTS3), 5 % - 10 %).

Ti geni kodirajo ionske kanale v prekatnih srčnih celicah, ki sodelujejo pri akcijskem potencialu. Manj kot 5 % primerov LQTS pa povzročajo mutacije v ostalih 10 genih, ki kodirajo ostale srčne kanale, s kanali povezane proteine ali membranske proteine, ki sodelujejo pri delovanju kanalov (13).

Vse oblike LQTS se dedujejo avtosomno dominantno, LQTS1 in LQTS5 (sindrom podaljšane dobe QT z mutacijo v genu *KCNE1*) pa se lahko dedujeta tudi avtosomno recesivno. Prva sta to obliko opisala Jervell in Lange-Nielsen, zato ta sindrom imenujemo po njiju. Za Jervell in Lange-Nielsen sindrom je značilna huda oblika srčnega fenotipa ter senzorična izguba sluha (18).

Če se bolezen deduje avtosomno dominantno, je za izražanje bolezni dovolj že prisotnost enega mutiranega alela. Večinoma so prisotne točkaste mutacije (zamenjava 1 nukleotida) ali pa majhne insercije oz. delecije. Odkrili pa so tudi velike genske preureditve kot so delecije oz. duplikacije celih eksonov, ki lahko vključujejo 100 do 1000 nukleotidov (22, 23).

1.2.2 Dejavniki tveganja za nastanek srčnih incidentov

Tveganje za nastanek srčnih incidentov (sinkopa, srčni zastoj in nenadna srčna smrt) pri nezdruženih bolnikih se lahko oceni na podlagi genotipa, spola, starosti in dolžine QTc. Kar se tiče starosti, se pri moških LQTS bolj verjetno izrazi pred puberteto, pri ženskah pa po puberteti (24). Paciente LQTS lahko po stopnji tveganja razdelimo v 3 skupine:

- Visoko tveganje (> 50 %): Dolžina QTc > 500 ms in genotip LQTS1 (moški / ženske) / LQTS2 (moški / ženske) / LQTS3 (moški)
- Srednje tveganje (30 – 50 %): QTc > 500 ms in LQTS3 (ženske) ali QTc < 500 ms in LQTS2 (ženske) / LQTS3 (moški / ženske)
- Nizko tveganje (< 30 %): QTc < 500 ms in LQTS2 (moški) / LQTS1 (moški / ženske) (25, 26).

Genetsko testiranje (s katerim določimo genotip) je v kombinaciji s tradicionalnimi dejavniki tveganja (spol, starost, QTc) pomembno za ocenjevanje tveganja srčnega incidenta pred

terapijo (17, 26). Genotip sicer moramo določiti z genetskim testiranjem, vendar bi ga lahko približno opredelili tudi s povezavo s fenotipom, saj sta genotip in fenotip direktno povezana. Fenotip nam je zaradi tega tudi v pomoč pri načrtovanju genetskega testiranja. Vendar fenotip lahko opredeliš šele po incidentu. Povezave med situacijo, v kateri je bil sprožen srčni incident in genotipom so znane za genotipe LQTS1, LQTS2 in LQTS3. Tako sta povezana LQTS1 in srčni incident med plavanjem oz. ob fizičnem naporu, LQTS2 in srčni incident ob zvočnem dražljaju (urni alarm, hišni zvonec) ter LQTS3 in srčni dogodek med spanjem oz. med počitkom (28).

Tveganje se lahko opredeli tudi glede na tip in lokacijo mutacije ter glede na celično funkcijo. Za bolnike z LQTS, ki imajo mutacije, ki prizadenejo protein v področju pore kanalčka velja, da imajo daljše intervale QT, bolj resen kliničen odziv ter več aritmičnih srčnih incidentov v mladosti kot tisti z mutacijami, ki prizadenejo terminalno C regijo. Bolniki z mutacijami v transmembranskih porah imajo torej največje tveganje za srčni incident. Bolniki z mutacijami s premikom bralnega okvirja ali z nesmiselnimi mutacijami v katerikoli regiji imajo srednje tveganje. Tisti z mutacijami s spremenjenim pomenom v terminalni C regiji imajo najmanjše tveganje (29).

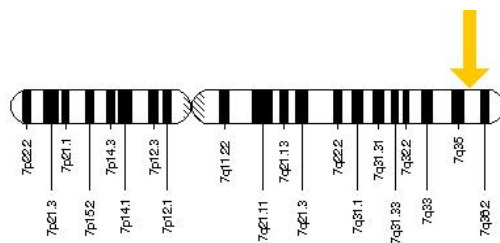
1.2.3 Zdravljenje

Zdravljenje bolnikov z LQTS je zelo pomembno. Z njim je potrebno nemudoma pričeti. Nezdravljeni bolniki z LQTS2 v 50 % do 60 % doživijo srčni incident pred 40-im letom starosti in srčni zastoj ali pa nenadno srčno smrt v 20 % primerov (letna umrljivost je 0,6 %) (24). Uporabljajo se različni načini zdravljenja. Farmakoterapija z zaviralci beta je osnovno zdravljenje za večino bolnikov z LQTS, vendar pa konkretno pri LQTS2 zaviralci beta le srednje zaščitijo bolnika (30). Pri bolnikih z LQTS2 je najpomembnejše ohranjanje ustrezne koncentracije kalija v plazmi, zato dobivajo dopolnilo kalija, ki je pri LQTS2 najboljša možna terapija. Prevodnost kanalov *KCNH2* je namreč direktno povezana z zunajceličnim K^+ . Z uporabo dopolnila se poveča zunajcelični K^+ in s tem se poveča pretok kalija. Posledično se tako vsaj delno nadomesti okvara kanalov *KCNH2*. Z raziskavami so ugotovili, da je dopolnilo uspešno pri zmanjševanju repolarizacijskih nepravilnosti, ni pa še podatkov, če lahko s tem tudi zmanjšamo tveganje za srčni incident (31). Naslednja možna terapija je intravenozna aplikacija nikorandila. To je odpiralec od ATP (adenintrifosfat) odvisnih kalijevih kanalov, ki

zmanjša podaljšanje intervala QT. Nikorandil nima učinka na kanale *KCNH2*, zato ga uvrščamo med nespecifične načine uravnavanja repolarizacijskih nepravilnosti. Pri oralni aplikaciji doseže veliko nižje plazemske koncentracije, zato je njegova klinična uporaba omejena (20). Pri izbiri terapije je poznavanje genotipa zelo pomembno, saj različni načini zdravljenja različno zaščitijo bolnike z določenimi genotipi. Odločitev o načinu zdravljenja ne sme temeljiti le na vrsti genotipa, temveč mora vključevati vse dejavnike tveganja (13).

1.3 Gen *KCNH2*

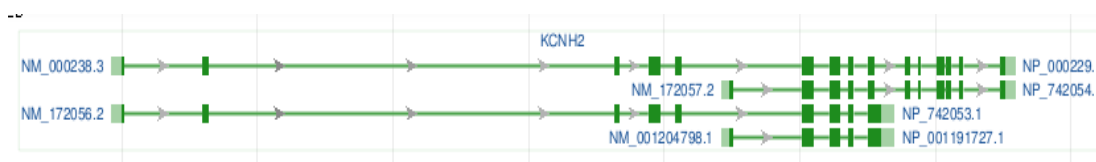
Gen *KCNH2* se nahaja na dolgi ročici kromosoma 7 (7q35-q36). Pozicija gena na kromosomu je prikazana na sliki 5. Ta gen nosi zapis za alfa podenoto hitrega napetostnega kalijevega kanala v miocitih. Funkcionalni kalijev kanal je zgrajen iz štirih alfa podenot, ki skrbijo za strukturo kanala in iz beta podenote, ki uravnava aktivnost kanala. Zapis za alfa podenote nosi *KCNH2* gen, za beta podenoto pa *KCNE2*. Protein gena *KCNH2* imenujemo Kv11.1 ali I_{Kr} ali HERG (angl. Human Ether-a-go-go-Related Gene). Gen sodi v poddružino H ter v družino EAG (ether-a-go-go) genov, ki kodirajo s Ca^{2+} modulirane kalijeve kanale (11, 32). Gen *KCNH2* je sestavljen iz 16 eksonov (33).



Slika 5: Pozicija gena *KCNH2* na kromosomu 7 (34).

Do danes je bilo opisanih več izooblik gena. Huffaker in sod. so ugotovili, da obstaja tudi možgansko specifična izooblika, ki jo imenujemo *KCNH2*-3.1. Na sliki 6 je ta izooblika gena označena z NM_001204798. Ta oblika gena ima vlogo pri razvoju možganov v prenatalnem obdobju. Ugotovili so, da se bolj izraža pri bolnikih s shizofrenijo (35). Na sliki 6 so poleg omenjene prikazane še 3 izooblike gena ter njihovi eksoni in introni. NM_000238 označuje transkript 1 oz. izoobliko a (referenčno sekvenco). Ta različica kodira najdaljšo izoobliko.

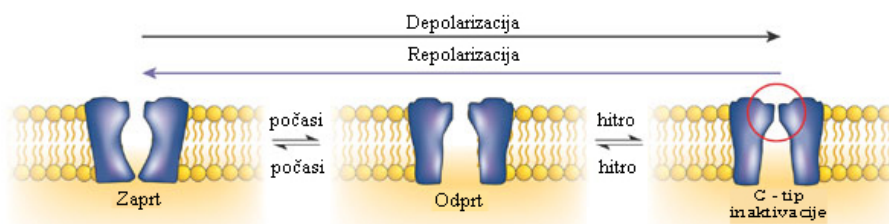
Izraža se v srcu. NM_172056 označuje transkript 2 oz. izoobliko b, ki jo imenujemo tudi HERG-USO. Ta različica je krajša od prejšnje in ima drugačen C-terminalni del. Izraža se v srcu, pogosto pa se močno izraža tudi v tumorskih celicah (36). NM_172057 označuje transkript 3 oz. izoobliko c, ki jo imenujemo tudi HERG 1b. Z različico 1 se razlikuje v N-terminalnem delu. Izraža se v srcu in debelem črevesu. NM_001204798 označuje transkript 4 oz. *KCNH2*-3.1, ki je najkrajša izooblika. Od različice 1 se razlikuje v N- in C-terminalnem delu. Izraža se v možganih (35, 36).



Slika 6: 4 izooblike gena *KCNH2* in njihovi eksoni in introni (38).

1.3.1 Protein HERG

Glavna naloga tega kanala je, da skrbi za normalno repolarizacijo prekatnih celic, tako da omogoči izhod kalijevih ionov iz miocitov. Kanal je lahko v odprtem, zaprtem ali pa inaktiviranem stanju.



Slika 7: HERG kanal je lahko zaprt, odprt ali inaktiviran, odvisno od transmembranske napetosti (39)

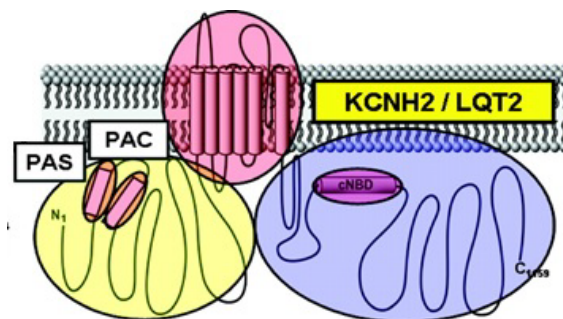
Prehodi med različnimi stanji so napetostno odvisni. Na sliki 7 je prikazano, da je kinetika inaktivacije veliko hitrejša kot kinetika aktivacije, kar pomeni, da je prehod med zaprtim in odprtim stanjem počasnejši kot prehod med odprtim in inaktiviranim stanjem (40). Na sliki 7

lahko tudi vidimo, da so različna stanja odvisna od transmembranske napetosti. Kanal je zaprt pri negativni napetosti. Z depolarizacijo membrane se kanal počasi aktivira, pri čemer se odpre. Pri pozitivni napetosti se kanal hitro inaktivira. Z repolarizacijo membrane se proces obrne (39). Repolarizacija je relativno hitra in enostavna. V zgodnji fazi diastole je majhen tok kalijevih ionov skozi kanal, ker je mirovni membranski potencial blizu vrednosti kalijevega potenciala. Če pride do prezgodnjega utripa med zgodnjo diastolično fazo, potem se fiziološko zviša delovanje HERG, da tako zavira depolarizacijo celice. Njihova funkcija v normalnem stanju je supresija dodatnih utripov (41). Zato so bolniki LQTS (ki imajo zaradi mutacij zmanjšano delovanje HERG) bolj nagnjeni k aritmijam, ki jih sproži prezgodnji utrip (40).

1.3.2 Spremembe nukleotidnega zaporedja gena *KCNH2*

Spremembe nukleotidnega zaporedja so izraz, ki zajema tako mutacije kot tudi polimorfizme. Poznamo različne definicije za mutacije in polimorfizme. Mutacija lahko pomeni spremembo DNA, ki povzroča bolezen, ali pa pomeni vsako spremembo, ki se pojavlja pri manj kot 1 % populacije in ni nujno, da povzroča bolezen. Polimorfizem pa lahko pomeni spremembo DNA, ki ne povzroča bolezni, ali pa pomeni vsako spremembo DNA, ki se pojavlja pri vsaj 1 % populacije in lahko povzroča bolezen (42, 43). Pogosto se sicer uporablja izraz mutacija za spremembe, ki povzročajo bolezen. V nalogi pa bomo v nadaljevanju uporabljali izraz mutacija in polimorfizem v smislu pogostosti pojavljanja nukleotidne spremembe v populaciji (pri obeh izrazih je možno, da povzročata oz. ne povzročata bolezni), ker smo tak način klasifikacije uporabljali tudi pri pisanju izvidov.

Glavni problem pri interpretaciji je razlikovanje patogenih in nepatogenih sprememb. Pri tako imenovanih radikalnih spremembah, kot so insercije, delecije ali nesmiselne spremembe, je več kot 90 % verjetnost resnično patogene spremembe. Pri spremembah s spremenjenim pomenom (najpogostejši tip sprememb; 67 % pri *KCNH2*) pa se ta odstotek razlikuje odvisno od lokacije spremembe.



Slika 8: Verjetnost patogenosti glede na položaj spremembe (10).

Z barvami je prikazana verjetnost patogenosti, če se sprememba s spremenjenim pomenom nahaja:

- v rdečem območju (med N- in C-terminalnim koncem (404. - 659. aminokislina)), ki vsebuje transmembranski del, povezovalni del ter poro, je velika verjetnost patogenosti in sicer več kot 80 %
- v modrem območju (na C-terminalnem koncu (660.-1159. aminokislina)) je možno, da je patogena in sicer med 51 % in 80 %
- v rumenem območju (na N-terminalnem koncu (1. - 403. aminokislina)) pa je verjetnost patogenosti manjša oz. enaka 50 %; te spremembe imenujemo genetske različice negotovega oz. nejasnega kliničnega pomena (VUS: okr. angl. variants of uncertain significance) (7, 38)

Pravilna interpretacija sprememb nukleotidnega zaporedja je zelo pomembna. Napačna interpretacija namreč lahko vodi v nepotrebno invazivno terapijo ali pa v nasprotnem primeru v smrt, saj je pri avtosomno dominantnem dedovanju dovolj že en sam mutiran alel. Ker direktno preverjanje patogenosti na humani srčni mišici ni možno, so Jou in sod. kot model za ugotavljanje patogenosti genetskih različic uporabili test na ribah zebricah. Ugotovili so, da bi se ta *in vivo* test, skupaj z algoritmi za interpretacijo pozitivnih LQTS testov, lahko uporabljal za dodatno pomoč za ugotavljanje patogenosti sprememb, ne pa kot samostojen test, saj se srce ribe ne odziva čisto enako kot srce sesalcev.

Z bolezenskim fenotipom so povezani tudi nekateri polimorfizmi. Odkrili so 251 polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP), od tega jih je 32 v kodirajočih regijah. Najmočnejšo povezavo s patofiziološkim fenotipom ima polimorfizem rs1805123 v eksonu 11. Pri tem polimorfizmu pride na 897. mestu do spremembe aminokislina in sicer iz lizina v treonin. Ta polimorfizem pomembno vpliva na podaljšanje dobe QT (40).

