

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

PETRA FERKOV

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA



PETRA FERKOV

**POVEZANOST POLIMORFIZMA -13910C>T V GENU ZA LAKTAZO Z
MINERALNO KOSTNO GOSTOTO**



ASSOCIATION OF -13910C>T POLYMORPHISM IN LACTASE GENE WITH
BONE MINERAL DENSITY

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. ter somentorstvom asist. dr. Vida Mlakar, univ. dipl. mikr.

ZAHVALA

Prof. dr. Janji Marc se zahvaljujem za mentorstvo, strokovne nasvete, pomoč pri dokončanju naloge in spodbudne besede.

Sodelovanje s somentorjem asist. dr. Vidom Mlakar v številnih projektih je bilo vedno zanimivo in poučno, zato se mu zahvaljujem za novo prejeta znanje in nasvete pri nastajanju te naloge.

Zahvaljujem se doc. dr. Igorju Locatelli za pomoč pri statistični obdelavi naloge in nasvete pri razpravi; članoma komisije, izr. prof. dr. Iztoku Grabnar in izr. prof. dr. Janezu Mravljak za hitro popravilo naloge; sodelavcem: asist. dr. Simoni Mencej Bedrač za motivacijo in podporo v času študija, asist. dr. Ireni Prodan Žitnik, doc. dr. Nataši Karas Kuželički in asist. dr. Tilnu Kranjc za strokovne nasvete ter asist. dr. Jasni Omersel in doc. dr. Barbari Ostanek za podporo.

Posebna zahvala gre sodelavki in prijateljici Manji Cedilnik, s katero sva se skupaj podali v študij in mi je ves čas stala ob strani ter me spodbujala. Iskren objem in hvala iz srca.

Najdragocenejša pa je bila podpora moje mame, ki je v času, ko sva z možem ponovno sedla v študijske klopi, skrbela za sinova Grega in Nejca ter hčerko Evo, za kar sem ji neizmerno hvaležna.

Andreju in otrokom hvala za potrpežljivost, razumevanje in podporo tekom študija. Obračamo nov list in upam, da bo sedaj ta še bolj pisano popisan.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo z naslovom *Povezanost polimorfizma - 13910C>T v genu za laktazo z mineralno kostno gostoto* samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. ter somentorstvom asist. dr. Vida Mlakar, univ. dipl. mikr.

Ljubljana, 2016

Petra Ferkov

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Član magistrske komisije: izr. prof. dr. Janez Mravljak

KAZALO

1. UVOD	1
1.1. KOSTNA PRENOVA IN VZDRŽEVANJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE	1
1.2. MOTNJE V KOSTNI PREMENI IN BOLEZNI KOSTI	2
1.2.1. Osteoporoza	2
1.3. LAKTAZNA NE-PERZISTENCA	4
1.3.1. Razširjenost laktazne ne-perzistence	5
1.3.2. Vzroki za pomanjkanje encima laktaze	6
1.3.3. Gen za laktazo	7
1.3.4. Laktazna intoleranca in potencialni vpliv na kostno prenovo	10
1.3.5. Določanje statusa laktazne ne-perzistence	10
2. NAMEN DELA	12
3. METODE IN MATERIALI	13
3.1. VZORCI	13
3.2. IZOLACIJA DNA	13
3.3. ALELNO-SPECIFIČNI PCR	14
3.3.1. Genotipizacija polimorfizma LCT-13910 C>T z metodo AS- PCR	15
3.4. ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV	19
3.4.1. Genotipizacija polimorfizma LCT-13910C>T z RFLP	20
3.5. SEKVENČNA ANALIZA	27
3.5.1. Priprava PCR produkta	27
3.5.2. Čiščenje PCR produktov	27
3.5.3. Merjenje koncentracije DNA v očiščenih PCR produktih	29
3.5.4. Sekvenčna reakcija	30
3.6. STATISTIČNA ANALIZA	35
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	36
4.1. RAZVOJ METODE	36
4.1.1. Oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov	36
4.1.2. Izbor najustreznejših reakcijskih pogojev	38
4.1.3. Ocena točnosti in specifičnosti	42
4.1.4. Ocena primerljivosti rezultatov razvite metode z RFLP	43
4.1.5. Potrditev genotipov s sekvenciranjem	44
4.2. KLINIČNI POMEN POLIMORFIZMA LCT-13910C>T ZA MINERALNO	48

KOSTNO GOSTOTO	48
4.2.1. Hardy Weinbergovo ravnotežje	49
4.2.2. Ocena normalnosti porazdelitve	52
4.2.3. Primerjava vrednosti MKG med skupinama različnih spolov	53
4.2.4. Ocena povezanosti negenetskih in genetskih dejavnikov z mineralno kostno gostoto.....	54
5. SKLEP	61
6. LITERATURA	62
7. PRILOGE.....	66

POVZETEK

Laktazna ne-perzistenca je fiziološko stanje, kjer gre za znižano aktivnost encima laktaze v tankem črevesju po prenehanju dojenja. Neprebavljena laktoza povzroča prebavne težave, kar ima za posledico odklanjanje mleka in mlečnih izdelkov v prehrani. Zaradi tega je zmanjšan vnos kalcija v telo, kar lahko negativno vpliva na homeostazo kosti. Osteoporoza je bolezen s povečano krhkostjo kosti in najpogostejša metabolna bolezen kostnega tkiva. Opredeljuje jo nizka kostna masa ter posledično tanjša in porozna kompaktna kostnina ter izguba trabekularnega kostnega tkiva. Opredelimo jo z merjenjem mineralne kostne gostote skeleta (MKG), ki trenutno predstavlja najpomembnejši kazalec tveganja za osteoporozni zlom.

Namen naše magistrske naloge je bil ugotoviti ali obstaja povezava med polimorfizmom -13910C>T v genu za laktazo in mineralno kostno gostoto pri starejših preiskovancih. V ta namen smo želeli vpeljati nov natančen hitrejši in cenejši postopek, ki bi zamenjal zamudno in dolgotrajno metodo analize dolžin restrikcijskih fragmentov za genotipizacijo polimorfizma *LCT*-13910C>T. Z novo alelnu-specifično metodo PCR smo 623 preiskovancem, ki jim je bila predhodno izmerjena MKG kolka, ledvenih vretenc in vratu stegnenice določili genotipe polimorfizma *LCT*-13910C>T ter s statistično analizo preverili njihov vpliv na MKG. Razdelili smo jih na podskupino pomenopavznih žensk ($n = 517$) in starejših moških ($n = 106$).

Genotipske frekvence pri pomenopavznih preiskovankah so bile za genotipe CC, CT in TT 38,9% ($n = 201$), 45,6% ($n = 236$) in 15,5% ($n = 80$) ter za moške 37,7% ($n = 40$), 44,3% ($n = 47$) in 17,9% ($n = 19$) in se niso značilno razlikovale. Pri pomenopavznih preiskovankah smo dokazali vpliv polimorfizma na MKG kolka ($p = 0,001$) in vratu stegnenice ($p = 0,018$), medtem ko se je v predelu ledvenih vretenc ta vpliv le nakazoval ($p = 0,058$). Za moško populacijo teh vplivov nismo mogli dokazati.

Razvili smo zanesljivo metodo za genotipizacijo polimorfizma *LCT*-13910C>T. Naši rezultati so pokazali, da je pri pomenopavznih ženskah polimorfizem *LCT*-13910C>T povezan z nižjo MKG kolka in vratu stegnenice, pri moških pa te povezanosti nismo dokazali. Zaključimo lahko, da predstavlja genetska laktazna ne-perzistenca dodaten dejavnik tveganja za pomenopavzno osteoporozo.

Ključne besede: laktazna ne-prezistenca, osteoporoza, *LCT*-13910C>T, MKG, alelnu-specifična metoda PCR

ABSTRACT

Lactase non-persistence is a physiological condition in which the activity of enzyme lactase in the small intestine is reduced after weaning. The undigested lactose causes digestive problems, resulting in the rejection of milk and milk products in the diet, leading to reduced intake of calcium, which may adversely affect the bone homeostasis. Osteoporosis is a disease with increased bone fragility and is the most common metabolic bone disease. It is characterized by low bone mass, consequently thinner and porous compact bone and loss of trabecular bone. It is diagnosed by measuring bone mineral density of the skeleton (BMD), which currently represents the most important risk factor for osteoporotic fractures.

The aim of this thesis was to find the association between the polymorphism - 13910C>T in the lactase (*LCT*) gene and bone mineral density in elderly subjects. We developed a new, precise, quicker and cheaper allele-specific PCR method where SNPs can be detected using allele-specific PCR primers that have the 3'-end base complementary to the SNP site. An additional set of primers amplify a constant larger fragment and serves as internal positive control for reaction. With the new method we determined genotypes for polymorphism *LCT*-13910C>T in 623 subjects with previously measured BMD of the total hip, lumbar spine and femoral neck. The subjects were divided into subgroups of postmenopausal women (n = 517) and older men (n = 106).

Genotype frequencies for genotypes CC, CT and TT of postmenopausal women were 38.9% (n = 201), 45.6% (n = 236) and 15.5% (n = 80), and for men 37.7% (n = 40), 44.3% (n = 47) and 17.9% (n = 19). They did not differ significantly between subgroups. In postmenopausal women we determined a significant effect of polymorphism on BMD total hip (p = 0.001) and the femoral neck (p = 0.018), while in the lumbar spine this effect was only suggestive (p = 0.058). No significant effects could be observed in a subgroup of men.

We developed a reliable method for genotyping the polymorphism *LCT*-13910C>T. Our results show that in postmenopausal women polymorphism *LCT*-13910C>T is associated with lower BMD at the total hip and femoral neck, therefore we can conclude that genetic lactase non-persistence represents an additional risk factor for postmenopausal osteoporosis.

Keywords: lactase non-persistence, osteoporosis, *LCT*-13910C> T, BMD, allele-specific PCR method

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: <i>Sistemski in lokalni dejavniki, ki uravnavajo kostno remodelacijo</i>	1
Preglednica II: <i>Kostne bolezni glede na MKG</i>	2
Preglednica III: <i>Kriteriji za osteoporozo po merilih SZO</i>	2
Preglednica IV: <i>Relativna moč baznih parov (45)</i>	14
Preglednica V: <i>Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za LCT in notranje kontrole CYP2D6</i>	16
Preglednica VI: <i>Sestava reakcijske zmesi za AS- PCR</i>	16
Preglednica VII: <i>Časovni in temperaturni protokol AS- PCR reakcije</i>	17
Preglednica VIII: <i>Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov</i>	20
Preglednica IX: <i>Sestava reakcijske zmesi za PCR</i>	21
Preglednica X: <i>Časovni in temperaturni protokol reakcije</i>	21
Preglednica XI: <i>Sestava reakcijske zmesi za RFLP reakcijo</i>	25
Preglednica XII: <i>Priprava reakcijske mešanice za sekvenčno analizo</i>	31
Preglednica XIII: <i>Časovni in temperaturni protokol reakcije</i>	32
Preglednica XIV: <i>Priprava STOP mešanice</i>	32
Preglednica XV: <i>Protokol kapilarne elektroforeze za sekvenciranje</i>	33
Preglednica XVI: <i>Primerjava rezultatov genotipizacije med AS-PCR in RFLP</i>	44
Preglednica XVII: <i>Primerjava genotipov med metodo AS-PCR in sekvenčno analizo</i>	47
Preglednica XVIII: <i>Predstavitev osnovnih značilnosti podskupin</i>	48
Preglednica XIX: <i>Frekvence genotipov in alelov pri vseh vzorcih</i>	49
Preglednica XX: <i>Frekvence genotipov in alelov pri podskupini pomenopavzne ženske</i> ...	50
Preglednica XXI: <i>Frekvence genotipov in alelov pri podskupini starejši moški</i>	50
Preglednica XXII: <i>Frekvence genotipov in alelov v različnih populacijah</i>	51
Preglednica XXIII: <i>p vrednosti Kolmogorov-Smirnovskega testa</i>	52
Preglednica XXIV: <i>Vpliv spremenljivk na MKG pri obeh podskupinah</i>	55
Preglednica XXV: <i>Rezultati post hoc testa v podskupini pomenopavzne ženske (n=517)</i> 58	

KAZALO SLIK

Slika 1: Zdrava kostnina in porušena mikroarhitektura kostnih trabekul pri osteoporozi (6)	3
Slika 2: Razgradnja laktoze pod vplivom encima laktaze v tankem črevesju (9)	4
Slika 3: Frekvenca laktaznega ne-perzistentnega fenotipa (10)	6
Slika 4: Kvararna struktura encima LPH (14)	7
Slika 5: Shematski prikaz zorenja proteina LPH (15)	8
Slika 6: Polimorfizmi v genu LCT	9
Slika 7: Princip alelna-specifične PCR reakcije	15
Slika 8: Mesto vezave smernega in protismernega oligonukleotidnega začetnika v 13. intronu gena MCM6	16
Slika 9: Prepoznavno mesto za restrikcijsko endonukleazo BsmFI	25
Slika 10: Potek sekvenčne analize (30)	31
Slika 11: Komponente aparata GenomeLab GeXP	33
Slika 12: Optimizacija AS-PCR reakcije	39
Slika 13: Rezultat ponovne optimizacije AS-PCR reakcije z daljšim časom prileganja	39
Slika 14: Rezultat pomnoževanja PCR produkta pri optimizaciji s smernim oligonukleotidnim začetnikom LCT_wt_F	40
Slika 15: Rezultat genotipizacije z metodo AS-PCR na 2% agaroznem gelu	40
Slika 16: Optimizacija oligonukleotidnih začetnikov CYP2D6 ter dupleks reakcije PCR	41
Slika 17: Kontrolni vzorci zunanje kontrole kakovosti RfB z znanimi genotipi	42
Slika 18: Preverjanje specifičnosti metode	43
Slika 19: Elektroferogram RfB kontrole (mutirani genotip TT) s smernim oligonukleotidnim začetnikom	45
Slika 20: Polimorfizem LCT-13910C>T v nemutirani homozigotni obliki CC, ki se kaže kot moder vrh (C)	46
Slika 21: Polimorfizem LCT-13910C>T v heterozigotni obliki CT, ki se kaže kot prekrivanje modrega (C) in rdečega (T) vrha	46
Slika 22: Polimorfizem LCT-13910C>T v mutirani homozigotni obliki TT, ki se kaže kot rdeči vrh (T)	46
Slika 23: Vrednosti logaritemsko transformirane spremenljivko MKG _{tot} po posameznih podskupinah	53
Slika 24: Vrednosti logaritemsko transformirane spremenljivko MKG _{fn} po posameznih podskupinah	53
Slika 25: Vrednosti logaritemsko transformirane spremenljivko MKG _{ls} po posameznih podskupinah	54
Slika 26: Primerjava povprečne vrednosti ln_MKG _{ls} med moško in pomenopavzno skupino v odvisnosti z LCT genotipom (en ali oba mutirana alela proti nemutiranemu alelu) prilagojena na povprečno starost 65,5 let in ITM 27,3	56
Slika 27: Primerjava povprečne vrednosti ln_MKG _{fn} med moško in pomenopavzno skupino v odvisnosti z LCT genotipom (en ali oba mutirana alela proti nemutiranemu alelu) prilagojena na povprečno starost 65,5 let in ITM 27,3	56
Slika 28: Primerjava povprečne vrednosti ln_MKG _{tot} med moško in pomenopavzno skupino v odvisnosti z LCT genotipom (en ali oba mutirana alela proti nemutiranemu alelu) prilagojena na povprečno starost 65,5 let in ITM 27,3	57
Slika 29: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu 996 (genotip CT)	72

Slika 30: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu 997 (genotip TT)	72
Slika 31: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu 1002 (genotip TT)	73
Slika 32: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu 1020 (genotip TT)	73
Slika 33: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu Z1002 (genotip CC)	74
Slika 34: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu Z1007 (genotip CT)	74
Slika 35: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu Z1035 (genotip CC)	75
Slika 36: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu Z1049 (genotip CC)	75
Slika 37: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu f176 (genotip CT)	76
Slika 38: Rezultati genotipizacije z RFLP metodo	76
Slika 39: Rezultati genotipizacije z RFLP metodo	77
Slika 40: Rezultati genotipizacije z RFLP metodo	77

KAZALO PRILOG

Priloga 1: <i>Rezultati genotipizacije z AS-PCR metodo (LCT genotip: 0-wt, 1-het, 2-mut)</i> ..66	
Priloga 2: <i>Potrditev genotipov s sekvenčno analizo</i>72	
Priloga 3: <i>Rezultati genotipizacije z RFLP metodo</i>76	

SEZNAM OKRAJŠAV

AS-PCR	alelno-specifična verižna reakcija s polimerazo
bFGF	bazični fibroblastični rastni dejavnik
CSF	kolonije stimulirajoči dejavnik
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat
ddNTP	dideoksinukleotid trifosfat
het	heterozigotni genotip
HNF α	hepatocitni jederni faktor alfa
HRM	analiza talilne krivulje visoke ločljivosti
IL-1	interlevkin-1
IL-6	interlevkin-6
INF- γ	interferon gama
ITM	indeks telesne mase
LCT	gen za laktazo
LMD	Laboratorij za molekularno diagnostiko
LPH	laktaza z glikozilceramidazno aktivnostjo (florizin hidrolaza)
MKG	mineralna kostna gostota
MKG _{fn}	mineralna kostna gostota v predelu vratu stegenice
MKG _{ls}	mineralna kostna gostota v predelu ledvenih vretenc
MKG _{tot}	mineralna kostna gostota v predelu celotnega kolka
mut	mutiran homozigotni genotip
OPG	osteoprotegerin
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PDGF	trombocitini rastni dejavnik
PTH	paratiroidni hormon
RANK	receptor za aktivacijo jedernega dejavnika kapa B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedernega dejavnika kapa B

RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov
TGF- β	transformirajoči rastni dejavnik beta
TNF- α	tumorski nekrozni faktor alfa
wt	nemutirani homozigotni genotip

1. UVOD

1.1. KOSTNA PRENOVA IN VZDRŽEVANJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE

Kostna masa se neprestano prenavlja v procesu kostne remodelacije, kjer se kost najprej razgradi in nato dogradi, pri tem pa se oblika kosti ohranja. Pri odraslem človeku je stopnja prenovetrabekularne kostnine 5-10 × višja kot pri kompaktni kostnini. Letno se s tem procesom prenovi približno 25% trabekularne kosti in 3% kortikalne. Ta fiziološki proces predstavlja tudi pomembno vlogo pri homeostazi kalcija (1,2).

Osrednji regulatorji kostne prenove so osteociti, ki s tvorbo prostaglandinov aktivirajo neaktivne osteoblaste, ki na svoji površini izrazijo transmembranski ligand RANKL (ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB). Ta se veže na receptor RANK (receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κB), ki je izražen na prekursorskih celicah osteoklastov. Ti se zaradi interakcije ligand/receptor aktivirajo, diferencirajo in z zlitem preobrazijo v mnogojedrne osteoklaste. S tem procesom se tudi zavira njihova apoptoza. Osteoblasti izločajo tudi topni receptor osteoprotegerin (OPG), preko katerega uravnavajo kostno resorpcijo, saj se veže na RANKL in tako prepreči njegovo vezavo na RANK. S tem se zavre aktivacija osteoklastov in izzove njihova apoptoza. Vzdrževanje mineralne kostne gostote poteka še z usklajeno sistemsko in lokalno regulacijo preko **hormonov** in **lokalnih faktorjev** (citokinov in rastnih dejavnikov) (2,3).

Preglednica I: Sistemski in lokalni dejavniki, ki uravnavajo kostno remodelacijo

Pospeševalci	Hormoni	Lokalni faktorji
tvorbe kosti	PTH (občasno izločanje) kalcitonin kalcitriol rastni hormon inzulin estrogeni androgeni	transformirajoči rastni dejavnik beta (TGF- β) bazični fibroblastični rastni dejavnik (bFGF) trombocitini rastni dejavnik (PDGF) Interferon gama (INF- γ)
resorpcije kosti	glukokortikoidi ščitnični hormoni prostaglandini PTH (neprekinjeno izločanje) kalcitriol (visoke koncentracije)	Tumorski nekrozni faktor alfa (TNF- α) Kolonije stimulirajoči dejavnik (CSF) Interlevkin-1 (IL-1) Interlevkin-6 (IL-6)

1.2. MOTNJE V KOSTNI PREMENI IN BOLEZNI KOSTI

Neravnovesje med kostno razgradnjo in tvorbo vodi v nepravilno prenovo in posledično v patološka stanja. Pri tem se spremeni kostna masa in mineralna kostna gostota.

Preglednica II: Kostne bolezni glede na MKG

Patološko stanje	Bolezen
znižana MKG - osteopenija	osteonekroza, osteomalacija, osteoporoza, osteogenesis imperfecta
zvišana MKG - osteoskleroza	osteoartritis, osteonekroza, osteomielitis, osteopetroza, Pegetova bolezen

1.2.1. Osteoporoza

Osteoporoza je sistemska skeletna bolezen, za katero sta značilni nizka mineralna kostna gostota (MKG; *ang. mineral bone density-BMD*) in porušena mikroarhitektura kostnih trabekul, ki se kaže kot krhkost kosti in vodi do večjega tveganja za zlomna predelu vretenc, zapestja in kolka.

