

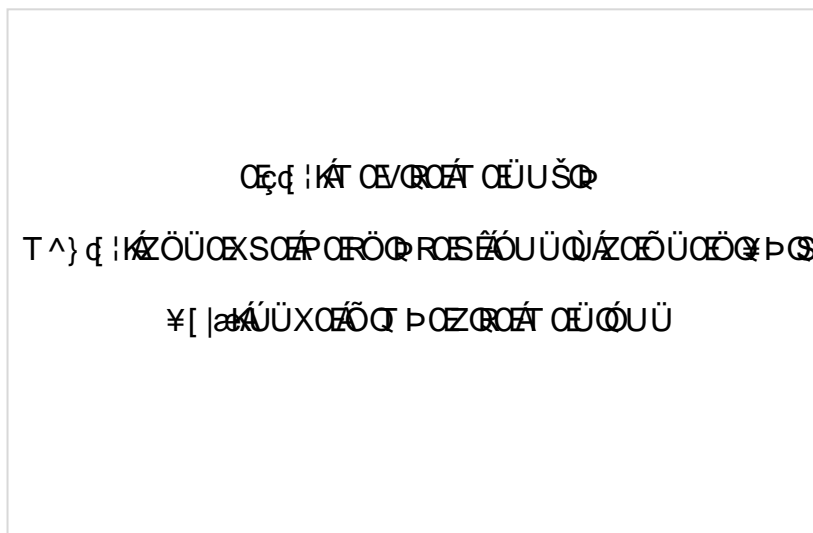
Mladi za napredek Maribora 2014

31. srečanje

**DOLOČITEV FREKVENCE SINDROM GILBERT V SPLOŠNI
SLOVENSKI POPULACIJI**

RAZISKOVALNO PODROČJE: ZDRAVSTVO IN VETERINA

Raziskovalna naloga



2014, Maribor

Mladi za napredek Maribora 2014

31. srečanje

**DOLOČITEV FREKVENCE SINDROM GILBERT V SPLOŠNI
SLOVENSKI POPULACIJI**

RAZISKOVALNO PODROČJE: ZDRAVSTVO IN VETERINA

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO



2014, Maribor

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	4
1. UVOD	5
2. PREGLED OBJAV	6
2.1 GILBERTOV SINDROM	6
3. MATERIALI IN METODE	8
3.1 PREISKOVANCI	8
3.2 IZOLACIJA DNK IZ BIOLOŠKEGA VZORCA	8
3.3 POMNOŽEVANJE SPECIFIČNIH ODSEKOV DNK V NAPRAVI PCR	8
3.4 LOČEVANJE POMNOŽENIH PCR PRODUKTOV Z AGARozNO ELEKTROFOREZO	10
3.5 NADALJNE LOČEVANJE POMNOŽENIH PCR PRODUKTOV Z KAPILARNO ELEKTROFOREZO	12
4. REZULTATI	13
5. SKLEP	17
VIRI	18
ZAHVALA	20

POVZETEK

Predmet raziskovanja te naloge je Gilbertov sindrom in njegova pogostost v splošni populaciji. Frekvenco smo preverjali na skupini 48 preiskovancev iz splošne populacije, ki smo jim določili genotip v genu UGTA1. Določeni aleli v tem genu (6TA in 7TA) so namreč povezani z nastankom tega sindroma. Gilbertov sindrom je avtosomno-recesivno stanje, ki je prisotno pri 2% do 12% oseb v splošni populaciji. Genotipizacijo smo opravili na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR- Polymerase chain reaction), elektroforezo nukleinskih kislin in kapilarno elektroforezo.

1. UVOD

Zvišana koncentracija nekonjugiranega bilirubina v krvi je lahko znak jetrne bolezni, vendar je pri tem potrebno izključiti prisotnost sindroma Gilbert. Gre za nenevarno stanje, ki ni povezano z bolezensko okvaro, kljub temu da je posledica slabšega delovanja encima, ki ga kodira gen UGTA1.

