

Usporedba metoda analize krivulje taljenja visoke rezolucije (HRM) i krivulje taljenja pomoću FRET hibridizacijskih proba za detekciju insercije TA u promotoru gena UGT1A1

Jirouš, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:584406>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Maja Jirouš

**USPOREDBA METODA ANALIZE
KRIVULJE TALJENJA VISOKE
REZOLUCIJE (HRM) I KRIVULJE
TALJENJA POMOĆU FRET
HIBRIDIZACIJSKIH PROBA ZA
DETEKCIJU INSERCIJE TA U
PROMOTORU GENA *UGT1A1***

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Maja Jirouš

**USPOREDBA METODA ANALIZE
KRIVULJE TALJENJA VISOKE
REZOLUCIJE (HRM) I KRIVULJE
TALJENJA POMOĆU FRET
HIBRIDIZACIJSKIH PROBA ZA
DETEKCIJU INSERCIJE TA U
PROMOTORU GENA *UGT1A1***

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva Odjela laboratorijske dijagnostike i kliničke transfuzijske medicine Kliničkog zavod za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc.dr.sc Saška Marczy

Rad ima 34 lista, 4 tablice i 7 slika.

Zahvala

Zahvaljujem mentorici, doc.dr.sc. Saški Marczy na velikodušnoj pomoći, savjetima i usmjeravanju tijekom izrade završnog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebno roditeljima, na pruženoj podršci, razumijevanju i omogućenom školovanju.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA	I
1. UVOD	1
1.1. Bilirubin-UDP-glukuronozil transferaza	1
1.2. Gen <i>UGT1A1</i>	2
1.3. Značaj određivanja insercije TA u promotoru gena <i>UGT1A1</i>	3
1.4. Metodologija lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (Real-Time PCR) ...	4
1.4.1. Metoda analize krivulje taljenja visoke rezolucije (HRM)	6
1.4.2. Metoda analize krivulje taljenja pomoću FRET hibridizacijskih proba	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	9
3. ISPITANICI I METODE	10
3.1. Ustroj istraživanja	10
3.2. Ispitanici	10
3.3. Metode	10
3.3.1. Izolacija DNA	11
3.3.2. Mjerenje koncentracije DNA	12
3.3.3. HRM	12
3.3.4. FRET	14
3.3.5. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu	17
3.3.6. Statističke metode	17
4. REZULTATI	18
4.1. HRM	18
4.2. FRET	22
4.3. Usporedbe karakteristika Real-time PCR metoda HRM i FRET	25
5. RASPRAVA	27
6. ZAKLJUČAK	29
7. SAŽETAK	30
8. SUMMARY	31
9. LITERATURA	32
10. ŽIVOTOPIS	34

POPIS KRATICA

Ct	eng. <i>threshold cycle</i>
Cp	eng. <i>crossing point</i>
CNI	Crigler-Najjarov sindrom, tip I
CNII	Crigler-Najjarov sindrom, tip II
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dTTP	deoksitimidin trifosfat
dCTP	deoksicitidin trifosfat
dGTP	deoksigvanozin trifosfat
dsDNA	dvolančana deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>double-stranded DNA</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (eng. <i>ethylenediaminetetraaceticacid</i>)
FRET	prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (eng. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
HRM	analiza krivulje taljenja visoke rezolucije (eng. <i>high resolution melting</i>)
KBC	Klinički bolnički centar
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (eng. <i>ribonucleic acid</i>)
TA	timin-adenin
T _m	temperatura taljenja (eng. <i>melting temperature</i>)
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (eng. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
UDP	uridin difosfat
UGT	uridin difosfat glukuronozil transferaza (eng. <i>uridine diphosphate-glucuronosyl transferase</i>)

1. UVOD

1.1. Bilirubin-UDP-glukuronozil transferaza

UDP-glukuronozil transferaze (UGT) predstavljaju porodicu enzima membrane endoplazmatskog retikuluma koji kataliziraju proces glukuronidacije, reakciju faze II metabolizma lijekova u jetri. Glukuronidacija je proces tijekom kojeg se odvija prijenos kisele glukuronske skupine s uridin difosfoglukuronske kiseline na funkcionalne skupine specifičnih supstrata, čime se povećava polarnost ciljane lipofilne molekule te se omogućuje njeno izlučivanje iz organizma putem žuči ili urina. Jetra je glavni organ u kojem se odvija proces glukuronidacije, a osim u jetri, UGT-i su lokalizirani i u crijevima, bubrezima, plućima te drugim tkivima i organima. Osim što sudjeluje u detoksifikaciji lijekova, glukuronidacijom se smanjuje i štetan utjecaj okolišnih otrova, karcinogena, toksina iz prehrane, te se postiže održavanje homeostaze endogenih molekula kao što su bilirubin, masne kiseline, steroidni hormoni i žučne kiseline (1).

UGT-i su građeni od dviju podjednako velikih N- i C- terminalnih domena. C-terminalna domena zajednička je svim UGT-ima; sadrži transmembransku uzvojniju, koja služi za usidranje enzima u membranu, te vezno mjesto za UDP-glukuronsku kiselinu. N-terminalna domena sadrži vezno mjesto za supstrate te se zbog toga razlikuje među UGT-ima (2). Iako se N-terminalne domene razlikuju, često je moguće da jedna molekula bude supstrat više različitih UGT-a. Za razliku od toga, glukuronidaciju bilirubina katalizira jedino bilirubin-UDP-glukuronozil transferaza (bilirubin-UGT) (3,4). Bilirubin je tvar žućkastog pigmenta koja nastaje razgradnjom hema, a ako se u organizmu nalazi u visokim koncentracijama ima toksičan učinak. Pomoću bilirubin-UDP-glukuronozil transferaze bilirubin prelazi iz slobodnog, nekonjugiranog oblika u konjugirani, polarniji oblik, koji se lako izlučuje iz organizma. Ukoliko se bilirubin ne konjugira te se nakuplja u krvi (hiperbilirubinemija) dolazi do žutice, tj. ikterusa, stanja koje karakterizira žućkasto obojenje kože i bjeloočnica. Reakcija glukuronidacije bilirubina stoga je vrlo važna jer visoke koncentracije nekonjugiranog bilirubina mogu imati štetan utjecaj na mozak. Nekoliko mutacija u genu za bilirubin-UGT uzrokuju nastanak nefunkcionalnog enzima, zbog čega se kod pacijenata javljaju povišene razine bilirubina u krvi. Među stanjima koja se povezuju s mutacijama u genu za bilirubin-UGT važno je spomenuti Crigler-Najjarov sindrom, tip I i II te Gilbertov sindrom. Crigler-Najjarov sindrom rijedak je autosomno recesivni poremećaj koji može biti posljedica najmanje 85 različitih mutacija. Sindrom može imati letalan ishod ako dođe do oštećenja mozga zbog nakupljanja nekonjugiranog bilirubina u mozgu, što se naziva

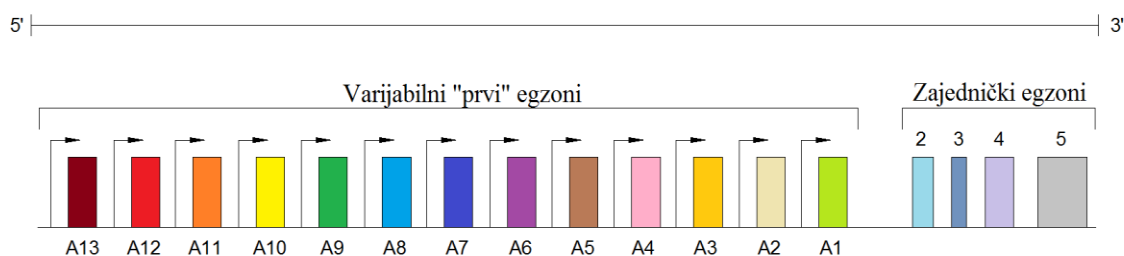
kernikterus. Klinička slika Crigler-Najjar sindroma I (CNI) teža je od Crigler-Najjar sindroma II (CNII) jer je kod CNI funkcija enzima izgubljena u potpunosti, dok je kod CNII očuvano do 20% enzimatske aktivnosti (4,5). Gilbertov sindrom je blaga nasljedna hiperbilirubinemija s 6-12%-tnom pojavnosću u populaciji, a nastaje kao posljedica smanjene konjugacije bilirubina u jetri (1). Insercija TA u promotoru gena *UGT1A1* mutacija je koja dovodi do Gilbertovog sindroma, ukoliko je naslijeđena na oba alela. Kod pacijenata s Gilbertovim sindromom očuvano je oko 30% aktivnosti bilirubin-UDP-glukuronozil transferaze, te se stoga javljaju povremene faze blage hiperbilirubinemije koje rijetko dovode do žutice. Povišene razine bilirubina prisutne su kada je organizam u stanju stresa koji može biti izazvan dehidracijom, teškom fizičkom aktivnošću, menstruacijom, dužim gladovanjem ili bolešću (5,6).

1.2. Gen *UGT1A1*

UGT1A1 gen kodira istoimeni UGT1A1 enzim, tj. bilirubin-UDP-glukuronozil transferazu. *UGT1A1* dio je superobitelji *UGT* gena koja sadrži *UGT1* i *UGT2* obitelji te *UGT1A*, *UGT2A* i *UGT2B* podobitelji. Lokus podobitelji *UGT1A* nalazi se na dužem kraku 2. kromosoma (2q37), obuhvaća 210 kb te sadržava kodirajuće sekvence za 9 različitih UGT1A enzima; UGT1A1, UGT1A3–UGT1A10 (Slika 1). Lokus je građen od ukupno 17 egzona, od kojih 4 egzona (egzoni 2, 3, 4, 5) sudjeluju u izgradnji svakog UGT1A enzima. Od preostalih 13 egzona, njih 9 sudjeluju u izgradnji funkcionalnog proteina, dok ostalih 4 egzona predstavljaju pseudogene. Da bi došlo do sinteze proteina, za svaki UGT potreban je jedan od 9 „prvih“ egzona te 4 nizvodna egzona (egzoni 2, 3, 4 i 5) koji su zajednički svim UGT1A enzimima. „Prvi“ egzoni kodiraju N-terminalnu domenu enzima, dok zajednički egzoni 2-5 kodiraju C-terminalnu domenu (2).

