Polimorfizam Y131H gena ALG6 u karcinomu dojke

Ruščić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:469481

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Iva Ruščić

Polimorfizam Y131H gena *ALG6* u karcinomu dojke

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Suvremene biokemijske tehnike Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Sandre Šupraha Goreta.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Sandri Šupraha Goreta na vodstvu, savjetima i pomoći tijekom pisanja ovog rada.

Također bih se zahvalila svim svojim prijateljima i prijateljicama bez kojih ovaj tijek studiranja ne bi bio isti.

Najveća hvala mojim roditeljima i sestri bez kojih ovo ne bi bilo moguće. Zahvaljujem im na bezgraničnoj podršci i razumijevanju koje su mi pružili i bez kojih ne bih bila ovdje gdje jesam.

Velika hvala svima!

SADRŽAJ

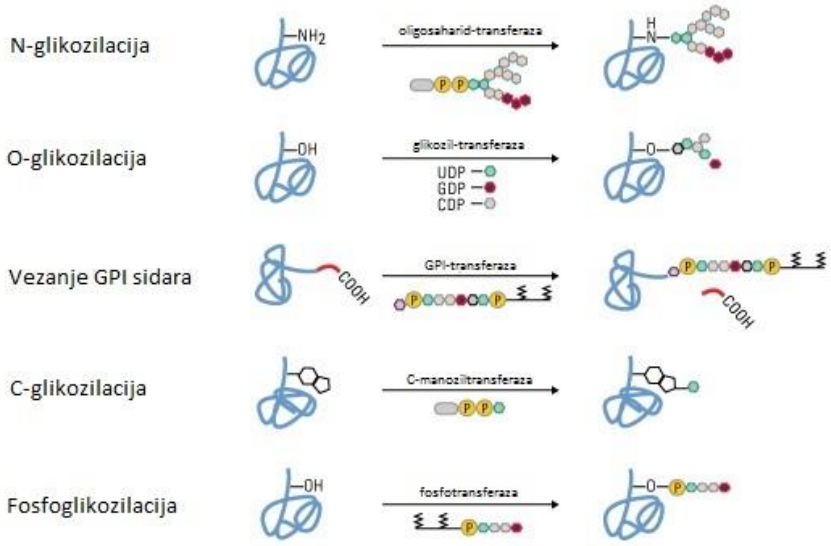
1. **UVOD**.....1
1.1. Glikozilacija.....1
1.1.1. Glikozilacijski putevi proteina.....2
1.2. Urođeni poremećani glikozilacije.....3
1.2.1. Poremećaji u N-vezanoj glikozilaciji.....4
1.2.1.1. PMM2-CDG (CDG-Ia).....4
1.2.1.2. MPI-CDG (CDG-Ib).....5
1.2.1.3. ALG6-CDG (CDG-Ic).....5
1.2.1.4. ALG3-CDG (CDG-Id).....6
1.3. Slobodna cirkulirajuća DNA.....6
1.3.1. Cirkulirajuća tumorska DNA.....7
2. **OBRAZLOŽENJE TEME**.....10
3. **MATERIJALI I METODE**.....11
3.1. Ispitanici.....11
3.1.1. Uzrokovanje i priprema uzoraka.....11
3.2 Materijali.....12
3.2.1. Standardne kemikalije.....12
3.2.2. Boje.....13
3.2.3. Standardi.....13
3.2.4. Specifične komercijalne smjese specifičnih reagenasa - kompleti.....13
3.2.5. Otopine i puferi.....14
3.2.6. Gel za SSCP elektroforezu.....16
3.3. Metode.....17
3.3.1. Izolacija slobodne cirkulirajuće DNA pomoću DNA Qiagen Mini Kita.17
3.3.2. Agarozna elektroforeza.....18
3.3.3. Lančana reakcija polimerazom.....19
3.3.4. Analiza polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP).....23
3.3.5. Bojanje srebrom.....25
4. **REZULTATI I RASPRAVA**.....27
4.1. Izolacija slobodne cirkulirajuće DNA.....28
4.2. Umnažanje egzona 5 *ALG6* gena.....30
4.3. Analiza polimorfizma Y131H u genu *ALG6* SSCP metodom.....32

4.4. Rasprava 34
5. **ZAKLJUČCI**.....37
6. **LITERATURA**.....38
7. **SAŽETAK/SUMMARY**.....42
7.1. Sažetak.....42
7.2. Summary.....43
8. **PRILOZI** 44
8.1. Popis kratica 44
Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

1. UVOD

1.1 Glikozilacija

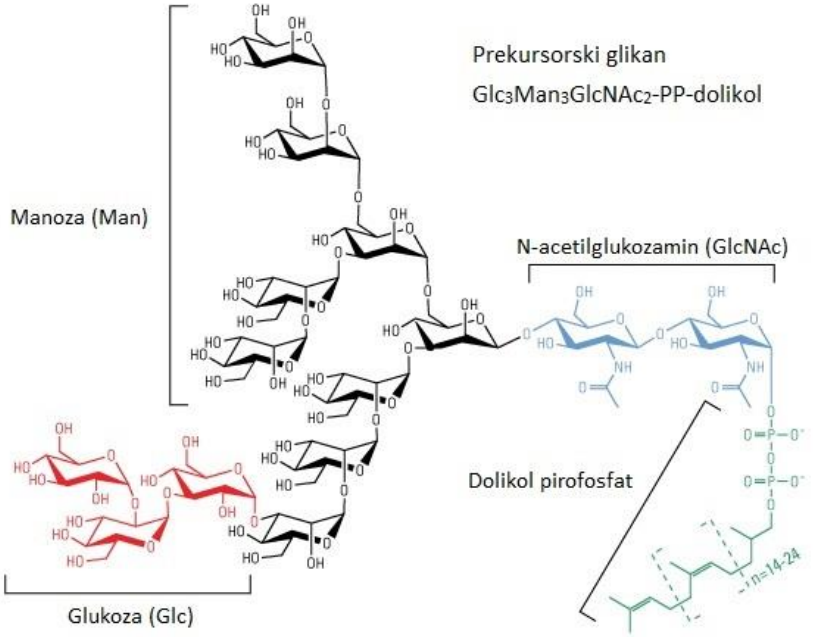
Glikozilacija je jedna od najvažnijih posttranslacijskih modifikacija prilikom koje se ugljikohidratni ostaci kovalentno vežu na proteine stvarajući glikoproteine. Tim se procesom povećava kompleksnost i raznolikost proteoma, a posredovan je enzimima. On utječe na raspodjelu proteina u stanici, na njihovu funkciju, aktivnost i smatanje. Odvija se u endoplazmatskom retikulumu (skraćeno ER) i Golgijevom aparatu (skraćeno GA). Ugljikohidratni se ostaci mogu vezati na hidroksilnu skupinu u serinskim i treoninskim ostacima (O-vezana glikozilacija) te na $–NH_2$ skupinu asparagina (N-vezana glikozilacija) (Cooper i Hausman, 2007). Oligosaharidi koji se vežu na proteine procesom O-vezane glikozilacije sastoje se od jednog do četiri ugljikohidratna ostatka, dok su N-vezani oligosaharidi kompleksniji i veći (Lodish i sur., 2000). Početno vezanje oligosaharidnog prekursora odvija se u ER-u, a zatim slijedi dorada u GA-u. Osim N- i O-vezane glikozilacije postoje još tri vrste glikozilacije, a to su C-manozilacija, vezanje glikozilfosfatidilinozitolnih skupina te fosfoglikozilacija. Tijekom C-manozilacije veže se C-1 atom manoze na C-2 atom indolskog prstena triptofanskog ostatka u proteinu. Sljedeća posttranslacijska modifikacija proces je vezanja glikolipida glikozil-fosfatidilinozitola (GPI sidro) na C-terminus proteina. Takav je protein vezan na staničnu membranu. Fosfoglikozilacija je proces stvaranja fosfodiesterske veze između šećera i proteina (Spiro, 2002).



Slika 1. Glikozilacijski putevi proteina (preuzeto i prilagođeno iz www.thermofisher.com)

1.1.1 Glikozilacijski putevi proteina

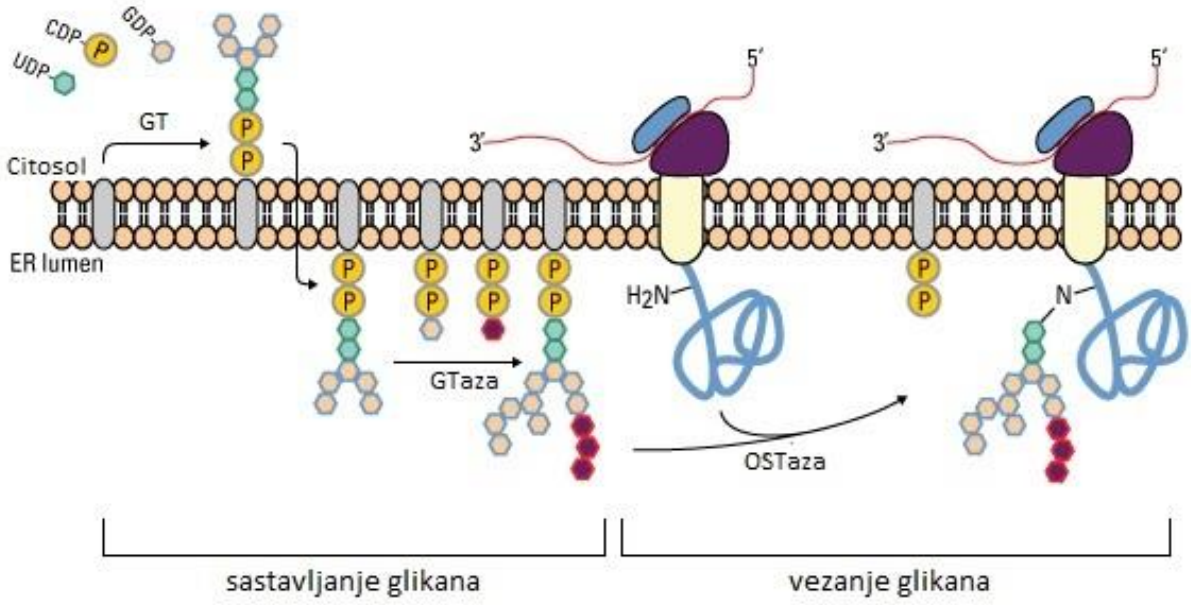
Oligosaharidni prekursor nastaje na lipidnom nosaču dolikolu, koji je vezan na membranu ER-a, a sastoji se od 14 šećernih jedinica : dva N-acetilglukozamina, devet manoza i tri glukoze (Slika 2). Tri manoze i dva N-acetilglukozamina čine jezgru tog prekursora koja se ne mijenja tijekom procesa glikozilacije u ER-u i GA-u, dok su ostali dijelovi podložni modifikaciji (Lodish i sur., 2000). Donor je N-acetilglukozamina uridin difosfat N-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc), donor manoze je gvanozin difosfat manoza (GDP-manoza), a donor glukoze uridin difosfat glukoza (UDP-glukoza).



Slika 2. Oligosaharidni prekursor (preuzeto i prilagođeno iz www.thermofisher.com)

Oligosaharidni prekursor vezan za dolikol okrenut je prema lumenu ER-a. Nakon translacije na ribosomima koji prekrivaju vanjsku površinu ER-a, polipeptidni lanac odlazi u lumen ER-a. Tamo se oligosaharidni prekursor veže na asparaginski ostatak koji se nalazi u tripeptidnom slijedu Asn-X-Ser i Asn-X-Thr, pri čemu je X bilo koja aminokiselina osim prolina. Tu reakciju katalizira enzim oligosaharil-transferaza, koji je vezan za membranu. Zatim se aktiviraju tri različita enzima koji uklanjaju sva tri glukozna ostatka i jedan specifični manozni ostatak (Lodish i sur., 2000). Protein se zatim premješta u GA, a procesi koji se odvijaju ondje su sljedeći: uklanjanje četiri manoze, dodavanje N-acetilglukozamina,

uklanjanje još 2 manoze, dodavanje fukoze i 2 N-acetilglukozamina te konačno dodavanje tri galaktoze i tri sijalinske kiseline. Različiti glikoproteini prolaze različite daljnje dorade u GA-u tako da u konačnici imaju različite N-vezane oligosaharide (Cooper i Hausman, 2007).