Cilji naloge so bili naslednji:

- določitev frekvence sindrom Gilbert v splošni populaciji,
- razširiti znanje o genetiki in o sindromu samem, saj veliko ljudi ne ve za njegov obstoj.

Tabela 1: Frekvenca sindroma med tremi glavnimi rasami

	Evropejska	Azijska	Afričanska
6TA/6TA	33%	28%	31.8%
6TA/7TA	54.8%	70%	45.1%
7TA/7TA	11.2%	2%	23.1%

2. PREGLED OBJAV

2.1 GILBERTOV SINDROM

Mutacije so spremembe v dednem zapisu posameznega osebk, ki se ohranijo in se prenašajo na hčerinske celice. So spremembe molekule DNA in lahko zajamejo gen, kromosom ali celoten genom. Posledice mutacij se kažejo v spremenjeni zgradbi beljakovin in kot nepravilnosti v zgradbi in delovanju celice ter organizma. Mutacije so pogoste. Nastanejo lahko spontano ali pa so izzvane (inducirane). Večina mutacij je škodljivih. Nek gen lahko na primer določena mutacija spremeni tako, da več ni zmožen tvorbe encima, ki je nujno potreben za sintezo beljakovine, ki je za organizem nujno potrebna. Vendar vse mutacije niso škodljive. Nek gen lahko na primer neka mutacija spremeni tako, da prične organizem tvoriti kakšen produkt, ki je za organizem koristen in mu tako omogoči boljše preživetje. Nekatere mutacije so tako celo vir variacij genskega materiala, ki omogočajo evolucijske spremembe. (Svarog, ni letnice)

Pri omenjenem simptomu jetra zaradi motnje encimov (UDP-glikozil tranferaze) niso sposobna adekvatno odstranjevati bilirubina, zato se ta zadržuje v krvi. Motnja je benigne narave, pogosteje prisotna pri moških. Najpogosteje se odkrije povsem slučajno pri rutinskih ali sistematskih pregledih. Jetra ustvarjajo rumenkasti pigment-bilirubin, ki nastane z razgradnjo eritrocitov (rdečih krvnih teles). Bilirubin v krvi potuje v jetra, kjer se razgradi in prebavi ter izloči skozi črevesje. Ljudje z Gilbertovim sindromom imajo motnjo pri delovanju encima, ki razgrajuje bilirubin, kar se odraža z nabiranjem nekonjugiranega bilirubina v krvi. (Rainer, ni letnice)

Za Gilbertov sindrom je odgovorna specifična mutacija v genu UGT1A1, ki se nahaja v promotorski regiji. Sestavljata jo dodatni 2 bazi TA in povzroči, da se zaradi manjšega prepisovanja gena sintetizira manj encima (UDP-glikozil transferaze). Mutacija torej vpliva na količino encima in ne na njegovo zaporedje A. K. (OMIM, #143500)

F: TCCCTGCTACCTTTGTGGAC
R: GAGGTTCCGCCCTCTCCTACT

chr2:234668795-234668914 (2q37.1)
TCTCTGAAAGTGAAC **TCCCTGCTACCTTTGTGGAC** TGACAGCTTTTTATAGTCACGTGACACAGTCAAACATTAA
CTTGGTGTATCGATTGGTTTTTGCCA TATATATATATATATA **AGTAGGAGAGGGCGAACCTC** TGGCAGGAGCAAAGG
CGCCATGGCT

TCTCTGAAAGTGAAC **TCCCTGCTACCTTTGTGGAC** TGACAGCTTTTTATAGTCACGTGACACAGTCAAACATTAA
CTTGGTGTATCGATTGGTTTTTGCCA TATATATATATATATA **AGTAGGAGAGGGCGAACCTC** TGGCAGGAGCAA
GGCGCCATGG

ATATATATATATATAA **A (TA) 6TAA**
ATATATATATATATATAA **A (TA) 7TAA**

120 bp = 6 TA/6 TA homozigot
120 in 122 bp = 6TA/7TA heterozigot
122 bp = 7 TA/7 TA homozigot

Gen UGT1A1

Začetna oligonukleotida (F in R, označena z zeleno barvo) pomnožita 120 bp dolg fragment na kromosomu 2q37.1, ki vsebuje 6TA ponovitev (označene z modro barvo). V primeru insercije 1 TA dinukleotida je dolžina DNA fragmenta 122bp. Možne so 3 kombinacije genotipov (6TA/6TA homozigot – sindroma ni, 6TA/7TA heterozigot – sindroma ni, 7TA/7TA – sindrom prisoten). (OMIM, #191470)

3. MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo zajeli 48 zdravih prostovoljcev iz Slovenije, ki si niso bili v sorodu. V skupini je bilo 24 moških in 24 žensk.