Poznato je nekoliko polimorfizama gena *UGT1A1*, među kojima se ističu polimorfizmi u promotorskoj regiji koji utječu na efikasnost transkripcije. *UGT1A1*1* je divlji tip alela (eng. *wild-type*), sadrži 6 TA (timin-adenin) ponavljanja u TATA box-u promotorske regije (slijed A(TA)₆TAA) te je povezan s normalnom aktivnošću enzima. *UGT1A1*28*, najčešća polimorfna varijanta sa 7 TA ponavljanja (A(TA)₇TAA), nastaje insercijom TA u TATA box-u promotorske regije gena *UGT1A1*. Zbog insercije TA u promotorskoj regiji gena *UGT1A1* smanjena je brzina inicijacije transkripcije gena, što dovodi do slabije aktivnosti enzima i smanjenja glukuronidacije na 30% u odnosu na divlji tip alela. Ukoliko je varijanta

*UGT1A1**28 naslijeđena na oba alela (*UGT1A1* 7/7 genotip), nastaje Gilbertov sindrom, koji se definira kao blaga nasljedna hiperbilirubinemija. Rjeđe varijante gena prisutne u osoba afričkog podrijetla su *UGT1A1**37 i *UGT1A1**36. *UGT1A1**36 sadrži 8 TA ponavljanja, zbog čega je inicijacija transkripcije još manje učinkovita, a aktivnost enzima smanjena za čak 50%, za razliku od *UGT1A1**37 varijante koja sadrži 5 TA ponavljanja te ima povećanu promotorsku aktivnost. U osoba azijskog podrijetla mutacije u promotorskoj regiji vrlo su rijetke. Najčešća mutacija u azijskoj populaciji je *missense* mutacija u jednoj kopiji *UGT1A1* gena koja rezultira zamjenom glicina argininom na 71. položaju u enzimu bilirubin-UGT (1).



Slika 1. Struktura gena *UGT1A1*.

1.3. Značaj određivanja insercije TA u promotoru gena *UGT1A1*

Glukuronidacija, kao jedna od glavnih reakcija faze II metabolizma lijekova u jetri, predstavlja važan korak u biotransformaciji lijekova (1). Brojni lijekovi metaboliziraju se putem glukuronidacije enzimom bilirubin-UGT. Zbog reducirane aktivnosti enzima, koja se javlja kao posljedica insercije TA u promotoru gena *UGT1A1*, metabolizam lijekova je usporen te je moguća pojava toksičnog učinka lijeka na organizam. Neki od lijekova koji se metaboliziraju bilirubin-UGT-om su: paracetamol, tolbutamid i lorazepam (1). Veliku pozornost privukao je protutumorski lijek irinotekan koji kod pacijenata s Gilbertovim sindromom izaziva teške nuspojave.

Irinotekan se koristi u liječenju metastatskog kolorektalnog karcinoma, često u kombinaciji s ostalim lijekovima, a nešto rjeđe koristi se i u liječenju karcinoma pluća, želudca i ginekoloških tumora (7). Metabolizam i inaktivacija irinotekana odvijaju se putem bilirubin-UDP-glukuronozil transferaze, a s obzirom da je kod homozigota za gen *UGT1A1**28 aktivnost enzima smanjena, povećan je rizik od toksičnosti terapije

irinotekanom. Naime, nakon intravenozne injekcije, irinotekan se metabolizira u aktivni oblik SN-38, koji ima 100-1000 puta potentnije djelovanje. SN-38 veže se za kompleks DNA i topoisomerase, čime nastaje tzv. trojni kompleks (SN-38-topoisomeraza-DNA) koji zaustavlja kretanje „replikacijskih rašlji“. Zbog sprječavanja replikacije DNA i interakcije između replikacijskih enzima i trojnog kompleksa dolazi do dvolančanog loma unutar DNA, a posljedično tome do apoptoze stanice. SN-38 inaktivira se glukuronidacijom u jetri, postaje topljiv u vodi te se najvećim dijelom izlučuje putem žuči, a oko 30% izlučuje se urinom. Kod bolesnika s Gilbertovim sindromom irinotekan uzrokuje teške proljeve i neutropenije, zbog čega samo liječenje irinotekanom može postati razlog duljoj hospitalizaciji. Upravo zbog toga vrlo je važno otkriti pacijente koji imaju TA inserciju u promotoru gena *UGT1A1* kako bi se lijek pravilno dozirao i izbjegao toksičan učinak lijeka. Prema preporuci FDA (Food and Drug Administration) i KNMP (Dutch Pharmacogenomics Working Group) doze irinotekana veće od 250 mg/m² potrebno je smanjiti za 30% kod homozigota za gen *UGT1A1**28, dok prilagođavanje doze za heterozigote nije potrebno jer bi smanjivanje doze moglo uzrokovati neuspjeh u liječenju (3).

1.4. Metodologija lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (Real-Time PCR)

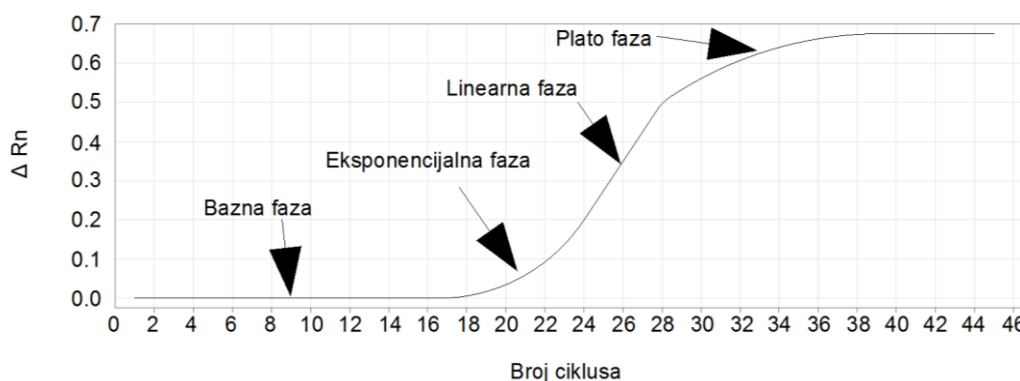
Lančana reakcija polimerazom, tj. PCR (eng. *polymerase chain reaction*) metoda je kojom se *in vitro* umnaža određeni fragment DNA te pritom nastaje velik broj kopija tog fragmenta DNA. PCR je otkrio i opisao Kary Mullis 1983. godine te je za to otkriće 1993. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju. Otkriće PCR-a imalo je vrlo značajnu ulogu u razvitku molekularne dijagnostike te se danas rad bez PCR-a u laboratoriju za molekularnu dijagnostiku gotovo ne može ni zamisliti. Razvitkom PCR-a tijekom godina nastale su mnoge napredne inačice, među kojima je vrlo važna Real-Time PCR, tj. lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu. Real-Time PCR temelji se na klasičnoj PCR reakciji, a njegova prednost je u kvantifikaciji PCR produkata za vrijeme procesa umnažanja. S obzirom da Real-Time PCR ne zahtijeva kasnije metode detekcije i kvantifikacije, kao što je gel elektroforeza, brža je i preciznija metoda.

Za svaku PCR reakciju potreban je uzorak DNA, sva 4 deoksinukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), termostabilna Taq polimeraza, dvije početnice (eng. primer), ioni magnezija (MgCl₂) te reakcijski pufer. Real-Time PCR zahtijeva i fluorescentne boje ili fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe jer se kvantifikacija produkata temelji na

kontinuiranom mjerenju njihove fluorescencije. Za razliku od klasične PCR metode koja se odvija u tzv. PCR termoblokovima, Real-Time PCR zahtijeva specijalizirane Real-Time uređaje koji, osim termobloka u kojem se odvija reakcija, imaju i sustav optičkih detektora koji mjere fluorescenciju te računalni program za interpretaciju rezultata. Metoda započinje zagrijavanjem na temperaturu od 94°C, pri čemu dolazi do denaturacije DNA. Zatim se temperatura snižava na 50-60°C kako bi se početnice vezale za komplementarni slijed DNA na 5' i 3' krajevima fragmenta od interesa. Formulom $T_m = 4 \times (nG + nC) + 2 \times (nA + nT)$ (n- broj nukleotida početnice) određuje se temperatura ispod koje dolazi do komplementarnog vezanja početnica na kalup DNA. U PCR reakciji za sintezu DNA najčešće se koristi termostabilna Taq polimeraza dobivena iz mikroorganizma *Thermus aquaticus*. Nakon vezanja početnica temperatura se podiže na 72°C jer je to temperatura pri kojoj Taq polimeraza ima optimalnu aktivnost. Nakon umnažanja željenog odsječka DNA opet dolazi do denaturacije, tj. ciklus se ponavlja, s time da nakon svakog ciklusa PCR smjesa sadržava 2^n kopija DNA, pri čemu n označava broj ciklusa. Ukoliko se u Real-Time PCR reakciji koristi fluorescentna boja ona će se vezati za DNA kada se nalazi u dvolančanom obliku, dok će se fluorescentno obilježene probe vezati za komplementarni slijed jednolančane DNA. Emitirana svjetlost fluorescentnih molekula mjeri se tijekom cijele reakcije, s time da povećanje fluorescencije odgovara povećanju broja umnoženih produkata. Prosječna PCR reakcija odvija se u 30-40 ciklusa, odnosno sve do postizanja tzv. *plato faze* kada PCR reakcija više nije efikasna. Četiri su faze PCR reakcije: osnovna (bazna), eksponencijalna, linearna i plato (Slika 2). U prvoj, baznoj fazi uočava se samo pozadinski signal zbog nedovoljnog broja produkata. Eksponencijalna faza koja slijedi prva je koja jasno prikazuje umnožavanje odsječaka DNA. Redni broj ciklusa tijekom kojeg započinje vizualizacija amplifikacije produkata, tj. ciklus kojim započinje eksponencijalna faza označava se kao Ct (eng. *threshold cycle*) ili Cp (eng. *crossing point*) vrijednost. Amplifikacija se u eksponencijalnoj fazi odvija najvećom brzinom te u svakom ciklusu dolazi do udvostručavanja produkata. Kako se reagensi troše, reakcija usporava, ne dolazi do udvostručavanja produkata u svakom ciklusu te je reakcija u linearnoj fazi. Slijedi plato faza, koje je konačna, jer su reagensi potrošeni i reakcija više ne napreduje (8).

Osim što omogućuje preciznu kvantifikaciju broja kopija DNA/RNA u uzorku, Real-Time-PCR koristi se za kvantifikaciju ekspresije gena, određivanje varijacija u broju kopija, SNP (eng. *single nucleotide polymorphism*) genotipizaciju, detekciju patogena te ima brojne druge primjene. U Real-Time PCR metodi koriste se različite oligonukleotidne probe i principi na temelju kojih se stvara fluorescentni signal. Najčešće korištene su probe koje se

temelje na FRET reakciji, TaqMan, Molecular beacon te Scorpion probe. Analiza svojstava PCR produkata temelji se na krivulji taljenja koja se dobiva obradom fluorescentnog signala molekula kojima su probe obilježene. Za kvantifikaciju produkata i analizu njihovih svojstava koriste se i interkalirajuće fluorescentne boje koje izrazito fluoresciraju kada su vezane za dvostruku uzvojnica DNA te se one primjenjuju u HRM metodi, tj. analizi krivulje taljenja visoke rezolucije.