Slika 3. N-vezana glikozilacija (preuzeto i prilagođeno iz www.thermofisher.com)

1.2 Urođeni poremećaji glikozilacije

Urođene poremećaje glikozilacije (eng. Congenital disorders of glycosylation, CDG) čini približno 70-ak genetskih poremećaja. Svi su posljedica poremećaja u procesu sinteze glikoproteina i glikolipida. To su često multisistemske bolesti koje zahvaćaju centralni živčani sustav, mišiće, unutarnje organe, imunološki sustav te sustav koagulacije krvi (Freeze i sur., 2012). Najčešće se očituju vrlo brzo nakon rođenja. Njihova kompleksnost leži u tome što se poremećaji mogu dogoditi na različitim razinama procesa glikozilacije proteina i lipida, bilo u ER-u, bilo u GA-u. U ER-u može doći do poremećaja na razini sinteze oligosaharidnog prekursora, sinteze dolikola te premještanja oligosaharidnog prekursora na protein. Može također doći do poremećaja u premještanju proteina između ER-a i GA-a. U GA-u pak može doći do poremećaja dorade ugljikohidratnih ostataka vezanih na protein, transporta proteina kroz sam GA te sekrecije proteina. (Scott i sur., 2014).

Trenutno se najviše zna o poremećajima na razini N-vezane glikozilacije, dok su poremećaji u O-vezanoj glikozilaciji najčešće tkivno specifični. Njihove kliničke manifestacije u potpunosti se razlikuju od poremećaja na razini N-vezane glikozilacije (Scott i sur., 2014). Prema staroj nomenklaturi urođeni poremećaji glikozilacije dijele se na CDG-I i CDG-II (Supraha Goreta i sur., 2012b). CDG-I obuhvaćaju poremećaje koji se događaju u citoplazmi i ER-u, a CDG-II poremećaje koji se događaju u GA-u. Glavna je diferencijalna metoda tih dviju skupina poremećaja izoelektrično fokusiranje plazmatskog transferina koji nosi dva kompleksna N-glikana. Povišena razina disijalotransferina karakteristična je za CDG-I poremećaje, a povišena razina asijalo-, monosijalo- i trisijalotransferina je tipična za poremećaje CDG-II tipa (Scott i sur., 2014). Prema novoj nomenklaturi urođeni poremećaji glikozilacije označavaju se prema imenu defektnog gena. Osnovna podjela uključuje poremećaje koji pogađaju N-glikozilaciju, O-glikozilaciju, lipidnu glikozilaciju, stvaranje GPI-sidara i poremećaje koji pogađaju više puteva glikozilacije (Supraha Goreta i sur., 2012b). Najčešćim i najznačajnijim poremećajima u N-vezanoj glikozilaciji smatraju se PMM2-CDG (CDG-Ia) i ALG6-CDG (CDG-Ic). U sljedećem poglavlju opisani su neki od najučestalijih i najznačajnijih CDG sindroma N-glikozilacije.

1.2.1 Poremećaji u N-vezanoj glikozilaciji

1.2.1.1 PMM2-CDG (CDG-Ia)

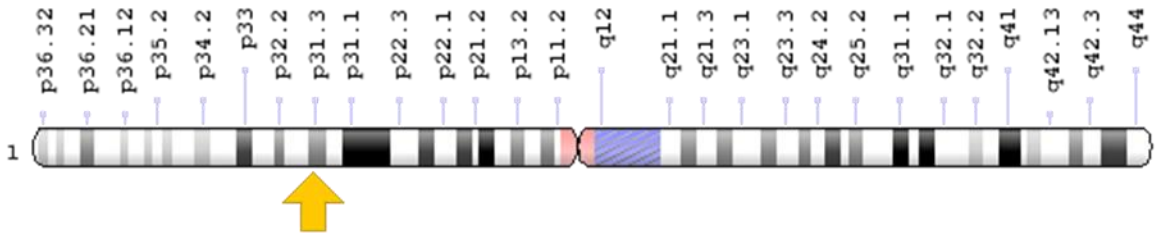
PMM2 gen (Gene ID: 5373) kodira enzim fosfomanomutazu 2 (EC:5.4.2.8). Taj enzim prevodi manoza-6-fosfat u manoza-1-fosfat. Postoji više od stotinu poznatih različitih mutacija u ovom genu, međutim najistraživanije su one mutacije na egzonima 5 i 8 (Kajergaard, 2004). Najučestalije su mutacije R141H i F119L, smještene na egzonu 5 koje posljedično dovode do vrlo niske aktivnosti enzima PMM2 i time razvoja teške kliničke slike u djece (Matthijs i sur., 1998). Smrtnost djece rođene s ovim sindromom iznosi do 20% u prvih pet godina života. Kliničke manifestacije PMM2-CDG variraju od umjereno teških neuroloških poremećaja do poremećaja koji rezultiraju smrću zbog teških infekcija, kardiomiopatije i zatajenja jetre. Središnji i periferni živčani sustav također su jako zahvaćeni (Carchon i sr., 1999).

1.2.1.2 MPI-CDG (CDG-Ib)

MPI je gen koji kodira enzim manoza-6-fosfat-izomerazu. Taj enzim prevodi fruktoza-6-fosfat u manoza-6-fosfat. Otkriveno je 18 različitih mutacija u ovom genu. Ovaj je poremećaj jedinstven među urođenim poremećajima glikozilacije jer nema neuroloških simptoma. Simptomi su vezani uz gastrointestinalni trakt i jetru. Uspješno se liječi oralnom primjenom manoze i jedini je dosada uspješno liječeni CDG sindrom (Nihues i sur., 1998).

1.2.1.3 ALG6-CDG (CDG-Ic)

Gen ALG6 (Gene ID: 29929) nalazi se na kratkom kraku kromosoma 1 na položaju p31.3 (1p31.3) (www. ghr.nlm.nih.gov), (Slika 4). Kodira enzim dolikol-P-glukoza: manoza9-N-acetilglukozamin2-pirofosfat-dolikol α-1,3 glikoziltransferazu (EC 2.4.1.267), koji katalizira dodatak prvog glukoznog ostatka u stvaranju oligosaharidnog prekursora vezanog za lipidni nosač u procesu N-glikozilacije (Burda i sur., 1998). Klinički su simptomi psihomotorna retardacija, epilepsija i mišićna hipotonija (Marquardt i Denecke, 2003). Smatra se umjerenim oblikom urođenih poremećaja glikozilacije i drugi je CDG sindrom po učestalosti. Klinički je najznačajnija mutacija 998CT>C koja rezultira mutacijom A333V. (Grünewald i sur., 2000). Promjena 391T>C na egzonu 5 rezultira polimorfizmom jednog nukleotida Y131H (rs35383149, tirozin na položaju 131 je zamijenjen histidinom). U literaturi i bazama podataka učestalo se navodi i polimorfizam F304S (rs17856039) koji je posljedica točkaste mutacije 911T>C na egzonu 10 (Westphal i sur., 2003). Polimorfizam F304S se ne smatra uzročnikom ALG6-CDG, ali je dokazano da pogoršava kliničko stanje, pogotovo u osoba koje pate od ostalih urođenih poremećaja glikozilacije (Westphal i sur., 2002). Za polimorfizam Y131H još uvijek nije utvrđeno je li dovoljan za razvoj bolesti ili su potrebne dodatne genske alteracije (Westphal i sur., 2003). Učestalost tog polimorfizma tri je puta veća u Hrvatskoj nego u SAD-u. Učestalost heterozigota mutiranog tipa (391T>C) u Hrvatskoj je 0.065, a homozigota divljeg tipa (391T/T) 0.935. Ni jedan homozigot mutiranog tipa nije detektiran, ali pretpostavlja se da bi učestalost mogla biti 1 na 1000 (Supraha Goreta i sur., 2012a).



Slika 4. Citogenetska lokacija gena *ALG6*(preuzeto iz www.ghr.nlm.nih.gov)

1.2.1.4 ALG3-CDG (CDG-Id)

ALG3 (ID 10195) je gen koji kodira enzim α-1,3-manoziltransferazu (EC 2.4.1.130) i sudjeluje u završnom dijelu sinteze oligosaharidnog prekursora. Pacijenti boluju od encefalopatije s mikrocefalijom te epileptičkih napada (Rimella-Le-huu i sur., 2008).

1.3 Slobodna cirkulirajuća DNA

Slobodna cirkulirajuća DNA (eng. cell-free DNA; cfDNA) je DNA koja slobodno cirkulira krvotokom. Prisutna je u malim količinama u plazmi zdravih pojedinaca. Nastaje raznim patološkim i normalnim biološkim procesima (Qin i sur., 2016). Iako njezino porijeklo nije još uvijek sa sigurnošću utvrđeno, smatra se da primarno nastaje kao posljedica propadanja stanica, odnosno procesa apoptoze limfocita i ostalih stanica s jezgrom (Swarup i Rajeswari, 2007). Prosječna je veličina većine cfDNA fragmenata oko 166 pb, što potvrđuje ovu teoriju. Razlog fragmentacije cfDNA još uvijek nije poznat. 166 pb je duljina DNA namotane oko nukleosoma uključujući i poveznicu. Upravo ta duljina fragmenta mogla bi potjecati od djelovanja o kaspazi ovisne endonukleaze. Ona kida DNA nakon jezgrenog histona i njegovu poveznicu (Mouliere i Rosenfeld, 2015). Također može nastati kao posljedica nekroze stanica. U zdravih pojedinaca, infiltrirajući fagociti uklanjaju ostatke nastale apoptozom i nekrozom. Iz tog je razloga količina cfDNA u krvi takvih pojedinaca manja nego u tumorskih bolesnika (Qin i sur., 2016).

Smrt stanica nije jedini izvor cfDNA. Stimulacijom se limfocita također otpušta cfDNA u krvotok (Qin i sur., 2016). Povećana koncentracija cfDNA veže se uz maligne solidne tumore (Underhill i sur., 2016), međutim određene aktivnosti, kao što su trčanje polu-

i ultra-maratona te dizanje utega također uzrokuju povišenje cfDNA u zdravih pojedinaca (Breitbach i sur., 2014). Tijekom trudnoće u krvotoku se majke pored njezine cfDNA može naći i cfDNA djeteta nastala nekrozom i apoptozom trofoblasta placente. Količina cfDNA nastale placentom ovisi o gestacijskoj dobi majke te stanju same placente. To otvara nove mogućnosti neinvazivne prenatalne dijagnostike (Manokhina i sur., 2014). cfDNA također obuhvaća i cirkulirajuću tumorsku DNA, koja bi se u budućnosti mogla koristiti kao neinvazivna „tekuća biopsija“ za praćenje tijeka bolesti i uspjeha terapije.

1.3.1 Cirkulirajuća tumorska DNA

Cirkulirajuća tumorska DNA (skraćeno ctDNA) su DNA fragmenti koje otpuštaju tumorske stanice u krvotok. Postoje različiti predloženi mehanizmi otpuštanja ctDNA. Programirana stanična smrt, odnosno apoptoza jedan je od njih. U prilog tome govori činjenica da fragmenti ctDNA u elektroforezi pokazuju obrasce slične onima apoptoziranih stanica. Također jedan od predloženih mehanizama su „mikrometastaze“ tumorskog porijekla koje se otpuštaju u cirkulaciju, međutim istraživanja su pokazala da je količina ctDNA vrlo visoka i nije u korelaciji s brojem tumorskih stanica u cirkulaciji, tako da je ta teza odbačena. Nekroza je tumorskih stanica također mogući uzrok otpuštanja ctDNA u cirkulaciju. Ono što ne ide u prilog toj tezi činjenica je da se nakon terapije zračenjem koja potiče nekrozu tumorskih stanica smanjenje količinu ctDNA u 90% pacijenata. Moguće je objašnjenje tog smanjenja posljedica izostanka stanične proliferacije uzrokovane zračenjem (Swarup i Rajeswari, 2007).