3.2 IZOLACIJA DNK IZ BIOLOŠKEGA VZORCA

Genomska DNK je bila izolirana po lastnem protokolu iz levkocitov, ki so jim z dodajanjem reagentov razgradili celične in jedrne membrane ter ribonukleinske kisline. S precipitacijo so bile odstranjene beljakovine in z izopropanolom oborjena genomska DNK. Prečiščena DNK je shranjena v raztopini TE (Tris-EDTA pufer 10:1) pri temperaturi 4 °C. Shranjena DNK bo dostopna do 10 let.

3.3 POMNOŽEVANJE SPECIFIČNIH ODSEKOV DNK V NAPRAVI PCR

Izolirano DNK smo uporabili za pomnoževanje določenega delca DNK z reakcijo PCR. Zato smo uporabili komercialni kit (QIAGEN Multiplex PCR Kit). Verižna reakcija s polimerazo (PCR – polymerase chain reaction) je preprost, hiter in prilagodljiv postopek, pri katerem pomnožujemo tarčni odsek molekule DNK.

Za reakcijo PCR smo najprej pripravili PCR mix. Ta je vseboval ustrezni pufer, začetne oligonukleotide, specifične za dva alela gena UGTA1 (6TA in 7TA), deoksiribonukleotide (gradnike DNK) in kofaktor encima MgCl₂. V posebno mikrocentrifugirko smo odpipetirali: 2.5 µl QIAGEN Multiplex PCR mix-a, 0.5 izolirane DNK, 1 µl mešanice začetnih oligonukleotidov in 1 µl sterilne bidestilirane vode.

Reakcijsko mešanico smo centrifugirali nekaj sekund, tako da so se zbrale vse sestavine reakcije na dnu mikrocentrifugirke. Mikrocentrifugirke smo vstavili v PCR aparaturo, ki je sposobna zelo hitro spreminjati temperaturo in doseženo temperaturo zelo natančno vzdrževati.



Slika 1: PCR aparat

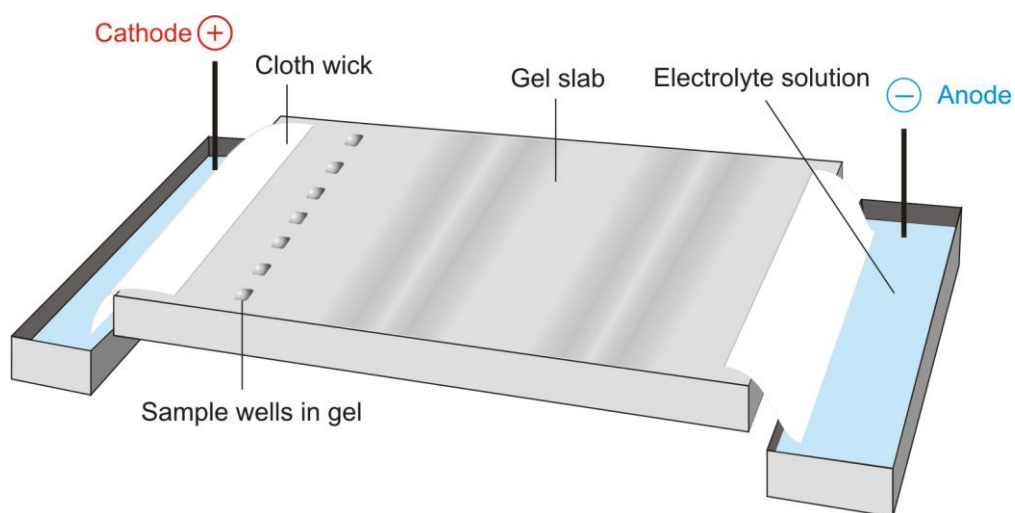
PCR aparat (slika 1) je spreminjal temperaturo reakcijske mešanice v seriji ponavljajočih se ciklusov. V reakciji PCR so se ponavljali trije osnovni koraki:

- V prvem delu je prišlo do ločevanja vodikovih vezi med komplementarnimi bazami molekule DNK. Pri temperaturi 92°C se je dvoverižna DNK ločila (denaturira) na dve enoverižni molekuli. Za vezavo začetnih oligonukleotidov na matrico, ki jo želimo pomnoževati, je nujno, da je DNK v enoverižni obliki.
- Ko se je temperatura znižala na 60°C , je prišlo do prileganja začetnih oligonukleotidov na matrico. Za vsak alel gena UGTA1 smo uporabili po dva različna začetna oligonukleotida, ki sta omejevala tarčno molekulo DNK, ki smo jo želeli pomnožiti. En začetni oligonukleotid je bil komplementaren z nukleotidnimi zaporedji na začetku, drugi pa komplementaren z nukleotidnimi zaporedji nasprotne verige na koncu tarčnega delca molekule DNK.
- Za optimalno delovanje termostabilne DNK polimeraze Taq se je temperatura v tretjem koraku dvignila na 72°C . Prišlo je do podaljševanja začetnih oligonukleotidov. Encim Taq polimeraza je na začetne oligonukleotide dodajala nukleotide in tako polimerizirala novo verigo DNK.

Celoten proces se je ponovil 25x. Pri vsaki ponovitvi se je število kopij pomnoževanega odseka podvojilo in posledično eksponentno naraščalo. Iz ene kopije DNK smo dobili 2^{30} kopij želenega DNK odseka.

3.4 LOČEVANJE POMNOŽENIH PCR PRODUKTOV Z AGAROZNO ELEKTROFOREZO

Pomnožene PCR produkte smo ločevali z elektroforezo na 3 % agaroznem gelu. Ker delci DNK niso vidni, jih je bilo potrebno označiti. V vzorce smo dodali UV barvilo Sybr green, ki se je vgradilo v molekulo DNK.



Slika 2: Agarozna elektroforeza

Agarozni gel smo pripravili tako, da smo v čašo dali 0,75 g agaroze v prahu in 25 ml pufru TBE (tris-borat-EDTA). Mešanico smo segrevali do vretja. Ko se je agarozna popolnoma raztopila, smo raztopino pod tekočo hladno vodo ohladili na približno 60°C. V pladenj za pripravo agaroznega gela smo vstavili glavnike, ki so poskrbeli za vdolbine v gelu. Raztopino smo vlili v pripravljen model. Ko se je gel strdil, smo glavnike odstranili. Agarozni gel smo prestavili v posodo za elektroforezo. Pomnožene produkte reakcije PCR smo vnesli v žepke agaroznega gela .

Agarozna gelska elektroforeza je metoda ločevanja fragmentov DNK po velikosti. Molekule DNK so zaradi svojega negativnega naboja v električnem polju potovale proti pozitivnem potencialu, anodi. Zamrežen agarozni gel je omogočal, da so se manjše molekule lažje prebijale skozi pore gela in tako potovale hitreje kot večje molekule DNK. Manjši in zato hitrejši fragmenti so pripotovali bližje anodi kot večji fragmenti v danem časovnem intervalu. Elektroforeza je potekala pri sobni temperaturi 10 minut pod napetostjo 500 mA in 100 V.

3.5 NADALJNE LOČEVANJE POMNOŽENIH PCR PRODUKTOV Z KAPILARNO ELEKTROFOREZO

Kapilarna elektroforeza (CE) je visoko učinkovita tehnika za ločevanje ionskih delcev v tanki (25-100 μm) kapilarni cevi, ki je napolnjena z elektrolitsko tekočino (Altria, 1996).