Slika 2. Krivulja PCR reakcije

1.4.1. Metoda analize krivulje taljenja visoke rezolucije (HRM)

Analiza krivulje taljenja visoke rezolucije (HRM, eng. *high resolution melting*) je metoda koja se zbog svoje preciznosti, u odnosu na klasične metode analize krivulje taljenja, sve više koristi u genotipizaciji. HRM omogućuje preciznu detekciju promjene slijeda nukleotida unutar određenog fragmenta DNA, bez korištenja obilježenih proba.

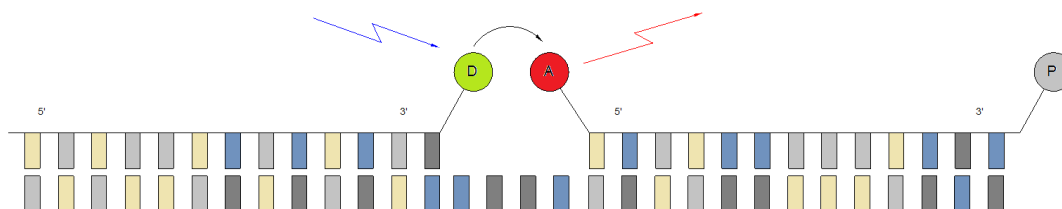
Metoda započinje umnažanjem određenog fragmenta DNA pomoću PCR reakcije, u prisutnosti fluorescentne boje koja ima svojstvo vezanja na dvolančanu DNA. SYBR[®] Green, LCGreen (Roche LightCycler[®]), SYTO[®] i EvaGreen[®] neke su od boja koje se primjenjuju u HRM metodi, a sve se temelje na svojstvu da se specifično vežu za dvostruku DNA uzvojnica te tako vezane jako fluoresciraju. Nakon PCR-a produkt se postepeno tali povišenjem temperature, a emitirana fluorescencija, odnosno pad fluorescencije, mjeri se kako bi u konačnici nastala krivulja karakteristična za amplikon. Na početku analize, pri nižim temperaturama, fluorescencija je visoka jer se DNA nalazi u obliku dvostruke uzvojnice na koju je čvrsto vezana fluorescentna boja. Povišenjem temperature dolazi do denaturacije DNA te disocijacije boje, koja u nevezanom stanju vrlo slabo fluorescira, zbog čega se fluorescencija smanjuje za čak 1000 puta. Pad fluorescencije na početku je blag, sve do denaturacije dsDNA, tj. do postizanja temperature taljenja (T_m), kada se očituje nagli pad

fluorescencije. Temperatura taljenja je točka pri kojoj je 50% DNA dvostruko zavijeno, a preostalih 50% nalazi se u obliku jednostruke DNA. Na temelju razlika u T_m i obliku krivulje taljenja, moguće je razlikovati mutirani od divljeg (*wild-type*) tipa alela te homozigote od heterozigota. Prvotno nastala krivulja taljenja prikazuje odnos fluorescencije i temperature, tj. pad fluorescencije uslijed povišenja temperature. Da bi se temperatura taljenja preciznije prikazala te lakše uočile razlike između pojedinih genotipova, računalni program vrši normalizaciju početne krivulje, promjenu po temperaturi (eng. *temperature shift*) i izračunava negativnu derivaciju fluorescencije po temperaturi te u konačnici nastaje specifična krivulja koja se koristi za analizu (9-12) (Slika 3).

1.4.2. Metoda analize krivulje taljenja pomoću FRET hibridizacijskih proba

U Real-Time PCR metodologiji često se za detekciju mutacija i polimorfizama koriste FRET (eng. *fluorescence resonance energy transfer*) hibridizacijske probe (Slika 4). FRET predstavlja kvantni fenomen pri kojem između dviju fluorescentnih molekula dolazi do prijenosa energije bez emisije fotona. U FRET reakciji prva fluorescentna molekula (donor) biva pobuđena svjetlošću određene valne duljine, te tako pobuđena fluorescira, odnosno emitira svjetlost veće valne duljine, koja pobuđuje drugu fluorescentnu molekulu (akceptor). Da bi FRET reakcija bila moguća, dvije fluorescentne molekule moraju biti u neposrednoj blizini, na udaljenosti od 1 do 10 nm. Također, vrlo je važan kriterij da se emisijski spektar donora preklapa s apsorpcijskim spektrom akceptora (13, 14). Za detekciju promjena slijeda baza unutar DNA koriste se dvije oligonukleotidne probe obilježene fluorescentnim molekulama. Svaka proba komplementarna je određenom slijedu DNA, a nakon komplementarnog vezanja nalaze se u neposrednoj blizini, u razmaku od 1-5 nukleotida, kako bi se mogao odviti FRET. Jedna proba obilježena je na 3' kraju fluoresceinom (*anchor* proba), dok je druga proba na 5' kraju obilježena akceptorskom bojom (*sensor* proba). Fluorescein na *anchor* probi apsorbira svjetlost vanjskog izvora te svjetlošću koju emitira pobuđuje akceptorsku boju na *sensor* probi, koja pak emitira svjetlost koju detektira optički sustav Real-Time PCR uređaja. *Anchor* proba veže se za onaj slijed fragmenta na kojem se nalazi potencijalna mutacija. Proba je dizajnirana tako da se komplementarno veže s divljim tipom alela, a ukoliko se radi o mutiranom tipu alela neće se u potpunosti komplementarno vezati, tj. neće se povezati vodikovim vezama s nukleotidima koji su promijenjeni. Budući se detekcija mutacija temelji na analizi krivulje taljenja, nakon PCR reakcija umnožavanja

specifičnog odsječka DNA, Real-Time PCR uređaj vrši program taljenja (*eng. melting program*). Program se sastoji od polaganog zagrijavanja do temperature od 94°C i mjerenja fluorescencije. Ukoliko umnoženi fragment sadržava promjenu u slijedu baza (mutacija ili polimorfizam) temperatura taljenja (T_m) *sensor* probe bit će niža u odnosu na temperaturu taljenja prilikom vezanja za fragment divljeg tipa alela, odnosno uočiti će se raniji pad fluorescencije. Promjena fluorescencije u ovisnosti o temperaturi može se prikazati kao promjena negativne derivacije fluorescencije u ovisnosti o temperaturi te se u takvom prikazu pad fluorescencije pri određenoj temperaturi očituje kao vrh krivulje (*eng. peak*). Primjenom FRET proba, na temelju razlika u T_m , moguće je detektirati promjene u samo jednoj bazi, tzv. SNP (*eng. single nucleotide polymorphism*).



Slika 3. Shematski prikaz FRET hibridizacijskih proba

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja testirati i usporediti specifičnost, pouzdanost, efikasnost, robusnost, utrošak vremena te financijske troškove za metode analize krivulje taljenja visoke rezolucije (HRM) i krivulje taljenja pomoću FRET hibridizacijskih proba za detekciju insercije TA u promotoru gena *UGT1A1*.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

Istraživanje je osmišljeno kao presječna studija (15). Provedeno je u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva Odjela laboratorijske dijagnostike i kliničke transfuzijske medicine Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu KBC-a Osijek u periodu od travnja do lipnja 2017. godine.

3.2. Ispitanici

Testirano je po 3 uzorka od svakog genotipa (TA6/6, TA6/7, TA7/7), ukupno 9 DNA uzoraka bolesnika poznatog genotipa. To su uzorci DNA izolirani iz uzoraka krvi pacijenata kojima je molekularna dijagnostika genotipizacije *UGT1A1* učinjena FRET metodom na Real-Time PCR uređaju u rutinskom dijagnostičkom programu u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva KBC-a Osijek. Uzorci krvi bolesnika bili su popraćeni liječničkom uputnicom i pri dolasku u laboratorij dobili su jedinstvenu oznaku. Pacijenti nisu sudjelovali aktivno u istraživanju. Istraživanje nije zahtijevalo ni nove kontakte prema pacijentima. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

U analizi su korišteni i referentni uzorci - uzorci DNA uspješno testirani u okviru vanjske kontrole kvalitete (Instand e.V.) tijekom 2016. godine: po 1 uzorak od svakog genotipa, ukupno 3 DNA uzorka poznatog genotipa.

3.3. Metode

U ovom radu za svaku od testiranih metoda učinjena je verifikacija oligonukleotidnih početnica te amplifikacije željenog odsječka kalupa. Nadalje, testirana je specifičnost, pouzdanost, efikasnost i robusnost dviju metoda koje se temelje na Real-Time PCR metodologiji - FRET i HRM. Osim navedenih svojstava dviju metoda uspoređen je i utrošak vremena te financijski troškovi potrebni za izvedbu testova. Pri testiranju navedenih metodoloških svojstava svaki uzorak primijenjen je u duplikatu, a testovi ponovljeni dva puta.

3.3.1. Izolacija DNA

DNA je izolirana iz uzoraka pune periferne krvi primjenom "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) seta za izolaciju DNA. Enzimskom aktivnošću proteinaze K uz pomoć pufera za razgradnju proteina denaturirani su stanični proteini te je tako omogućeno oslobađanje DNA iz stanice koja se zatim veže na staklenu mrežicu u kolektorskoj tubici.

Materijal: 200 μ l pune periferne krvi s EDTA antikoagulansom, High Pure PCR Template Preparation Kit, izopropanol, apsolutni etanol, destilirana H₂O.

Pribor: mikropipete (volumena do: 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L), nastavci (sterilni, nekoristeni), plastične tubice volumena 1,5 mL i 2,0 mL (sterilne, nekoristene), mikrocentrifuga (do 14200 o/min) s regulacijom temperature, grijač/shaker Thermo Shaker TS-100, zamrzivač (-20 °C), hladnjak (+4 °C), jednokratne zaštitne rukavice.

Postupak: Prvi postupak u izolaciji DNA je liza stanica proteinazom K uz pufer za razgradnju proteina (6 M gvanidin-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% triton X-100 (v/v), pH 4.4, 25 °C). U sterilnu mikroeprevetu s 200 μ L pune periferne krvi dodaje se 200 μ L pufera za razgradnju proteina i 40 μ L vodene otopine proteinaze K, smjesa se promiješa te slijedi inkubacija na 70°C tijekom 10 minuta. Zatim se dodaje 100 μ L izopropanola koji omogućuje bolje prijanjanje DNA na mrežicu, sve se dobro promiješa te se ukupni sadržaj prenosi u kolektor tubicu koja sadrži staklenu mrežicu za vezanje DNA. Slijedi centrifugiranje pri brzini od 8000 x g, u trajanju od 1 minute. DNA ostaje vezana na staklenu mrežicu, a ostali stanični sastojci su eluirani s kolone. Osim DNA, na mrežici ostaju vezane i "nečistoće" kao što su neki proteini i polisaharidi te stoga slijedi postupak ispiranja kako bi u konačnici na mrežici ostala čista DNA. Nakon centrifugiranja, tubica sa staklenom mrežicom prebacuje se u novu kolektor tubicu. Dodaje se 500 μ L pufera za uklanjanje inhibitora (5M gvanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (25 °C)), a zatim 500 μ L pufera za ispiranje (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25 °C)), dva puta zaredom. Nakon svakog dodavanja pufera uzorak se centrifugira (8000 x g/1 min), tubica sa staklenom mrežicom stavlja se u nove kolektorske tubice, a nakon posljednjeg centrifugiranja slijedi kratko centrifugiranje u trajanju od 10 sekundi pri brzini od 13000 x g. Dodatkom 200 μ L elucijskog pufera (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 25°C) koji je zagrijan na 70 °C i centrifugiranjem (8000 x g / 1 min) DNA je eluirana s mrežice. Izolirana DNA prenesena je u označenu mikroeprevetu u kojoj se uzorak do analize čuva na -20 °C.