Osim upitnog porijekla ctDNA, također postoji vrlo malo podataka o njezinoj stabilnosti. Mehanizam je klirensa vrlo brz te se smatra da u tom procesu sudjeluju jetra, slezena i bubrezi (Heitzer i sur., 2015). Razlog povišenoj razini cfDNA u tumorskih je bolesnika inhibicija enzima DNaze I i II inhibitorima prisutnim u tumorskim stanicama. Ti su enzimi prisutni u cirkulaciji te razgrađuju DNA u zdravih pojedinaca i zato oni imaju puno manju količinu cfDNA nego tumorski bolesnici(Swarup i Rajeswari, 2007).cfDNA u bolesnika s većim udjelom ctDNA više je fragmentirana u odnosu na cfDNA koji potječe iz somatskih tkiva zdravih pojedinaca, dok su cfDNA fragmenti u bolesnika s manjim udjelom ctDNA veći (Mouliere i Rosenfeld, 2015).

ctDNA ima veliki potencijal korištenja kao neinvazivna „tekuća biopsija“ u pogledu dijagnostike tumora, odabira prave terapije te praćenja uspjeha terapija. „Tekuća biopsija“

ima određene prednosti nad standardnom biopsijom iz nekoliko razloga. Naime, neinvazivna je metoda koja se može vrlo lako i često provoditi, a ono što je najbitnije omogućava odabir ispravne terapije. U današnje je vrijeme uzrok neuspjeha terapije tumorskih bolesti intratumorska heterogenost te heterogenost među pacijentima. ctDNA može otkriti cijeli spektar mutacija, od točkastih mutacija, insercija, delecija do epigenetskih mutacija. To sve bi omogućilo personaliziranu terapiju prilagođenu pacijentovim genomskim promjenama, a moglo bi se pratiti u realnom vremenu potpuno neinvazivnom tehnikom (Christie i sur., 2016). Ipak, ctDNA je izrazito izazovan analit zbog svoje male koncentracije te visokog stupnja fragmentiranja. Plazma je bolji izvor cfDNA iako je u serumu može biti 2-24 puta više. Ta veća koncentracija cfDNA posljedica je *in vitro* lize leukocita tijekom procesa zgrušavanja krvi. Upravo zato serum nije dobar izvor cfDNA, jer ona nastaje *in vitro,* a ne *in vivo* (Lee i sur., 2001).

Nekoliko je problema koji se trebaju riješiti da bi se „tekuća biopsija“ koristila u svakodnevnoj praksi kao tumorski biomarker. Prvi je problem odabir prikladne analitičke metode. Takva metoda morala bi omogućiti ekstrakciju dovoljne količine DNA visoke kvalitete. Istraživanja su pokazala da predanalitički faktori kao što su uzimanje uzorka krvi te obrada samog uzorka jako utječu na ishod analize. Drugi je veliki problem nedostatna usklađenost metoda kvantifikacije. Mogu se primjenjivati spektrofotometrijske metode, i kvantifikacijske PCR metode, međutim svaka metoda daje različiti rezultat. Treći problem leži u tome što većina studija uopće ne uzima u obzir povećanje koncentracije cfDNA uzrokovanu normalnim fiziološkim stanjima. Iako je u tumorskih bolesnika povišena koncentracija cfDNA, teško je odrediti do koje je razine ta cfDNA tumor-specifična, jer se količina cfDNA povećava pri napornim treninzima te trudnoći. Trebao bi se postići konsenzus o pouzdanoj i učinkovitoj metodi koja bi omogućila usporedbu rezultata u različitim laboratorijima (Heitzer i sur., 2015).

Longitudinalne studije pokazale su da se količina cfDNA smanjuje kao odgovor na terapiju te da se povećava u relapsima. Međutim ta količina nije u korelaciji s histološkim podtipom i stadijem bolesti. ctDNA čini jako mali udio cfDNA, osim u pacijenata s uznapredovalim metastatskim bolestima. Kod lokaliziranih se tumora izrazito smanjuje mogućnost detekcije ctDNA. Iz tog razloga sama kvantifikacija cfDNA nema veliku prognostičku vrijednost. Međutim, detekcija specifičnih mutacijskih središta u ctDNA ima puno veću vrijednost u vidu personalizirane medicine. Olakotna okolnost pri detekciji ctDNA razlika je u veličini fragmenata u odnosu na cfDNA nastalu normalnim fiziološkim

mehanizmima. Veličina fragmenata ctDNA kreće se većinom između 134 i 144 pb, dok je veličina fragmenata cfDNA za 20-50 pb veća. Fragmenti ljudske ctDNA također su pokazali veliku periodičnost 10 pb, koja se objašnjava kidanjem nukleosoma djelovanjem nukleaze. Ipak, porijeklo kraćih fragmenata ctDNA još je uvijek nejasno (Underhill i sur., 2016).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Urođeni su poremećaji glikozilacije sindromi koji se mogu manifestirati već nakon rođenja. Najčešće zahvaćaju više organskih sustava te se manifestiraju velikim brojem simptoma, najčešće neuroloških koje je teško pravilno klinički dijagnosticirati. Upravo iz tog razloga nema pouzdanih podataka o učestalosti ovih poremećaja, jer se smatra da jako veliki broj ovih poremećaja još uvijek nije dijagnosticiran. Ovi poremećaji mogu biti posljedica defekta na bilo kojoj razini glikozilacije proteina, u ER-u ili u GA-u, a to još više otežava dijagnostiku i liječenje ukoliko je moguće. S vremenom se otkrilo sve više poremećaja, trenutno ih je evidentirano oko 70-ak različitih sindroma. Najučestaliji su defekti vezani za N-glikozilaciju. Upravo je zato bitno moći pravilno dijagnosticirati ove vrste poremećaja te pronaći njihove uzroke.

S obzirom da su defekti glikozilacije povezani s brojnim kompleksnim genetskim bolestima, uključujući i rak, poznato je da su određeni polimorfizmi/mutacije u N-glikozilacijskom putu imaju visoku učestalost u pojedinim populacijama, posebice Y131H u *ALG6* genu.

Svrha je ovog rada pokušaj povezivanja tumorskih bolesti (karcinoma dojke) i poremećaja N-glikozilacijskog puta, to jest uspostaviti metodu koja bi omogućila uvid u pojavnost mutacija/polimorfizama, u ovom slučaju konkretno polimorfizma Y131H *ALG6* gena koja se učestalo pojavljuje i u zdravih ljudi, posebice u našoj regiji, a dokazano je da uzrokuje ALG6-CDG.

S obzirom da se u suvremenoj medicini javlja potreba za jednostavnijim i manje invazivnim načinom dijagnostike, cilj je rada bio iz uzorka slobodne cirkulirajuće DNA iz plazme i seruma ispitati dostatnost i kvalitetu takve vrste uzorka za određivanje mutacije povezane s defektom glikozilacije relativno jednostavnim tehnikama, kao što je PCR-SSCP metoda.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

Uzorci seruma i plazme korišteni za ovo istraživanje uzeti su od 20 zdravih dobrovoljaca (prosječne starosne dobi 19-37 godina) i 20 pacijentica s dijagnozom karcinoma dojke (raspon dobi od 20-60 godina) koji nisu u krvnom srodstvu. Sudjelovale su isključivo ženske ispitanice. Uzorci zdravih ispitanica dobiveni su iz Zavoda za transfuziju krvi, Petrova 3 nakon odobrenja Etičkog povjerenstva Zavoda za transfuziju, Zagreb i potpisanih informiranih pristanaka. Uzorci pacijentica s karcinomom dojke prikupljeni su na Klinici za tumore u Zagrebu, KBC Sestre milosrdnice, uz dozvolu Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice i potpisanih informiranih pristanaka. Svi informirani pristanci dizajnirani su u skladu s Helsinškom deklaracijom.

3.1.1 Uzorkovanje i priprema uzorka

Venska krv vađena je u epruvete s podtlakom (Vacutainer, Becton Dickinson) kojima je dodan antikoagulans EDTA. Krvna plazma odvojena je od krvnih stanica centrifugiranjem pri 1400 g tijekom 10 min na sobnoj temperaturi. Plazma je prenesena u novu sterilnu epruvetu pazeći da se prilikom pipetiranja ne poremeti sloj leukocita. Nakon toga, plazma je ponovno centrifugirana pri 4500 g tijekom 10 minuta, da bi uklonili eventualno zaostale stanice ili stanični sadržaj. Supernatant je prenesen u novu sterilnu epruvete te pohranjen pri -20° C do analize.

Krv izvađena venepunkcijom bez dodatka antikoagulansa (Vacutainer, Becton Dickinson) zgrušava se stajanjem na zraku posredstvom sustava za koagulaciju. Centrifugiranjem (10 minuta, 2500 g) se ugrušak odvaja od supernatanta koji nazivamo krvnim serumom. Serum je, dakle, dio krvi bez čimbenika zgrušavanja, fibrinogena i krvnih stanica; možemo ga smatrati puferiranom otopinom koja sadrži ione, organske tvari (urea, kreatinin, bilirubin), biološke makromolekule (proteini, lipoproteini, DNA).

3.2 Materijali

Materijal i kemikalije upotrijebljeni u ovom radu nabavljeni su od:

Amersham Biosciences (Cardiff, Velika Britanija)
Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD)
Bio-Rad (Hercules, CA , SAD)
Fermentas (Vilnius, Litva)
Invitrogen (Carlsbad, CA, SAD)
Kemika (Zagreb, Hrvatska)
Merck (Darmstadt, Njemačka)
Pharmacia (Uppsala, Švedska)
Qiagen (Qiagen, Valencia, CA, SAD)
Roche (Mannheim, Njemačka)
Roth (Karlsruhe, Njemačka)
Sigma (St. Louis, MO, SAD)

3.2.1 Standardne kemikalije

agaroza	Sigma
$AgNO_3$	Sigma
akrilamid/bisakrilamid mix. 37.5:1 (30%)	Sigma
amonijev persulfat	Sigma
EDTA	Roth
etanol (96%)	Kemika
formamid	Sigma
formaldehid (37%)	Sigma
glacijalna octena kiselina	Sigma
glicerol (redestilirani)	Kemika
H_3BO_3	Roth
HCl (36%)	Kemika
KCl	Kemika
metanol	Kemika
$MgCl_2$	Invitrogen
Na_2CO_3	Sigma

NaOH	Sigma
octena kiselina	Kemika
Platinum Taq polimeraza	Invitrogen
Proteinaza K	Invitrogen
Temed	Sigma
Tris (tris[hidroksimetil]aminometan) - Trizma baze®	Sigma
Triton X-100	Sigma

3.2.2 Boje

bromfenol plavo	Sigma
ksilen-cijanol	Sigma
GelRed™ boja za nukleinske kiseline	Biotium

3.2.3 Standardi

komercijalno pribavljene smjese fragmenata DNA (standard 100 pb i standard 1 kb)	Invitrogen
DNA Mass Ruler™ SMO 383 standard molekulskih masa DNA	Fermentas

3.2.4 Specifične komercijalne smjese analitičkih reagenasa – kompleti

QIAamp® DNA mini Kit	Qiagen

3.2.5 Otopine i puferi

otopina proteinaze K

proteinaza K	10 mg/ml
Tris HCl pH 7,5	10 mM
$CaCl_2$	20 mM
glicerol	50%
u dest. vodi	

otopina amonijevog persulfata

amonijev persulfat	10%
u destiliranoj vodi	

otopina EDTA

EDTA	0.5 M
NaOH (do pH 8,0)	
u destiliranoj vodi	

otopina za fiksiranje

metanol	50%
octena kiselina	10%
u destiliranoj vodi	

otopina za ispiranje

etanol	10%
octena kiselina	7%
u destiliranoj vodi	

otopina za bojanje

$AgNO_3$	20%
u destiliranoj vodi	

otopina za odbojavanje

Na_2CO_3	2,5%
formaldehid	0,02%
u destiliranoj vodi	

6 x pufer za nanošenje uzoraka DNA (pH 6,8)

bromfenol plavo	0,25%
ksilen-cijanol	0,25%
glicerol	30%
u destiliranoj vodi	

10 x PCR pufer (pH 8,3)