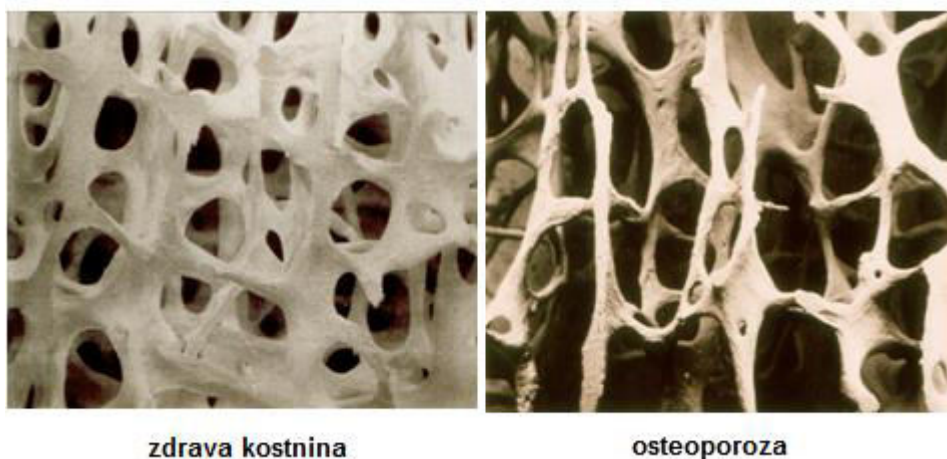
MKG lahko izmerimo z metodo dvoenergijske rentgenske absorpciometrije (DXA, *angl. dual-energy x-ray absorptiometry*), kjer se meri količina kalcija na površini 1 cm² kosti (g/cm²). Rezultat MKG testa se izrazi kot T-vrednost, ki predstavlja razliko med izmerjeno pacientovo MKG in povprečno MKG zdrave osebe v zgodnji odrasli dobi, ki jo nato delimo s SD populacije istega spola in rase. Po kriteriju Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) je osteoporoza prisotna, če je T vrednost manjša kot -2,5. Metoda nam služi kot orodje za postavitev diagnoze osteoporoze, za oceno tveganja za osteoporozni zlom ter za spremljanje zdravljenja same bolezni (4).

Preglednica III: Kriteriji za osteoporozo po merilih SZO

Stanje	MKG
normalna kost	$T \geq -1 \text{ SD}$
osteopenija	$-2,5 \text{ SD} < T < -1 \text{ SD}$
osteoporoza	$T \leq -2,5 \text{ SD}$
huda osteoporoza	$T \leq -2,5 \text{ SD}$, pri pacientu je prisoten en ali več zlomov

Vzroki za nastanek osteoporoze:

- motnji v regulatornem sistemu osteoklastogeneze (preko sistema RANKL/RANK/OPG) in osteoblastogeneze (signalna pot Wnt). Posledica je pospešeno delovanje osteoklastov, ki razgrajujejo kost, ob nespremenjeni stopnji tvorbe nove kosti ali zmanjšano delovanje osteoblastov, kar vodi do upočasnjene gradnje kosti, ob tem pa se stopnja razgradnje ne spreminja.
- znižane koncentracije estrogenov, ki drugače preko receptorjev na osteoblastih in osteoklastih močno zavirajo kostno razgradnjo in pospešujejo delovanje osteoblastov. Pri moških je za razvoj osteoporoze verjetno pomembno postopno zmanjševanje izločanja androgenov iz testisov in nadledvičnih žlez.
- oksidativni stres, saj se s starostjo v kosteh kopičijo reaktivne kisikove spojine, kar ima za posledico izgubo kostne mase zaradi procesa aktivacije osteoklastogeneze in povečanja apoptoze osteoblastov. Prav tako znižana koncentracija estrogenov in androgenov ne zadošča več za antioksidativno zaščito kosti.
- pretirana aktivacija imunskega sistema vodi do povečanega sproščanja vnetnih citokinov, ki povečajo osteoklastogenezo (3,5).



Slika 1: Zdrava kostnina in porušena mikroarhitektura kostnih trabekul pri osteoporozi (6)

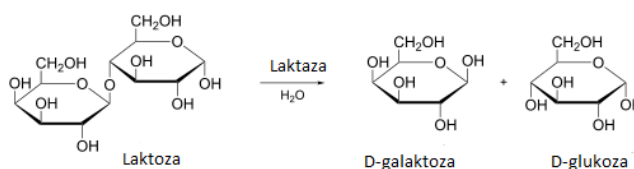
K nastanku osteoporoze prispevajo številni dejavniki tveganja:

- genetski dejavniki (rasa in spol, genetske spremembe v genih povezane z delovanjem in razvojem kostnih celic)
- življenjske navade in razvade (nepravilna prehrana z nezadostnim vnosom kalcija in vitamina D, K in C, kajenje, pretirano uživanje alkohola)
- prekomerna ali prenizka telesna teža
- motnje v delovanju žlez z notranjim izločanjem
- kronične bolezni jeter in ledvic
- jemanje nekaterih zdravil (glukokortikoidi, barbiturati in drugi antiepileptiki, steroidi, antikonvulzanti, antikoagulant, inhibitorji protonske črpalke)
- telesna neaktivnost

Preprečevanje osteoporoze se lahko prične že v otroštvu, kjer si z zdravim načinom življenja, primerno telesno aktivnostjo in zadostnim vnosom proteinov, vitamina D in kalcija s prehrano (mlekom in mlečnimi izdelki) izgradimo največjo možno kostno maso. Posledično je tako v starosti izguba kostnine manjša. Absorpcija kalcija, ki je najpomembnejši prehranski dejavnik za doseganje optimalne kostne mase, je v otroštvu 75%, in se v odrasli dobi postopoma zmanjšana 30% do 50%. V starosti se absorpcija še dodatno zmanjša, zato se potreba po vnosu kalcija še poveča (7,8).

1.3. LAKTAZNA NE-PERZISTENCA

S prenehanjem dojenja aktivnost encima laktaze v enterocitih počasi upade na 5 - 10% prvotne aktivnosti in ostane nizka do konca življenja. Ta pojav imenujemo **laktazna ne-perzistenca**.



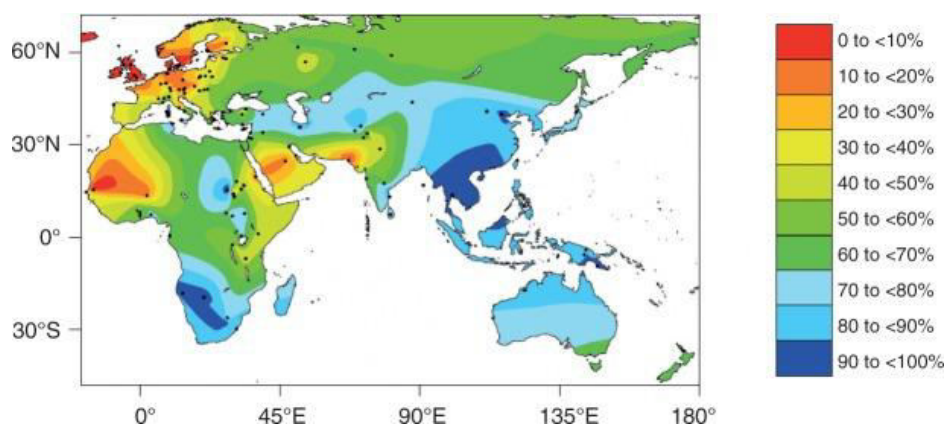
Slika 2: Razgradnja laktoze pod vplivom encima laktaze v tankem črevesju (9)

V tem stanju se disaharid laktoza iz hrane ne razgradi (slika 2) in tako nerazgrajena prehaja v debelo črevo, kjer zaradi osmotskega gradienta povzroči zadrževanje vode v črevesu in posledično nastanek diareje. Črevesna flora debelega črevesa razgradi laktozo na kratkoverižne maščobne kisline in pline (vodik, ogljikov dioksid in metan), kar povzroči hude trebušne krče, slabost, napihnjenost in napenjanje. Pojav teh simptomov zaradi zmanjšane aktivnosti laktaze imenujemo **laktozna intoleranca**. Razvoj simptomov je povezan s količino zaužite laktoze, višino laktazne aktivnosti, prisotnostjo drugih hranil v obroku, črevesne flore, prisotnostjo bolezni prebavil in občutljivost gastrointestinalnega trakta. Pri nekaterih ljudeh pa se visoka aktivnost encima ohrani (**laktazna perzistenca**). Pri teh ljudeh uživanje mlečnih izdelkov in laktoze v poznejšem obdobju ne predstavlja nobenih težav (10,11,12).

1.3.1. Razširjenost laktazne ne-perzistence

V odrasli človeški populaciji obstajata dva fenotipa glede na sposobnost hidrolize laktoze. **Laktazni ne-perzistentni** fenotip izkazuje upad laktazne aktivnosti po prenehanju dojenja in ima za posledico nezadostno razgradnjo laktoze v odrasli dobi z večino simptomov laktozne intolerance, medtem ko **laktazni perzistentni** fenotip izkazuje visoko aktivnost laktaze in se deduje dominantno. Razširjenost laktazno perzistentnega fenotipa je visoka v severnih predelih Evrope (Nemčija, Avstrija, Švica, severna Francija, Britanija, Irska in Skandinavija) in nomadskih populacijah severne in centralne Afrike in Arabskega polotoka.

Fenotip laktazne ne-perzistence pa prevladuje (slika 3) v nativni populaciji Avstralije (aborigini) in Amerike (indijanci), na Pacifiku, Turčiji, Balkanu, Italiji in južni Franciji, vzhodni in severno-vzhodni Aziji ter tropski Afriki (12).



Slika 3: Frekvenca laktaznega ne-perzistentnega fenotipa (10)

Fenotip laktazne ne-perzistence je razvojno starejši, saj se aktivnost encima po obdobju dojenja zmanjša pri vseh sesalcih. Do mutacije je prišlo v neolitiku pred 5.000 - 10.000 leti, ko so se ljudje pričeli ukvarjati z živinorejo in posledično pričeli uživali mleko, ki jim je zagotavljal dodatni prehranski vir proteinov, maščob in ogljikovih hidratov. Druga prednost prebavljanja svežega mleka je tudi v tem, da je pomemben vir vode, kar je še posebej pomembno v puščavskem podnebju. V prid nastanka mutacije govori tudi teorija, da se encimska aktivnosti spreminja z zemljepisno širino, pigmentacijo kože in izpostavljenostjo ultravijoličnim žarkom. V območjih z nizkim UV sevanjem, nastajajo v koži manjše količine aktivnega vitamina D, kar ima lahko za posledico nastanek rahitisa, ki nezdravljen, zniža reprodukcijsko sposobnost prebivalstva. Laktazna perzistenca preprečuje nastajanje rahitisa, saj laktoza spodbuja črevesno absorpcijo kalcija. V predelih, kjer pa je UV sevanje visoko in posledično rahitis ne ogroža prebivalcev, laktaza ni potrebna (12).

1.3.2. Vzroki za pomanjkanje encima laktaze

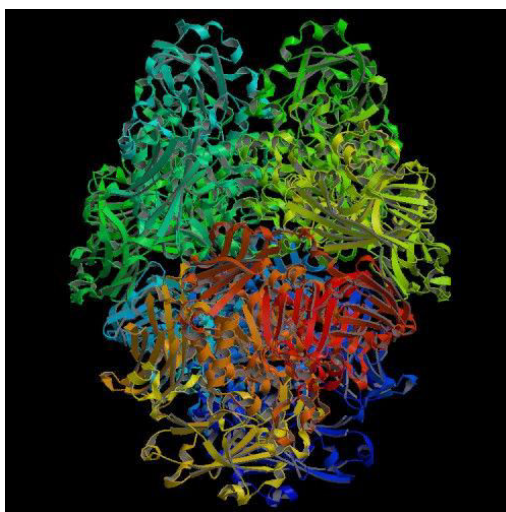
Laktozna malabsorpcija je lahko posledica

1. Genetskih vzrokov pri t.i. **primarni hipolaktaziji**, kjer ločimo dve obliki:
 - kongenitalna (prirojena) hipolaktazija, kjer nastanek mutacije v genu za laktazo povzroči tvorbo neaktivnega encima in se pri novorojenčkih kaže s hudimi simptomi

- hipolaktazija odraslih, ki se kaže kot upadanje ekspresije laktaznega gena po končani laktaciji
2. različnih bolezni prebavil (kronične vnetne bolezni črevesja, celiakije, gastroenteritisa, infekcijske driske, obsevanja) pri t.i. **sekundarni hipolaktaziji**. Znižana aktivnost laktaze izgine, ko se osnovna bolezen pozdravi (10).

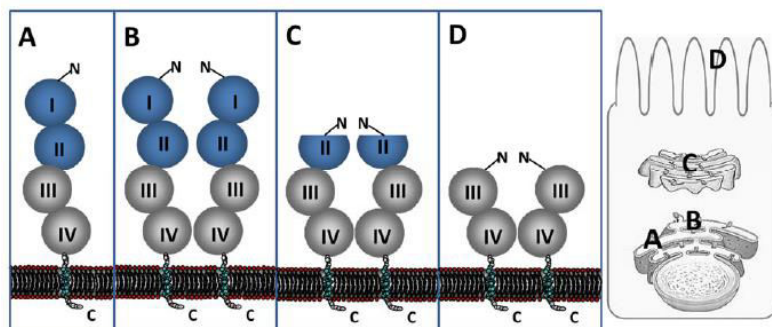
1.3.3. Gen za laktazo

Gen za laktazo (*LCT*) je dolg 49,3 kb in se nahaja na daljši (q) ročici kromosoma 2 na mestu 21. Vsebuje 17 eksonov in se prepiše v 6,2 kb dolg zapis. Kodira encim laktazo (laktaza-florizin hidrolaza-LPH; EC 3.2.1.23), ki ima dve encimski aktivnosti: laktazno (EC 3.2.1.108) in florizin hidrolazno (EC 3.2.1.62). Laktazno aktivnost najdemo samo pri sesalcih, florizin hidrolazno pa pri vseh vretenčarjih. Laktaza cepi disaharid laktozo, celobiozo, celotriozo in celotrozo, florizin hirdolaza pa β -glikozide. Pri osebah z laktazno ne-perzistenco in laktazno prezistenco je zapis kljub tihim mutacijam identičen, zato se laktazi ne razlikujeta (11,13).



Slika 4: Kvartarna struktura encima LPH (14)

Sinteza laktaznega proteina



Slika 5: Shematski prikaz zorenja proteina LPH (15)

V zrelih, diferenciranih enterocitih se laktazni gen prepiše v mRNA ter nato prevede v genski produkt z 1927 aminokislinskimi ostanki. Protein LPH je sestavljen iz N-terminalnega zunajceličnega dela, ki obsega 4 homologne domene (domena I in II pripadata pro-regiji (LPH α profragment), ki kot molekularni spremljevalec omogoča pravilno zvijanje pro-LPH; domena III vsebuje florizin hidrolazno aktivno mesto, IV pa laktazno) (slika 4). V membrano je zasidran z 19 hidrofobnimi aminokislinami in se na C terminalnem delu konča s 26 znotrajceličnimi aminokislinami. Asparaginski ostanki polipeptida so N-glikozilirani z manozo (slika 5, A). Molekula pro-LPH se poveže v homodimer (slika 5, B) in se prenese na Golgijev aparat, kjer se pro-regija delno odstrani s proteolitično cepitvijo na mestu Arg₇₃₄-Leu₇₃₅. Nastane LPH β _{initial}, ki se še dodatno N- in O-glikozilira (slika 5, C). Glikozilacija je pomembna za intracelularni transport in encimsko aktivnost. LPH se nato transportira na membrano mikrovilov, kjer pankreatični tripsin razgradi preostanek pro-regije na mestu Arg₈₆₈-Ala₈₆₉ in tako razgali zreli protein (LPH β _{final}) z molekulsko maso 160 kDa (slika 5, D)(13, 15,16).

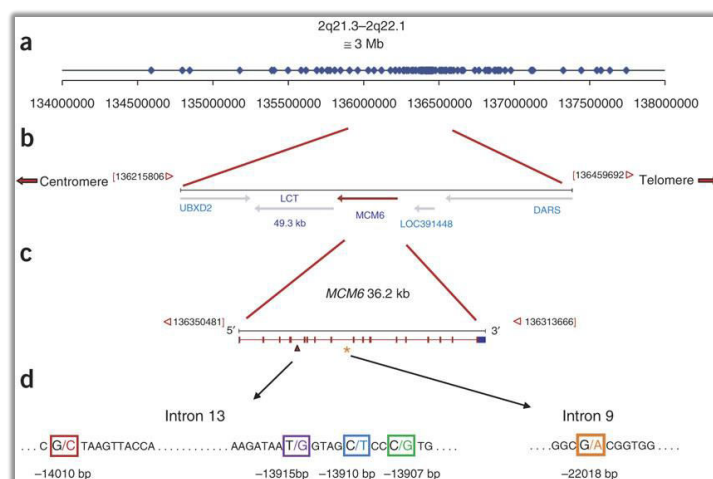
Uravnavanje prepisovanja gena LCT

Natančen molekularni mehanizem laktazne perzistence ni poznan, vendar so za to verjetno odgovorni transkripcijski faktorji, ki s svojo vezavo na regulatorno regijo 13,000-14,030 baznih parov navzgor od gena LCT povečajo prepisovanje gena. Promotorska regija gena za laktazo je dolga 150 baznih parov in se nahaja nad transkripcijsko regijo. Vsebuje *cis*-elemente na katere se vežejo transkripcijski

faktorji. *In vivo* transkripcijskih faktorjev še niso identificirali, v *in vitro* študijah pa so dokazali, da aleli -13910T, -13907G, -13915G in -14010C delujejo kot ojačevalci promotorske aktivnosti. Transkripcijski faktor Oct-1 se močnejše veže na te alele kot na nemutirano zaporedje alela, ob tem pa se na promotor veže tudi transkripcijski faktor HNF α (11).

Genetski polimorfizmi v genu za laktazo

Pri Kavkazijcih se je razvil genetski polimorfizem -13910C>T (rs4988235), ki se 100% ujema s perzistenco laktaze v odrasli dobi (alel T je odgovoren za nastanek perzistence, alel C pa vodi v laktozno intoleranco). Polimorfizem se nahaja na daljši ročici kromosoma 2 v 13. intronu gena *MCM6* (Minichromosome maintenance complex component 6) in gre verjetno za prekrivanje regulatorne regije gena *LCT* s koncem transkripcijske regije *MCM6* gena. V Afriki so plemena, ki so se ukvarjala z govederejo na področjih Sudana, Kenije in Tanzanije, razvila polimorfizme -14010G>C, -13915T>G ali -13907C>G, v Saudski Arabiji pa polimorfizem -13915T>G (slika 6). Z laktazno perzistenco se tudi povezuje polimorfizem -22018G>A, ki se nahaja v 9. intronu gena *MCM6*. Po zadnjih raziskavah je pri populaciji severnih Kitajcev in Brazilcev z japonskimi predniki celo boljši napovedovalec laktozne perzistence kot polimorfizem -13910C>T (10, 17).



Slika 6: Polimorfizmi v genu *LCT* (a) Porazdelitev SNP-jev (b) Mesto nahajanja *LCT* in *MCM6* gena (c) *MCM6* gen. (d) Lokacija SNP-ov povezanih z laktazno perzistenco znotraj 9. in 13. introna gena *MCM6* pri afriški in evropski populaciji (18)

1.3.4. Laktazna intoleranca in potencialni vpliv na kostno prenavo

Zaradi neprijetnih simptomov, ki se pojavljajo pri laktozni intoleranci, se tako otroci, kot tudi odrasli izogibajo mleku in mlečnim izdelkom. To vodi do zmanjšane vnosa kalcija pod priporočenim nivojem (1000 mg/dan za odrasle in 1300 mg/dan za najstnike) in ima lahko za posledico razvoj osteoporoze.

Pregled literature je pokazal nasprotujoče izsledke o vplivu zmanjšane vnosa kalcija na kostno prenavo in posledično razvoju osteoporoze. Stallings s sod (19) ter Infante s sod (20) so pri otrocih z zmanjšanim vnosom laktoze in kalcija ugotovili povezavo z nižano MKG. To je potrdila tudi študija na italijanski mladini (Di Stefano s sod (21)), ki je tudi prva potrdila, da osebe z laktozno intoleranco ne morejo doseči zadostne kostne mase.

Enattah s sod niso dokazali vpliva laktozne intolerance na spremenjeno absorpcijo kalcija, hitrost kostne prenave in kostno maso pri mlajših finskih moških (22) kot tudi ne povezave z večjim tveganjem za osteoporozni zlom pri pomenopavznih ženskah (23). Pozitivno povezavo med polimorfizmom *LCT*-13910C in nižjo MKG na pomenopavznih ženskah zaradi zmanjšane vnosa kalcija pa sta potrdili študiji Bacsí s sod (24) in Obermayer-Pietsch s sod (25).

1.3.5. Določanje statusa laktazne ne-perzistence

Za diagnosticiranje laktozne ne-perzistence se uporabljajo naslednji testi:

1. **Merjenje laktazne aktivnosti v bioptu** sluznice duodenuma tankega črevesja. S testom izključimo vzroke, ki povzročijo sekundarno laktozno hipolaktazijo, vendar je test omejen zaradi neenotne ekspresije laktaze vzdolž črevesja, ob enem pa je postopek pridobivanja črevesnega biopta invaziven in za preiskovanca neprijeten (10, 26).
2. **Laktozni tolerančni test**, kjer oseba zaužije od 20-50 g laktoze (kar ustreza vsebnosti laktoze v 400–1000 mL kravjega mleka) in se ji nato izmeri koncentracija glukoze v krvi. Povečan nivo glukoze v krvi označuje laktozno razgradnjo, saj se glukoza, ki pri tem nastane, absorbira v kri. Če

pa se koncentracija glukoze ne spremeni, ima oseba laktozno malabsorpcijo in laktazni ne-perzistentni fenotip (10,11).

3. Dihalni test: oseba zaužije od 20-50 g laktoze in se ji nato izmeri količina vodika v izdihanem zraku. Povečana količina vodika v izdihanem zraku kaže na nezadostno razgradnjo laktoze in posledično fermentacijo laktoze v debelem črevesju s pomočjo črevesne flore. V primeru prevelikega razraščanja bakterij v tankem črevesu se v izdihanem zraku zazna povečano izločanje vodika, kar vodi do lažno pozitivnih rezultatov. Lažno negativni rezultati so lahko posledica (10,11):

- prisotnosti bakterije, ki ne proizvajajo vodika pri hidrolizi laktoze
- jemanja antibiotikov v času 1 meseca pred izvedbo testa
- v primeru nizkega črevesnega pH, ki inhibira aktivnost bakterij
- prilagoditve črevesne flore na stalno izpostavljenost laktozi

4. Genetski testi polimorfizmov v genu za *LCT*. Prisotnost polimorfizmov v nekodirajoči regiji gena vodi v spremembo vezavnega mesta za transkripcijski dejavnik, kar ima za posledico spremenjen nivo izraženega gena. Polimorfizmi posameznih nukleotidov v genu za *LCT* so v študijah genotipizirani s pomočjo analize polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP), HRM tehnike, z uporabo TaqMan hidrolizirajočih sond, pirosekveniranjem in s sekveniranjem (27).

Genetski testi korelirajo z 86-95% z zgoraj naštetimi testi. Laktozna malabsorpcija (in posledično laktozna intoleranca) se deduje recesivno, zato heterozigoten genotip predstavlja negativen rezultat (10).

Merjenje izdihanega vodika in genetski testi se pri Kavkazijcih široko uporabljajo v klinični diagnostiki.

2. NAMEN DELA

Nekatere študije kažejo na to, da imajo posamezniki z laktozno intoleranco znižano mineralno kostno gostoto in posledično večjo možnost razvoja osteoporoze. Dokazano je, da je laktozna intoleranca povezana z zmanjšanim uživanjem mleka in zato z zmanjšanim vnosom kalcija in da je za to odgovoren polimorfizem -13910C>T v genu *LCCT*. Alel C je povezan z nizko, alel T pa z visoko aktivnostjo laktaze v odrasli dobi. Podatkov o pojavnosti osteoporoze pri bolnikih z laktozno intoleranco v Sloveniji še ni. Na drugi strani pa obstoječe analize metode za genotipizacijo polimorfizma *LCCT*-13910C>T niso optimalne. Večinoma se uporablja RFLP, ki je zamudna in dolgotrajna metoda. Zato je bil naš namen:

1. Vpeljati nov, hitrejši in natančen postopek genotipizacije polimorfizma - 13910C>T v genu za *LCCT*.
2. Ugotoviti povezanost polimorfizma -13910C>T z mineralno kostno gostoto v slovenski starejši populaciji.

Cilji naloge so bili:

- izbrati alelno specifične oligonukleotidne začetnike
- optimizirati alelno specifično reakcijo PCR
- optimizirati vizualizacijo in odčitanje rezultatov pomnožitve na agaroznem gelu
- potrditi genotipe s pomočjo sekvenčne analize
- primerjati rezultate genotipizacije z RFLP metodo
- statistično ovrednotiti vpliv genotipov na MKG

3. METODE IN MATERIALI

3.1. VZORCI

V nalogi smo uporabili vzorce iz SLO-PREVAL banke vzorcev DNA na Fakulteti za farmacijo, Katedri za klinično biokemijo. Ta banka vključuje 623 vzorcev DNA, in sicer 515 pomenopavznih žensk in 106 moških. Mineralno kostno gostoto na področju celotnega kolka (MKG_{tot}), vratu stegenice (MKG_{fn}) in ledvenega dela hrbtenice (MKG_{ls}) so izmerili na inštrumentu QDR-4500 (Hologic, Inc., Waltham, MA, USA) z metodo dvoenergijske rentgenske absorpciometrije (DXA). Meritve so potekale na enem od treh oddelkov sodelujočih centrov: Kliniki za endokrinologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, na Travmatološkem oddelku Splošne bolnišnice Celje ter na Oddelku za endokrinologijo in diabetologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Mariboru. Poleg kliničnega pregleda so opravili biokemijske teste za izključitev sekundarnih vzrokov osteoporoze. Vsi preiskovanci na terapiji z zdravili, ki potrjeno vplivajo na kostni metabolizem, so bili izključeni iz raziskave. Študijo je odobrila Etična komisija Republike Slovenije in vsak preiskovanec je podpisal pisni pristanek o sodelovanju v študiji.

3.2. IZOLACIJA DNA

Genomska DNA je bila predhodno izolirana iz polne venske krvi z uporabo metode po Millerju. Delovne raztopine s koncentracijo DNA približno 10 ng/μL so bile pripravljene naploščicah z 96 vdolbinicami in shranjene v hladilniku na + 4°C.

Genotipizacijo naših vzorcev smo izvedli z novo metodo alelna specifičnega PCR, ki smo jo v nalogi razvili in preverili njeno učinkovitost in pravilnost. V nadaljevanju je opisan končni postopek, ki smo ga razvili in s katerim smo na koncu opravili genotipizacijo vseh 623 vzorcev. V postopku evalvacije nove metode pa smo del vzorcev DNA analizirali sočasno tudi s predhodno metodo RFLP zaradi ocene primerljivosti rezultatov. Obe metodi sta opisani v nadaljevanju.

3.3. ALELNO-SPECIFIČNI PCR

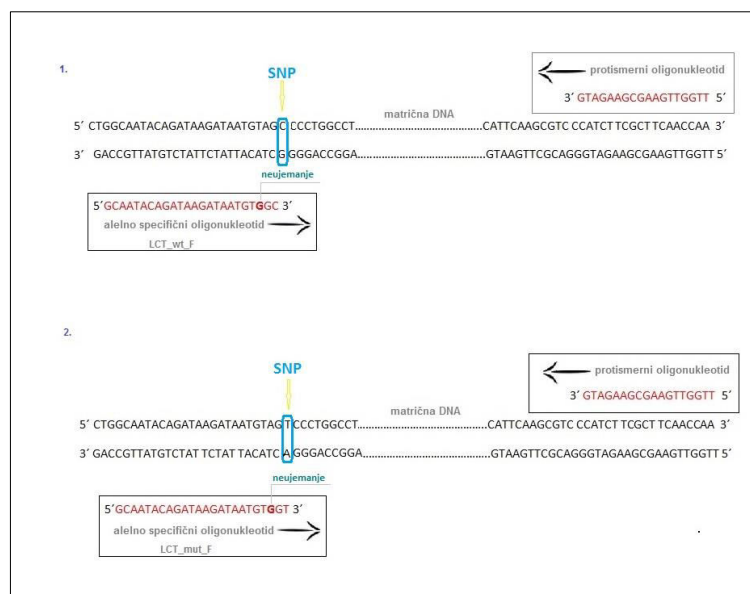
Alelno-specifični PCR (AS-PCR) je enostavna metoda za detekcijo znanih točkovnih mutacij, manjših delecij ali insercij. Uporabimo tri oligonukleotidne začetnike za dve ločeni reakciji PCR. Protismerni oligonukleotid je enak pri obeh reakcijah, medtem ko se smerna začetnika razlikujeta na njunem 3' koncu in sta specifična za alelno različico polimorfizma, ki ga analiziramo. Podaljšujejo se oligonukleotidi, ki imajo popolnoma ujemajoče se 3' konce. Detekcija in analiza PCR produktov poteka na agaroznem gelu.

Specifičnost reakcije se poveča, če se v zaporedje oligonukleotidnega začetnika vnese neujemajoč bazni par znotraj zadnjih štirih baz na 3' koncu. Stopnja destabilizacije je zadostna, da prepreči Taq polimerazi podaljševanje neujemajočega začetnika, vendar pa ne tako močna, da bi preprečila podaljševanje začetnika z ujemajočim se 3' koncem. Stopnja zahtevane destabilizacije je odvisna od narave neujemanja na 3' koncu (28). Neujemajoče purin/pirimidin baze tvorijo relativno močan par, medtem ko purin/purin oz. pirimidin/pirimidin tvorijo šibke pare (preglednica IV).

Preglednica IV: Relativna moč baznih parov (45)

Bazni par	Moč baznega para	Moč destabilizacije
G-C, A-T	najmočnejša	je ni
G-T, A-C	močna	šibka
G-G, A-A	srednja	srednja
C-C	šibka	močna
G-A, C-T, T-T	zelo šibka	najmočnejša

Za uspešno načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov je zato potrebno poznati zaporedje okoli SNP-ja.



Slika 7: Princip alelni-specifične PCR reakcije

3.3.1. Genotipizacija polimorfizma LCT-13910 C>T z metodo AS- PCR

Za analizo polimorfizma *LCT*-13910 C>T smo izvedli dve ločeni alelni-specifični PCR reakciji. V eni reakciji poteka pomnoževanje nemutiranega alela s smernim oligonukleotidnim začetnikom LCT_wt_F 5'-GCAATACAGATAAGATAATGTGGC-3', v drugi pa pomnoževanje mutiranega alela s smernim oligonukleotidnim začetnikom LCT_mut_F 5'-GCAATACAGATAAGATAATGTGGT-3'. Pri obeh reakcijah smo uporabili isti protismerni oligonukleotidni začetnik LCT_R 5'-TTGGTTGAAGCGAAGATG-3'. Genotipizacija posameznega alela je potekala kot dupleks reakcija, saj smo uporabili še dodaten par oligonukleotidnih začetnikov CYP2D6 kot interno pozitivno kontrolo (CYP2D6_F5 5'-GTTCTGTCCCGAGTATGCT-3', CYP2D6_R5 5'-GCCCTGTACTTCGATGTCA-3'). V reakcijsko mešanico smo h genotipski DNA dodali še komercialno dostopen SYBR® Select Master Mix, ki vsebuje pufersko raztopino z AmpliTaq® polimerazo in dNTP-je. V njegovi sestavi so tudi uracil-DNA glikozilaza (UNG) ter barvili SYBR®Green ER™ in ROX™, saj se SYBR® Select Master Mix primarno uporablja za qPCR tehniko. Uporabljene volumne reagentov in začetne oz. končne koncentracije nam podaja preglednica VI.

5'-taccagagtcactttgatgatgagagcagagataaacagattgttgcattgttttaacttttggtatgggacataactagaattcactgca
aatacatTTTTATGtaactgttgatgctacacgaccatggaattctccctttaagagcttggaagcatttgagttagttgtagacggaga
cgatcacgcatagtttatagagtgcataaagacgtaagttaccatttaatacctttcattcaggaaaaatgtacttagaccctacaatgtacta
gtaggcctctgctgctggaatacagataagataatgtag[c/t]ccctggcctcaaagggaactctcctccttaggttgacattgtataatgtttga
tttttagattgttctttgagccctgcattccacgaggataggcagtggttattaacgaggtaaaaggggagtagtacgaaagggcattcaag
cgtccatcttcgcttcaaccaaagcagccctgcttttctagttttattaataggttgatgaaggtcgtctttgaaaaggggtttggctttt
ttacagtgtagtgaggataattataaaaagggaatgtatggcatggtgagttttcacatacatcctgtgaataccagctcaag-3'

Slika 8: Mesto vezave smernega in protismernega oligonukleotidnega začetnika v 13. intronu gena MCM6

V preglednici V so zapisani podatki o oligonukleotidnih začetnikih za polimorfizem LCT-13910C>T.

Preglednica V: Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za LCT in notranje kontrole CYP2D6

Polimorfizem	Ime začetnika	Nukleotidno zaporedje
LCT-13910C>T	LCT_wt_F	5'-GCAATACAGATAAGATAATGTGGC-3'
	LCT_mut_F	5'-GCAATACAGATAAGATAATGTGGT-3'
	LCT_R	5'-TTGGTTGAAGCGAAGATG-3'
CYP2D6	CYP2D6_F5	5'-GTTCTGTCCCGAGTATGCT-3'
	CYP2D6_R5	5'-GCCCTGTACTTCGATGTCA-3'

Preglednica VI: Sestava reakcijske zmesi za AS-PCR

Sestavina reakcije	Začetna koncentracija	Volumen (μL)	Končna koncentracija
Ultra čista voda		2,0	
SYBR® Select Master Mix	2×	5,0	1×
LCT1 F wt (mut)	5,0 μM	0,5	0,25 μM
LCT1 R	5,0 μM	0,5	0,25 μM
CYP2D6 F5	2,5 μM	0,5	0,125 μM
CYP2D6 R5	2,5 μM	0,5	0,125 μM
matrična DNA	10 ng/μL	1,0	1 ng/μL
Skupni volumen		10,0	

Reakcija AS-PCR je potekala na termostatu C-1000™ Thermal Cycler. Reakcija pomnoževanja se je pričela z aktivacijo AmpliTaq® polimeraze za 2 minuti na 95 °C. Nato je sledilo 42 ciklov pomnoževanja. V vsakem ciklu poteče 15 sekundna

denaturacija genomske DNA na 95 °C, 20 sekundno prileganje oligonukleotidnih začetnikov na 56 °C ter 40 sekundno podaljševanje novo nastale verige na 72 °C. Končno podaljševanje je potekalo 5 minut na 72 °C. V preglednici VII je naveden časovni in temperaturni protokol pomnoževanja.

Preglednica VII: Časovni in temperaturni protokol AS-PCR reakcije

Stopnje reakcije	Temperatura (°C)	Čas	Št.ciklov
Aktivacija AmpliTaq® polimeraze	95	2 min	
Denaturacija	95	15 s	
Prileganje	56	20 s	42
Podaljševanje	72	40 s	
Zaključno podaljševanje	72	5 min	
Shranjevanje	12	∞	

Priprava reakcijske mešanice:

1. Reakcijsko mešanico smo pripravili v komori, ki smo jo predhodno očistili z raztopino 10% etanola. Da smo preprečili kontaminacijo PCR reakcije, smo očistili vse pipete, stojala, škatle z nastavki in kozarce z epruvetkami z raztopino natrijevega hipoklorita ter jih nato obsevali še z UV-lučjo.
2. Pripravili smo si načrt reakcijske mešanice tako, da smo osnovni volumen posameznih reagentov pomnožili s številom vzorcev.
3. Vse zamrznjene raztopine oligonukleotidnih začetnikov smo odtalili.
4. SYBR® Select Master Mix smo tik pred uporabo iz hladilnika prenesli v komoro.
5. Vse reagente smo pred uporabo dobro premešali in jih na kratko centrifugirali.
6. Nato smo reagente po vrstnem redu, kot je zapisan v preglednici VI, napipetirali v sterilno epruvetko. Pripravljeno mešanico smo dobro premešali in na kratko centrifugirali.

7. V pripravljene 0,2 mL epice smo nato pipetirali po 9 µL reakcijske mešanice.
8. Na koncu smo dodali še 1 µL vzorčne oz. kontrolne DNA.
9. V luknjico s »slepim« vzorcem smo dodali 1 µL ultračiste vode.
10. Vsebinsko epruvetk smo na stresalniku dobro premešali in centrifugirali.
11. Tako pripravljene vzorce smo prenesli v termostatski blok C-1000™ Thermal Cycler in zagnali program za pomnoževanje.

Reagenti in oprema

Reagenti:

- ✓ vzorci DNA s koncentracijo 10 ng/µL
- ✓ vzorci DNA notranjih kontrol z znanim genotipom s koncentracijo 10 ng/µL
- ✓ SYBR® Select Master Mix (Applied biosystems by Life technologies, ZDA; PN 4472897)
- ✓ smerni oligonukleotidni začetnik
LCT_wt_F 5'-GCAATACAGATAAGATAATGTGGC-3' (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Nemčija; 5,0 µM)
- ✓ smerni oligonukleotidni začetnik
LCT_mut_F 5'-GCAATACAGATAAGATAATGTGGT-3' (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Nemčija; 5,0 µM)
- ✓ protismerni oligonukleotidni začetnik
LCT_R 5'-TTGGTTGAAGCGAAGATG-3' (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Nemčija; 5,0 µM)
- ✓ smerni oligonukleotidni začetnik
CYP2D6_F 5'-GTTCTGTCCCGAGTATGCT-3' (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Nemčija; 2,5 µM)
- ✓ protismerni oligonukleotidni začetnik
CYP2D6_R 5'-GCCCTGTACTTCGATGTCA-3' (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Nemčija; 2,5 µM)
- ✓ ultra čista voda

Aparature in oprema:

- ✓ parni sterilizator Laboklav 25M (SHP Steriltechnik AG, Nemčija)
- ✓ komora DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR (Biosan, Latvija)
- ✓ mikrocentrifuga Combi-spin FVL-2400N (Biosan, Latvija)
- ✓ ciklični pomnoževalnik C-1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, ZDA)
- ✓ polavtomatske pipete (0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL; Eppendorf Research Plus, Nemčija)
- ✓ avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- ✓ avtoklavirane epruvetke 0,2 in 1,5 mL (Eppendorf, Nemčija)
- ✓ stojalo za epruvetke
- ✓ rokavice

Po končani PCR reakciji smo vzorce centrifugirali, jim dodali 2 µL nanašalnega pufra ksilencianol ter celotni volumen PCR vzorcevprenesli na 2% agarozni gel (poglavje 3.4.1) in odčitali genotipe.

3.4. ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV

Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) je metoda, pri kateri z uporabo restrikcijskih endonukleaz (restriktaz) ugotavljamo znane spremembe v nukleotidnem zaporedju. Restriktaze prepoznajo in cepijo specifično zaporedje v dvoverižni DNA. Genetski polimorfizmi lahko zaradi spremembe nukleotidnega zaporedja uvedejo ali (za druge SNP) odstranijo prepoznavno mesto za restrikcijske encime. Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) se najprej pomnoži želeni odsek DNA in nato sledi vezava restriktaze na prepoznavno mesto PCR produkta. Po restrikciji nastanejo fragmenti različnih dolžin, ki jih ločimo na agaroznem ali poliakrilamidnem gelu (27).

3.4.1. Genotipizacija polimorfizma *LCT*-13910C>T z RFLP

Uporabili smo protokol PCR reakcije za genotipizacijo polimorfizma *LCT*-13910C>T Laboratorija za molekularno diagnostiko z metodo RFLP.

Verižna reakcija s polimerazo

Reakcijski mešanici za PCR, ki je sestavljena iz pufra, ultračiste vode, $MgCl_2$, smernega in protismernega oligonukleotidnega začetnika, vseh štirih deoksinukleozid-trifosfatov (dNTP) ter termostabilne Taq polimeraze, dodamo vzorec DNA. Reakcija poteka na termostatu C-1000™ Thermal Cycler, kjer se reakcijska mešanica najprej segreje na 95 °C, da se aktivira Taq polimeraza. Nato sledi cikel sinteze nove dvovijačne DNA, ki je sestavljen iz treh stopenj (29):

- *denaturacije* DNA, kjer se pri temperaturi 94 °C razklene dvoverižna DNA
- *prileganja* oligonukleotidnih začetnikov na enoverižo DNA pri temperaturi 58,5 °C
- *podaljševanja* nove verige s pomočjo encima Taq polimeraze, ki se pri temperaturi 72 °C veže na oligonukleotidni začetnik in v smeri od 5' do 3' vgrajuje dNTP-je ter tako izgradi komplementarno verigo DNA.

Vsak cikel se ponovi 40 ×, pri tem pa se teoretično pri vsakem ciklu število kopij želenega odseka podvoji. Reakcija se nato nadaljuje 10 min pri 72 °C, da encim lahko do konca izgradi pomnožene odseke. Reakcijo se ustavi z inkubacijo pri 4 °C.

V preglednici VIII je zapisano nukleotidno zaporedje smernega in protismernega oligonukleotidnega začetnika. Sestavo reakcijske zmesi ter časovni in temperaturni protokol podajata preglednici IX in X.

Preglednica VIII: Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov

Polimorfizem	Ime začetnika	Nukletidno zaporedje
<i>LCT</i> -13910 C>T	LPH_F	5'-GGATGCACTGCTGTGATGAG-3'
	LPH_R	5'-CCCACTGACCTATCCTCGTG-3'

Preglednica IX: Sestava reakcijske zmesi za PCR

Sestavina reakcije	Začetna koncentracija	Volumen (μL)	Končna koncentracija
Ultra čista voda		14,9	
PCR pufer II	10 ×	2,5	1 ×
raztopina dNTP	2 mmol/L	2,5	0,2 mmol/L
raztopina MgCl ₂	25 mmol/L	2,0	2,0 mmol/L
LPH_F	5 μM	1,0	0,2 μM
LPH_R	5 μM	1,0	0,2 μM
Taq-polimeraza	5 U/μL	0,1	0,02 U/μL
vzorec DNA	10 ng/μL	1,0	1 ng/μL
Skupni volumen		25,0	

Preglednica X: Časovni in temperaturni protokol reakcije

Stopnje reakcije	Temperatura (°C)	Čas	Št.ciklov
Začetna denaturacija	95	12 min	
Denaturacija	94	30 s	
Prileganje	58,5	30 s	40
Podaljševanje	72	1 min	
Zaključno podaljševanje	72	7 min	
Shranjevanje	4	∞	

Reagenti:

- ✓ vzorci DNA s koncentracijo 10 ng/μL
- ✓ vzorci DNA notranjih kontrol z znanim genotipom s koncentracijo 10 ng/μL
- ✓ AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5 U/μL, Applied Biosystems, Life technologies, Austin, ZDA)
- ✓ 10 × PCR Buffer II (pH 8,3 pri 20 °C, 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl; Applied Biosystems, Life technologies, Austin, ZDA)
- ✓ MgCl₂ (25 mM; Applied Biosystems, Life technologies, Austin, ZDA)

- ✓ raztopina dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP- vsak v koncentraciji 2 mM; Promega, Madison, ZDA)
- ✓ oligonukleotidni začetnik LPH_F 5'-GGATGCACTGCTGTGATGAG-3' (Qiagen, Nemčija; 5,0 µM)
- ✓ oligonukleotidni začetnik LPH_R 5'-CCCACTGACCTATCCTCGTG-3' (Qiagen, Nemčija; 5,0 µM)
- ✓ ultra čista voda

Aparature in oprema:

- ✓ parni sterilizator Laboklav 25M (SHP Steriltechnik AG, Nemčija)
- ✓ komora DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR (Biosan, Latvija)
- ✓ mikrocentrifuga Combi-spin FVL-2400N (Biosan, Latvija)
- ✓ ciklični pomnoževalnik C-1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, ZDA)
- ✓ polavtomatske pipete (0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL; Eppendorf Research Plus, Nemčija)
- ✓ avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- ✓ avtoklavirane epruvetke 0,2 in 1,5 mL (Eppendorf, Nemčija)
- ✓ stojalo za epruvetke
- ✓ rokavice

Po končani PCR reakciji se nato preveri uspešnost pomnožitve želenega odseka DNA z elektroforezo na 2% agaroznem gelu.

Agarozna gelska elektroforeza

S separacijsko agarozno gelsko elektroforezo smo preverili uspešnost pomnožitve verižne reakcije s polimerazo. Tehnika temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Nukleinske kisline so zaradi fosfatnih skupin negativno nabite in v električnem polju potujejo proti pozitivno nabiti anodi. Molekule se ločijo na osnovi njihove molekulske mase in konformacije. Na hitrost potovanja molekul vpliva naboj delca, velikost in oblika delca, jakost električnega polja, koncentracija agaroznega gela, sestava in temperatura elektroforeznega pufra.

Vzorci smo nanесли na agarozni gel skupaj z nanašalnim pufrom, ki poveča gostoto vzorca in tako povzroči, da DNA enakomerno pade v jamico žepka. Ker je

obarvan, služi kot vizuelni označevalec migracije vzorcev med elektroforezo. Detekcija nukleinskih kislin v agaroznem gelu je potekala s pomočjo barvila Midori Green. Ta se je med potovanjem molekul vzorca skozi gel vgradil med bazne pare. Ko gel obsevamo z ultravijolično svetlobo, Midori Green odda zeleno fluorescenco in molekule DNA postanejo vidne.

Priprava 2% agaroznega gela in izvedba elektroforeze

V erlenmajerico smo natehtali 1,5 g agaroze, ki smo ji dodali 75 mL 1 × TAE pufra. Erlenmajerico smo pokrili z urnim steklom in tehtnico umerili na nič. Raztopino smo nato segrevali v mikrovalovni pečici toliko časa, dokler se agarosa ni popolnoma raztopila. Erlenmajerico smo nato ponovno postavili na tehtnico in izparjeno tekočino nadomestili z destilirano vodo. Ko se je raztopina na sobni temperaturi ohladila na ~60 °C, smo ji nato dodali 3 µL barvila Midori Green. Vsebinsko smo dobro premešali in vlili v pripravljen nosilec za gel z dvema glavničkoma po 30 jamic. V jamice smo nanesti po 2,5 µL PCR produkta skupaj z 2,0 µL nanašalnega pufra ksilencianola. Uporabili smo tudi 3,5 µL označevalca dolžin odsekov DNA (PCR marker), ki smo ga predhodno na parafilmu s pomočjo pipete zmešali s 2,0 µL ksilencianola in mešanico nato nanesti na gel. Elektroforeza je potekala v 1 × TAE pufri 20 min, pri standardni napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gel prenesli v G:Box, kjer smo pod UV svetlobo zaznali položaj in jakost lis PCR produktov.

Priprava 4% agaroznega gela (za RFLP)

Postopek priprave 4% agaroznega gela je enak zgoraj opisanemu, le da smo uporabili 3 g agaroze wide range, s katero dosežemo večjo zamreženost gela. Uporabili smo glavničke z 20 jamicami. Tudi tu smo nanesti označevalec dolžin odsekov DNA. Celotnemu volumnu vzorcev smo nato dodali 3 µL nanašalnega pufra bromfenol modro ter tako pripravljene vzorce prenesli v jamice.

Reagenti in oprema

Reagenti:

- ✓ agaroz za rutinsko uporabo (A9539; Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- ✓ agaroz za RFLP (wide range/standard 3:1, A7431;Sigma –Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- ✓ 1 × TAE pufer (Tris-acetat-EDTA; sestava: 242 g tris baze, 57,1 mL očetne kisline, 100 mL 0,5 M EDTA s pH 8,5); redčenje 1:50
- ✓ Midori Green Advanced DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Nemčija; Cat.No. MG 04)
- ✓ nanašalni pufer ksilencianol (Sestava: 0,025 g ksilencianola (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija), 3 mL glicerola (Merck, Nemčija) in 7 mL ultra čiste vode)
- ✓ nanašalni pufer bromfenolno modro (Sestava: 0,025 g bromfenolno modro (Fluka chemie, Švica), 3mL glicerola (Merck, Nemčija), 7 mL ultra čise vode)
- ✓ označevalec dolžin odsekov DNA – PCR Marker; odseki velikosti: 50, 150, 300, 500, 700, 1000 bp (Promega, Madison, ZDA; Part No.: G316A)
- ✓ PCR produkti

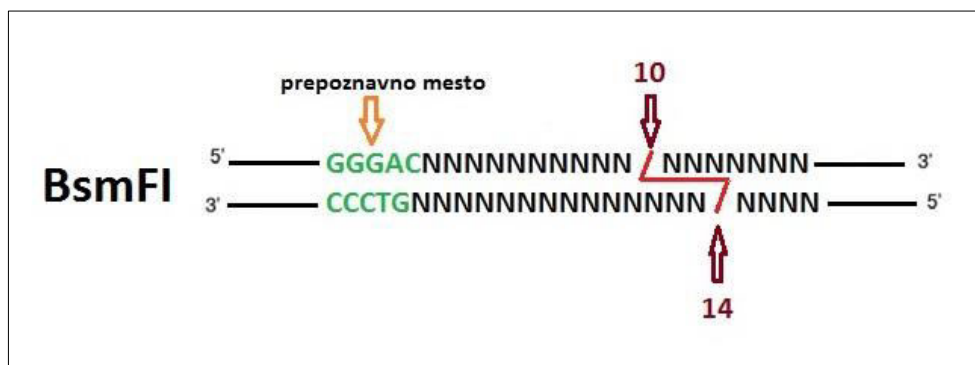
Aparature in oprema:

- ✓ elektronska tehtnica Kern EW (Kern&Sohn GmbH, Nemčija)
- ✓ elenmajerica (250 mL)
- ✓ urno steklo
- ✓ merilni valj (100 mL)
- ✓ mikrovalovna pečica
- ✓ kalup za agarozni gel, nosilec (10 × 15 cm) ter glavnički (30 oz. 20 žepkov)(Bio-Rad, ZDA)
- ✓ kadička za elektroforezo Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, ZDA)
- ✓ vir napetosti Power Pac Basic 300 (Bio-Rad, ZDA)
- ✓ polavtomatski pipeti (0,5-10 µL in 10-100 µL; Eppendorf, Nemčija)

- ✓ avtoklavirani nastavki za pipeti (Sarstedt, Nemčija)
- ✓ komora z UV svetilko G:Box (SynGene, VB)
- ✓ računalnik s programsko opremo Gene Snap (SynGene, VB)
- ✓ nitrilne rokavice

RFLP analiza

Po končani PCR reakciji smo PCR produkt dodali v reakcijsko mešanico za RFLP, ki jo sestavljajo pufer NEB4, ultra čista voda, restrikcijski encim BsmFI ter goveji serumski albumin (BSA) po protokolu, kot je napisan v preglednici XI.



Slika 9: Prepoznavno mesto za restrikcijsko endonukleazo BsmFI

Preglednica XI: Sestava reakcijske zmesi za RFLP reakcijo

Sestavina reakcije	Začetna koncentracija	Volumen (μL)	Končna koncentracija
Ultra čista voda		8,6	
pufer NEB 4	10 ×	1,5	1 ×
BsmFI	2 U/μL	0,75	0,1 U/μL
BSA	100 ×	0,15	1 ×
PCR produkt		4,0	
Skupni volumen		15,0	

Celotno reakcijsko zmes smo inkubirali čez noč (15-18 ur) v vodni kopeli na 65 °C. Po inkubaciji smo produkte restrikcije pomešali z 3 µL raztopine nanašalnega pufru z bromfenol modrim in prenesli v žepke 4% agaroznega gela. Elektroforeza je potekala v 1 × TAE pufru 60 min, pri napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gel prenesli v G:Box, kjer smo pod UV svetlobo zaznali položaj in jakost lis produktov restrikcije ter odčitali genotipe.

Reagenti in oprema

Reagenti:

- ✓ ultra čista voda
- ✓ pufer NEB4 (1 ×: 50 mM K-acetat, 20 mM Tris acetat, 10 mM Mg-acetat, 1 mM ditiotreitol, pH = 7,9 pri temperaturi 25 °C; New England Biolabs GmbH, Nemčija)
- ✓ restrikcijski encim BsmFI (v 50 mM NaCl, 10 mM tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/mL BSA, 50% glicerol; 100 enot, 2,000 U/mL; New England Biolabs GmbH, Nemčija)
- ✓ BSA (100 ×; New England Biolabs GmbH, Nemčija)

Aparature in oprema:

- ✓ vodna kopel WB-4MS (Biosan, Riga, Litva)
- ✓ mini centrifuga NG002B (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Nemčija)
- ✓ polavtomatske pipete (0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL; Eppendorf Research Plus, Nemčija)
- ✓ avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- ✓ avtoklavirane epruvetke 1,5 mL (Eppendorf, Nemčija)
- ✓ stojalo za epruvetke
- ✓ plovec za epruvetke
- ✓ rokavice

3.5. SEKVENČNA ANALIZA

Vse tri genotipe notranjih kontrol in treh vzorcev smo na analizirali tudi s sekvenčno analizo na aparatu GenomeLab™ GeXzP Genetic Analysis System, zato da bi potrdili pričakovano zaporedje nukleotidov v produktih reakcij PCR. Aparat deluje na principu kapilarne elektroforeze, kjer se pod vplivom visoke napetosti v električnem polju negativno nabite molekule DNA ločijo po velikosti zaradi različne hitrosti potovanja skozi poliakrilamidni gel v kapilari.

Proces sestavlja več faz:

1. Faza: Priprava PCR produkta
2. Faza: Čiščenje PCR produkta in merjenje koncentracije DNA
3. Faza: Sekvenčna reakcija

3.5.1. Priprava PCR produkta

- ✓ Po postopku PCR za RFLP (poglavje 3.4.1)

Preostalo količino PCR produkta smo uporabili v nadaljnji reakciji čiščenja PCR produkta.

3.5.2. Čiščenje PCR produktov

Za čiščenje PCR produktov smo uporabili komercialno dostopen komplet QIAquick® PCR Purification Kit, ki s pomočjo silikatne membrane v prisotnosti pufru z visoko vsebnostjo soli veže DNA, nečistote pa se sperejo skozi kolono. Elucija očiščene DNA iz membrane nato poteče ob prisotnosti pufru z nizko vsebnostjo soli ali z vodo. S tem postopkom odstranimo oligonukleotidne začetnike, nukleotide, encime, mineralno olje, soli in druge nečistote. Centrifugiranje v vseh korakih je bilo izvedeno na sobni temperaturi pri 13000 rpm. Volumnu PCR reakcije smo dodali 5 volumnov pufru PB in dobro premešali. Da se DNA adsorbira na membrano v čim večji meri, smo dodali 10 µL 3 M natrijevega acetata s pH 5,0 in premešali. Celotno vsebino smo nato prenesli na QIAquick kolono in centrifugirali vzorce 1 minuto. Tekočino, ki je prešla membrano smo

zavrgli. Nato je sledilo spiranje odvečne količine soli iz membrane z 750 µL pufru PE. Kolone smo centrifugirali 1 minutno in ponovno zavrgli eluirano tekočino. Da smo popolnoma odstranili ostanke pufru PE, smo postopek centrifugiranja ponovili. Nato smo kolone prenesli v čisto 1,5 mL epruvetko. Elucijo DNA iz membrane smo dosegli z dodatkom 30 µL EB pufru (10 mM Tris·Cl, pH 8,5), ki smo ga s pipeto prenesli na center membrane. Sledila je 1 minutna inkubacija in nato faza centrifugiranja. Očiščenim PCR produktom smo nato s spektrofotometrom izmerili koncentracijo DNA.

Reagenti in oprema

Reagenti:

- ✓ QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen GmbH Hilden, Nemčija; Cat.No.: 28104):
 - pufer PB
 - pufer PE
 - pufer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8,5)
- ✓ etanol (96-100%)
- ✓ natrijev acetat 3M (24,61 g natrijevega acetata raztopimo v 100 mL ultračiste vode; pH 5,0)

Aparature in oprema:

- ✓ QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen GmbH Hilden, Nemčija; Cat.No.: 28104)
- ✓ vibracijski stresalnik IKA Genius 3 (IKA, Nemčija)
- ✓ centrifuga Centrifuge 5415R (Eppendorf, Nemčija)
- ✓ polavtomatske pipete (0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL; Biohit, Finska)
- ✓ avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- ✓ avtoklavirane epruvetke 1,5 mL (Eppendorf, Nemčija)
- ✓ stojalo za epruvetke
- ✓ rokavice

3.5.3. Merjenje koncentracije DNA v očiščenih PCR produktih

Spektrofotometer NanoDrop™ ND-1000 meri koncentracijo dvoverižne in enoverižne DNA, RNA in proteinov z visoko natančnostjo in ponovljivostjo. Uporablja princip površinske napetosti, s katero obdrži kapljico vzorca na svojem mestu in tako ni potrebna uporaba kivet ali kapilar. Podlaga za analizo je Beerov zakon, ki temelji na tem, da je koncentracija raztopine pri konstantni dolžini poti svetlobe, konstantni valovni dolžini in temperaturi direktno proporcionalna količini absorbirane svetlobe.

Princip metode

Nukleinske kisline zaradi prisotnosti aromatskih obročev v purinskih in pirimidinskih bazah absorbirajo UV svetlobo z maksimumom absorbance pri 260 nm. Za čisto raztopino DNA velja, da je absorbanca raztopine s koncentracijo 50 µg/mL pri 260 nm enaka 1. Čistost preverimo z merjenjem absorbance pri 280 nm in 230 nm. Za merilo prisotnosti proteinov uporabimo razmerje A260/A280, ki je optimalno za čisto DNA pri 1,8. Če je manjše, so prisotni poleg proteinov še fenoli in drugi kontaminanti, ki absorbirajo pri 280 nm. Optimalno razmerje A260/A230 za čistost DNA pa mora biti 1,8-2,2. Manjša vrednost razmerja kaže na prisotnost ostankov fenola, gvanidina, magnetnih kroglic ali proteinov.

Potek dela

Na spodnje optično vlakno naneseemo 1,5 µL vzorca. Nato položimo ročico zgornjega optičnega vlakna na spodnje. S pomočjo površinske napetosti se ustvari mostiček med optično potjo. Svetloba ksenonske žarnice se pri prehodu skozi vzorec absorbira, prepuščena svetloba pa pride do detektorja. Spektrofotometer z referenčno raztopino (EB pufer v katerem je eluiran PCR produkt) umerimo na »ničelno nastavitev«, ki pri meritvi vzorca primerja delež svetlobe, ki pride skozi referenčno raztopino in skozi merjen vzorec.

Reagenti in oprema

Reagenti:

- ✓ ultračista voda
- ✓ EB pufer (10 mM Tris-Cl; pH 8,5)
- ✓ očiščeni PCR produkti

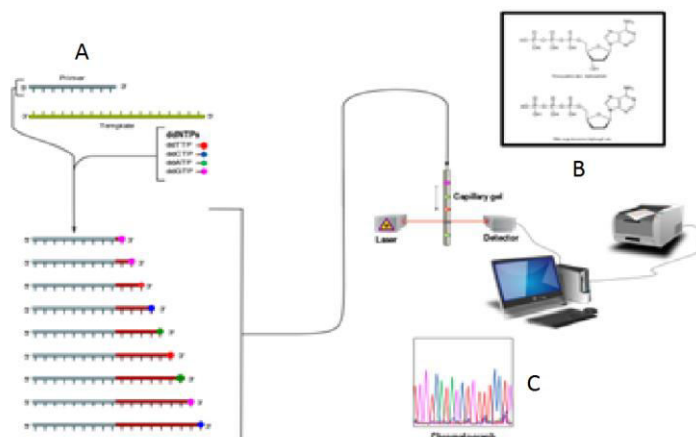
Aparature in oprema:

- ✓ spektrofotometer NanoDrop™ ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, ZDA)
- ✓ računalnik s programom ND-1000
- ✓ polavtomatska pipeta (1-10 µL; Eppendorf, Nemčija)
- ✓ avtoklavirani nastavki za pipeto (1-10 µL; Sarstedt, Nemčija)
- ✓ stojalo za epruvetke
- ✓ papirnate brisačke za čiščenje optične poti spektrofotometra
- ✓ rokavice

3.5.4. Sekvenčna reakcija

Določanje nukleotidnega zaporedja DNA temelji na tehniki, ki jo je Sanger l. 1977 razvil skupaj s sodelavci. Z razliko od klasične PCR reakcije v mešanico dodamo samo en oligonukleotidni začetnik, zato se po toplotni denaturaciji v cikličnem termostatu pomnožuje samo ena veriga DNA. Druga razlika je tudi v tem, da je poleg deoksinukleotidov dodana manjša količina štirih dideoksinukleotidov, ki so označeni z različnim fluorescentnimi barvili. Na 3' ogljikovemu atomu sladkorja jim manjka OH skupina, zato ne morejo tvoriti fosfodiesterne vezi z naslednjim nukleotidom in nadaljnja sinteza verige se prekine. Naključna vgraditev ddNTP-jev ima za posledico nastanek različno dolgih fragmentov, ki jih ločimo s kapilarno elektroforezo (slika 10, A). Med elektroforezo se enoverižne negativno nabite molekule DNA injicirajo v kapilaro pod vplivom električnega toka in potujejo proti pozitivni anodi. Krajši fragmenti potujejo v gelu hitreje in dosežejo konec kapilare prvi, medtem ko daljši fragmenti potujejo počasneje zaradi zapletanja med

molekule gela in potrebujejo dalj časa, da dosežejo optični del kapilare, kjer poteka detekcija fragmentov. V optičnem delu laserski žarek povzroči vzbujanje fluorescenčnega barvila na dideoksinukleotidu, kar povzroči nastanek fluorescence pri specifični valovni dolžini oz. barvi (slika 10, B). Fluorescentni signal zajame fotopomnoževalka in programska oprema analizatorja ga pretvori v digitalno obliko. Na zaslonu računalnika se nato v obliki elektroferograma izpiše zaporedje baz pomnoženega enoverižnega fragmenta (slika 10, C).



Slika 10: Potek sekvenčne analize (30)

Sekvenčno reakcijo izvedemo v 0,2 mL epruvetkah po protokolu, kot je opisan v preglednici XII. Priporočena količina dvoverižne DNA, ki jo dodamo v mešanico, je 50-100 fmol, kar za 448 bp dolg fragment pomeni od 16-33 ng PCR produkta.