3.3.2. Mjerenje koncentracije DNA

Prije same genotipizacije *UGT1A1* (TA)_n polimorfizma provedeno je spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije uzoraka DNA te provjerena njihova čistoća. Apsorbancija uzoraka mjerena je pri valnim duljinama od 230, 260 i 280 nm. Apsorbancija izmjerena pri 260 nm koristi se za određivanje koncentracije DNA, dok se mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm koristi za određivanje koncentracije proteina u uzorku. Omjer apsorbancija A_{260}/A_{280} daje podatak o čistoći DNA, tj. kontaminiranosti uzorka proteinima te, ukoliko se radi o uzorku čiste DNA, vrijednost omjera je između 1,8 i 2,0. Vrijednost omjera manja od 1,8 označuje onečišćenost uzorka proteinima. Osim proteinima, uzorak može biti kontaminiran organskim spojevima kao što su urea, EDTA, ugljikohidrati i fenolatni ioni. Povećana apsorbancija uzorka pri valnoj duljini od 230 nm ukazuje na kontaminacija navedenim spojevima.

Materijal: uzorci DNA, elucijski pufer iz seta za izolaciju DNA, destilirana H₂O

Pribor: uređaj SpectraMax QuickDrop UV-Vis Spectrophotometer, mikropipeta volumena do 10 µL, sterilni jednokratni nastavci, jednokratne zaštitne rukavice

Postupak: Na spektrofotometru se odabere opcija mjerenja koncentracije DNA. Pipetom se nanese 2 µL uzorka DNA. Nakon izvršenog mjerenja uređaj prikaže vrijednosti apsorbancija pri valnim duljinama 260 nm, 280 nm i 230 nm, koncentraciju DNA te omjer A_{260}/A_{280} . Pri prvom mjerenju je umjesto uzorka, kao slijepa proba, korišten elucijski pufer, iz seta za izolaciju DNA, u kojem je DNA uzorka otopljena. Destilirana voda korištena je za čišćenje optičke podloge spektrofotometra nakon svakog mjerenja.

Za obje korištene metode, HRM i FRET, potrebno je da koncentracije uzoraka budu ujednačene te je nakon mjerenja svakom uzorku DNA pomoću TE pufera prilagođena koncentracija.

3.3.3. HRM (High Resolution Melting)

Za genotipizaciju *UGT1A1* (TA)_n polimorfizma korištena je HRM metoda modificirana prema radu Minucci i sur (12). Analizirano je ukupno 13 uzoraka: 9 uzoraka DNA pacijenata (po 3 uzorka od svakog genotipa TA6/6, TA6/7 i TA7/7), 3 referentna uzorka (za svaki genotip po jedan) te negativna kontrola (H₂O PCR grade). Prije PCR reakcije bilo je

potrebno pripremiti reakcijsku smjesu prema uputama proizvođača (Roche Diagnostics). PCR reakcija i nakon nje izvršen „melting“ program odvijali su se u LightCycler® 480 II uređaju. U reakciji su korištene neobilježene oligonukleotidne početnice te LC 480 High Resolution Melting boja koja ima svojstvo vezanja na dvolančanu DNA. Za obradu podataka dobivenih analizom taljenja DNA korišten je program LightCycler® 480 Gene-Scanning Software Version 1.2 (Roche Diagnostics).

Urađena je optimizacija koncentracije $MgCl_2$ tako što je u PCR reakcijama korištena serija razrjeđenja $MgCl_2$ konačne koncentracije od 1,5 mM do 3,5 mM. Nadalje, urađena je optimizacija koncentracija kalupa genomske DNA konačnih koncentracija 0,4 ng/ μ L do 1,6 ng/ μ L. Optimalne konačne koncentracije $MgCl_2$ (3 mM) i kalupa DNA (1,6 ng/ μ L) korištene su u daljnjoj analizi usporedbe metoda HRM i FRET.

Pribor i oprema: PCR kabinet za sterilni rad Bioair Aura (Euroclone), LightCycler 480 II Real-Time PCR uređaj (Roche Diagnostics), Centrifuga Multifuge 3 SR (Heraeus), short-spin centrifuga, mikrotitarske ploče za LightCycler 480 (bijele, 96 jažica, Roche), mikropipete volumena do 10 μ L, 100 μ L i 200 μ L, filter nastavci, plastične tubice volumena 0,5 mL i 2 mL, alu folija, jednokratne zaštitne rukavice.

Reagensi: LightCycler 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics), neobilježene početnice HPLC čistoće.

Oligonukleotidne početnice: UGT1A1-F: 5'-GGTGTATCGATTGGTTTTTGC-3'

UGT1A1-R: 5'-TTTGCTCCTGCCAGAGGTT-3'

Postupak:

1. Priprema reakcijske smjese:

Otopiti reagense u ohlađenom stalku. Reakcijska smjesa za svaki uzorak sadržavala je točno određene volumene i konačne koncentracije sljedećih reagensa: Master Mix (1x konc.), 0,2 μ M svake od početnica, 3,0 mM $MgCl_2$, 1,6 ng/ μ L kalupa DNA.

Reakcijske smjese finalnog volumena 20 μ L pripremane su za 1 uzorak više. Nakon što je reakcijska smjesa vortexirana i spuštена (spin down), po 15 μ L reakcijske smjese podijeljeno je u jažice LightCycler mikrotitarske ploče. U svaku jažicu ploče dodano je 5 μ L uzorka DNA. Za negativnu kontrolu umjesto uzorka stavlja se 5 μ L vode (PCR-grade, iz LC 480 HRM Master seta). Ploča je zatim pokrivena prozirnom folijom te centrifugirana tijekom 2 min. na 1500 x g. Nakon toga ploča je postavljena u uređaj LightCycler 480 II te je pokrenut PCR program.

2. PCR program:

Tablica 1. Program za Real-Time PCR i HRM analizu amplificiranog produkta

Postavke					
Tip termo-bloka			Volumen reakcijske smjese (μL)		
96			20		
Detekcijski format		Ekscitacijski filter		Emisijski filter	
Sybre Green I / HRM boja		465		510	
Programi					
Naziv programa		Broj ciklusa		Način analize	
Preinkubacija		1		-	
Amplifikacija		47		Kvantifikacija	
Krivulja taljenja		1		Krivulja taljenja	
Hlađenje		1		-	
Ciljne temperature					
	Ciljna temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Način akvizicije	Trajanje (hh:mm:ss)	Brzina promjene temperature ($^{\circ}\text{C/s}$)	Akvizicije (po $^{\circ}\text{C}$)
Pre-inkubacija	95	-	00:10:00	4.4 (4.8)	-
Amplifikacija	95	-	00:00:10	4.4 (4.8)	-
	53	-	00:00:15	2.2 (2.5)	-
	72	Jednostruko	00:00:10	4.4 (4.8)	-
Krivulja taljenja	95	-	00:01:00	4.4 (4.8)	-
	40	-	00:01:00	2.2 (2.5)	-
	65	-	00:00:01	1	-
	95	Kontinuirano	-	-	25
Hlađenje	40	-	00:00:10	2.2 (2.5)	-

3.3.4. FRET

Druga metoda korištena za genotipizaciju *UGT1A1* (TA)_n polimorfizma je FRET metoda modificirana prema radu Borlak i sur (16). Analizirani su isti uzorci koji su analizirani i HRM metodom, ukupno 13 uzoraka: 9 uzoraka DNA pacijenata (po 3 uzorka od svakog genotipa TA6/6, TA6/7 i TA7/7), 3 referentna uzorka (za svaki genotip po jedan) te negativna kontrola (voda PCR-grade, iz LC DNA Master Hyb seta). Kao i kod HRM metode, prije PCR reakcije pripremljena je reakcijska smjesa te se reakcija odvijala u LightCycler[®] 480 II uređaju. Da bi došlo do FRET reakcije, korištene su dvije vrste obilježenih proba; *anchor* proba koja je na 3' kraju obilježena fluoresceinom te *sensor* proba koja je na 5' kraju obilježena LC-Red 640 akceptorskom bojom. Probe su nakon vezanja za DNA kalup bile udaljene za 2 baze. Kraća *sensor* proba sadržava slijed koji se veže za dio fragmenta na kojem

se nalazi mutacija, a fluorescein na *anchor* probi služio je kao izvor svjetlosti koji pobuđuje akceptorsku boju na *sensor* probi. Real-Time PCR uređaj detektirao je promjene u fluorescenciji tijekom reakcije, pri čemu je gubitak fluorescencije označavao taljenje *sensor* probe. Računalni program stvorio je krivulju taljenja umnoženih fragmenata kao rezultat omjera negativne derivacije fluorescencije i temperature te se na temelju razlike u temperaturi taljenja i obliku krivulje mogu razlikovati genotipovi TA6/6, TA6/7 i TA7/7.

Urađena je optimizacija koncentracije MgCl₂ tako što je u PCR reakcijama korištena serija razrjeđenja MgCl₂ konačne koncentracije od 3,0 mM do 5,0 mM. Optimalna konačna 3,0 mM koncentracija MgCl₂ korištena je u daljnjoj analizi usporedbe metoda HRM i FRET.

Pribor i oprema: PCR kabinet za sterilni rad Bioair Aura (Euroclone), LightCycler 480II Real-Time PCR uređaj (Roche), Centrifuga Multifuge 3 SR (Heraeus), short-spin centrifuga, mikrotitarske ploče za LightCycler 480 (bijele, 96 jažica, Roche), mikropipete volumena do 10 µL, 100 µL i 200 µL, filter nastavci, plastične tubice volumena 0,5 mL i 2 mL, alu folija, jednokratne zaštitne rukavice.

Reagensi: LC DNA Master Hybridization Kit (Roche Diagnostics), neobilježene početnice (Metabion), fluorescentno obilježene probe (TibMolBiol).

Oligonukleotidne početnice:

UGT1A1-sense: 5'-AAGTGA ACTCCCTGCTACCTT-3'

UGT1A1-antisense: 5'-CCACTGGGATCAACAGTATCT-3'

Oligonukleotidne probe:

UGT1A1-anchor:

5'-CTTTGCTCCTGCCAGAGGTTCCG CCT-fluorescein-3'

UGT1A1-sensor:

5'-Lightcycler-Red640-CCTACTTATATATATATATATATATGGCAAAAACC-P-3'

Postupak:

1. Priprema reakcijske smjese:

Reagensi su otopljeni u ohlađenom stalku. Reakcijska smjesa ukupog volumena 20 µL, za svaki je uzorak sadržavala točno određene volumene i koncentracije sljedećih

reagensa: LC DNA Master Hyb (1x konc.), 3,0 mM MgCl₂, 0,4 μM početnice, 0,2 μM probe, 6,0 ng/μL kalupa DNA.