KCl	500 mM
Tris/HCl	100 mM

TAE-pufer (pH 8,3)

Tris acetat	40 mM
EDTA	1 mM
u destiliranoj vodi	

5 x TBE-pufer (pH 8,3)

Tris HCl	45 mM
H_3BO_3	45 mM
EDTA	1mM
u destiliranoj vodi	

TE-pufer za proteinazu K

Tris	50 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	0,5%
u destiliranoj vodi	

SSCP pufer za denaturaciju i nanošenje uzoraka

formamid	95%
NaOH	10 mM
bromfenol plavo	0,025%
ksilen-cijanol	0,025%

SSCP pufer za nanošenje nedenaturirane dvolančane DNA

saharoza	40%
bromfenol plavo	0,25%
ksilen-cijanol	0,25%
u destiliranoj vodi	

3.2.6 Gel za SSCP elektroforezu

Gel za razdvajanje 5%

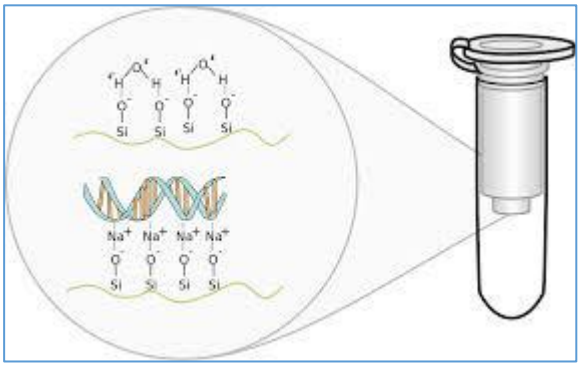
Akrilamid/bisakrilamid mix. 37.5:1 (30%)	20%
5 x TBE-pufer	20%
10% amonijev persulfat	1%
Temed	0,03%
u destiliranoj vodi	

3.3 Metode

3.3.1 Izolacija slobodne cirkulirajuće DNA pomoću QIAamp® DNA mini Kit-a

Načelo

QIAamp® DNA Mini Kit koristi se kao jednostavna i brza metoda izolacije genomske DNA s ciljem daljnje analize drugim tehnikama, kao što je primjerice lančana reakcija polimerazom. DNA se može izolirati iz pune krvi, seruma, plazme, koštane srži, ostalih tjelesnih tekućina, tkiva te forenzičkih uzoraka. Krv može biti svježa ili smrznuta te smije biti tretirana heparinom, EDTA i citratom. U prosjeku se izolira 6 µg DNA iz 200 µl uzorka pune krvi (30 ng/µl). Ova se metoda izolacije zasniva na četiri glavna koraka koja se odvijaju u QIAamp spin kolonama sa silika-membranom i u standardnoj mikrocentrifugi.



Slika 5. Shema silika-membrane kolone za izolaciju DNA (preuzeto iz https://commons.wikimedia.org)

Prvi je korak liza uzorka koja se odvija dodavanjem enzima Proteinaze K, koji se nalazi u sastavu kompleta. pH lizata i koncentracija soli onemogućuju vezanje proteina i drugih onečišćivača na QIAamp silika-membranu (Slika 5), a omogućuju optimalnu adsorpciju DNA. Zatim slijedi ispiranje DNA centrifugiranjem koristeći dva različita pufera, AW1 i AW2 s etanolom, koji joj značajno povećavaju čistoću. Oni uklanjaju sve ostatne tvari ne utječući pri tome na vezanje DNA. Izolirana se DNA eluira u u AE puferu za eluranje ili sterilnoj vodi. Može se odmah koristiti za daljnju obradu ili se može čuvati pohranjena na

temperaturi od -30 do -15 °C. Takva je izolirana DNA pročišćena, odnosno ne sadrži ostatke proteina, nukleaza ili ostalih nečistoća. Protokol je namijenjen izolaciji DNA pomoću komercijalnih kolona sa silika-membranom. Izvor DNA u ovom radu bio je serum i plazma, te se pokušala izolirati cirkulirajuća slobodna DNA s obzirom na literaturno dostupne podatke i postupak (QIAGEN,2012).

Postupak za izolaciju iz seruma/plazme

Uzorci se inkubiraju na sobnoj temperaturi približno 30 minuta. 10 µl Proteinaze K otpipetira se u epruvetu za centrifugiranje veličine 1,5 ml. Doda se 200 µl uzorka i nakon toga 200 µl pufera AL. Promiješa se na miješalici 15 sekundi te se inkubira pri 56 °C stupnjeva u vodenoj kupelji 10 minuta. Kratko se centrifugira, da bi se uklonile kapljice s poklopca i unutarnjih stijenki epruvete. U uzorak se doda 200 µl etanola (96-100%), 15 sekundi se promiješa na miješalici te se ponovno kratko centrifugira. Ta se smjesa zatim nanosi na QIAamp Spin kolonu koja se nalazi u epruveti za skupljanje od 2 ml. Zatvori se poklopac te se centrifugira 1 minutu (8000 rpm ili 6000 x g). Kolona se potom premjesti u novu epruvetu za skupljanje, a prethodna se epruveta, koja sadrži filtrat, odbaci. Na kolonu se zatim doda 500 µl pufera AW1. Ponovi se postupak centrifugiranja. Kolona se opet premjesti u novu epruvetu, a filtrat se odbaci. Potom se na kolonu doda 500 µl AW2 pufera. Centrifugira se maksimalnom brzinom (14000 rpm ili 20000 x g) 3 minute. Kolona se potom stavi u novu epruvetu za centrifugiranje od 1,5 ml, a filtrat se odbaci. Na kolonu se doda 200 µl pufera AE. Inkubira se na sobnoj temperaturi 1 minutu te se centrifugira 1 minutu (8000 rpm ili 6000 x g). Tako izolirana DNA spremna je za daljnju obradu (QIAGEN, 2012) i pohranjuje se pri -20° C. Analiza dobivenih fragmenata provodi se elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu.

3.3.2 Agarozna elektroforeza

Načelo

Agarozna gel elekroforeza učinkovita je metoda razdvajanja DNA fragmenata različitih veličina koje mogu biti od 100 pb do 25 kb (Lee i sur., 2012). Agaroza je kopolimer koji se sastoji od naizmjenično postavljenih β-D-galaktoze i 3,6-anhidro-α-L-galaktoze

(Stellwagen, 2009). Agaroza se izolira iz morske trave rodova Gracilaria i Gelidium. Agarozni se polimeri tijekom procesa geliranja vežu nekovalentnim vezama. Uzorci se postavljaju u jažice na gelu te se primjenjuje struja. DNA ima negativno nabijene fosfatne skupine, zbog čega se u električnom polju giba prema pozitivno nabijenoj elektrodi (anodi). S obzirom da DNA ima stalan omjer mase i naboja, razdvajanje po veličini fragmenata odvija se na takav način da je udaljenost koju je fragment prešao u gelu obrnuto proporcionalna logaritmu njegove molekulske mase. Kretanje DNA fragmenta kroz agarozni gel ovisi o nekoliko uvjeta: veličini fragmenta DNA, primijenjenom naponu, koncentraciji agaroze, konformaciji DNA, tipu agaroze i vrsti pufera za elektroforezu (Lee i sur., 2012).

Postupak

Koristi se 1,5% agarozni gel koji se pripremi otapanjem 0,45 g agaroze u 30 ml *1x TBE pufera* zagrijavanjem. Kada se otopina ohladi na 56 °C, izlije se u elektroforetsku kadicu. Hlađenjem dolazi do formiranja gela. Uzorcima DNA izolirani metodom QIAGEN (10 µl) dodaje se 1 µl *6 x pufera za nanošenje uzoraka DNA* te se stavljaju u jažice. Standardi su komercijalno pribavljene smjese fragmenata DNA poznatih veličina. U 5 µl standarda dodaje se 1 µl *6 x pufera za nanošenje uzoraka DNA* te se nanose u jažice. Elektroforeza se provodi u *TBE-puferu* u električnom polju jakosti 5-7 V/cm. Provodi se dok tamno plava boja (bromfenol plavo) ne dosegne 2/3 gela. Vizualizacija se provodi pomoću Gel Imager-a (Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences)

3.3.3 Lančana reakcija polimerazom

Načelo

Lančana reakcija polimerazom (eng. Polymerase chain reaction, PCR) znanstvena je tehnika *in vitro* selektivnog umnožavanja točno određenog DNA segmenta koji može biti dio kompleksne smjese DNA. Rezultira stvaranjem i do nekoliko milijuna kopija u kratkom vremenu. Metodu je razvio američki biokemičar Karry Mullis 1984.godine. Danas je to učestala tehnika koja ima različite primjene u medicinskim i biokemijskim istraživanjima. Tri su glavna koraka ove tehnike: denaturacija, vezanje ishodnica i elongacija. Ta tri koraka čine 1 ciklus (Joshi i Desphande, 2011). PCR tehnika zahtijeva određene komponente koje su preduvjet uspješnog odvijanja, a to su: Taq polimeraza, kalup DNA koji sadrži nukleotidni

slijed koji se želi umnožiti, specifične ishodnice te nukleotide koji će stvarati PCR produkt. Nukleotidi sadrže dušične baze koje tvore DNA, a to su adenin (A), timin (T), citozin (C) i gvanin (G). Specifične ishodnice određuju koji će slijed DNA biti umnožen. To su kratki sljedovi DNA koji su komplementarni ciljnoj DNA te služe kao mjesta na kojima započinje elongacija, odnosno slaganje nukleotida u DNA lanac (Garibyan i Nidhi, 2013). Tijekom denaturacije razdvajaju se lanci DNA zagrijavanjem na temperaturi od 90-97 °C. U drugom koraku dolazi do sljubljivanja ishodnica na lanac DNA koji služi kao kalup za sintezu komplementarnog lanca DNA. Taj se proces događa na temperaturi 50-60 °C. Elongacija uz Taq polimerazu se odvija pri temperaturi od 72°C. Bitno je svojstvo ovog enzima termostabilnost, dobivena izolacijom enzima iz Termus Aquaticus-a u gejzirima na temperaturama do 110 °C. Svaka dobivena molekula DNA sastoji se od jednog originalnog te jednog novosintetiziranog lanca DNA i svaka od njih dalje služi kao kalup za stvaranje novih kopija. Broj dobivenih kopija DNA jednak je 2^n, pri čemu je n broj provedenih ciklusa (Joshi i Desphande, 2011).

Postupak

Uzorci cirkulirajuće DNA izolirani metodom QIAGEN korišteni su za umnožavanje željenih fragmenata za gen *ALG6* lančanom reakcijom polimerazom. U tablici 1 prikazan je sastav reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom.

Tablica 1. Sastav reakcijskih smjesa za lančanu reakciju polimerazom.

sastojak	volumen	konačna koncentracija
otopina DNA (uzorci)	5 µl	
$MgCl_2$ (50 mM)	1,5 µl	1,5 mM
Smjesa dNTP-a (10 mM dATP, 10mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP)	1 µl	0,2 mM
nizvodne ishodnice (12,9 µM)	1,93 µl	0,5 mM
uzvodne ishodnice (13,7 µM)	1,82 µl	0,5 mM
10x PCR pufer (500 mM KCl, 100mM Tris/Hcl, pH = 8,3)	5 µl	1x
Platinum Taq polimeraza (5 U/µl)	0,5 µl	0,05 U/µl
Sterilna H_2O	33,25 µl	

U PCR epruvete otpipetiraju se svi sastojci reakcijske smjese (Tablica 1) osim uzoraka (otopine DNA). Zatim se u svaku epruvetu otpipetira po 1 uzorak. Ukupni je volumen reakcijske smjese 50 µl. Koristila se heterozigotna pozitivna kontrola (ALG6 Y131H 0,14 µg/ml) i negativna kontrola (sterilna H_2O). Reakcije su se odvijale u uređaju za lančanu reakciju polimerazom (GeneAMP®PCR System 2700, Applied Biosystems). Uvjeti reakcije navedeni su u tablici 2.