1.3.3 Vpliv sprememb nukleotidnega zaporedja na HERG

Spremembe nukleotidnega zaporedja v genu *KCNH2* lahko povzročijo izgubo proteinske funkcije in podaljšajo interval QT (20). Izguba HERG funkcije ima za posledico napake v

zapiranju in odpiranju kanalov ter nepravilno ionsko prepustnost (45). Povezovanje mutiranih proteinov v tetramerne komplekse lahko vpliva na funkcijo divjega tipa proteina. Ta pojav imenujemo dominantno negativen efekt, ki povzroča več kot 50 % zmanjšanje funkcionalnosti (20). Spremembe lahko vplivajo na sintezo, aktivnost, prepustnost HERG itd. (44).

1.4 Diagnostika LQTS

Na prisotnost LQTS lahko opozorijo že primarni klinični znaki, kot so palpitacije, sinkope (med napori), krči in srčni zastoj ter obremenilna družinska anamneza. Pri kliničnem pregledu se ugotovi splošni status bolnika, ki lahko poda sum na prirojeno bolezen (npr. majhna postava, nizko položena ušesa, gluhost,...), status srca pa na strukturno srčno bolezen. Kot primer, popolna izguba funkcije kanala Kv7.1, ki ga kodira *KCNQ1* (LQTS1), povzroča senzorično gluhost (21). Diagnoza je klinična in temelji na modificiranih Schwartzovih kriterijih (modificirani leta 2011), po katerih se seštevajo točke in se tako oceni verjetnost prisotnosti LQTS. Po tem točkovnem sistemu lahko odkrijejo predvsem simptomatske bolnike, problem nastane pri nemih nosilcih mutacij, ki se jih lahko odkrije le z genetskimi preiskavami (46).

Pri veliki večini bolnikov diagnosticirajo podaljšanje dobe QT (LQT) s standardnim 12-kanalnim EKG. Dobo QT je potrebno standardizirati, saj je odvisna od srčne frekvence (QTc). Izračunajo jo s pomočjo Bazzet-ove formule, ki je prikazana v enačbi 1 (42).

$$QTc = QT \text{ interval} \div \sqrt{RR \text{ interval}}$$

Enačba 1: Bazzet-ova formula (47).

Vendar pa 10 – 35 % bolnikov nima diagnostičnega intervala QT, poleg tega pa morajo ročno preveriti vse meritve dob QT, ker avtomatski analizatorji niso povsem zanesljivi in natančno pregledati še morfologijo T-valov, da lahko odkrijejo LQTS. Pri nekaterih bolnikih povečajo diagnostično občutljivost z obremenitvenim testiranjem, stresnim testom z adrenalinom in s Holter EKG-jem. Obremenitveno testiranje izvajajo z »burst« protokolum, kar pomeni, da je preiskovanec maksimalno obremenjen za 1 min na kolesu. Pojav nenormalnih T-valov ali podaljšanje QTc > 85 ms je zelo občutljivo in specifično za LQTS. Po obremenitvenem

testiranju pa merijo še QTc v fazi počitka. Adrenalinski test se imenuje tudi medikamentozno testiranje, pri katerem uporabljajo postopno naraščajoče odmerke. Pri zdravih zaznajo skrajšanje intervala QTc, pri bolnikih pa izrazito podaljšanje QTc (še posebej pri LQTS1). Holter EKG je celodnevno snemanje EKG-ja. (10, 43).

1.4.1 Genetsko testiranje

Genetsko testiranje - DNA analiza se izvaja za LQTS1, LQTS2, LQTS3 in sicer pri kliničnem sumu na LQTS ali pri QTc > 480 ms. Pred samim genetskim testiranjem se priporoča genetsko svetovanje, ki je namenjeno vsem bolnikom in njihovim sorodnikom z družinsko srčno boleznijo. Vključevati bi moralo pogovor o tveganjih, koristih in možnostih za klinično in/ali genetsko testiranje (13). Genetsko testiranje postaja z novimi odkritji zlati standard pri diagnostiki LQTS. Genetski rezultati pri LQTS prispevajo k diagnostiki, prognozi bolezni in vplivajo na terapijo (13). Z molekularno diagnostiko lahko odkrijemo neme nosilce mutacij. Opredelimo lahko tudi družinske člane. Bolnike, ki imajo podaljšano dobo QTc in jasno klinično diagnozo LQTS, bi morali prav tako genetsko testirati in jim s tem opredeliti genotip, saj se tako lahko oceni tveganje ter se odloča o načinih zdravljenja (10). Preventivni ukrepi in terapija so pomembni pri zdravljenju te bolezni, zato je treba narediti genetsko testiranje družinskih članov čim prej, neodvisno od starosti (13). Z genetskim testiranjem si pomagajo tudi pri bolnikih z nepojasnjeno sinkopo ali pri bolnikih, ki imajo z zdravili povzročeno podaljšanje dobe QTc in hkrati ne izpolnjujejo diagnostičnih kriterijev LQTS. Genetsko testiranje torej pomaga tudi pri dvoumih primerih. Negativen rezultat izključuje 75 % prirojenih LQTS (10), nikoli pa ne more sam po sebi izključevati prisotnosti bolezni, saj še niso poznani vsi genetski vzroki za LQTS (13).

1.4.1.1 Priporočila Heart Rhythm Society (HRS) / European Heart Rhythm Association (EHRA) iz leta 2011

1. Genetsko testiranje za LQTS 1 - 3 je priporočljivo bolnikom s kliničnim sumom na LQTS. Klinični sum se postavi na podlagi pregleda klinične zgodovine bolnika (sinkope) ter izražanja elektrokardiografskega fenotipa (testiranje z 12-kanalnim EKG, stresno testiranje z obremenitvijo ali infuzijo kateholamina ter ugotovljeno LQT). Genetsko testiranje se ne

sme izvajati samo, brez posvetovanja s kardiologom. Testiranje je treba izvajati izključno zaradi suma bolezni (na podlagi kliničnih znakov) oz. zaradi mutacije v družini (13).

2. Genetsko testiranje za LQTS 1 - 3 je priporočljivo asimptomatskim bolnikom z nedvoumno in idiopatsko LQT, ki nimajo ostalih kliničnih stanj ali bolezni, ki podaljšujejo dobo QT (npr. elektrolitsko neravnovesje, srčna hipertrofija, sladkorna bolezen): QTc > 480 ms (pred puberteto) ali > 500 ms (odrasli) (13).
3. Genetsko testiranje specifičnih mutacij je priporočljivo družinskim članom (starši, bratje in sestre, potomci), katerih sorodnik ima LQTS. Genetsko testiranje naj bi izvedli tudi v primeru negativnega simptomatskega in elektrokardiografskega fenotipa. Pri družinskih članih se lahko izključi prisotnost LQTS samo z negativnim genetskim testom. Normalna doba QTc ni dovolj za izključitev LQTS. LQTS se torej lahko izključi, kadar so genetski test, klinična zgodovina in 12-kanalni EKG negativni. V primeru negativnega genetskega testa in LQT, je potrebno razmisliti, ali ponovimo specifično testiranje ali nadaljujemo s celovitim genetskim testiranjem. V začetnem genetskem presejanju, bi bilo morda dobro vključiti tudi ostale sorodnike, ne samo najbližjih (13).
4. Genetsko testiranje za LQTS 1 - 3 pa lahko pride v poštev tudi pri asimptomatskih bolnikih z drugačnimi idiopatskimi vrednostmi QTc > 460 ms (otroci), > 480 ms (odrasli) (13).

2. Namen dela

LQTS je zelo kompleksna genetska bolezen. Zaradi okvare delovanja ionskih kanalčkov srčnih celic lahko nastanejo hude posledice, kot je nenadna srčna smrt. Bolnikov ne moremo vedno odkriti zgolj s preiskavo EKG, ker vsi bolniki nimajo podaljšane dobe QT. Zato je odkrivanje mutacij z genetskimi preiskavami zelo pomembno.

Namen magistrske naloge bo vpeljati molekularno genetsko testiranje gena *KCNH2* v klinično prakso. Genetske preiskave bi radi vpeljali, ker ima LQTS relativno visoko incidenco, za gen *KCNH2* pa smo se odločili, ker so molekularno genetske analize za gena, ki povzročata LQTS1 in LQTS3 že bile vpeljane in izmed najpogostejše okvarjenih genov manjka samo še ta. Tako bomo lahko zagotovili primerljivo kvaliteto obravnave slovenskih bolnikov s sumom na LQTS, kot je v tujini.

Primarno bomo vpeljali genetsko preiskavo v klinično prakso, ob tem pa bomo vzporedno analizirali še gen na vzorcih bolnikov. Pregledali bomo vse eksone in pripadajoče eksonsko-intronske regije gena *KCNH2* in pri tem iskali nukleotidne spremembe. Bolnikom se bodo lahko na koncu napisali izvidi.

V ta namen bomo:

Vpeljali genetsko preiskavo oz. postavili metodo za sekvenciranje:

- z računalniškim programom oblikovali specifične oligonukleotidne začetnike za verižno reakcijo s polimerazo (PCR),
- optimizirali pogoje pomnoževanja za vseh 16 eksonov gena.

Poizkusili optimizirati metodo visokoločljivostne talilne analize (HRM), ki bi bila predstopnja sekvenciranju:

- optimizirali pogoje pomnoževanja eksonov za HRM,
- s HRM analizirali vzorce ter naredili analizo rezultatov,
- izbranim vzorcem s sekvenciranjem po Sangerju določili nukleotidno zaporedje.

Izvedli analizo gena na vzorcih 43 bolnikov:

- s PCR pomnožili vzorce za sekvenčno reakcijo
- s sekvenciranjem po Sangerju določili nukleotidno zaporedje in opredelili klinični pomen odkritih sprememb zaporedja.

3. Materiali in metode

3.1 Splošna navodila

Pri delu v laboratoriju je potrebno slediti načelom dobre laboratorijske prakse. Ves čas moramo skrbeti, da ne pride do kontaminacije reagentov in reagenčne mešanice. Med delom moramo ves čas nositi zaščitna delovna oblačila in rokavice za enkratno uporabo ter dosledno menjati nastavke za pipete. Pri delu uporabljamo sterilen pribor. Nastavke za pipete moramo pred uporabo avtoklavirati. Na posode z nastavki za pipete nalepimo trak za avtoklaviranje, na katerem so zelene črte, ki po pravilnem avtoklaviranju postanejo črne. Na tak način kontroliramo avtoklaviranje. Dosledno zapiramo škatlo z nastavki in vrečke s sterilnim plastičnim priborom. Pulte, pipete ter ostalo opremo redno čistimo in razkužujemo z 10 % etanolom. Vzorce in reagente dobro označimo, da ne pride do zamenjave. Z vzorci in reagenti delamo previdno ter jih ne puščamo odprtih. Pri reakciji PCR moramo paziti tudi na to, da imamo fizično ločene prostore glede na stopnje dela. Tako imamo posebej prostor za pripravo vzorcev, prostor za fazo pre-PCR in prostor za fazo post-PCR. Reakcijsko zmes pri reakciji PCR pripravljamo v delovni komori. V primeru ugotovljene kontaminacije moramo o tem obvestiti vodjo, očistiti delovne površine in pipete ter zavreči vse reagente.

3.2 Priprava vzorcev

Kardiolog, ki vodi bolnike z LQTS na Pediatrični kliniki, je oblikoval seznam 43 bolnikov, pri katerih je obstajala potencialna možnost, da so nosilci mutacij na genu *KCNH2*. Tako smo prejeli 43 vzorcev periferne krvi, odvzetih z antikoagulantom etilendiaminotetraocetna kislina (EDTA). Vzorec pri analizi prisotnosti mutacij z določanjem nukleotidnega zaporedja je deoksiribonukleinska kislina (DNA). DNA smo izolirali iz levkocitov periferne krvi z uporabo reagenčnega kompleta FlexiGene DNA kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca (49).

Izolirani DNA smo izmerili koncentracijo in ocenili njeno čistost, saj tako kontroliramo kvantiteto ter kvaliteto izolirane DNA. Uporabili smo spektrofotometrično metodo. Absorbanco vzorca DNA smo merili pri 260 nm, ker pri tej valovni dolžini baze v molekuli DNA absorbirajo ultravijolično svetlobo z maksimalno absorbanco. Velja splošno uveljavljeno

določilo, da je absorbanca pri 50 µg/mL DNA približno 1. Vzorec DNA lahko uporabljamo za nadaljnje molekularno genetske analize, če je njegova koncentracija vsaj 50 µg/mL. Večina proteinov ima maksimum absorbcije ultravijolične svetlobe pri 280 nm. Iz razmerja obeh absorbanc ugotavljamo čistost DNA (A_{260} / A_{280}) oziroma stopnjo kontaminacije DNA vzorca s proteini. Če je razmerje med 1,7 in 1,9, je DNA primerna za analizo. Absorbance smo izmerili s spektrofotometrom Lambda 25 (Perkin Elmer). Aparat je izmeril obe absorbanci in podal razmerje ter koncentracijo.

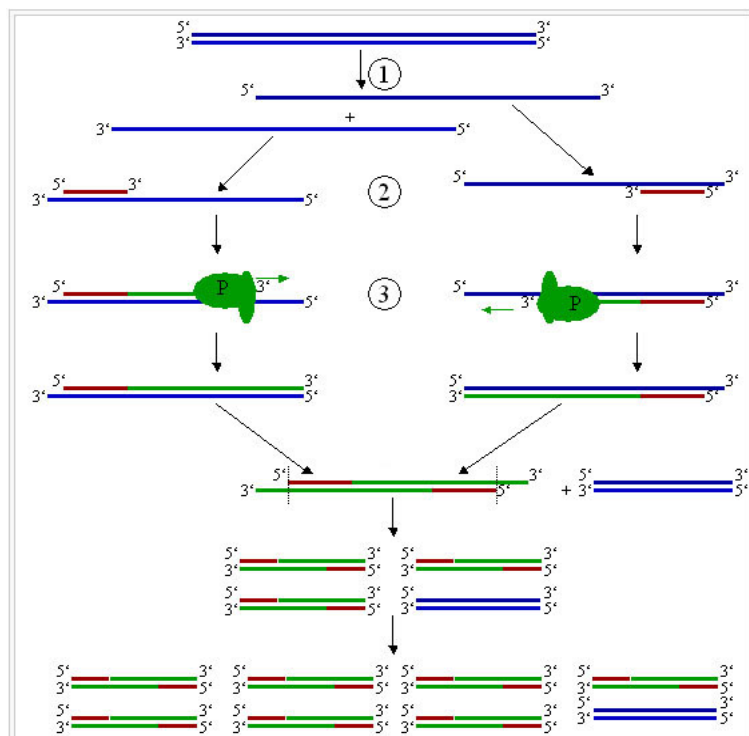
Vzorci DNA smo potem shranili v hladilnik (4 °C). V seznam preiskovancev smo zapisali podatke o preiskovancu (ime in priimek, datum rojstva, klinične značilnosti), številko vzorca, koncentracijo in redčenje DNA. Preiskovančevo DNA smo šifrirali z določitvijo položaja na nosilcu za vzorce in to šifro zavedli v seznam bolnikov. Vzorce DNA smo pripravili v mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami, tako da smo jih redčili do koncentracije 100 ng/µL. Ploščo smo shranili v hladilnik.

3.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR; angl. Polymerase Chain Reaction) je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin. Gre za encimsko reakcijo, ker uporabljamo encim Taq-polimerazo, ki deluje pri 72 °C. V kratkem času lahko dobimo veliko število kopij določenega odseka DNA, ki jih uporabimo za presejalne in potrditvene metode pri analitiki nukleinskih kislin (50).