Reakcijske smjese pripremane su za 1 uzorak više. Nakon što je reakcijska smjesa vortexirana i spuštена (spin down), po 16 μL reakcijske smjese podijeljeno je u jažice LightCycler mikrotitarske ploče. U svaku jažicu ploče dodano je 4 μL uzorka DNA. Za negativnu kontrolu umjesto uzorka stavljano je 4 μL vode (PCR-grade, iz LC DNA Master Hyb Kita). Ploča je zatim pokrivena prozirnóm folijóm te centrifugirana tijekom 2 minute na 1500 x g. Nakon toga ploča je postavljena u uređaj LightCycler 480 II te je pokrenut PCR program.

2. PCR program:

Tablica 2: Program za Real-Time PCR i FRET analizu amplificiranog produkta

Postavke					
Tip termo-bloka			Volumen reakcijske smjese (μL)		
96			20		
Detekcijski format		Ekscitacijski filter		Emisijski filter	
Programi					
Naziv programa		Broj ciklusa		Oblik analize	
Preinkubacija		1		-	
Amplifikacija		45		Kvantifikacija	
Krivulja taljenja		1		Krivulja taljenja	
Hlađenje		1		-	
Ciljne temperature					
	Ciljna temperatura (°C)	Način akvizicije	Trajanje (hh:mm:ss)	Brzina promjene temperature (°C/s)	Akvizicije (po °C)
Preinkubacija	95	-	00:02:00		
Amplifikacija	95	-	00:00:00		
	55	Jedinstveno	00:00:07		
	72	-	00:00:12		
Krivulja taljenja	95	-	00:00:30		
	45	-	00:00:30		
	94	Kontinuirano	00:00:00		
Hlađenje	40	-	00:00:30		

3.3.5 Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Kvaliteta specifičnih odsječaka DNA umnoženih pomoću oligonukleotidnih početnica za metode HRM i FRET provjerena je pomoću agarozne gel elektroforeze. Rađena je 2% elektroforeza DNA u agaroznom gelu. Za bojanje DNA korištena je boja GelRed (Olerup), a marker se sastojao od ljestvica DNA odsječaka veličina 50, 100, 200, 300, 400, 500 i 1000 pb.

3.3.6. Statističke metode

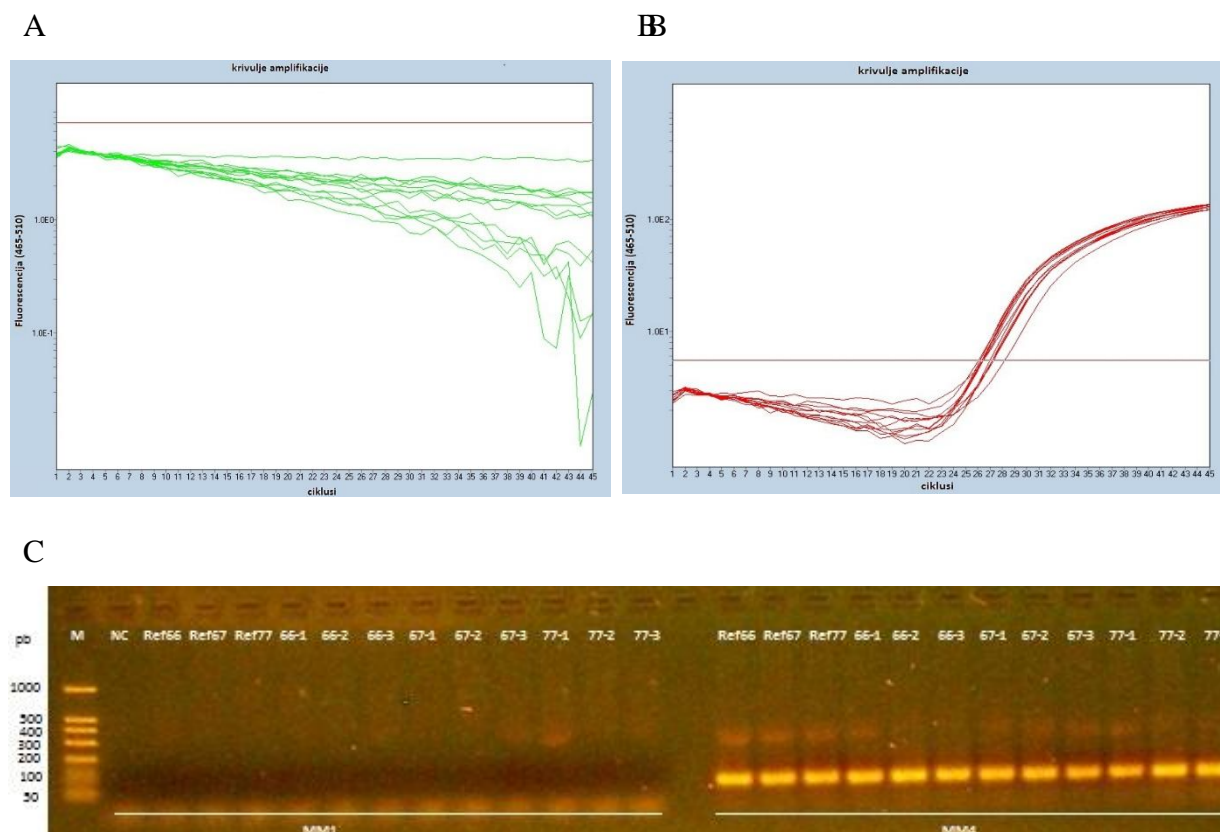
Karakteristike Real-Time PCR metoda HRM i FRET definirane su u odnosu na rezultate krivulja taljenja referentnih uzoraka. U testovima verifikacije svojstava uspoređivanih metoda razrjeđenja pojedinih komponenata PCR smjese testirana su u duplikatu u dva neovisna ponavljanja te su rezultati obrađeni metodama deskriptivne statistike.

4. REZULTATI

4.1. HRM

Za dobru HRM analizu sve amplifikacijske krivulje produkata PCR-a trebale bi imati Cp (eng. *crossing point*) vrijednosti <30 i sve bi krivulje amplifikacije trebale dostići jednaku visinu platoa. Pokusi titracije serije koncentracija MgCl₂ od 1,5 mM do 3,5 mM pokazali su da uz 1,5 mM konačnu koncentraciju MgCl₂ ne dolazi do amplifikacije produkta PCR-a (Slika 4A). Kao optimalna koncentracija za HRM analizu pokazala se 3,0 mM koncentracija MgCl₂ (Slika 4B), titracijski set 4 (MM4) u pokusima titracije koncentracije MgCl₂. Svi su uzorci reakcijskog seta MM4 imali Cp vrijednosti <30 (između 25,5 i 28,8), kao i reakcijski setovi MM2, MM3 i MM5, no za razliku od drugih reakcijskih setova u MM4 su sve amplifikacijske krivulje dostigle jednaku visinu platoa.

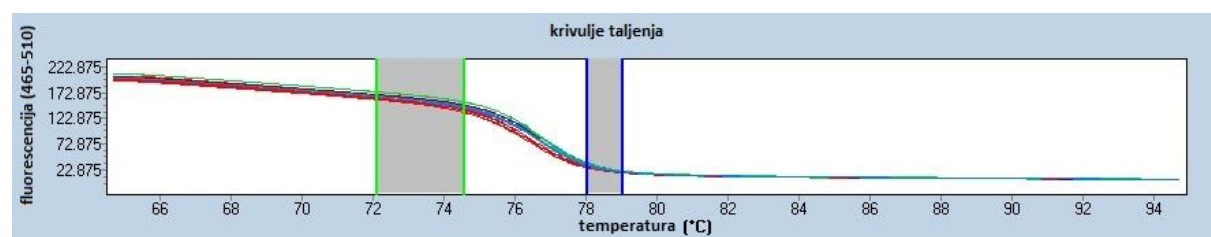
Kvaliteta amplificiranog produkta veličine 70 pb verificirana je i 2% agaroznom gel elektroforezom (Slika 4C). Rezultat gel elektroforeze (Slika 4C) potvrđuje rezultate analize PCR amplifikacije učinjene Abs Quant / Fit Point analizom u programu LC480 Software 1.5 (Slika 4 A i B).



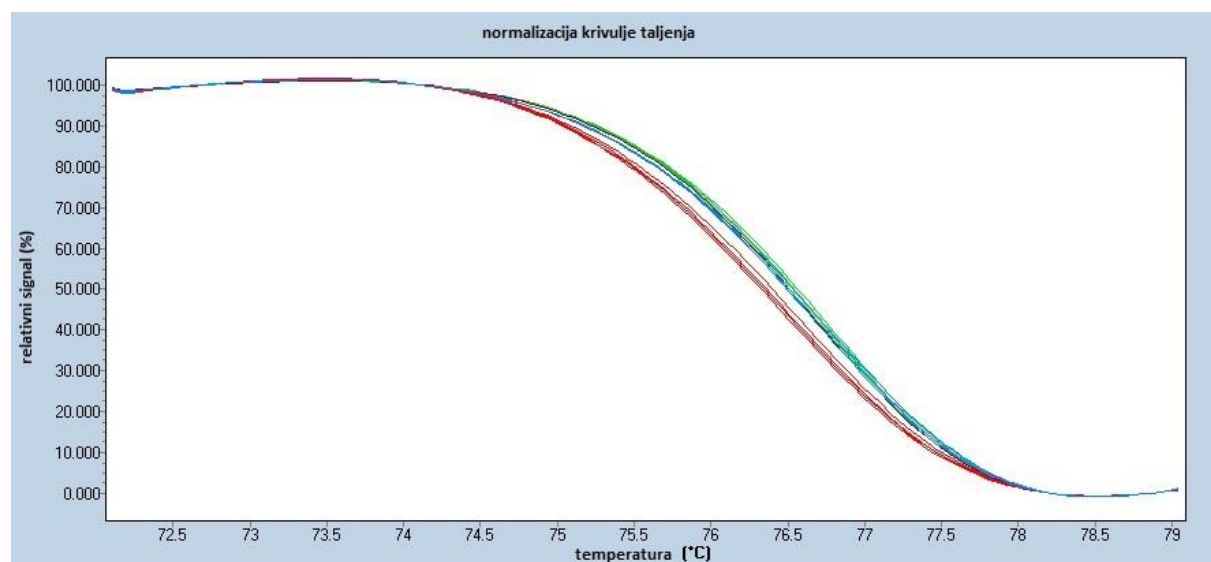
Slika 4: Rezultati analize amplifikacije kalupa DNA u reakcijskim titracijskim setovima MgCl_2 . (A) Nema amplifikacije produkta PCR-a u reakcijskom setu MM1 (1,5 mM MgCl_2). (B) Optimalna amplifikacija kalupa DNA u reakcijskom setu MM4 (3,0 mM MgCl_2). (C) Slika 2% agarozne gel elektroforeze produkata PCR reakcija reakcijskih setova MM1 i MM4 (M = DNA marker, NC = negativna kontrola).