Tablica 2. Reakcijski uvjeti za umnažanje dijela gena *ALG6* u kojem se očekuje polimorfizam Y131H lančanom reakcijom polimerazom.

Reakcijski uvjeti PCR reakcije	
95 °C ; 5 minuta	
95 °C ; 45 sekundi 53 °C ; 30 sekundi 72 °C ; 1 minuta	35 ciklusa
72 °C ; 7 minuta	

Slijedi naglo hlađenje na +4 °C.

Korištene ishodnice za umnažanje dijela gena *ALG6* u kojem se očekuje polimorfizam Y131H lančanom reakcijom polimerazom prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Ishodnice za umnažanje dijela gena *ALG6* u kojem se očekuje polimorfizam Y131H lančanom reakcijom polimerazom

ishodnica	Nukleotidni slijed	T_m (°C)	Veličina PCR produkta
nizvodna za Y131H	5'-TGGAGGAAGGGAGGCAGTTAATG-3'	53	199 pb
uzvodna za Y131H	5'-ATACATTTCAGAGAGACGAACTGTCAGGC-3'	53	199 pb

Dobiveni su fragmenti zatim analizirani elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu u *TAE puferu.*

3.3.4 Analiza polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP)

Načelo

Polimorfizam konformacije jednolančane DNA učinkovita je tehnika otkrivanja razlika u sekvenci jednolančane DNA. Temelji se na razlici u brzini migracije jednolančane DNA u nedenaturirajućem poliakrilamidnom gelu. DNA se denaturira (razdvajaju se lanci) te dolazi do sparivanja baza unutar jednog lanca. Na taj način DNA poprima trodimenzionalnu konformaciju koja ovisi o slijedu nukleotida. Konformacije se razlikuju čak i ako se sekvence razlikuju samo u jednoj dušičnoj bazi. Različite konformacije kreću se različitim brzinama u elektroforetskom gelu, što je posljedica različitog omjera veličina/naboj, iako sekvence imaju isti naboj. Različite konformacije uzrokuju promjene u konfiguraciji ili veličini, tako da je ta razlika u omjeru veličina/naboj dovoljna da se može detektirati kao promjena u brzini gibanja kroz gel (Kalvatchev i Draganov, 2005).

Četiri su bitne varijable kod optimiranja SSCP-a: duljina PCR fragmenata, utjecaj temperature, vrsta PCR denaturacije te karakteristike gela. Optimalna dužina DNA kreće se između 150 i 200 nukleotida. U tom rasponu veličina uočljivo je 70-90% zamjena jedne baze (eng. single base supstitution). Kraći lanci u samom početku poprimaju manje konformacija, a većim se lancima manje mijenja konformacija zamjenom jedne baze. Temperatura značajno utječe na rezultate SSCP-a, a uobičajeni su uvjeti provođenja tehnike na sobnoj temperaturi ili na temperaturi od 4 °C uz dodatak glicerola 50 ili 100 ml/l. Uobičajena je jakost električnog polja 5 V/cm. Moguća je pojava lažnih vrpci ukoliko je bio preveliki broj ciklusa PCR-a ili je zaostalo jako puno specifičnih početnica koje se mogu vezati na jednolančanu DNA. To se može izbjeći smanjenjem broja ciklusa PCR (npr. 20) i razrjeđivanjem uzorka. Ipak, ukoliko se radi o manje osjetljivim metodama detekcije, ne smije se jako razrijediti uzorak. Tada se koriste jaki denaturirajući agensi kao što su NaOH, urea, formamid te metilživa hidroksid. Što se tiče karakteristika gela, omjer akrilamida i bisakrilamida te ukupna količina akrilamida određuju sposobnost prosijavanja gela. Veliki utjecaj na mobilnost u SSCP-u također imaju koncentracija i vodljivost pufera, temperatura gela te dodane tvari kao što je glicerol (Kalvatchev i Draganov, 2005).

Nekoliko je metoda detekcije, a najosjetljivija je detekcija fluorescentnim obilježavanjem i razdvajanjem kapilarnom elektroforezom pod strogo kontroliranim uvjetima. Također se može koristiti detekcija etidijevim bromidom te bojanje srebrom (Kalvatchev i Draganov, 2005).

Postupak

Stakla za elektroforezu temeljito se operu deterdžentom, isperu destiliranom vodom i prebrišu 70% etanolom. Razmaknice se postave između stakala te se „češalj“ i stakla povežu plastičnim spojnicama. Pripravlja se 35 ml 5% gela za SSCP elektroforezu, na način da se pomiješaju sastavnice gela prikazane u tablici 4.

Tablica 4. Sastavnice gela (5%) za SSCP elektroforezu

	SSCP gel (5%, 35 ml)
destilirana voda	21 ml
30% akrilamid/0,8 % bisakrilamid	7 ml
5 x *TBE pufer*	7 ml
10% amonijev persulfat	0,35 ml
Temed (katalizator)	0,01 ml

Temed se dodaje neposredno prije izlijevanja gela. Nakon polimerizacije gela izvadi se „češalj“ te se jažice ispiru nekoliko puta destiliranom vodom. Stakla s gelom postave se na kadicu. Uzorci se za analizu prirede na sljedeći način: 10 µl PCR produkata razrijedi se s formamid-puferom za nanošenje uzorka (5 µl) u omjeru 1:2. Uzorci se denaturiraju na 94 °C kroz 6 minuta te se hlade na ledu 3-5 minuta. Kao kontrola putovanja dvolančane DNA koristi se PCR produkt (5 µl) razrijeđen puferom za nanošenje uzorka nedenaturirane dvolančane DNA sa saharozom (5 µl). Uzorci i nedenaturirane kontrole nanose se u jažice Hamiltonovom mikropipetom. Također se nanose standardi (standard 100 pb – 5 µl; standard 1 kb – 3 µl) i kontrola (5 µl). Elektroforeza se provodi kroz 5 sati i 30 min korištenjem *1 x TBE puferaza elektroforezu* pri struji snage 3 W, na temperaturi od 4 °C. *1 x TBE pufer* dobiven je razrjeđivanjem *5 x TBE pufera* (200 ml *5 x TBE pufera* + 800 ml destilirane vode). Nakon završetka elektroforeze gel se boji srebrom.

3.3.5 Bojanje srebrom

Načelo

Bojanje srebrom osjetljiva je metoda trajnog bojanja nukleinskih kiselina u poliakrilamidnom gelu. Omogućava vizualizaciju rezultata elektroforeze bez ikakve dodatne opreme. Međutim, to je kompleksni proces na čiji rezultat utječu mnoge varijable (Amersham Biosciences, 1997).

Postupak se sastoji od četiri koraka: fiksiranje, impregnacija srebrom, razvijanje te zaustavljanje reakcije. Tijekom fiksiranja gel se obrađuje octenom kiselinom. To čini DNA u gelu netopljivom te sprječava razlijevanje po gelu tijekom sljedećih koraka bojanja. U ovom se koraku ispiru potencijalno prisutni ostaci pufera, iona i denaturirajućih agenasa koji bi mogli interferirati s ovim procesom. Impregnacija srebrom odvija se inkubiranjem gela u otopini za bojanje, a to je otopina srebrovog nitrata ($AgNO_3$). Blago kiseli uvjeti sprječavaju redukciju srebrovih iona u elementarno srebro. Razvijanje gela odvija se dodatkom otopine za odbojavanje gela koja sadrži Na_2CO_3 i formaldehid. Formaldehid je reducirajući agens koji reducira srebrove ione (Ag^+) u elementarno srebro (Ag^0), vidljivo i netopljivo. To omogućuje vizualizaciju vrpci DNA fragmenata koje sadrže srebro. Na_2CO_3 koristi se za zaluživanje reakcijskog medija, jer se prethodna reakcija odvija pri pH 12. Posljednji je korak zaustavljanje reakcije, kojim se zaustavlja daljnja redukcija srebrovih iona. Postiže se zakiseljavanjem uvjeta reakcija, odnosno ispiranjem octenom kiselinom (Amersham Biosciences, 1997).

Postupak

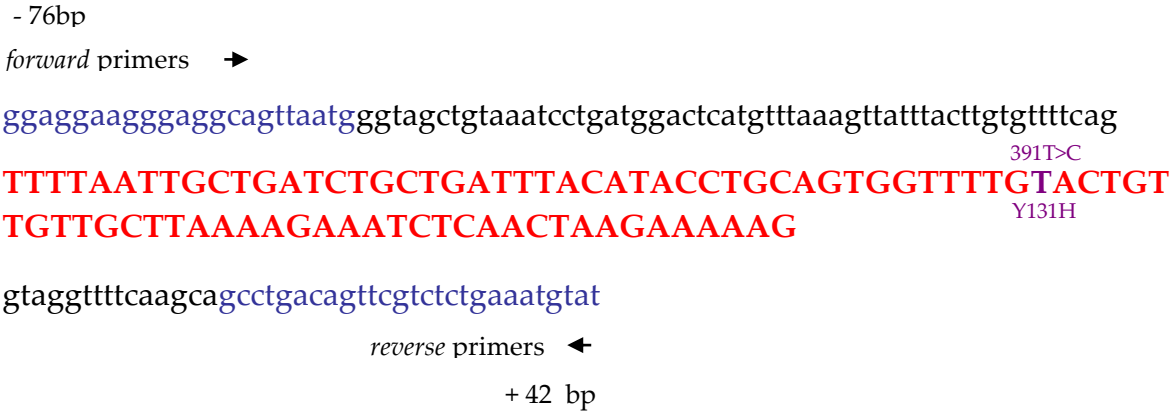
Fiksacija gela odvija se u 50% metanolu/10% octenoj kiselini tijekom 15 minuta. Gel se zatim ispire u 10% etanolu/7% octenoj kiselini kroz 15 minuta. Zatim se ponovi fiksiranje kroz 30 minuta te ispiranje tijekom 30 minuta. Postupak se ispiranja zatim ponavlja dva puta po 10 minuta. Slijedi tri puta ispiranje gelom u redestiliranoj H_2O po 5 minuta. Gel se zatim inkubira u otopini za bojanje (0,1% $AgNO_3$) tijekom 30 minuta. Ponovno se kratko ispere dva puta u redestiliranoj H_2O. Dodaje se svježe pripremljena otopina za odbojavanje koja sadrži 2,5% Na_2CO_3 i 0,02% formaldehida. Inkubacija se provodi na sobnoj temperaturi. Obojene vrpce jednolančane i dvolančane DNA pojavljuju se unutar nekoliko minuta. Reakcija se

zaustavlja ispiranjem gela 1% octenom kiselinom kroz nekoliko minuta. Gel se zatim nekoliko puta ispire u redestiliranoj H_2O.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Urođeni poremećaji glikozilacije velika su skupina rijetkih genetskih bolesti uzrokovanih poremećenom glikozilacijom proteina. Jedan od najčešćih CDG tipova, ALG6-CDG, uzrokovan nedostatnom N-glikozilacijom, posljedica je smanjene aktivnosti alfa-1,3-glikozil-transferaze uslijed specifičnih mutacija u genu *ALG6*. Najčešća je mutacija u tom genu A333V, te polimorfizmi Y131H i F304S. Premda do danas bolesnik s ALG6-CDG nije u Hrvatskoj otkriven, potreba za što boljim razumijevanjem nastanka mutacija u ovim poremećajima, kao i genskih karakteristika te povezanosti s drugim kompleksnim bolestima, što je dokazano za neke od CDG polimorfizama, bila je poticaj da se u ovome radu odredi jedan od polimorfizama iz navedenog sindroma, a to je Y131H. Za ovaj je polimorfizam poznato da se s velikom učestalošću pojavljuje u određenim populacijama te da pridonosi kliničkoj slici CDG-a.

Promjena baze T u C na položaju 391 u egzonu 5 gena *ALG6* uzrokuje aminokiselinsku zamjenu tirozina u histidin na položaju 131 (Y131H). Smatra se da ovaj polimorfizam u homozigotnom obliku uzrokuje CDG-Ic.



Slika 6. Nukleotidni slijed egzona 5 i dijelova intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *ALG6*.

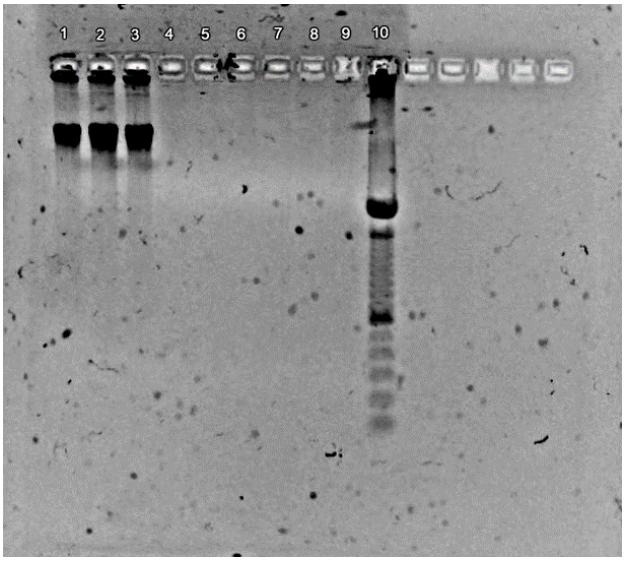
Prikazani nukleotidni slijed dijela gena *ALG6* obuhvaća egzon 5 te pripadajuće intronske regije IVS4 (-76 bp) i IVS5 (+42 bp) (Slika 6). Položaj polimorfizma Y131H (391T>C) obilježen je ljubičastom bojom, egzon 5 crvenom bojom, a sljedovi ishodnica otisnuti su plavom bojom.

4.1 Izolacija slobodne cirkulirajuće DNA

U američkoj populaciji Y131H polimorfizam ima učestalost 0,0214 (1/45), dok je učestalost u hrvatskoj populaciji tri puta veća. Prisutnost polimorfizma Y131H u uzorcima analizirana je PCR-SSCP metodom. Kao pozitivna kontrola korištena je gDNA dobivena od heterozigotnog nositelja Y131H polimorfizma (391 T/C).

Jedna od specifičnosti u ovom radu bila je pokušaj umnažanja željenog fragmenta iz uzorka zolirane slobodne cirkulirajuće DNA.

Provedena je izolacija DNA pomoću QIAamp DNA mini Kit-a. Na izoliranim je uzorcima provedena elektroforeza u 1,5% agaroznom gelu, da bi se provjerila uspješnost izolacije te eventualna fragmentiranost uzoraka slobodne cirkulirajuće DNA. Vizualizacija je provedena pomoćuAmersham Imager software-a.



Slika 7. Agarozna elektroforeza izolirane slobodne cirkulirajuće DNA. Elektroforeza izolirane slobodne cirkulirajuće DNA (cfDNA) iz plazme zdravih žena i pacijentica oboljelih od karcinoma dojke. Nakon izolacije slobodne cirkulirajuće DNA iz plazme/seruma, izolati su analizirani elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu i vizualizirani na Gel Imager-u. 1-3: izolati cfDNA, karcinom dojke s metastazama, uznapredovali stadij, 4-6; izolati cfDNA pacijentica, karcinom dojke bez metastaza, na terapiji, 7-9: izolati cfDNA zdravih žena, 10: standard molekulskih masa DNA (1 kb DNA).

Iz analize agarozne elektroforeze vidi se da je pretežno genomska DNA vidljiva, s vrlo nejasnim fragmentima koji bi pripadali cirkulirajućoj cfDNA (približno 400 bp). Potrebne su specifičnije izolacije na kolonama specifičnijim za male fragmente koji bi omogućili detaljniju analizu cfDNA. Međutim, izrazito je vidljiva razlika u količini DNA u plazmi kod pacijentica s metastazama od onih kod kojih je uspješno provedena terapija. Temeljem toga možemo pretpostaviti da je njihova koncentracija cfDNA ispod detektabilnosti analize Imager software-om nakon razdvajanja agaroznom elektroforezom. Isto tako, nakon bojanja Gel Redom™, obična vizualizacija UV-svjetlom praktički nije bila moguća osim vizualizacijom na Gel Imager-u.

Izolatima je određena koncentracija i spektrofotometrijski na instrumentu Nanodrop 8000, gdje su rezultati iznosili:

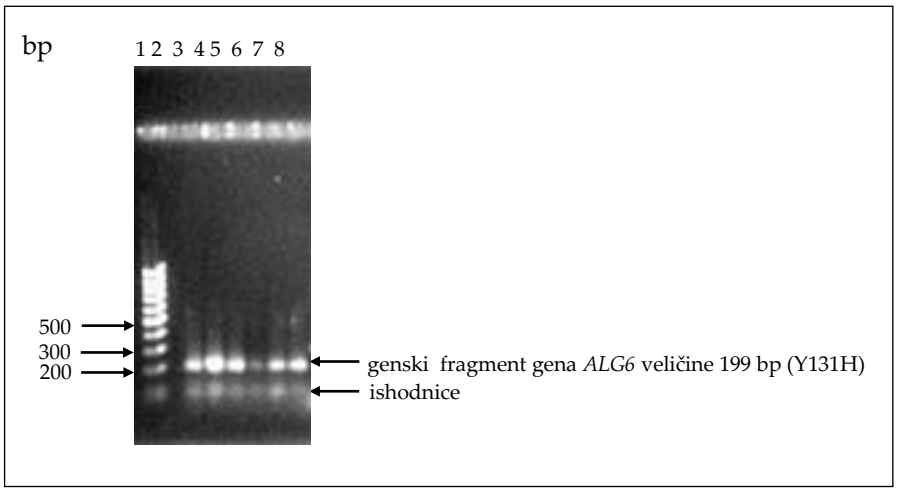
izolati DNA zdravih žena: do 12 ng/µl,

izolati DNA pacijentica oboljelih od karcinoma dojke s metastazama: 25-70 ng/µl

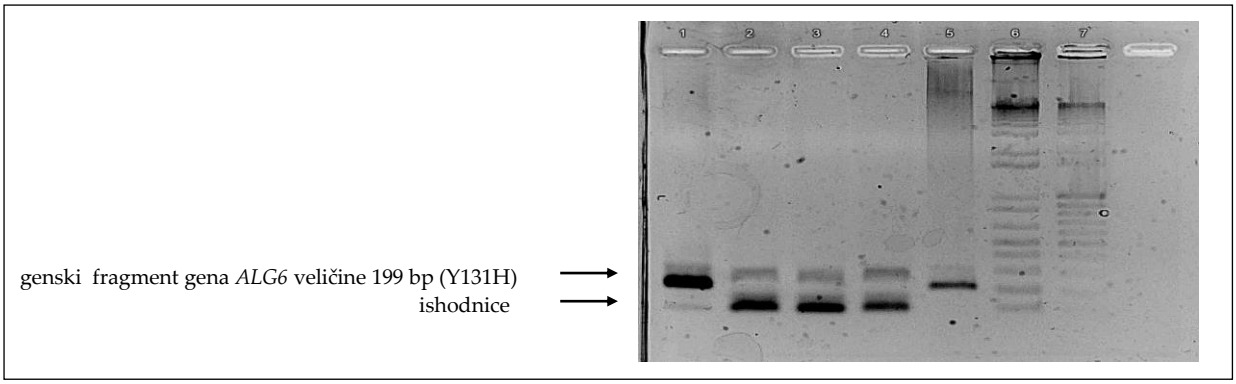
izolati DNA pacijentica bez metastaza: do 15 ng/µl

4.2 Umnažanje egzona 5 *ALG6* gena

Izolati su umnoženi PCR metodom uz specifične ishodnice za Y131H polimorfizam, pri specifičnim uvjetima karakterističnim za taj polimorfizam (Tablica 2).



Slika 8. Elektroforeza PCR produkata (199 bp) nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadajućih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *ALG6*. Nakon izolacije slobodne cirkulirajuće DNA iz seruma i lančane reakcije polimerazom, PCR su produkti izolirani eklektroforezom u 1,5% agaroznom gelu. 1: standard molekulskih masa DNA, 2-8: PCR produkti nastali umnažanjem 7 uzoraka DNA izoliranih iz plazme pacijentica oboljelih od karcinoma dojke s metastazama. Položaji PCR produkata veličine 199 bp i položaji ishodnica označeni su strelicom. Količina PCR produkata procijenjena je prema standardu DNA.



Slika 9. Elektroforeza PCR produkata (199 bp) nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadajućih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *ALG6*. Nakon izolacije slobodne cirkulirajuće DNA iz plazme i lančane reakcije polimerazom, PCR su produkti izolirani elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu.1-4: PCR produkti nastali umnažanjem 4 uzorka DNA izoliranih iz plazme pacijentica oboljelih od karcinoma dojke s metastazama, 5: PCR produkt nastao umnažanjem uzorka DNA izoliranih iz plazme zdrave ispitanice, 6,7: standardi molekulskih masa DNA. Položaji PCR produkata veličine 199 bp i položaji ishodnica označeni su strelicom. Količina PCR produkata procijenjena je prema standardu DNA.

Svi su uzorci uspješno umnoženi PCR metodom, što upućuje na dostatnu količinu DNA u izolatima za umnažanje PCR metodom (vrijedi i za izolaciju iz seruma i iz plazme) .

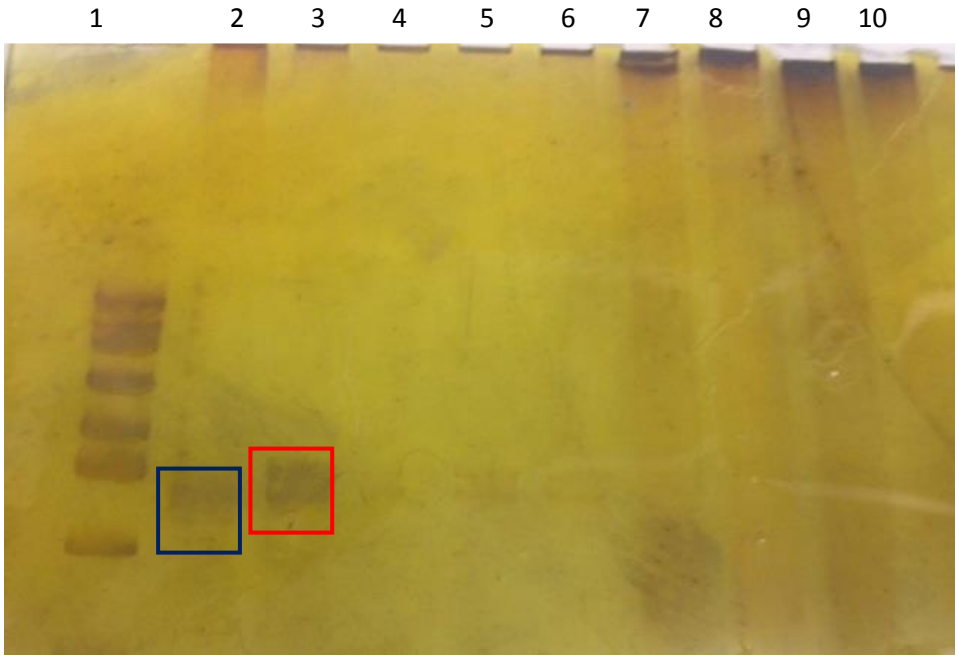
Fragment odgovara željenom fragmentu, PCR produktu Y131H (Slika 8,9). Svi su PCR produkti razdvojeni na +4°C SSCP metodom, uz odgovarajuće uvjete, prethodno optimirane za taj specifični polimorfizam.