PCR je sestavljena iz treh stopenj (slika 9) in sicer:

1. Denaturacija: dvoverižno DNA razpremo s segrevanjem na 94 – 95 °C
2. Prileganje oligonukleotidnih začetnikov: pri 40 – 72 °C (najpogosteje je pri 58 °C)
3. Izgrajevanje komplementarne verige: s termostabilno DNA-polimerazo pri 72 °C



Slika 9: Shematski prikaz PCR reakcije (51).

Te tri stopnje predstavljajo skupno en cikel, ki ga običajno 20 do 45 X ponovimo. V vsakem ciklu se število kopij podvoji. Tako na koncu dobimo milijon ali več kopij specifičnih področij DNA iz minimalne začetne količine DNA. Da omejimo odsek, ki ga želimo analizirati, uporabimo dva oligonukleotidna začetnika, ki sta komplementarna vsak eni verigi DNA. Za reakcijo potrebujemo tudi deoksiribonukleotide (dNTP), DNA-polimerazo, magnezijeve ione in reakcijski pufer. Glavni namen te metode je pomnožitev odsekov DNA z encimom DNA-polimerazo, ki sintetizira komplementarno verigo obstoječi matriki. (50).

3.3.1 Reagenti

- DNA-polimeraza s pripadajočim pufrom in raztopino MgCl_2 s koncentracijo 25 mM
 - o AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) s koncentracijo 5 U/ μL
 - o GoTaq Flexi (Promega) s koncentracijo 5 U/ μL
- Raztopina posameznih dNTP s koncentracijo 2 nM (Applied Biosystems)
- Voda (za injiciranje BP, Braun)
- 40 % dimetilsulfoksid (DMSO) (Sigma)

- Delovna raztopina začetnikov s koncentracijo 10 pmol/ μ L
- 2 X GoTaq Green MasterMix

3.3.2 Instrumenti in oprema

- 1,5 ml sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf)
- Pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 μ L) in ustrezni sterilni nastavki za pipete
- Nosilci za vzorce (Applied Biosystems) in podstavki za nosilce vzorcev (Applied Biosystems)
- Reakcijske epruvete 0,2 mL (Applied Biosystems) in pripadajoči pokrovčki (Applied Biosystems)
- Vibracijski mešalnik (Maxi MixII, Termolyne)
- Komora za sterilno delo
- Aparat za PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

3.3.3 Potek dela

Pri vpeljavi metode PCR v laboratorijsko prakso sta bili najpomembnejši nalogi oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov ter optimizacija reakcijskih pogojev. Potek vpeljave metode je predstavljen v poglavju 4. Rezultati in razprava, v tem poglavju pa je predstavljena že vpeljana reakcija PCR.

V preglednici II so predstavljeni oblikovani oligonukleotidni začetniki (začetniki F in začetniki R) in sicer njihova nukleotidna zaporedja, dolžine produktov, temperature tališč (T_m) ter delež baznih parov (bp) citozin gvanin (GC).

Preglednica II: Oligonukleotidni začetniki za eksone gena *KCNH2*.

ekson	oligonukl. začetniki	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE 5' - 3'		dolžina (bp)	T_m ($^{\circ}$ C)	% GC
1	KCNH2e1F	gccacccgaagcctagt	18	221	61,77	66,67
	KCNH2e1R	catccacactcggaagagc	19		59,36	57,89
2	KCNH2e2F	gagtggagaatgtggggaag	20	459	59,51	55,00
	KCNH2e2R	gtcacacccccacagaacc	19		61,28	63,16

ekson	oligonukl. začetniki	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE 5' - 3'		dolžina (bp)	T _m (°C)	% GC
3	KCNH2e3F	ttctgctctgcccactgag	19	296	60,28	57,89
	KCNH2e3R	tgaccttgacagctcacag	20		60,02	55,00
4	KCNH2e4F	gttccccctccttcccttacc	20	655	61,03	60,00
	KCNH2e4R	cccaggacgtagtgaaaagg	20		59,59	55,00
5	KCNH2e5F	cccatggactcctgactgtg	20	400	61,57	60,00
	KCNH2e5R	ctctggatcacagcccactc	20		60,83	60,00
6	KCNH2e6F	gtgcagggtgaggcagtgg	18	291	61,53	66,67
	KCNH2e6R	aagcttcctacttcccagca	20		59,08	50,00
7	KCNH2e7F	tcctcctcattctgcttgg	20	512	59,94	55,00
	KCNH2e7R	gcctctcctctccctacacc	20		60,22	65,00
8	KCNH2e8F	ctttggggatctgacctctg	20	558	62,24	50,00
	KCNH2e8R	ttcctccaacttgggttcct	20		60,85	50,00
9	KCNH2e9F	cgacgctgagactgagacac	20	387	59,76	60,00
	KCNH2e9R	gtttgctgtgccaagagggt	20		60,30	50,00
10	KCNH2e10F	ggttgagatttctctgacatgg	22	558	58,65	45,45
	KCNH2e10R	tccaggctagcatttcttcc	20		59,41	50,00
11	KCNH2e11F	agctgaggggacatgctct	19	379	59,96	57,89
	KCNH2e11R	ttcaatgtcacacagcaaagg	21		59,75	42,86
12	KCNH2e12F	ctgtgttaaggaggagcttg	21	237	58,99	52,38
	KCNH2e12R	ctcccagcctcaccttgt	18		58,75	61,11
13	KCNH2e13F	tctctgttctcctcccctctc	21	400	59,94	57,14
	KCNH2e13R	gagcagagctgggtgagc	18		59,81	66,67
14	KCNH2e14F	cagcggtggtgcgtctac	18	321	61,50	66,67
	KCNH2e14R	gccctctccctctaccagac	20		60,22	65,00
15	KCNH2e15F	gtggaggctgtcactggtgt	20	292	61,22	60,00
	KCNH2e15R	ctggaatcggggaacaag	18		59,01	55,56
16	KCNH2e16F	cctttccctccccttcct	18	295	60,38	61,11
	KCNH2e16R	ctgagcagggcctccaag	18		62,09	66,67

Vzorec je bil raztopina izolirane DNA s koncentracijo 100 µg/mL, za negativno kontrolo pa smo vzeli vodo. Vse reagente, razen DNA-polimeraze, smo odmrznili na sobni temperaturi in jih kratko premešali z vrtinčenjem. DNA-polimerazo smo vzeli iz zamrzovalne skrinje šele tik pred uporabo, po uporabi pa smo jo takoj vrnili nazaj v zamrzovalnik, saj se aktivnost polimeraze pri sobni temperaturi zmanjša. Še preden smo se lotili priprave reakcijske mešanice, pa smo morali prižgati aparat za PCR GeneAmp® PCR System 9700 ter s 70 % etanolom temeljito očistiti delovni pult, pipete in nosilce za vzorce. Najprej smo pripravili PCR reakcijske epruvete, ki smo jih vstavili v nosilec za vzorce. Nosilec za vzorce smo označili z datumom ter imenom gena in eksona. Potem smo pripravili delovno mešanico iz sestavin, brez encima in DNA ter jo pomešali z vrtinčenjem in kratko centrifugirali. Nato smo tej mešanici dodali encim. Ta stopnja priprave mešanice PCR je zelo pomembna. Paziti moramo na to, da po dodatku encima mešanice ne vrtinčimo, ampak jo samo rahlo premešamo z ročnim obračanjem in kratkim centrifugiranjem, saj bi lahko z vrtinčenjem uničili encimsko aktivnost. Hkrati pa moramo paziti na to, da je encim enakomerno porazdeljen v mešanici, da je po porazdelitvi mešanice res prisoten v vsaki reakcijski epruveti. V nasprotnem primeru se nam lahko zgodi, da se vzorci ne pomnožijo.

Tako pripravljeno reakcijsko mešanico smo razdelili v epruvete. V vse epruvete, razen v eno, smo potem dodali še DNA preiskovancev. Epruveta, v kateri ni bilo vzorca DNA, je bila namenjena za negativno kontrolo. Epruvete smo dobro zaprli in preverili, da v reakcijski mešanici ni mehurčkov in da ni kapljic mešanice na stenah epruvete. Nosilec z vzorci smo vstavili v PCR-aparat ter na aparatu nastavili pogoje pomnoževanja ter ga zagnali.

Nekaterih eksonov nismo mogli uspešno pomnožiti s Taq Gold PCR mix-om, zato smo uporabili drugo reakcijsko mešanico, ki je bila sestavljena samo iz vode, začetnikov ter 2 X GoTaq Green MasterMix-a. Potek dela je bil enak, razlika je bila samo v tem, da encima, dNTP-jev, pufra in MgCl₂ nismo dodajali vsakega posebej, ker so bile vse te sestavine že v omenjenem MasterMix-u.

V nadaljevanju so v preglednicah predstavljeni pogoji PCR-reakcije in pogoji pomnoževanja za vseh 16 eksonov.

Preglednica III: Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom AmpliTaq Gold in optimizirani pogoji pomnoževanja za **eksone 3, 10, 11 in 15**.

Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom AmpliTaq Gold	
H ₂ O	15,05 µL
2 nM dNTP	2,5 µL
10 X pufer AmpliTaq Gold	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	1,8 µL
10 pmol/µL začetnik R	1 µL
10 pmol/µL začetnik F	1 µL
100 ng/µL DNA	1 µL
5 U/µL polimeraza AmpliTaq Gold	0,15 µL
40 % DMSO	0 µL
SKUPAJ	25 µL

Optimizirani pogoji pomnoževanja		
Začetna denaturacija		95 °C, 10 ´
35 X	Denaturacija	94 °C, 30 ´
	Prileganje začetnikov	58 °C, 30 ´
	Podaljševanje verige	72 °C, 30 ´
Končno podaljševanje		72 °C, 7 ´
Hlajenje		10 °C, ∞

Preglednica IV: Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom AmpliTaq Gold in optimizirani pogoji pomnoževanja za **ekson 9**.

Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom AmpliTaq Gold	
H ₂ O	15,05 µL
2 nM dNTP	2,5 µL
10 X pufer AmpliTaq Gold	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	1,8 µL
10 pmol/µL začetnik R	1 µL
10 pmol/µL začetnik F	1 µL
100 ng/µL DNA	1 µL
5 U/µL polimeraza AmpliTaq Gold	0,15 µL
40 % DMSO	0 µL
SKUPAJ	25 µL

Optimizirani pogoji pomnoževanja		
Začetna denaturacija		95 °C, 10 ´
35 X	Denaturacija	94 °C, 30 ´
	Prileganje začetnikov	59 °C, 30 ´
	Podaljševanje verige	72 °C, 30 ´
Končno podaljševanje		72 °C, 7 ´
Hlajenje		10 °C, ∞

Preglednica V: Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom AmpliTaq Gold in optimizirani pogoji pomnoževanja za **eksone 4, 5, 6, 7 in 8**.

Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom AmpliTaq Gold	
H ₂ O	11,65 µL
2 nM dNTP	2,5 µL
10 X pufer AmpliTaq Gold	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	1,8 µL
10 pmol/µL začetnik R	1 µL
10 pmol/µL začetnik F	1 µL
100 ng/µL DNA	1 µL
5 U/µL polimeraza AmpliTaq Gold	0,15 µL
40 % DMSO	3,4 µL
SKUPAJ	25 µL

Optimizirani pogoji pomnoževanja		
Začetna denaturacija		95 °C, 10 ´
35 X	Denaturacija	94 °C, 30 ´
	Prileganje začetnikov	58 °C, 30 ´
	Podaljševanje verige	72 °C, 30 ´
Končno podaljševanje		72 °C, 7 ´
Hlajenje		10 °C, ∞

Preglednica VI: Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom AmpliTaq Gold in optimizirani pogoji pomnoževanja za **ekson 16**.

Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom AmpliTaq Gold	
H ₂ O	11,65 µL
2 nM dNTP	2,5 µL
10 X pufer AmpliTaq Gold	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	1,8 µL
10 pmol/µL začetnik R	1 µL
10 pmol/µL začetnik F	1 µL
100 ng/µL DNA	1 µL
5 U/µL polimeraza AmpliTaq Gold	0,15 µL
40 % DMSO	3,4 µL
SKUPAJ	25 µL

Optimizirani pogoji pomnoževanja		
Začetna denaturacija		95 °C, 10 ´
35 X	Denaturacija	94 °C, 30 ´
	Prileganje začetnikov	61 °C, 30 ´
	Podaljševanje verige	72 °C, 30 ´
Končno podaljševanje		72 °C, 7 ´
Hlajenje		10 °C, ∞

Preglednica VII: Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom GoTaq Flexi in optimizirani pogoji pomnoževanja za **ekson 1**.

Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom GoTaq Flexi	
H ₂ O	7 µL
2 X GoTaq Green MasterMix	10 µL
10 pmol/µL začetnik R	1 µL
10 pmol/µL začetnik F	1 µL
100 ng/µL DNA	1 µL
SKUPAJ	20 µL

Optimizirani pogoji pomnoževanja		
Začetna denaturacija		95 °C, 10 ´
35 X	Denaturacija	94 °C, 30 ´
	Prileganje začetnikov	58 °C, 30 ´
	Podaljševanje verige	72 °C, 30 ´
Končno podaljševanje		72 °C, 7 ´
Hlajenje		10 °C, ∞

Preglednica VIII: Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom GoTaq Flexi in optimizirani pogoji pomnoževanja za **ekson 14**.

Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom GoTaq Flexi	
H ₂ O	7 µL
2 X GoTaq Green MasterMix	10 µL
10 pmol/µL začetnik R	1 µL
10 pmol/µL začetnik F	1 µL
100 ng/µL DNA	1 µL
SKUPAJ	20 µL

Optimizirani pogoji pomnoževanja		
Začetna denaturacija		95 °C, 10 ´
35 X	Denaturacija	94 °C, 30 ´
	Prileganje začetnikov	61 °C, 30 ´
	Podaljševanje verige	72 °C, 30 ´
Končno podaljševanje		72 °C, 7 ´
Hlajenje		10 °C, ∞

Preglednica IX: Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom GoTaq Flexi in optimizirani pogoji pomnoževanja za **eksona 12 in 13**.

Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom GoTaq Flexi	
H ₂ O	7 µL
2 X GoTaq Green MasterMix	10 µL
10 pmol/µL začetnik R	1 µL
10 pmol/µL začetnik F	1 µL
100 ng/µL DNA	1 µL
SKUPAJ	20 µL

Optimizirani pogoji pomnoževanja		
Začetna denaturacija		95 °C, 10 ´
35 X	Denaturacija	94 °C, 30 ´´
	Prileganje začetnikov	62 °C, 30 ´´
	Podaljševanje verige	72 °C, 30 ´´
Končno podaljševanje		72 °C, 7 ´
Hlajenje		10 °C, ∞

Preglednica X: Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom GoTaq Flexi in optimizirani pogoji pomnoževanja za **ekson 2**.

Optimizirana sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom GoTaq Flexi	
H ₂ O	7 µL
2 X GoTaq Green MasterMix	10 µL
10 pmol/µL začetnik R	1 µL
10 pmol/µL začetnik F	1 µL
100 ng/µL DNA	1 µL
SKUPAJ	20 µL

Optimizirani pogoji pomnoževanja		
Začetna denaturacija		95 °C, 10 ´
35 X	Denaturacija	94 °C, 30 ´´
	Prileganje začetnikov	64 °C, 30 ´´
	Podaljševanje verige	72 °C, 30 ´´
Končno podaljševanje		72 °C, 7 ´
Hlajenje		10 °C, ∞

3.4 Preverjanje dolžine pomnoženih odsekov z agarozno elektroforezo

Uspešnost reakcije PCR smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. S tem nismo preverili samo dolžine nastalega produkta, temveč tudi ali so v vseh epruvetah nastali produkti in če je slučajno prišlo do pomnoževanja tudi v negativni kontroli, kar bi pomenilo, da je prišlo do kontaminacije. Priprava agaroznega gela je hitra in relativno enostavna. Agarozno elektroforezo uporabljamo za ločitev in detekcijo različno dolgih odsekov nukleinskih kislin. Ker so nukleinske kisline negativno nabite, v električnem polju potujejo proti pozitivno nabitemu polu. Krajši odseki potujejo hitreje kot daljši.

3.4.1 Reagenti

- 10 x pufer TBE (1 M TRISHCl, 650 mM borna kislina, 20 mM EDTA in destilirana voda)
- 1 x pufer TBE
- Agaroz (Sigma-Aldrich)
- Barvilo Syber Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Koncentriran nanašalni pufer (0,25 % bromfenol modro, 0,25 % ksilencianol, 50 % glicerol, destilirana voda)
- Velikostni standard oz. označevalec velikosti DNA

3.4.2 Instrumenti in oprema

- Erlenmajerica
- Merilni valj
- Urno steklo
- Plastična žlica
- Pipete Gilson in ustrezni sterilni nastavki za pipete
- Tehtnica (Sartorius TE6101)
- Mikrovalovna pečica Sharp R-939
- Sistem za agarozno gelsko elektroforezo: nosilec za gel in glavniček (Biorad)

- Parafilm
- Komora z ultravijolično svetilko in z digitalnim fotoaparatom G:BOX (SYNGENE)

3.4.3 Priprava 2 % agaroznega gela

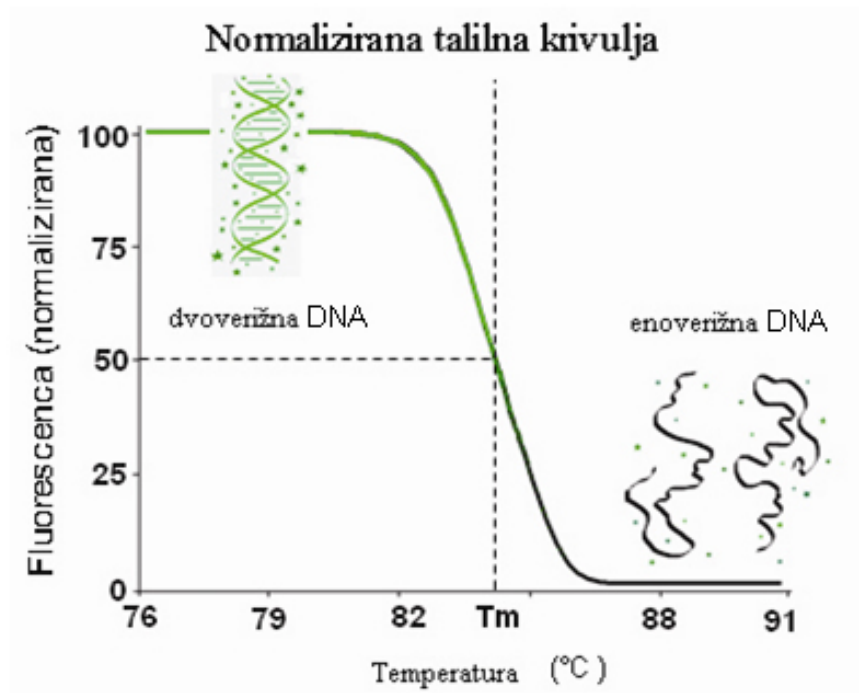
Zatehtali smo 1,6 g agaroze, dodali 80 mL 1X pufru TBE in 8 μ L barvila Syber Safe, vse skupaj premešali in dali v mikrovalovno pečico, dokler se niso raztopili vsi delčki agaroze. Pred kuhanjem smo erlenmajerico še stekali, da smo lahko po kuhanju dodali toliko destilirane vode, da je bila teža enaka kot pred kuhanjem. Gel smo vlili v pripravljen kalup, kamor smo že prej vstavili glavničke. Gel smo pustili 30 min, da se je strdil, nato pa smo odstranili glavničke. Za vizualizacijo DNA smo namesto etidijevega bromida uporabljali barvilo Syber Safe, ki je varnejša alternativa. Etidijev bromid je namreč toksičen in kancerogen.

3.4.4 Izvedba elektroforeze

Gel smo prenesli v kadičko za elektroforezo, kamor smo dolili 1X pufer TBE. Gel je moral biti popolnoma potopljen. Vzorce smo nanesli v žepke, še prej pa smo vzorcem dodali nanašalni pufer (barvilo), ki nam olajša nanos vzorca (ker so vzorci in gel prozorni, bi brez barvila težko nanesli vzorce v žepke). Nanašalni pufer vsebuje barvilo bromfenol modro ter ksilencianol, ki nam torej olajšata nanos, vsebuje pa tudi glicerol, ki zagotavlja, da se vzorci DNA usedejo v žepke, saj jim poveča gostoto. S potovanjem barvila spremljamo potek elektroforeze. Da smo lahko določili velikost nukleinske kisline, smo poleg vzorca na gel nanesli tudi velikostni standard. Pred samim nanosom smo torej morali pripraviti vzorce. Na parafilmu smo primerne volumne vzorcev pomešali z nanašalnim pufrom. Pripravili smo tudi velikostni standard in sicer tako, da smo zmešali 13 μ L standarda in 4 μ L nanašalnega pufru. S pipeto smo nanesli vzorce in velikostni standard v odprtine gela. Ko smo pokrili kadičko s pokrovom, smo zagnali elektroforezo, ki je potekala pri 90 V, 45 min. Gel smo nato pogledali pod ultravijolično svetlobo na aparatu G:BOX (SYNGENE) in ga fotografirali.

3.5 Visokoločljivostna talilna analiza (HRM)

Princip metode je merjenje padca fluorescence ob segrevanju DNA. Dvoverižna DNA pri tem prehaja v enoverižno. Temperaturo, pri kateri pade fluorescenca na polovico, imenujemo T_m . Pri tej temperaturi je polovica dvoverižnih DNA, polovica pa enoverižnih. T_m je odvisna od % GC, od dolžine ter od zaporedja DNA. Več kot je GC parov ter večja kot je dolžina, večja je T_m (53). Na sliki 10 je prikazana talilna krivulja, ki jo dobimo z merjenjem fluorescence v odvisnosti od temperature.



Slika 10: Talilna krivulja DNA (54).

Prva stopnja izvedbe HRM je pomnoževanje tarčnega odseka s PCR, tako da dobimo specifičen produkt. Po končanem pomnoževanju sledi denaturacija in renaturacija z vezanjem fluorescentnega barvila, da dobimo dvoverižne DNA. Potem pa sledi postopno dviganje temperature in posledična denaturacija dvoverižne DNA, pri kateri se barvilo sprošča iz DNA in s tem pade intenziteta fluorescence (55). Pri analizi HRM uporabljamo saturirajoča DNA barvila. Za ta barvila je značilno, da ne inhibirajo PCR in da pri njih ne prihaja do prerazporeditve. Ravno nasprotno je pri barvilu Syber Green (Applied Biosystems). Syber

Green inhibira pomnoževanje in zato ne bi mogli uporabiti visokih koncentracij tega barvila, posledično pa bi se zaradi nizkih koncentracij, ob delni denaturaciji DNA, barvilo prerazporedilo na drugi del verige, namesto da bi se molekule tega barvila odstranile in tako povzročile padec fluorescence. Ker saturirajoča barvila ne inhibirajo PCR, lahko uporabimo visoke koncentracije. V dvoverižno DNA se vgradijo po celotni dolžini, tako da so vsa mesta v DNA verigi zasedena in se morajo zato ob delni denaturaciji odstraniti iz DNA verige, ker nimajo možnosti prerazporeditve (52).

Končni rezultati so talilne krivulje. Če je v zaporedju DNA prisotna sprememba, se spremeni oblika talilne krivulje. To spremembo zaznamo s primerjavo s krivuljo divjega tipa DNA (nemutiran homozigot) (55). Na profil talilne krivulje vplivajo nukleotidno zaporedje, vsebnost nukleotidov GC, dolžina in heterozigotnost. Podatke o temperaturi in intenziteti fluorescence matematično analiziramo.

Aparat za HRM mora imeti precizno kontrolo temperature, da jo lahko nadzorovano zvišuje ter visoko občutljiv optični sistem, da lahko zazna nizke spremembe v padcu fluorescence. Obstajajo specializirani aparati (npr. HR-1, LightScanner), lahko pa so tudi del aparatov za PCR v realnem času (npr. 7500 Fast RT-PCR system, Life Tech.). Pri slednjih lahko v enem testu določimo kvantitativne (npr. duplikacija) in kvalitativne spremembe. Prednosti specializiranih aparatov pa sta večja hitrost ter preciznejša kontrola temperature (52).

HRM je relativno nova metoda, saj je bila prvič opisana šele leta 2002. Uporaba HRM v diagnostiki narašča, ker je hitra, enostavna in poceni. Njena dobra lastnost je tudi ta, da je pri izvedbi majhna možnost kontaminacije. Metoda HRM ima veliko dobrih lastnosti, seveda pa ima tudi slabe. HRM ima večjo občutljivost pri krajših produktih, pri večjih pa se nam lahko zgodi, da se sprememba »skrije« in je ne zaznamo. Problem lahko nastane tudi pri odkrivanju homozigotov, katere ločujemo na osnovi razlik T_m . Pri nekaterih spremembah ne moremo ločiti homozigotov in moramo zato dodati referenčno DNA (normalni homozigot), da nastanejo heterodupleksi. Lahko se zgodi, da s HRM ne bomo zaznali spremembe kot je A-T v T-A, ker take spremembe slabše zazna (52). Težave pri optimizaciji pogojev se lahko pojavijo zaradi velike vsebnosti GC v oligonukleotidnih začetnikih. Težava pa se lahko pojavi tudi pri izbiri vzorcev za sekvenciranje po analizi talilnih krivulj, saj za to potrebujemo izkušeno osebo.

Aplikacije metode HRM v genskih preiskavah so različne. Lahko se uporablja za genotipizacijo, iskanje sprememb, ugotavljanje ujemanja zaporedja, ugotavljanje profilov metilacije itd. (52).

3.5.1 Reagenti

- Voda (za injiciranje BP, Braun)
- Delovna raztopina začetnikov s koncentracijo 10 pmol/ μ L
- 2 X Type-IT HRM MasterMix (Qiagen)

3.5.2 Instrumenti in oprema

- Vibracijski mešalnik (Maxi MixII, Termolyne)
- 1,5 ml sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf)
- Pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 μ L) in ustrezni sterilni nastavki za pipete
- 7500 Fast RT-PCR system (Life Tech.)

3.5.3 Potek dela

Reagente smo morali najprej odmrzniti pri sobni temperaturi. Med tem časom smo v vsako vdolbinico z multikanalno pipeto napipetirali 2 μ L vzorčne DNA, ki smo jo predhodno razredčili na koncentracijo 5 ng/ μ L. Vsako serijo smo kontrolirali z negativno kontrolo (voda za injiciranje namesto DNA), ki pokaže ali je med delom prišlo do kontaminacije. Reagente smo nato premešali z vrtinčenjem. Pri reagentu Type-IT HRM MasterMix moramo paziti, da ga hranimo v temi zaradi fluorescenčnega barvila EvaGreen. MasterMix vsebuje HotStarTaq Plus DNA polimerazo, Type-IT HRM PCR pufer (z barvilom EvaGreen), dNTP in raztopino Q (56). Potem pa smo pripravili reakcijsko zmes (preglednica XI).

Preglednica XI: Sestava reakcijske zmesi za HRM z encimom HotStarTaq Plus.

H ₂ O	0,8 µL
2 X Type-IT HRM MasterMix	3 µL
10 pmol/µL začetnik R	0,1 µL
10 pmol/µL začetnik F	0,1 µL
5 ng/µL DNA	2 µL
SKUPAJ	6 µL

Zmes smo dobro premešali in jo s polavtomatsko pipeto po 4 µL razdelili v vdolbinice na mikrotitrski ploščici. Mikrotitrsko ploščico smo pazljivo prekrili s samolepilno prozorno folijo, ki prepušča svetlobo in s tem omogoča meritev. Paziti smo morali na to, da se folije nismo dotikali, ker bi madeži na foliji ovirali detekcijo na aparatu 7500 Fast RT-PCR (Applied Biosystems). Še pred samo analizo smo mikrotitrsko ploščico premešali z vrtnčastim mešalom in jo kratko centrifugirali. Reakcijski pogoji za posamezne eksone so predstavljeni v preglednici XII.

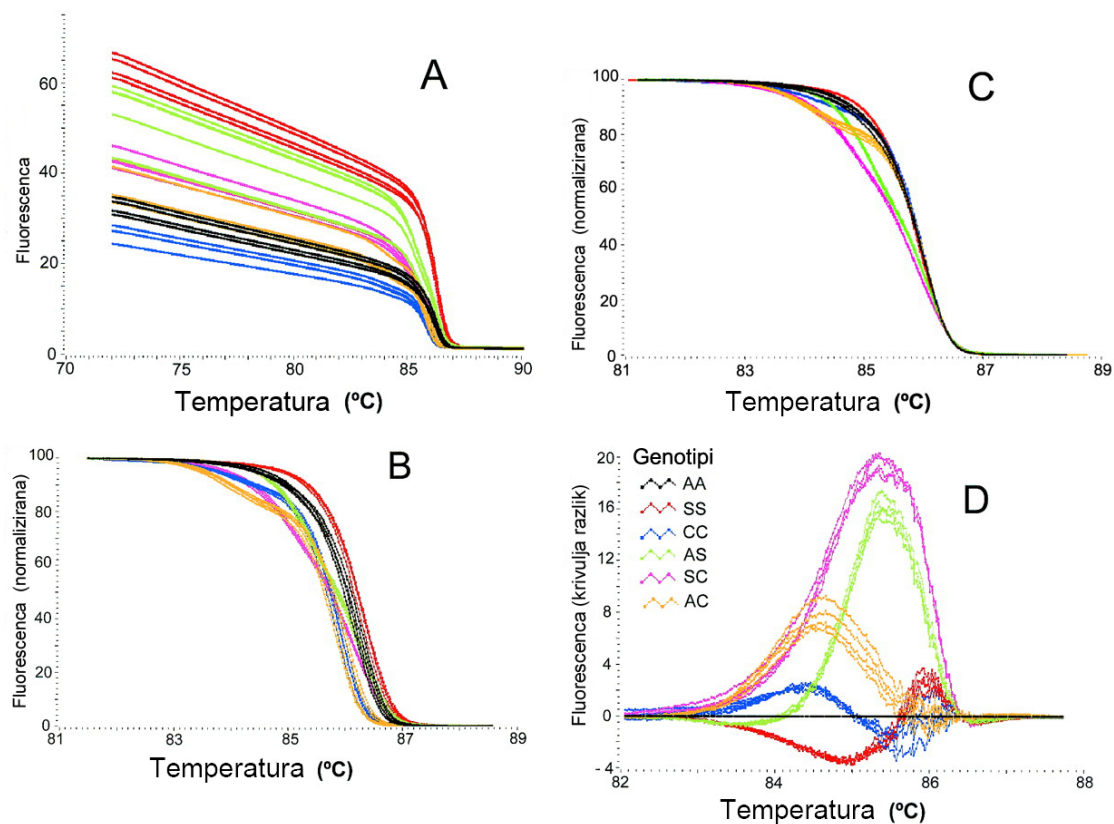
Preglednica XII: Optimizirani pogoji pomnoževanja za HRM.

Pogoji pomnoževanja		
Začetna denaturacija		95° C, 5 ´
Pomnoževanje 50 X	Denaturacija	95 °C, 10 ´
	Prileganje začetnikov	60 °C, 25 ´ (eksoni 3, 4, 11) 61 °C, 25 ´(ekson 8) 61,5 °C, 25 ´(eksona 5, 6)
	Podaljševanje verige	72 °C, 15 ´
	• 70 °C, 1 ´ • postopno višanje temperature do 98 °C, 1 % / s	
Hlajenje		56 °C, ∞

Opomba: Z različnimi temperaturami prileganja začetnikov glede na eksone.

3.5.4 Analiza rezultatov HRM

Po končanem merjenju smo rezultate analizirali s pomočjo programske opreme. Talilne krivulje, ki so bile rezultat analize, smo poravnali in normalizirali s HRM 2.0 programsko opremo (Life Tech.). Metodo glavnih komponent (PCA) in gručenje smo izvedli s statistično programsko opremo RapidMiner, končne rezultate pa smo prikazali s pomočjo programske opreme za vizualizacijo Tableau public (55). Prvi korak je poravnava in normalizacija talilnih krivulj. Ta korak je shematsko prikazan na sliki 11. Najprej moramo matematično odšteti ozadje in normalizirati fluorescenco (0 – 100 %). To naredimo tako, da določimo temperaturno območje, v katerem so v vseh vzorcih dvoverižne DNA (v tem območju je relativen signal 100 %). Relativen signal je 0 % v območju, v katerem so fragmenti DNA popolnoma denaturirani. Na ta način pretvorimo fluorescenčen signal v relativen signal (0 – 100 %). Nato sledi še temperaturni premik krivulj po osi do točke, v kateri so vse DNA v vsakem vzorcu popolnoma denaturirane. Na ta način se znebimo razlik med vzorci, ki so nastale zaradi temperaturnih razlik med luknjicami na mikrotitrski ploščici. Nato sledi še grupiranje podobnih oblik krivulj. To naredimo tako, da od referenčne krivulje odštejemo premaknjene krivulje in dobimo krivuljo razlik (57). Diagram ostankov pa ustvarimo z odštevanjem krivulj razlik od mediane vseh krivulj. Diagram ostankov se uporablja kot osnova za multivariantno statistično metodo PCA (58).



Slika 11: Analiza talilnih krivulj (59):

- **A:** neobdelane talilne krivulje
- **B:** normalizacija talilnih krivulj
- **C:** temperaturni premik krivulj
- **D:** krivulja razlik

Z metodo PCA opišemo razpršenost enot v prostoru, ki je določen z merjenimi spremenljivkami. Razpršenost opišemo z množico spremenljivk, ki med sabo ne korelirajo (60). S to metodo skušamo definirati manj-dimenzionalni prostor, s katerim pojasnimo skoraj vso varianco. Sledita 2 algoritma gručenja in sicer gručenje na osnovi gostote (DBSCAN) ter pričakovani-maksimizacijski algoritem (EM). DBSCAN algoritem uporabljamo za odkrivanje kompleksnih struktur gruč. EM algoritem pa uporabljamo za napovedovanje števila različnih genetskih sprememb v analizirani populaciji ter za gručenje enostavno oblikovanih gruč (55). Končne rezultate smo prikazali s pomočjo programske opreme za vizualizacijo. Primer je prikazan v poglavju 4.4.2 Analiza talilnih krivulj.

3.6 Sekvenciranje po Sangerju

3.6.1 Priprava sekvenčne reakcije

DNA sekvenciranje je proces določanja nukleotidnega zaporedja specifičnemu DNA amplikonu. Najpogosteje uporabljen princip sekvenciranja je metoda po Sangerju (dideoksi metoda). Metoda temelji na vgradnji dideoksiribonukleotidov (ddNTP), ki ustavijo izgradnjo verige DNA. DNA najprej toplotno denaturiramo, da dobimo eno verigo. Dodamo le en oligonukleotidni začetnik, da se sintetizira le ena veriga DNA. V reakcijski zmesi so poleg dNTP-jev prisotni še ddNTP-ji. Ko se ddNTP vgradi v verigo, se sinteza ustavi, ker nima OH skupine na 3' koncu. Bistvo te metode je, da ima vsak ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) vezano drugačno fluorescentno barvilo na 3' koncu. Tako na koncu dobimo zmes različno dolgih odsekov (vse možne dolžine preiskovanega odseka), ki se končajo vsak z enim od ddNTP-jev.

3.6.1.1 Reagenti

- Encim EXO-SAP-IT (USB Corporation)
- Big-DyeTerminator 1.1 reagent (Applied Biosystems)
- Big-DyeTerminator 5 X pufer
- Voda
- Ustrezen začetnik s koncentracijo 10 pmol/ μ L

3.6.1.2 Instrumenti in oprema

- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf)
- Pipete Gilson, sterilni nastavki za pipete
- Nosilci za vzorce (Applied Biosystems) in podstavki za nosilce vzorcev (Applied Biosystems)
- Reakcijske epruvete 0,2 mL (Applied Biosystems) in pokrovčki (Applied Biosystems)
- Vibracijski mešalnik (Maxi MixII, Termolyne)
- Komora za sterilno delo
- Aparat za PCR GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

- Centrifuga 320R (Hettich)

3.6.1.3 Potek dela

Sekvencirali smo vzorce pomnožene s klasično reakcijo PCR in vzorce pomnožene s PCR v realnem času v okviru HRM. V reakcijske epruvete smo dodali 1 μ L encima EXO-SAP-IT in 2,5 μ L reakcije PCR (oz. 0,5 μ L produkta HRM, ki smo mu dodali še 2 μ L vode), dobro premešali in na kratko centrifugirali. To mešanico smo inkubirali 15 min pri 37 °C, nato pa še 15 min pri 80 °C, da smo tako deaktivirali encim. Sekvenčna reakcija je potekala tako, da smo v 3,5 μ L reakcijske mešanice dodali 16,2 μ L Big-Dye reagenta s pufrom in 0,3 μ L oligonukleotidnega začetnika. Vse skupaj smo dobro premešali in na kratko centrifugirali ter pomnožili v PCR-aparatu PCR System 9700 pri naslednjih pogojih (preglednica XIII):

Preglednica XIII: Pogoji sekvenčne reakcije.

Pogoji sekvenčne reakcije		
Začetna denaturacija		96 °C, 1 ´
25 X	Denaturacija	96 °C, 10 ´
	Prileganje začetnika	50 °C, 5 ´
	Podaljševanje verige	60 °C, 4 ´
Hlajenje		4 °C, ∞

3.6.2 Precipitacija produktov sekvenčne reakcije

Glavni namen precipitacije produktov sekvenčne reakcije je odstranitev nevgrajenih ddNTP-jev iz reakcijske mešanice, ker sicer višek barvila, s katerim so ddNTP-ji označeni, vpliva na kvaliteto začetnega dela sekvenčnega elektroferograma in na kvaliteto prepoznavanja nukleotidov (basecalling). Produkte sekvenčne reakcije smo precipitirali z etanolom in natrijevim acetatom. Na koncu smo produkte sekvenčne reakcije raztopili v formamidu in to mešanico denaturirali.

3.6.3 Analiza odsekov na genetskem analizatorju ABI 3500

Na avtomatskem sekvenatorju s kapilarno elektroforezo ločimo odseke glede na dolžino in s fluorescentnim detektorjem določimo ddNTP vsakega odseka. Pod vplivom električnega polja gre del vzorca v kapilaro, ki je napolnjena s polimerom in v polimeru se fragmenti ločijo po velikosti. Ko fragment doseže detektorsko okence na kapilari, se z laserjem osvetli barvilo, ki fluorescira. Rezultat dobimo v obliki elektroferograma.

3.7 Interpretacija rezultatov sekvenciranja in izvid

Rezultate interpretiramo glede na valovno dolžino in intenziteto fluorescence. Rezultat določanja nukleotidnega zaporedja je izpisan v obliki elektroferograma, kjer zeleni vrhovi predstavljajo A (adenin), rdeči T (timin), modri C in črni G. Dobljeno nukleotidno zaporedje smo s programom BLAST (61) primerjali z znanim zaporedjem normalnega gena, objavljenega v bazi zaporedij GeneBank (62).

Ugotovljene spremembe v nukleotidnem zaporedju smo potrdili s ponovnim določanjem zaporedja odseka gena pomnoženega iz sveže redčene preiskovančeve genomske DNA. Nukleotidno spremembo prevedemo v aminokislinsko spremembo. V bazi mutacij HGMD (63) in polimorfizmov dbSNP (64) preverimo, ali je sprememba lahko patološka. Če pa mutacija še ni opisana, preverimo prisotnost mutacije pri zdravih kontrolah. Mutacije lahko poimenujemo na 2 načina in sicer proteinsko (p.Arg176Trp) ali glede na cDNA (c.526C>T). V tem konkretnem primeru p.Arg176Trp pomeni, da se je na mestu 176 arginin spremenil v triptofan. Kadar pa pri spremembi nukleotidnega zaporedja ne pride do spremembe aminokislinske, to poimenujemo z enačajem (p.Phe513=). Pri poimenovanju si pomagamo z genetskim kodom. Na osnovi ugotovitev smo izpisali izvid analize. Izvid smo oštevilčili in številko zapisali v seznam preiskovancev.

4. Rezultati in razprava

25 % - 40 % primerov LQTS je posledica nukleotidnih sprememb v genu *KCNH2*. Osnovni namen magistrske naloge je bil vpeljati molekularno genetsko testiranje gena *KCNH2* v klinično prakso. Želeli smo postaviti metodo za sekvenciranje, ki je zlati standard v diagnostiki LQTS. V ta namen smo oblikovali specifične oligonukleotidne začetnike ter optimizirali pogoje pomnoževanja za vseh 16 eksonov gena za PCR. S PCR smo pomnožili vzorce za sekvenčno reakcijo ter s sekvenciranjem po Sangerju določili njihovo nukleotidno zaporedje. Ta metoda je relativno zahtevna in dolgotrajna, zato smo poizkusili optimizirati še metodo HRM, ki bi v primeru, da bi se izkazala za uspešno, predstavljala alternativno možnost testiranja gena *KCNH2*. Uporabili bi jo kot presejalno metodo, s katero bi izbrali posamezne vzorce za sekvenciranje, da nam ne bi bilo potrebno sekvencirati vseh.

4.1 Priprava vzorcev

Prva stopnja je bila pridobitev DNA. DNA smo izolirali iz periferne krvi 43 bolnikov s Pediatrične klinike in njihovih sorodnikov, pri katerih je obstajala potencialna možnost, da so nosilci mutacij na genu *KCNH2*. Da smo se prepričali, da je bila naša izolacija uspešna, smo izmerili koncentracijo DNA in njeno čistost. To smo naredili s spektrofotometrično metodo. Koncentracija DNA mora biti vsaj 50 µg/mL, čistost, ki je določena z razmerjem absorbanc pa med 1,7 in 1,9. Vsi vzorci so imeli koncentracijo nad 50 µg/mL (preglednica XIV) in razmerje med 1,7 in 1,9, kar pomeni, da so bili sprejemljivi za nadaljnje molekularno genetske analize.

Preglednica XIV: Spektrofotometrično izmerjene koncentracije vzorcev DNA.

Oznaka vzorca	Koncentracija DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Oznaka vzorca	Koncentracija DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Oznaka vzorca	Koncentracija DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Oznaka vzorca	Koncentracija DNA ($\mu\text{g/mL}$)
a1	265,9	b1	457,9	c1	336,4	d1	451,7
a2	325	b2	564,2	c2	448,6	d2	461,4
a3	378,4	b3	530,9	c3	352,2	d3	488,8
a4	315,1	b4	299,4	c4	267,2	d4	1079,2
a5	413	b5	589,5	c5	465,8	d5	346,1
a6	341,8	b6	380,1	c6	660,7	d6	250,6
a7	345,4	b7	458	c7	330,4	d7	345,5
a8	430,5	b8	424	c8	416,1		
a9	506,1	b9	455,1	c9	571,1		
a10	467,1	b10	440,1	c10	1031,9		
a11	407,1	b11	322,9	c11	422,2		
a12	401	b12	523,9	c12	537,9		

4.2 Verižna reakcija s polimerazo

4.2.1 Oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov

Nukleotidno zaporedje začetnikov smo izbrali na osnovi nukleotidnega zaporedja eksonov, ki ga najdemo v javno dostopni bazi podatkov GenBank. Pri oblikovanju začetnikov smo uporabili računalniški program Primer3 (v.0.4.0), ki je dostopen na medmrežju (65). Pri oblikovanju oligonukleotidnih začetnikov upoštevamo naslednja priporočila:

- dolžina začetnikov naj bo od 15 do 30 nukleotidov
- začetniki naj bi vsebovali približno 40 - 60 % GC parov
- par začetnikov naj ima podobno T_m : razlika v paru mora biti manj kot 5 °C
- T_m : 52 – 72 °C (najboljše rezultate dajo začetniki s T_m : 52 – 58 °C)
- brez daljših monobaznih ali večbaznih ponovitev (npr. GGG)
- brez komplementarnosti (oziroma čim manjša komplementarnost) znotraj začetnika
- brez komplementarnosti para začetnikov še posebej na 3' koncu (nastajanje dimerov)
- brez neujemanj na 3' koncu

- na 3` koncu G ali C (66)

Vsa ta priporočila so nam bila v pomoč pri oblikovanju začetnikov. Najpomembnejše je, da se izognemo nespecifičnim začetnikom, zaradi katerih dobimo nespecifične produkte. Idealno je, da se začetnik prilega samo na regijo, ki jo želimo pomnožiti. Pomembno je, da začetniki niso polimorfni, saj bi tako lahko zgrešili mutacijo. Zato smo na koncu preverili, če začetniki v svojem zaporedju vsebujejo SNP-je. To smo naredili s programom SNPCheck.

4.2.2 Optimizacija pogojev PCR

Ker pomnoževanje gena *KCHN2* še ni bilo vpeljeno v laboratorijsko prakso, je bilo potrebno najprej optimizirati pogoje PCR. Tega smo se lotili eksperimentalno. Za preizkus smo uporabili 5 naključno izbranih vzorcev iz seznama bolnikov. Optimiziramo lahko sestavo in koncentracije sestavin reakcijskih zmesi ter parametre ciklov. Za vsak dejavnik obstajajo priporočila, ki nam običajno služijo kot izhodišča za optimizacijo (66). Mi smo izhodiščno sestavo reakcijske zmesi in pogoje pomnoževanja izbrali kar na podlagi dosedanjih izkušenj s pomnoževanjem genov povezanih z LQTS. Pogoji so opisani v standardnih operacijskih postopkih za analizo genov pri bolnikih z LQTS. V laboratoriju na Pediatrični kliniki imajo namreč vpeljani metodi za analizo dveh drugih genov pri LQTS. Pri optimizaciji smo spreminjali temperature prileganja oligonukleotidnih začetnikov ter sestavo reakcijske mešanice. V preglednici XV so predstavljeni pogoji pomnoževanja. V prvi fazi smo spreminjali temperaturo prileganja začetnikov.

Preglednica XV: Optimizacija pogojev pomnoževanja za PCR.

Pogoji pomnoževanja		
Začetna denaturacija		95 °C, 10 ´
35 X	Denaturacija	94 °C, 30 ´
	Prileganje začetnikov	58 – 64 °C, 30 ´
	Podaljševanje verige	72 °C, 30 ´
Končno podaljševanje		72 °C, 7 ´
Hlajenje		10 °C, ∞

Opomba: Z različnimi temperaturami prileganja začetnikov.

Sestava reakcijske zmesi, ki smo jo uporabili na začetku je predstavljena v preglednici XVI.

Preglednica XVI: Izhodiščna sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom AmpliTaq Gold.

H ₂ O	15,05 µL
2 nM dNTP	2,5 µL
10X pufer AmpliTaq gold	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	1,8 µL
10 pmol/µL začetnik R	1 µL
10 pmol/µL začetnik F	1 µL
100 ng/µL DNA	1 µL
5 U/µL polimeraza AmpliTaq gold	0,15 µL
40 % DMSO	0
SKUPAJ	25 µL

Temperatura prileganja začetnikov, ki smo jo izbrali na začetku, je bila **58 °C**. V našem primeru so bile vse T_m oligonukleotidnih začetnikov vsaj 58°C, zato smo izbrali to temperaturo prileganja. Optimalno temperaturo prileganja pa lahko tudi ocenimo s pomočjo različnih formul, vendar pa lahko dejanske temperature prileganja določimo le empirično (67). Za vsak ekson posebej smo pomnožili 5 izbranih vzorcev ter s pomočjo agarozne elektroforeze ugotovili, da so se s temi pogoji uspešno pomnožili naslednji eksoni: **3, 10, 11** in **15**. Pri eksonu **9** so bile lise na agaroznem gelu premočne, zato smo za ta ekson dvignili temperaturo prileganja za 1 °C, torej na **59 °C** in s tem dobili boljše rezultate.

Za ostale eksone smo spremenili sestavo reakcijske zmesi, tako da smo poleg vode dodali še DMSO. DMSO namreč izboljša učinkovitost PCR-pomnoževanja odsekov DNA, ki so bogati z GC in odsekov z močno izraženimi sekundarnimi strukturami, ki upočasnjujejo pomnoževanje. Temperatura prileganja pa je bila **58 °C**.

Preglednica XVII: Izhodiščna sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom AmpliTaq Gold z dodatkom DMSO.

H ₂ O	11,65 µL
2 nM dNTP	2,5 µL
10 X pufer AmpliTaq Gold	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	1,8 µL
10 pmol/µL začetnik R	1 µL
10 pmol/µL začetnik F	1 µL
100 ng/µL DNA	1 µL
5 U/µL polimeraza AmpliTaq Gold	0,15 µL
40 % DMSO	3,4 µL
SKUPAJ	25 µL

S temi pogoji smo uspešno pomnožili naslednje eksone: **4, 5, 6, 7 in 8**.

Ekson **16** je preveč izstopal po svoji intenzivnosti, zato smo dvignili temperaturo prileganja za 3 °C, torej na **61 °C**. Pri tej temperaturi smo dobili veliko boljše rezultate pomnoževanja.

Težave smo imeli z eksoni 1, 2, 12, 13 in 14. S to sestavo reakcijske zmesi namreč pri njih nismo bili uspešni. Odločili smo se za drugo DNA-polimerazo in sicer GoTaq Flexi. Ta encim se skupaj z ostalimi potrebnimi reagenti nahaja v Go Taq MasterMix-u. Sestava te reakcijske zmesi je predstavljena v preglednici XVIII.

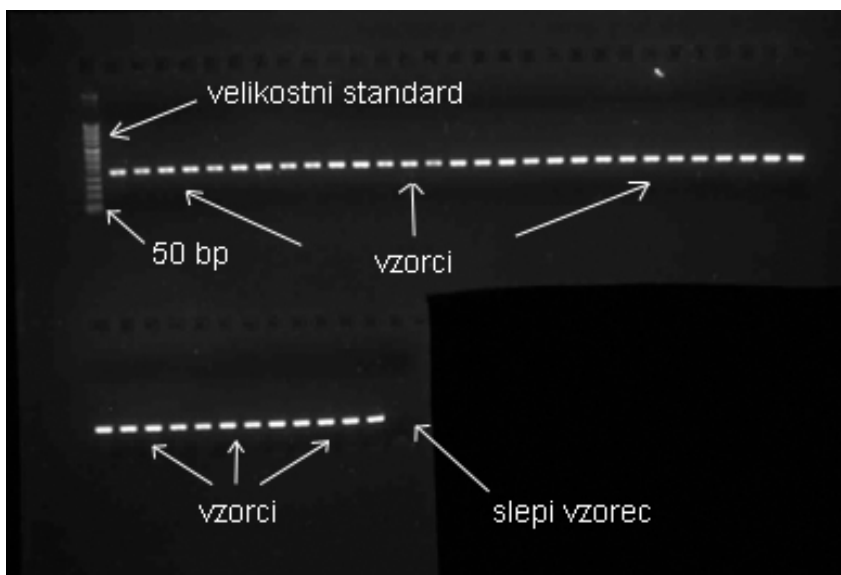
Preglednica XVIII: Izhodiščna sestava reakcijske zmesi za PCR z encimom GoTaq Flexi.

H ₂ O	7 µL
2 X GoTaq Green MasterMix	10 µL
10 pmol/µL začetnik R	1 µL
10 pmol/µL začetnik F	1 µL
100 ng/µL DNA	1 µL
SKUPAJ	20 µL

Pri temperaturi prileganja 58 °C smo uspešno pomnožili ekson 1, pri 61 °C smo uspešno pomnožili ekson 14, pri temperaturi 62 °C pa eksona 12 in 13. Temperatura prileganja 64 °C pa je bila najprimernejša za pomnoževanje eksona 2.

4.3 Preverjanje uspešnosti pomnoževanja z agarozno elektroforezo

V primeru pomnoževanja s klasično reakcijo PCR moramo preveriti uspešnost pomnoževanja z agarozno elektroforezo. Pri pomnoževanju s PCR v realnem času v okviru HRM pa to ni potrebno. V vsaki seriji pomnoževanja smo imeli negativno kontrolo, da smo se prepričali, da ni prišlo do kontaminacije. Z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu smo preverjali uspešnost pomnoževanja in dolžino pomnoženih odsekov. Na sliki 13 je prikazan primer gela eksona 12. Na sliki 12 lahko vidimo 41 lis, ki predstavljajo 41 vzorcev, ki smo jih pomnoževali v tisti seriji. Na zadnjem mestu ni lise, ker smo na tisto mesto nanegli slepi vzorec. To pomeni, da med laboratorijskim delom ni prišlo do kontaminacije reakcijske mešanice. Dolžino pomnoženih odsekov pa smo preverili s pomočjo velikostnega standarda (na sliki 12 vidno kot »lestvica«). Spodnja lisa na »lestvici« predstavlja dolžino 50 bp, vsaka naslednja lisa pa še dodatnih 50 bp. Iz »lestvice« lahko vidimo, da so lise na gelu velike nekje med 200 in 250 bp, ker se nahajajo med 4. in 5. liso na velikostnem standardu. V preglednici II lahko vidimo, da je ekson 12 velik 237 bp. To pomeni, da dolžina pomnoženih odsekov ustreza predvideni velikosti.



Slika12: Fotografirani agarozni gel, na katerem so pomnoženi vzorci eksona 12.

Seveda pa vedno vse lise niso bile enako močno obarvane ali pa se celo nekaterih lis ni videlo. Možni razlogi za neuspešno pomnoževanje so lahko nezadostno premešana reakcijska mešanica, zaradi česar vsi reagenti niso prisotni v enakih deležih v vseh PCR reakcijskih epruvetah ali pa da vzorec ostane na stenah in ne pride v stik z reakcijsko mešanico. Ogromno je možnosti za neuspešno pomnoževanje in v takih primerih je potrebno ponoviti PCR reakcijo za tiste vzorce, ki se niso pomnožili. Na koncu smo uspeli vse vzorce uspešno pomnožiti.

4.4 Rezultati analize HRM

4.4.1 Optimizacija pogojev metode HRM

Že Millat in sod. so ugotovili, da je optimizacija analize HRM za gen *KCNH2* zahtevna. HRM analizo so namreč uspešno optimizirali za gen *KCNQ1*, pri genu *KCNH2* pa so optimizirali pogoje zgolj za 3 eksone (68). Tudi nam ni uspelo optimizirati pogojev za celoten gen, temveč samo za 6 eksonov. V preglednici XIX so opisani pogoji pomnoževanja in pogoji talilne analize. Uporabili smo enake začetnike kot pri klasični PCR reakciji. Spreminjali smo zgolj temperaturo prileganja oligonukleotidnih začetnikov.

Preglednica XIX: Optimizacija pogojev pomnoževanja in pogoji talilne analize.

Pogoji pomnoževanja		
Začetna denaturacija		95 °C, 5 ´
Pomnoževanje 50 X	Denaturacija	95 °C, 10 ´
	Prileganje začetnikov	60 – 61,5 °C, 25 ´
	Podaljševanje verige	72 °C, 15 ´
HRM	• 70 °C, 1 ´ • postopno višanje temperature do 98 °C, 1 %/s	
Hlajenje		56 °C, ∞

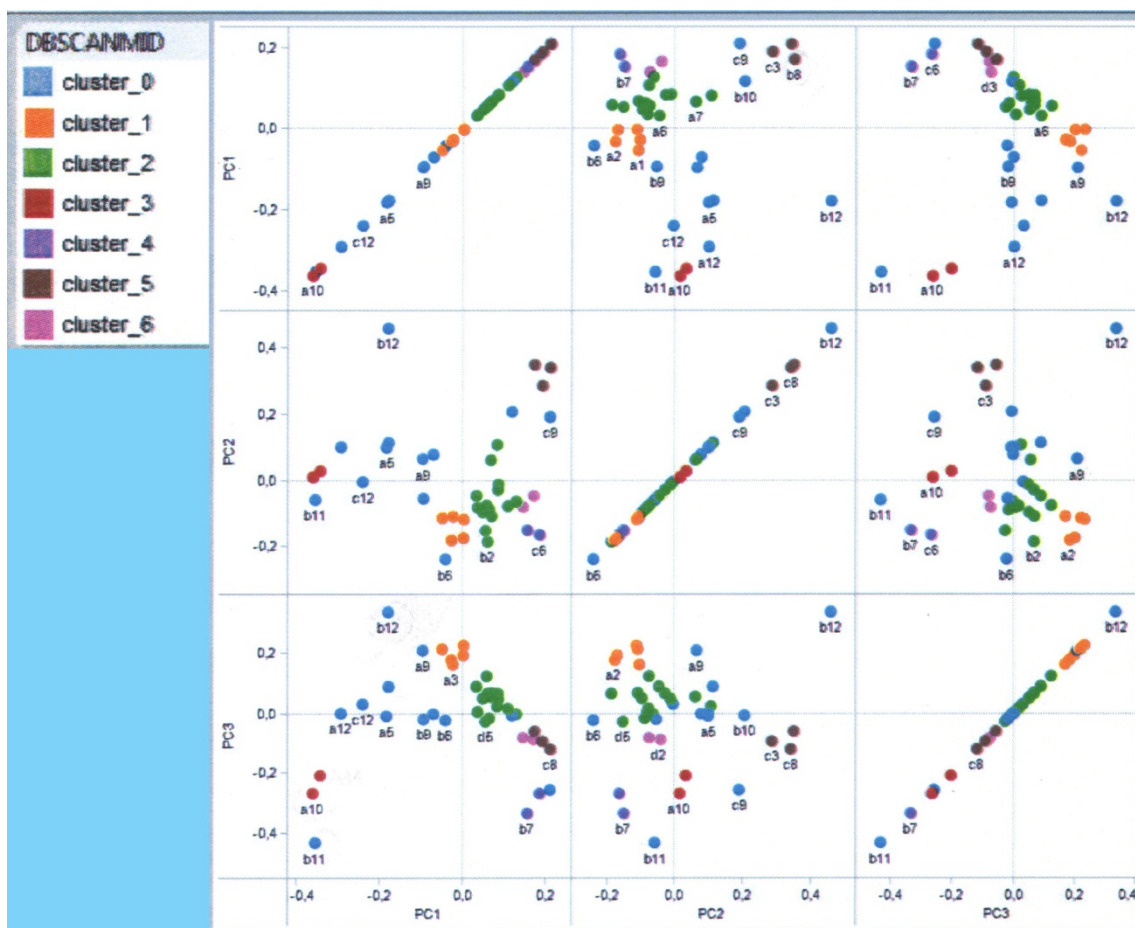
Opomba: Z različnimi temperaturami prileganja začetnikov.

Temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov smo izbrali na podlagi T_m začetnikov. Običajno izberemo približno isto ali za 1 °C višjo temperaturo od T_m , da na ta način povišamo specifičnost. Metodo HRM smo najprej preizkusili za eksone: 1, 2, 3 in 4. Eksonov 1 in 2 nam ni uspelo pomnožiti z metodo HRM. Preizkušali smo različne temperature prileganja, vendar nam ni uspelo, zato smo predvidevali, da je razlog za neuspeh verjetno v tem, da so začetniki vsebovali velik delež nukleotidov GC. Eksona **3** in **4** pa smo uspešno pomnožili in analizirali z metodo HRM in sicer pri temperaturi prileganja začetnikov **60 °C**. Pri tej temperaturi prileganja začetnikov se je uspešno pomnožil tudi ekson **11**. Za ekson **8** smo ugotovili, da je temperatura prileganja začetnikov **61 °C**. Za eksona **5** in **6** pa smo ugotovili, da je ta temperatura **61,5 °C**.

4.4.2 Analiza talilnih krivulj

Na sliki 13 lahko vidimo primer končnega rezultata analize talinih krivulj. Zadnja stopnja analize je statistična obdelava podatkov z metodo PCA ter proces gručenja, da dobimo različne skupine vzorcev. S pomočjo grafa si izberemo vzorce, katere bomo sekvencirali (69). Naš namen je bil namreč s pomočjo metode HRM zmanjšati število vzorcev za sekvenciranje. Metode HRM torej nismo uporabljali kot samostojen test, ampak kot predstopnjo. Izbrali smo

naključne predstavnike različnih skupin ter tiste, ki so najbolj izstopali iz oblikovanih skupin. Naj poudarim, da proces izbire vzorcev zahteva izkušnje, zato so nam pri tem pomagale osebe, ki se s tem ukvarjajo že dlje časa in imajo zato oblikovan občutek, kateri so tisti vzorci, ki bi jih morali pregledati. Glavna prednost metode HRM je ravno v tem, da nam ni potrebno sekvencirati vseh vzorcev, temveč samo predstavnike skupin ter tiste, ki izstopajo in imajo tako veliko verjetnost prisotnosti nukleotidnih sprememb. Tako lahko prihranimo veliko časa.



Slika 13: Končni rezultat obdelave podatkov z metodo PCA in z metodo gručenja.

Pri optimizaciji metode HRM smo naleteli na težave in sicer smo uspešno pomnožili le 6 eksonov. V prihodnosti bi bilo smiselno optimizirati pogoje še za ostale eksone, saj ima metoda HRM precej pozitivnih lastnosti in bi jo morda lahko vpeljali tudi v vsakdanjo klinično prakso. Prednost analize gena z metodo HRM je predvsem v tem, da ni tako

dolgotrajna, kot je metoda za sekvenciranje, ki smo jo vpeljali v klinično prakso. V našem primeru smo uporabljali metodo HRM kot predstopnjo sekvenciranja in glavna prednost je ta, da po končani HRM analizi lahko sekvenciramo samo izbrane vzorce, poleg tega pa lahko po končani reakciji preverimo uspešnost pomnožitve s pomočjo programske opreme in nam ni potrebno tega preverjati z agarozno elektroforezo, s čimer se tudi zmanjša možnost kontaminacije, ker nam ni potrebno odpirati reakcijskih epruvet. Vendar pa smo poleg težav z optimizacijo, imeli težave tudi pri sami izbiri vzorcev po analizi talilnih krivulj. Nismo namreč dobili jasno definiranih gruč, zato smo za vsak slučaj sekvencirali večino vzorcev, kar pa nam je vzelo precej časa. Ugotovili smo, da je bila težava predvsem v premajhnem številu vzorcev, zato bi naslednjič morali za analizo HRM izbrati več vzorcev.

4.5 Rezultati sekvenciranja po Sangerju

4.5.1 Sekvenčna reakcija

Pri sekvenčni reakciji uporabljamo samo 1 oligonukleotidni začetnik, zato da se sintetizira le 1 veriga DNA. Eksperimentalno smo ugotavljali, da za skoraj vse eksone dobimo lepše sekvence, če uporabljamo oligonukleotidni začetnik F, edino pri eksonu 2 smo ugotovili, da dobimo lepše sekvence, če uporabljamo oligonukleotidni začetnik R. V preglednici XX so predstavljene končne ugotovitve. Kadar pa na določenem odseku nismo dobili lepih sekvenc ali pa kadar smo odkrili nukleotidno spremembo, smo morali reakcijo ponoviti še z drugim začetnikom, da smo s tem pogledali sekvenco še iz druge strani.