Glavni sestavni deli naprave za kapilarno elektroforezo so visoko napetostni vir napajanja, kapilara, ki potuje mimo optičnega centra detekcijskega sistema, ki je povezan z napravo za pridobivanje podatkov ter sistemom za avtomatski vnos vzorcev. Naprava za kapilarno elektroforezo je najpogosteje nadzorovana z osebnim računalnikom (Altria, 1996).

Kapilara se najprej napolni z ustrezno pufersko raztopino. Nato je raztopina vzorca, običajno nekje med 1-20 nL, dovedena na konec kapilare, ki ni na strani detektorja (ponavadi anoda). Konci kapilare se nato potopijo v zbiralnik, ki vsebuje visoko napete elektrode in ustrezno pufersko raztopino. Elektrode so iz inertnih materialov, kot je platina. Napetost (npr. 10-30kV) skozi kapilare povzroči elektroforetsko in elektroendosmotsko gibanje, ki je posledica ionskih vrst v vzorcih, ki se gibajo vzdolž kapilare in gredo mimo detektorja. Odgovor detektorja, ki meri fluorescenco, nastaja v času in se imenuje elektroferogram (Altria, 1996).

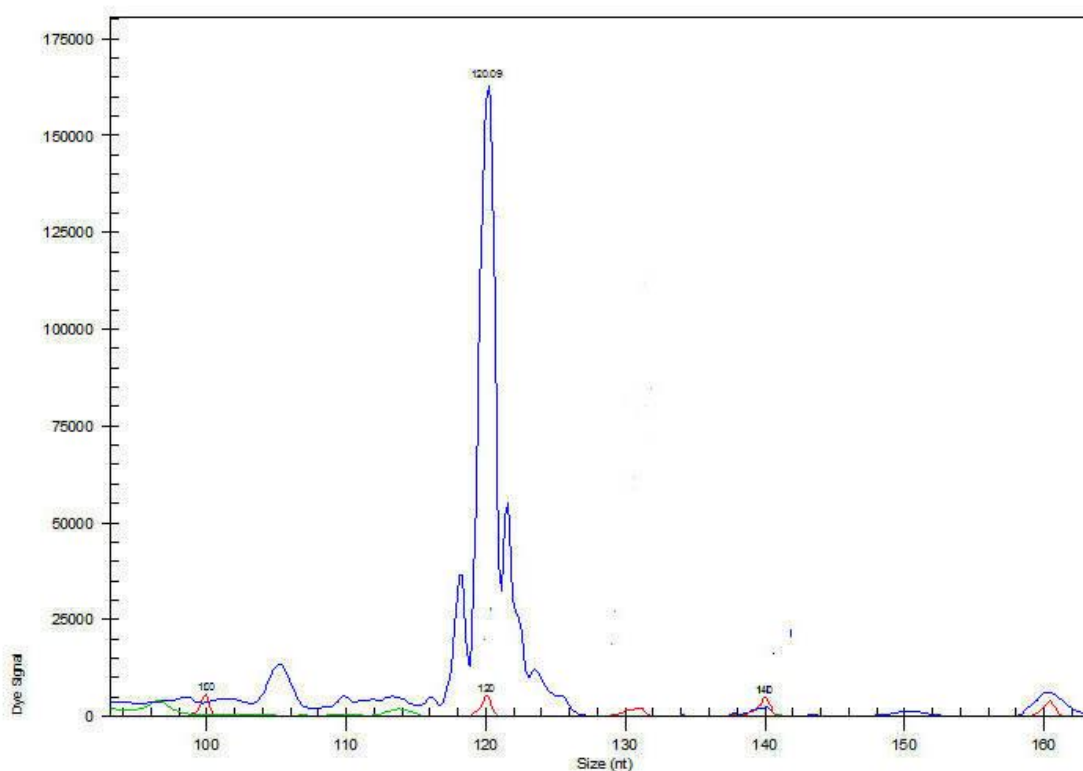
Kapilarno elektroforezo smo izvedli s pomočjo aparata Beckman Coulter CEQ 8000 (slika 4) v skladu z navodili proizvajalca.



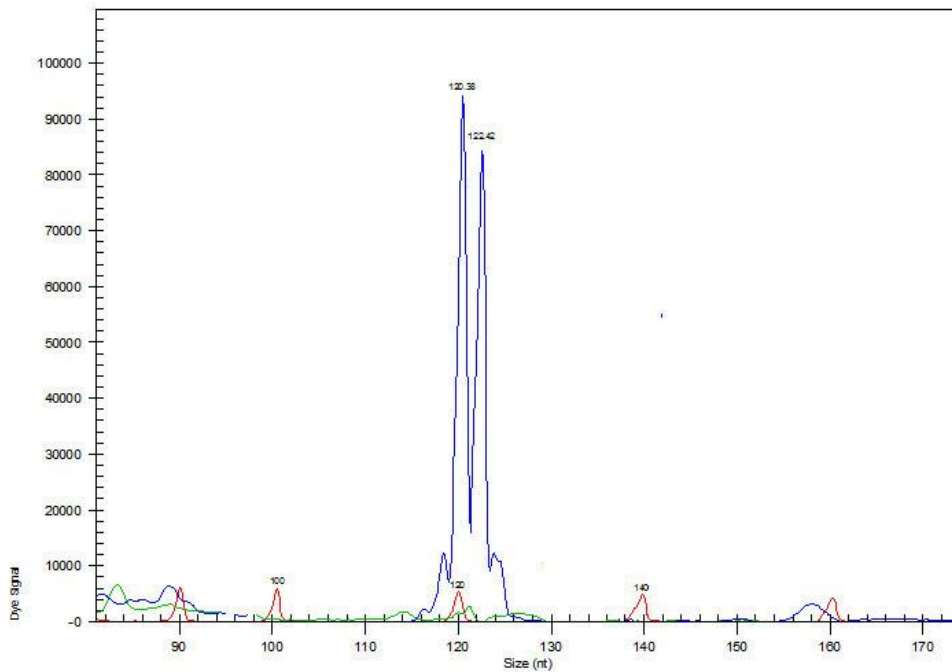
Slika 4: Naprava za izvajanje kapilarne elektroforeze

4. REZULTATI

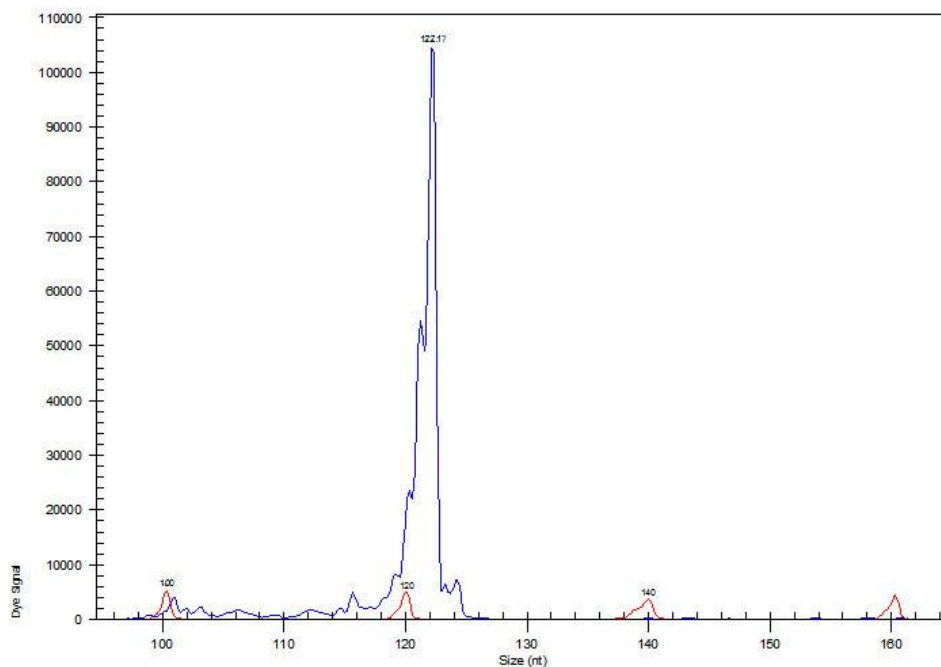
Genotipe v genu UGT1A1 smo odčitali iz rezultatov kapilarne elektroforeze (slike 4, 5 in 6), kjer je za genotip 6TA/6TA značilna prisotnost signala velikosti 120bp, za genotip 6TA/7TA sta značilna 2 signala velikosti 120 in 122 bp, in za genotip 7TA/7TA je značilen signal velikosti 122 bp.



Slika 5: Homozigot (6TA/6TA) – 120bp



Slika 6: Heterozigot (6TA/7TA)- 120/122bp



Slika 7: Homozigot (7TA/7TA) – 122bp

Heterozigot 6TA/7TA (120 in Analizirali smo genotipe v skupini 48 preiskovancev ter jih izrazili kot delež preiskovancev z določenim genotipom ()). 5 oseb je homozigotov za alel 7TA (10.4%), kar pomeni da imajo Gilbertov sindrom. 25 preiskovancev je heterozigotnih za alel 6TA/ 7TA (52.1%) , ki so zgolj zdravi nosilci mutacije za Gilbertov sindrom. Ostalih 18 preiskovancev je homozigotov za alel 6TA (37.5%) in je brez mutacije za sindrom Gilbert.

Genotip	Število (%)
6 TA / 6 TA	18 (37.5)
6 TA / 7 TA	25 (52.1)
7 TA / 7 TA	5 (10.4)

Tabela 2: Število genotipov med preiskovanci

5. SKLEP

Ugotovili smo, da je delež oseb, ki so nosilci dveh mutacija 7TA/7TA v vzorcu 48 ljudi iz splošne slovenske populacije 10%. Dobljeni rezultati so zelo podobni rezultatom analize splošnih populacij v Italiji in Nemčiji (tabela 3). Hkrati se rezultati ujemajo z objavljeno frekvenco sindroma Gilbert v splošni slovenski populaciji (PubMed, 7565971). Rezultat raziskovalne naloge kaže, da je s pomočjo PCR in kapilarne elektroforeze možno zanesljivo določati mutacijo 6TA/7TA v genu UGT1A1 in s tem diagnosticirati sindrom Gilbert.

	Nemci	Italijani	Slovenci*	Slovenci**
6TA/6TA	50.4%	43.9%	38.1%	37.5%
6TA/7TA	41.2%	39.8%	47.9%	52.1%
7TA/7TA	8.4%	16.3%	13.6%	10.4%

*raziskava iz leta 2007

**naša raziskava

Tabela 3: Frekvenca mutacija v različnih narodih

VIRI

<http://www.simptomi.rs/index.php/bolesti/10-endokrinologija-bolesti-zlezda-sa-unutrasnjim-lucenjem/188-zutica-ikterus-nasledna-zuta-prebojenost-koze-uvecanje-jetre-hepatomegalija-slezine-splenomegalija-gilbert-gilbertov-zilber-zilberov-simptomi-medicina-zdravlje-lekar-trudnoca-bolesti-ishrana-dijeta-dijagnoza-uzrok-posledica-lecenje-terapija-beograd-srbija>

<http://www.viva.si/Bolezni/Presnovne-bolezni-Endokrinologija/4262/Gilbertov-sindrom>

http://www.bambino.si/gilbertov_sindrom

<http://www.stetoskop.info/Gilbertov-sindrom-977-s2-sickness.htm>

<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/gilberts-syndrome/basics/definition/con-20024904>

<http://ghr.nlm.nih.gov/condition/gilbert-syndrome>

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/UGT1A1>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20948/>

<http://www.clinchem.org/content/45/6/897.long>

ZAHVALA

Raziskovalno delo je potekalo v Laboratoriju za medicinsko genetiko UKC, Maribor.

Iskreno se zahvaljujem svojim mentorjema za nasvete in pomoč pri pisanju naloge.

Hvala vsem ostalim zaposlenim za pomoč in nasvete.