4.3 Analiza polimorfizma Y131H u genu *ALG6* SSCP metodom

Prisutnost polimorfizmaY131H u genu *ALG6* u uzorcima ispitana je analizom polimorfizma konformacije jednolančane DNA (*eng*. single-strand conformation polymorphism, SSCP).

Budući da je jedan od čimbenika razdvajanja temperatura pri kojoj se elektroforeza provodi, postupak je proveden pri već prethodno optimiranoj vrijednosti temperature (4° C).

Svi uzorci analizirani su elektroforezom u 6% poliakrilamidnom gelu u *1xTBE puferu* pri temperaturi 4° C, uz struju snage 3 W (100 V, 30 mA), tijekom 5 sati i 30 minuta. Za analizu SSCP uzorci su priređeni na sljedeći način: 10-25 µl PCR produkata razrijeđeno je *SSCP-puferom za denaturaciju i nanošenje uzoraka*u volumnom omjeru 1:2 te je smjesa zagrijana tijekom 6 minuta pri 94° C i naglo ohlađena na ledu. Kao kontrola putovanja dvolančane DNA na gel je nanesen uzorak priređen s *SSCP-puferom za nanošenje uzoraka nedenaturirane dvolančane DNA*. Volumeni uzoraka nanošenih na gel sadržavali su približno 50 ng PCR produkata. Gel je po završetku elektroforeze obojan srebrom.



Slika 10: PCR produkti razdvojeni poliakrilamidnom elektroforezom (SSCP analiza). 1: standard DNA molekulskih masa, 2: heterozigot, kontrola polimorfizam Y131H (plavim kvadratom uokvireno), 3: PCR produkt izolata cfDNA izoliran iz ispitanica s karcinomom dojke (metastaze, uokvireno crvenim kvadratom), 4: divlji tip, 5-6: PCR produkt izolata cfDNA izoliran iz ispitanica s karcinomom dojke, 7-10; PCR produkt izolata cfDNA izoliran iz zdravih ispitanica.

Na slici 10 jasno je vidljivo razdvajanje heterozigota u uzorku broj 2, što odgovara obrascu navedenom u literaturi. Isto se tako vidi jasna razlika između ostalih uzoraka PCR produkata karcinoma dojke s metastazama i bez njih te uzoraka dobivenih iz zdravih ispitanica, gdje nije dobiven obrazac. Razlog tome možda leži u činjenici niske koncentracije DNA u zdravim uzorcima, gdje optimiranje ipak nije bilo dostatno te bi se eventualno dodatnim Sangerovim sekvenciranjem mogao utvrditi željeni nukleotidni slijed egzona 5 *ALG6* gena i pojavnost divljeg/mutiranog tipa polimorfizma *ALG6*. Mutirani oblik polimorfizma Y131H vidljiv je u pacijentica s metastazama, no broj je uzoraka nedostatan za statističku analizu. Stoga bi u daljnjim istraživanjima trebalo uključiti skupine specifičnih uzoraka te napraviti podrobniju statističku analizu.

Važno je naglasiti da je SSCP relativno precizna metoda analize pojedine mutacije ukoliko su uvjeti adekvatno optimirani. Ipak, da bi se rezultat SSCP analize potvrdio, svi uzorci s obrascem koji nije odgovarao normalnom obrascu, kao i određen broj nasumično odabranih uzoraka koji su pokazali normalni elektroforetski obrazac, moraju dodatno biti podvrgnuti automatskom sekvenciranju.

4.4 Rasprava

Mnoge su bolesti praćene promjenama u glikozilaciji i upravo se njihovom analizom u nekim slučajevima može pratiti tijek bolesti. Kod patoloških procesa, kao što su reumatoidni artritis, alergije, septički šok te neki tumori, promjene glikozilacije blisko su povezane s napredovanjem bolesti. Općenito se može reći da je funkcija oligosaharida posredovanje u specifičnim reakcijama međumolekularnog prepoznavanja i moduliranje bioloških procesa.

Golema strukturna raznolikost glikanskih struktura čini ih idealnim za pohranu bioloških informacija. Glikani utječu na strukturu i funkciju glikoproteina, zbog čega imaju važnu ulogu u mnogim biološkim procesima. Glikozilacija može biti uzrok bolesti, što znači da je pravilna glikozilacija ključna za održavanje homeostaze, odnosno zdravlja. Stoga je razumljivo da su promjene glikozilacije povezane s mnogim medicinskim problemima.

Bolesti uzrokovane specifičnim mutacijama gena koji kodiraju enzime uključene u proces glikozilacije, praćene nedostatnom ili smanjenom glikozilacijom proteina, svrstane su u skupinu urođenih poremećaja glikozilacije (*eng.* Congenital Disorders of Glycosylation, CDGs).

U genu *ALG6*, u egzonu 10, blizu navedene mutacije A333V i mutacije I299*del*smješten je polimorfizam 911T>C (F304S) koji ne uzrokuje CDG-Ic. Istraživanje provedeno na francuskoj populaciji dokazalo je da polimorfizam F304S nije uzrok CDG, s obzirom na visoku učestalost nositelja od 27% (Vuillaumier-Barrot i sur., 2001). Međutim, dokazano je da utječe na izražaj kliničkog fenotipa ne samo kod CDG-Ic uzrokovanog mutacijama u genu *ALG6*, nego i u drugim tipovima CDG. Primjerice, dokazano je da osobe oboljele od CDG-Ia (mutacija R141H u egzonu 5 gena *PMM2*) koje su nositelji i polimorfizma F304S imaju mnogo teži klinički oblik te drugačiji ishod bolesti od bolesnika koji nemaju ovaj polimorfizam.

U egzonu 5 gena *ALG6* kod bolesnika s CDG-Ic otkrivena je heterozigotna točkasta mutacija 391T>C (Y131H) (Slika 6). Istraživanja provedena na kvascima pokazala su da ova promjena uzrokuje jednako ozbiljne promjene kao i mutacija 998C>T (A333V) koja se pojavljuje u gotovo pola svih do sada poznatih bolesnika s CDG-Ic. Učestalost mutacije 391T>C (Y131H) u populaciji SAD-a iznosi 0,0214, što upućuje na zaključak da bi se homozigoti trebali pojavljivati u navedenoj populaciji s učestalošću od 1:2200. Osim toga, glikozilacija njihovog serumskog transferina je normalna, za razliku od osoba oboljelih od

CDG kod kojih nije prisutna mutacija 391T>C (Y131H). Stoga je još uvijek nerazjašnjeno uzrokuje li 391T>C CDG-Ic ili je samo polimorfizam koji pridonosi simptomima. (Westphal i sur., 2003). Potrebna je dodatna genotipizacija bolesnika sa simptomima sličnima simptomima CDG-a, da bi se riješilo to pitanje.

S obzirom da je poznato da N-glikozilacija utječe na kliničku ekspresiju mnogih bolesti, bilo kao genski faktor, bilo kao glavni doprinos njihovoj patologiji, pokušaj je bio metodološki analizirati polimorfizam koji pridonosi patogenezi urođenih poremećaja glikozilacije (u ovom radu polimorfizam Y131H i eventualno ga povezati s kompleksnom tumorskom bolešću, u ovom slučaju s karcinomom dojke).

S obzirom na navedeno, potrebno je provesti detaljnija istraživanja u budućnosti u vezi navedenih CDG sindroma. Neobjašnjene slučajeve bolesti te sumnjive dijagnoze sa simptomima sličnim CDG potrebno je preispitati te provesti detaljnije istraživanje. Tek će budućnost pokazati stvarne učestalosti mutacija, kako za CDG-I, tako i za CDG-II. Istraživanja CDG treba shvatiti kao jednu još uvijek nepotpuno složenu slagalicu čijim se postupnim upotpunjavanjem tek naziru konačni obrisi cjelokupne slike.

U ovom je radu DNA izolirana metodom na silika-membrani komercijalnom kit izolacijom koja se za potrebe analize mutacija/polimorfizama metodom SSCP nije u potpunosti pokazala zadovoljavajućom. Trebalo bi uzorke izolirati na specifičnijim kolonama (za slobodnu cirkulirajuću DNA) jer fragmenti dobiveni gel elektroforezom nisu jasno vidljivi. Ipak, ovaj se postupak izolacije pokazao zadovoljavajućim za pripremu gDNA koja je korištena za umnažanje fragmenta egzona 5 *ALG6* gena za genotipizaciju polimorfizma Y131H. Izolati dobiveni ovim postupkom bili su zadovoljavajuće kvalitete pa je umnažanje fragmenata gDNA za potrebe te analize uspješno provedeno. SSCP analiza dala je zadovoljavajuće rezultate, međutim nedostatne kod PCR fragmenata izoliranih iz uzoraka zdravih ispitanica, kod kojih bi tek naknadnim sekvenciranjem eventualno mogli potvrditi genotip traženog polimorfizma.

S obzirom na uspješnu detekciju polimorfizma, a ujedno i veliku heterogenost i raznolikost tumora, svakako bi trebalo specificirati uzorke po skupinama (stupanj bolesti, terapija) te provesti analizu na većem broju uzoraka, da bi se rezultati mogli statistički analizirati.

Bilo bi zanimljivo analizirati uzorke bolesnika oboljelih od različitih bolesti sa sličnim simptomima (primjerice od neuroloških) ili osoba s psihomotornim zaostajanjem u razvoju nepoznate etiologije te bolesnika oboljelih od enteropatije s gubitkom proteina.

S obzirom na podatke o učestalosti mutacija i polimorfizama gena *ALG6* primjenom optimiranih metoda,daljnja bi istraživanja trebala obuhvatiti veći broj uzoraka. Uzevši u obzir činjenicu da poremećaji vezani uz ovaj gen u velikom broju slučajeva uzrokuju neurološke simptome, trebalo bi možda testirati prisutnost ovih mutacija i polimorfizama kod bolesnika s takvim simptomima.

5. ZAKLJUČCI

- izolacija na komercijalnim kolonama korištenima za izolaciju genomske DNA nije dostatna za kompletnu vidljivost i izolaciju manjih fragmenata očekivanih u cirkulaciji ispitanica oboljelih od karcinoma dojke
- uspješno je umnožen željeni fragment egzona 5 *ALG6* gena u svim uzorcima primjenom navedenih uvjeta umnožavanja PCR metodom
- polimorfizam/mutacija Y131H specifična za urođene poremećaje glikozilacije ne može se bez sveobuhvatnije analize povezati s kompleksnošću bolesti kao što je karcinom dojke
- ispitivani uvjeti SSCP analize uspješni su za detekciju i genotipizaciju polimorfizma/mutacije Y131H, ali bi trebalo poboljšati kvalitetu i prinos DNA izolacije

5. LITERATURA

ALG6 gene chromosomal location, 2014., http://ghr.nlm.nih.gov, pristupljeno 20.3.2017.

Amersham Biosciences. Automated silver and coomassie staining of polyacrylamide gels, 1997, Revision B, 1-8.

Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T i sur. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. PLoS ONE, 2014, 9, 1-11.

Burda P., Borsig L, de Rijk-van Andel J, Wevers R, Jaeken J i sur. A novel carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome characterized by a deficiency in glucosylation of the dolichol-linked oligosaccharide. J Clin Invest, 1998, 102, 647-652.

Carchon H, Van Schaftingen E, Matthijs G, Jaeken J. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A (phosphomannomutase-deficiency). Biochim Biophys Acta, 1999, 1455, 155-165.

Christie EL, Dawson SJ, Bowtell DDL. Blood worth bottling: Circulating tumor DNA as cancer biomarker. Cancer Res, 2016, 76, 5590-5591.

Cooper GM, Hausman RE. The Cell: A Molecular Approach. Sunderland, Sinauer Associates, 2007, str. 355-412.

Freeze HH, Eklund EA, Ng BG, Patterson MC. Neurology of inherited glycosylation disorders. Lancet Neurol, 2012, 11, 453-466.

Garibyan L, Nidhi A. Polymerase Chain Reaction. J Invest Dermatol, 2013, 133, 392-395.

Grünewald S, Imbach T, Huijben K, Rubio-Gozalbo ME, Verrips A i sur. Clinical and biochemical characteristics of congenital disorder of glycosylation type 1c, the first recognized endoplasmic reticulum defect in N-glycan synthesis. Ann Neurol, 2000, 47, 776-781.

Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liqud biopsy for cancer. Clin Chem, 2015, 61, 112-123.

Joshi M, Deshpande JD. Polymerase Chain Reaction : methods, principles and application. Int J of Biomed Res, 2011, 2, 81-97.

Kalvatchev Z, Draganov P. Single-Strand Conformation Polymorphism (Sscp) Analysis : a Rapid and Sensitive Method for Detection of Genetic Diversity Among Virus Population. Biotechnol Biotechnol Equip, 2005, 19, 9-14.

Kjaergaard S. Congenital disorders of glycosylation type Ia and Ib. Genetic, biochemical and clinical studies. Dan Med Bull, 2004, 51, 350-363.

Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. J Vis Exp, 2012, 62, 1-5.

Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantification of genomic DNA in plasma and serum samples : higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. Transfusion, 2001, 41, 276-282.

Lodish H, Berk A, Lawrence Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D i sur. Molecular Cell Biology. New York, Freeman, 2000, str. 673-674.

Manokhina I, Singh TK, Peñaherrera MS, Robinson WP. Quantification of cell-free DNA in normal and complicated pregnancies: Overcoming biological and technical issues. PLoS ONE, 2014, 7, 1-7.

Marquardt T, Denecke J. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular basis, clinical presentations and specific therapies. Eur J Pediatr, 2003, 162, 359-379.

Matthijs G, Schollen E, Van Schaftingen E, Cassiman JJ, Jaeken J. Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. Am J Hum Genet, 1998, 62, 542-550.

Mouliere F, Rosenfeld N. Circulating tumor-derived DNA is shorter than somatic DNA in plasma. Proc Natl Acad Sci U S A , 2015, 112, 3178-3179.

Niehues R, Hasilik M, Alton G, Körner C, Schiebe-Sukumar M i sur. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. J Clin Invest, 1998, 101, 1414-1420.

QIAGEN. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2012, 3., 1-72. Dostupno na : https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1379318/mod_resource/content/0/QIAamp_DNA_Mini_Blood.pdf

Protein Glycosylation, 2016., https://www.thermofisher.com, pristupljeno 21.3.2017.

Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, Tong Y, Liang J. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. Chin J Cancer, 2016, 35, 1-9.

Rimella-Le-huu A, Henry H, Kern I, Hanquinet S, Roulet-Perez E i sur. Congenital disorders of glycosylation type Id (CDG Id): Phenotypic, biochemical and molecular characterization of a new patient. J Inherit Metab Dis , 2008, 31, 381-386.

Scott K, Gadomski T, Kozicz T, Morava E. Congenital disorders of gycosylation: New defects and still counting. J Inherit Metab Dis , 2014, 37, 609-617.

Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. Glycobiology, 2002, 12, 43R-56R.

Stellwagen NC. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. Electrophoresis, 2009, 30, S188-S195.

Supraha Goreta S, Dabelic S, Pavlinic D, Lauc G, Dumic J. Frequency Determination of α-1,3 Glucosyltransferase p.Y131H and p.F304S Polymorphisms in the Croatian Population Revealed Five Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the hALG6 Gene. Genet Test Mol Biomarkers, 2012a, 16, 50-53.

Supraha Goreta S, Dabelic S, Dumic J. Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation. Biochem Med, 2012b, 22, 156-170.

Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids – A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. FEBS Lett, 2007, 581, 795-799.

Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R i sur. Fragment Lenght of Circulating Tumor DNA. PLoS Genet, 2016, 12, 1-24.

Vuillaumier-Barrot S, Le Bizec C, Durand G, Seta N. The T911C (F304S) substitution in the human ALG6 gene is a common polymorphism and not a causal mutation of CDG-Ic. J Hum Genet, 46, 547-548.

Westphal V, Kjaergaard S, Schollen E, Martens K, Grunewald S i sur. A frequent mild mutation in ALG6 may exacerbate the clinical severity of patients with congenital disorder of glycosylation Ia (CDG-Ia) caused by phosphomannomutase deficiency. Hum Mol Genet, 2002, 11, 599-604.

Westphal V, Xiao M, Kwok PY, Freeze HH. Identification of a frequent variant in ALG6, the cause of Congenital Disorder of Glycosylation-Ic. Hum Mutat, 2003, 22, 420-425.Westphal V, i sur. Identification of a frequent variant in ALG6, the cause of Congenital Disorder of Glycosylation-Ic. Human mutation, 2003, 22, 420-425.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Urođeni poremećaji glikozilacije (CDGs) skupina su genskih poremećaja uzrokovanih nedostatnom sintezom ili procesiranjem glikoproteina. Do danas je poznato pedesetak poremećaja proteinske N-glikozilacije. Klinički je spektar sindroma CDG iznimno varijabilan, od poremećaja ograničenih na specifične organe do ozbiljnih multisistemskih poremećaja. Najčešći su tipovi urođenih poremećaja glikozilacije CDG-Ia i CDG-Ic. Tip Ia nastaje kao posljedica smanjene aktivnosti fosfomanomutaze 2 uslijed mutacija u genu *PMM2*, dok je CDG-Ic uzrokovan mutacijama u genu *ALG6* koji kodira $Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol α1,3-glikoziltransferazu. Pokazano je da je učestalost nositelja određenih mutacija, ali i bolesnika s CDG, specifična za pojedinu populaciju. Premda u Hrvatskoj nije otkriven nijedan bolesnik s CDG uzrokovanim poremećajem N-glikozilacije, svrha ovoga rada bila je ispitati genotip polimorfizma Y131H u genu *ALG6* u hrvatskoj populaciji, s obzirom na njegovu visoku pojavnost (6,7%). Za određivanje polimorfizma gena *ALG6*, Y131H (391T>C u egzonu 5), korištena je metoda lančane reakcije polimerazom i SSCP analiza. Polimorfizam Y131H ispitivan je na zdravoj populaciji i u ispitanica oboljelih od karcinoma dojke, jer je dokazano da Y131H polimorfizam pogoršava kliničku sliku kompleksnih genskih bolesti, uključujući i tumore. Fragment od interesa je uspješno genotipiziran, no za procjenu utjecaja ovog polimorfizma na ovakvu vrstu bolesti trebalo bi provesti dodatno sekvenciranje i obuhvatiti veći broj uzoraka.

7.2. Summary

Congenital disorders of glycosylation (CDGs) are a growing group of genetic disorders caused by a deficient assembly or processing of glycoproteins. About fiffty disease-causing defects in protein N-glycosylation are known so far. The clinical spectrum of the different types of CDGs discovered so far is variable, ranging from disorders restricted to specific organs to severe multisystemic disorders. The most common types of CDGs are CDG-Ia and CDG-Ic. Type Ia is caused by reduced N-glycosylation due to phosphomannomutase 2 deficiency as a consequence of mutations in *PMM2* gene and CDG-Ic is caused by mutations in *ALG6* gene, encoding $Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol α1,3-glucosyltransferase. The frequencies of heterozygotes for specific mutations, as well as CDG patients are specific for every population. Until now no patient with CDG syndrome affecting N-glycosylation was detected in Croatia. The aim of this study was to determine various mutations/polymorphisms in *ALG6* gene in complex disease as breast cancer.

For determination of the frequencies of polymorphisms of *ALG6* gene, Y131H (391T>C in exon 5, PCR-SSCP analysis was used. Resolution of Y131H polymorphism was determined by SSCP analysis but it can not be said that the worse clinical outcome is due to found mutated genotype. The results must be checked by automated sequencing to obtain eventual minor frequent variants and to look in much bigger population study to find the right answers.

8. PRILOZI

8.1 Popis kratica

CDG – urođeni poremećaji glikozilacije

cfDNA – slobodna cirkulirajuća DNA

ctDNA – cirkulirajuća tumorska DNA

ER- endoplazmatski retikulum

GA- Golgijev aparat

PCR – lančana reakcija polimerazom

SSCP – polimorfizam konformacije jednolančane DNA

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

POLIMORFIZAM Y131H GENA ALG6 U KARCINOMU DOJKE

Iva Ruščić

SAŽETAK

Urođeni poremećaji glikozilacije (CDGs) skupina su genskih poremećaja uzrokovanih nedostatnom sintezom ili procesiranjem glikoproteina. Do danas je poznato pedesetak poremećaja N-glikozilacije. Klinički je spektar sindroma CDG iznimno varijabilan, od poremećaja ograničenih na specifične organe do ozbiljnih multisistemskih poremećaja. Najčešći su tipovi urođenih poremećaja glikozilacije CDG-Ia i CDG-Ic. Tip Ia nastaje kao posljedica smanjene aktivnosti fosfomanomutaze 2 uslijed mutacija u genu *PMM2*, dok je CDG-Ic uzrokovan mutacijama u genu *ALG6* koji kodira $Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol α1,3-glikoziltransferazu. Pokazano je da je učestalost nositelja određenih mutacija, ali i bolesnika s CDG, specifična za pojedinu populaciju. Premda u Hrvatskoj nije otkriven nijedan bolesnik s CDG uzrokovanim poremećajem N-glikozilacije, svrha ovoga rada bila je ispitati genotip polimorfizma Y131H u genu *ALG6* u hrvatskoj populaciji, s obzirom na njegovu visoku učestalost (6,7%). Za određivanje polimorfizma Y131H (391T>C u egzonu 5), korištena je metoda lančane reakcije polimerazom i SSCP analiza. Polimorfizam Y131H ispitivan je na zdravoj populaciji i u ispitanica oboljelih od karcinoma dojke, jer je dokazano da Y131H polimorfizam pogoršava kliničku sliku kompleksnih genskih bolesti, uključujući i tumore. SSCP analizom pri utvrđenim uvjetima uzorci su genotipizirani, međutim za pravilnu procjenu utjecaja ovog polimorfizma za ovakvu vrstu bolesti trebalo bi provesti dodatno sekvenciranje i obuhvatiti veći broj uzoraka.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 44 stranice, 10 grafičkih prikaza, 4 tablice i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: CDG, slobodna cirkulirajuća DNA, polimorfizam Y131H, SSCP analiza

Mentor: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lidija Bach Rojecky, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Toma Keser, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2017

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

POLYMORPHISM Y131H IN BREAST CANCER

Iva Ruščić

SUMMARY

Congenital disorders of glycosylation (CDGs) are a growing group of genetic disorders caused by a deficient assembly or processing of glycoproteins. About fiffty disease-causing defects in protein N-glycosylation are known so far. The clinical spectrum of the different types of CDGs discovered so far is variable, ranging from disorders restricted to specific organs to severe multisystemic disorders. The most common types of CDGs are CDG-Ia and CDG-Ic. Type Ia is caused by reduced N-glycosylation due to phosphomannomutase 2 deficiency as a consequence of mutations in *PMM2* gene and CDG-Ic is caused by mutations in *ALG6* gene, encoding $Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol α1,3-glucosyltransferase. The frequencies of heterozygotes for specific mutations, as well as CDG patients are specific for every population. Until now no patient with CDG syndrome affecting N-glycosylation was detected in Croatia. The aim of this study was to determine various mutations/polymorphisms in *ALG6* gene in complex disease as breast cancer. For determination of the frequencies of polymorphisms of *ALG6* gene, Y131H (391T>C in exon 5, PCR-SSCP analysis was used. Resolution of Y131H polymorphism was determined by SSCP analysis but it can not be said that the worse clinical outcome is due to found mutated genotype. The results must be checked by automated sequencing to obtain eventual minor frequent variants and to look in much bigger population study to find the right answers.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 44 pages, 10 figures, 4 tables and 36 references. Original is in Croatian language.

Keywords: CDG, cell free DNA, Y131H polymorphism, SSCP analyses

Mentor: **Sandra Šupraha Goreta**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sandra Šupraha Goreta**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach Rojecky, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Toma Keser, **Ph.D.** *Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2017.