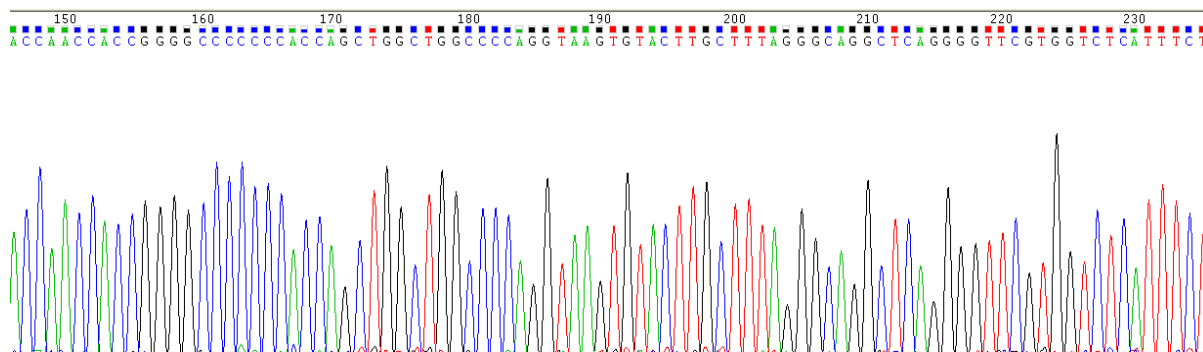
Preglednica XX: Izbor oligonukleotidnih začetnikov za posamezne eksone

Začetnik F	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Začetnik R	2														

4.5.2 Analiza odsekov na genetskem analizatorju ABI 3500

Končni rezultat sekvenčne reakcije je elektroferogram, ki nam prikaže nukleotidno zaporedje vzorca. Elektroferograme dobimo s pomočjo sekvenatorja s kapilarno elektroforezo. Na sliki

14 je primer elektroferograma. Kot lahko vidimo, so nukleotidi predstavljeni z različnimi barvami in sicer zeleni vrhovi predstavljajo A, rdeči T, modri C, črni pa G.



Slika 14: Primer elektroferograma (70).

Seveda elektroferogrami pri našem raziskovalnem delu niso bili zmeraj tako jasni in lepi kot kaže slika 14. Velikokrat so bili nejasni, bodisi z motečim ozadjem ali pa so bili vrhovi enostavno previsoki oz. preširoki. Možni razlogi so lahko bili preveč DNA ali pa nekvalitetna precipitacija sekvenčne reakcije, s katero odstranimo nevgrajene ddNTP skupaj z vezanim barvilom, ki prav tako vpliva na kvaliteto elektroferograma. V takih primerih smo morali ponavljati sekvenčno reakcijo.

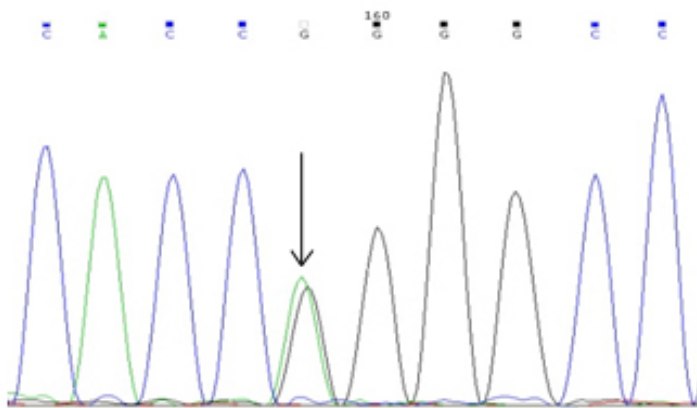
4.6 Interpretacija rezultatov sekvenciranja

V tem poglavju bomo predstavili vse spremembe nukleotidnega zaporedja, ki smo jih našli pri našem raziskovalnem delu ter njihov klinični pomen. Pri tistih spremembah nukleotidnega zaporedja, ki so spremenile aminokislino, sem dodala tudi sliko elektroferograma.

4.6.1 p.Arg148Gln

Pri preiskovancu A9 smo v eksonu 3 opredelili heterozigotno nukleotidno spremembo c.443G>A, ki na mestu 148 spremeni aminokislino arginin v glutamin. Sprememba je prikazana na sliki 15. Nukleotidna sprememba v bazi mutacij HGMD še ni opisana, prav tako je ni v bazi polimorfizmov dbSNP za gen *KCNH2*. Na istem mestu je, kot patološka, opisana sprememba p.Arg148Trp (71). Kliničnega pomena p.Arg148Gln še ne poznamo. Arginin je

polarna, pozitivno nabita aminokislina, z bazičnim značajem. Glutamin je prav tako polarna, a nenabita aminokislina. Zamenjava arginina z glutaminom malo spremeni polarnost in kaže premik v hidrofobnosti od -4,5 na -3,5 po Kyte-Doolittle formuli. S to formulo lahko računamo hidropatske lastnosti aminokislin. Vsaka aminokislina ima po tej formuli določeno vrednost in bolj kot je ta vrednost pozitivna, bolj je aminokislina hidrofobna (68, 69). Glede na to, da se sprememba nahaja na N-terminalnem koncu, je možno, da je to genetska različica negotovega oz. nejasnega kliničnega pomena (VUS). Verjetnost patogenosti za spremembe s spremenjenim pomenom, ki se nahajajo na N-terminalnem koncu, je manjša oz. enaka 50 % (10).

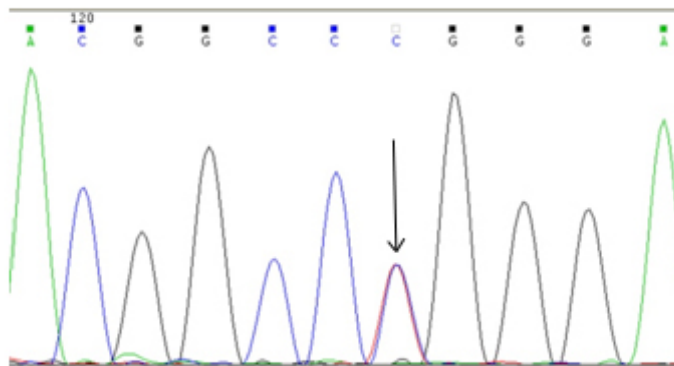


Slika15: Heterozigotna nukleotidna sprememba c.443G>A na elektroferogramu.

4.6.2 p.Arg176Trp

Pri preiskovanki D6 smo v eksonu 4 opredelili nukleotidno spremembo c.526C>T, ki spremeni aminokislino arginin na mestu 176 v triptofan. Sprememba je prikazana na sliki 16. Arginin, ki je velika, polarna, nabita aminokislina z bazičnimi lastnostmi, se spremeni v triptofan, ki je velika, nepolarna, aromatska aminokislina. Po Kyte-Doolittle formuli hidrofobnost naraste iz -4,5 na -0,9 (73). Nukleotidno spremembo so prvič opisali kot patološko Swan in sod. leta 1999 (74). Nasprotno je bila 2013 objavljena študija, pri kateri so na modelnem organizmu (test na ribah zebričah) preizkušali patogenost različice, vendar je niso dokazali in spremembo umestili med benigne (75). Glede na to, da se sprememba nahaja

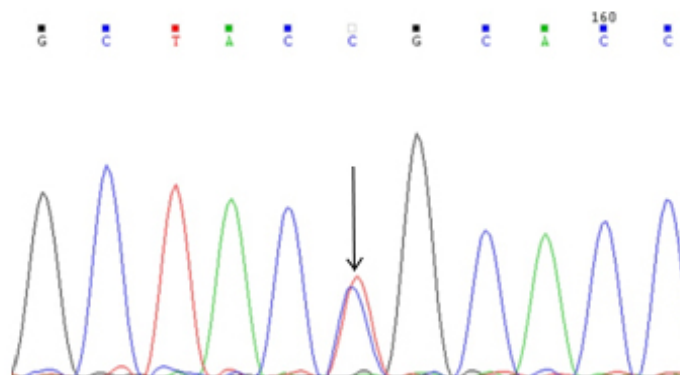
na N-terminalnem koncu, je možno, da je to genetska različica negotovega oz. nejasnega kliničnega pomena za bolnika (10). Genetsko preiskavo smo v nadaljevanju naredili tudi pri družinskih članih preiskovanke D6 s klinično sliko in tudi pri njih opredelili to nukleotidno spremembo. Iz tega bi lahko sklepali, da sprememba očitno povzroča klinično sliko in da je patogena.



Slika16: Heterozigotna nukleotidna sprememba c.526C>T na elektroferogramu.

4.6.3. p.Arg328Cys

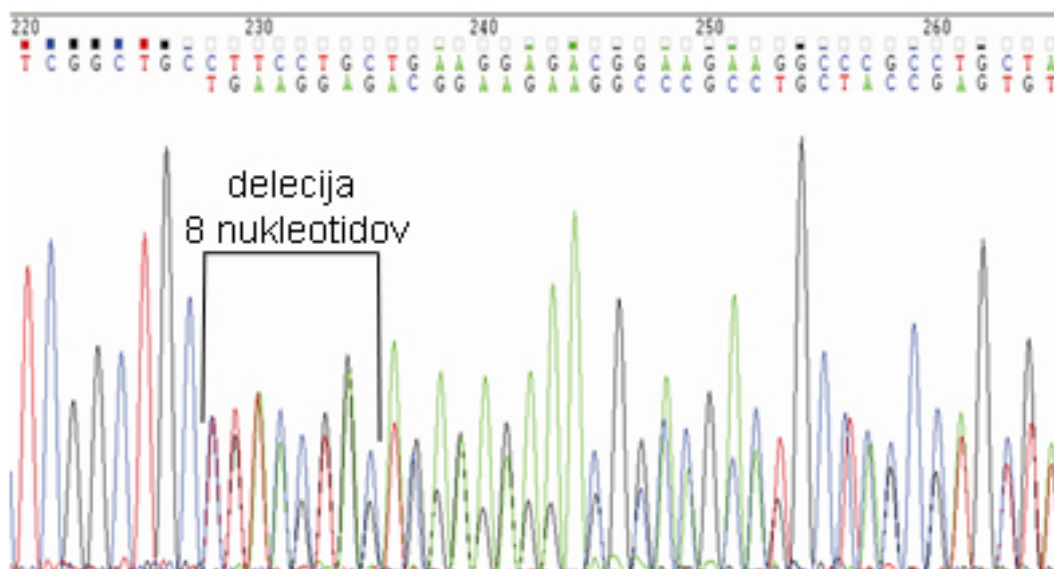
Pri preiskovankah A5 in C2 smo v eksonu 5 opredelili nukleotidno spremembo c.982C>T, ki na mestu 328 povzroči zamenjavo arginina s cisteinom. Sprememba je prikazana na sliki 17. Velika, polarna, pozitivno nabita, bazična aminokislina arginin se spremeni v srednje veliko, polarno, nenabito aminokislino cistein. Po Kyte-Doolittle formuli hidrofobnost naraste iz -4,5 na 2,5 (73). Sprememba je v HGMD podatkovni bazi zavedena kot sprememba, ki povzroča klinično sliko LQTS (70, 71). To spremembo smo opredelili pri dveh preiskovankah, ki sta sestri.



Slika17: Heterozigotna nukleotidna sprememba c.98C>T na elektroferogramu.

4.6.4 p.Ala430fs

Pri preiskovanki D7 smo v eksonu 7 opredelili delecijo 8 nukleotidov c.1290_1297delCTTCCTGC, ki spremeni bralni okvir in ustvari novo sekvenco aminokislin. Mutacije s spremembo bralnega okvirja ustvarijo nov terminacijski (STOP) kodon ter s tem spremenijo dolžino produkta (zmanjšajo ali povečajo). Najpogosteje uvedejo prezgodnji STOP kodon ter s tem okrnijo protein. Verjetnost patogenosti je več kot 90 % (ne glede na lokacijo spremembe). Pri mutacijah s spremenjenim pomenom, kjer se zamenja samo ena aminokislina, pa ni nujno, da bo sprememba patogena. Sprememba je prikazana na sliki 18. Mutacija v bazi HGMD še ni opisana, vendar je glede na vrsto mutacije najverjetneje vzrok za klinično sliko pri bolnici. Genetsko preiskavo smo v nadaljevanju naredili tudi pri družinskih članih s klinično sliko in tudi pri njih opredelili to nukleotidno spremembo.



Slika18: Delecija 8 nukleotidov c.1290_1297delCTTCCTGC na elektroferogramu.

4.6.5 p.Ile489=

V eksonu 7 smo odkrili polimorfizem p.Ile489= (rs147126965), ki pri zdravih kontrolah ne vpliva na podaljšanje dobe QT. 5 preiskovancev je bilo homozigotov za ta polimorfizem in sicer A1, A4, C1, C3 in C7. 10 preiskovancev je bilo heterozigotov za ta polimorfizem in sicer A2, A5, A9, A10, A12, B6, C2, C6, C8 in D6.

4.6.6 p.Phe513=

V eksonu 7 smo odkrili polimorfizem p.Phe513= (rs1805120), ki pri zdravih kontrolah ne vpliva na podaljšanje dobe QT. 5 preiskovancev je bilo homozigotov za ta polimorfizem in sicer A1, A4, C1, C3 in C7. 8 preiskovancev je bilo heterozigotov za ta polimorfizem in sicer A2, A9, A10, A12, B6, C6 C8 in D6.

4.6.7 p.Ile521=

Pri preiskovancu A1 smo v eksonu 8 našli p.Ile521=. Klinični pomen ni znan. Ta sprememba verjetno ne povzroča bolezni.

4.6.8 p.Leu564=

V eksonu 8 smo odkrili polimorfizem p.Leu564= (rs1805121), ki pri zdravih kontrolah ne vpliva na podaljšanje dobe QT. 6 preiskovancev je bilo homozigotov za ta polimorfizem in sicer A1, A2, A4, C1, C3 in C7. 15 preiskovancev je bilo heterozigotov za ta polimorfizem in sicer A3, A5, A9, A10, A12, B3, B6, B8, B12, C2, C4, C6, C8, D3 in D6.

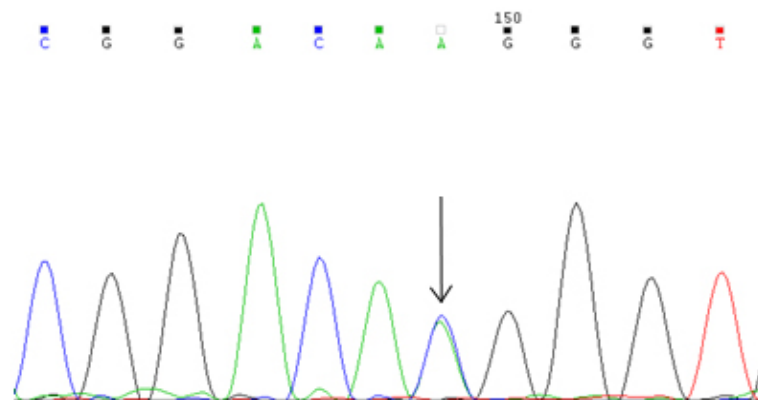
4.6.9 p.Tyr652=

V eksonu 9 smo odkrili polimorfizem p.Tyr652=, ki pri zdravih kontrolah ne vpliva na podaljšanje dobe QT. 7 preiskovancev je bilo homozigotov za ta polimorfizem in sicer A1, A4, B6, C3, C7, C10 in D3. 21 preiskovancev je bilo heterozigotov za ta polimorfizem in sicer A3, A5, A7, A8, A9, A10, A12, B1, B3, B5, B7, B8, B11, B12, C2, C5, C6, C8, C11, D1 in D6.

4.6.10 p.Lys897Thr

V eksonu 12 smo odkrili polimorfizem p.Lys897Thr (rs1805123), za katerega je opisano, da vpliva na dolžino intervala QT pri zdravih in ga zato uvrščamo med polimorfizme, ki so povezani z boleznijo (74, 75). Lizin, ki je polarna, pozitivno nabita, bazična aminokislina se spremeni v treonin, ki je polarna nenabita aminokislina. Po Kyte-Doolittle formuli hidrofobnost naraste iz

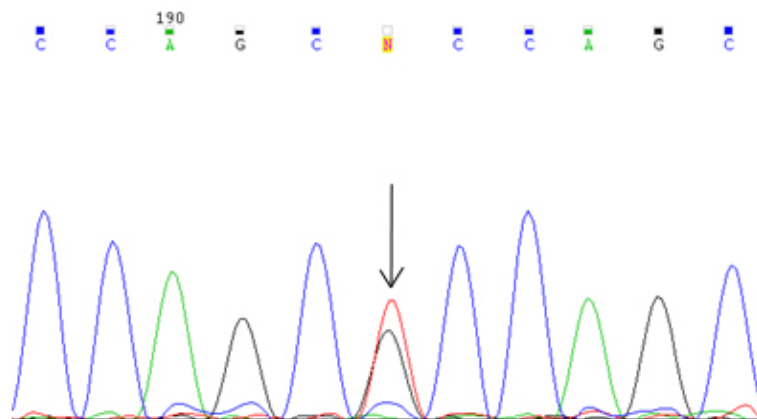
-3,9 na -0,7 (71). Polimorfizem c.2690A>C je prikazan na sliki 19. Preiskovanec C10 je bil homozigot za ta polimorfizem. 12 preiskovancev je bilo heterozigotov za ta polimorfizem in sicer A7, A8, B1, B5, B6, B7, B11, C5, C11, D1, D3 in D7. Ta polimorfizem se pojavlja v 23 % pri zdravi populaciji.



Slika 19: Heterozigoten polimorfizem c.2690A>C na elektroferogramu.

4.6.11 p.Arg1047Leu

V eksonu 14 smo odkrili heterozigotni polimorfizem p.Arg1047Leu (rs36210420), ki spremeni polaren, pozitivno nabit, bazičen arginin v levcin, ki je nepolarna aminokislina. Kyte-Doolittle hidrofobnost naraste iz -4,5 na 3,8. Številne študije ta polimorfizem različno opredeljujejo in pogosto povezujejo z z zdravili povzročeno *torsades de pointes* (TdP) morfologijo. Nosilci spremembe imajo višjo pojavnost TdP ob jemanju zdravil (76). Kakšna je vloga polimorfizma v homozigotnem stanju, pa v literaturi ni opisano. Študije so pokazale, da se posledice polimorfizma kažejo v 10 mV pozitivnem premiku dinamičnega ravnovesja aktivacijske krivulje ter v počasnejši kinetiki aktivacije oz. inaktivacije (80). Polimorfizem c.3140G>T je prikazan na sliki 20. 2 preiskovanca sta bila heterozigota za ta polimorfizem in sicer B12 in C4. Ta polimorfizem se pojavlja v 2 % pri zdravi populaciji.



Slika 20: Heterozigoten polimorfizem c.3140G>T na elektroferogramu.

5. Sklep

Glavni cilj naše magistrske naloge je bil vpeljava molekularno genetske preiskave gena *KCNH2* v klinično prakso.

- Uspešno smo optimizirali metodo za sekvenciranje za vseh 16 eksonov gena in za optimizirano genetsko preiskavo napisali standardni operativni postopek (SOP) z naslovom Analiza gena *KCNH2* pri bolnikih s podaljšano dobo QT; omenjeni SOP bodo uporabljali v laboratoriju Pediatrične klinike UKC Ljubljana.
- Optimizirali smo metodo HRM za 6 eksonov in sicer kot presejalno metodo, s katero izberemo vzorce, ki odstopajo iz oblikovanih skupin ali gruč in jih sekvenciramo.
- S pomočjo vpeljane metode smo analizirali gen na vzorcih 43 bolnikov; pri tem smo odkrili 11 različnih sprememb od tega 2 spremembi še nista bili opisani, pri 4 bolnikih pa smo lahko z odkrito nukleotidno spremembo potrdili klinično sliko LQTS2.
- Bolnikom smo na osnovi ugotovitev napisali izvide, ki smo jih tudi klinično interpretirali.
- V prihodnosti bi bilo smiselno odkriti še neznane nukleotidne spremembe, ki povzročajo LQTS, saj še vedno za 15 % do 20 % primerov bolezni ne poznamo nukleotidnih sprememb (13), kar pa je za bolezen s tako resnimi kliničnimi znaki še vedno veliko.

6. Literatura

1. Bresjanac M, Rupnik M. Patofiziologija s temelji fiziologije. Ljubljana: Inštitut za patološko fiziologijo; 2002:19-27.
2. <http://www.lek.si/media/storage/cms/images/2012/08/24/13/18/17/kako-je-zgrajeno-srce.gif> (18.9.2013)
3. Klabunde R. Cardiovascular Physiology Concepts. Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 257.
4. <http://www.austincc.edu/apreview/PhysText/Cardiac.html> (3.5.2014)
5. <http://www.bris.ac.uk/phys-pharm/research/cardio/channels> (8.11.2013)
6. Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12th edition. Philadelphia, Pa: Saunders; 2010:1120.
7. Garcia TB, Garcia VPVP at the U of MMFTB, Holtz N. 12-Lead ECG. Jones & Bartlett Publishers; 2011:550.
8. <http://www.web-books.com/eLibrary/ON/B0/B7/06MLongQT.html> (3/5/2014)
9. <http://www.bostonscientific.com/lifebeat-online/heart-smart/long-qt.html> (3/5/2014)
10. Tester DJ, Ackerman MJ. Genetic Testing for Potentially Lethal, Highly Treatable Inherited Cardiomyopathies/Channelopathies in Clinical Practice. Circulation. 2011 Mar 8;123(9):1021–37.
11. Shimizu W. Clinical Impact of Genetic Studies in Lethal Inherited Cardiac Arrhythmias. Circ J. 2008;72(12):1926–36.
12. <http://ibmi3.mf.uni-lj.si/mmd/cardio-a/slo/sz-50/sldr00025.html> (3.5.2014)
13. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, et al. HRS/EHRA Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for the Channelopathies and Cardiomyopathies This document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). Europace. 2011 Aug 1;13(8):1077–109.
14. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. Circulation. 1999 Feb 2;99(4):529–33.
15. Vincent, MD GM. The Molecular Genetics of the Long Qt Syndrome: Genes Causing Fainting and Sudden Death. Annu Rev Med. 1998;49(1):263–74.

16. Tester DJ, Ackerman MJ. Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Jan 16;49(2):240–6.
17. Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, et al. Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation*. 2007 Jan 23;115(3):361–7.
18. Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L, Pedrazzini M, Besana A, Bosi G, et al. Prevalence of the Congenital Long QT Syndrome. *Circulation*. 2009 Nov 3;120(18):1761–7.
19. Priori SG, Napolitano C. Genetics of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 May;1015:96–110.
20. Ruan Y, Liu N, Napolitano C, Priori SG. Therapeutic Strategies for Long-QT Syndrome Does the Molecular Substrate Matter? *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2008 Oct 1;1(4):290–7.
21. Schwartz PJ, Spazzolini C, Crotti L, Bathen J, Amlie JP, Timothy K, et al. The Jervell and Lange-Nielsen syndrome: natural history, molecular basis, and clinical outcome. *Circulation*. 2006 Feb 14;113(6):783–90.
22. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm Off J Heart Rhythm Soc*. 2005 May;2(5):507–17.
23. Koopmann TT, Alders M, Jongbloed RJ, Guerrero S, Mannens MMAM, Wilde AAM, et al. Long QT syndrome caused by a large duplication in the KCNH2 (HERG) gene undetectable by current polymerase chain reaction-based exon-scanning methodologies. *Heart Rhythm Off J Heart Rhythm Soc*. 2006 Jan;3(1):52–5.
24. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, et al. Risk Stratification in the Long-QT Syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348(19):1866–74.
25. <http://www.qtsyndrome.ch/faq.html> (5.5.2014)
26. Medeiros-Domingo A, Iturralde-Torres P, Ackerman MJ. [Clinical and genetic characteristics of long QT syndrome]. *Rev Esp Cardiol*. 2007 Jul;60(7):739–52.
27. Gollob MH, Blier L, Brugada R, Champagne J, Chauhan V, Connors S, et al. Recommendations for the use of genetic testing in the clinical evaluation of inherited cardiac arrhythmias associated with sudden cardiac death: Canadian Cardiovascular Society/Canadian Heart Rhythm Society joint position paper. *Can J Cardiol*. 2011 Apr;27(2):232–45.

28. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, et al. Genotype-Phenotype Correlation in the Long-QT Syndrome Gene-Specific Triggers for Life-Threatening Arrhythmias. *Circulation*. 2001 Jan 2;103(1):89–95.
29. Shimizu W, Moss AJ, Wilde AAM, Towbin JA, Ackerman MJ, January CT, et al. Genotype-phenotype aspects of type 2 long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Nov 24;54(22):2052–62.
30. Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Benhorin J, et al. Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2000 Feb 15;101(6):616–23.
31. Compton SJ, Lux RL, Ramsey MR, Strelich KR, Sanguinetti MC, Green LS, et al. Genetically defined therapy of inherited long-QT syndrome. Correction of abnormal repolarization by potassium. *Circulation*. 1996 Sep 1;94(5):1018–22.
32. Priori SG, Barhanin J, Hauer RNW, Haverkamp W, Jongsma HJ, Kleber AG, et al. Genetic and Molecular Basis of Cardiac Arrhythmias: Impact on Clinical Management Parts I and II. *Circulation*. 1999 Feb 2;99(4):518–28.
33. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Keating MT. Genomic Structure of Three Long QT Syndrome Genes:KVLQT1, HERG,andKCNE1. *Genomics*. 1998 Jul 1;51(1):86–97.
34. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/KCNH2> (24.10.2013)
35. Huffaker SJ, Chen J, Nicodemus KK, Sambataro F, Yang F, Mattay V, et al. A primate-specific, brain isoform of KCNH2 affects cortical physiology, cognition, neuronal repolarization and risk of schizophrenia. *Nat Med*. 2009 Maj;15(5):509–18.
36. Guasti L, Crociani O, Redaelli E, Pillozzi S, Polvani S, Masselli M, et al. Identification of a posttranslational mechanism for the regulation of hERG1 K⁺ channel expression and hERG1 current density in tumor cells. *Mol Cell Biol*. 2008 Aug;28(16):5043–60.
37. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?symbol=KCNH2> (3.5.2014)
38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3757> (3.5.2014)
39. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*. 2006 Mar 23;440(7083):463–9.
40. Vandenberg JI, Perry MD, Perrin MJ, Mann SA, Ke Y, Hill AP. hERG K⁺ Channels: Structure, Function, and Clinical Significance. *Physiol Rev*. 2012 Jul 1;92(3):1393–478.
41. Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature*. 1996 Feb 29;379(6568):833–6.

42. Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet.* 2001 Jul;109(1):121–4.
43. Čelhar T, Ferk P, Mlinarič Raščan I. Genetska raznolikost kot osnova uporabnosti farmakogenomike v klinični praksi. *Farm Vestn.* 58:149–54.
44. Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA, Harris-Kerr C, Pungliya MS, Alders M, et al. Genetic Testing for Long QT Syndrome - Distinguishing Pathogenic Mutations from Benign Variants. *Circulation.* 2009 Nov 3;120(18):1752–60.
45. Gianulis EC, Trudeau MC. Rescue of Aberrant Gating by a Genetically Encoded PAS (Per-Arnt-Sim) Domain in Several Long QT Syndrome Mutant Human Ether-á-go-go-related Gene Potassium Channels. *J Biol Chem.* 2011 Jun 24;286(25):22160–9.
46. Schwartz PJ, Crotti L. QTc Behavior During Exercise and Genetic Testing for the Long-QT Syndrome. *Circulation.* 2011 Nov 15;124(20):2181–4.
47. Bazett HC. An analysis of time relations of electrocardiograms. *Heart.* 1920;7:353–67.
48. Vyas H, Ackerman MJ. Epinephrine QT stress testing in congenital long QT syndrome. *J Electrocardiol.* 2006 Oct;39(4 Suppl):S107–113.
49. http://docsfiles.com/pdf_flexigene_dna_handbook.html (26.7.2013)
50. McPherson M, Møller S. PCR. Garland Science; 2007:305.
51. http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/pcr.html (6.5.2014)
52. Vossen RHAM, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening. *Hum Mutat.* 2009;30(6):860–6.
53. Patrinos G, Ansorge W. Molecular Diagnostics. Academic Press; 2009:618.
54. <http://www.gene-quantification.de/hrm.html> (6.5.2014)
55. Kovač J, Trebušak Podkrajšek K, Battelino T. Optimized high resolution melting (HRM) analysis algorithm improves detection rate of genetic variants. *Molecular medicine and biotechnology: book of abstracts.* Ljubljana: Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani; 2012:88.
56. <file:///C:/DOCUME~1/Tadeja/LOCALS~1/Temp/EN-Type-it-HRM-PCR-Handbook.pdf> (6.10.2013)
57. Muršak V. Povezanost polimorfizmov v promotorju in eksonu B v genu PPARG z mineralno kostno gostoto in biokemičnimi kazalci kostne premene. Ljubljana: Diplomaska naloga; 2011:20-35.

58. Reja V, Kwok A, Stone G, Yang L, Missel A, Menzel C, et al. ScreenClust: Advanced statistical software for supervised and unsupervised high resolution melting (HRM) analysis. *Methods*. 2010 Apr;50(4):S10–S14.
59. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry* 2003; 49
60. <http://vlado.fmf.uni-lj.si/vlado/podstat/Mva/PCA.pdf> (6.5.2014)
61. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (6.5.2014)
62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (6.5.2014)
63. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (6.5.2014)
64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (6.5.2014)
65. <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm> (6.5.2014)
66. Černe D, Ostanek B. Biomedicinska analitika I. Učbenik za študente laboratorijske biomedicine. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo; 2012:108-18.
67. <http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.html> (12.10.2013)
68. Millat G, Chanavat V, Créhalet H, Rousson R. Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in Long QT Syndrome. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2011 Jan 14;412(1-2):203–7.
69. <http://ehp.niehs.nih.gov/0901764/> (12.5.2014)
70. <http://www.intechopen.com/books/latest-research-into-quality-control/postmortem-dna-qc-considerations-for-sequence-and-dosage-analysis-of-genes-implicated-in-long-qt-syn> (12.5.2014)
71. Millat G, Kugener B, Chevalier P, Chahine M, Huang H, Malicier D, et al. Contribution of long-QT syndrome genetic variants in sudden infant death syndrome. *Pediatr Cardiol*. 2009 May;30(4):502–9.
72. Fasman GD. *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*. Springer; 1989:820.
73. <http://cellbiologyolm.stevegallik.org/node/32> (13.5.2014)
74. Swan H, Viitasalo M, Piippo K, Laitinen P, Kontula K, Toivonen L. Sinus node function and ventricular repolarization during exercise stress test in long QT syndrome patients with KvLQT1 and HERG potassium channel defects. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Sep;34(3):823–9.

75. Jou CJ, Barnett SM, Bian J-T, Weng HC, Sheng X, Tristani-Firouzi M. An In Vivo Cardiac Assay to Determine the Functional Consequences of Putative Long QT Syndrome Mutations. *Circ Res*. 2013 Mar 1;112(5):826–30.
76. Chevalier P, Bellocq C, Millat G, Piqueras E, Potet F, Schott J-J, et al. Torsades de pointes complicating atrioventricular block: Evidence for a genetic predisposition. *Heart Rhythm*. 2007 Feb 1;4(2):170–4.
77. Anderson CL, Delisle BP, Anson BD, Kilby JA, Will ML, Tester DJ, et al. Most LQT2 Mutations Reduce Kv11.1 (hERG) Current by a Class 2 (Trafficking-Deficient) Mechanism. *Circulation*. 2006 Jan 24;113(3):365–73.
78. Nof E, Cordeiro JM, Perez GJ, Scornik FS, Calloe K, Love B, et al. A Common Single Nucleotide Polymorphism Can Exacerbate Long QT Type 2 Syndrome Leading to Sudden Infant Death. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Apr;3(2):199–206.
79. Crotti L, Lundquist AL, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, De Ferrari GM, et al. KCNH2-K897T is a genetic modifier of latent congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2005 Aug 30;112(9):1251–8.
80. Sun Z, Milos PM, Thompson JF, Lloyd DB, Mank-Seymour A, Richmond J, et al. Role of a KCNH2 polymorphism (R1047 L) in dofetilide-induced Torsades de Pointes. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Nov;37(5):1031–9.
81. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_065854.pdf (13.5.2014)