Nakon analize PCR amplikona i odabira optimalnih koncentracija sastojaka reakcijske smjese, analizirane su krivulje taljenja amplificiranog odsječka DNA pomoću Light Cycler 480 Gene Scanning programa (Slika 5).

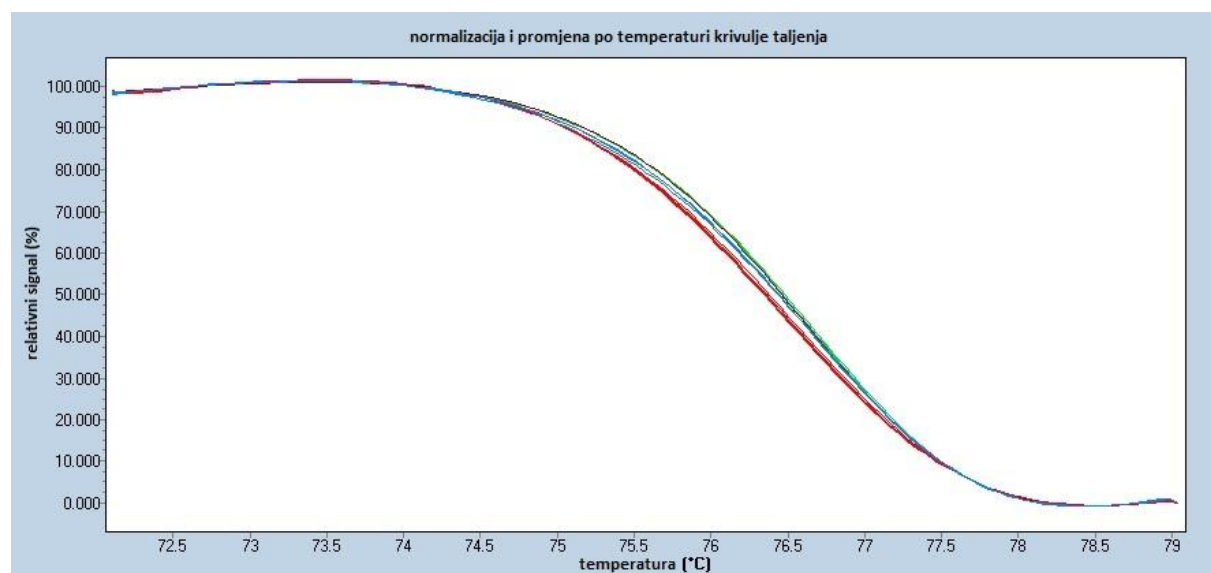
A

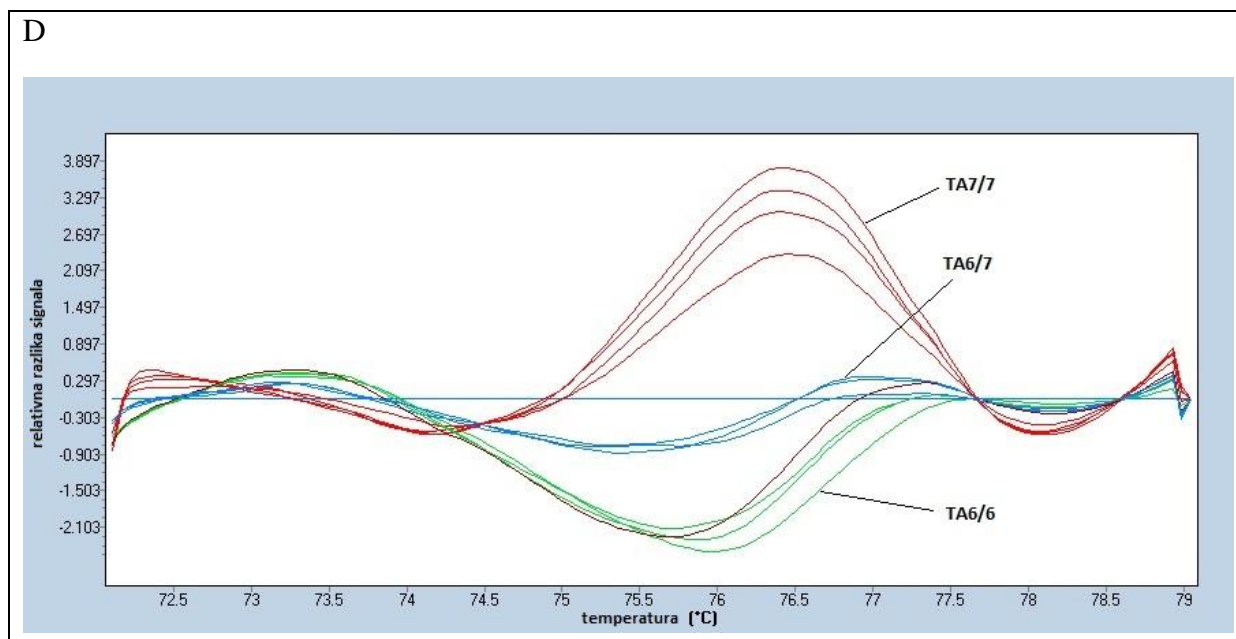


B



C





Slika 5. Postupak promjene oblika te nastajanja konačnih diferencijalnih krivulja taljenja DNA tijekom HRM genotipizacije. (A) Početne krivulje taljenja dobivene nakon „melting“ programa. Za normalizaciju krivulja taljenja pre-melting temperatura bila je postavljena na 72,11-74,58 °C, a post-melting temperatura na 78,04-79,00 °C (B) Krivulje taljenja nakon normalizacije. (C) Krivulje taljenja nakon normalizacije i promjene po temperaturi. (D) Konačne diferencijalne krivulje taljenja dobivene kao rezultat negativne derivacije po fluorescenciji.

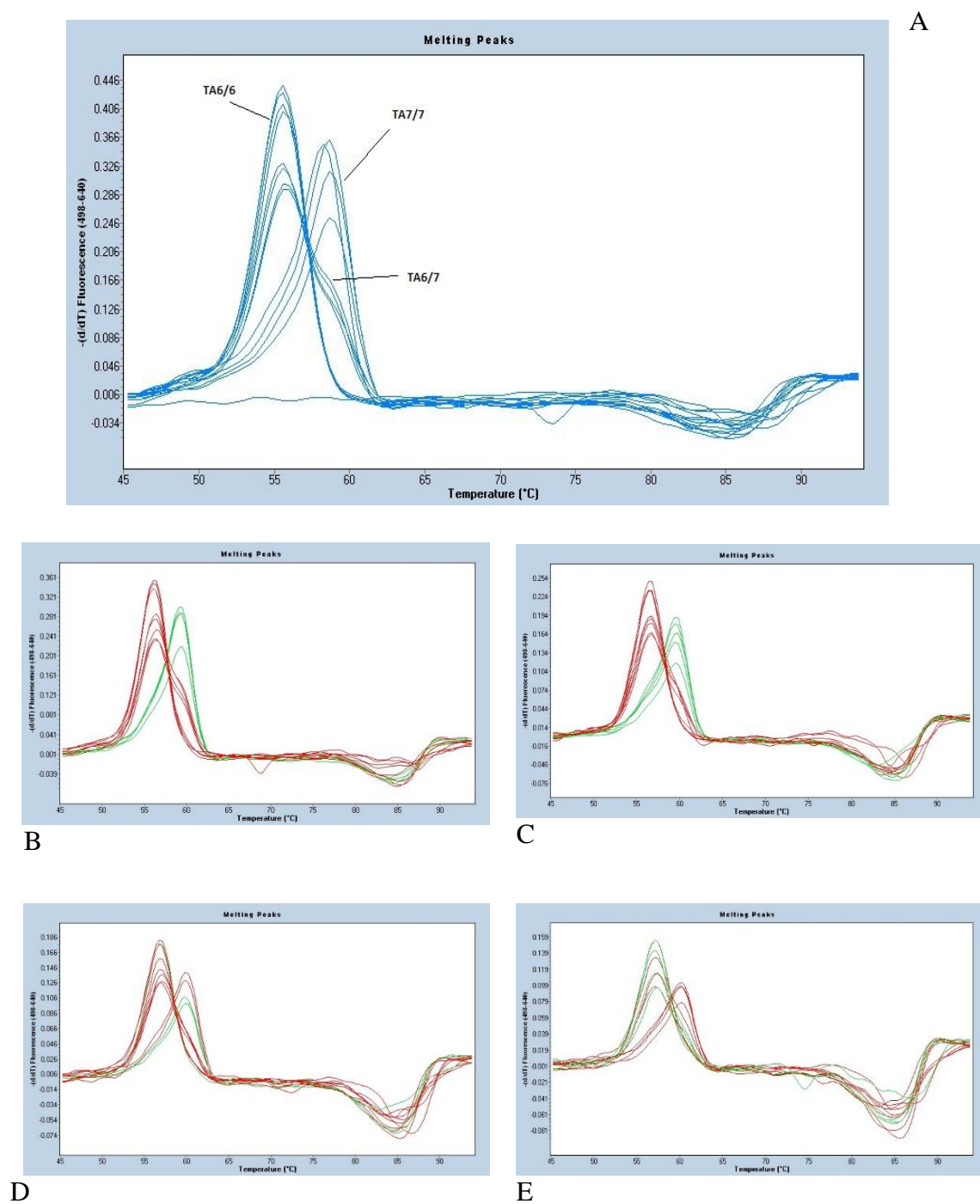
Prije „melting“ programa i HRM analize, tj. nakon PCR reakcije, očitane su Cp vrijednosti za uzorke svakog od tri genotipa. Analizom Cp vrijednosti uočeno je da su sve Cp vrijednosti manje od 30, što odgovara uvjetu dobre HRM analize. Usporedba Cp vrijednosti korištena je kao provjera reproducibilnost i pouzdanosti HRM metode. Svaki uzorak amplificiran je u duplikatu te je PCR reakcija ponovljena dva puta. Na temelju podataka o Cp vrijednostima izračunate su aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama i raspon Cp vrijednosti za svaki genotip. Cp vrijednosti između TA7/7, TA6/7 i TA6/6 genotipova neznatno su se razlikovale, a isto tako između Cp vrijednosti uzoraka svakog pojedinog genotipa postojao je mali raspon, tj. niska vrijednost standardne devijacije. Između prvog i drugog ponavljanja PCR reakcije nije bilo značajnih razlika u Cp vrijednostima (Tablica 3).