Preglednica XII: Priprava reakcijske mešanice za sekvenčno analizo

Sestavina reakcije	Volumen (μL)
ultra čista voda	4,3
PCR produkt	1,0
smerni/protismerni oligonukleotidni začetnik LPH	0,7
DTCS Quick Start Master Mix	4,0
Skupni volumen	10,0

Za vsak vzorec pripravimo dve sekvenčni reakciji. V epruvetko, kjer se bo pomnožila vodilna veriga PCR produkta, napipetiramo 4,3 μL ultra čiste vode, 1 μL PCR produkta, smerni oligonukleotidni začetnik ter 4,0 μL DTCSQuick Start

Master Mix, ki vsebuje DNA polimerazo, dNTP-je in z barvili označene ddNTP-je v 10 × pufru. V drugi epruvetki se pomnožuje komplementarna veriga z istimi reagenti in protismernim oligonukleotidnim začetnikom.

Vsebinsko epruvetk smo dobro premešali in centrifugirali ter jih nato prenesli v termostat ThermalCycler C-1000. V preglednici XIII je naveden časovni in temperaturni protokol pomnoževanja.

Preglednica XIII: Časovni in temperaturni protokol reakcije

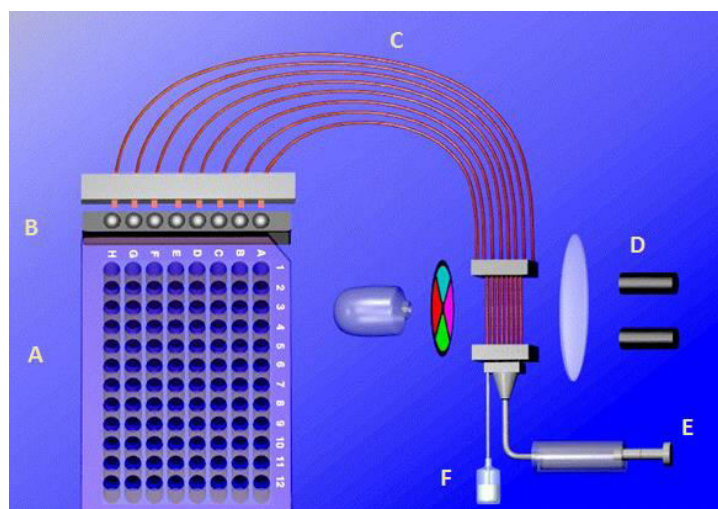
Stopnje reakcije	Temperatura (°C)	Čas	Št.ciklov
Denaturacija	96	20 s	40
Prileganje	50	20 s	
Podaljševanje	60	4 min	
Shranjevanje	8	∞	

Enoverižne DNA produkte smo nato očistili s pomočjo obarjanja z etanolom. Vse stopnje centrifugiranja so bile izvedene pri 4 °C na 14000 rpm. Za vse vzorce smo pripravili STOP mešanico (preglednica XIV) in jo razdelili po 2 µL v predhodno označene 0,5 mL epruvetke. V ustrezno epruvetko smo dodali celotni volumen posamezne sekvenčne reakcije in vsebinsko dobro premešali. Mešanici smo dodali 60 µL predhodno ohlajenega 95% etanola na -20 °C, vse dobro premešali in takoj centrifugirali vzorce 15 minut. Po centrifugiranju smo s pipeto previdno odstranili supernatant in peletko dvakrat sprali z 200 µL predhodno ohlajenim 70% etanolom na -20 °C. Zopet smo vsebinsko epruvetk dobro premešali in centrifugirali 2 minuti. Supernatant smo s pipeto previdno odstranili in po zadnjem centrifugiranju peletke sušili na zraku 15 min. Peletke smo ponovno raztopili z dodatkom 40 µL SLS pufra.

Preglednica XIV: Priprava STOP mešanice

Sestavina reakcije	Volumen (µL)
3 M Na acetat (pH 5,2)	1,0
100 mM Na ₂ -EDTA (pH 8,0)	1,0
Skupni volumen	2,0

Vsebinsko epruvetk smo nato prenesli na ploščico za vzorce in jih zaščitili pred oksidacijo barvil ter izhlapevanjem z dodatkom kapljice mineralnega olja. V aparat GenomeLab GeXP (slika 11) smo vstavili kapilare, ploščico s pufrom in ploščico z vzorci, napolnili rezervoar z destilirano vodo ter zamenjali vtič v segmentu za gel z injekcijsko brizgo napolnjeno s poliakrilamidnim gelom. Nato smo v računalniški program GenomeLab System vnesli položaj vzorcev na ploščici in izbrali metodo sekvenciranja FLR-a (preglednica XV) ter zagnali program.



Slika 11: Komponente aparata GenomeLab GeXP (A – ploščici za vzorce in separacijski pufer, B – nosilec za destilirano vodo, C – kapilare, D– optični sistem z laserjem in fotocelico, E – brizga s poliakrilamidnim gelom, F – odpad)(31)

Preglednica XV: Protokol kapilarne elektroforeze za sekvenciranje

Metoda	Kapilare	Denaturacija		Injiciranje		Ločevanje	
	T (°C)	T (°C)	t (s)	napetost (kV)	t (s)	napetost (kV)	t (min)
LFR-a	50	90	120	2,0	15	4,0	110

Reagenti in oprema

Reagenti:

- ✓ ultra čista voda
- ✓ PCR produkti

- ✓ oligonukleotidni začetnik LPH_F 5'-GGATGCACTGCTGTGATGAG-3' (Qiagen, Nemčija; 5,0 µM)
- ✓ oligonukleotidni začetnik LPH_R 5'-CCCACTGACCTATCCTCGTG-3' (Qiagen, Nemčija; 5,0 µM)
- ✓ poliakrilamidni gel Separation Gel LPA 1 (10 mL; 608010)
- ✓ separacijski pufer Separation Buffer (30 mL; P/N 608012)
- ✓ GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit:
 - DTCS Quick Start Master Mix (vsebuje DNA polimerazo, dNTP-je in z barvili označene ddNTP-je v 10 × pufru)
 - glikogen
 - mineralno olje (5 mL; P/N 608114)
 - Sample Loading Solution, SLS (6 mL; P/N 608082)
- ✓ 3 M raztopina natrijevega acetata v ultra čisti vodi
- ✓ 100 mM raztopina Na₂EDTA v ultra čisti vodi
- ✓ Ohlajena 70% (v/v) in 95% (v/v) raztopina etanola

Aparature in oprema:

- ✓ Ciklični termostat ThermalCycler C-1000 (Bio-Rad, ZDA)
- ✓ Centrifuga Centrifuge 5415R
- ✓ GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System z ustrezno programsko opremo (Beckman Coulter, ZDA)
 - osem kapilar GenomeLab™ Separation Capillary array 33-75B (s premerom kapilare 75 µm in dolžino 33 cm; P/N 608087)
 - ploščica za vzorce (polipropilenska ploščica za 96 vzorcev; P/N 609801)
 - ploščica za separacijski pufer (polistirenska ploščica z 96 vdolbinicami; P/N 609844)
- ✓ polavtomatske pipete (0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL; Biohit, Finska)
- ✓ avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- ✓ avtoklavirane epruvetke 0,2 in 0,5 mL (Eppendorf, Nemčija)
- ✓ rokavice

3.6. STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično analizo smo uporabili statistični program SPSS Statistics ver.20 (IBM, Chicago, IL, ZDA). S Kolmogorov-Smirnovim testom smo ocenili distribucijo spremenljivk. Logaritmično transformacijo smo uporabili pri tistih spremenljivkah, ki niso bile normalno porazdeljene. Vplivi genotipa na MKG so bili ovrednoteni s pomočjo splošnega linearnega modela (GLM), kjer smo poleg vpliva polimorfizma upoštevali tudi že znane vplive spola, starosti in indeksa telesne mase (ITM) v študijskih podskupinah. Da bi ugotovili razlike med genotipskimi podskupinami, smo uporabili Bonferonijev *post hoc* test. Model je vključeval preučevana alela (enega ali oba mutirana alela proti nemutiranemu alelu), starost (v letih), ITM (v kg/m²) in MKG vrata stegenice (v g/cm²). Statistično značilnost smo določili pri 0,05.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

V Laboratoriju za molekularno diagnostiko (LMD) na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo že izvajajo genotipizacijo polimorfizma *LCT*-13910C>T, ki omogoča odkrivanje laktazno ne-perzistentnih oseb brez simptomov. Polimorfizem se določa z metodo RFLP z uporabo restrikcijskega encima BsmFI. Postopek se opušča, saj je zamuden, sestavljen iz več faz in inkubacija z endonukleazo traja kar 15-18 ur. Rezultat restrikcije je odvisen tudi od delovanja endonukleaze. Vpeljava novega postopka tako ni posledica napak v genotipizaciji z RFLP metodo, temveč smo želeli razviti lažjo in hitrejšo preiskavo. V nalogi smo zato najprej uvedli nov postopek za genotipizacijo polimorfizma *LCT*-13910C>T z alelno specifično reakcijo PCR. V postopku evalvacije nove metode smo ocenili njeno točnost in specifičnost ter nato del vzorcev genotipizirali sočasno tudi z RFLP metodo ter nato primerjali rezultate. Genotipe nekaterih naključnih vzorcev smo potrdili tudi z analizo na sekvenatorju. Nato smo genotipe 623 vzorcev določili z novo metodo AS-PCR. Razvoj metode in rezultati statistične obdelave podatkov so opisani v nadaljevanju.

4.1. RAZVOJ METODE

Za genotipizacijo s AS-PCR metodo smo morali izbrati ustrezne začetnike, ustrezní reakcijski pufer ter ustrezne pogoje za izvedbo reakcije PCR.

4.1.1. Oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov

Izbira alelno specifičnih oligonukleotidnih začetnikov je potekala s pomočjo programa Primer-BLAST.

Pri oblikovanju oligonukleotidnih začetnikov smo upoštevali nekaj splošnih priporočil:

- ✓ Dolžina oligonukleotidni začetnikov naj bo 18 do 24 nukleotidov, saj imajo še krajši večjo možnost prileganja na druga mesta v genomski DNA, daljši pa se lahko zaradi višje temperature prileganja vežejo na nepopolnoma ujemajoča zaporedja. Tako imata smerna oligonukleotidna začetnika dolžino 24 nukleotidov, protismerni pa 18 nukleotidov.
- ✓ Temperatura prileganja (T_m), ki predstavlja temperaturo pri kateri je 50 % oligonukleotidnih začetnikov vezanih na genomsko DNA, preostalih 50 pa je prostih, naj bo med 52 do 58 °C.
- ✓ Da dosežemo učinkovito prileganje obeh oligonukleotidnih začetnikov, mora biti razlika v T_m med njima pod 5 °C.
- ✓ Nespecifičnemu prileganju oligonukleotidov se izognemo tako, da v zadnjih petih nukleotidih na 3' koncu ni zaporedno vgrajenih treh C ali G nukleotidov.
- ✓ Trojna vez zadnjega nukleotida (C ali G) na 3' koncu omogoči učinkovitejše podaljševanje.
- ✓ dolžina PCR produkta naj bo med 100 in 1000 bp. Naš PCR produkt je dolg 192 bp.

Specifičnost reakcije PCR smo izboljšali z vnosom neujemajočega nukleotida G (5'-GCAATACAGATAAGATAATGTGG[C/T]-3') na tretje mesto od 3' konca smernega oligonukleotidnega začetnika. To neujemanje polimerazi v primeru vgraditve ujemajočega nukleotida na 3' koncu ne predstavlja ovire, če pa se na genomsko DNA veže oligonukleotidni začetnik z neujemajočim nukleotidom na 3' koncu, pa polimeraza ne nadaljuje s podaljševanjem.

Prve reakcije PCR, kjer smo uporabili smerni oligonukleotidni začetnik za nemutirano zaporedje LCT_wt_F 5'-CAATACAGATAAGATAATGTGGC-3', niso uspele, zato smo naročili novi začetnik z zaporedjem 5'-GCAATACAGATAAGATAATGTGGC-3'.

Za (interno) kontrolo AS-PCR reakcije smo v PCR zmes dodali še en par oligonukleotidnih začetnikov, ki je omogočil sočasno pomnoževanje daljšega odseka skupaj z odsekom LCT in nam tako služil kot interna kontrola samega pomnoževanja. Iznaše podatkovne zbirke internih PCR protokolov smo ugotovili, da bi lahko uporabili že optimiziran protokol za pomnoževanje gena CYP2D6,

katerega končni produkt je fragment dolžine 556 bp. Začetnike (CYP2D6_F5 5'-GTTCTGTCCCGAGTATGCT-3' ter CYP2D6_R5 5'-GCCCTGTACTTCGATGTA-3') za ta produkt smo pregledali in ugotovili, da ne tvorita dimere z alelno specifičnimi oligonukleotidi in sta zato primerna za izvedbo dupleks reakcije.

Natančen postopek je opisan v naslednjem poglavju.

4.1.2. Izbor najustreznejših reakcijskih pogojev

Pripravili smo dve ločeni reakcijski mešanici za PCR ki sta vsebovali 5 µL komercialno pripravljenega 1×SYBR® Select Master Mix-a, po 0,5 µL protismernega LCT_R 5'-TTGGTTGAAGCGAAGATG-3' in smernega oligonukletidnega začetnika LCT_wt_F 5'-CAATACAGATAAGATAATGTGGC-3' oz. LCT_mut_F 5'-GCAATACAGATAAGATAATGTGGT-3' s koncentracijo 5,0 µM ter 3 µL ultra čiste vode. V mešanico smo nato dodali 1 µL genomske DNA s koncentracijo 10 ng.

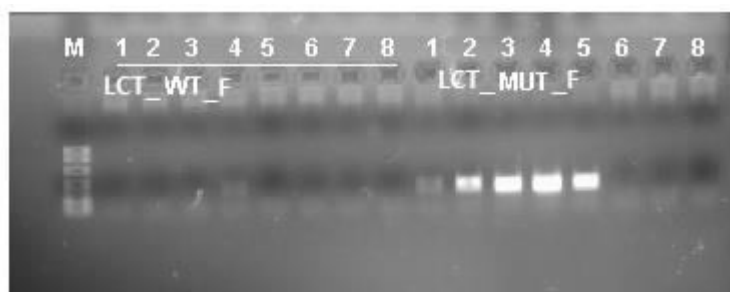
Na termostatu C-1000™ Thermal Cycler smo vnesli program pomnoževanja, ki se je začel z aktivacijo AmpliTaq polimeraze za 2 minuti na 95 °C. Nato je sledilo 40 ciklov pomnoževanja. V vsakem ciklu je potekla 15 s denaturacija genomske DNA na 95 °C, 20 sekundno prileganje oligonukleotidnih začetnikov pri temperaturnem gradientu med 50 in 60 °C (vsaka od 8 luknjic je imela svojo temperaturo prileganja – luknjica 1: 60 °C, 2: 59,3 °C, 3: 58,1 °C, 4: 56,3 °C, 5: 54,0 °C, 6: 52,3 °C, 7: 50,9 °C, 8: 50 °C) ter 20 sekundno podaljševanje verige pri 72 °C. Končno podaljševanje je potekalo 5 minut na 72 °C in končno shranjevanje vzorcev na 4 °C.

Po končanem pomnoževanju smo produktom PCR reakcije dodali 2 µL nanašalnega pufru kselencianol ter celotno vsebino epruvetk nanesti v jamice 2% agaroznega gela. Da smo lažje odčitati dolžino PCR produkta, smo na gel nanesti tudi označevalec dolžin odsekov (M) (slika 12).



Slika 12: Optimizacija AS- PCR reakcije (M-označevalec dolžin odsekov vsebuje fragmente dolžin 1000, 750, 500, 300, 150 in 50 bp)

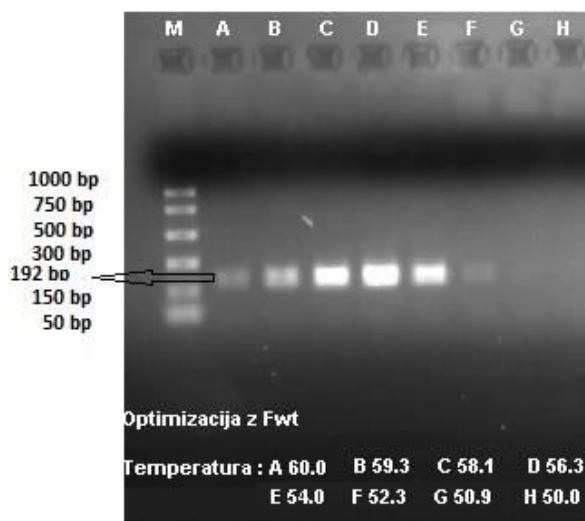
Zaradi slabe pomnožitve PCR produktov smo reakcijo ponovili in pri tem podaljšali čas prileganja oligonukleotidnih začetnikov na 30 s.



Slika 13: Rezultat ponovne optimizacije AS- PCR reakcije z daljšim časom prileganja (M-označevalec dolžin odsekov vsebuje fragmente dolžin 1000, 750, 500, 300, 150 in 50 bp)

Pri reakciji z LCT_mut_F začetnikom smo dobili boljše rezultate, pri reakciji z LCT_wt_F smo dobili zelo šibko ponovitev v luknjici 4 (56,3 °C). Odločili smo se, da naročimo nov smerni oligonukleotidni začetnik za nemutirano zaporedje (5'-GCAATACAGATAAGATAATGTGGC-3'), ki je vseboval na 5' koncu gvanidin, ki je s trojno vezjo dodatno stabiliziral vezavo začetnika na matrično DNA.

Z novim začetnikom smo ponovno izvedli PCR reakcijo s 20 sekundnim prileganjem oligonukleotidnih začetnikov in pri tem povečali število ciklov na 42. Po 20 minutni elektroforezi smo nato pod UV svetlobo odčitali uspešno pomnožen PCR produkt velikosti 192 bp (slika 14).



Slika 14: Rezultat pomnoževanja PCR produkta pri optimizaciji s smernim oligonukletidnim začetnikom LCT_wt_F (M-označevalec dolžin odsekov vsebuje fragmente dolžin 1000, 750, 500, 300, 150 in 50 bp)

V luknjicah C in D je prišlo do zelo dobre pomnožitve in tako smo se odločili, da bo faza prileganja pri reakciji PCR potekala na 58 °C (luknjica C).

Nato smo izvedli reakcijo AS-PCR na vzorcih (slika 15).

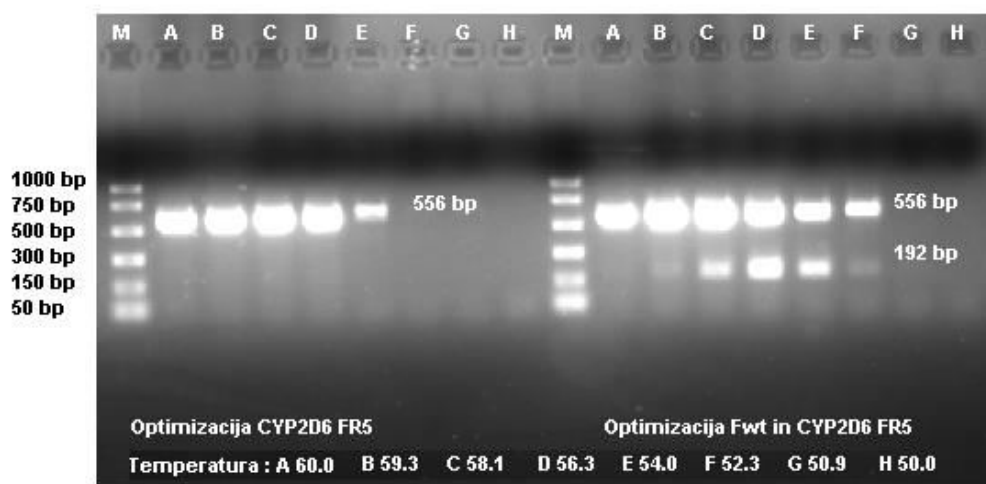


Slika 15: Rezultat genotipizacije z metodo AS-PCR na 2% agaroznem gelu (W-reakcija s smernim oligonukleotidnim začetnikom LCT_wt_F, M-reakcija s smernim oligonukleotidnim začetnikom LCT_mut_F; M-označevalec dolžin odsekov vsebuje fragmente dolžin 1000, 750, 500, 300, 150 in 50bp)

Da bi preprečili lažno negativen rezultat pomnoževanja, ki bi bil posledica nepravilnosti pri pipetiranju genomske DNA (vzorca ne bi dodali), smo v reakcijsko mešanico vnesli še en par oligonukleotidnih začetnikov kot pozitivno notranjo kontrolo pomnoževanja. Pri izbiri notranje kontrole smo morali paziti, da je dolžina PCR produkta večja od 192 bp. Izbrali smo oligonukleotidna začetnika CYP2D6_F5

5'-GTTCTGTCCCGAGTATGCT-3' ter CYP2D6_R5 5'-GCCCTGTACTTCGATGTA-3' z dolžino PCR produkta 556 bp.

Zato smo izvedli ponovno optimizacijo postopka za nove oligonukleotidne začetnike, kot tudi za dupleks PCR reakcijo. Pri slednji smo program pomnoževanja spremenili v stopnji podaljševanja iz 20 na 40 sekund (slika 16). Temperatura v luknjicah je bila: A 60 °C, B 59,3 °C, C 58,1 °C, D 56,3 °C, E 54,0 °C, F 52,3 °C, G 50,9 °C, H 50 °C.



Slika 16: Optimizacija oligonukleotidnih začetnikov CYP2D6 ter dupleks reakcije PCR

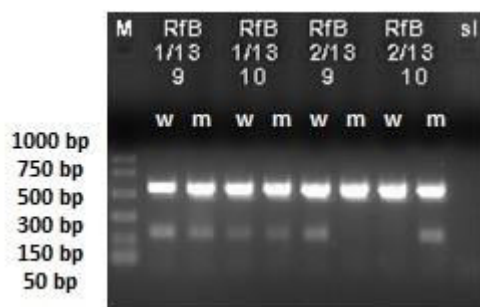
Reakcijska mešanica za dupleks PCR reakcijo s skupnim volumnom 10 µL je vsebovala 5 µL komercialno pripravljenega 1×SYBR® Select Master Mix-a, po 0,5 µL protismernega LCT_R in smernega oligonukletidnega začetnika LCT_wt_F s koncentracijo 5,0 µM ter po 0,5 µL kontrolnega CYP2D6 smernega in protismernega oligonukletidnega začetnika s koncentracijo 5,0 µM. V mešanico smo nato dodali še 2 µL ultra čiste vode ter 1 µL genomske DNA s koncentracijo 10 ng.

Rezultat optimizacije dupleks reakcije je pokazal, da je bila naša odločitev o časovni spremembi stopnje podaljševanja novo sintetizirane verige DNA pravilna. Reakcija PCR s temperaturo prileganja oligonukleotidnih začetnikov 56 °C (luknjica D) je pokazala zelo dobro pomnoževanje obeh parov oligonukleotidnih začetnikov, zato smo prvotni program pomnoževanja ustrezno spremenili. Pri reakciji smo opazili zelo močne lise pri PCR fragmentu CYP2D6 (interna kontrola),

zato smo se odločili, da lahko zmanjšamo koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov iz 5 μ M na 2,5 μ M.

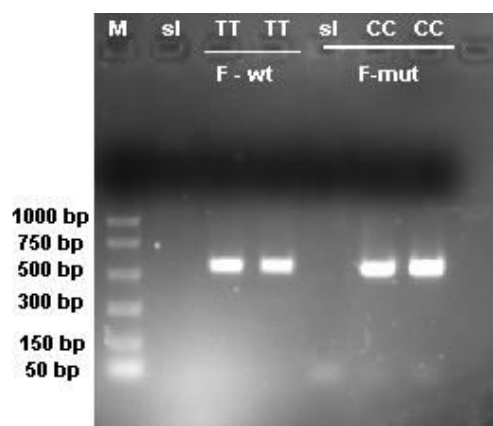
4.1.3. Ocena točnosti in specifičnosti

Za oceno točnosti nove AS-PCR metode smo uporabili kontrolne vzorce zunanje kontrole kakovosti podjetja RfB iz Nemčije, katerih genotip je bil že znan in potrjen (slika 17). Primerjava genotipov pri analizi štirih vzorcev z rezultati RfB je potrdila popolno ujemanje. Zaključili smo, da daje naša AS-PCR metoda točne rezultate.



Slika 17: Kontrolni vzorci zunanje kontrole kakovosti RfB z znanimi genotipi (w-reakcija s smernim oligonukleotidnim začetnikom LCT_wt_F, m-reakcija s smernim oligonukleotidnim začetnikom LCT_mut_F)

Za potrditev specifičnosti metode smo izvedli neke vrste navzkrižni preizkus. Tako smo vzorcu z mutiranim homozigotnim genotipom TT dodali nemutirani istosmerni oligonukleotid LCT_wt_F. Podobno smo naredili v drugi epruveti, kjer smo vzorcu z nemutiranim genotipom CC v reakcijsko mešanico dodali mutirani istosmerni oligonukleotidni začenik. Do pomnožitve fragmentov polimorfizma LCT-13910C>T ne bi smelo priti zaradi neujemajočega baznega para na tretji in zadnji bazi 3' konca, kar prepreči polimerazi nadaljnje pomnoževanje. Kot je razvidno iz slike 18 (analiza izvedena v dvojniku) je pri vseh vzorcih prišlo samo do pomnožitve intrinsega kontrolnega gena (gen CYP2D6, fragment dolžine 556 bp), medtem ko do pomnožitve odseka LCT ni prišlo, kar potrjuje specifičnost metode.



Slika 18: *Preverjanje specifičnosti metode*

4.1.4. Ocena primerljivosti rezultatov razvite metode z RFLP

Smernice, ki jih podaja CLSI (Clinical and laboratory standards institute) narekujejo, da mora laboratorij, ki uvaja novo metodo, potrditi genotipe na vzorcih z znanim genotipom, nato pa lahko analizira vzorce z neznanimi genotipi. Obvezen del verifikacije metod v laboratorijski medicini je primerjava nove metode z obstoječo (32,33). S tem namen smo z obema metodama genotipizirali 48 vzorcev DNA in ugotovili 100% ujemanje genotipov določen z obema metodama (slikovni prikaz se nahaja v prilogi 3).

Izbrali smo 15 vzorcev z CC genotipom, 18 vzorcev z CT genotipom in 15 vzorcev z TT genotipom. Kot notranjo kontrolo vseh treh genotipov smo uporabili vzorec 9 RfB 2/13 z nemutiranim homozigotnim genotipom CC, vzorec 10 RfB 1/13 z heterozigotnim genotipom CT, ter vzorec 10 RfB 2/13 z homozigotnim mutiranim genotipom TT.

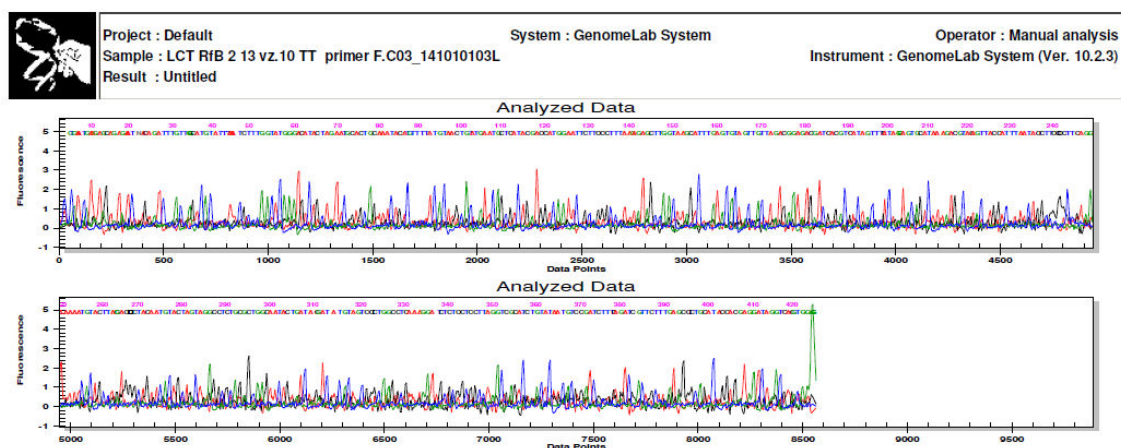
Preglednica XVI: Primerjava rezultatov genotipizacije med AS-PCR in RFLP

Vzorec	AS-PCR	RFLP	Vzorec	AS-PCR	RFLP	Vzorec	AS-PCR	RFLP
f175	CC	CC	964	CT	CT	765	TT	TT
z1002	CC	CC	983	CT	CT	958	TT	TT
z1003	CC	CC	993	CT	CT	966	TT	TT
z1012	CC	CC	996	CT	CT	974	TT	TT
z1021	CC	CC	998	CT	CT	984	TT	TT
z1028	CC	CC	1000	CT	CT	990	TT	TT
z1032	CC	CC	F168	CT	CT	991	TT	TT
z1033	CC	CC	F174	CT	CT	997	TT	TT
z1035	CC	CC	F176	CT	CT	1002	TT	TT
z1038	CC	CC	Z1007	CT	CT	1005	TT	TT
z1041	CC	CC	Z1008	CT	CT	1010	TT	TT
z1049	CC	CC	Z1031	CT	CT	1020	TT	TT
z1051	CC	CC	Z1040	CT	CT	1025	TT	TT
z1054	CC	CC	Z1056	CT	CT	Z1005	TT	TT
z1055	CC	CC	Z1058	CT	CT	Z1010	TT	TT
z1053	CT	CT	Z1060	CT	CT	Z1009	CT	CT

4.1.5. Potrditev genotipov s sekvenciranjem

Mutacije oz. zaporedje nukleotidov v vzorcu ugotovimo z metodo sekveniranja po Sangerju, ki je zlati standard za določanje genotipov.

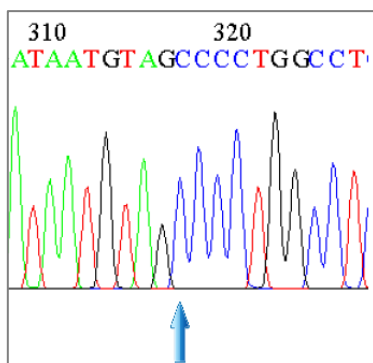
Tako smo na sekvenatorju GenomeLab™ GeXP določili nukleotidno zaporedje trem vzorcem RfB kontrole, katerih genotipi so bili že znani in trem vzorcem (z genotipom CC, CT in TT), ki smo jih genotipizirali tako z RFLP kot tudi z AS-PCR metodo. Primer rezultata sekvenčne analize prikazuje slika 19, kjer zaporedje nukleotidov odčitamo s pomočjo fluorescentnih barvil s katerimi so označeni ddNTP-ji. Tako dobimo zaporedje barvnih signalov, ki jih lahko povežemo z določenim nukleotidom. Z rdečo barvo je tako označen adenin (A), timin (T) z modro, citozin (C) s črno in gvanidin (G) z zeleno.



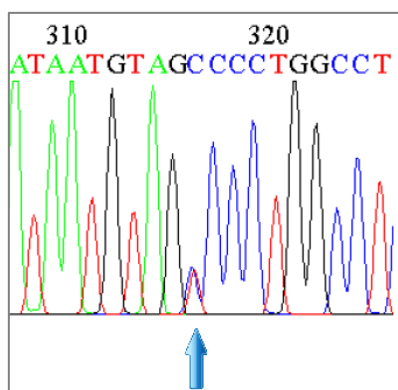
Slika 19: Elektroferogram RfB kontrole (mutirani genotip TT) s smernim oligonukleotidnim začetnikom (Legenda: Rdeča barva je adenin (A), modra timin (T), črna citozin (C) in zelena je gvanidin (G)).

Fluorescentni signali vseh vzorcev so bili nizki, kar ima za posledico slabšo občutljivost, saj se signali iz ozadja mešajo s sekvenco fragmenta in je tako odčitavanje zaporedja oteženo. Vzrok za to je po vsej verjetnosti potrebno iskati pri postopku obarjanja PCR produktov sekvenčne reakcije z etanolom, kjer se je lahko med procesom del peletke odstranil skupaj s supernatantom.

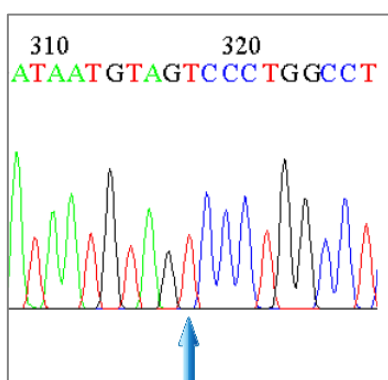
Odločili smo se, da na novo pripravimo vzorce (po tri vzorce z istim genotipom) ter jih pošljemo na sekvenčno analizo na Nizozemsko v laboratorij podjetja MacroGen.



Slika 20: Polimorfizem LCT-13910C>T v nemutirani homozigotni obliki CC, ki se kaže kot moder vrh (C)



Slika 21: Polimorfizem LCT-13910C>T v heterozigotni obliki CT, ki se kaže kot prekrivanje modrega(C) in rdečega (T) vrha



Slika 22: Polimorfizem LCT-13910C>T v mutirani homozigotni obliki TT, ki se kaže kot rdeči vrh (T)

Dobljene sekvence se ujemajo z bazami podatki zaporedja v regiji *MCM6* in z genotipom naše AS-PCR reakcije. Slike 20-22 prikazujejo izpis elektroferograma sekvence polimorfizma *LCT*-13910 v nemutirani, heterozigotni in mutirani obliki. Rezultati sekvenčne analize za vseh 9 vzorcev so podani v prilogi 2, primerjave genotipov pa v preglednici XVII.

Preglednica XVII: Primerjava genotipov med metodo AS-PCR in sekvenčno analizo

Vzorec	Genotip	
	AS-PCR	Sekvenčna analiza
996	CT	CT
997	TT	TT
1002	TT	TT
1020	TT	TT
Z1002	CC	CC
Z1007	CT	CT
Z1035	CC	CC
Z1049	CC	CC
f176	CT	CT

Ocena točnosti in specifičnosti, potrditev genotipov s sekvenciranjem in popolno ujemanje genotipov pri primerjavi z metodo RFLP potrjujejo, da je novo razvita metoda AS-PCR zanesljiva. Z njo pridobimo tako na času analize kot tudi na ceni, saj je RFLP dvostopenjska metoda (PCR reakcije in nato še restrikcije PCR fragmenta z endonuklazo), kjer se zato posledično uporablja tudi več reagentov.

Ugotavljamo, da lahko pričnemo metodo vpeljevati v rutinsko diagnostiko. Končno primernost metode bomo potrdili s pravilno genotipizacijo vzorcev zunanje kontrole kakovosti za polimorfizem -13910C>T.

V LMD smo tako uspešno uvedli natančen hitrejši in cenejši postopek genotipizacije za polimorfizem *LCT*-13910C>T.

4.2. KLINIČNI POMEN POLIMORFIZMA *LCT*-13910C>T ZA MINERALNO KOSTNO GOSTOTO

Namen naloge je bil ugotoviti ali ima polimorfizem *LCT*-13910C>T vpliv na MKG. Varianta TT povzroči večjo ekspresijo gena, poveča se količina mRNA in aktivnost encima se ohrani. Pri fiziološkem upadanju aktivnosti se neprebavljena laktoza iz mleka kopiči v črevesju in povzroča neprijetne simptome. Zaradi tega se ljudje z CC genotipom izogibajo uživanju mleka in mlečnih izdelkov. Študije na drugih populacijah so dokazale, da zmanjšan vnos kalcija vpliva na MKG in posledično na nastanek osteoporoze (34, 35, 36).

Polimorfizmem *LCT*-13910C>T smo določili v slovenski populaciji z analizo 623 vzorcev, ki smo jih razdelili na podskupini pomenopavznih žensk ter starejših moških. Pri vseh preiskovancih je bila predhodno izmerjena MKG na vratu stegenice (MKG_{fn}), celotnega kolka (MKG_{tot}) in ledvenih vretenc (MKG_{ls}). Vrednosti so podane v preglednici XVIII.

V skupini pomenopavznih žensk je bil starostni razpon od 42 do 93 let, pri moških pa od 55 do 84 let. Srednje vrednosti in standardne deviacije izmerjenih parametrov za obe podskupini so podane v preglednici XVIII.

Preglednica XVIII: Predstavitev osnovnih značilnosti podskupin

POMENOPAVZNE ŽENSKE	Vrednost	Število preiskovank	STAREJŠI MOŠKI	Vrednost	Število preiskovancev
Višina (cm)	159,7 ± 6,2	533	Višina (cm)	171,3 ± 5,9	114
Masa (kg)	69,5 ± 12,1	534	Masa (kg)	81,7 ± 12,9	114
Starost (leta)	65,2 ± 9,5	529	Starost (leta)	67,6 ± 6,1	114
ITM	27,3 ± 4,5	533	ITM	27,8 ± 3,8	114
MKG _{tot} (kg/m ²)	0,818 ± 0,148	525	MKG _{tot} (kg/m ²)	1,025 ± 0,167	87
MKG _{fn} (kg/m ²)	0,684 ± 0,124	527	MKG _{fn} (kg/m ²)	0,813 ± 0,161	87
MKG _{ls} (kg/m ²)	0,861 ± 0,169	531	MKG _{ls} (kg/m ²)	1,059 ± 0,178	113

4.2.1. Hardy Weinbergovo ravnotežje

Določili smo frekvenco genotipov in alelov v naši skupini pomenopavznih žensk in starejših moških ter nato preverili, če so v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

V študijah populacijske genetike na ljudeh velja načelo, da alelne in genotipske frekvence v populaciji ostajajo konstantne iz ene generacije v drugo v odsotnosti motečih dejavnikov (mutacij, naravne selekcije, migracij in emigracij ljudi, majhne populacije in nenaključno parjenje). V praksi to pomeni, da genotipske frekvence v populaciji, ki niso v Hardy Weinbergovem ravnotežju, nakazujejo na možne napake pri naboru in ali pri analizi vzorcev. Primerjavo naše eksperimentalno ugotovljene genotipske frekvence s teoretično oz. izračunano po HW enačbi smo opravili s pomočjo χ^2 testa. Postavili smo ničelno hipotezo, ki trdi, da se ugotovljene frekvence značilno razlikujejo od teoretičnih (pričakovanih). S χ^2 testom smo hipotezo zavrnili, saj so bile vse tri p vrednosti večje od 0,05 (vsi vzorci: p = 0,30, pomenopavzne ženske: p = 0,44, starejši moški: p = 0,43) in tako potrdili, da se genotipi v Hardy-Weinbergovem ravnotežju (preglednice XIX-XXI).

Preglednica XIX: Frekvence genotipov in alelov pri vseh vzorcih

POMENOPAVZNE ŽENSKE in STAREJŠI MOŠKI	Ugotovljene vrednosti				Pričakovane vrednosti Hardy-Weinbergovega ravnotežja	
	Alel C	Alel T	N	genotipska frekvenca %	N	genotipska frekvenca %
genotip CC	482	0	241	38,68	234,84	37,70
genotip CT	283	283	283	45,43	295,32	47,40
genotip TT	0	198	99	15,89	92,84	14,90
Skupaj	765	481	623	100	623	100
Frekvenca alelov	0,61	0,39				
p vrednost						p = 0,30

*p vrednost χ^2 testa 0,30, ki smo jo dobili pri primerjavi genotipskih frekvenc pri vseh vzorcih (37)

Preglednica XX: Frekvence genotipov in alelov pri podskupini pomenopavzne ženske

POMENOPAVZNE ŽENSKE	Ugotovljene vrednosti				Pričakovane vrednosti Hardy-Weinbergovega ravnotežja	
	Alel C	Alel T	N	genotipska frekvenca %	N	genotipska frekvenca %
genotip CC	402	0	201	38,88	196,83	38,07
genotip CT	236	236	236	45,65	244,34	47,26
genotip TT	0	160	80	15,47	75,83	14,67
Skupaj	638	396	517	100	517	100
Frekvenca alelov	0,62	0,38				
p vrednost						p = 0,44

*p vrednost χ^2 testa 0,44, ki smo jo dobili pri primerjavi genotipskih frekvenc v podskupini pomenopavznih žensk (37)

Preglednica XXI: Frekvence genotipov in alelov pri podskupini starejši moški

STAREJŠI MOŠKI	Ugotovljene vrednosti				Pričakovane vrednosti Hardy-Weinbergovega ravnotežja	
	Alel C	Alel T	N	genotipska frekvenca %	N	genotipska frekvenca %
genotip CC	80	0	40	37,74	38,04	35,89
genotip CT	47	47	47	44,34	50,92	48,04
genotip TT	0	38	19	17,92	17,04	16,08
Skupaj	127	85	106	100	106	100
Frekvenca alelov	0,60	0,40				
p vrednost						p = 0,43

*p vrednost χ^2 testa 0,43, ki smo jo dobili pri primerjavi genotipskih frekvenc v podskupini starejši moški (37)

V nadaljevanju pa nas je zanimalo, ali se genotipske frekvence v naši populaciji razlikujejo od frekvenc v drugih populacijah po svetu. Frekvence genotipov

polimorfizma *LCT*-13910C>T v podatkovni bazi Ensembl (38) za Evropejce in druge narode so prikazane v preglednici XXII.

Preglednica XXII: Frekvence genotipov in alelov v različnih populacijah

Populacija	LCT -13910C>T			Frekvence alelov		p vrednost
	CC n (%)	CT n (%)	TT n (%)	C n (%)	T n (%)	
Evropejci	154 (30,6)	187 (37,2)	162 (32,2)	495 (49,0)	511 (51,0)	p < 0,01
Finci	14 (14,2)	53 (53,5)	32 (32,3)	81 (40,9)	117 (59,1)	p < 0,01
Britanci	9 (9,9)	33 (36,3)	49 (53,8)	51 (28,0)	131 (72,0)	p < 0,01
Španci	34 (31,8)	48 (44,8)	25 (23,4)	116 (54,2)	98 (45,8)	p = 0,049
Slovenci	241 (38,7)	283 (45,4)	99 (15,9)	765 (61,0)	481 (39,0)	
južni Azijci	387 (79,1)	93 (19,1)	9 (1,8)	867 (88,7)	111 (11,3)	p < 0,01
vzhodni Azijci	504 (100)			1008 (100)		p < 0,01
Američani	219 (63,1)	106 (30,6)	22 (6,3)	544 (78,4)	150 (21,6)	p < 0,01
Afričani	629 (95,2)	28 (4,2)	4 (0,6)	1286 (97,3)	36 (2,7)	p < 0,01

Dobljene vrednosti frekvence genotipov slovenske populacije so pokazale, da prevladuje heterozigotni genotip CT (45,4%), sledi genotip CC (38,7%), najmanj pa je mutiranega TT genotipa (15,9%). Po pregledu podatkov za nekatere evropske in druge populacije vidimo, da je pogostost pojavljanja genotipov zelo različna. V skupni evropski populaciji so genotipi zastopani približno po enakih deležih, pri južnih Azijcih, Američanih in Afričanih pa prevladuje genotip CC, njegovo največjo, kar 100% pogostost, pa zasledimo pri vzhodnih Azijcih. S

Fisherjevim testom smo ugotovili, da se naše genotipske in alelne frekvence zelo razlikujejo od le-teh v drugih populacijah ($p < 0,01$). Še najbolj smo podobni glede tega s špansko populacijo ($p = 0,049$). Naši rezultati so skladni z literaturnimi viri, kjer poročajo o padanju pogosti laktozno-persistentega mutiranega genotipa TT iz severa proti jugu Evrope. Podobno zasledimo pri južnih Azijcih, Afričanih in Američanih. Avtor Misselwitz s sodelavci razlagajo ta fenomen z verjetno nedostopnostjo drugih virov hrane in kalcija v severnih deželah (10).

4.2.2. Ocena normalnosti porazdelitve

Pred statistično analizo povezanosti genotipa s fenotipom (MKG) smo najprej morali preveriti porazdelitev vrednosti MKG celotnega kolka (MKG_{tot}), vratu stegenice (MKG_{fn}) in ledvenega vretenca (MKG_{ls}) v naši populaciji. Za ugotavljanje normalnosti porazdelitve smo uporabili Kolmogorov-Smirnovov test. Postavili smo ničelno hipotezo, ki pravi, da se spremenljivke porazdeljujejo normalno in jo sprejeli če je bila vrednost $p > 0,05$.

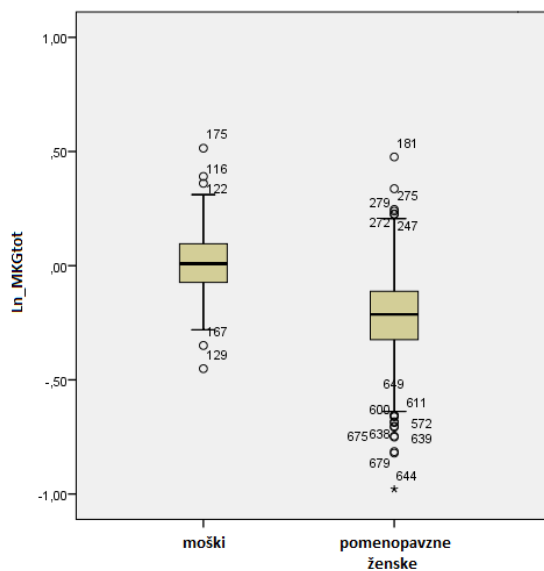
Preglednica XXIII: *p* vrednosti Kolmogorov-Smirnovega testa

	<i>MKG_{tot}</i>	<i>MKG_{fn}</i>	<i>MKG_{ls}</i>
<i>Pomenopavzne ženske</i>	$p = 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
<i>Starejši moški</i>	$p = 0,008$	$p = 0,185$	$p = 0,015$

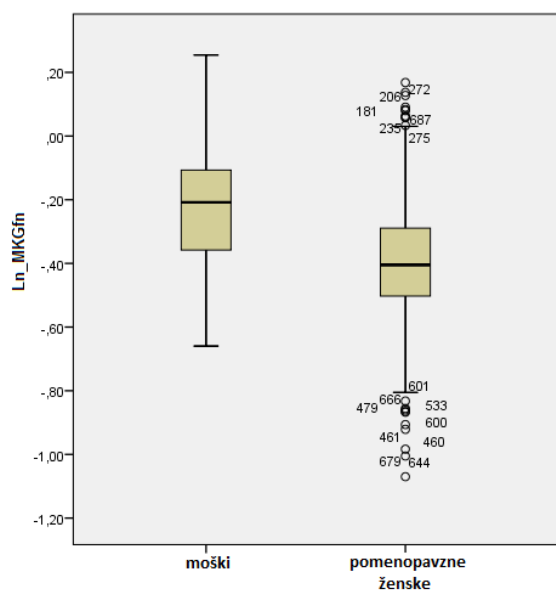
Rezultati analize s Kolmogorov-Smirnovim testom so pokazali, da se v podskupini pomenopavznih žensk vse meritve MKG ne porazdeljujejo normalno, pri moških pa se je normalno porazdeljevala samo meritev MKG_{fn}. Zato smo v naslednjem koraku vse spremenljivke logaritemsko transformirali in ponovili Kolmogorov-Smirnov test. Tokrat je ta statistična analiza pokazala normalno porazdelitev spremenljivk pri moških, pri pomenopavznih ženskah pa je porazdelitev ostala nespremenjena. Za lažjo statistično primerjavo smo v nadaljevanju za vse spremenljivke uporabili neparametrične statistične teste.

4.2.3. Primerjava vrednosti MKG med skupinama različnih spolov

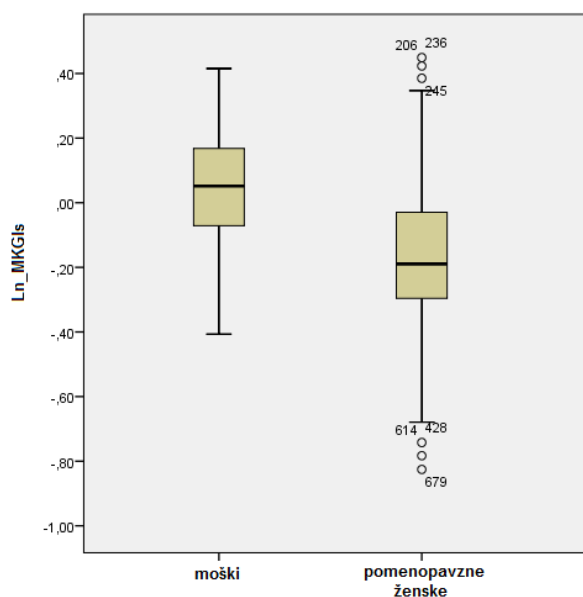
Primerjava vrednosti spremenljivk med podskupinama je prikazana s histogrami na slikah 23-25.



Slika 23: Vrednosti logaritmsko transformirane spremenljivko MKGtot po posameznih podskupinah



Slika 24: Vrednosti logaritmsko transformirane spremenljivko MKGfn po posameznih podskupinah



Slika 25: Vrednosti logaritamsko transformirane spremenljivko MKGs po posameznih podskupinah

Iz histogramov je razvidno, da imajo moški na vseh izmerjenih mestih višjo MKG od pomenopavznih žensk. Rezultati so pričakovani, saj imajo moški daljše in širše kosti in tako fiziološko za 25% večjo kostno maso kot ženske (39).

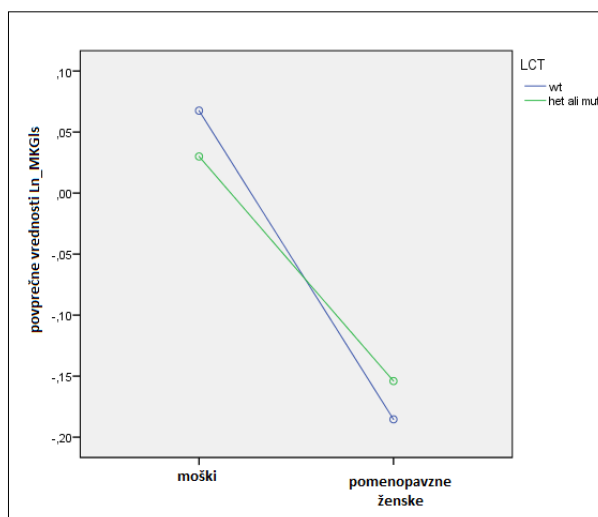
4.2.4. Ocena povezanosti negenetskih in genetskih dejavnikov z mineralno kostno gostoto

S pomočjo splošnega linearnega modela (test ANCOVA) smo ovrednotili povezanost dejavnikov kot so starost, ITM, podskupina in genotip z MKG na vseh treh izmerjenih mestih pri obeh podskupinah (preglednica XXIV). Genotip je v tem primeru dihotomna spremenljivka, kjer gledamo genotip CC proti genotipoma CT in TT. Postavili smo ničelno hipotezo, ki pravi, da posamezna spremenljivka ne vpliva na MKG ($p < 0,05$).

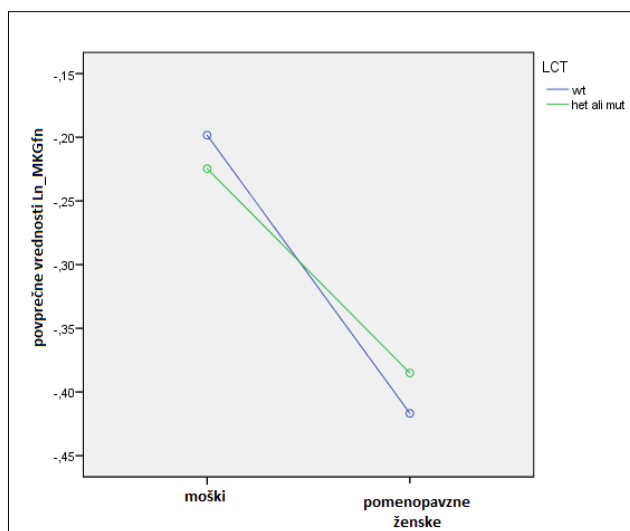
Preglednica XXIV: Vpliv spremenljivk na MKG pri obeh podskupinah

<i>Spremenljivka</i>	<i>MKG_{tot}</i> <i>(n = 585)</i>	<i>MKG_{fn}</i> <i>(n = 587)</i>	<i>MKG_{ls}</i> <i>(n = 614)</i>
<i>starost</i>	<i>p < 0,001</i>	<i>p < 0,001</i>	<i>p < 0,001</i>
<i>ITM</i>	<i>p < 0,001</i>	<i>p < 0,001</i>	<i>p < 0,001</i>
<i>spol</i>	<i>p < 0,001</i>	<i>p < 0,001</i>	<i>p < 0,001</i>
<i>genotip</i>	<i>p = 0,149</i>	<i>p = 0,883</i>	<i>p = 0,876</i>

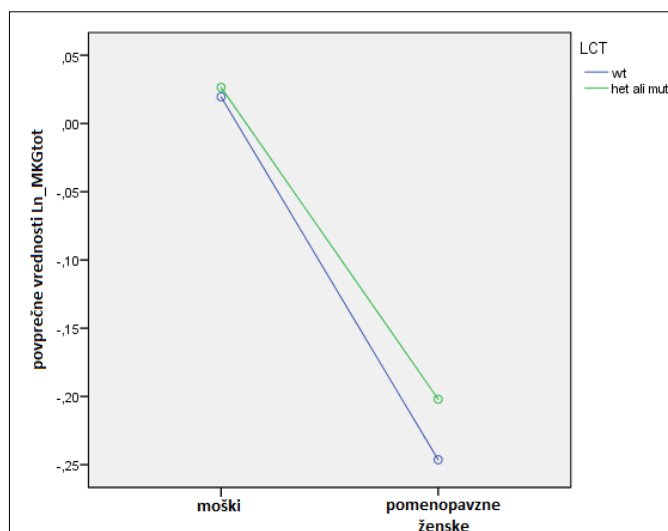
Statistični test je pokazal, da so starost, ITM in spol značilno povezani z nivoji MKG na treh predelih skeleta, medtem ko vpliv genotipa nismo dokazali ($p > 0,05$). Te ugotovitve so skladne z literaturo, kjer navajajo, da na znižano MKG in razvoj osteoporoze vpliva starost (s starostjo se prenova kosti upočasnijo in zmanjša se tudi kostna masa), spol (ženskam se v pomenopavznem obdobju nivo estrogenov močno zmanjša, kar ima za posledico povečano kostno razgradnjo) in ITM (osebe z nižjim ITM imajo večje tveganje za zlom (8, 35)). Zanimivo je, da smo v podskupini starejših moških ugotovili, da je genotip CC povezan z višjo MKG na predelu ledvenih vretenc ter vratu stegenice, medtem ko je bil v predelu kolka pri moških in na vseh predelih skeleta pri ženskah ta genotip CC povezan z nižjo MKG (slike 26-28).



Slika 26: Primerjava povprečne vrednosti $\ln_MKGls$ med moško in pomenopavno skupino v odvisnosti z LCT genotipom (en ali oba mutirana alela proti nemutiranemu alelu) prilagojena na povprečno starost 65,5 let in ITM 27,3.



Slika 27: Primerjava povprečne vrednosti $\ln_MKGfn$ med moško in pomenopavno skupino v odvisnosti z LCT genotipom (en ali oba mutirana alela proti nemutiranemu alelu) prilagojena na povprečno starost 65,5 let in ITM 27,3.



Slika 28: Primerjava povprečne vrednosti $\ln_MKG_{tot}$ med moško in pomenopavzno skupino v odvisnosti z LCT genotipom (en ali oba mutirana alela proti nemutiranemu alelu) prilagojena na povprečno starost 65,5 let in ITM 27,3.

V nadaljevanju pa smo zaradi relativno majhne razlike med genotipi pri pomenopavznih ženskah statistične teste izvedli še enkrat in skušali ugotoviti povezanost MKG z aleli (enega ali oba mutirana alela proti nemutiranemu alelu). Postavili smo ničelno hipotezo, ki pravi, da imata obe alelni skupini primerljivo MKG na vseh predelih skeleta, kjer je bila MKG izmerjena. Vpliv alelana MKG smo potrdili pri spremenljivkah MKG_{tot} ($p = 0,001$) in MKG_{fn} ($p = 0,018$), medtem ko se pri MKG_{ls} ($p = 0,058$) nakazuje.

Razlike znotraj genotipskih podskupin pri pomenopavznih ženskah smo nato ugotavljali s pomočjo Bonferoni *post hoc* testa (preglednica XXV).

Preglednica XXV: Rezultati post hoc testa v podskupini pomenopavzne ženske (n = 517)

Spremenljivka	Genotip	Vrednost p	Razlika med genotipoma
Ln_MKGtot	CC <i>proti</i> CT	0,002	-0,049
	CC <i>proti</i> TT	0,300	-0,032
	CT <i>proti</i> TT	1,000	0,017
Ln_MKGfn	CC <i>proti</i> CT	0,074	-0,033
	CC <i>proti</i> TT	0,369	-0,031
	CT <i>proti</i> TT	1,000	0,002
Ln_MKGls	CC <i>proti</i> CT	0,127	-0,036
	CC <i>proti</i> TT	1,000	-0,019
	CT <i>proti</i> TT	1,000	0,018

Signifikantno razliko med genotipoma CC in CT smo dobili pri spremenljivki MKG kolka ($p = 0,002$), pri MKG na vratu stegenice pa se ta razlika nakazuje ($p = 0,074$).

Ugotovili smo, da imajo pomenopavzne ženske z genotipom CT ($n = 236$) za 4,9% višjo MKG kolka ter za 3,3% višjo MKG na vratu stegenice v primerjavi z nosilkami CC ($n = 201$) genotipa. Genotip TT ($n = 80$) ima v primerjavi z genotipom CC sicer višjo MKG za 1,9-3,2%, vendar je to statistično nepomembno, kar je verjetno posledica manjšega števila vzorcev z mutacijo na obeh alelih. Ne glede na to naši rezultati nakazujejo, da je T alel polimorfizma *LCT*-13910C>T povezan z višjo MKG pri pomenopavznih ženskah, pri moških pa te povezanosti ni. Rezultat je pričakovan, saj alel T označuje osebe z višjo aktivnostjo laktaze, ki načeloma dobro prenašajo mleko in mlečne izdelke.

Laktozno intolerantne osebe močno znižajo vnos kalcija (31,35,40,41), ob pojavu hujših simptomov pa je znižana tudi absorpcija kalcija (11), kar ima negativne posledice na kostno homeostazo. V naši študiji nismo imeli podatkov o vnosu kalcija oz. mleka in mlečnih izdelkov. Tako lahko le sklepamo iz ugotovitev predhodnih študij in naših rezultatov, da je genotip CC pri naših pomenopavznih ženskah zaradi znižanega vnosa kalcija povezan z znižano MKG na predelu kolka in vratu stegenice, medtem ko se v predelu ledvenih vretenc ta povezava samo nakazuje. Pri pregledu literature smo ugotovili, da so naši rezultati skladni z objavljenimi rezultati na nekaterih evropskih populacijah (24,25), kjer so na pomenopavznih ženskah potrdili povezanost polimorfizma z znižanim vnosom kalcija in nižjo MKG na izmerjenih mestih. V nasprotju pa študija na finskih pomenopavznih ženskah, ki jo je objavil Enattah s sod (23), ni pokazala nobene povezave med genotipom in znižanim vnosom kalcija, znižano MKG, osteoporozo ali zlomom.

Pri moških nismo potrdili povezave MKG in genotipom, kar se sklada z ugotovitvami v študiji na finskih (Enattah s sod 2004) in avstrijskih (Gugatschka s sod 2007) starejših moških. V raziskavi tudi niso zaznali razlike v vnosu kalcija pri laktozno intolerantnih osebah (22, 42).

Študija Enattah s sod (2005) na starostnikih je potrdila, da imajo posamezniki z genotipom CC in manjšim vnosom kalcija nižjo MKG in povečano tveganje za zlom v primerjavi z drugimi genotipi (43). Nasprotje tega pa so izsledki študije (Koek s sod) na danskih starostnikih, ki so pokazali, da je laktazni ne-perzistentni genotip povezan z nizkim vnosom kalcija in nizkim serumskim nivojem kalcija, ne pa tudi z MKG in zlomi. Populacija te študije ni bila v Hardy-Weinbergovem ravnotežju, kar je verjetno posledica napačne genotipizacije (44). Študija na estonskih populaciji, s samozvanim stanjem laktozne intolerance (Rask Pedersen s sod 1982), pa je pokazala povečano verjetnost za osteoporozi zlom (36).

Predvidevamo, da so nasprotujoči si zaključki študij posledica različno zahtevnih vprašalnikov za pridobivanje podatkov o dnevnem vnosu mleka in mlečnih izdelkov, o uživanju nadomestkov kalcija in laktaznih pripravkov. Prav tako ni bilo jasne razdelitve med preiskovanci z genotipom CC, ki imajo simptome in tiste brez simptomov. Pri tem bi morali biti tudi navedeni pomembni dejavniki kot so fizična

aktivnost, kajenje, sončenje, ipd., ki kljub znižanem vnosu kalcija poskrbijo, da je pri posamezniku dosežena maksimalna kostna gostota.

V študiji smo pri pomenopavznih ženskah dokazali, da imajo laktazno ne-perzistentne posameznice večje tveganje za znižano MKG na predelu kolka in vratu stegenice ter nakazano tveganje v predelu ledvenih vretenc s posledičnem razvojem osteoporoze v primerjavi z laktazno prezistentnimi osebami. To je verjetno posledica odklanjanja mleka in mlečnih izdelkov v prehrani zaradi pojava neprijetnih prebavnih simptomov. Zato bi bilo v nadaljnjih študijah smiselno pridobiti tudi podatke o vnosu kalcija s prehrano in s prehranskimi dopolnili.

5. SKLEP

Ob koncu našega dela smo prišli do naslednjih zaključkov:

RFLP metoda za genotipizacijo polimorfizma *LCT*-13910C>T se lahko zamenja z vpeljavo nove, zanesljive, hitrejše in cenovno ugodnejše alelno specifične metode. Primerjava rezultatov genotipizacije je pokazala 100% ujemanje med obema metodama in s sekvenčno analizo je bila tudi dokazana pravilnost nukleotidnega zaporedja določenih genotipov z metodo AS-PCR v območju polimorfizma - 13910C>T v regiji *MCM6*.

Genotipi CC, CT in TT so bili prisotni v 38,7%, 45,4% in 15,9% deležu populacije in so biliv Hardy-Weinbergovem ravnotežju ($p = 0,30$). Pri evropski populaciji je delež genotipa CC in CT manjši (30,6% in 37,2%), medtem ko je delež mutiranega laktazno persistentnega TT genotipa 1-krat višji od slovenske populacije (32,2%).

V skupini pomenopavznih žensk smo dokazali statistično značilno povezanost polimorfizma *LCT*-13910C>T z MKG kolka ($p = 0,001$) in vratu stegnenice ($p = 0,018$). Na mestu ledvenih vretenc pa se ta vpliv nakazuje ($p = 0,058$). Preiskovanke z genotipom CT so imele za 5% oz. 3,3% višjo MKG kolka in vratu stegnenice kot preiskovanke z genotipom CC. Pri moških te povezave nismo mogli dokazati.

Iz tega sklepamo, da imajo pomenopavzne ženske z laktozno ne-perzistentnim genotipom večje tveganje za nižjo MKG in osteoporozo kot laktozno perzistentne osebe.

Zaradi pomanjkanja podatkov o uživanju mleka in mlečnih ter morebitnih prehranskih dodatkov kalcija nismo dobili vpogleda o vnosu kalcija, kar bi našim izsledkom dodalo še dodatno težo. Zato priporočamo, da se v nadaljnjih študijah MKG vključi v vprašalnik tudi ta podatek.

6. LITERATURA

1. Hadjidakis DJ, Androulakis II: Bone Remodeling. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1092:385-396.
2. Watts NB: Clinical Utility of Biochemical Markers of Bone Remodeling. *Clinical Chemistry* 1999; 45(8(B)): 1359-68.
3. Mencej Bedrač S, Ostanek B, Mlakar V, Zupan J, Kocjan T, Preželj J, Marc J: Sodobni pogledi na nastanek osteoporoze. *Farm Vestn* 2012; 63:269-79.
4. Utilization of DXA Bone Mineral Densitometry in Ontario. *Ont Health Technol Assess Ser* 2006; 6(20): 1–180. Dostopno na spletni strani: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3379167/pdf/ohtas-06-180.pdf> (3.4.2014).
5. Reid IR, *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 8 th ed, John Wiley&Sons, Inc, 2013; 21:165-7.
6. Nras: Osteoporosis in RA. Dostopno na spletni strani: <http://www.nras.org.uk/osteoporosis-in-ra> (10.4.2016).
7. Caroli A, Poli A, Ricotta D, Banfi G, Cocchi D: Dairy intake and bone health: Aviewpoint from the state of the art. *J Dairy Sci* 2011; 94:5249-62.
8. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: *Interna medicina*, 4. izdaja. Založba Littera Ljubljana, 2011: 973-1008
9. Wikipedia. Dostopno na spletni strani: <https://pl.wikipedia.org/wiki/Laktaza> (13.4.2016).
10. Misselwitz B, Pohl D, FrüHauf H, Fried M, Vavricka SR, Fox M: Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. *United European Gastroenterol J* 2013; 1(3): 151-9.
11. Mattar R, de Campos Mazo DF, Carrilho FJ: Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clin Exp Gastroenterol* 2012; 5: 113-21.
12. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D: *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, 8. izdaja, The McGraw-Hill Copmanies, Inc., New York, 2001: 1623-63.
13. Troelsen JT: Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1723(1-3): 19-32.
14. Dusty Carroll Lesson Plan 4: Getting to know Lactase. Dostopno na spletni strani: <http://www.sas.upenn.edu/~carroll/LessPlan4Lactase.pdf> (16.4.2016).

15. Amiri M, Diekmann L, von Köckritz-Blickwede M, Naim HY: The Diverse forms of Lactose Intolerance and the Putative Linkage to Several Cancers. *Nutrients* 2015; 7(9): 7209-30.
16. Naim HY: Molecular and cellular aspects and regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *Histol Histopathol* 2001; 16(2):553-61.
17. Mattar R, Monteiro Mdo S, Silva JM, Carrilho FJ: LCT-22018G>A single nucleotide polymorphism is a better predictor of adult-type hypolactasia/lactase persistence in Japanese-Brazilians than LCT-13910C>T. *Clinics* 2010; 65(12):1399-1400.
18. Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Babbitt CC, Silverman JS, Powell K, Mortensen HM, Hirbo JB, Osman M, Ibrahim M, Omar SA, Lema G, Nyambo TB, Gori J, Bumpstead S, Pritchard JK, Wray GA, Deloukas P: Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat Genet* 2007; 39(1):31-40.
19. Stallings VA, Oddleifson NW, Negrini BY, Zemel BS, Wellens R: Bone mineral content and dietary calcium intake in children prescribed a low-lactose diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 18(4):440-5.
20. Infante D, Tormo R: Risk of inadequate bone mineralization in diseases involving long-term suppression of dairy products. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30(3): 310-3.
21. Di Stefano M, Veneto G, Malservisi S, Cecchetti L, Minguzzi L, Strocchi A, Corazza GR: Lactose malabsorption and intolerance and peak bone mass. *Gastroenterology* 2002; 122(7):1793-9.
22. Enattah N, Välimäki VV, Välimäki MJ, Löyttyäniemi E, Sahi T, Järvelä I: Molecularly defined lactose malabsorption, peak bone mass and bone turnover rate in young finnish men. *Calcif Tissue Int* 2004; 75(6): 488-93.
23. Enattah N, Pekkarinen T, Välimäki MJ, Löyttyäniemi E, Järvelä I: Genetically defined adult-type hypolactasia and self-reported lactose intolerance as risk factors of osteoporosis in Finnish postmenopausal women. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59(10): 1105-11.
24. Bácsi K, Kósa JP, Lazáry A, Balla B, Horváth H, Kis A, Nagy Z, Takács I, Lakatos P, Speer G: LCT 13910 C/T polymorphism, serum calcium, and bone mineral density in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2009; 20(4): 639-45.
25. Obermayer-Pietsch BM, Bonelli CM, Walter DE, Kuhn RJ, Fahrleitner-Pammer A, Berghold A, Goessler W, Stepan V, Dobnig H, Leb G, Renner W: Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. *J Bone Miner Res* 2004; 19(1): 42-7.

26. Ingram CJ, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, Swallow DM: Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Hum Genet* 2009; 124(6):579-91.
27. Mlinarič-Raščanl: Farmakogenomika, 1. izdaja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010: 14-44, 45-73.
28. Gaudet M, Fara AG, Beritognolo, Sabatti M: Allele-Specific PCR in SNP Genotyping, *Methods Mol Biol* 2009; 578: 415-24.
29. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I, 1. izdaja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 108-20.
30. Wikipedia. Dostopno na spletni strani: https://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequencing (10.3.2015)
31. Beckman Coulter GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System. Dostopno na spletni strani: http://research.bergen.org/images/Documents/Stem_Cell/Beckman_Coulter_GenomeLab_GeXP_Genetic_Analysis_System_Complete_Guide.pdf (10.3.2015).
32. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, Müller CR, Pratt V, Wallace A; EuroGentest Validation Group: A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet* 2010; 18(12):1276-88.
33. Ahmad-Nejad P, Dorn-Beineke A, Pfeiffer U, Brade J, Geilenkeuser WJ, Ramsden S, Pazzagli M, Neumaier M: Methodologic European external quality assurance for DNA sequencing: the EQUALseq program. *Clin Chem* 2006; 52(4): 716-27.
34. Obermayer-Pietsch BM, Gugatschka M, Reitter S, Plank W, Strele A, Walter D, Bonelli C, Goessler W, Dobnig H, Högenauer C, Renner W, Fahrleitner-Pammer A: Adult-type hypolactasia and calcium availability: decreased calcium intake or impaired calcium absorption?. *Osteoporos Int* 2007; 18(4): 445-51.
35. Nguyen TV, Center JR, Eisman JA: Osteoporosis in elderly men and women: effects of dietary calcium, physical activity, and body mass index. *J Bone Miner Res* 2000; 15(2): 322-31.
36. Wilt TJ, Shaikat A, Shamliyan T, et al. Lactose intolerance and health. *Evid Rep Technol Asses* (Full report) 2010; 192:1-410.
37. Koonec: Hardy-Weinberg equilibrium calculator. Dostopno na spletni strani: <http://www.koonec.com/k-blog/2010/06/20/hardy-weinberg-equilibrium-calculator/> (28.10.2015).

38. Ensembl! Dostopno na spletni strani:[http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=2:135850576-135851576;v=rs4988235;vdb=variation;vf=3089869#population_fraq_AFR\(28.10.2015\)](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=2:135850576-135851576;v=rs4988235;vdb=variation;vf=3089869#population_fraq_AFR(28.10.2015)).
39. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: Physiology, 5 th ed., Mosby, 2004: 794-817.
40. Corazza GR, Benati G, Di Sario A, Tarozzi C, Strocchi A, Passeri M, Gasbarrini G: Lactose intolerance and bone mass in postmenopausal Italian women. *Br J Nutr* 1995; 73:479-487.
41. Honkanen R, Pulkkinen P, Järvinen R, Kröger H, Lindstedt K, Tuppurainen M, Uusitupa M: Does lactose intolerance predispose to low bone density? A population-based study of perimenopausal Finnish women. *Bone* 1996; 19(1): 23-8.
42. Gugatschka M, Hoeller A, Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H, Pietschmann P, Kudlacek S, Obermayer-Pietsch B: Calcium supply, bone mineral density and genetically defined lactose maldigestion in a cohort of elderly men. *J Endocrinol Invest* 2007, 30(1): 46-51.
43. Enattah NS, Sulkava R, Halonen P, Kontula K, Järvelä I: Genetic variant of lactase-persistent C/T-13910 is associated with bone fractures in very old age. *J Am Geriatr Soc* 2005; 53(1): 79-82.
44. Koek WN, van Meurs JB, van der Eerden BC, Rivadeneira F, Zillikens MC, Hofman A, Obermayer-Pietsch B, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG, van Leeuwen JP: The T-13910C polymorphism in the lactase phlorizin hydrolase gene is associated with differences in serum calcium levels and calcium intake. *J Bone Miner Res* 2010; 25(9): 1980-7.
45. Hawkins JR: Finding Mutations The Basics, Oxford University Press, New York, 1997: 27-55.

7. PRILOGE

Priloga 1: Rezultati genotipizacije z AS-PCR metodo (LCT genotip: 0-wt, 1-het, 2-mut)

Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip
913	1	728	1	1087Z	0
914	2	729	0	1089Z	1
919	1	732	1	1091Z	1
922	2	733	0	1092Z	1
924	1	741	0	1093Z	0
935	1	743	2	1094Z	2
937	0	744	0	771	1
940	2	747	2	787	2
941	0	748	1	794	0
944	1	749	0	809	0
948	1	750	2	813	1
951	0	752	0	817	0
953	1	753	1	818	1
957	1	1021Z	0	820	1
958	2	1036Z	1	824	0
965	1	1039Z	2	827	0
973	1	1041Z	0	920	0
974	2	1042Z	0	921	1
975	0	1043Z	1	1009	1
979	1	1045Z	1	1015	1
980	0	1049Z	0	1020	2
981	1	1052Z	1	1021	1
670	1	1053Z	0	1022	1
671	0	1064Z	0	1025	2
681	1	1066Z	0	1027	1
684	2	1067Z	2	1035	0
687	1	1068Z	1	1045	0
688	0	1069Z	1	955	1
691	1	1071Z	0	956	1
696	1	1072Z	1	962	1
697	2	1074Z	2	977	1
703	2	1075Z	0	987	0
705	1	1078Z	2	988	0
715	0	1081Z	1	991	2
718	1	1083Z	1	1050	1
721	1	1085Z	1	1057	0

Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip
1066	1	821	2	727	1
1071	1	823	1	730	0
1072	0	1011	1	738	0
1098	0	1013	0	745	0
1126	0	1017	0	766	1
1032	2	1028	1	770	0
1036	1	1032	1	778	0
1042	1	1036	2	781	2
1049	0	1040	1	782	1
1053	0	985	0	785	1
1065	0	986	1	793	0
1072	1	992	0	796	0
1076	2	1056	0	797	0
1077	0	1063	0	798	1
1079	1	1074	1	801	1
1086	1	1078	0	811	1
1090	1	1091	0	812	0
1091	0	1144	2	815	1
1095	1	1148	2	822	2
1101	0	667	1	923	1
1102	1	673	0	928	1
680	0	674	1	929	1
686	0	678	1	936	1
699	1	679	1	950	0
702	2	682	1	1010	0
707	0	690	2	1016	0
735	0	698	0	1026	2
739	2	701	0	1029	1
746	0	704	2	1033	0
751	0	706	0	1041	0
765	2	709	1	1042	2
773	1	711	0	1043	0
786	1	719	2	1044	2
792	1	722	1	960	0
807	2	725	1	964	1
814	0	726	1	966	2

Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip
969	0	1026	0	1003	0
990	2	1028	1	1034	1
995	0	1035	0	1037	0
1054	1	1039	2	993	1
1055	1	1052	1	994	0
1059	0	1054	0	1049	0
1060	0	1060	1	1068	2
1061	1	1064	1	1069	0
1064	1	1073	0	1073	0
1065	1	1080	2	1077	1
1087	1	1081	0	1082	1
1088	2	1083	1	1090	0
1092	0	1087	0	1094	1
1097	0	1088	0	1102	0
1099	0	1089	1	1119	1
1100	1	1092	2	1120	0
1103	0	1103	1	1122	1
1104	0	1113	0	1124	0
1107	1	668	0	1125	1
1110	0	672	1	666	1
1115	0	689	0	669	1
1116	1	693	1	676	0
1121	1	694	2	677	0
1127	0	700	0	685	0
1138	1	714	2	695	0
1142	1	716	1	708	1
1145	2	731	0	710	1
1005	1	736	1	713	1
1011	0	737	1	717	1
1013	1	740	1	720	1
1014	1	742	0	723	1
1016	1	760	0	734	0
1020	0	762	1	754	0
1021	0	799	1	756	1
1149	1	805	0	761	1
1025	1	806	1	1002Z	0

Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip
1003Z	0	1100Z	0	997	2
1005Z	2	1101Z	0	1058	0
1007Z	1	1102Z	1	1067	0
1008Z	1	1103Z	1	1070	1
1009Z	2	1104Z	0	1080	0
1010Z	2	1105Z	2	1084	1
1012Z	0	1106Z	0	1089	2
1028Z	0	1107Z	1	1095	0
1031Z	1	1108Z	0	1096	1
1032Z	0	1110Z	0	1101	1
1033Z	0	168f	1	1111	1
1034Z	2	174f	1	1112	2
1035Z	0	175f	0	1113	1
1037Z	2	176f	1	1117	1
1038Z	0	775	1	1118	1
1040Z	1	783	1	1123	2
1051Z	0	795	0	1129	0
1054Z	0	802	1	1130	1
1055Z	0	808	0	1131	1
1056Z	1	816	0	1132	1
1057Z	2	819	1	1134	1
1058Z	1	927	0	1135	0
1059Z	2	930	1	1140	0
1060Z	1	938	1	1141	1
1061Z	0	947	2	1146	0
1065Z	1	1000	1	1001	0
1070Z	0	1002	2	1004	1
1076Z	1	1004	1	1006	1
1077Z	0	1005	2	1012	0
1079Z	1	1006	1	1015	1
1082Z	0	1012	2	1017	1
1088Z	0	1014	1	1018	1
1090Z	0	1030	0	1024	0
1095Z	1	1038	0	1150	1
1098Z	0	967	0	1045	1
1099Z	1	983	1	1048	2

Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip
1050	1	626	0	131f	0
1070	0	627	0	134f	1
587	0	628	2	135f	1
588	0	630	1	136f	2
589	2	631	0	138f	0
591	0	633	0	139f	2
593	0	635	2	140f	1
594	2	636	0	141f	1
595	0	637	2	142f	0
596	2	639	1	148f	0
597	0	659	1	149f	1
598	0	662	0	155f	1
600	2	664	2	156f	1
601	0	666	1	158f	0
602	2	667	1	159f	1
603	1	100f	1	160f	0
604	0	101f	0	161f	2
605	0	103f	0	163f	0
606	2	106f	2	167f	2
607	1	108f	1	93f	2
608	1	109f	0	94f	1
609	0	110f	1	95f	0
610	1	111f	0	96f	1
611	1	112f	1	97f	1
612	0	113f	0	98f	1
613	0	115f	0	712	1
615	2	117f	0	943	1
616	2	118f	1	946	0
617	0	119f	1	1001	0
618	1	120f	1	984	2
619	1	121f	0	996	1
620	1	122f	2	998	1
621	0	123f	0	1083	1
623	1	124f	0	1105	1
624	1	125f	0	1106	1
625	2	126f	1	1108	2

Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip	Številka vzorca	LCT genotip
1109	2	57	0	73	0
1137	0	6	1	76	1
1	0	61	0	77	1
10	1	62	0	79	2
101	0	66	0	82	1
102	1	7	1	88	1
104	1	8	1	89	1
106	0	101	1	91	0
11	1	102	2	92	2
110	1	105	0	94	2
13	2	106	1		
14	1	112	1		
17	2	114	0		
19	1	35	1		
2	1	37	0		
20	0	41	2		
23	1	42	0		
24	0	43	2		
26	0	47	2		
27	0	49	1		
30	1	50	1		
32	1	84	1		
34	1	104	2		
37	1	100	1		
38	1	107	1		
39	1	108	1		
4	2	110	0		
45	0	38	0		
5	1	39	0		
50	2	44	1		
51	1	46	1		
52	1	51	0		
53	0	60	1		
54	0	64	0		
55	0	67	0		
56	0	72	1		





Slika 31: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu 1002 (genotip TT)



Slika 32: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu 1020 (genotip TT)



Slika 35: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu Z1035 (genotip CC)

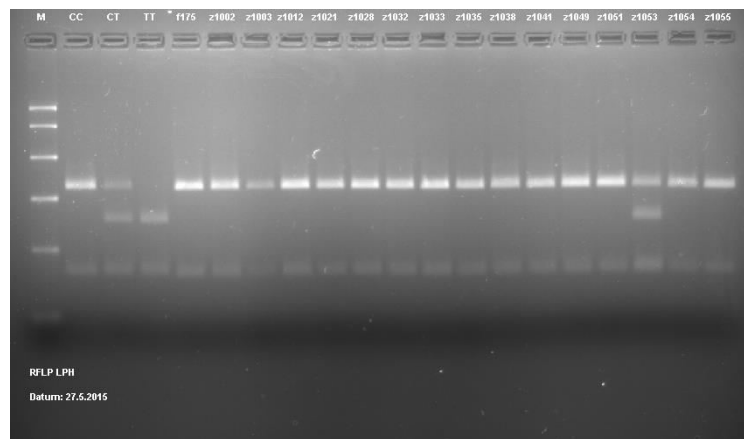


Slika 36: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu Z1049 (genotip CC)

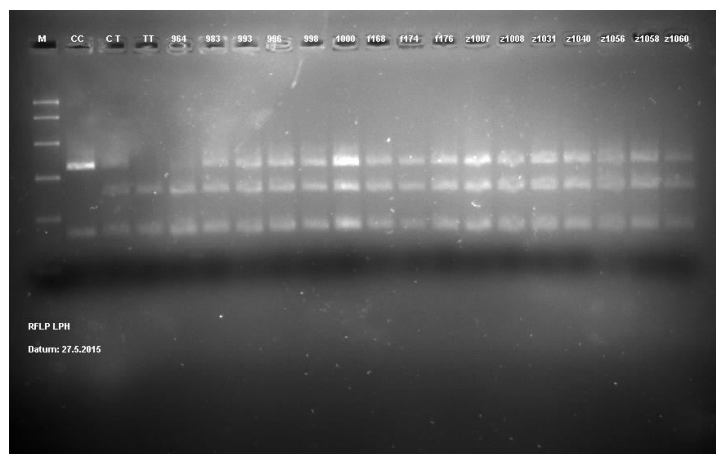


Slika 37: Zapis nukleotidnega zaporedja pri vzorcu f176 (genotip CT)

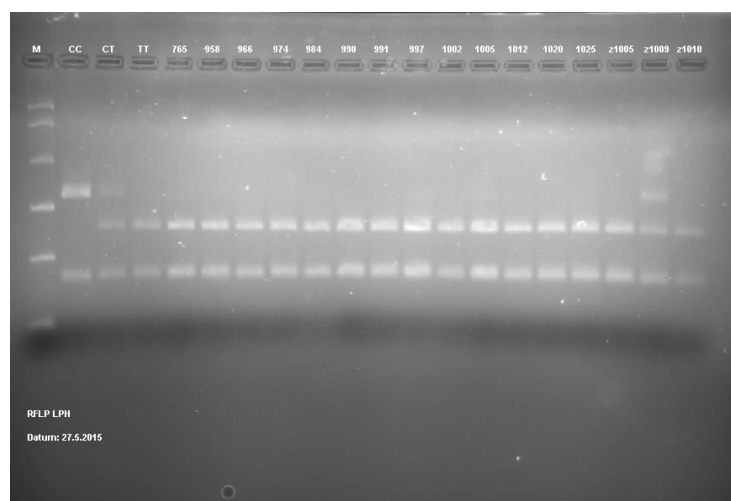
Priloga 3: Rezultati genotipizacije z RFLP metodo



Slika 38: Rezultati genotipizacije z RFLP metodo (M-označevalec dolžin odsekov DNA, kontrole RfB z genotipom CC, CT in TT, vzorci f175, z1002, z1003, z1012, z1021, z1028, z1032, z1033, z1035, z1038, z1041, z1049, z1051, z1054 in z1055 z nemutiranim homozigotnim genotipom CC in vzorec z1053 s heterozigotnim genotipom CT)



Slika 39: Rezultati genotipizacije z RFLP metodo (M-označevalec dolžin odsekov DNA, kontrole z genotipom CC, CT in TT, vzorci 964, 983, 993, 996, 998, 1000, f168, f174, f176, z1007, z1008, z1031, z1040, z1056, z1058 in z1060 s heterozigotnim genotipom CT)



Slika 40: Rezultati genotipizacije z RFLP metodo (M-označevalec dolžin odsekov DNA, kontrole z genotipom CC, CT in TT, vzorci 765, 958, 966, 974, 984, 990, 991, 997, 1002, 1005, 1010, 1020, 1025, z1005, z1010 z mutiranim homozigotnim genotipom TT in vzorec z1009 s heterozigotnim genotipom CT)