Tablica 3. Usporedba Cp vrijednosti za uzorke sva tri genotipa

1. ponavljanje			
	Cp prosjek \pm SD	Raspon Cp (ciklusa)	Ukupno raspon (ciklusa)
TA6/6 (Ref66, 66-1, 66-2, 66-3)	25,83 \pm 0,15	25,64-25,99 (0,35)	3,22 ciklusa (Cp 28,86 – Cp 25,64)
TA6/7 (Ref67, 67-1, 67-2, 67-3)	26,23 \pm 0,50	25,75-26,82 (1,07)	
TA7/7 (Ref77, 77-1, 77-2, 77-3)	26,88 \pm 1,39	25,68-28,86 (3,18)	
2. ponavljanje			
TA6/6 (Ref66, 66-1, 66-2, 66-3)	26,27 \pm 0,19	26,07-26,48 (0,41)	2,15 ciklusa (Cp 28,22 – Cp 26,07)
TA6/7 (Ref67, 67-1, 67-2, 67-3)	26,78 \pm 0,52	26,30-27,25 (0,95)	
TA7/7 (Ref77, 77-1, 77-2, 77-3)	27,18 \pm 0,75	26,45-28,22 (1,77)	

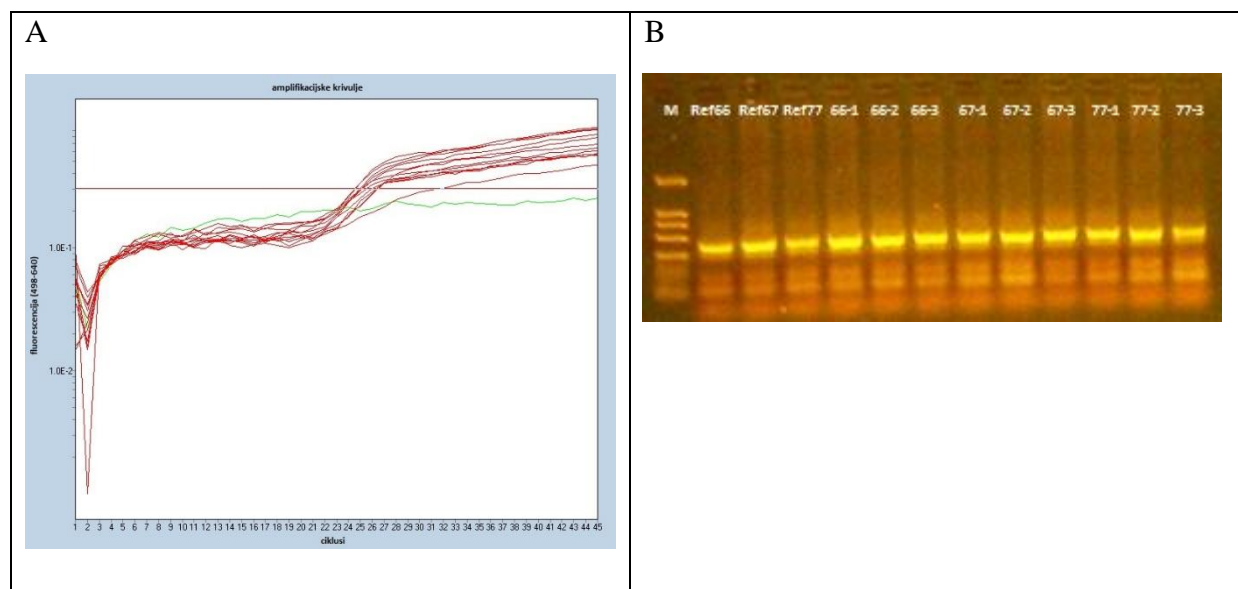
4.2. FRET

Analiza krivulja taljenja produkata PCR-a titracije serije koncentracija $MgCl_2$ od 3,0 mM do 5,0 mM pokazala je da je 3,0 mM konačna koncentracija $MgCl_2$ optimalna koncentracija za FRET analizu (Slika 6). Krivulje taljenja svakog pojedinog uzroka, kao i razlike između TA7/7, TA6/7 i TA 7/7 genotipova, jasno su se mogle uočiti samo uz 3,0 mM koncentraciju $MgCl_2$ (Slika 6A). Povećanjem koncentracije $MgCl_2$ (titracijski setovi MM2, MM3, MM4 i MM5) preciznost analize se smanjivala zbog preklapanja krivulja te sve manje mogućnosti uočavanja razlika između genotipova (Slika 6 B, C, D i E) .



Slika 6: Oblik krivulja taljenja u ovisnosti o koncentraciji MgCl_2 (A) 3,0 mM MgCl_2 – MM1 (B) 3,5 mM MgCl_2 – MM2 (C) 4,0 mM MgCl_2 – MM3 (D) 4,5 mM MgCl_2 – MM4 (E) 5,0 mM MgCl_2 – MM5

Prisutnost i kvaliteta amplificiranog fragmenta DNA veličine 242 pb u reakcijskoj smjesi MM1 potvrđeni su 2% agaroznom gel elektroforezom. Rezultat gel elektroforeze (Slika 7B) potvrđuje rezultate analize PCR amplifikacije učinjene Abs Quant / Fit Point analizom u programu LC480 Software 1.5 (Slika7A).



Slika7: Rezultat analize amplifikacije kalupa DNA u reakcijskom titracijskom setu MM1.

(A) Optimalna amplifikacija kalupa DNA u reakcijskom setu MM1 (3,0 mM $MgCl_2$).

(B) Slika 2% agarozne gel elektroforeze produkata PCR reakcije reakcijskog seta MM1, (M = DNA marker).

Usporedbom vrijednosti temperatura taljenja (T_m) između mjerenja provjeravane su reproducibilnost i pouzdanost FRET metode. Svaki uzorak amplificiran je u duplikatu, PCR reakcija ponovljena je dva puta te su na temelju izmjerenih T_m izračunate prosječne T_m za uzorke svakog genotipa, kao i raspon T_m . Razlike u T_m uzoraka istog genotipa bile su vrlo male. Raspon T_m bio je manji od $1^\circ C$ kod svih uzoraka, osim uzoraka TA6/6 genotipa u drugom ponavljanju kod kojih je raspon T_m iznosio $2,11^\circ C$. Između prvog i drugog ponavljanja također nije bilo velikih razlika u T_m (Tablica 4).

Tablica 4: Usporedba vrijednosti T_m za uzorke sva tri genotipa

1. ponavljanje				
	Tm1 prosjek (°C) ± SD	Raspon Tm1(°C)	Tm2 prosjek (°C) ± SD	Raspon Tm2(°C)
TA6/6 (Ref66, 66-1, 66-2, 66-3)	55,55 ± 0,07	55,54-55,66 (0,12)		
TA6/7 (Ref67, 67-1, 67-2, 67-3)	55,96 ± 0,18	55,73-56,13 (0,4)	59,46 ± 0,06	59,4-59,5 (0,1)
TA7/7 (Ref77, 77-1, 77-2, 77-3)			58,83 ± 0,08	58,7-58,9 (0,2)
2. ponavljanje				
TA6/6 (Ref66, 66-1, 66-2, 66-3)	55,39 ± 0,72	53,62-55,73 (2,11)		
TA6/7 (Ref67, 67-1, 67-2, 67-3)	55,93 ± 0,10	55,81-56,05 (0,24)	59,26 ± 0,04	59,2-59,3 (0,1)
TA7/7 (Ref77, 77-1, 77-2, 77-3)			59,04 ± 0,15	58,8-59,3 (0,5)

4.3. Usporedbe karakteristika Real-time PCR metoda HRM i FRET

Titracijama sastojaka reakcijskih smjesa za HRM i za FRET metode testirana je robusnost tih metoda. Pokazano je da HRM tolerira promjene u koncentraciji $MgCl_2$ između 2,0 mM i 3,5 mM što se tiče same amplifikacije PCR produkta, no za specifične konačne krivulje genotipova u analizi rezultata bilo je potrebno odabrati optimalnu reakcijsku smjesu točno određenih koncentracija sastojaka. FRET metoda također tolerira određeni raspon koncentracija $MgCl_2$ (3,0 mM do 5,0 mM) pri kojima dolazi do amplifikacije produkta, no iz oblika krivulja T_m analize vidljivo je da se porastom koncentracije $MgCl_2$ krivulje pomiču tako da na kraju više nema specifične razlike između vrhova krivulja za svaki od genotipova. Za FRET metodu je također bilo potrebno odabrati optimalnu reakcijsku smjesu koja je najefikasnija i najspecifičnija za genotipizaciju TA6/7 polimorfizma u genu *UGT1A1*.

Verifikacija amplifikacije za svaki real-time PCR za obje metode učinjena je Abs Quant / Fit Point analizom u programu LC480 Software 1.5, a za određene je amplifikacije potvrđena i 2% agaroznom gel elektroforezom (Slike 4 i 7).

Pouzdanost i reproducibilnost HRM metode provjerena je usporedbom C_p vrijednosti za uzorke sva tri genotipa rađene u duplikatu i ponovljene dva puta (Tablica 3). Sve su C_p vrijednosti bile ispod 30 ciklusa, raspona od 2,15 do 3,22 ciklusa što pokazuje da je metoda reproducibilna. Osim toga, za svako je ponavljanje svakog uzorka analizirana i konačna diferencijalna krivulja taljenja visoke rezolucije (Slika 5D) uz uvjet da su svi parametri PCR programa i analize u Gene Scanning programu bili jednako namješteni kako bi bili usporedivi.

Pouzdanost i reproducibilnost FRET metode provjerena je usporedbom T_m vrijednosti za uzorke sva tri genotipa rađene u duplikatu i ponovljene dva puta (Tablica 4). Ukupno je raspon T_m vrijednosti bio od 0,1 do 2,11 °C, što je prihvatljivo te potvrđuje da je metoda reproducibilna.

Utrošak vremena za pripremu reakcijske smjese i samu Real-Time PCR reakciju između HRM i FRET metode se ne razlikuje. Nešto više vremena potrebno je uložiti u analizu dobivenih rezultata kod HRM metode.

Usporedba financijskih troškova pokazala je da je FRET metoda 2,5 puta skuplja u odnosu na HRM metodu.

5. RASPRAVA

Određivanje insercije TA u promotoru gena *UGT1A1* molekularno je dijagnostički postupak kojim se može potvrditi dijagnoza Gilbertovog sindroma. Utvrđivanje genotipa polimorfizma TA u genu *UGT1A1* može pomoći i u pravilnom doziranju lijekova koji se metaboliziraju putem glukuronidacije enzimom bilirubin-UGT (1,3). U postupku dijagnostike vrlo je važno imati pouzdanu, specifičnu i robusnu metodu, kojom se do rezultata dolazi u što kraćem vremenskom roku. Također je poželjno da financijski troškovi potrebni za izvedbu budu što niži. U ovom su istraživanju ispitane i uspoređene karakteristike FRET i HRM metode.

Testirani su specifičnost, pouzdanost, efikasnost, robusnost, vremenski utrošak te financijski troškovi dviju navedenih metoda. Za testiranje i usporedbu karakteristika korišteno je devet DNA uzoraka poznatog genotipa - po tri uzorka od svakog genotipa (TA6/6, TA6/7 i TA7/7), tri referentna uzorka kao pozitivne kontrole te voda kao negativna kontrola.

Prilikom testiranja karakteristika HRM metode utvrđeno je da je metoda specifična za genotipizaciju *UGT1A1* jer je HRM analizom točno i jasno određen genotip uzorka. Specifičnost metode potvrđuju i krivulje taljenja ispitivanih uzoraka koje su oblikom i temperaturom taljenja odgovarale krivuljama taljenja referentnog uzorka istog genotipa. Usporedbom C_p vrijednosti nakon PCR programa utvrđen je ukupni raspon od 2,15 do 3,22 ciklusa, što je potvrdilo da je metoda pouzdana i reproducibilna. Robusnost HRM metode provjeravana je titracijama koncentracije $MgCl_2$ od 1,5 mM do 3,5 mM. Testovi titracije pokazali su da se amplifikacija događa pri koncentracijama od 2,0 do 3,5 mM, dok pri koncentraciji od 1,5 mM amplifikacije nije bilo. Usporedbom s FRET metodom može se uočiti da FRET metoda tolerira veći raspon koncentracije $MgCl_2$ što se tiče same amplifikacije. Iako se amplifikacija tijekom HRM metode odvijala pri koncentracijama $MgCl_2$ od 2,0 do 3,5 mM, isto kao i kod FRET metode samo je koncentracija od 3,0 mM bila povoljna za kvalitetnu analizu zbog oblika krivulja taljenja. Priprema reakcijskih smjesa za HRM metodu traje jednako kao i priprema za FRET metodu, jedino je nešto više vremena potrebno utrošiti kod analize rezultata HRM metode zbog normalizacije i derivatizacije krivulja. Ukupno trajanje HRM metode iznosi otprilike 1,5h (16). Kod HRM metode nema potrebe za kupovanjem dodatnih obilježenih oligonukleotidnih proba te je metoda financijski povoljnija jer su troškovi u odnosu na FRET metodu 2,5 puta manji.

Osim uspoređivanih karakteristika, uočeno je da je HRM metoda prikladnija za detekciju heterozigotnog TA 6/7 genotipa zbog boljeg prikaza. Analizom krivulja taljenja FRET metode, odnosno analizom vrhova krivulja (engl. *peak*) negativnih derivacija fluorescencije po temperaturi mogu se uočiti jasno odvojeni vrhovi krivulja te krivulje različitih T_m za homozigotne genotipove TA7/7 i TA6/6, dok krivulje taljenja heterozigotnih uzoraka i njihovi vrhovi krivulja izgledom ne odgovaraju očekivanjima. Očekivano bi bilo da se kod heterozigotnih uzoraka, zbog prisutnosti dvaju različitih alela, isto tako može uočiti krivulja s dva vrha, pri čemu bi svaki trebao odgovarati T_m homozigotnih genotipova. Međutim, nakon genotipizacije *UGT1A1* (TA)_n polimorfizma FRET metodom utvrđeno je da krivulja taljenja heterozigotnih genotipova izgleda kao krivulja taljenja uzoraka genotipa TA 6/6 s blagim proširenjem prema većoj vrijednosti T_m , što je u skladu i s krivuljama FRET analize prikazanim u radu Borlak i sur. (16). Za razliku od krivulja taljenja FRET metode, konačnim diferencijalnim krivuljama taljenja HRM metode jasno se mogu razlučiti sva tri genotipa. Ovo istraživanje potvrđuje navode Minucci i sur. (12) da HRM metodu možemo smatrati korisnom tehnikom za detekciju insercije TA u genu *UGT1A1*.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog testiranja karakteristika te usporedbe metoda analize krivulje taljenja visoke rezolucije (HRM) te analize krivulje taljenja pomoću FRET hibridizacijskih proba može se zaključiti:

1. obje metode su specifične, pouzdane i efikasne za detekciju genotipova TA 6/6, TA 6/7 i TA 7/7 u promotoru gena *UGT1A1*
2. metoda analize krivulje taljenja pomoću FRET hibridizacijskih proba je 2,5 puta skuplja u odnosu na HRM analizu
3. za analizu rezultata kod HRM metode potrebno je utrošiti malo više vremena
4. HRM metoda je prikladnija za detekciju heterozigotnog TA6/7 genotipa

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Testirati i usporediti specifičnost, pouzdanost, efikasnost, robusnost, utrošak vremena te financijske troškove za metode analize krivulje taljenja visoke rezolucije (HRM) i krivulje taljenja pomoću FRET hibridizacijskih proba za detekciju insercije TA u promotoru gena *UGT1A1*.

Ispitanci i metode: U istraživanju je korišteno 9 DNA uzoraka poznatog genotipa - po tri uzorka od svakog genotipa (TA6/6, TA6/7 i TA7/7) te po jedan referentan uzorak za svaki genotip. Genotipizacija uzoraka učinjena je HRM i FRET metodama.

Rezultati: Titracijama koncentracije $MgCl_2$ testirana je robusnost HRM i FRET metoda te je utvrđeno da FRET metoda tolerira veći raspon koncentracija što se tiče amplifikacije, no jedino je koncentracija od 3,0 mM bila optimalna za analizu rezultata genotipizacije kod obje metode. Usporedbom C_p vrijednosti za HRM metodu te usporedbom vrijednosti T_m za FRET metodu utvrđen je mali ukupni raspon te ustanovljeno da su metode pouzdane i reproducibilne. Usporedbom vremena koje je potrebno za izvedbu metoda utvrđeno je da HRM metoda traje malo duže zbog analize rezultata, dok je usporedbom financijskih troškova utvrđeno da je FRET metoda 2,5 puta skuplja.

Zaključak: Testiranjem i usporedbom karakteristika HRM i FRET metoda dokazano je da su obje metode specifične, pouzdane i efikasne za genotipizaciju *UGT1A1* (TA)_n polimorfizma. Također je utvrđeno da je metoda analize krivulje taljenja pomoću FRET hibridizacijskih proba 2,5 puta skuplja u odnosu na HRM analizu, dok je za analizu rezultata kod HRM metode potrebno utrošiti malo više vremena. Nadalje, utvrđeno je da je HRM metoda prikladnija za detekciju heterozigotnog TA 6/7 genotipa.

KLJUČNE RIJEČI: analiza krivulja taljenja, FRET hibridizacijske probe, gen *UGT1A1*, HRM

8. SUMMARY

Comparison of high resolution melting (HRM) and FRET HybProbes melting curve analysis for TA-insertion in *UGT1A1* gene promoter

Objectives: The aim of this study was to test and compare specificity, reliability, efficiency, robustness, time consumption and financial costs of high resolution melting method (HRM) and FRET HybProbes melting curve analysis for TA-insertion in *UGT1A1* gene promoter.

Patients and methods: In this study 9 DNA samples of known genotypes were used - three samples of each genotype (TA6/6, TA6/7 and TA7/7) and one reference sample for each genotype. Samples genotyping was performed using HRM and FRET methods.

Results: The robustness of HRM and FRET methods was tested by titration of MgCl₂ concentration and it was found that the FRET method tolerates a larger concentration range as far as amplification is concerned, but the only optimal concentration for genotyping result analysis in both methods was 3.0 mM. By comparing the C_p values for the HRM method and by comparing the T_m value for the FRET method, a small overall range was found and it was confirmed that the methods were reliable and reproducible. By comparing the time required for implementation of both methods, it was found that the HRM method lasts a little longer due to analysis of the results, while by comparing the financial costs it is determined that the FRET method is 2.5 times more expensive.

Conclusion: Testing and comparing the characteristics of HRM and FRET methods showed that both methods are specific, reliable and effective for genotyping *UGT1A1* (TA)_n polymorphisms. It was also found that the FRET HybProbes melting curve analysis method is 2.5 times more expensive than HRM analysis, while analyzing results of the HRM method takes a little more time. Furthermore, it was found that the HRM method is more suitable for detection of heterozygous TA 6/7 genotype.

KEY WORDS: melting curve analysis, FRET HybProbes, *UGT1A1* gene, HRM

9. LITERATURA

1. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J.* 2003; 3: 136-158
2. Manevski N. Activity and Enzyme Kinetics of Human UDP-Glucuronosyltransferases: Studies of Psilocin Glucuronidation and the Effects of Albumin on the Enzyme Kinetic Mechanism (disertacija). Helsinki: 2013; 15-20
3. Dean L. Irinotecan Therapy and UGT1A1 Genotype. U: Dean L. *Medical Genetics Summaries.* Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2015:1-8
4. Genetics Home Reference. UGT1A1 gene. Dostupno na adresi: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/UGT1A1#conditions>. Datum pristupa: 22.7.2017.
5. Murray R K, Bender A, Botham K M, Kennelly P J, Rodwell V W, Well A. Harperova ilustrirana biokemija. Lovrić J, Sertić J, urednici. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
6. Genetics Home Reference. Gilbert syndrome. Dostupno na adresi: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/gilbert-syndrome>. Datum pristupa: 22.7.2017.
7. Yi L, Lin G, Zhang K, Wang L, Zhang R, Xie J, i sur. Molecular Genetics External Quality Assessment Pilot Scheme for Irinotecan-Related UGT1A1 Genotyping in China. *PLoS One.* 2016; 11(1): e0148081.
8. Shipley GL. An introduction to real-time PCR. U: Dorak MT ur. *Real-time PCR*;2006:1-37.
9. Dujols V, Kusukawa N, McKinney JT, Dobrowolsky SF, Wittwer CT. High-resolution melting analysis for scanning and genotyping. U: Dorak MT ur. *Real-time PCR*;2006:155-169.
10. Applied Biosystems. A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis. SAD:2009.

11. Roche Diagnostics GmbH. High Resolution Melting: Optimization Strategies. Mannheim, Njemačka: 2008.
12. Minucci A, Concolino P, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E. Rapid UGT1A1 (TA)_n genotyping by high resolution melting curve analysis for Gilbert's syndrome diagnosis. Clin Chim Acta. 2010; 246–249
13. Didenko V V. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. Biotechniques. 2001; 31(5): 1106–1121.
14. Hussain S A i sur. An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)[internet]. Tripura, India: ResearchGate; 2009. Dostupno na adresi: https://www.researchgate.net/publication/45867167_An_Introduction_to_Fluorescence_Resonance_Energy_Transfer_FRET. Datum pristupa: 5.8.2017.
15. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
16. Borlak J, Thum T, Landt O, Erb K, Hermann R. Molecular diagnosis of a familial nonhemolytic hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome) in healthy subjects. Hepatology. 2000;32(4):792-795.

10. ŽIVOTOPIS

MAJA JIROUŠ

Datum i mjesto rođenja:

- 8. rujan 1995. godine, Virovitica

Kontakt:

- majajirous@gmail.com

Obrazovanje:

- 2010.-2014. Gimnazija Petra Preradovića u Virovitici, smjer prirodoslovno-matematička gimnazija
- 2014.-2017. Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku