

**UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET**

Maja Stojiljković

**POLIMORFIZMI U GENU ZA FENILALANIN
HIDROKSILAZU ČOVEKA KAO REGULATORI GENSKE
EKSPRESIJE, MODULATORI FENOTIPA I
POPULACIONO-GENETIČKI MARKERI**

Doktorska disertacija

Beograd, maj 2009. godine

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Maja Stojiljković

**POLIMORFIZMI U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU ČOVEKA KAO
REGULATORI GENSKE EKSPRESIJE, MODULATORI FENOTIPA I
POPULACIONO-GENETIČKI MARKERI**

Универзитет у Београду
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА ФИЗИОЛОГИЈУ И БИОХЕМИЈУ
БИБЛИОТЕКА
Инв. бр. SO117
БЕОГРАД

Doktorska disertacija

Beograd, maj 2009. godine

ZAHVALNICA

Ovaj rad je realizovan u laboratoriji za molekularnu hematologiju na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu. Najveću zahvalnost dugujem Dr Sonji Pavlović koja mi je ukazala ogromno poverenje i pružila neopozivnu podršku u toku rada na ovoj temi. Sonja, hvala vam na svemu što ste mi učinili.

Hvala Prof. dr Gordani Matić na interesovanju i pomoći koja mi je pružila u toku doktorske studije na Biološkom fakultetu u toku završetka ovog rada.

Hvala Dr Dragici Radojković na savetima i kritičkoj Odrasloj dve teme.

Očigledno hvala svima: Branku, Nataši, Doru, Mileni, Tanji, Vasi i svim ZAVG-ovcima kojima koje su bili na mojoj strani tokom realizacije. Hvala vam što ste rad učinili lepim, hvala na razgovorima, savetima i podršci. Hvala vam što ste uvek bili tu kad je trebalo. Ove godine, bez vas moj pogled na svet ne bi bio isti kao sada. Hvala vam na svemu.

Veliko hvala kolegama sa IMGIN. Odrasloj temi, hvala vam što ste uvek imali vremena za moja pitanja, što vašeg znanja i iskustva počinje da realizujem ove teme bila bi teža.

Bez savetnika sa Institutom za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukobratović" ovaj rad ne bi bio moguć. Zahvaljujem se dugujem inženjerskoj asistentki Dr Marii Đorđević.

Prvi deo ovog rada realizovan je u toku tromesečnog boravka u laboratoriji za molekularnu osnovu genetičkih bolesti u okviru Centra za molekularnu biologiju "Severo Ochoa" u Madridu. Pre svega hvala Prof. dr Margariti Ugarte, Dr Belen Perez i Dr Lourdes Osviat koje su me srdačno primile u svoju laboratoriju i omogućile mi da dođem do novog znanja i tvrdog naučnog iskustva. Veliko hvala Cristini Aguado koja mi je pružila svoje znanje. Takođe, hvala Marcelu de Lucca i Juanu Cabellu, bez kojih me put morada ne bi odmah bio do ovog mesta. Odrasloj zahvaljujem se Fondaciji "Boehringer Ingelheim" koja mi je boravak u Španiji omogućila.

Komisija za pregled i ocenu doktorske disertacije:

Dr Sonja Pavlović, viši naučni saradnik, mentor
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

Prof. dr Gordana Matić, redovni profesor, mentor
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Dragica Radojković, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

ZAHVALNICA

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu hematologiju na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu. Najveću zahvalnost dugujem Dr Sonji Pavlović koja mi je ukazala ogromno poverenje i pružila neiscrpnu podršku u toku rada na ovoj tezi. Sonja, hvala Vam na svemu što ste me naučili.

Hvala Prof. dr Gordani Matić na interesovanju i pomoći koju mi je pružila u toku doktorskih studija na Biološkom fakultetu i u toku izrade ovog rada.

Hvala Dr Dragici Radojković na savetima i kritičkom čitanju ove teze.

Od sveg srca hvala Branki, Nataši, Dori, Mileni, Tanji, Vesni i svim ZMZG devojakama koje su bar na kratko bile deo laboratorije. Hvala vam što ste rad učinile lepim, hvala na razgovorima, naučnim i veselim. Hvala vam što ste uvek bile tu kad je trebalo. Devojke, bez vas moj pogled na svet ne bi bio ovakav kakav je danas.

Veeeliko hvala kolegama sa IMGGI! Dragi moji, hvala vam što ste uvek imali vremena za moja pitanja. Bez vašeg znanja i ogromne pomoći realizacija ove teze bila bi teža.

Bez saradnje sa Insitutom za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić" ovaj rad ne bi bio moguć. Zato veliku zahvalnost dugujem imenjakinji i saputnici Dr Maji Đorđević.

Jedan deo ovog rada realizovan je u toku tromesečnog boravka u Laboratoriji za molekularnu osnovu genetičkih bolesti u okviru Centra za molekularnu biologiju "Severo Ochoa" u Madridu. Pre svega hvala Prof. dr Magdaleni Ugarte, Dr Belén Perez i Dr Lourdes Desviat koje su me srdačno primile u svoju laboratoriju i omogućile mi da steknem nova znanja i izvanredna iskustva. Veliko hvala Cristini Aguado koja mi je prenela svoje znanje. Takođe, hvala Marisel de Lucca i Juanu Cabellu, bez kojih me put možda ne bi odveo baš do ovih divnih ljudi. Ogromnu zahvalnost dugujem i Fondaciji "Boehringer Ingelheim" bez koje moj boravak u Španiji ne bi bio moguć.

Koristim ovu priliku da se zahvalim Ministarstvu za nauku Republike Srbije, Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Human Genome Organisation i Federation of European Biochemical Societies bez čije pomoći bi moje razumevanje molekularne osnove fenilketonurije bilo suženiije.

Hvala Marizeli, Tijani & Tijani koje su zajedno sa mnom delile sudbinu PhD studenta u Srbiji. Hvala Ani, Neveni, Ljubici, Mariji, Nađi, Jeleni i Voji koji su prenosili iskustva iz nekih drugih zemalja. Hvala mom bratu i mojim prijateljima koji su još uvek ovde.

Hvala najboljem tati na svetu koji me je naučio najvažnijim stvarima u životu. Hvala mojoj nani, Olgici i Ljilji za neizmernu ljubav i podršku ali i što su me uvek pitale šta ću raditi dalje.

Hvala mom Bošku, mojoj ljubavi i mom najboljem prijatelju. Hvala ti što si svaki moj problem pretvorio u lako rešivu sitnicu. Hvala ti za podršku koju si mi pružio od polaganja fizičke hemije sve do korićenja ove teze.

KRATAK SADRŽAJ

Fenilketonurija (PKU, phenylketonuria) je najčešća nasledna metabolička bolest u populaciji belaca. Prosečna učestalost PKU je u evropskim populacijama 1/10000, a u srpskoj 1/12300. Fenilketonurija se nasleđuje autozomalno-recesivno, a uzrok su mutacije u genu za fenilalanin hidroksilazu (PAH, phenylalanine hydroxylase) koje dovode do promenjene strukture i smanjene efikasnosti enzima (PAH) čija je uloga u konverziji fenilalanina u tirozin u jetri. Iako je fenilketonurija monogenetska bolest, opisan je čitav spektar različitih fenotipova. S obzirom da se najteži oblik PKU fenotipa (mentalna retardacija), razvija tek kao posledica interakcije genotipa i uslova sredine (fenilalanina u hrani), rana dijagnoza i lečenje dijetalnom restrikcijom fenilalanina su od presudne važnosti. Iako se neonatalni skrining na fenilketonuriju u Srbiji sprovodi od 1980. godine, ovaj rad predstavlja prvu kompletnu studiju o molekularnoj karakterizaciji mutacija i polimorfizama u genu za PAH. Uvedena molekularna dijagnostika ima značaj za postavljanje preciznije dijagnoze, genetičko savetovanje i otvara mogućnost za odabir pacijenata kojima bi koristila terapija preparatom tetrahidrobiopterina.

U studiju su bila uključena 34 nesrodna pacijenta, koji su na osnovu nivoa fenilalanina pre lečenja, svrstani u fenotipske kategorije: klasičnu PKU (65%) i blagu PKU (35%). Osmišljena je strategija i optimizovane su metode za detekciju mutacija u genu za fenilalanin hidroksilazu pacijenata obolelih od fenilketonurije u Srbiji. Kombinacijom metoda za indirektnu i direktnu detekciju mutacija (multipleks DGGE širokog spektra za analizu 13 egzona i njihovih okolnih intronskih regiona, PCR-RFLP, PCR-ACRS i DNK sekvenciranje odabranih regiona) postignut je nivo detekcije od 97%. Identifikovano je 19 mutacija u genu za PAH koje dovode do bolesti (13 "missense" tipa, 3 "nonsense" tipa, 2 splajsing mutacije i 1 mala delecija). Najčešće mutacije su L48S (21%), R408W (18%), P281L (9%), E390G (7%) and R261Q (6%), koje predstavljaju 60% od mutiranih alela. Interesantno je da mutacija L48S, koja je detektovana u mnogim evropskim populacijama, u srpskoj populaciji ima najvišu relativnu učestalost. Ostale mutacije detektovane u srpskoj populaciji (R158Q, I306V, IVS12+1G>A, Q20X, R111X, V177L, P225T, R261X, L15/S16fsCTdel, S231F, R252Q, R297H, IVS10-11G>A i R413P) imaju učestalost manju od 5%. Takođe, identifikovane su i neke česte tihe mutacije (Q232Q, V245V and L385L) kao i intronski polimorfizmi (IVS2-19T>C, IVS5-54A>G, IVS12-35C>T). Podaci o mutacijama uneti su u nacionalnu bazu podataka o učestalosti mutacija (www.goldenhelix.org/serbian/).

Po prvi put je analizirana alelska heterogenost PAH lokusa u srpskoj populaciji. Homozigotna vrednost PAH lokusa (0.10), kao i genotipska homozigotnost (8.82%) su niske i ukazuju na heterogenost molekularne osnove fenilketonurije u srpskoj populaciji, što oslikava brojne istorijski dokumentovane migracije, suživot različitih populacija u ovom delu balkanskog poluostrva, kao i potvrdu da se protok gena dešavao između populacija.

Data je prva procena dobrobiti od primene terapije sa preparatom tetrahidrobiopterina u Srbiji. Ukupna učestalost mutacija (L48S, E390G, R261Q, R158Q i R413P) koje bi potencijalno pozitivno reagovala na tetrahidrobiopterin iznosi 40.2% u srpskoj populaciji.

Na osnovu korelacije genotipa i fenotipa u homozigotnim i funkcionalno hemizigotnim pacijentima, analiziran je efekat 9 mutacija u genu za PAH. Za tri retke mutacije (P225T, R413P, R297H) je po prvi put opisan *in vivo* efekat, a analiza ostalih mutacija (R252Q, R261Q, E390G, I306V, V177L) je u većini slučajeva pokazala slaganje sa predhodnim podacima. U slučaju L48S mutacije, koja je predhodno opisana kao mutacija koja dovodi do različitog efekta kod pacijenata, u srpskoj populaciji je zapažen

konzistentno težak efekat. Od mutacija koje su se našle u genotipu sa L48S mutacijom i dovele do klasične fenilketonurije, jedino efekat S231F mutacije, ranije nije bio proučavan u *in vitro* sistemima.

Iz tog razloga, po prvi put je urađena analiza efekta S231F mutacije u prokariotskom (*E. coli*) i eukariotskom (hepatoma) ekspresionom *in vitro* sistemu. Na osnovu esaja za aktivnost PAH, određeni su rezidualna aktivnost (1%) i nivo aktivacije supstratom (0.94) S231F PAH. Utvrđeno je da GroEL/GroES šaperoni ne dovode do povećanja količine i aktivnosti S231F PAH u prokariotskom sistemu, dok tetrahidrobiopterin dovodi do neznatnog povećanja količine S231F PAH u eukariotskom sistemu. Na osnovu ovih rezultata, S231F mutacija je okarakterisana kao funkcionalno „nulta“, što je upotrebjeno za kompletiranje korelacije genotipa i fenotipa funkcionalno hemizigotnih pacijenata sa teškom kliničkom slikom kod kojih je jedna od mutacija L48S. Time je potvrđen konzistentno težak efekat L48S mutacije u srpskoj populaciji.

Da bi rasvetlili poreklo visoke relativne učestalosti i konzistentnog fenotipskog efekta L48S mutacije u srpskoj populaciji, sprovedli smo haplotipsku studiju na pacijentima sa klasičnom fenilketonurijom, kod kojih je u genotipu prisutna L48S mutacija (jedan homozigot i 8 kombinovanih heterozigota). Istovremeno, po prvi put je u srpskoj populaciji ustanovljeno na kakvom hromozomskom okruženju se nalazi jedna mutacija u genu za PAH koja dovodi do fenilketonurije. Analizirali smo 6 bialelskih polimorfizama (*BglII*, *PvuIIa*, *PvuIIb*, *EcoRI*, *MspI* i *XmnI*) primenom PCR-RFLP metode i jedno multialelski polimorfizam (VNTR) pomoću PCR metode. Uočena je niska očekivana heterozigotnost (0.08) za *BglII*, *PvuIIa* i *PvuIIb* polimorfna mesta, dok je za *EcoRI*, *MspI* i *XmnI* polimorfna mesta, uočena visoka očekivana heterozigotnost (0.47 – 0.5). Utvrđeno je da se L48S mutacija kod pomenute grupe pacijenata nalazi na haplotipu 4.3 (70%) i haplotipu 28.3 (20%), dok u 10% slučajeva haplotip nije bilo moguće odrediti. S obzirom da su u srpskoj populaciji detektovana dva različita, predhodno opisana haplotipa, smatramo da L48S nije nastala *de novo* u srpskoj populaciji i da je u procesu migracija uneta u srpsku populaciju iz populacija sa različitim genetičkim osnovama posle čega je doživela ekspanziju (efekat osnivača ili genetički drift).

S obzirom na nedostatak podataka o uticaju regulacije transkripcije na varijabilnost fenotipa PKU, analizirani su delovi introna gena za PAH koji sadrže RFLP polimorfizme. *In silico* analiza primenjena je za odabir regiona koji je zatim analiziran metodama za identifikaciju interakcije između DNK i proteina (EMSA i South-Western blot). Funkcionalna karakterizacija regiona sprovedena je u eukariotskom (hepatoma) *in vitro* sistemu uz primenu CAT i beta galaktozidaznog esaja. Pokazano je da u osmom intronu gena za fenilalanin hidroksilazu postoji transkripcioni regulatorni element koji vezuje GATA-1 transkripcioni faktor i funkcioniše kao pojačivač. Ovo je prvi put da je za neki region u okviru PAH introna, pokazano da je regulatorni transkripcioni element.

U ovom radu, primenom raznovrsnih ali komplementarnih metoda identifikovane su mutacije u genu za fenilalanin hidroksilazu čoveka i analiziran je njihov efekat na modulaciju fenotipa. Polimorfizmi koji ne utiču na fenotipsku ekspresiju, iskorišćeni su kao sredstvo za analizu molekularne osnove PKU u srpskoj populaciji. Skrenuta je pažnja na ulogu intronskih regiona na ekspresiju gena za PAH, kao dodatnih, do sada neistraženih faktora koji utiču na kompleksan fenotip fenilketonurije.

Ključne reči: Aktivnost fenilalanin hidroksilaze; Efekat šaperona; Fenilketonurija; GATA-1; Genotip-fenotip korelacija; Haplotipska analiza; Mutacije u genu za fenilalanin hidroksilazu; Regulatorni transkripcioni element.

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is the most common inborn metabolic disease in Caucasians. Its incidence is 1/10000 in European populations and 1/12300 in Serbian population. PKU is transmitted in autosomal-recessive pattern, and it is caused by mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (*PAH*) which change structure and decrease activity of the enzyme (*PAH*) involved in the conversion of phenylalanine to tyrosine in the liver. Even though PKU is monogenic disease, the wide spectrum of different phenotypes was described. Since the most severe form of PKU phenotype (mental retardation) is developed as a consequence of the genotype-environment interaction (phenylalanine in the food), the early diagnosis and restriction of a dietary phenylalanine intake are essential. Although the neonatal screening of PKU in Serbia is conducted since 1980, we present the first complete study on molecular characterization of mutations and polymorphisms in the *PAH* gene. Implemented molecular diagnostics has application in precise diagnostics, genetic counseling and creates possibility for selection of patients that could benefit from tetrahydrobiopterin therapy.

34 unrelated patients were included in this study. According to pretreatment serum phenylalanine level, they were assigned to phenotypic categories: classical PKU (65%), mild PKU (35%). We designed the strategy and optimized methods for detection of mutations in the *PAH* gene of the patients with PKU from Serbia. By combining methods for indirect and direct mutation detection (multiplex 'broad range' DGGE for all 13 exons and their flanking intron regions, PCR-RFLP, PCR-ACRS and DNA sequencing analysis for selected regions) we reached mutation detection rate of 97%. We identified 19 disease-causing mutations (13 missense, 3 nonsense, 2 splice and 1 small deletion). The most frequent mutations were: L48S (21%), R408W (18%), P281L (9%), E390G (7%) and R261Q (6%), accounting for 60% of all mutant alleles. Interesting, L48S mutation, which was detected in many European populations, has the highest frequency in the Serbian population. The remaining mutations detected in the Serbian population (R158Q, I306V, IVS12+1G>A, Q20X, R111X, V177L, P225T, R261X, L15/S16fsCTdel, S231F, R252Q, R297H, IVS10-11G>A and R413P) occurred at frequency less than 5%. Additionally, we found some common silent mutations (Q232Q, V245V and L385L) and intron polymorphisms (IVS2-19T>C, IVS5-54A>G, IVS12-35C>T). The mutation data were incorporated into The Serbian National Mutation Frequency Database (www.goldenhelix.org/serbian/).

For the first time, the allele heterogeneity of the *PAH* locus in the Serbian population was analyzed. The homozygosity value of the *PAH* locus (0.10), as well as the genotypic homozygosity (8.82%) were low, indicating numerous historically documented migrations, co-existence of different populations in this part of the Balkan Peninsula, as well as confirmation that the gene flow occurred between populations.

We made preliminary estimation of the potential benefit of tetrahydrobiopterin supplementation therapy in Serbia. Total frequency of mutations (L48S, E390G, R261Q, R158Q and R413P) which could have positive response to tetrahydrobiopterin is 40.2% for the Serbian population.

On the basis of the genotype-phenotype correlation, studied in the homozygous and functionally hemizygous patients, we analyzed the effect of 9 mutations in the *PAH* gene. For three rare mutations (P225T, R413P, R297H), the *in vivo* effect was described for the first time. The effects of the majority of the remaining mutations (R252Q, R261Q, E390G, I306V, V177L) were in concordance with the previous data. However, for the L48S mutation, previously described as mutation that causes different effects in patients, we observed consistently severe effect in the Serbian population. Among the mutations found in compound L48S/Mut heterozygotes associated with classical PKU, only the effect of S231F mutation was not previously analyzed. Therefore, we characterized S231F *PAH* protein in prokaryotic (*E. coli*) and eukaryotic (hepatoma cells) *in vitro* expression systems. The enzyme activity assay for S231F *PAH*, showed that the residual enzyme activity was 1% and activation fold (0.94). The GroEL/GroES did not increase amount or activity of S231F *PAH* in prokaryotic system, while

tetrahydrobiopterin slightly increased amount of S231F PAH in eukaryotic system. On the basis of presented results, S231F mutation was characterized as a functionally null one. This finding was applied for completing the genotype-phenotype correlation in patients with classical PKU in whom one of the mutations was L48S. Thus, the consistently severe effect of L48S mutation in the Serbian population was confirmed.

In order to elucidate the prominence and phenotypic consistency of L48S detected in the Serbian population, we conducted the haplotype study on the patients with classical PKU, carriers of L48S (one homozygote and 8 compound heterozygotes). At the same time, the haplotype background on which a mutation had arisen, was investigated for the first time in Serbian population. We performed PCR-RFLP on six polymorphic sites (*Bgl*III, *Pvu*IIa, *Pvu*IIb, *Eco*RI, *Msp*I and *Xmn*I) and identified VNTRs by PCR analysis. We found that *Bgl*III, *Pvu*IIa and *Pvu*IIb polymorphic sites had low (0.08), while *Eco*RI, *Msp*I and *Xmn*I had high (0.47-0.5) expected heterozygosity. We found that L48S mutation was associated with haplotype 4.3 (70%) and haplotype 28.3 (20%), while in the 10% of the cases, haplotype could not be defined. Since, two different, previously described haplotypes were detected in the Serbian population, we concluded that L48S did not arise *de novo* in the Serbian population. We suggest that L48S was imported from populations with different genetic backgrounds and experienced the propagation afterwards by mechanisms of founder effect or genetic drift.

Considering the lack of the data about the effect of the regulation of transcription on PKU phenotypic variability, we analyzed intronic parts of the *PAH* gene that include RFLP polymorphisms. *In silico* analysis was conducted in order to select regions which were consequently analyzed by methods for identification of DNA/protein interaction (EMSA and South-Western blot). Functional characterization of the region was conducted in eukaryotic (hepatoma cells) *in vitro* expression system by using CAT assay and beta-galactosidase assay. We showed that a region within *PAH* gene intron 8 contains transcription regulatory element which binds GATA-1 transcription factor and acts as an enhancer. This was the first time that a region in the *PAH* intron was characterized as a regulatory transcription element.

In this study, different but complementary methods were used in order to identify the mutations in the human *PAH* gene and analyze their effects on phenotype modulation. Polymorphisms that do not influence phenotype, were used as a tool for analysis of molecular basis of PKU in the Serbian population. We pointed out the role of intronic regions on the expression of the *PAH* gene as additional, uncharacterized factors that have influence on phenylketonuria complex phenotype.

Key words: Chaperone effect; GATA-1; Genotype-phenotype correlation; Haplotype analysis; Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene; Phenylalanine hydroxylase activity; Phenylketonuria; Regulatory transcription element.

UVOD	1
GEN ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU	3
POLIMORFIZAM I MUTACIJA - TERMINOLOŠKO OBJAŠNJENJE.....	4
MUTACIJE U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU	4
<i>Tip mutacija</i>	4
<i>Efekat mutacija</i>	4
<i>PKU mutacije u Evropi</i>	5
POLIMORFIZMI U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU	5
HAPLOTIPSKI SISTEM GENA ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU	6
POVEZANOST MUTACIJA I HAPLOTIPSKOG SISTEMA.....	7
SUDBINA HAPLOTIPSKO ANALIZE	8
TRANSKRIPCIONA REGULACIJA EKSPRESIJE GENA ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU	9
EKSPRESIJA FENILALANIN HIDROKSILAZE U <i>IN VITRO</i> SISTEMIMA	11
STRUKTURA FENILALANIN HIDROKSILAZE ČOVEKA	12
STABILIZACIJA STRUKTURE ŠAPERONIMA	14
AKTIVNOST FENILALANIN HIDROKSILAZE	16
REGULACIJA AKTIVNOSTI FENILALANIN HIDROKSILAZE	16
EFEKAT MUTACIJA NA AKTIVNOST FENILALANIN HIDROKSILAZE	17
TETRAHIDROBIOPTERIN	17
POREMEĆAJ AKTIVNOSTI FENILALANIN HIDROKSILAZE ILI DEFICIJENCIJA BH4 DOVODE	
DO HIPERFENILALANINEMIJE I NEDOSTATKA TIROZINA U ORGANIZMU ČOVEKA	19
POSLEDICA POVIŠENOG NIVOA FENILALANINA	20
HIPERFENILALANINEMIJA I FENILKETONURIJA	21
KLASIFIKACIJA FENILKETONURIJE	21
KORELACIJA GENOTIPA <i>PAH</i> I FENOTIPA PKU.....	22
TERAPIJA FENILKETONURIJE TETRAHIDROBIOPTERINOM.....	23
FENILKETONURIJA U SRBIJI	24
 CIJ RADA	 25
 MATERIJAL I METODE	 27
MATERIJAL	28
PACIJENTI	28
ĆELIJSKE LINIJE	28
BAKTERIJSKI SOJEVI	28
PLAZMIDNI VEKTORI.....	28
PRAJMERI I OLIGONUKLEOTIDI	29
METODE ZA DETEKCIJU POLIMORFIZAMA U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU	32
IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRV I SOLJAVANJEM	32
IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRV I FENOL/HLOROFORM/IZOAMIL ALKOHOLOM	32
IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRV I NA KOLINI	32

ANALIZA DNK NA AGAROZNOM GELU	33
METODE ZA SKRINING I DETEKCIJU MUTACIJA.....	33
ELEKTROFOREZA NA GELU SA DENATURISUĆIM GRADIJENTOM (DGGE)	33
BOJENJE POLIAKRILAMIDNIH GELOVA SREBRONITRATOM.....	35
PCR-RFLP I PCR-ACRS METODE ZA DETEKCIJU MUTACIJA.....	35
ANALIZA DNK NA POLIAKRILAMIDNOM GELU	37
PCR-RFLP METODA ZA HAPLOTIPSKU ANALIZU	38
ANALIZA VARIJABILNOG BROJA TANDEMskih PONOVAKA (VNTR).....	39
SEKVENCIJIRANJE PCR PRODUKATA	40
RAČUNANJE HOMOZIGOTNOSTI.....	41
RAČUNANJE OČEKIVANE HETEROZIGOTNOSTI.....	41
METODE ZA ANALIZU POLIMORFIZMA U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU	
KAO REGULATORA GENSKE EKSPRESIJE.....	42
METODOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK	42
KULTIVISANJE BAKTERIJA.....	43
PRIPREMANJE KOMPETENTNIH ČELIJA <i>E. Coli DH5α</i>	44
TRANSFORMACIJA <i>E. Coli DH5α</i> KOMPETENTNIH ČELIJA.....	44
DETEKCIJA ŽELJENOG KONSTRUKTA	45
IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI (MINI PREP).....	45
IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI	46
IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA VELIKOJ SKALI	46
ČUVANJE TRANSFORMANATA	47
USLOVI GAJENJA ČELIJA U KULTURI	47
ODMRZAVANJE ČELIJA.....	48
ZAMRZAVANJE ČELIJA	48
SUBKULTIVACIJA ČELIJA.....	49
BROJANJE ČELIJA	49
IZOLOVANJE JEDARNIH PROTEINA.....	49
BRADFORD METODA	50
ANALIZA INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA.....	50
OBELEŽAVANJE OLIGONUKLEOTIDNE PROBE	50
METODA USPORENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI	51
SOUTH-WESTERN METODA	52
<i>Denaturišući SDS poliakrilamidni gel</i>	52
<i>Polusubi transfer proteina na membranu</i>	52
<i>Ostvarivanje interakcije DNK probe i proteina</i>	53
EKSPRESIJA KLONIRANOG GENA U HUMANIM HEP G2 ČELIJAMA	53
TRANSFEKCIJA PLAZMIDNE DNK U HEPATOCITE - LIPOFEKTAMINSKA TRANSFEKCIJA.....	54
PRIPREMA ČELIJSKIH EKSTRAKTA.....	54
CAT ELISA ESEJ.....	55
BETA GALAKTOZIDAZNI ESEJ.....	55

METODE ZA ANALIZU EFEKTA MUTIRANOG PROTEINA IN VITRO	57
MESTO-DIRIGOVANA MUTAGENEZA KLONIRANE DNK.....	57
DETEKCIJA PLAZMIDA KOJI NOSI ŽELJENU MUTACIJU	58
EKSPRESIJA WT I MUTIRANOG PAH U <i>E. COLI</i>	58
KO-EKSPRESIJA SA PROKARIOTSKIM ŠAPERONIMA U <i>E. COLI</i>	59
PRIPREMANJE PROTEINSKOG EKSTRAKTA.....	59
PRIPREMA AMILOZNE KOLONE.....	60
PREČIŠĆAVANJE FUZIONIH MBP-PAH PROTEINA.....	60
DETEKCIJA I ANALIZA PURIFIKOVANIH PROTEINA NA SDS GELU KOMAZI BOJENJEM	61
ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI FENILALANIN HIDROKSILAZE	61
USLOVI GAJENJA ČELIJA U KULTURI	62
TRANSFEKCIJA PLAZMIDNE DNK U HEPATOCITE - JetPEI TRANSFEKCIJA	62
PRIPREMA ČELIJSKIH EKSTRAKTA.....	63
WESTERN BLOT	63
<i>Denaturišući SDS poliakrilamidni gel.....</i>	63
<i>Transfer proteina na membranu.....</i>	63
<i>Blokiranje nespecifičnog vezivanja.....</i>	64
<i>Imunodetekcija.....</i>	64
REZULTATI.....	66
MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE PACIJENATA SA FENILKTENURIJOM U SRBIJI.....	67
<i>Strategije za detekciju mutacija.....</i>	67
<i>Spektar i učestalost PAH mutacija u srpskoj populaciji.....</i>	70
KORELACIJA GENOTIPA PAH I FENOTIPA PKU.....	72
IN VITRO FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA S231F PAH	73
<i>Prokariotski ekspresioni sistem.....</i>	73
<i>Eukariotski ekspresioni sistem.....</i>	75
HAPLOTIPSKA ANALIZA L48S MUTACIJE	77
XMNI POLIMORFIZAM KAO REGULATOR EKSPRESIJE GENA ZA PAH	80
<i>In silico analiza</i>	80
<i>Analiza interakcija DNK sa proteinima.....</i>	81
<i>Funkcionalna karakterizacija regulatornog cis-elementa</i>	84
DISKUSIJA.....	86
MUTACIJE U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU KAO MODULATORI FENOTIPA	87
<i>Broj i heterogenost mutacija u genu za PAH u srpskoj populaciji.....</i>	87
<i>Spektar i učestalost mutacija u genu za PAH u srpskoj populaciji.....</i>	88
<i>Učestalost mutacija u genu za PAH koje odgovaraju na terapiju tetrahidrobiopterinom</i>	91
ANALIZA EFEKTA MUTACIJE NA MODULACIJU FENOTIPA.....	91
<i>Genotip-fenotip korelacija</i>	91
<i>In vitro funkcionalna karakterizacija S231F PAH</i>	93

POLIMORFIZMI U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU KAO POPULACIONO-GENETIČKI MARKERI	96
POLIMORFIZMI U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU KAO REGULATORI GENSKE EKSPRESIJE	98
MUTACIJE I POLIMORFIZMI U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU I GENIMA MODIFIKATORIMA DOVODE DO KOMPLEKSNOG FENOTIPA PKU	99
ZAKLJUČCI	101
LITERATURA	103
ELEKTRONSKE BAZE PODATAKA.....	118

UVOD

Gen za fenilalanin hidroksilazu (**PAH**) čoveka odgovoran je za sintezu enzima fenilalanin hidroksilaze (**PAH**) koji katalizuje reakciju hidroksilacije fenilalanina u tirozin. Neki od polimorfizama u genu za **PAH** menjaju njegovu gensku ekspresiju, neki narušavaju funkcionalnost enzima dovodeći do promene fenotipa čitavog organizma, a neki svojim postojanjem omogućavaju uvid u kretanja populacija kroz ljudsku istoriju. Svi oni zajedno daju kompletnu sliku o najčešćem naslednom poremećaju aminokiselinskog metabolizma u populaciji belaca – **fenilketonuriji (PKU)**.

Na početku priče o različitim promenama u genu za **PAH** i efektima koje oni proizvode, navedeni su značajni momenti u razvoju znanja o fenilketonuriji koji su doveli do toga da se ona danas tretira kao jedna od prvih genetičkih bolesti čoveka koja može efikasno da se leči. Pronalazak terapije za fenilketonuriju doveo je do naučne revolucije u opštem stavu medicine prema genetičkim bolestima.

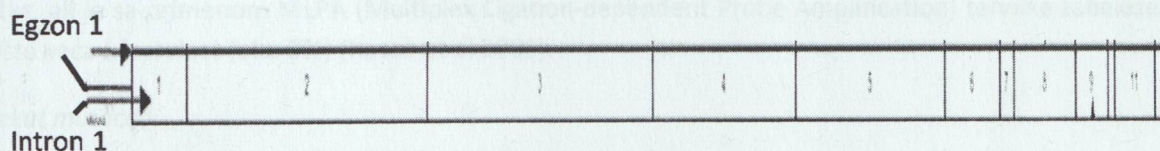
- | | | |
|---------|--|---|
| 1902 | Garrod je formulisao koncepte <i>hemijske individualnosti kod ljudi i postojanja metaboličkih puteva</i> . | |
| 1908 | Garrod je održao prestižno Croonian predavanje pod nazivom "Urođene greške metabolizma" u kome je opširnije obrazložio svoje koncepte i formulisao hipotezu <i>jedan gen, jedan enzim</i> . | |
| 1934 | Folling je otkrio i opisao oboljenje koje je nazvao "fenilpiruvična oligofrenija". Ovo oboljenje, povezano je sa mentalnom retardacijom, poseduje izmenjen metabolički fenotip i nasleđuje se po Mendelovim pravilima, kao autozomalno recesivno. | |
| 1937 | Penrose i Quastel su oboljenje preimenovali u fenilketonurija prema neobičnom produktu metabolizma koji je njegova karakteristika. | <i>MIM261600</i> |
| 1940-te | Penrose je, proučavajući uzroke mentalne retardacije, među prvima shvatio mogućnost promene štetnih posledica mutiranog gena pomoću ishrane. | |
| 1953 | Jervis je pokazao deficitarnu aktivnost enzima jetre, fenilalanin hidroksilaze (PAH). | <i>EC 1.14.16.1</i> |
| 1954 | Bickel je dokazao da ishrana osiromašena fenilalaninom može da spreči hiperfenilalaninemiju koja se javlja u fenilketonuriji i tako spreči mentalnu retardaciju. | |
| 1963 | Kaufman je otkrio da je tetrahidrobiopterin neophodan katalitički kofaktor fenilalanin hidroksilaze u reakciji konverzije fenilalanina u tirozin. | |
| 1963 | Guthrie i Susi su osmislili jednostavan laboratorijski test koji je lako mogao da se upotrebi pri neonatalnom skriningu. Zahvaljujući tome, širom sveta se u narednim godinama uvode neonatalni programi skrininga na fenilketonuriju i ova bolest tako postaje prototip genetičkog skrininga. | |
| 1983 | Woo je u časopisu <i>Nature</i> objavio otkriće cDNK gena za fenilalanin hidroksilazu čoveka (PAH).
<i>GenBank NM_000277 (iRKN); U49897.1 (cDNK)</i> | |
| | Konecki i saradnici su 2003. godine kompletirali genomsku sekvencu gena za PAH .
<i>GenBank AF404777 (gDNK)</i> | |
| 1990-te | <ul style="list-style-type: none"> • U brojnim populacijama analiziraju se mutacije u genu za PAH pacijenata obolelih od fenilketonurije. • Otkrivene mutacije se karakterizuju u <i>in vitro</i> sistemima • Intenzivno se proučava korelacija genotipa i fenotipa pacijenata sa nadom da će samo poznavanje genotipa biti dovoljno da se predvidi težina bolesti i osmisli režim ishrane. • Primećene nekonzistentnosti u genotip-fenotip korelacijama objašnjavaju se genskim modifikatorima, apsorpcijom i distribucijom amino kiselina, kao i endogenim metabolizmom i ekskrecijom. • Formira se sveobuhvatna lokus specifična baza podataka. | http://www.pahdb.mcgill.ca |
| 1999 | Erlandsen i Stevens kristališu enzim PAH i opisuju njegovu strukturu, omogućujući <i>in silico</i> analizu efekta mutacija | |
| 2000-te | Podstiču se istraživanja alternativnih genskih pristupa (terapija tetrahidrobiopterinom, genska terapija i druge). | |

GEN ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU

Prva saznanja o genu za fenilalanin hidroksilazu (*PAH*) datiraju sa početka osamdesetih godina XX veka. S obzirom da je bilo poznato da je uzrok fenilketonurije defektna fenilalanin hidroksilaza, gen za fenilalanin hidroksilazu čoveka, otkriven je funkcionalnim kloniranjem. Pošto je bilo poznato da je jetra mesto ekspresije gena za *PAH*, enzim je prečišćen iz jetre pacova. Napravljena su specifična antitela koja su upotrebljena za imunoprecipitaciju polizoma koji su sadržali *PAH* iRNK (Robson et al 1982). Nakon toga purifikovana iRNK pretvorena je u cDNK i pronađen je odgovarajući cDNK klon kod pacova. On je zatim iskorišćen kao proba radi izolacije cDNK čoveka iz cDNK biblioteke jetre čoveka (Woo et al 1983). Na osnovu istraživanja na genomskoj DNK normalnih homozigota, Woo i saradnici su zaključili da je gen za *PAH* verovatno jedinstvena sekvenca u genomu čoveka i da nema pseudogene (Woo et al 1983). S obzirom na prisustvo gena za *PAH* kod obolelih od fenilketonurije, smatrali su da bolest nije uzrokovana delecijom čitavog gena, već mutacijama koje menjaju strukturu i narušavaju funkciju enzima. (Woo et al 1983).

Nakon pionirskih radova Woo-a i saradnika (1983) i Kwok-a sa saradnicima (1985), Konecki i saradnici su 1992. odredili kompletnu sekvencu cDNK *PAH*. Zahvaljujući radovima ovih autora i projektu sekvenciranja ljudskog genoma (Venter et al 2001), nedavno je završena kompletna sekvenca gDNK *PAH* (Konecki et al 2003). Ove sekvence, kao i obilje drugih informacija o genu za *PAH*, dostupne su u bazi podataka o genu za *PAH* (<http://www.pahdb.mcgill.ca>) (Scriver et al 2000; Scriver et al 2003).

Gen za fenilalanin hidroksilazu nalazi se na hromozomu 12, u regionu 12q23.2 koji pokriva 1.5 Mbp i sem gena za *PAH* obuhvata još pet drugih gena nepoznate funkcije (International Human Genome Sequencing Consortium 2001; Lidsky et al 1985b; Venter et al 2001). Genomska sekvenca za *PAH* i njeni okolni regioni prostiru se na 171,266 bp, pri čemu 5'UTR pokriva oko 27 Kb, a 3' sekvenca nizvodno od poly(A) mesta u poslednjem egzonu oko 64.5 Kb. Trinaest egzona gena za *PAH* pokrivaju svega oko 2.88% genomske sekvence između start kodona i 3' poly(A) signala. Naime, postoje tri poliadenilaciona signala (AATAAA) u egzonu 13, s tim što se treći najčešće koristi. Najkraći egzon, dug je 57 bp (egzon 9), a najduži 892 (egzon 13), pri čemu je srednja dužina egzona 170 bp. Svi egzoni su kodirajući, a dužina iRNK je 2.4 kb. Što se tiče introna, najkraći je dug 556 bp (intron 10), a najduži 17,874 bp (intron 2), što dovodi do srednje dužine introna od 6,390 bp (Slika 1). Ove veličine su uobičajene za sisarske gene (Scriver 2007).



Slika 1. Šema gena za *PAH* predstavlja odnos dužina egzona (crte) i introna (pravougaonici).

Genomska sekvenca za *PAH* sadrži 40.7% GC nukleotida, što iznosi nešto iznad prosečne vrednosti za tipičan gen kod čoveka (37-38%). Gustina intermedijernih nizova je oko 42.2%, što odgovara vrednosti za sisarske gene. Repetitivne DNK sekvence su prilično česte, što dovodi do velikih delecija i duplikacija

(Kozak et al 2006). Alu ponovci se, prema kompjuterskoj predikciji, takođe nalaze u genomskoj sekvenci za PAH. U genu za PAH ima 1198 CpG ostrvaca, koja predstavljaju potencijalna mesta na kojima bi ista mutacija mogla nezavisno da nastane više puta (Scriver 2007).

POLIMORFIZAM I MUTACIJA - TERMINOLOŠKO OBJAŠNJENJE

U nekim disciplinama pojam "mutacija" koristi se da označi "promenu" dok se u drugim koristi da označi "promenu koja dovodi do razvoja bolesti". S druge strane, pojam "polimorfizam" se koristi da označi "promenu koja ne izaziva bolest" ili "promenu koja je u populaciji detektovana sa učestalošću $\geq 1\%$ ". Da bi se izbegla konfuzija, HGVS (Human Genome Variation Society) u svojim preporukama za nomenklaturu, savetuje korišćenje neutralnih pojmova poput "varijanta u sekvenci" ("sequence variant"), "promena" ("alteration") ili "alelska varijanta" ("allelic variant") (<http://www.hgvs.org/mutnomen/recs.html>). S obzirom da ovi preporučeni pojmovi još uvek nisu zaživeli u naučnoj terminologiji srpskog jezika, u odabiru naslova ove teze odlučili smo se za pojam **"polimorfizam"** želeći da jednim pojmom obuhvatimo, kako promene koje ne dovode, tako i one koje dovode do razvoja bolesti. Međutim u toku pisanja rada, nametnula se potreba da se različite "promene" nazovu uobičajenim terminom za oblast fenilketonurije - u skladu sa efektom do koga ona dovodi.

MUTACIJE U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU

Do sada je identifikovano više od 500 mutacija u genu za PAH koje dovode do razvoja fenilketonurije (PKU mutacija). Sve mutacije zabeležene su u bazi podataka PAH (<http://www.pahdb.mcgill.ca>), poštujući nomenklaturu preporučenu od strane HGVS organizacije. Tako se promena citozina u timin na poziciji 1222 u kodirajućoj DNK, na prvoj poziciji 408-og kodona, koja dovodi do zamene amino kiseline arginin amino kiselinom triptofan u proteinu, označava c.1222C>T na genomskom, odnosno p.R408W na proteinskom nivou.

Tip mutacija

Mutacije u genu za PAH su pretežno "missense" tipa (63%) i menjaju jednu amino kiselinu u proteinskoj sekvenci. Male delecije (13%) i mutacije koje menjaju mesto iskrajanja introna -splajsing (11%) su relativno česte, dok su mutacije koje dovode do promene amino kiseline u stop kodon - "nonsense" (5%) i male insercije (1%) relativno retke (Scriver 2007). Za velike delecije se ranije smatralo da su vrlo retke, ali je sa primenom MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) tehnike zabeležena nešto veća učestalost (oko 3%) (Kozak et al 2006).

Efekat mutacija

U zavisnosti od tipa, pozicije na kojoj se nalazi, kao i sličnosti između aminokiselinskih ostataka kada se radi o zameni amino kiselina ("missense"), mutacije u genu za PAH imaju različite efekte na strukturu i funkciju proteina PAH. O efektu mutacije na protein i modulaciju fenotipa biće reči kasnije.

PKU mutacije u Evropi

Molekularne studije, koje se u Evropi i Severnoj Americi sprovode od kraja osamdesetih XX veka, otkrile su spektar mutacija koje se javljaju kod pacijenata obolelih od fenilketonurije u većini evropskih zemalja i zabeležile značajne razlike u njihovoj relativnoj učestalosti.

Međutim, zbog metodoloških ograničenja korišćenih metoda (RFLP/Southern ili PCR-RFLP) prve studije su bile ograničene na detekciju samo nekih mutacija, za koje su autori predpostavljali da bi mogle biti česte u datoj populaciji (DiLella et al 1986). Tako su na značajnom delu fenilketonuričnih hromozoma, mutacije ostale neidentifikovane. Novije metode, pre svega elektroforeza na gelu sa denaturišućim gradijentom (DGGE) kojom je obuhvaćeno svih 13 egzona gena za *PAH* (Guldberg i Guttler 1994) i direktno sekvenciranje DNK, omogućile su dostizanje nivoa detekcije mutacija od preko 95%.

Zschocke je 2003, na osnovu do tada dostupnih podataka na PubMed-u, sproveo sveobuhvatnu studiju o *PAH* mutacijama u Evropi (Zschocke 2003). Došao je do zaključka da je učestalost fenilketonurije slična u evropskim zemljama i da odgovara učestalosti izračunatoj za belu populaciju, 1 : 10,000 (Bickel et al 1954). Dalje je zaključio da se 29 različitih mutacija može smatrati čestim u evropskim populacijama (imale su relativnu učestalost preko 3% u makar dve zemlje). Međutim, postoje značajne razlike u spektru mutacija između zemalja.

Što se tiče regiona jugoistočne Evrope, podaci su relativno ograničeni. Prvi podaci o frekvenciji mutacija u ovom regionu potiču iz studije o multicentričnom poreklu mutacija. U okviru ove studije za Mađarsku je detektovano pet mutacija, pri čemu mutacija R408W ima značajnu učestalost (49%) (Eisensmith et al 1992). Ovo su ujedno i jedini podaci o mađarskoj populaciji. Studija o pacijentima obolelim od fenilketonurije u Bugarskoj pokazuje da je najčešća mutacija u ovoj populaciji takođe R408W (35%). Učestalost IVS10-11G>A mutacije je izrazito visoka (25%) (Kalaydjieva et al 1993). Za Grčku i do današnjih dana postoje samo preliminarni podaci sa niskom stopom detekcije. Naime, od devet mutacija koje su analizirane, u grčkoj populaciji pronađeno je svega pet. Mutacije IVS10-11G>A (13%) i P281 (10%) nađene su sa značajnom relativnom učestalošću, međutim ne može se reći da su navedene mutacije najčešće u grčkoj populaciji (Traeger-Synodinos 1994). Za Rumuniju je urađena kompletna studija, koja je pokazala da su najčešće mutacije R408W (48%), c.1089delG (14%) i P225T (7%) (Popescu et al 1998).

Od zemalja sa prostora bivše Jugoslavije postoje podaci samo za Hrvatsku u kojoj je R408W takođe najčešća mutacija (37%), a zatim slede mutacije P281L (11%), R261Q (9%) i E390G (9%) (Zschocke et al 2003).

POLIMORFIZMI U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU

Sekvenca gena za *PAH* sadrži veliki broj polimorfizama – promena koje ne dovode do razvoja bolesti. Oni se obično svrstavaju u tri grupe.

Tihi tačkasti polimorfizmi (SNP, silent single nucleotide polymorphisms) dovode do promene u genomskoj sekvenci gena za *PAH*, ali se zahvaljujući izrođenosti genetičkog koda promena ne odražava

na protein. U SNP-ove spadaju Q232Q, V245V, L385L i drugi polimorfizmi. SNP-ovi zajedno dostižu učestalost od 7% ukupnog broja unosa u bazu podataka *PAH*. Detektovani su kako na mutiranom, tako i na normalnim hromozomima.

Bialelski polimorfizmi (RFLP, restriction fragment length polymorphism) imaju samo dve alelske varijante i nazvani su prema restrikcionom enzimu koji ih prepoznaje: *BglII* (intron 1), *PvuIIa* (intron 2), *PvuIIb* (intron 3), *EcoRI* (intron 5), *MspI* (intron 7), *XmnI* (intron 8) i *EcoRV* (3' region). Sa izuzetkom *EcoRV* mesta, koje zahteva analizu Southern metodom, ostali RFLP-ovi u genu za *PAH* mogu da se analiziraju primenom PCR-RFLP metode (Dworniczak et al 1991a; Dworniczak et al 1991b; Goltsov et al 1992b, Goltsov et al 1992c; Wedemeyer et al 1991).

Multialelski polimorfizmi obuhvataju tandemske ponovke varijabilnog broja (VNTR, variable number of tandem repeats) sa barem osam alelskih varijanti i kratke tandemske ponovke (STR, short tandem repeats) sa barem devet alelskih varijanti.

VNTR su tandemski ponovci varijabilnog broja i nalaze se 3 kb nizvodno od poslednjeg egzona u genu za *PAH*. Naime, analiza *HindIII* RFLP mesta, koje se nalazi nizvodno od VNTR sistema, karakterisala se prisustvom 3 fragmenta (4.0 kb, 4.2 kb i 4.4 kb) u Southern blot analizi. Detaljnom analizom *HindIII* fragmenta, otkriveno je da se ne radi o tačkastom polimorfizmu nego o tandemskim ponovcima koji variraju po broju (Goltsov et al 1992a).

Ponovci se neznatno razlikuju u sekvenci (CACATATATGTATA^GTGCATAT^CGTAC^{AT}G^ATAT^GG^A) i dugi su 30bp. Prema Goldsovu i saradnicima, dužina fragmenta od 380 bp odgovara prisustvu 3 tandemska ponovka, i sa porastom dužine za 30 bp, broj ponovaka se povećava za 1. Brojevi ponovaka koji su do sada zabeleženi kod čoveka su 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12 i 13 (Goltsov et al 1992a; Kamkar et al 2003). U odnosu na dužine fragmenata koje su dobijane prilikom *HindIII* Southern blot analize, pokazano je da dužina od 4.0 kb odgovara broju od 3 ponovka, dužina od 4.4 kb odnosi se na 12 ponovaka (13 ponovaka je veoma retko), a varijabilna traka od 4.2 kb, zapravo obuhvata ostale ponovke.

STR su tetranukleotidi, (TCTA)_n, koji se javljaju u barem 9 varijanti u trećem intronu gena za *PAH*. Goltsov i saradnici su identifikovali ovaj polimorfni sistem u genu za *PAH*, međutim koristili su radioaktivno obeležene PCR produkte koje su razdvajali na PAGE gelu da bi odredili veličine. Na ovaj način, fragmenti koje su identifikovali kretali su se u opsegu od 228 bp do 260 bp i bili za 2 bp duži nego što bi trebalo (Goltsov et al 1993). Nakon uvođenja metode sa fluorescentnim obeležavanjem, dobijeni su fragmenti tačnih dužina, od 226 do 258 bp (Zschocke et al 1994). Iako se u nekim radovima mogu naći dužine po Goltsovu, tačne dužine, po Zschocke-u su danas opšte prihvaćene.

HAPLOTIPSKI SISTEM GENA ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU

Sedam bialelskih i jedno trialelsko (*HindIII*) RFLP mesto su ranije analizirani pomoću Southern blota i korišćeni su za određivanje haplotipova na lokusu *PAH*. Od 384 (2⁷ x 3) haplotipa, teorijski moguća na osnovu nezavisnog kombinovanja navedenih mesta, kod čoveka je detektovan samo mali broj (Eisensmith i Woo 1992). Kada se u haplotipski sistem uključe i VNTR-ovi, teorijski broj mogućih haplotipova dostiže 1,024 (2⁷ x 8), a sa STR-ovima taj broj raste na 9,216 (2⁷ x 8 x 9). Iako je moguće

zamisliti nekoliko hiljada različitih *PAH* haplotipova kombinovanjem 7 bialelskih i 2 multialelska mesta, daleko manji broj je zaista prisutan na ljudskim hromozomima, za sada je zabeleženo 87. Šta više, u jednoj studiji je ukazano da samo pet haplotipova- 1, 2, 4, 5 i 7 – karakteriše više od 76% normalnih hromozoma, a samo 4 haplotipa – 1, 2, 3 i 4 – karakterišu više od 80% PKU hromozoma (Daiger, 1989). Ova pojava se može objasniti neravnotežom vezanih gena (linkage disequilibrium) 100 kb dugog genskog lokusa za *PAH* (Scriver and Kaufman 2001).

Dakle, kombinacijom RFLP, VNTR i STR alela dobijaju se **ekstenzivni *PAH* haplotipovi** koji se označavaju arapskim brojevima. Zbog naknadnog uključivanja VNTR-ova u sistem ekstenzivnih haplotipova, nakon arapskog broja koji označava RFLP haplotip, dodaje se tačka i arapskim brojem se označava broj tandemskih ponovaka prisutnih u okviru datog haplotipa (npr. haplotip 2 sa 3 VNTR ponovka, obeležava se: H2.3). Haplotipovi za koje su bile karakteristične 4.0 kb i 4.4 kb *HindIII* trake, uvek imaju 3 odnosno 12 ponovaka, dok oni kod kojih je ranije bilo zabeleženo prisustvo 4.2 kb *HindIII* trake, postaju dodatno polimorfni (Eisensmith i Woo 1992). Označavanje STR sistema ne govori o broju, već o dužini po Zschocke-u (npr. STR 238).

Dalje su Eisensmith i saradnici ukazali da se kombinacijom analize **STR-ova, VNTR-ova i *XmnI* RFLP mesta** dostiže 95% heterozigotnosti i dobija visoka informativnost za prenatalnu dijagnostiku i skrining nosilaca mutiranog gena (Eisensmith et al 1994). Zschocke je sa saradnicima predložio kombinaciju samo VNTR-ova i STR-ova koju je nazvao **mini haplotip**. U odnosu na ekstenzivne haplotipove, mini haplotipove je lakše analizirati, potrebna je analiza jednog roditelja, a što se tiče mutacione analize, podjednako su informativni kao i ekstenzivni haplotipovi (Zschocke et al 1995). Međutim, za razliku od RFLP-ova i VNTR-ova koji su prilično stabilni i do promene uglavnom dolazi zbog rekombinacije, STR aleli su daleko češće podložni promenama zbog "proklizavanja" u toku transkripcije (Schlotterer i Tautz 1992; Weber i Wong 1993). Iz tog razloga, ekstenzivni haplotipovi se nipošto ne mogu zaobići u studijama koje se bave određivanjem porekla mutacije i populaciono-genetičkim studijama (Zschocke et al 1995). Zschocke je sa saradnicima osmislio još jednu varijantu haplotipova, koja je uključivala kombinaciju tri RFLP mesta (*BglII*, *PvuII* i *MspI*), VNTR-ove, STR-ove i tihe tačkaste polimorfizme (Q232Q, V245V, L385L i IVS3-22T). Ovi, takozvani **modifikovani haplotipovi**, kompatibilni su sa ekstenzivnim haplotipovima i informativni su za donošenje zaključka da li se neka mutacija u datoj populaciji ima jedinstveno poreklo (Zschocke i Hoffmann 1999). Zanimljivo je istaći da su razlike u STR-ovima u ovoj studiji bile zanemarivane upravo zbog manje stabilnosti u okviru ovog polimorfnog sistema.

Drugi autori su većinom koristili VNTR-ove i STR-ove kao dodatak punim RFLP haplotipovima u cilju povećanja rezolucije haplotipske analize i kvalitetnijeg razjašnjavanja porekla i migratornih kretanja mutacije (Cali et al 1997; Tighe et al 2003).

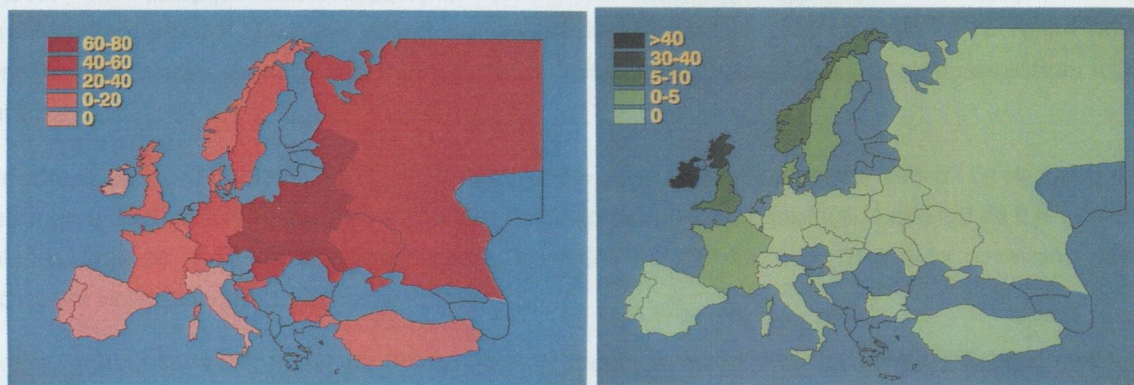
POVEZANOST MUTACIJA I HAPLOTIPSKOG SISTEMA

Česti haplotipovi su obično povezani sa više različitih mutacija. Tako je na primer vrlo česti haplotip 1 povezan sa R408W, P281L, R261Q, Q20X i drugim mutacijama.

Takođe, ista mutacija može nezavisno da se dogodi na dva ili više različita haplotipa. Dobro dokumentovan takav slučaj je R408W mutacija koja je u Severozapadnoj Evropi povezana sa haplotipom

1.8, a u Istočnoj Evropi sa haplotipom 2.3 (Eisensmith et al 1995) (Slika 2). Ponovno javljanje mutacije naročito je zapaženo u slučaju onih mutacija koje se nalaze na CpG ostrvcima (Zschocke 2003).

U okviru jednog haplotipa primećeno je prisustvo više različitih VNTR-ova (npr. mutacija P281L se javlja na H1.7 i H1.8) (Goltsov et al 1992a). Dalje, s obzirom na varijabilnost u sekvenci ponovaka, postoji mogućnost da VNTR haplotipovi koji su isti po broju ponovaka, budu polimorfni u odnosu na sekvencu. Isto tako, u slučaju jednog RFLP haplotipa u kombinaciji sa jednoobraznim VNTR sistemom, zabeležene su razlike u STR sistemu (npr. mutacija R408W povezana je sa H1.8-b5 i STR 234 bp i 242 bp) (Tighe et al 2003).



Slika 2. Distribucija učestalosti R408W-H2.3 (levo) i R408W-H1.8 (desno) u Evropi.

Moguće je da povezanost različitih mutacija sa istim VNTR alelom ukaže da su se mutacije dogodile nakon formiranja VNTR alela. Isto tako, postojanje istog VNTR alela na različitim RFLP haplotipovima teoretski bi moglo da znači da se VNTR oformio pre promene u RFLP mestima. Zaključak o primarnoj strukturi u okviru koje se dogodila promena koja je dovela do divergencije, može se doneti na osnovu podataka o učestalosti i distribuciji RFLP haplotipova, VNTR alela i mutacija u genu za *PAH* za datu populaciju (Goltsov et al 1992a).

Važno je istaći da haplotipska analiza zahteva analizu DNK uzoraka roditelja. S obzirom da su podaci o haplotipovima dostupni samo za neke PKU studije, zapravo je teško razlikovati mutacije koje su nezavisno nastale više puta od onih koje su identične po poreklu. Čak i u PKU studijama koje su se bavile određivanjem haplotipova, uzorci roditelja bili su dostupni samo za deo pacijenata uključenih u studiju, pa su haplotipovi kombinovanih heterozigotnih pacijenata često zaključivani na osnovu očekivanih, predhodno utvrđenih, haplotipova za česte mutacije. Iako su rezultati dobijeni na ovaj način uglavnom tačni, sigurno se nekad dešavaju i greške koje dovode do pogrešnih zaključaka (Zschocke 2003).

SUDBINA HAPLOTIPKE ANALIZE

U vreme kada je po prvi put opisana cDNK gena za *PAH*, već je bilo poznato da u genomu različitih individua postoje mnogobrojne nukleotidne zamene koje nemaju fenotipsku ekspresiju ali mogu biti detektovane pomoću restrikcionih enzima i Southern blot metode (Woo et al 1983).

Postojanje RFLP alelskih sistema omogućilo je prve analize gena za *PAH* pacijenata obolelih od fenilketonurije (Chakraborty et al 1987; Lidsky et al 1985a).

U cilju prenatalne dijagnostike i genetičkog savetovanja, nekada je bilo važno otkriti samo da li je dete nosilac haplotipova povezanih sa bolešću. Analizom alelskih sistema, mutacija u genu za *PAH* ostajala je nepoznata. Danas se prenatalna dijagnostika ne savetuje trudnicama sa rizikom da dobiju dete sa fenilketonurijom. Smatra se da postojanje dve mutacije u genotipu deteta nije razlog za prekidanje trudnoće jer se dete, uz adekvatan dijetalni tretman, razvija normalno. S druge strane postalo je daleko značajnije identifikovati mutacije koje dete nosi radi pokušaja da se predvide težina bolesti i eventualni odgovor na terapiju tetrahidrobiopterinom (vidi: Korelacija genotipa i fenotipa, Terapija tetrahidrobiopterinom). Zato su, nakon kompletne karakterizacije gena za *PAH* i s razvojem novih i jednostavnijih tehnika za detekciju mutacija (PCR, DGGE, sekvenciranje i dr), haplotipski sistemi izgubili značaj.

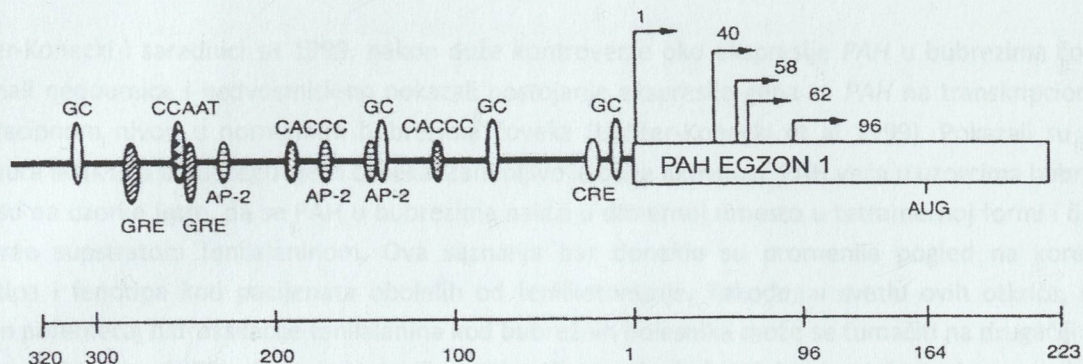
Međutim, s obzirom da RFLP, VNTR i STR nude obilje informacija, haplotipski sistemi će nastaviti da se analiziraju u populaciono-genetičke svrhe. Bez haplotipske analize nemoguće je utvrditi da li je određena mutacija, koja se javlja na više hromozoma, identična po poreklu ili je više puta nezavisno nastala (Zschocke i Hoffmann 1999; Zschocke 2003).

Takođe, polimorfni haplotipovi na lokusu za *PAH* mogu se koristiti za istraživanje ljudske evolucije i istorije ljudskih populacija. Razdvajanje između afričkih, evropskih i azijskih populacija dokumentovano je zahvaljujući analizi haplotipova gena za *PAH*. Isto tako, mogu se predvideti predački haplotipovi na kojima su nastale neke savremene haplotipske konfiguracije ili se za određeni alel može otkriti poreklo u smislu geografskog regiona i populacije u kojoj je nastao. Pored toga, određena genetička struktura lokusa za *PAH* neke populacije (skup haplotipova u okviru nje), daje uvid u njenu demografsku istoriju i funkcioniše kao trag o migracijama koje su se dešavale na velikim prostorima i u dugom vremenskom periodu (Scriver i Kaufman 2001).

TRANSKRIPCIONA REGULACIJA EKSPRESIJE GENA ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU

Pokazano je da se u 5'UTR regionu gena za *PAH* nalazi pet potencijalnih mesta inicijacije transkripcije (CAP), od kojih se najudaljenije nalazi 154 nukleotida uzvodno od prvog kodona (Konecki 1992). Po konvenciji, A u prvom (ATG) kodonu označava se sa +1, tako da se nukleotidi u 5'UTR označavaju negativnim brojevima. Promotor, koji se nalazi tik uzvodno od CAP mesta nema TATA-box, ali sadrži druge regulatorne elemente (GC boks, CACCC boks, CCAAT boks, Ap-2 mesto, delimični GRE i delimični CRE) (Konecki 1992) (Slika 3). Konecki i saradnici zaključili su da gen za *PAH* čoveka poseduje "TATA-less" promotor koji je regulisan pomoću većeg broja transkripcionih faktora. *PAH* iRNK koja nastaje u procesu transkripcije duga je oko 2.4 kb (svih 13 egzona su kodirajući).

Ekspresija gena za *PAH* je specifična za tkivo i fazu razvića. Kod čoveka i drugih primata, gen za *PAH* se pre svega eksprimira u jetri. U toku embrionalnog razvića, aktivnost enzima *PAH* pokazana je već u prvom trimestru. S obzirom da postojanje aktivnosti koincidira sa prisustvom *PAH* iRNK, smatra se da je osnovni nivo regulacije ekspresije gena za *PAH* upravo na transkripcionom nivou.



Slika 3. Šematski prikaz proksimalnog promotora gena za *PAH*.

Poznato je da brojne promotorske i enhanserske sekvence upravljaju specifičnom ekspresijom gena. Čelijski transkripcioni faktori prepoznaju i vezuju se za odgovarajuće *cis* elemente i na taj način iniciraju transkripciju ili regulišu njen intenzitet. Tkivno-specifična regulacija postiže se finim balansiranjem različitih transkripcionih faktora između različitih tkiva (Strachan and Read, 1999).

Wang i saradnici su 1992. napravili nekoliko linija transgenih miševa koji su nosili fuzioni gen sačinjen od 9-kb 5' fragmenta gena za *PAH* čoveka i *CAT* gena i pokazali da odabrani 9-kb fragment zaista upravlja tkivno-specifičnom ekspresijom i ekspresijom karakterističnom za faze razvika gena za *PAH*. Međutim, neznatne razlike u distribuciji 9-kb/*CAT* i endogene *PAH* na imunohistohemijskim preparatima, ukazale su da odabranom 9-kb 5' fragmentu ipak nedostaju neki *cis* elementi uključeni u preciznu regulaciju ekspresije gena za *PAH* (Wang et al 1992). Međutim, po našim saznanjima, do sada se niko nije bavio traženjem *cis*-regulatornih elemenata izvan 9-kb 5' fragmenta gena za *PAH*, odnosno u preostalih 90% gena.

I naredne studije vršene su u okviru istog 9-kb fragmenta gena za *PAH*. Okarakterisan je minimalni promotor koji sadrži dva funkcionalna regulatorna elementa, za koje se pokazalo da nisu tkivno specifični (Wang et al 1994). Nešto kasnije su u istom 9-kb 5' fragmentu gena za *PAH*, identifikovana i dva vezivna mesta za hepatični nuklearni faktor 1 (HNF1) za koje je pokazano da funkcionišu nezavisno od prisustva hormona (Lei i Kaufman 1998). Naime, ekspresija gena za *PAH* kod čoveka, uprkos prisustvu dva delimična glukokortikoid-specifična elementa (GRE) i dva CACCC boksa (Slika 3), nezavisna je od glukokortikoida i/ili cAMP za razliku od gena kod miša gde je ekspresija gena zavisna od hormonske ekspresije (Bristeau et al 2001).

HNF1 je transkripcioni faktor uključen u regulaciju ekspresije velikog broja gena koji su tkivno-specifični za jetru (npr. albumin, antitripsin). Sem u jetri, HNF1 se eksprimira i u bubrežima, pankreasu i digestivnom traktu (Lei i Kaufman 1998).

Wang i saradnici nisu detektovali značajniju količinu endogene *PAH* u drugim tkivima, sem u jetri i bubrežima transgenih miševa (Wang 1992). Eksperimentalni rezultati i drugih autora navodili su na

zaključak da je ekspresija gena za *PAH* ograničena na jetru kod čoveka i jetru i bubrege kod pacova (Murthy i Berry 1975).

Lichter-Konecki i saradnici su 1999. nakon duže kontroverze oko ekspresije *PAH* u bubrezima čoveka, odagnali nedoumice i nedvosmisleno pokazali postojanje ekspresije gena za *PAH* na transkripcionom i translacionom nivou u normalnim bubrezima čoveka (Lichter-Konecki et al 1999). Pokazali su da je struktura iRNK ista u bubregu i jetri čoveka. Zanimljivo je da je aktivnost *PAH* veća u uzorcima bubrega u odnosu na uzorke jetre, da se *PAH* u bubrezima nalazi u dimernoj umesto u tetramernoj formi i da nije aktiviran supstratom fenilalaninom. Ova saznanja bar donekle su promenila pogled na korelaciju genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od fenilketonurije. Takođe, u svetlu ovih otkrića, ranije opisan poremećaj hidroksilacije fenilalanina kod bubrežnih bolesnika može se tumačiti na drugačiji način (Young i Parsons 1973). Naredne studije, pokazale su da bubrezi imaju važnu ulogu u ukupnoj hidroksilaciji fenilalanina u tirozin u ljudskom telu (Moller et al 2000; Tessari et al 1999).

Sem ekspresije u bubrezima, transkripti gena za *PAH* su detektovani i u pankreasu. Zajedničko poreklo jetre i pankreasa, kao i prisustvo HNF1 daju objašnjenje za slabu ekspresiju u pankreasu (Lichter-Konecki et al 1999).

Ilegitimna (ektopična) transkripcija predstavlja nizak nivo transkripcije tkivno-specifičnih gena izvan tkiva u kome su normalno ekspimirani. Pokazano je da postoji bazalni nivo transkripcije gena za *PAH* u belim krvnim ćelijama, K562 eritroleukemičnim ćelijama i ćelijama iz horionskih vilusa (Sarkar i Sommer 1989). Veoma mali broj transkripata gena za *PAH* iz nehepatičnog tkiva može biti amplifikovan upotrebom RT-PCR metode tako da količina dobijene cDNK bude dovoljna za dalju analizu. S obzirom da je cDNK (2.4 kb) daleko manja od genomske DNK (oko 90 kb) gena za *PAH*, a pri tome je lako dostupna iz limfocita, ona je rado korišćena za detekciju mutacija kod pacijenata obolelih od fenilketonurije (Abadie et al 1993; Devi et al 1998; Okano et al 1994; Ramus et al 1992; Takahashi et al 1992). Međutim, prema našim saznanjima, niko nije istraživao osnovu ilegitimne transkripcije u nehepatičnim tkivima u kojima nisu prisutni transkripcioni faktori karakteristični za jetru.

Interesantno je da su Scriver i Waters istakli da bi polimorfizmi u genu za *PAH* i njima odgovarajuće ekstenzivne haplotipske strukture, mogli da utiču na transkripciju i ekspresiju gena za *PAH*, kao i da ovi potencijalni regulatorni elementi još uvek nisu analizirani (Scriver i Waters 1999).

EKSPRESIJA FENILALANIN HIDROKSILAZE U *IN VITRO* SISTEMIMA

S obzirom da je protein *PAH* u dovoljnoj meri ekspimiran samo u jetri i bubrezima čoveka, direktna analiza mutiranih enzima kod pacijenata obolelih od fenilketonurije nije moguća. Ledley i saradnici su razvili alternativni pristup – *in vitro* ekspresionu (IVE) analizu enzima *PAH* (Ledley et al 1985; Ledley et al 1987). Njihova analiza podrazumevala je kloniranje normalne (wild type, wt) cDNK gena za *PAH* čoveka u plazmidni vektor, njegovu transfekciju u ćelije u kojima nema endogenog enzima *PAH* i karakterizaciju nastalog funkcionalnog enzima. Ovo je otvorilo put *in vitro* ekspresionim analizama u kojima se mutacija u gen za *PAH* uvodi pomoću mesto-dirigovane mutageneze da bi se ekspimirao odgovarajući mutirani enzim. *In vitro* analize su dragocen metod za istraživanje efekta mutacije na strukturu i funkciju enzima *PAH*.

In vitro ekspresione analize mutacija koje su prisutne kod čoveka i koje dovode do razvoja bolesti daju odgovor na tri srodna pitanja: 1) potvrđivanje da je mutacija koja je povezana sa bolešću kod pacijenta uistinu mutacija koja dovodi do razvoja bolesti, 2) procena težine efekta mutacije na protein (važno i za korelaciju genotipa sa fenotipom) i najaktuelnije pitanje 3) razumevanje molekularnog mehanizma tj. načina na koji mutacija dovodi do narušavanja funkcionalnosti enzima (Waters 2003).

Do sada je oko 100 različitih mutacija u genu za PAH, od kojih je ogromna većina "missense" tipa, okarakterisano *in vitro* (<http://www.pahdb.mcgill.ca>). Neke od mutacija analizirane su u više ekspresionih sistema. S obzirom da ne postoji ni jedan savršen *in vitro* sistem, koji bi bez greške dočarao situaciju *in vivo*, tek kada se rezultati iz različitih sistema razmatraju u kombinaciji, dolazi se do potpunije informacije o analiziranoj mutaciji.

Permanentne sisarske ćelijske linije (humane hepatoma ćelije, COS ćelije, humane ćelije bubrega A293 i druge) su u poređenju sa ostalim *in vitro* ekspresionih sistema, najpribližnije *in vivo* sredini (Waters 2003).

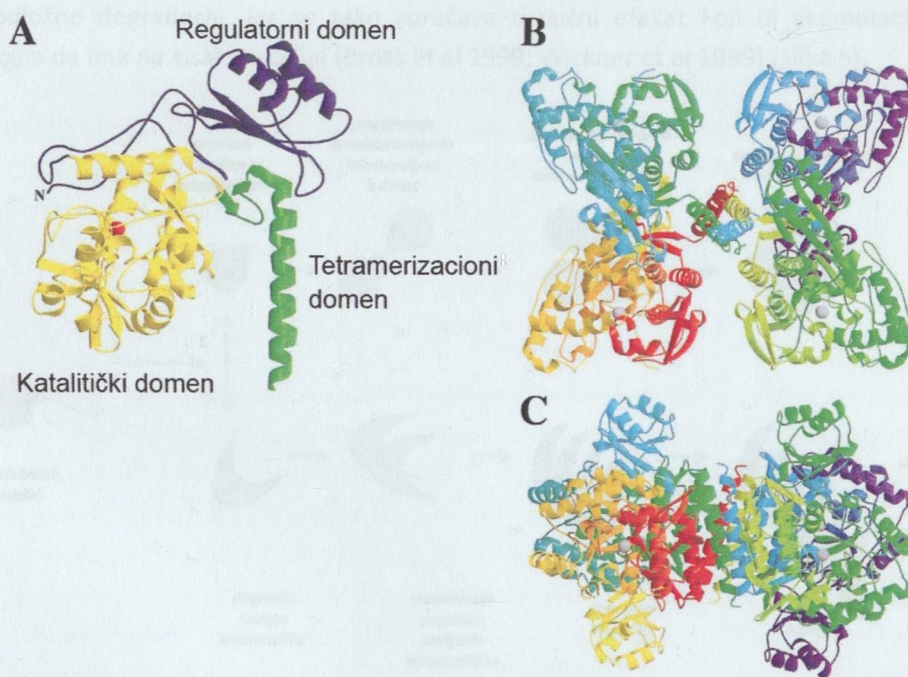
S druge strane ekspresija u *E. coli* omogućava proizvodnju i prečišćavanje velikih količina enzima PAH koje se onda koriste za detaljne strukturne i funkcionalne analize. Onaj pristup je omogućio i dobijanje kristalne strukture wtPAH (vidi: Struktura fenilalanin hidroksilaze). Međutim, čak je i wtPAH enzim podložan proteolitičkoj degradaciji u *E. coli*. Ovo je problem koji se često sreće kod ekspresije heterologih – sisarskih proteina u bakterijama. Naravno, ovo ometa izolaciju i analizu intaktnih proteina. Martinez i saradnici su napravili značajan pomak po ovom pitanju osmisivši alternativni sistem u kome se PAH eksprimira u *E. coli* kao fuzioni protein sa proteinom koji vezuje maltozu (maltose binding protein, MBP) (Martinez et al 1995). Ne samo da je u ovom sistemu PAH-MBP zaštićen od degradacije, već je omogućeno i olakšano prečišćavanje na amiloznoj koloni. Takođe, pokazano je da MBP veoma uspešno pomaže polipeptidu sa kojim je fuzionisan da ostane u solubilnoj formi (Kapust i Waugh 1999). Iako se na prvi pogled čini da se konstrukcijom fuzionog proteina udaljujemo od *in vivo* situacije, ovaj pristup je opšte prihvaćen zbog značajnih prednosti koje nudi i proverenih rezultata koje daje (Gamez et al 2000; Pey et al 2003).

Čak i kada se eksprimira kao PAH-MBP fuzioni protein, u *E. coli* sistemu se u manjoj ili većoj meri formiraju proteinski agregati. Formiranje agregata u prokariotskom sistemu ne znači automatski da bi mutirana PAH formirala agregate i u ćelijama čoveka *in vivo*. Naime, akumulacija agregata posledica je visokog nivoa ekspresije PAH u *E. coli*, kao i značajno drugačije unutarćelijske sredine u odnosu na eukariotsku ćeliju, u kojoj su senzitivnost i specifičnost sistema za degradaciju proteina daleko veći. Iz tog razloga, prokariotski ekspresioni sistem pre svega treba da pokaže da li je mutacija u genu za PAH sama po sebi uzrok nepravilnog pakovanja polipeptida (folding) ili poremećaja u formiranju dimera i tetramera enzima PAH (vidi: Stabilizacija strukture šaperonima)(Waters 2003).

STRUKTURA FENILALANIN HIDROKSILAZE ČOVEKA

Fenilalanin hidroksilaza čoveka (hPAH, EC 1.14.16.1) je uglavnom proučavana u *in vitro* sistemima, ali je predhodno pokazano da njene kinetičke i fiziko-hemijske osobine odgovaraju

osobinama pokazanim za enzim izolovan iz jetre čoveka. Rekombinantni hPAHwt nalazi se u obliku homodimera i homotetramera, koji su u ravnoteži, na pH 7.0 postiže optimalnu katalitičku aktivnost, a izoelektrična tačka je na oko 5.0 (Martinez et al 1995). Molekularna težina jedne subjedinice iznosi oko 50 kDa (između 50 i 53 kDa, u zavisnosti od fosforilacije na Ser-16) i sastoji se od 452 aminokiseline (AK). Svaka subjedinica sastoji se iz tri domena: regulatornog (1-142 AK), katalitičkog (143-410 AK) i tetramerizacionog (411-452 AK) (Slika 4, A). Regulatorni domen sadrži standardni α - β sendvič motiv, inače uobičajen za regulatorne domene. Sa jedne strane β -ploče, koja se sastoji od četiri antiparalelna lanca, nalaze se dve kratke α -spirale, a sa druge strane je katalitički domen (Kobe et al 1999). Katalitički domen ima oblik korpe i sačinjen je od 14 α -spiral i 8 β -lanaca. Gvožđe (Fe III) koje je neophodno za funkcionisanje fenilalanin hidrosilaze, nalazi se u okviru aktivnog centra katalitičkog domena, koordinativno vezano za His285, His290 i Glu330. U blizini atoma gvožđa, nalaze se i mesta vezivanja supstrata (L-Phe) i kofaktora (BH₄) (Anderson i Flatmark 2001; Anderson et al 2002; Erlandsen et al 2000). Kratki tetramerizacioni domen sastoji se od dva antiparalelna β -lanca i jedne C-terminalne α -spirale koja se prepliće sa α -spiralama ostalih subjedinica (coiled-coil) formirajući jezgro tetramera (Slika 4, B).



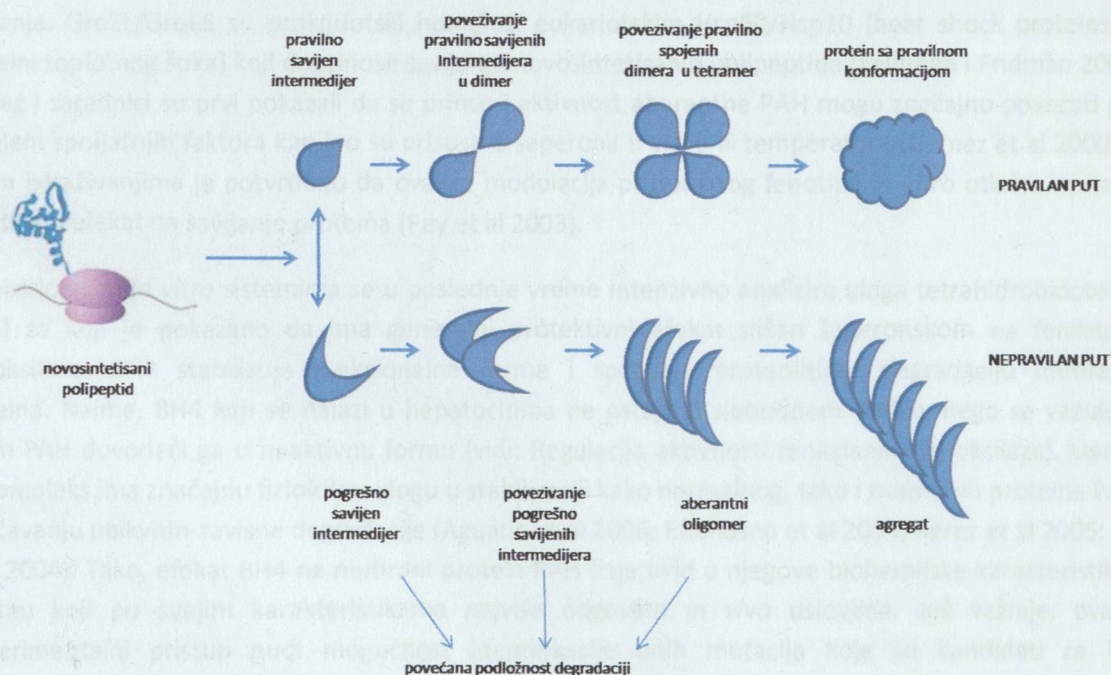
Slika 4. Model strukture fenilalanin hidrosilaze čoveka (Erlandsen i Stevens 1999). A-Struktura subjedinice PAH u kojoj je atom gvožđa prikazan kao crvena sfera; B i C-Dva pogleda na strukturu kompletne tetramerne fenilalanin hidrosilaze. Boje se smenjuju od crvene (N-terminalni kraj subjedinice 1) do plave (C-terminalni kraj subjedinice 4), pri čemu je atom gvožđa prikazan kao siva sfera u svakoj subjedinici.

Na osnovu kristalnih struktura nekoliko delova fenilalanin hidrosilaze, uključujući regulatorni/katalitički domen (Kobe et al 1999) i katalitički/tetramerizacioni domen (Erlandsen et al 1997; Fusetti et al 1998) na osnovu preklapanja katalitičkog dela, konstruisan je potpuni model enzima PAH (Slika 4, B, C). Na ovaj

način, struktura enzima PAH detaljno je opisana i postalo je moguće razumeti promene do kojih dovodi zamena jedne aminokiseline drugom (Erlandsen i Stevens 1999; Jennings et al 2000). Šta više, omogućeno je molekularno modelovanje aberantnih enzima i *in silico* analiza efekta mutacije (Pey et al 2007). Ipak, *in vitro* analize ostaju nezamenljive u cilju utvrđivanja efekta mutacije.

STABILIZACIJA STRUKTURE ŠAPERONIMA

Bilo koji novosintetisani polipeptid, bilo da je u pitanju normalni ili mutirani, može biti usmeren ka pravilnom ili aberantnom putu za pakovanje u terciarnu strukturu (folding) i sklapanje u dimere i tetramere (Betts et al 1997). Naime, novosintetisani polipeptid počinje da formira nekoliko različitih intermedijernih formi koje predhode finalnoj formi sa pravilnom tercijernom konformacijom. Među intermedijernim formama nalaze se one koje su na putu da postignu pravilnu konformaciju, kao i one koje se pogrešno savijaju. Samo pravilno savijene subjedinice će se pravilno povezati i formirati funkcionalne tetramere. S druge strane, pogrešno savijene subjedinice imaju tendenciju da se povezuju preko svojih greškom izloženih hidrofobnih delova formirajući aberantne oligomerne forme koje nastavljaju međusobno da se povezuju i konačno formiraju agregate. Pogrešno savijene subjedinice su naročito podložne degradaciji, jer se tako sprečava toksični efekat koji bi akumulacija proteinskih agregata mogla da ima na sisarske ćelije (Bross et al 1999; Wickner et al 1999) (Slika 5).



Slika 5. Šema kompeticije između puteva koji rezultuju formiranjem pravilnog enzima PAH i nefunkcionalnog agregata (po ugledu na Waters 2003).

Podaci iz *in vitro* analiza u kontekstu trodimenzionalne proteinske strukture, ukazali su da većina mutacija u genu za PAH dovodi do gubitka proteinske stabilnosti, lošeg savijanja (foldinga), poremećenog formiranja dimera i tetramera, što za posledicu ima podložnost agregaciji i/ili ubrzanoj

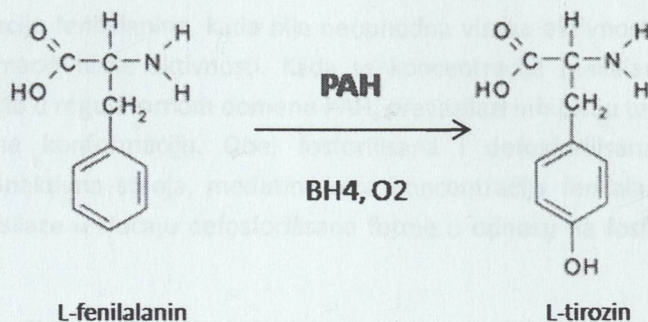
degradaciji (Gamez et al 2000; Pey et al 2003; Pey et al 2007; Waters 1999; Waters et al 2000; Waters 2003).

Naime, neke mutacije u genu za PAH dovode do smanjenja termodinamičke stabilnosti tetramera, što se ponekad može pretpostaviti već iz poređenja biofizičkih karakteristika aminokiselinskog ostatka (veličina, naelektrisanje, polarnost itd.) koji se nalazi u mutiranom proteinu u odnosu na aminokiselinski ostatak koji bi se normalno nalazio na datoj poziciji. Ponekad je očigledno da se remeti važna interakcija između aminokiselina ili da "novi" aminokiselinski ostatak naprosto ne može da bude smešten u predviđeni prostor a da ozbiljno ne naruši konformaciju dela enzima (Erlandsen i Stevens 1999; Jennings et al 2000). S druge strane, neke mutacije utiču na savijanje subjedinice. Ovakav efekat je veoma teško predvideti samo na osnovu aminokiselinskih karakteristika. Naprosto, može se desiti da aminokiselinski ostatak ima ključnu ulogu u postizanju pravilne konformacije i da neka druga aminokiselina na datoj poziciji odvodi savijanje polipeptida na pogrešan put (Waters 2001). Efekat mutacija koje pre utiču na kinetiku savijanja, nego na termodinamičku stabilnost mogu se analizirati u *in vitro* sistemima, na osnovu efekta koji na njega ostvaruju šaperoni.

U prokariotskim *in vitro* sistemima, obično se analizira efekat GroEL/GroES šaperona (Gamez et al 2000; Pey et al 2003). GroEL je veliki cilindrični proteinski kompleks koji funkcioniše u sadejstvu sa kofaktorom u obliku prstena, GroES koji na cilindru formira poklopac, tako da je polipeptidni substrat zatvoren u toku savijanja. GroEL/GroES su prokariotski homolozi eukariotskim Hsp60/Hsp10 (heat shock proteins, tj. proteini toplotnog šoka) koji doprinose savijanju nosintetisanih polipeptida (Feldman i Fridman 2000). Gamez i saradnici su prvi pokazali da se prinos i aktivnost aberantne PAH mogu značajno povećati pod uticajem spoljašnjih faktora kao što su prisustvo šaperona u višku ili temperatura (Gamez et al 2000). U daljim istraživanjima je potvrđeno da ovakva modulacija proteinskog fenotipa *in vitro* otkriva mutacije koje imaju efekat na savijanje proteina (Pey et al 2003).

U eukariotskim *in vitro* sistemima se u poslednje vreme intenzivno analizira uloga tetrahidrobiopterina (BH4) za koji je pokazano da ima generalni protektivni efekat sličan šaperonskom na fenilalanin hidroksilazu. BH4 stabilizuje funkcionalne forme i sprečava proteolitičku degradaciju mutiranog proteina. Naime, BH4 koji se nalazi u hepatocitima ne ostaje u slobodnom obliku, nego se vezuje za enzim PAH dovodeći ga u neaktivnu formu (vidi: Regulacija aktivnosti fenilalanin hidroksilaze). Upravo taj kompleks ima značajnu fiziološku ulogu u stabilizaciji kako normalnog, tako i mutiranih proteina PAH i sprečavanju ubikvitin-zavisne degradacije (Aguado et al 2006; Erlandsen et al 2004; Perez et al 2005; Pey et al 2004). Tako, efekat BH4 na mutirani protein PAH daje uvid u njegove biohemijske karakteristike u sistemu koji po svojim karakteristikama najviše odgovara *in vivo* uslovima. Još važnije, ovakav eksperimentalni pristup nudi mogućnost identifikacije onih mutacija koje su kandidati za BH4 suplementacionu terapiju – novi pristup u lečenju fenilketonurije (vidi: Terapija tetrahidrobiopterinom) (Perez et al 2005).

AKTIVNOST FENILALANIN HIDROKSILAZE



Slika 6. Reakcija katalizovana fenilalanin hidroksilazom (PAH) u kojoj se, uz pomoć kofaktora tetrahidrobiopterina (BH4) i kiseonika (O₂), od fenilalanina produkuje tirozin.

Phenilalanin hidroksilaza čoveka je od gvožđa zavisni enzim koji katalizuje konverziju L-fenilalanina (L-Phe) u L-tirozin (L-Tyr) u prisustvu esencijalnog kofaktora (6R)-L-erithro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) i molekularnog kiseonika (Slika 6). S obzirom da atom kiseonika koji ulazi u sastav tirozina potiče od molekularnog kiseonika, a ne od molekula vode, fenilalanin hidroksilaza je zapravo oksigenaza (Kaufman et al 1962).

Samo mali broj "missense" mutacija menja upravo one aminokiseline enzima PAH od kojih zavisi vezivanje supstrata fenilalanina, molekula kiseonika, kofaktora BH4 i tako dovodi do promene kinetičkih osobina ($V_{\max}$, K_m) enzima PAH (Waters 2003). U *in vitro* sistemima, specifična aktivnost mutirane fenilalanin hidroksilaze određuje se na osnovu količine produkovanog L-Tyr iz poznate početne količine L-Phe u reakciji koja se odvija u prisustvu tetrahidrobiopterina i gvožđe sulfata, pri kontrolisanim uslovima -određeno vreme i zadata temperatura (Martinez et al 1995).

REGULACIJA AKTIVNOSTI FENILALANIN HIDROKSILAZE

Aktivnost fenilalanin hidroksilaze je tesno regulisana pomoću fenilalanina, tetrahidrobiopterina i fosforilacije na aminokiselini Ser-16.

Fenilalanin se za fenilalanin hidroksilazu vezuje na dva različita mesta – u katalitičkom domenu, kada funkcioniše kao supstrat i u regulatornom domenu kada funkcioniše kao pozitivni regulator. Aktivacija fenilalaninom je najznačajniji mehanizam regulacije. Vezivanje fenilalanina za regulatorno mesto u enzimu dovodi do velikih konformacionih promena, koje uključuju kako tercijernu (izmeštanje N-terminalne regulatorne sekvence ka aktivnom centru), tako i kvaternernu strukturu (favorizovano formiranje tetramerne forme) što rezultuje značajnim povećanjem enzimске aktivnosti. Takođe, vezivanje fenilalanina za PAH favorizuje fosforilaciju (Erlandsen et al 2004; Knappskog et al 1996; Kobe et al 1999).

Suptilnija regulacija aktivnosti odvija se preko vezivanja BH₄, takođe za regulatorni domen fenilalanin hidroksilaze. PAH zauzima konformaciju u kojoj je njena aktivnost inhibirana. U toj konformaciji, aktivacija fenilalaninom je blokirana, a fosforilacija nije favorizovana (Jennings 2001; Solstad 2003).

U prisustvu niske koncentracije fenilalanina, kada nije neophodna visoka aktivnost PAH, vezivanje BH₄ stabilizuje enzim u konformaciji niske aktivnosti. Kada se koncentracija fenilalanina u hepatocitima poveća, on se vezuje za mesto u regulatornom domenu PAH, prevazilazi inhibiciju tetrahidrobiopterinom i prevodi enzim u aktivnu konformaciju. Obe, fosforilisana i defosforilisana forma fenilalanin hidroksilaze, predstavljaju inaktivna stanja, međutim veća koncentracija fenilalanina je potrebna za aktivaciju fenilalanin hidroksilaze u slučaju defosforilisane forme u odnosu na fosforilisanu (Kobe et al 1999).

Za većinu mutacija, kako blagih tako i teških, pokazano je smanjenje ili gubitak aktivacije supstratom, ukazujući da je glavni uzrok ometanje prenosa konformacione promene kroz strukturu enzima (Erlandsen et al 2004). Iz tog razloga, obično se specifična enzimska aktivnost *in vitro* meri u dve različite reakcije: prvoj, kada se enzim pre odpočinjanja reakcije inkubira fenilalaninom i drugoj, bez preinkubacije. Odnos specifičnih aktivnosti označava se kao aktivacioni nivo, koji je karakterističan za određeni mutirani enzim (Pey et al 2004).

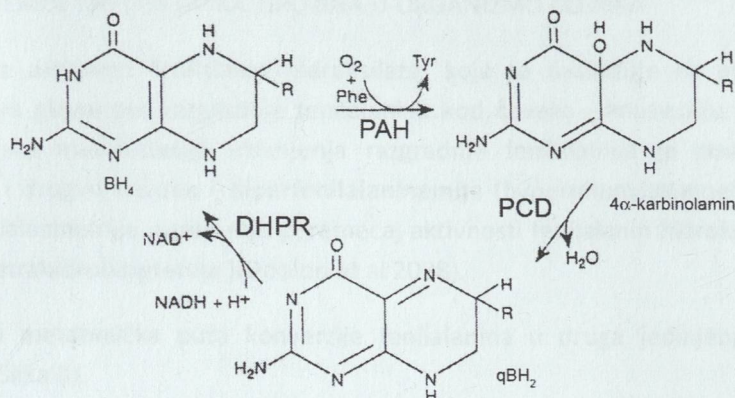
EFEKAT MUTACIJA NA AKTIVNOST FENILALANIN HIDROKSILAZE

Mutacije u genu za PAH dovode do poremećaja u aktivnosti fenilalanin hidroksilaze. Međutim, nemaju sve mutacije isti efekat. Velike delecije i mutacije u mestima za iskrcavanje iRNK (splajsing mutacije) dovode do velikih promena u primarnoj strukturi proteina i u potpunosti onemogućavaju njegovu aktivnost. Male delecije i insercije dužine koja nije deljiva sa 3 i pogotovo ako su na početku gena za PAH, dovode do sasvim pogrešne sinteze polipeptidnog lanca koji neće vršiti konverziju fenilalanina. Tačkasta mutacija koja dovodi do formiranja prevremenog stop kodona onemogućava sintezu polipeptidnog lanca. Ove mutacije, označavaju se kao **funkcionalno nulte mutacije**. Sem ovih, u nulte mutacije ubrajaju se i "missense" mutacije za koje je u *in vitro* esejima potvrđena izuzetno niska enzimska aktivnost, <10% u odnosu na wtPAH (Guldborg et al 1998).

Ostale "missense" mutacije u manjoj ili većoj meri remete strukturu i/ili katalitičke osobine fenilalanin hidroksilaze dovodeći do manjeg ili većeg poremećaja u aktivnosti enzima. U *in vitro* analizama pokazano je da aktivnost mutiranih enzima PAH varira od 0% do skoro 100% u odnosu na aktivnost wtPAH (Waters 2003).

TETRAHIDROBIOPTERIN

Tetrahidrobiopterin (BH₄, (6R)-L-erithro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina) je nekonjugovani pterin. S obzirom da mogu da ga sintetišu, BH₄ za sisare nije vitamin. Sintaza se vrši iz guanozin trifosfata (GTP) u reakcijama koje sekvencijalno katalizuju GTP ciklohidrolaza I (GTPCH), 6-piruvoil-tetrahidropterin sintaza (6-PTPS) i sepiapterin reduktaza (SR) (Slika 8).



Slika 7. Ciklus regeneracije tetrahidrobiopterina (BH₄). Označena su dva intermedijera jedinjenja 4α-karbinolamin i kinonoid dihidropterin (qBH₂), kao i tri enzima koji učestvuju u reakcijama fenilalanin hidroksilaza (PAH), pterin 4α-karbinolamin dehidrataza (PCD) i dihidropteridin reduktaza (DHPR).

Prilikom konverzije L-fenilalanina u L-tirozin, BH₄, koji je esencijalni kofaktor fenilalanin hidroksilaze (PAH), oksiduje se u 4α-hidroksitetrahidropterin (4α-karbinolamin). Iz ovog jedinjenja nastaje kinonoid dihidropterin (qBH₂) u reakciji koju katalizuje pterin 4α-karbinolamin dehidrataza (PCD). Regeneraciju BH₄ iz qBH₂ katalizuje dihidropteridin reduktaza (DHPR) (Slika 7) (Kaufman 1975).

Mutacije u genima koji kodiraju enzime za biosintezu (GTPCH ili PTPS) ili regeneraciju (PCD ili DHPR) BH₄ dovode do deficijencije tetrahidrobiopterina (Donlon et al 2008).

Uloge tetrahidrobiopterina, detaljnije opisane u okviru aktivnosti fenilalanin hidroksilaze, u regulaciji aktivnosti fenilalanin hidroksilaze, stabilizaciji strukture šaperonima i terapiji fenilketonurije tetrahidrobiopterinom, sumirane su u Tabeli 1.

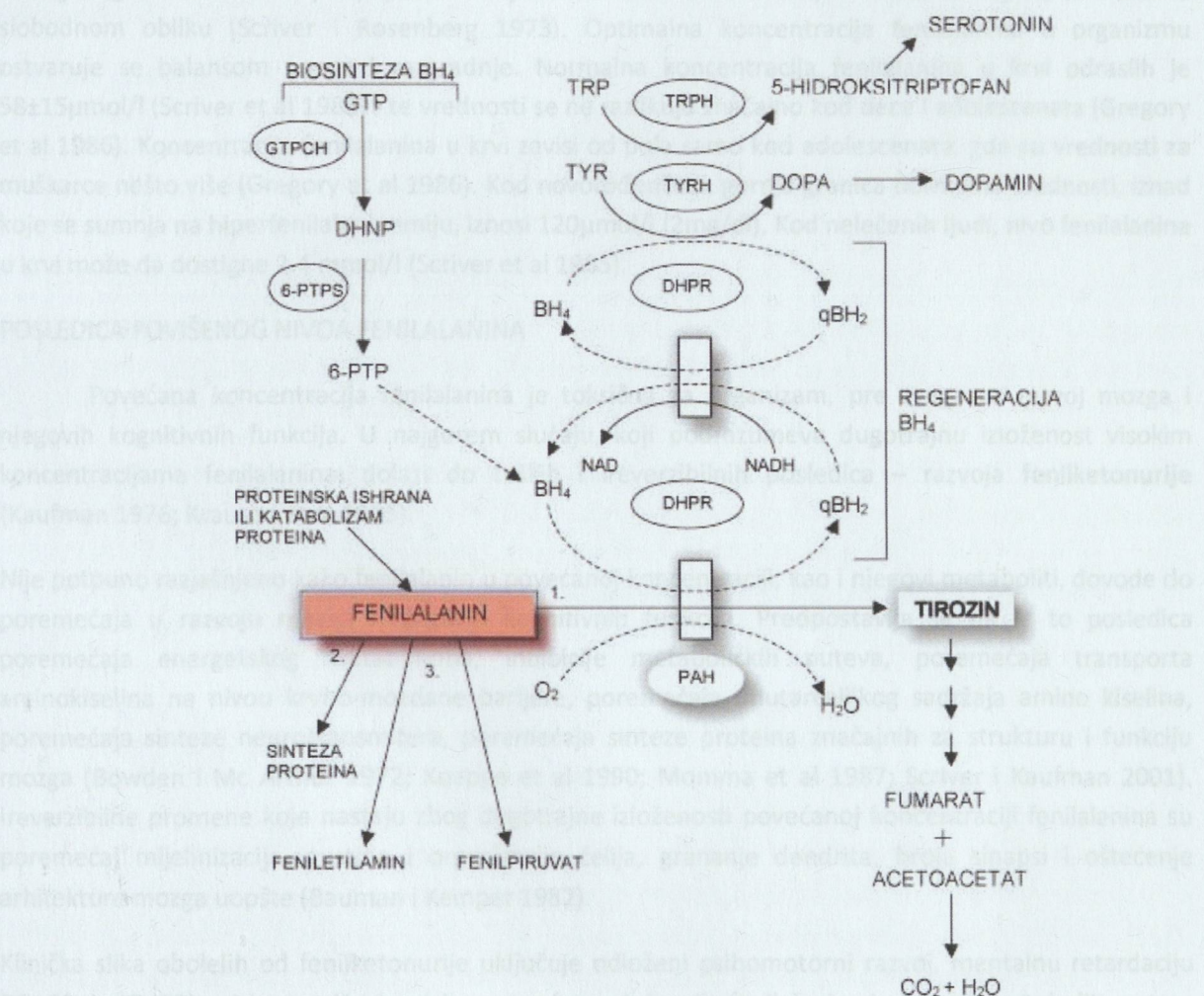
Tabela 1. Uloge tetrahidrobiopterina (BH₄) relevantne za fenilketonuriju.

BH ₄	obligatni kofaktor fenilalanin hidroksilaze, ali i drugih enzima (tirozin hidroksilaza i triptofan hidroksilaza)
	negativni regulator aktivnosti fenilalanin hidroksilaze
	hemijski šaperon fenilalanin hidroksilaze koji stabilizuje strukturu normalnog i mutiranog enzima preko nekoliko opisanih mehanizama
	jedini odobreni lek za fenilketonuriju (sapropterin dihidrohlorid; Kuvan®), ukoliko pacijent reaguje na BH ₄ test opterećenja

POREMEĆAJ AKTIVNOSTI FENILALANIN HIDROKSILAZE ILI DEFICIJENCIJA BH₄ DOVODE DO HIPERFENILALANINEMIJE I NEDOSTATKA TIROZINA U ORGANIZMU ČOVEKA

Deficijentna aktivnost fenilalanin hidroksilaze, koja se nasleđuje na autozomalno-recesivan način, onemogućava glavni put razgradnje fenilalanina kod čoveka - konverziju fenilalanina u tirozin. Osnovna biohemijska manifestacija smanjenja razgradnje fenilalanina je povećanje koncentracije fenilalanina u krvi i drugim tkivima - **hiperfenilalaninemija** (hyperphenylalaninemia, HPA. U 1 do 2% slučajeva hiperfenilalaninemije, uzrok nije poremećaj aktivnosti fenilalanin hidroksilaze, već nedostatak njenog kofaktora tetrahidrobiopterina)(Donlon et al 2008).

Naime, postoje tri metabolička puta konverzije fenilalanina u druga jedinjenja, međutim nisu svi podjednako važni (Slika 8).



Slika 8. Glavni put u homeostazi fenilalanina je konverzija fenilalanina u tirozin. Sem fenilalanin hidroksilaze (PAH), za ovu reakciju su nepodostadni tetrahidrobiopterin (BH₄), kao i enzim koji vrši njegovu regeneraciju, dihidropteridin reduktaza (DHPR). Takođe, prikazana je i biosinteza BH₄ u koju su uključeni GTP ciklohidrolaza I (GTPCH), 6-piruvoil-tetrahidropterin sintaza (PTPS) i sepiapterin reduktaza (SR).

Nakon što se deo fenilalanina potroši u toku biosinteze proteina, preostali fenilalanin se pretežno razgrađuje do tirozina u reakciji koju katalizuje enzim fenilalanin hidroksilaza u prisustvu BH₄. Samo kada je ova reakcija blokirana i kada je koncentracija fenilalanina jako povišena, reakcija transaminacije u kojoj nastaje fenilpiruvat, postaje funkcionalno značajna (Kaufman 1976). Udeo reakcije dekarboksilacije, u kojoj nastaje feniletilamin, čak i u takvim uslovima nije veliki (Rampini et al 1974).

S druge strane, reakcija koju katalizuje fenilalanin hidroksilaza ima vrlo važnu ulogu u obezbeđivanju dovoljne količine tirozina u organizmu. U normalnim uslovima tirozin nije esencijalna aminokiselina, ali to postaje kada je reakcija u kojoj nastaje blokirana (Donlon et al 2008).

L-fenilalanin je esencijalna aminokiselina za čoveka koja mora da se unosi ishranom kako bi se omogućila sinteza proteina (Young i Pellett 1987). Nedostatak fenilalanina u ishrani dovodi do oslobađanja endogenog fenilalanina iz polipeptida u kojima se nalazi u vezanom, ili mišića u kojima se nalazi u slobodnom obliku (Scriver i Rosenberg 1973). Optimalna koncentracija fenilalanina u organizmu ostvaruje se balansom unosa i razgradnje. Normalna koncentracija fenilalanina u krvi odraslih je $58 \pm 15 \mu\text{mol/l}$ (Scriver et al 1985) i te vrednosti se ne razlikuju značajno kod dece i adolescenata (Gregory et al 1986). Koncentracija fenilalanina u krvi zavisi od pola samo kod adolescenata, gde su vrednosti za muškarce nešto više (Gregory et al 1986). Kod novorođenčadi, gornja granica normalne vrednosti, iznad koje se sumnja na hiperfenilalaninemiju, iznosi $120 \mu\text{mol/l}$ (2mg/dl). Kod nelečenih ljudi, nivo fenilalanina u krvi može da dostigne 2.4 mmol/l (Scriver et al 1985).

POSLEDICA POVIŠENOG NIVOA FENILALANINA

Povećana koncentracija fenilalanina je toksična za organizam, pre svega za razvoj mozga i njegovih kognitivnih funkcija. U najgorem slučaju, koji podrazumeva dugotrajnu izloženost visokim koncentracijama fenilalanina, dolazi do teških i ireverzibilnih posledica – razvoja **fenilketonurije** (Kaufman 1976; Krausen et al 1985).

Nije potpuno razjašnjeno kako fenilalanin u povećanoj koncentraciji, kao i njegovi metaboliti, dovode do poremećaja u razvoju mozga i njegovih kognitivnih funkcija. Predpostavlja se da je to posledica poremećaja energetskog metabolizma, inhibicije metaboličkih puteva, poremećaja transporta aminokiselina na nivou krvno-mozdane barijere, poremećaja unutarćelijskog sadržaja amino kiselina, poremećaja sinteze neurotransmitera, poremećaja sinteze proteina značajnih za strukturu i funkciju mozga (Bowden i Mc Arthur 1972; Koeppe et al 1990; Momma et al 1987; Scriver i Kaufman 2001). Ireverzibilne promene koje nastaju zbog dugotrajne izloženosti povećanoj koncentraciji fenilalanina su poremećaj mijelinizacije, gustine i organizacije ćelija, grananje dendrita, broja sinapsi i oštećenje arhitekture mozga uopšte (Bauman i Kemper 1982).

Klinička slika obolelih od fenilketonurije uključuje odloženi psihomotorni razvoj, mentalnu retardaciju ($\text{IQ} < 68$ do $\text{IQ} < 35$), miris na miševinu (zbog povećane ekskrecija fenilalanina i njegovih metabolita putem mokraće i znoja), svetlu pigmentaciju kože i kose, ekcematozne promene na koži, epilepsiju i poremećaje ponašanja (npr. iritabilnost). Opisane promene na koži i karakterističan miris su reverzibilne prirode i nestaju sa smanjenjem koncentracije fenilalanina u krvi (Scriver i Kaufman, 2001).

HIPERFENILALANINEMIJA I FENILKETONURIJA

Kao što je već rečeno, pojam hiperfenilalaninemija odnosi se na povišen nivo fenilalanina. Pojam fenilketonurija odnosi se na oboljenje koje, ukoliko se ne leči, dovodi do teškog i ireverzibilnog poremećaja u razvoju nervnog sistema. U tom smislu, postoje "PKU" i "ne-PKU" forma hiperfenilalaninemije, pri čemu se pod "ne-PKU" formom podrazumevaju blage kliničke manifestacije (Weiss and Buchanan 2003).

S druge strane, ako posmatramo genetičku osnovu hiperfenilalaninemije, postoje forme čiji je uzrok u mutacijama u genu za *PAH* i forme čiji su uzrok mutacije u genima koji kodiraju enzime uključene u kontrolu sinteze i recikliranja tetrahidrobiopterina (Donlon et al 2008).

Međutim, uobičajeno da se terminom "fenilketonurija" označava čitav spektar različitih fenotipova (Scriver 2007).

KLASIFIKACIJA FENILKETONURIJE

S obzirom da se pod fenilketonurijom podrazumeva čitav spektar različitih fenotipova, pacijenti oboleli od fenilketonurije se svrstavaju u tri fenotipske kategorije na osnovu koncentracije fenilalanina u krvi pre početka terapije (Trefz et al 1985).

Pacijent kod kog je zabeležen nivo fenilalanina $< 600\mu\text{mol/l}$, svrstava se u **blagu hiperfenilalaninemiju** (mild hyperphenylalaninemia, MHP). Pacijenti sa ovim poremećajem odlikuju se skoro normalnom tolerancijom na fenilalanin iz hrane. Kod njih nije zabeležen efekat na psihički, neurološki i kognitivni razvoj i lečenje dijetom nije obavezno (Guttler i Guldborg 2000).

Ukoliko je nivo fenilalanina između $600\mu\text{mol/l}$ i $1200\mu\text{mol/l}$, pacijent se svrstava u **blagu fenilketonuriju** (mild phenylketonuria). Pacijenti kod kojih nivo fenilalanina prelazi $1200\mu\text{mol/l}$, svrstavaju se u **klasičnu fenilketonuriju** (classical phenylketonuria). Ove dve grupe pacijenata moraju se lečiti da bi se izbegla teška i ireverzibilna oštećenja nervnog sistema i kognitivnih funkcija. Naravno, lečenje se odvija u skladu sa težinom bolesti.

S obzirom da se bebe sa nasleđenim poremećajem u metabolizmu rađaju bez vidljivih fenotipskih znakova, a karakteristični fenotip fenilketonurije nastaje tek kao posledica interakcije genotipa i uslova sredine (fenilalanina u hrani), njihovo pravovremeno otkrivanje i lečenje je od neprocenjivog značaja. Zbog toga se u Severnoj Americi i Velikoj Britaniji od sredine 60-ih, a u većini ostalih razvijenih zemalja od ranih 70-ih godina XX veka, sprovodi kompletan **skrining novorođenčadi na fenilketonuriju**. Masovno testiranje je uvedeno zbog odlične prognoze ukoliko se sa terapijom (dijetalnom restrikcijom fenilalanina) započne još pre pojave kliničkih znakova bolesti - u prvom mesecu života (Scriver 1998). Najkorisnija laboratorijska metoda za neonatalni skrining je tandemna masena spektrometrija. Ostale uobičajene metode su Gatrijev bakterijski test, fluorimetrijska i hromatografska analiza (National Institutes of Health Consensus Development Panel 2001).

KORELACIJA GENOTIPA PAH I FENOTIPA PKU

Iako bi se na prvi pogled moglo pretpostaviti da je korelacija između genotipa i fenotipa jednostavna, jer deficijencija BH4 ne komplikuje situaciju (<2%), ipak ova tipična monogenska bolest ima komplikovan fenotip.

Glavni razlog leži u velikom broju različitih mutacija u genu za PAH koje izazivaju bolest (>500) i koje remeteći strukturu i/ili funkciju fenilalanin hidrosilaze smanjuju njenu aktivnost u opsegu od 0% do 100%. Takođe, moguće je zamisliti da u jednom genu za PAH postoje dve mutacije. Ne treba zaboraviti ni da lokus za PAH sadrži veliki broj polimorfizama koji bi mogli da utiču na transkripciju i ekspresiju gena za PAH – genetsko okruženje (Scriver i Waters 1999).

Sem direktnog efekta koji mutacija ostvaruje na protein, takav mutirani protein se mora posmatrati i u kontekstu vrlo kompleksnog unutarćelijskog sistema u kome se nalazi. S obzirom da je glavni uzrok smanjene aktivnosti mutiranog proteina njegova strukturna nestabilnost, Gregersen i saradnici su nazvali fenilketonuriju primerom konformacione bolesti koja se karakteriše povećanom degradacijom loših intermedijernih polipeptidnih lanaca i nepravilno savijenim proteinima (Gregersen et al 2001). Tako, varijacije u sistemima za savijanje, prepoznavanje i degradaciju mutiranog proteina mogu imati uticaj na fenotip PKU (Pey et al 2003; Pey et al 2004; Waters 2003).

S obzirom da se radi o autozomalno-recesivnoj bolesti, u genotipu su prisutne dve, najčešće različite mutacije, koje u različitom stepenu narušavaju aktivnost enzima. Dodatno komplikuje situaciju što se kod kombinovanih heterozigota formiraju heteromerni enzimi PAH i dolazi do fenomena negativne interalelske komplementacije. Ovaj efekat je izraženiji u slučaju mutacija lociranih u regulatornom domenu enzima (Leandro et al 2006; Waters et al 2001).

Takođe, fenotip PKU je kompleksan jer na njega, sem mutacija u genu za PAH imaju uticaj i apsorpcija fenilalanina u digestivnom traktu, efektivnost unosa fenilalanina u jetru (gde se razgrađuje), potrebe organizma za sintezom proteina i transport preko krvno-moždane barijere (Greeves et al 2000; Jennings et al 2000; Kayaalp et al 1997; Scriver i Waters 1999; Weglage et al 2002). Zbog ovih razloga, promene u mnogim drugim genima učestvuju u nastajanju finalnog fenotipa.

Uzevši u obzir da se produkt mutiranog gena nalazi u okviru vrlo kompleksnih sistemima (unutar ćelije i unutar organizma) sa brojnim dodatnim genetičkim polimorfizmima, postojanje korelacije između genotipa i fenotipa skoro da deluje neverovatno. Međutim, korelacija postoji u velikom broju slučajeva. To su svi oni slučajevi u kojima je efekat koji proizvodi mutacija toliko veliki ili tako mali da ga svi ostali uticaji koji bi se mogli naći u sistemu ne mogu ugroziti ("prag proteinske funkcionalnosti"). Drugim rečima, ako je mutacija izuzetno teška ili veoma laka, varijacije u sistemu teško da će moći da utiču na modifikaciju fenotipa (Dipple i McCabe 2000). Nekonzistentnost je karakteristika onih mutacija koje dovode do delimično aktivnog proteina, jer u tom slučaju, različiti sistemski faktori mogu igrati ulogu u finalnom fenotipu. Drugim rečima, mutacije koje ne narušavaju u potpunosti aktivnost proteina su nepredvidive.

Devedesetih godina XX veka, urađen je veliki broj studija korelacije genotipa i fenotipa (Guldborg et al 1995; Guldborg et al 1998; Kayaalp et al 1997; Romano et al 1996) i na ovaj način je analiziran efekat velikog broja mutacija. Analize korelacije rađene su u funkcionalno hemizigotnim pacijentima (nulta mutacija/"missense" mutacija) kod kojih fenotip potiče od efekta "missense" mutacije, jer je efekat druge mutacije jednak nuli. Za veliki broj mutacija pokazana je konzistentnost i mogućnost da se na osnovu njihovog prisustva u genotipu prilično pouzdano predvidi fenotip. Međutim, iako je postojala velika nada da će istraživanja o genotipu omogućiti lakše postavljanje dijagnoze, predviđanje težine bolesti i uvođenje optimalne terapije (Guttler i Guldborg 2000), pojavila su se i upozorenja da će tek sa boljim razumevanjem alelskih (PAH) i genomskih (geni modifikatori) varijacija, odnos genotipa i fenotipa postati jasniji, a genetika prići bliže primeni u svakodnevnoj medicinskoj praksi (Scriver i Waters 1999; Scriver 2007).

U poslednjih nekoliko godina, posle otkrića da tetrahidrobiopterin može da se koristi u terapiji fenilketonurije, bačeno je novo svetlo na primenu genetike.

TERAPIJA FENILKETONURIJE TETRAHIDROBIOPTERINOM

Konvencionalno lečenje obolelih od fenilketonurije je terapija dijetom koja je veoma restriktivna i sprovodi se godinama, u najlakšim slučajevima bar do puberteta, a neretko doživotno. Sastav dijeta se menjao veoma malo od kad je uvedena 50-tih godina XX veka. Radi se o niskoproteinskoj ishrani kojoj se dodaju mešavina aminokiselina koja ne sadrži fenilalanin, minerali, vitamini i drugi hranljivi sastojci (Scriver i Kaufman 2001). Mleko i mlečni proizvodi, meso, jaja, pšenica, kukuruz, grašak, sočivo, kiki-riki i drugo zrnevlje su zabranjeni. Majčino mleko je dozvoljeno samo uz pažljivu kontrolu. Voće i povrće može da se konzumira, ali u ograničenim količinama. Sve u svemu, PKU dijeta je izuzetno restriktivna i teška za praćenje. Štaviše, mešavine aminokiselina-bez fenilalanina imaju neprijatan ukus i miris i moraju da se konzimiraju u prilično velikim količinama. Tek u poslednje vreme pojavili su se preparati nešto boljeg ukusa i praktičniji za primenu. Takođe, usled hranljivih nedostataka vrlo restriktivne ishrane, moguća je pojava niza zdravstvenih problema (avitaminoza, osteoporoza). Zbog takve dijeta, kvalitet života PKU pacijenata je relativno loš, i veliki broj pacijenata vremenom odustaje od nje (Hoeks et al 2009; Scriver 2007).

Situacija u kojoj je restriktivna dijeta obavezna je kada žena koja ima fenilketonuriju ostane u drugom stanju (**maternalna fenilketonurija**). Teratogeni efekat povišene koncentracije fenilalanina u krvi majke na razvoj fetusa uključuje mentalnu retardaciju, dismorfizam lica, mikrocefaliju, usporen intrauterinalni rast, kongenitalne bolesti srca (Lee et al 2003). Kada se žena pridržava restrikcione dijeta i održava nivo fenilalanina u granicama od 120 do 360 $\mu\text{mol/l}$, sva je prilika da će se roditi normalna beba (Levy et al 2003). Međutim, mali unos proteina i kalorija nepovoljno utiče na normalan razvoj fetusa.

Od početka XXI veka, razvoj alternativnih terapija je u žiži istraživanja vezanih za fenilketonuriju. Sem terapije fenilalanin amonijum liazom (koja razgrađuje fenilalanin u lumenu creva), terapije velikim neutralnim aminokiselinama (koje kompetiraju sa fenilalaninom za apsorpciju u crevu i/ili transportu kroz krvno-moždanu barijeru), enzimske terapije (funkcionalan protein se doprema u jetru ili druga tkiva gde vrši konverziju fenilalanina), genske terapije (funkcionalan gen se doprema u genom somatskih ćelija

i nadoknađuje mutirani) koje su nezavisne od genotipa, efikasnost terapije tetrahidrobiopterinom zavisi od genotipa i nije svrsishodna kod svih pacijenata (Sarkissian et al 2009).

Kure i saradnici su prvi prijavili slučajeve pacijenata kod kojih je unošenje BH4 dovelo do značajnog smanjenja koncentracije fenilalanina u krvi dok su bili na normalnoj ishrani (Kure et al 1999). Do tada, originalna upotreba BH4 u terapiji bila je ograničena samo na pacijente sa BH4 deficijencijom (Danks 1978). Nakon ovog i drugih prijavljenih slučajeva (Fiege i Blau 2007; Matalon et al 2004; Zurfluh et al 2008), istraživanja su usmerena ka otkrivanju mehanizama pomoću kojih BH4 dovodi do snižavanja koncentracije fenilalanina u krvi pacijenata sa mutacijama u genu za *PAH*. (Erlandsen et al 2004). Pokazano je da tetrahidrobiopterin, inače esencijalni kofaktor i regulator aktivnosti fenilalanin hidroksilaze, ima i ulogu sličnu šaperonskoj na stabilizaciju aberantnih ali funkcionalnih formi enzima *PAH*. Štiteći polipeptide od degradacije, BH4 povećava količinu funkcionalnih proteina i tako omogućava razgradnju fenilalanina (Perez et al 2005). Iz tog razloga, značajan fiziološki efekat tetrahidrobiopterina se može očekivati kod pacijenata kod kojih mutacije u genu za *PAH* dovode do delimično aktivnih enzima.

Terapija sa BH4 omogućava smanjenje restrikcija u ishrani ili čak normalnu ishranu kojoj se dodaje BH4. Takođe, prijavljeni su slučajevi kontrolisanja koncentracije fenilalanina u trudnoći kombinacijom manje restriktivne dijeta i terapije tetrahidrobiopterinom (Koch et al 2005). Do nedavno, BH4 je bio dostupan samo za istraživanja. Kompanija BioMarin Pharmaceutical Inc. proizvela je KUVAN® (sapropterin dihidrohlorid, sintetička forma 6R-izomera BH4) koji je trenutno u fazi kliničkih ispitivanja. Standard koji je prihvaćen kao odgovor na tetrahidrobiopterin je $\geq 30\%$ smanjenje koncentracije fenilalanina u krvi u toku 8 do 24h nakon oralne administracije BH4 (10-20 mg/kg telesne težine) (Blau i Erlandsen 2004). Rezultati II i III faze kliničkih ispitivanja (Burton et al 2007; Levy et al 2007; Trefz et al 2009a) ukazale su da je odgovor na terapiju tetrahidrobiopterinom u korelaciji sa genotipom (Trefz et al 2009b; Zurfluh et al 2008). Iako informacija o genotipu može ukazati na pozitivan odgovor na terapiju tetrahidrobiopterinom, standardizovani BH4 test opterećenja morao bi da se uradi kada se donosi odluka o terapijskim mogućnostima (Trefz et al 2009b). Međutim, naročito u zemljama u kojima se test opterećenja tetrahidrobiopterinom ne radi rutinski iz finansijskih razloga, karakterizacija genotipa *PAH* igra važnu ulogu u odabiru pacijenata koji bi mogli da odgovore na BH4 terapiju.

FENILKETONURIJA U SRBIJI

U Srbiji se skrining novorođenčadi na fenilketonuriju sprovodi od 01. 02. 1980. godine u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukan Čupić" a prvi koraci u molekularnoj dijagnostici započeli su 2004. godine (Poznanić 2004).

Skrining se obavlja pomoću Gatrijevog bakterijskog testa (Guthrie i Susi 1963). Učestalost sve tri fenotipske kategorije fenilketonurije, na osnovu podataka neonatalnog skrininga iznosi 1 : 12,300. U toku godine, prosečno se dijagnostikuju tri do četiri nova pacijenta (Stojiljković et al 2006). Klasifikacija novorođenčadi se vrši prema koncentraciji fenilalanina u krvi pre otpočinjanja lečenja. U Srbiji trenutno nije dostupan test opterećenja tetrahidrobiopterinom.

Kako se u Srbiji najbrže sklapa slika o fenilketonuriji, od 1990. godine, javila se potreba za kreiranjem i optimizacijom strategije za molekularnu dijagnostiku. Tako je kao preliminarni cilj ovog rada postavljena potpuna molekularna karakterizacija mutacija u genu za fenilalanin hidroksilazu koje uzrokuju deficit u enzimu i dovode do razvoja fenilketonurije kod pacijenata u Srbiji. Određivanje kompletnog spektra i učestalosti mutacija u genu za PAH kod pacijenata obolelih od fenilketonurije u srpskoj populaciji omogućuje vanjsku dijagnostiku na međunarodnom nivou i postavlja osnovu za buduća istraživanja fenilketonurije u Srbiji. Takođe, ovaj rad će omogućiti analizu genetičkih varijacija (heterogenosti) na lokusu PAH u srpskoj populaciji i poređenje srpske populacije sa drugim evropskim populacijama. Pored toga, podaci o mutacijama u genu za fenilalanin hidroksilazu u srpskoj populaciji biće upotrebljeni u nacionalnu bazu podataka.

S obzirom na brojnost mutacija i mogućih genotipova, kao i raznovidnost fenotipova povezanih sa fenilketonurijom, jedan od ciljeva je i analiza efikasa mutacija u genu za PAH na osnovu fenotipske genotipa i fenotipa pacijenata iz srpske populacije. Takođe, cilj ovog rada jeste da se utvrdi koji imaju značaj u kliničkoj praksi za izbor odgovarajućeg dijetalnog režima i davanje genetičkog savjeta u porodicama sa visokim rizikom za ovo oboljenje.

U slučaju otkrivanja novih ili retkih, neklasifikovanih mutacija, neophodni su podaci o kliničkim i funkcionalnim karakteristikama. Ovi podaci mogu biti uključeni u vanjsku bazu podataka o genu za PAH i doprineti razumijevanju molekularne prirode fenilketonurije.

Poslednja analiza, koja se odnosi na identifikaciju u genu za fenilalanin hidroksilazu kod neznanih oboljelih, može se izvršiti na raznovidnim vrstama DNK. Najbolje rezultate daje razdvajanje koda iz

CILJ RADA

Rad ima za cilj da se utvrdi kompletni spektar mutacija u genu za fenilalanin hidroksilazu kod pacijenata sa fenilketonurijom u Srbiji. Takođe, cilj ovog rada jeste i analiza efikasa mutacija u genu za PAH na osnovu fenotipske genotipa i fenotipa pacijenata iz srpske populacije. Takođe, cilj ovog rada jeste da se utvrdi koji imaju značaj u kliničkoj praksi za izbor odgovarajućeg dijetalnog režima i davanje genetičkog savjeta u porodicama sa visokim rizikom za ovo oboljenje.

Kako se u Srbiji neonatalni skrining na fenilketonuriju sprovodi još od 1980. godine, javila se potreba za kreiranjem i optimizacijom strategije za molekularnu dijagnostiku. Zato je kao **preliminarni cilj ovog rada postavljena potpuna molekularna karakterizacija mutacija u genu za fenilalanin hidroksilazu koje uzrokuju defekt u enzimu i dovode do razvoja fenilketonurije kod pacijenata u Srbiji.** Određivanje kompletnog spektra i učestalosti mutacija u genu za *PAH* kod pacijenata obolelih od fenilketonurije u srpskoj populaciji omogućiće rutinsku dijagnostiku na molekularnom nivou i postaviti osnovu za buduća istraživanja fenilketonurije u Srbiji. Takođe, ovi podaci omogućiće analizu genetičkih varijacija (heterogenosti) na lokusu *PAH* u srpskoj populaciji i poređenje srpske populacije sa drugim evropskim populacijama. Pored toga, podaci o mutacijama u genu za fenilalanin hidroksilazu u srpskoj populaciji biće uneti u nacionalnu bazu podataka.

S obzirom na brojnost mutacija i mogućih genotipova, kao i raznovrsnost fenotipova povezanih sa fenilketonurijom, **jedan od ciljeva je i analiza efekta mutacija u genu za *PAH* na osnovu korelacije genotipa i fenotipa pacijenata iz srpske populacije.** Podaci dobijeni na osnovu ove analize mogu imati značaj u kliničkoj praksi za izbor odgovarajućeg dijetetskog režima i davanje genetičkog saveta u porodicama sa visokim rizikom za ovo oboljenje.

U slučaju otkrivanja nove ili retke, neokarakterisane mutacije, aberantni protein će biti funkcionalno okarakterisan. Ovi podaci mogli bi biti uključeni u svetsku bazu podataka o genu za *PAH* i doprineti razumevanju molekularne osnove fenilketonurije.

Haplotipska analiza, bazirana na polimorfizmima u genu za fenilalanin hidroksilazu koji ne dovode do razvoja bolesti, osnov je za populaciono-genetičku studiju. **Haplotipska analiza biće realizovana kako bi rasvetlila protok gena među populacijama koje su istorijski dolazile u kontakt i dala odgovore o poreklu mutacija.**

Iste mutacije u genu za fenilalanin hidroksilazu usled prisustva različitih faktora rezultuju u varijabilnom fenotipu. Kako je regulacija transkripcije jedan od mogućih mehanizama koji doprinose varijabilnoj ekspresiji, **clj ovog istraživanja je i analiza intronskih fragmenata i definisanje regulatornih elemenata u genu za *PAH*.** Po prvi put će introni, koji čine veliki deo gena za *PAH*, biti analizirani u svetlu potencijalne modifikacije fenotipa.

MATERIJAL

PACIJENTI

U studiju o molekularnoj karakterizaciji gena za fenilalanin hidroksilazu uključeno su 34 bezrodna pacijenta iz Srbije. Fenilketonurija je kod ovih pacijenata dijagnostikovana prikom neonatalnog skrininga ili u starijem uzrastu, najčešće zbog zdravstvene zaštite majke i deteta "Dr Vukobratović". Pacijenti su klasifikovani u tri fenotipske kategorije u odnosu na nivo fenilalanina u krvi pre početka terapije. Klasičnu fenilketonuriju (Phe >1200 $\mu\text{mol/l}$) imalo je 22 pacijenata (65%), blagu fenilketonuriju (Phe 500-1200 $\mu\text{mol/l}$) imalo je 12 pacijenata (35%), dok nijedan pacijent nije bio zavrstan u kategoriju hipofenilalaninemije - HMP (<500 $\mu\text{mol/l}$).

U okviru fenotipske grupacije dodatno je analizirano grupa pacijenata sa klasičnom fenilketonurijom, kod kojih je u genotipu prisutna 1485 mutacija. Analiziran je 1 homozigot (L485/L485) i osam kombinovanih heterozigota (L485/M417). Radi dobijanja kompletnih informacija o fenotipovima, srodnici i roditelji obolelih pacijenata analizirani su kao grupa u cilju mogućih.

Krv pacijenata i roditelja uzimana je sa 3-5% Na citratom kao antiheparinom u odnosu 9:1 i transportovana do Instituta za molekularnu genetiku - genetičko laboratorijum gde je izvršena izolacija DNK.

Za ovo istraživanje dobili smo odobrenje Stručnog kolegijuma Pedijatrijske Klinike Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukobratović".

MATERIJAL I METODE

U studiji funkcionalne karakterizacije proteina S231F PAH korišćena je funkcionalna hepatoma ćelija linije HepG2 (dobijena od Dr. Miodraga Ugarca u Madridu). U studiji funkcionalne karakterizacije intronskog regiona gena za PAH korišćene su sledeće ćelije linije, za dobijanje nuklearnih ekstrakata korišćeni su DHSA ekspresionim sistemima korišćene su hrvatske hepatoma ćelije linije HepG2 i embrioblastične ćelije linije hES-2, dok je za ekspresiju transiente transfekcije korišćena ćelija HepG2 ćelije linije.

IMUNISERENJE

U studiji funkcionalne karakterizacije proteina S231F PAH korišćeni su KL1-PAH (Stratagen) i DHSA 6, koji su 95%, dok je u studiji funkcionalne karakterizacije intronskog regiona gena za PAH korišćen samo DHSA 6, koji je 100%.

PLAZMIDNI Vektor

U studiji funkcionalne karakterizacije proteina S231F PAH korišćeni su pGL3-PAHwt (Martinez et al 1995), pGL3-PAH V485M, pGROEN (Gamer et al 2000) i pFLAG-CMV PAHwt (Gajda et al 2005). U studiji funkcionalne karakterizacije intronskog regiona gena za PAH korišćen je pGL3 (Bozhart et al 1992). Kao kontrola efikasnosti transfekcije korišćen je pCMV130 (Amersham Pharmacia Biotech) koji ekspresira β -gal.

MATERIJAL

PACIJENTI

U studiju o molekularnim karakteristikama gena za fenilalanin hidroksilazu uključena su 34 nesrodna pacijenata iz Srbije. Fenilketonurija je kod ovih pacijenata dijagnostikovana prilikom neonatalnog skrininga ili u starijem uzrastu, na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukan Čupić". Pacijenti su klasifikovani u tri fenotipske kategorije u odnosu na nivo fenilalanina u krvi pre početka terapije. Klasičnu fenilketonuriju ($\text{Phe} > 1200 \mu\text{mol/l}$) imalo je 22 pacijenata (65%), blagu fenilketonuriju ($\text{Phe} 600\text{--}1200 \mu\text{mol/l}$) imalo je 12 pacijenata (35%), dok nijedan pacijent nije bio svrstan u blagu hiperfenilalaninemiju - MHP ($< 600 \mu\text{mol/l}$).

U okviru haplotipske studije, dodatno je analizirana grupa pacijenata sa klasičnom fenilketonurijom, kod kojih je u genotipu prisutna L48S mutacija. Analiziran je 1 homozigot (L48S/L48S) i osam kombinovanih heterozigota (L48S/MUT). Radi dobijanja kompletne informacije o haplotipovima, srodnici i roditelji obolelih pacijenata analizirani su kad god je to bilo moguće.

Krv pacijenata i roditelja uzimana je sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom, u odnosu 9:1 i transportovana do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo gde je vršena izolacija DNK.

Za ovo istraživanje postoji odobrenje Stručnog kolegijuma Pedijatrijske Klinike Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić".

ĆELIJSKE LINIJE

U studiji funkcionalne karakterizacije proteina S231F PAH korišćena je humana hepatoma ćelijska linija- Hep3B (Laboratorija Dr Magdalene Ugarte u Madridu). U studiji funkcionalne karakterizacije intronskog regiona gena za PAH korišćene su sledeće ćelijske linije: za dobijanje nuklearnih ekstrakata korišćenih u EMSA eksperimentima kkorišćene su: humana hepatoma ćelijska linija- HepG2 i eritroleukemična ćelijska linija- K562, dok je za eksperimente tranzientne transfekcije korišćena samo HepG2 ćelijska linija.

BAKTERIJSKI SOJEVI

U studiji funkcionalne karakterizacije proteina S231F PAH korišćeni su XL1-Blue (Stratagen) i DH5 α *E. coli* sojevi, dok je u studiji funkcionalne karakterizacije intronskog regiona gena za PAH korišćen samo DH5 α *E. coli* soj.

PLAZMIDNI VEKTORI

U studiji funkcionalne karakterizacije proteina S231F PAH korišćeni su pMAL-PAHwt (Martinez et al 1995), pMAL-PAH V388M, pGroESL (Gamez et al 2000) i pFLAG-CMV PAHwt (Aguado et al 2006). U studiji funkcionalne karakterizacije intronskog regiona gena za PAH korišćen je pBLCAT5 (Boshart et al 1992). Kao kontrola efikasnosti transfekcije korišćen je pCH110 (Amersham Pharmacia Biotech) koji eksprimira β -gal.

PRAJMERI I OLIGONUKLEOTIDI

U različitim PCR reakcijama korišćeni su odgovarajući specifični prajmeri, čiji su nazivi, sekvence i regioni koje umnožavaju navedeni u tabelama 2 – 6. U reakcijama sekvenciranja obično su korišćeni prajmeri upotrebljeni u PCR reakciji. Unutrašnji prajmeri korišćeni za sekvenciranje navedeni su u tabeli 7. Oligonukleotidi korišćeni u EMSA i Sauthe-Western esejima, navedeni su u tabeli 8.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni za PCR-DGGE reakcije u okviru detekcije mutacija.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Region koji umnožava
PAH1F	5'-[50GC]-TTAAAACCTTCAGCCCCACG-3'	Egzon 1
PAH1R	5'-TGGAGGCCCAAATCCCCTAACTG-3'	
PAH2F	5'-GAGGTTTAACAGGAATGAATTGCT-3'	Egzon 2
PAH2R	5'-[40GC]-TCCTGTGTTCTTTTCATTGC-3'	
PAH3F	5'-[40GC]-GCCTGCGTTAGTTCCTGTGA-3'	Egzon 3
PAH3R	5'-CTTATGTTGCAAAATTCCTC-3'	
PAH4F	5'-ATGTTCTGCCAATCTGTACTCAGGA-3'	Egzon 4
PAH4R	5'-[40GC]-CAAGACACAGGCCATGGACT-3'	
PAH5F	5'-TCATGGCTTTAGAGCCCCCA-3'	Egzon 5
PAH5R	5'-[40GC]-AGGCTAGGGGTGTGTTTTTC-3'	
PAH6F	5'-[40GC]-CCGACTCCCTCTGCTAACCT-3'	Egzon 6
PAH6R	5'-CAATCCTCCCCCAACTTTCT-3'	
PAH-X7-Fd	5'-[40GC]-GGTGATGAGCTTTTAGTTTTCTTTC-3'	Egzon 7
PAH-X7-R*	5'-AGCAATGAACCCAAACCTC-3'	
PAH8F	5'-[40GC]-TGGCTTAAACCTCCTCCCCT-3'	Egzon 8
PAH8R	5'-CTGGGCTCAACTCATTTGAG-3'	
PAH9F	5'-ATGGCCAAGTACTAGGTTGG-3'	Egzon 9
PAH9R	5'-[40GC]-GAGGGCCATAGCCTATAGCA-3'	
PAH10F	5'-[40GC]-TTAACCATCATAGAGTGTGC-3'	Egzon 10
PAH10R	5'-ACAAATAGGGTTTCAACAAT-3'	
PAH-X11-F*	5'-TGAGAGAAGGGGCACAAATG-3'	Egzon 11
PAH-X11-Rd	5'-[40GC]-GCCAACCACCCACAGATGAG-3'	
PAH12F	5'-ATGCCACTGAGAACTCTCTT-3'	Egzon 12
PAH12R	5'-[40GC]-ACTGAGAAACCGAGTGGCCT-3'	
PAH13F	5'-[40GC]-GACACTGAAGAGTTTTTGC-3'	Egzon 13
PAH13R	5'-TTTTCGGACTTTTTCTGATG-3'	

Legenda:

[40GC]=CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG

[50GC]=CCCGCCGCGCCGCTCGCCCGCCGCGCCCTGCCCGCCGCCCCGCCCCG

Primedba: * označava prajmere koji su isti kao za PCR-RFLP

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za PCR-RFLP i PCR-ACRS reakcije u okviru detekcije mutacija.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Region koji umnožava
PAH-X2-F	5'-AGAAAGAGTTCATGCTTGCTTTGTCCATG-3'	deo egzona 2 (L48S)
PAH-X2-R	5'-TGTTCCAGATCCTGTGTTCTTTTCATTGCA-3'	
PAH-X5-Fm	5'-ATCCTGTGTACCGTGCAAGC-3'	deo egzona 5 (R158Q)
PAH-X5-R	5'-TCATGCTGGTATTTTCATCC-3'	
PAH-X7-F	5'-ACATCTGAAGCCAAGTCTG-3'	deo egzona 7 (R261Q i R261X)
PAH-X7-R	5'-AGCAATGAACCCAAACCTC-3'	
PAH-X11-F	5'-TGAGAGAAGGGGCACAAATG-3'	deo introna 10 (11 G<A)
PAH-X11-R	5'-GAGTGGCACCAGTCAGGAG-3'	
PAH-X12-F	5'-ATGCCACTGAGAACTCTCTT-3'	deo egzona 12 (R408W)
PAH-X12-R	5'-AGTCTTCGATTACTGAGAAA-3'	

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za PCR i PCR-RFLP reakcije u okviru haplotipske analize.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Region koji umnožava
BglII F	5'-GCAGGAAACTCTCTGACTTTGG-3'	Deo introna 1 (BglII)
BglII R	5'-TGGCAGTTCTGGAGGCCAGA-3'	
PvuIIa F	5'-GGCATGACTGGATACGATTAG-3'	Deo introna 2 (PvuIIa)
PvuIIa R	5'-CTAGACTCAGAATGCCTGGG-3'	
PvuIIb F	5'-GCCTGAAAGCAATACAGAGG-3'	Deo introna 3 (PvuIIb)
PvuIIb R	5'-TGAGGTAGGGATGAAAGACC-3'	
EcoRI F	5'-AGAGTTTTTAGCATGAAAGGC-3'	Deo introna 5 (EcoRI)
EcoRI R	5'-CTACCCACCAAAAAAAGTACA-3'	
MspI F	5'-TGAGCATATTGTATCTGCCC-3'	Deo introna 7 (MspI)
MspI R	5'-CACATGTCCCAACAGCTGAT-3'	
XmnI F	5'-CTGTACTTGTAAGATGCAGC-3'	Deo introna 8 (XmnI)
XmnI R	5'-ACTGTCCCAAGCAATCAAAG-3'	
VNTR F	5'-GCTTGAAACTTGAAAGTTGC-3'	deo 3' regiona
VNTR R	5'-GGAAACTTAAGAATCCCATC-3'	

Tabela 5. Prajmeri korišćeni za umnozavanje fragmenta potrebnog za kloniranje.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Region koji umnožava
HXmnIF	5'-CCCAAGCTTGCTGTACTTGTAAGATGCAGC-3'	deo introna 8 (XmnI)
XXmnIR	5'-GCTCTAGAGCACTGTCCCAAGCAATCAAAG-3'	

Primedba: podvučeni region je mesto sečenja *HindIII*, odnosno *XbaI* restrikcionog enzima.

Tabela 6. Prajmeri korišćeni u PCR reakciji u okviru mesto-specifične dirigovane mutageneze.

Naziv oligonukleotida	Sekvenca oligonukleotida
PAHS231Fsense	5'-AGCTGGAAGACGTTTTTCAGTTCCTGCAGA-3'
PAHS231Fantisense	5'-TCTGCAGGAAGTGAACAAACGTCTTCCAGCT-3'

Primedba: Tamnije je označen izmenjeni nukleotid koji uvodi željenu mutaciju na poziciji 692 (c.692C>T).

Tabela 7. Prajmeri korišćeni za sekvenciranje *cPAH* uklaniranog u pMAL i pFLAG vektore.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
cPAH 1	5'-TTTTGCGGCCGCGATGTCCACTGCGGTCCTCG-3'
cPAH 2	5'-AAAAGTCGACGGCTTTACTTTATTTCTGGAG-3'
PAH 2 reverse	5'-TATCCACTCGAGGGATGGG-3'
c.1025A	5'-GAAAACATGGGGCACAGTGT-3'

Tabela 8. Oligonukleotidi korišćeni za EMSA i South-Western eseje.

Naziv oligonukleotida	Sekvenca oligonukleotida	Xmnl
XmnlA (coding)	5'-TTTTGGAAGTGGAAGTGTTCAGGGATTAGTTGAACTTAAC-3'	-
XmnlT (noncod)	5'-GTTAAAGTTCAACTAATCCCTAAACACTTCCACTTCCAAAA-3'	
XmnlC (coding)	5'-TTTTGGAAGTGGAAGTGTTCAGGGATTAGTTGAACTTAAC-3'	+
XmnlG (noncod)	5'-GTTAAAGTTCAACTAATCCCGAAACACTTCCACTTCCAAAA-3'	

Primedba: Tamnije je označen nukleotid koji odgovara *Xmnl* polimorfnom mestu.

Tabela 9. Oligonukleotid koji se specifično vezuje za GATA-1 transkripcioni faktor, korišćen za kompeticione EMSA eseje (Pruzina et al 1991).

Naziv oligonukleotida	Sekvenca oligonukleotida
-870 GATA	CAGGGCTTTGATAGCACTATCTGCAGAGCCAGGGCC

METODE ZA DETEKCIJU POLIMORFIZAMA U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU

IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI ISOLJAVANJEM

(Goosens et al 1983)

U corex epruvetu od 30ml sipa se 2.5 ml nekoagulisanog uzorka krvi i doda se 22.5 ml Lysis buffer-a (0.32 M saharoza, 10 mM Tris HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X100). Ovo se nežno promućka i inkubira na ledu u trajanju od 15 min. Zatim se vrši centrifugiranje na 4000 rpm na 4°C (centrifuga SORVALL, rotor SS 34) u trajanju od 10 min. Talog se ispira dva puta sa po 5ml Fisio buffer-a (75 mM NaCl, 25 mM EDTA). Posle svakog ispiranja vrši se centrifugiranje (10 min, 4000 rpm, 4°C). Na kraju se talog rastvori u 750 µl 1xTE (10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) i prebaci u ependorf epruvetu, a zatim se doda 25 µl 20% SDS-a i 125 µl proteinaze K (10mg/ml u 1%SDS, 2mM EDTA) i inkubira se jedan sat na 65°C. Posle inkubacije se doda 250µl zasićenog NaCl-a (6M), vorteksuje se 15 s, i vrši se centrifugiranje na 6000 rpm na +4°C u trajanju od 15 min (mikrofuga Eppendorf). Supernatant se prebaci u nove ependorf epruvete i ostavi da stoji preko noći na +4°C. Ponovo se izvrši centrifugiranje 15 min na 6000 rpm na 4°C. Supernatant se prebaci u novu ependorf epruvetu, doda se jedna zapremina izopropanola, i inkubira jedan sat na sobnoj temperaturi. DNK se zatim namotava uz pomoć staklenog štapića, koji se potom potopi u 70% etanol, kratko suši, i rastvori u 250µl 1xTE puferu.

IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI FENOL/HLOROFORM/IZOAMIL ALKOHOLOM

(Budowle et al 2000)

U ependorf epruvetu se sipa 400 µl Stain extraction buffer-a (100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 10 mM EDTA pH 8.0, 2% SDS), 10µl proteinaze K (20 mg/ml u 1% SDS, 2 mM EDTA) i doda 3 µl nekoagulisanog uzorka krvi. Promućka se i inkubira preko noći na 56°C. Zatim se rastvoru doda 500 µl smeše fenol/hloroform/izoamil alkohol (25:24:1) i vorteksuje 20 s. Posle 2 min centrifugiranja na 13000 rpm, gornja faza, koji sadrži DNK, prebaci se u novu epruvetu. Zatim se doda 1ml apsolutnog etanola, promućka i inkubira 30 min na -20°C. Sledi centrifugiranje u trajanju od 15 min na 13000 rpm, a zatim se apsolutni etanol odlije. Talog se ispere dodavanjem 1 ml 70% etanola, centrifugira 5 min na 13000 rpm i etanol ponovo odlije. Posle sušenja, talog je rastvaran u 36 µl 1xTE pufera

IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI NA KOLINI

(Prema uputstvu QIAGEN-a)

U ependorf epruvetu se sipaju 20 µl QIAGEN proteaze, 200 µl nekoagulisanog uzorka krvi i 200 µl pufera AL. Smeša se meša vorteksovanjem u toku 15 sek i zatim inkubira na 56°C u toku 10 min da bi se obezbedili liziranje ćelija i oslobađanje DNK od proteina. Nakon toga se dodaje 200 µl 100% etanola i smeša ponovo meša vorteksovanjem u toku 15 sek. Smeša se pažljivo nanosi na QIAamp kolonu i vrši se centrifugiranje na 8000 rpm u toku 1 min da bi sadržaj prošao kroz kolonu. Eluat se odbacuje jer se DNK afinitetno vezala za kolonu, a kolona se prebacuje u novu tubu za sakupljanje eluata. Zatim se dodaje 500 µl pufera AW1 i vrši centrifugiranje na 8000 rpm u toku 1 min. U ovom koraku se DNK, koja je vezana za kolonu, ispira od nečistoća. Eluat se ponovo odbacuje, a kolona se prebacuje u novu tubu za sakupljanje eluata. U sledećem koraku, dodaje se pufer AW2 koji dodatno oslobađa DNK od nečistoća i

vrši centrifugiranje na 14000 rpm u toku 3 min. Eluat se odbacuje, kolona prebacije u novu tubu i ponavlja centrifugiranje na istoj brzini u toku 1 min kako bi se uklonili i poslednji tragovi pufera. Konačno se kolona prebacuje u čistu ependorf epruvetu i dodaje se 200 µl pufera AE koji će osloboditi DNK sa kolone. Korisno je inkubirati kolonu na sobnoj temperaturi u toku 1 min kako bi se povećao prinos DNK. Centrifugiranjem na 6000 rpm u toku 1 min dobija se 190-200 µl eluata u kome je rastvorena DNK.

ANALIZA DNK NA AGAROZNOM GELU

(Maniatis et al 1989)

Analiza DNK vrši se na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (0,8 - 4%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. Kao pufer za pripremanje gelova koristi se 1xTAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA pH 8.0). Isti pufer koristi se i za elektroforezu. U gel se dodaje fluorescentna boja etidijum bromid (u finalnoj koncentraciji 0.5µg/µl) koja se interkalira u DNK i omogućava njenu vizuelizaciju pod UV svetlom. Elektroforeza se izvodi pri jačini struje od 80 mA i naponu od 80 V. Veličina fragmenata DNK određuje se pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

METODE ZA SKRINING I DETEKCIJU MUTACIJA

Metoda za skrining mutacija, poput DGGE metode, omogućava pretraživanje DNK sekvenci i otkrivanje sekvence kod koje je prisutna neka promena u odnosu na normalnu sekvencu. Da bi se promena identifikovala neophodno je primeniti i metode za direktnu detekciju mutacija poput sekvenciranja, PCR-RFLP i PCR-ACRS metode.

ELEKTROFOREZA NA GELU SA DENATURISUĆIM GRADIJENTOM (DGGE)

(Guldborg i Guttler 1994)

Elektroforeza na gelu sa denaturišućim gradijentom (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) je metoda koja samo otkriva prisustvo promene u okviru sekvence koja se ispituje. Ova metoda je korisna jer nam omogućava da eliminišemo one sekvence koje ne nose nikakvu promenu i dalju analizu nastavimo samo na onim sekvencama koje sadrže promenu. Ukoliko je promena prisutna, neophodno je da se dati DNK segment sekvencira radi utvrđivanja o kakvoj promeni se radi. Ova metoda najefikasnija je za otkrivanje promena u DNK sekvenci dužine 100-500bp.

Radi detekcije svih promena u 13 egzona i njima okolnim intronskim regionima gena za *PAH* korišćen je multipleks DGGE širokog raspona. Uspešan multipleks DGGE se zasniva na optimizaciji multipleks PCR reakcije i pravilnom odabiru egzona, sa karakteristikama dovoljno različitim, kako bi se na DGGE gelu pozicionirali u različitim regionima. U ovom radu optimizovane su sledeće multipleks kombinacije: I) egzoni 3, 5 i 9, II) egzoni 7, 11 i 12; III) egzoni 2 i 8; IV) egzoni 1, 4 i 13; V) egzoni 6 i 10. Zahvaljujući ovakvoj strategiji, u samo 5 multipleks PCR reakcija moguće je uočiti promene u 13 egzona gena za *PAH* jednog pacijenta. Šta više, na jednom gelu moguće je istovremeno obraditi uzorke pacijenta i oba roditelja.

Multipleks PCR smeša finalne zapremine 25 μ l sadrži sledeće komponente:

- 200-500 ng DNK
- 10x PCR pufer sa 15 mM $MgCl_2$ (finalna koncentracija 1x PCR pufer, 1.5 mM $MgCl_2$)
- 25 mM $MgCl_2$ (finalna koncentracija 1.5 mM)
- dNTPs (finalna koncentracija svakog 200 μ M)
- prajmeri navedeni u tabeli 2 (finalna koncentracija svakog 25 pmol)
- Taq polimeraza (Amersham Pharmacia, 5U/ μ l) 1U

Temperaturni profil svih multipleks PCR reakcija:

94°C/5min

(94°C/45s, 57°C/45s, 72°C/45s) ponovljeno 30 puta

72°C/10min

Prisustvo svih produkata nastalih u toku multipleks PCR reakcije proverava se na 2% agaroznom gelu.

Ukoliko je određena promena prisutna samo na jednom hromozomu (heterozigotno stanje), u PCR reakciji će nastati dva različita DNK molekula. Međutim, u slučaju tačkastih mutacija i delecija/insercija koje obuhvataju nekoliko baznih parova, promena neće biti vidljiva na agaroznom gelu. Pre nanošenja na gel sa gradijentom denaturišućeg agensa, potencira se formiranje heterodupleksa, tako što se DNK podvrgne denaturaciji (94°C/5min), pa nerestriktivnoj renaturaciji (58°C/20min; 37°C/20min; 4°C/ ∞). Na taj način formiraće se 2 homodupleksa (sa normalnom sekvencom i sa sekvencom koja sadrži promenu) i 2 heterodupleksa (na 5'-3' lancu je normalna sekvenca a na 3'-5' lancu se nalazi promena, i obrnuto).

Ukoliko u datoj sekvenci ne postoji promena ili se ista promena nalazi na oba hromozoma, u PCR reakciji produkovaće se samo jedna vrsta DNK molekula. Ukoliko je potrebno, takav PCR može da se pomeša sa PCR-om poznate sekvence, kako bi se obezbedilo formiranje heterodupleksa.

Za analizu se koristi 6% poliakrilamidni gel (akrilamid : N,N'-metilenbisakrilamid, u odnosu 37.5 : 1) pravljen sa 1X TAE puferom pH 8.0 (40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1 mM Na_2EDTA). Kao inicijatori polimerizacije koriste se 0,1% amonijumpersulfat i 0,01% TEMED. Kao što je već rečeno, korišćen je DGGE gel širokog raspona, što označava gradijent denaturišućeg agensa u rasponu od 0 do 80% (0M urea, 0% formamid do 5,6M urea, 32% formamid). Elektroforeza se odvija u 1x TAE puferu pri konstantnoj temperaturi (60°C) i konstantnom naponu 10V/cm 4,5h. Gel se zatim boji srebronitratom.

DGGE omogućava razdvajanje DNK fragmenata koji se razlikuju po topljivosti usled razlike u nukleotidnoj sekvenci. Većina DNK fragmenata duža od 200bp ima dva ili više domena sa karakterističnim tačkama topljenja koje su određene nukleotidnom sekvencom (Abrams i Stanton 1992). Fragment DNK putuje kroz gel u kome raste koncentracija denaturišućih agensa i zaustavlja se kada je koncentracija denaturišućeg agensa dovoljna da se poremeti struktura DNK dupleksa i onemogući njegovo dalje kretanje kroz gel. Potpuna denaturacija DNK sprečava se dodavanjem GC fragmenta dužine ~40bp ("GC

clamp“) na jedan kraj molekula. On ima najvišu tačku topljenja tako da će se svi ostali domeni molekula denaturisati pre njega.

Razlika u samo jednom nukleotidu učiniće da se normalni, heterozigotni i homozigotni DNK duplekسي zaustave na različitim mestima u gelu. Ukoliko je određena promena prisutna samo na jednom hromozomu, 4 formirana duplekسي će se na različitim mestima zaustaviti u gelu sa denaturišućim gradijentom. U idealnom slučaju, na gelu će se jasno videti 4 trake koje odgovaraju istom PCR produktu. Međutim, u zavisnosti od karakteristika DNK duplekسي, moguće je da se na gelu uoče svega dve ili tri trake. Takođe, moguće je da homodupleks sa normalnom sekvencom i homodupleks sa promenom, usled sličnih karakteristika, zauzimaju istu poziciju na gelu. Lažno negativni rezultat se u ovom slučaju može izbeći posebnom pripremom uzorka, tj njegovim mešanjem sa uzorkom poznate sekvence.

Raspored traka je reproducibilan i karakterističan za promenu. Ipak, potvrda sekvenciranjem je neophodna jer postoji mogućnost da slične promene dovode do istog rasporeda traka na gelu.

BOJENJE POLIAKRILAMIDNIH GELOVA SREBRONITRATOM

(Radojković i Kušić 2000)

Vizuelizacija DNK na poliakrilamidnim gelovima vrši se bojenjem pomoću srebronitrata. Gel se posle elektroforeze fiksira rastvorom 10% etanola i 0.5% glacijalne sirćetne kiseline, uz mućkanje na klackalici 20-30min. Posle toga se ovaj rastvor odlije, a gel se prelije 0.1% rastvorom srebronitrata i mućka na klackalici 10min. Sledi ispiranje vodom. Trake u gelu postaju vidljive nakon dodavanja rastvora 1.5% NaOH, 0.01% NaBH₄ i 0.048% formaldehid (15 do 20min, u zavisnosti od količine uzorka u gelu). Bojenje se stopira dodavanjem 0.75% rastvora Na₂CO₃.

PCR-RFLP I PCR-ACRS METODE ZA DETEKCIJU MUTACIJA

PCR-RFLP (Polimerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism) je metoda koji se koristi za direktnu detekciju mutacije koja menja, kreira novo ili ukida postojeće mesto prepoznavanja nekog restrikcionog enzima. PCR-RFLP metodu koristili smo za detekciju R408W (Ivaschenko i Baranov 1993), L48S, R261Q, R261X i IVS10-11G>A mutacija (Eiken et al 1993; Rivera et al 1998; . www.geneticahumana.lt), kao i za analizu polimorfnihi mesta u sastavu ekstenzivnog PAH haplotipa.

PCR-ACRS (Polimerase chain reaction –Amplification-created restriction site) je metoda koja se koristi kada ne postoji restrikcioni enzim kojim se direktno može detektovati mutacija. U tom slučaju određeno restrikciono mesto može biti kreirano specifičnom mutagenezom pomoću PCR-a. Jedan od prajmera koji se koristi u PCR-u dizajniran je tako da bude komplementaran sekvenci DNK u blizini mesta gde se nalazi mutacija, ali ne potpuno. Jedan od nukleotida na 3'-kraju je izmenjen tako da ne sprečava specifično vezivanje prajmera za DNK, ali omogućava kreiranje restrikcionog mesta. Restrikciono mesto unutar umnoženog fragmenta DNK formira se od dela sekvence prajmera u kojem se nalazi izmenjeni nukleotid i dela prepisane DNK sekvence u kojem se nalazi mutacija. PCR-ACRS metodu koristili smo za detekciju R158Q mutacije. Na ovaj način se u dobijenom DNK fragmentu kreira restrikciono mesto za enzim *MspI*, ali samo ukoliko u fragmentu ne postoji mutacija R158Q (Eiken et al 1991).

PCR-RFLP i PCR-ACRS se izvode u dva koraka. Prvo se PCR-om pomoću specifičnih prajmera umnožava region DNK u kojem se nalazi određena mutacija, a zatim se tako dobijeni fragment DNK seče odgovarajućim restrikcionim enzimom. Produkti digestije analiziraju se elektroforezom na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu, a rezultati interpretiraju u zavisnosti od toga da li restrikcioni enzim seče ili ne seče DNK fragment.

Regioni gena za *PAH* u kojima se nalaze mutacije L48S, R158Q, R261Q, R261X, IVS10-11G>A i R408W, umnožavaju se prajmerima koji su navedeni u Tabeli 3. Ostale komponente PCR smeše su iste za sve navedene mutacije.

PCR smeša finalne zapremine 50 μ l sadrži sledeće komponente:

- 200-500ng DNK
- 10x PCR pufer sa 15mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1x PCR pufer, 1.5 mM MgCl₂)
- dNTPs (finalna koncentracija svakog 200 μ M)
- prajmeri (finalna koncentracija svakog 50pmol, osim u slučaju mutacije L48S, 25pmol svaki)
- Taq polimeraza (Amersham Pharmacia, 5U/ μ l) 1U

Različite temperature anilinga prajmera date su u tabeli 9. Sem toga temperaturni profili PCR reakcija za detekciju L48S, R261Q, R261X, IVS10-11G>A i R408W mutacija se ne razlikuju:

95°C/5min

(94°C/1min, T_A/1min, 72°C/1min) ponovljeno 30 puta

72°C/10min

Tabela 9: Odgovarajuća temperatura anilinga prajmera:

Mutacija	L48S	R261Q	R261X	IVS10-11G>A	R408W
T _A	55°C	56°C	56°C	56°C	50°C

Temperaturni profil PCR reakcije za detekciju R158Q mutacije je nešto drugačiji:

95°C/5min

55°C/30s

72°C/1min

(95°C/30s, 55°C/30s, 72°C/1min) ponovljeno 30 puta

72°C/10min

Nakon provere PCR produkta na 2% agaroznom gelu, pristupa se detekciji mutacije pomoću sečenja dobijenog DNK fragmenata odgovarajućim restrikcionim enzimima. Sastavi smeša za digestiju restrikcionim enzimom dati su u Tabeli 10.

Tabela 10. Sastavi smeša za digestiju za detekciju mutacija L48S, R158Q, R261Q, R261X i IVS10-11G>A i R408W.

Mutacija	L48S	R158Q	R261Q	R261X	IVS10-11G>A	R408W
PCR produkt	10µl	15µl	10µl	10µl	15µl	10µl
10x pufer	1xBall (Ph)	10x T (Ph)	2xOPA (Ph)	1xNEB 3 (B)	1xNEB 3 (B)	1xH (Ph)
restrikcioni enzim	<i>Bal</i> 2U (Ph)	<i>Msp</i> 5U (Ph)	<i>Hinfl</i> 3U (Ph)	<i>Ddel</i> 2.5U (B)	<i>Ddel</i> 2.5U (B)	<i>Styl</i> 2.4U (Ph)
BSA	0.01%	0.01%	/	/	/	/
finalna zapremina	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl

Ph- Amersham Pharmacia

B- Biolabs

Sve smeše za digestiju inkubirane su 16h na 37°C. Produkti digestija za detekciju mutacija L48S i IVS10-11G>A analizirani su elektroforezom na 2% agaroznim gelovima, produkti digestije R158Q na 4% agaroznom gelu, a produkti digestija za detekciju mutacija R261Q, R261X i R408W elektroforezom na 8% poliakrilamidnim gelovima.

Mutacije R261X, IVS10-11G>A i R408W redom kreiraju nova restrikciona mesta za enzime *Ddel*, *Ddel* i *Styl* (*Eco*T14I), a mutacije L48S i R261Q ukidaju postojeća restrikciona mesta za enzime *Bal* I (*Msc*I) i *Hinfl*. U slučaju prisustva R158Q mutacije, *Msp*I enzim neće seći PCR produkt (Tabela 11).

Tabela 11. Pregled dužina PCR produkata i fragmenata koji nastaju usled sečenja odgovarajućim restrikcionim enzimom.

Mutacija	Dužina PCR produkta (bp)	Restrikcioni enzim	Dužine fragmenata (bp)	
			u odsustvu mutacije	u prisustvu mutacije
L48S	305	<i>Bal</i>	184+121	305
R158Q	157	<i>Msp</i> I	137+20	157
R261Q	362	<i>Hinfl</i>	146+123+93	269+93
R261X	362	<i>Ddel</i>	267+95	148+119+95
IVS10-11G>A	284	<i>Ddel</i>	284	205+79
R408W	245	<i>Styl</i>	245	148+97

ANALIZA DNK NA POLIAKRILAMIDNOM GELU

(Maniatis et al 1989)

Analiza DNK vrši se vertikalnom 8% poliakrilamidnom gelu (akrilamid : N,N'-metilenbisakrilamid, u odnosu 29 : 1). Kao pufer za elektroforezu a i za pripremanje gela koristi se 1x TBE (100 mM Tris, 83mM borna kiselina, 1 mM EDTA pH 8.0). Kao inicijatori polimerizacije koriste se 0,1%

amonijumpersulfat i 0,01% TEMED. Elektroforeza se izvodi pri jačini struje od 20mA i naponu od 120V u toku 90min. Gel se zatim boji srebronitratom.

PCR-RFLP METODA ZA HAPLOTIPSKU ANALIZU

U haplotipsku analizu uključeno je šest polimorfnih mesta (*BglII*, *PvuIIa*, *PvuIIb*, *EcoRI*, *MspI* i *XmnI*) koji se nalaze u intronskim regionima gena za *PAH* (ALFRED data base; Dworniczak et al 1991a; Dworniczak et al 1991b; Goltsov et al 1992a, Goltsov et al 1992b; Wedemeyer et al 1991).

Prajmeri koji se koriste za umnožavanje odgovarajućih intronskih regiona navedeni su u Tabeli 4. Ostale komponente PCR smeše, kao i temperaturni profili PCR reakcija isti su za sve navedene polimorfizme.

PCR smeša finalne zapremine 25 μ l sadrži sledeće komponente:

- 200-500 ng DNK
- 10x PCR pufer sa 15 mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1x PCR pufer, 1.5 mM MgCl₂)
- 5x Q pufer (finalna koncentracija 1x)
- 25 mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1.5 mM)
- dNTPs (finalna koncentracija svakog 200 μ M)
- prajmeri (finalna koncentracija svakog 20 pmol)
- Qiagen HotStart Taq DNA polimeraza, 5U/ μ l (finalno 1U)

Temperaturni profil PCR reakcije:

95°C/15min

50°C/1min

72°C/2min

(92°C/25s, 50°C/25s, 72°C/40s) ponovljeno 35 puta

72°C/10min

Nakon provere PCR produkta na 2% agaroznom gelu, pristupa se detekciji mutacije pomoću sečenja dobijenog DNK fragmenata odgovarajućim restrikcionim enzimima. U smešu za digestiju se, sem 300-800ng umnoženog intronskog fragmenta gena za *PAH*, dodaju odgovarajući restrikcioni enzimi, puferi i aditivi navedeni u tabeli 11.

Tabela 12. Sastavi smeša za digestiju za detekciju *BglII*, *PvuIIa*, *PvuIIb*, *EcoRI*, *MspI* i *XmnI* polimorfizama (nose nazive prema restrikcionim enzimima).

	PCR	Restrikcioni enzim	Fin	Radni pufer	Fin	Aditivi	Fin	V
BglII	I 1	Fermentas, 10 U/ μ l	1U	10x Orange	1x	-	-	20
PvuII	I 2/3	Biolabs, 10 U/ μ l	1U	10x NEB2	1x	-	-	20
EcoRI	I 5	Biolabs, 20 U/ μ l	1U	10x NEB2	1x	-	-	20
MspI	I 7	Pharmacia, 10 U/ μ l	1U	10x T	1x	0.1% BSA	0.01%	15
XmnI	I 8	Biolabs, 6 U/ μ l	1U	10x NEB	1x	100x BSA	1x	20

Smeša za digestiju inkubira se 16h na 37°C, a produkti digestije se analiziraju elektroforezom na 2% agaroznom gelu (Tabela 13).

Tabela 13. Pregled dužina PCR produkata i fragmenata koji nastaju usled sečenja odgovarajućim restrikcionim enzimom.

Polimorfno mesto	Dužina PCR produkta (bp)	Dužine fragmenata (bp)
BglI	290	209+81
PvuIIa	375	225+149
PvuIIb	489	259+230
EcoRI	458	412+45
MspI	425	300+125
XmnI	205	110+95

ANALIZA VARIJABILNOG BROJA TANDEMSKIH PONOVAKA (VNTR) (Goltsov et al 1992a)

Za određivanje broja tandemskih ponovaka, u okviru 3' regiona gena za *PAH*, korišćena je PCR metoda.

PCR smeša finalne zapremine 25μl sadrži sledeće komponente:

- 200-500ng DNK
- 10x PCR pufer sa 15mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1x PCR pufer, 1.5 mM MgCl₂)
- 5xQ pufer (finalna koncentracija 1x)
- 25 mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1.5 mM)
- dNTPs (finalna koncentracija svakog 200μM)
- prajmeri navedeni u tabeli 4 (finalna koncentracija svakog 20pmol)
- Qiagen HotStart Taq DNA polimeraza, 5U/μl (finalno 1U)

Temperaturni profil PCR reakcije:

95°C/15min

50°C/1min

72°C/2min

(92°C/25s, 50°C/25s, 72°C/40s) ponovljeno 35 puta

72°C/10min

PCR produkt analizira se elektroforezom na 4% agaroznom gelu. Na osnovu dužine PCR produkta vrši se određivanje broja ponovaka.

SEKVENCIJANJE PCR PRODUKATA

Sekvenciranje DNK je rađeno BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Ovaj kit omogućava sekvenciranje u PCR reakciji u kojoj se pored deoksinukleotida koriste i 2',3'-dideoksinukleotidi (Sanger et al 1977). DNK polimeraza kopira jedan lanac DNK matrice ugrađujući nukleotide na 3' kraj prajmera sve dok u rastući lanac ne ugradi neki od dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH-grupu na 3' poziciji, zbog čega nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom (asimetrični PCR) tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Svaki od 4 dideoksinukleotida obeležen je različitom fluorescentnom bojom čime je omogućena detekcija fragmenata u sekvenceru. Za razliku od kitova u kojima su dideoksinukleotidi obeleženi jednom istom fluorescentnom bojom, ovaj kit omogućava da se sekvenciranje jednog uzorka radi u jednoj PCR reakciji umesto u četiri odvojene.

Egzoni gena za *PAH* umnožavaju se zajedno sa okolnim intronskim sekvencama u PCR reakciji, uz pomoć odgovarajućih prajmera navedenih u tabeli 2. Jedina razlika u odnosu na multipleks PCR koji se izvodi pre DGGE metode, je što PCR smeša za sekvenciranje sadrži samo jedan par prajmera.

PCR smeša finalne zapremine 25 µl sadrži sledeće komponente:

- 200-500 ng DNK
- 10x PCR pufer sa 15 mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1x PCR pufer, 1.5 mM MgCl₂)
- 25 mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1.5 mM)
- dNTPs (finalna koncentracija svakog 200 µM)
- prajmeri (finalna koncentracija svakog 25 pmol)
- Taq polimeraza (Amersham Pharmacia, 5U/µl) 1U

Temperaturni profili svih PCR reakcija:

94°C/5min

(94°C/45s, 57°C/45s, 72°C/45s) ponovljeno 30 puta

72°C/10min

Nakon provere PCR produkta na 2% agaroznom gelu, vrši se njegovo prečišćavanje na kolini (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Kada je DNK matrica pripremljena, pristupa se reakciji sekvenciranja za koju su u izradi ovog rada korišćeni isti prajmeri kao i za PCR reakciju, sem ukoliko nije drugačije naglašeno (Tabela 7).

Smeša za sekvenciranje finalne zapremine 8µl sadrži sledeće komponente:

- 3-10 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-500bp)
- Prajmer za sekvenciranje (finalna koncentracija 3.2 pmol)
- 3µl Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)

Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje:

96°C/1min

(96°C/10s, 50°C/5s, 60°C/4min) ponovljeno 25 puta

4°C/∞

Posle završene reakcije sekvenciranja u uzorke se doda 40μl Na-acetata, promućka se i centrifugira 20min na 13000 rpm posle čega se supernatant uklanja. Talogu se doda 200μl 70% etanola i centrifugira 10min na 13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Ovaj korak se ponavlja dva puta. Nakon drugog ispiranja etanolom talog je neophodno u potpunosti osušiti. Osušeni talog se rastvara u 25μl HiDi i celokupna količina se nanosi na plejt za sekvenciranje.

RAČUNANJE HOMOZIGOTNOSTI

(Guldborg et al 1996)

Homozigotnost (j) lokusa *PAH* date populacije izračunava se pomoću sledeće jednačine: $j = \sum x_i^2$, gde je x_i frekvencija i -tog alela. Svakim od neokarakterisanih alela pripisuje se frekvencija $1/N$, gde je N ukupan broj mutiranih hromozoma koji su uključeni u istraživanje.

Ova vrednost je teorijska frekvencija da dva pacijenata nose dve identične mutacije. Homozigotna vrednost različitih populacija oslikava njihovu heterogenost za dati lokus.

RAČUNANJE OČEKIVANE HETEROZIGOTNOSTI

(Kidd et al 2000)

Očekivana heterozigotnost date pozicije izračunava se prema sledećoj formuli: $1 - \sum p_i^2$, gde je p alelska frekvencija, a heterozigotnost može da varira u opsegu od 0 do 1. Za bialelske sisteme, postoje samo dve različite mogućnosti, odnosno $i=2$.

METODE ZA ANALIZU POLIMORFIZMA U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU KAO REGULATORA GENSKE EKSPRESIJE

METODOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

(Maniatis et al 1989)

Radi analize dela osmog introna gena za *PAH*, željeni DNK region je metodama rekombinantne DNK (digestija restrikcionim enzimima, defosforilacija i ligacija) ubačen u pBRCAT5 plasmidni vektor. Dobijeni konstrukt označen je sa XmnI.

U prvom koraku, željeni DNK region se umnožava u PCR reakciji pomoću specifičnih prajmera navedenih u Tabeli 5.

PCR smeša finalne zapremine 25 μ l sadrži sledeće komponente:

- 200-500 ng DNK
- 10x PCR pufer sa 15 mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1x PCR pufer, 1.5 mM MgCl₂)
- 5x Q pufer (finalna koncentracija 1x)
- 25 mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1.5 mM)
- dNTPs (finalna koncentracija svakog 200 μ M)
- prajmeri (finalna koncentracija svakog 20 pmol)
- Taq polimeraza (Qiagen HotStart, 5U/ μ l) 1U

Temperaturni profil PCR reakcije:

95°C/15min

(95°C/30s, 58°C/30s, 72°C/30s) ponovljeno 35 puta

72°C/10min

PCR produkt se proverava elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Nakon toga metodom digestije odabranim restrikcionim enzimima formiraju se lepljivi krajevi na plazmidu i PCR fragmentu. Plazmid pCAT5 sadrži polilinker sa mestima sečenja za veliki broj restrikcionih enzima, između ostalih *HindIII* i *XbaI*. U slučaju PCR fragmenta, restrikciona mesta su kreirana pomoću prajmera u PCR reakciji.

Smeša za digestiju finalne zapremine 20 μ l sadrži sledeće komponente:

- 400ng pCAT5 plazmida ili 300-800ng prečišćene PCR smeše
- 10xM pufer (finalno 1x)
- 0.1%BSA (finalno 0.01%)
- HindIII, Pharmacia 15U/ μ l (finalno 3U)
- XbaI, Pharmacia 15U/ μ l (finalno 3U)

Smeše za digestiju inkubirane su 16h na 37°C. Produkti digestije analizirani su elektroforezom na 1% agaroznom gelu u slučaju digestije plazmida, odnosno 2% agaroznom gelu u slučaju digestije PCR produkta.

Istovremeno su pripremane i kontrolne digestije u kojima je plazmid sečen samo sa jednim enzimom. Linearizacija plazmida u obe jednostruke digestije je potvrda aktivnosti oba restrikciona enzima.

Radi sprečavanja recirkularizacije plazmida vrši se reakcija defosforilacije kojom se sa 5' kraja plazmida uklanja fosfatna grupa. Defosforilacija se vrši alkalnom fosfatazom izolovanom iz creva teleta (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIAP) prema uputstvu proizvođača.

Smeša za defosforilaciju finalne zapremine 35μl sadrži sledeće komponente:

- 1.5-2 μg pCAT5 plazmida
- 10x pufer (finalno 1x)
- CIAP, Fermentas 10U/μl (finalno 2U)

Smeša za defosforilaciju se inkubira 30 minuta na 37°C. Dejstvo alkalne fosfataze se zaustavlja izlaganjem smeše temperaturi od 85 °C u trajanju od 15 minuta.

Formiranje rekombinantnog DNK molekula spajanjem plazmida i PCR fragmenta sa komplementarnim lepljivim krajevima vrši se u ligacionoj reakciji.

Ukupna količina DNK u ligacionoj smeši ne bi trebalo da pređe 200 ng. Molarni odnos vektora i fragmenta je varijabilan. Za fragmente veličine slične vektoru, preporučuje se odnos 1 : 1, dok u slučaju fragmenata manjih od vektora odnos raste 1:2, 1:3, 1:5 i tako dalje.

Ligaciona smeša finalne zapremine 10μl sadrži sledeće komponente:

- 100ng digeriranog, defosforilovanog, prečišćenog pCAT5
- 75ng digeriranog prečišćenog PCR fragmenta (molarni odnos plazmida i fragmenta je 1:15)
- 10xpufer, sadrži Mg i ATP (finalno 1x)
- T4 DNK Ligaza, Biolabs 400U/μl (finalno 4U)

Ligaciona smeša se inkubira 16h na 16°C. Produkta ligacije moguće je analizirati elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

KULTIVISANJE BAKTERIJA (Maniatis et al 1989)

U toku rada sa bakterijama neophodno je održati sterilne uslove. Iz tog razloga, sve manipulacije odvijaju se u neposrednoj blizini plamenika. Takođe, svi rastvori, posude (petri šolje, menzure itd.) i alatke (eža, nastavak, čačkalica itd.) moraju biti sterilni.

E. coli bakterije soja DH5 α kultivisane su u tečnom LB (Luria-Bertani) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj LB podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca i 1,5% bacto-agar). Svi medijumi za kultivisanje se sterilisu autoklaviranjem.

Bakterije se kultivisu na temperaturi od 37 °C. I u tečni i u čvrsti medijum dodaje se je odgovarajući antibiotik. S obzirom da pCAT5 nosi rezistenciju na ampicilin, ovaj antibiotik je dodavan u finalnoj koncentraciji 100 μ g/ml.

PRIPREMANJE KOMPETENTNIH ČELIJA *E. Coli* DH5 α (Maniatis et al 1989)

Ovom metodom se bakterije pripremaju za transformaciju stranom DNK. Čelijska membrana bakterija se učini propustljivijom, a pritom se ne sme umanjiti vijabilnost samih ćelija i njihova sposobnost umnožavanja.

Sa čvrste LB podloge se pojedinačna bakterijska kolonija prenese u 5 ml tečnog LB medijuma bez antibiotika (DH5 α soj nije rezistentan na antibiotike). Kultivacija se vrši preko noći, uz aeraciju i mućkanje na 37 °C. Narednog dana, u svež LB medijuma (20 ml) inokulira se 1ml prekonoćne kulture. Bakterije se gaje na 37 °C do postizanja gustine od 0,3 - 0,5 OD/ml, koja se određuje merenjem spektrofotometrom na talasnoj dužini od 620 nm. Bakterije iz ove kulture razblažuju se inokuliranjem (2ml) u svež tečni LB medijuma (20 ml). Rast bakterijske kulture se nastavlja na 37 °C do gustine 0,5 OD₆₂₀/ml. Na ovaj način dobijamo veliki broj bakterijskih ćelija koje se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta.

Taloženje bakterija se vrši centrifugiranjem na 7000 rpm na +4 °C u trajanju od 10 minuta (Sorvall centrifuga, SS-34). Dobijeni talog bakterija se resuspenduje u 10 ml hladnog 0,1 M CaCl₂, inkubira na ledu 10 minuta i ponovo centrifugira pri istim uslovima. Bakterijski talog se resuspenduje u 2 ml ohlađenog rastvora sačinjenog od 0,1 M CaCl₂ i 15% glicerola. Kompetentne bakterijske ćelije čuvaju se u alikvotima od 200 μ l na -80 °C.

Poželjno je izvršiti proveru kompetentnih ćelija njihovim zasejavanjem na čvrstu LB podlogu (očekuje se rast) i na čvrstu LB podlogu sa antibiotikom (ne očekuje se rast). Takođe, poželjno je isprobati efikasnost transformacije ovih ćelija plazmidom koji nosi rezistenciju i njihovim sejanjem na podlogu koja sadrži odgovarajući antibiotik (očekuje se rast).

U delu rada koji je vršen u laboratoriji za Molekularnu osnovu metaboličkih bolesti u Madridu, korišćene su komercijalne superkompetentne XL1-Blue ćelije (Stratagene).

TRANSFORMACIJA *E. Coli* DH5 α KOMPETENTNIH ČELIJA (Cohen et al 1972)

Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija plazmidom u koji je ukloniran željeni fragment DNK je ključna metoda genetičkog inženjerstva, i obezbeđuje velike količine DNK potrebne za naredne

eksperimente. Bakterije se u ovom postupku koriste (zbog svoje značajne reproduktivne sposobnosti) kao recipijent za stranu DNK koju replikuju jednako efikasno kao i svoju sopstvenu.

Kompetentne ćelije (200 µl) se otapaju na ledu i dodaje im se produkt ligacije plazmida i DNK fragmenta uz veoma pažljivo, blago mešanje. Smeša se inkubira 30min na ledu.

Izlaganjem smeše temperaturnim šokovima: led - 42 °C (2min)- led (10min), propustljivost bakterijskih membrana dostiže maksimum što omogućava efikasnu transformaciju kompetentnog soja *E. coli* bakterija plazmidnom DNK.

Transformisanim ćelijama dodaje se 800 µl tečnog LB bez antibiotika i njihov oporavak se favorizuje rastom u aerisanim uslovima na 37°C u toku 30-60min. Oporavak se nastavlja dodavanjem svežeg LB medijuma sa antibiotikom (1ml) i rastom u aerisanim uslovima na 37°C u toku 1-2h.

Nakon toga se alikvot bakterijske kulture (20-100 µl) razmazuje po čvrstoj LB podlozi koja sadrži antibiotik. Rast bakterija odvija se preko noći na 37°C, posle čega se uočavaju pojedinačne kolonije na petri šoljama. S obzirom na selektivnost podloge, samo bakterije koje su primile plazmidnu DNK tj. transformanti, mogu da izrastu.

DETEKCIJA ŽELJENOG KONSTRUKTA

Sekvenciranje konstrukta je konačna potvrda da plazmid sadrži željeni DNK fragment i da u čitavoj sekvenci ne postoji promena nastala usled eventualne greške u DNK replikaciji. Sekvenciranje je vršeno pomoću prajmera iz Tabele 5.

U slučaju transformacije bakterija *Xmnl* konstruktom dobije se veliki broj transformanata. Da bi se smanjio broj onih koji će se proveravati sekvenciranje, radjena je digestija konstrukta istim restrikcionim enzimima kojima su plazmid i fragment bili pripremljeni pre reakcije ligacije. Na taj način DNK fragment se "izbacije" iz plazmida, što se proverava elektroforezom na agaroznom gelu.

Da bi digestija, sekvenciranje i dalji eksperimenti sa konstruktom mogli da se realizuju, potrebno je izolovati plazmidnu DNK iz transformanata.

IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI (MINI PREP)

(Zhou et al 1990)

Za dobijanje relativno male količine plazmida zadovoljavajuće čistoće i kvaliteta da se na njemu mogu raditi analize restrikcionim enzimima, koristimo metodu "mini prep".

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 2 ml tečnog LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37 °C uz aeraciju. Prekonoćna kultura se prebaci u ependorf epruvetu i centrifugira 5 min na 13000rpm. Bakterijski talog se resuspenduje vorteksovanjem i suspenziji se dodaje 300 µl svežeg TENS pufera (1x TE, 0,1 N NaOH, 0.5% SDS) koji lizira bakterije. Nakon kratkog vorteksovanja dodaje se 150 µl 3M Na-acetat pH 5,2. Nakon snažnog vorteksovanja centrifugira se 2 minuta na 13000rpm (Ependorf centrifuga). Supernatant u kome se nalazi DNK prebacuje se u čistu

ependorf epruvetu, dok proteini ostaju u talogu. Dodaje se 1 ml hladnog 95% etanola, promeša i centrifugira pri istim uslovima. DNK talog se ispira hladnim 70% etanolom i nakon centrifugiranja pri istim uslovima suši u vakuum centrifugi. DNK se resuspenduje u 30 μ l pufera 1xTE koji sadrži RNK-aza (finalna koncentracija 10 μ g/ml).

IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI

(Prema uputstvu QIAGEN-a)

Za dobijanje male količine plazmidne DNK koja može uspešno da se sekvencira, koristi se QIAprep Spin Miniprep Kit.

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 5 ml tečnog LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37 °C uz aeraciju. Prekonoćna kultura se prebaci u ependorf epruvetu i centrifugira 5 min na 13000rpm. Bakterijski talog se resuspenduje vorteksovanjem u 250 μ l pufera P1. Zatim se dodaje 250 μ l pufera P2 i sadržaj se meša prevrtanjem tube 4 do 6 puta. I nakon dodavanja 350 μ l pufera N3 neophodno je momentalno i temeljno promešati sadržaj na isti način. Ovi koraci omogućili su lizu bakterija. Zatim se smeša centrifugira na 13000 rpm u toku 10 min. Supernatant se direktnim presipanjem iz ependorf epruvete nanosi na QIAprep kolonu. Nakon toga se vrši centrifugiranje na 13000 rpm u toku 1 min i eluat se odbacuje. U ovom koraku DNK je ostala vezana za kolonu i potrebno ju je isprati od nečistoća. To se postiže dodavanjem 0.5 ml pufera PB i centrifugiranjem u toku 1 min. Ovaj korak nije neophodan u slučaju DH5 α bakterijskog soja, ali s obzirom da ne ometa izolaciju i ne smanjuje prinos reakcije ne mora se preskočiti. Dodavanje 0.75 ml pufera PE i centrifugiranje na 13000 rpm u toku 1 min takođe oslobađa DNK od nečistoća. Posle svakog od do sada navedenih centrifugiranja, eluat se odbacuje. Da bi se odstranili i poslednji tragovi pufera, kolona se prebacuje u čistu ependorf epruvetu i ponovo centrifugira na 13000 rpm u toku 1 min. Kolona se ponovo prebacuje u čistu ependorf epruvetu i dodaje se 100 μ l pufera EB koji će osloboditi DNK sa kolone. Korisno je inkubirati kolonu na sobnoj temperaturi u toku 1 min kako bi se povećao prinos DNK. Centrifugiranjem na 13000 rpm u toku 1 min dobija se 95-100 μ l eluata u kome je rastvorena plazmidna DNK.

IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA VELIKOJ SKALI

(Prema uputstvu QIAGEN-a)

Za dobijanje velike količine plazmidne DNK dobrog kvaliteta, koja je potrebna za eksperimente transfekcije, koristi se QIAGEN Plasmid Purification Maxi Kit.

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 500 ml tečnog LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37 °C uz aeraciju. Ukoliko bakterijski soj nije dostupan na petri šolji, može se koristiti i glicerolski stok. Glicerolski stok nije potrebno otapati, dovoljno je zagrebat sterilnim nastavkom po površini i nastavak ubaciti u tečni medijum. Prekonoćnu kulturu je potrebno podeliti na dva dela i prebaciti u sterilnu plastičnu tubu od 250 ml. Centrifugiranje se vrši na 6000rpm u toku 20 min, nakon čega se supernatant prosipa, a bakterijski talog resuspenduje u 10 ml pufera P1 da bi se obezbedila liza bakterijskih ćelija. Od ovog koraka pa nadalje, sve se radi na ledu.

Nakon što je talog u potpunosti rastvoren, sadržaj se prebacuje u sterilnu plastičnu tubu od 30 ml. Zatim se dodaje 10 ml pufera P2 a sadržaj se meša prevrtanjem 4 do 6 puta. Mešanje vorteksovanjem se ne preporučuje da ne bi došlo do mešanja plazmidne i genomske DNK. Nakon toga, smeša se inkubira na sobnoj temperaturi u toku 5 min. Zatim se dodaje 10 ml pufera P3 nakon čega je potrebno momentalno i temeljno promešati smešu prevrtanjem 4 do 6 puta i ostaviti je na ledu u toku 20 min. Smeša se zatim centrifugira na 13000 rpm u toku 30 min na +4°C (Sorvall centrifuga, rotor SS-34). Da ne bi došlo do taloženja, supernatant u kome se nalazi plazmidna DNK je najbolje odmah prebaciti u predhodno pripremljenu Qiagen kolonu. Kolona se priprema propuštanjem 10 ml pufera QBT, koji uz pomoć sile gravitacije prolazi kroz kolonu. Na isti način i supernatant prolazi kroz kolonu. DNK koja je ostala vezana za nju ispira se od nečistoća dva puta dodavanjem 30 ml pufera QC. Svi eluati se do ovog trenutka bacaju. Pre dodavanja sledećeg pufera, potrebno je kolonu učvrstiti za sterilnu staklenu corex epruvetu od 30 ml. Zatim se dodaje 15 ml pufera QF koji eluira DNK sa kolone.

DNK se taloži dodavanjem 10.5 ml izopropanola. Nakon dodavanja, smešu je potrebno promešati prevrtanjem i centrifugirati na 8000 rpm u toku 30 min na +4°C (Sorvall centrifuga, rotor SS-34). Supernatant se pažljivo odliva, a DNK talog se ispira sa 5 ml 70% etanola. Nakon centrifugiranja na 8000 rpm u toku 10 min, supernatant je potrebno ukloniti do poslednje kapi, kako bi se talog što pre osušio. DNK talog se rastvara u 200 µl 1xTE. Kako bi se DNK bolje rastvorila poželjno je da se ne rastvara odmah, nego da se ostavi na +4°C u toku noći.

ČUVANJE TRANSFORMANATA

(Maniatis et al 1989)

Transformanti su nekoliko nedelja vijabilni na čvrstim LB podlogama suplementiranim sa antibiotikom, ukoliko su petri šolje zatvorene para filmom i čuvaju se na +4°C okrenute naopako.

Za duže čuvanje transformanata, pripremaju se glicerolski stokovi: 150 µl sterilnog 100% glicerola i 850 µl tečne prekonoćne kulture. Najbolje je koristiti istu prekonoćnu kulturu koja se koristi za izolaciju plazmidne DNK na maloj skali. Na taj način pouzdano znamo da se u glicerolskom stoku nalazi upravo ona bakterijska kultura kod koje je konstrukt potvrđen sekvenciranjem.

Glicerolski stokovi su vijabilni par godina na -20°C i duži niz godina na -80°C.

USLOVI GAJENJA ĆELIJA U KULTURI

(Shannon et al 1973)

Hep G2, Hep 3B i K562 su ustaljene (permanentne) ćelijske linije. Hep G2 i Hep 3B ćelije se lepe za podlogu i rastu dok se ne formira jednoćelijski "tepih" na donjoj površini posude za kultivisanje, kada, usled kontaktne inhibicije, ćelije ulaze u stacionarnu fazu rasta (mirovanje), dok K562 ćelije rastu u suspenziji (razmnožavaju se u tečnom medijumu bez lepljenja za podlogu).

Sve ćelijske linije se gaje u Petri šoljama ili Falkon plastičnim sudovima u termostatu sa automatskim protokom 5% CO₂ u vazduhu i na temperaturi od 37 °C. Koristi se medijum koji sadrži sve komponente neophodne za neprekidno razmnožavanje ćelija (Eagle MEM sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma).

Jedan litar ovog medijuma sadrži 100 ml 10x Eagle MEM-a, 100 ml fetalnog telećeg seruma, 28 ml 7,5% NaHCO_3 , 10 ml 1 M HEPES-a pH 7-7.2, 10 ml 3% glutamina (0.03% finalno), 10 ml 100x neesencijalnih aminokiselina, 10 ml antibiotika (penicilin - streptomycin).

ODMRZAVANJE ČELIJA

Ćelije treba brzo odmrznuti, prenoseći ih sa -196°C u topli medijum (37°C). Brzim otapanjem, kristalne strukture brzo nestaju i smanjuje se opasnost da probiju ćelijske membrane.

DMSO koji je prisutan u medijumu za zaleđivanje, može se ukloniti centrifugiranjem na 1200 obr/min, 2min. Međutim, neposredno nakon otapanje ćelije su veoma osetljive. S obzirom da je koncentracija DMSO-a veoma niska nakon dodavanja svežeg medijuma, ovaj korak je poželjno odložiti.

Ispiranje ćelija PBS-om da bi se odstranile mrtve ćelije i DMSO najbolje je vršiti nakon 24-48 h od momenta odmrzavanja.

Potrebno je da prođe izvesno vreme da bi se ćelije oporavile posle odmrzavanja i ušle u normalni tempo rasta.

ZAMRZAVANJE ČELIJA

Ćelije se zamrzavaju kad su u fazi logaritamskog rasta, ni pre (*lag* faza - neposredno posle pasažiranja dok se ćelije oporavljaju i neznatno umnožavaju), ni posle (*stacionarna* faza koja se karakteriše sve većim umiranjem ćelija zbog prevelikog broja ćelija po mililitru medijuma za rast).

Ćelije se pripremaju za zamrzavanje na sledeći način:

Ćelije koje se lepe ispiraju se od medijuma u kome su rasle i tripsinizuju, i resuspenduju u svežem medijumu. U slučaju ćelija koje rastu u suspenziju, ovaj korak ne postoji. Nezavisno od karakteristika, ćelijska suspenzija se prebacije u tubu i vrši se centrifugiranje na 1200 obr/min, 2 minuta na sobnoj temperaturi (centrifuga Heraeus). Medijum se pažljivo usisa da ne bi došlo do odlepljivanja taloga, ćelije se resuspenduju u PBS-u (ispiranje) i ponovo talože pod istim uslovima. Talog od $1-2 \times 10^6$ ćelija se rastvori u 0.5-1 ml medijuma za zamrzavanje i sipa u već ohlađene i obeležene epruvete za zamrzavanje. Medijum za zamrzavanje sadrži krioprotektivni agens, DMSO-a (dimetilsulfoksid) i fetalni teleći serum (ili MEM) u odnosu 1:9. Prisustvo krioprotektivnog agensa je neophodno zbog njegove funkcije da veže vodu i smanji verovatnoću stvaranja kristala leda pogubnih za ćelije.

Ćelijska suspenzija se mora zamrznuti polako (temperatura treba da opada $1-3^\circ\text{C}/\text{min}$) jer se tada preferencijalno stvaraju ekstra-, a ne intracelularni kristali leda, pa ćelije ostaju neoštećene. To se postiže držanjem ćelija prvo na $+4^\circ\text{C}$ (1 sat), zatim na -20°C (1 do 16 sati), i konačno na -80°C (16 do 72 sati). Tek tada se ćelije smeštaju u tečni azot (-196°C), gde su hemijske i fizičke aktivnosti u ćeliji na zanemarljivom nivou, i one ostaju vijabilne godinama.

SUBKULTIVACIJA ĆELIJA

Hep G2 i Hep 3B ćelije se pasažiraju kada formiraju konfluentni sloj, svaka 3 - 4 dana. Medijum se usisava pasterovom pipetom pomoću vakuuma, nakon čega se konfluentan sloj ćelija ispira PBS-om (phosphate buffer saline) koji na 1litar sadrži: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4 i 1.15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Ćelije isprane od medijuma odvajaju se od podloge pomoću 0,1% rastvora tripsina u PBS-u. Tripsin je proteolitički enzim koji često sadrži i elastazu, te oba enzima u sadejstvu degraduju proteinski matriks koji vezuje ćelije i doprinose disocijaciji ćelija. Tripsinizacija ćelija traje 5-10 minuta, u zavisnosti od aktivnosti tripsina. Alikvot tripsina poželjno je predhodno zagrijati na 37°C kako bi se povećala enzimska aktivnost. Inkubacija ćelija sa tripsinom može da se odvija na sobnoj temperaturi ili na 37°C. Disocijacija ćelija se potvrđuje pod mikroskopom. Pod mlazem šprica, ćelije se potpuno odvajaju od podloge. Dodavanjem medijuma za gajenje ćelija inaktiviše se dejstvo tripsina. Pre subkultivisanja, ćelije je neophodno temeljno resuspendovati u medijumu. Time se obezbeđuje da se ćelije koje se lepe za podlogu pravilno rasporede po čitavoj površini petri šolje. Subkultivacija se najčešće vrši u odnosu 1:2.

U slučaju K562 ćelija koje rastu u suspenziji, ćelije se pasažiraju (prebacuju u svež medijum u optimalnoj koncentraciji) kada dostignu koncentraciju od 2×10^6 ćelija/ml, što se događa 2 do 4 dana od prethodnog pasažiranja.

BROJANJE ĆELIJA

(Mayerman 1963; Ristić 1979)

Ćelije se broje uz pomoć mikroskopa i pločice za brojanje. U izradi ovog rada korišćena je Bürker-Türk-ova pločica i sledeća formula za izračunavanje broja ćelija: broj ćelija na pločici/64 x 0.5= broj ćelija u suspenziji (10^6)/ml.

Da bi brojanje bilo verodostojno, neophodno je dobro resuspendovati ćelije. Mešanjem 100 μl ćelija iz suspenzije sa istim volumenom 0,1% tripan-plavo boje omogućava se razlikovanje živih od mrtvih ćelija. Tripan-plavo ulazi u mrtve ćelije i boji ih, dok žive ćelije ostaju svetle, sa zlatnim oreolom.

IZOLOVANJE JEDARNIH PROTEINA

(Schreiber et al 1989)

Za izolaciju jedarnih proteina iz Hep G2 i K562 ćelijskih linija obično se polazi od $0.5-1 \times 10^6$ ćelija. Ćelije se resuspenduju u 1ml TBS i prebacuju u eppendorf epruvetu. Nakon kratkog centrifugiranja na 10000 rpm (Eppendorf), talog se resuspenduje u 400 μl u hladnog pufera A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) laganim provlačenjem kroz žuti nastavak. Ćelije se inkubiraju 15 minuta na ledu, nakon čega im se dodaje 25 μl 10% rastvora Nonidet NP-40. Nakon intenzivnog vorteksovanja, homogenat se centrifugira 30 sekundi na 10000rpm (Eppendorf). Talog nukleusa se resuspenduje u 50 μl hladnog pufera C (20mM HEPES pH7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF) i mikro tuba se snažno protresa 15 minuta na +4°C (MultiBio RS-24, LKB). Nuklearni ekstrakt se centrifugira 5 min na 10000 na +4°C i supernatant se u alikvotima (oko 55 μl) čuva na -70°C.

BRADFORD METODA

(Bradford et al 1976)

Bradford metoda se koristi za utvrđivanje koncentracije proteina u uzorku. U smešu finalne zapremine 1ml stavlja se 10 μ l proteinskog uzorka i 200 μ l Bradford reagensa (Protein Assay Due Reagent, Bio Rad). Nakon mešanja smeše, apsorpcija se određuje spektrofotometarski na talasnoj dužini od 595nm (Ultrospec 3300 Pro, Amersham Biosciences).

Radi određivanja koncentracije proteina u uzorku, neophodno je napraviti standardnu krivu tako što se poznata razblaženja BSA proteina (1 mg/ml), uključujući blank, pripremaju i mere na identičan način.

ANALIZA INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA

Radi proučavanja regulatornog potencijala odabranog intronskog fragmenta gena za PAH čoveka, sintetisane su dva puta po dve komplementarne jednolančane oligonukleotidne probe dužine 40bp (Tabela 8). S obzirom da u *in vivo* uslovima regulatorne sekvence postoje u obliku dvolančane DNK, od dva komplementarna jednolančana oligonukleotida, renaturacijom je pravljena dvolančana proba. U ovom radu korišćene su dve dvolančane probe koje su se međusobno razlikovale u jednom, centralno postavljenom nukletoidu. Smeštanjem polimorfizma koji se ispituje u sredinu, potencira se destabilizacija nespecifičnih DNK/protein kompleksa.

Za proučavanje interakcija potencijalno regulatornih DNK sekvenci i transkripcionih faktora koristili smo dve metode: metodu usporene elektroforetske pokretljivosti (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) i South-Western metodu (South-Western blotting).

U slučaju South-Western blota, gde se nuklearni ekstrakti prvo razdvajaju prema svojoj molekulskoj težini, ostvaruje se finija detekcija proteina koji stupaju u interakciju sa analiziranim fragmentom.

OBELEŽAVANJE OLIGONUKLEOTIDNE PROBE

Reakcija obeležavanja 5' kraja oligonukleotida vršena je pomoću Ready-To-Go T4 Polinukleotidne kinaze (Amersham Bioscience) prema preporuci proizvođača.

Reakcija obeležavanja finalne zapremine 50 μ l sadrži sledeće komponente:

- 5 pmol jednolančanog oligonukleotida, navedenog u tabeli 8.
- 1-2 μ l γ -³²P ATP-a
- Ready-To-Go T4 Polinukleotidne kinaze (Amersham Bioscience) rastvorena u vodi

Reakcija se inkubira na 37°C u toku 30 min, nakon čega se oligonukleotid prečišćava od neugrađenog aktiviteta propuštanjem kroz G-50 kolonu (GE Healthcare).

Specifični aktivitet oligonukleotidne probe određuje se merenjem na scintilacionom brojaču.

Obeleženi jednolančani oligonukleotid se uparava u vakuum centrifugi i rastvara u 25 μ l 10 puta razblaženom puferu za renaturaciju (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA i 1

mM DTT). Zatim se dodaje komplementarni oligonukleotid u velikom višku (50 pmol), radi sigurnosti da će sve jednolančane obeležene probe biti uključene u reakciji hibridizacije. Reakcija hibridizacije obeleženog i neobeleženog oligonukleotida postiže se kratkom denaturacijom na temperaturi od 90 °C u toku 3 minuta i renaturacijom - sporim hlađenjem do sobne temperature.

Specifični aktivitet oligonukleotidne probe određuje se merenjem na scintilacionom brojaču.

Reakcija prevođenja neobeleženih proba i neobeleženih specifičnih kompetitora u dvolančanu formu se vrši na isti način, samo što nije potrebno dodavati komplementarni lanac u višku.

METODA USPORENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI

(Fried i Crothers 1981; Wall et al 1988)

Interakcija jedarnih proteina sa odabranim fragmentom gena za *PAH* čoveka analizirana je modifikovanom standardnom metodom usporene elektroforetske pokretljivosti.

Pri određenim uslovima, jedarni proteini se, ukoliko imaju afinitet za određene sekvence DNK, vezuju za iste, formirajući komplekse koji se u električnom polju kreću sporije nego slobodan DNK fragment. Nakon razdvajanja na poliakrilamidnom gelu, formirani kompleksi se detektuju u vidu traka čija je elektroforetska pokretljivost manja u poređenju sa onom koju ima slobodan fragment.

Reakcione smeša finalne zapremine 25 µl sadrži sledeće komponente:

- 1-5 ng ^{32}P obeležene dvolančane probe (finalna specifična aktivnosti oko 10000 cpm)
- 2-5 µg jedarnih proteina
- 10 x pufer (50 mM Tris, pH 8.0; 250 mM NaCl; 5 mM DTT, 5 mM EDTA; 50 % glicerola, finalna koncentracija je 1x)

Po potrebi, smeši se dodaju i sledeće komponente:

- Nespecifični dvolančani kompetitor (1µg/µl Poly(dI-dC):Poly(dI-dC) Pharmacia, finalna konc 20 ng/µl)
- Specifični kompetitor (ista, ali neobeležena dvolančana proba, dodaje se u velikom višku -50 ili 100x većem molarnom odnosu u odnosu na obeleženu probu)
- Kompetitor koji sadrži konsenzus sekvencu za određeni transkripcioni faktor, naveden u tabeli 9 (GATA-1 specifično mesto), takođe dvolančana neobeležena proba.
- Rat anti-mouse GATA-1 IgG mAb N6 (1:4 razblaženje medijuma za rast konfluentne kulture mijeloma ćelijske linije koja je proizvela ovo antitelo; poreklo: J.D. Engel, Evanston, & P. Sjak, Rotterdam) (Whyatt *et al.*, 1993). 10 µl ovog antitela dodavano je u superšift eseje.

Smeša se priprema na ledu, dok se reakcija vezivanja transkripcionih faktora za DNK probu odvija na 37°C tokom 30 min. Nakon isteka tog vremena, reakciona smeša se meša sa 6 µl boje (0.25%, brom fenol plavo, 0.25% ksilen cijanol, 30% glicerol) i nanosi na 4% poliakrilamidni gel. Elektroforeza se odvija

u 0.5x TBE puferu, pri konstantnom naponu od 250 V i struji od 55 mA u toku sat vremena. Poliakrilamidni gel se suši i analizira na fosfoimidžeru (Cyclone, Perkin Elmer) ili autoradiografski.

SOUTH-WESTERN METODA

(Michael et al 1988)

Interakcija između fragmenta DNK i pojedinačnih proteina može se detektovati South-Western metodom. Metoda obuhvata: razdvajanje jedarnih proteina na denaturišućem SDS-poliakrilamidnom gelu, transfer razdvojenih proteina na nitriceluloznu membranu, inkubaciju proteina na membrani sa radioaktivno obeleženom probom nakon čega se detekcija uspostavljenih interakcija vrši autoradiografijom.

Denaturišući SDS poliakrilamidni gel

Denaturišući SDS poliakrilamidni gel sastoji se iz gela za nanošenje (sticking gel) i gela za razdvajanje (running gel).

Prvo se priprema 10% poliakrilamidni SDS gel u kome će se proteini iz uzorka razdvojiti. Kao pufer za pripremanje gela koristi se 1.5 M Tris HCl pH 8.8. Kao denaturisuci agens koristi se SDS (0.1%), a kao inicijatori polimerizacije amonijumpersulfat (0,1%) i TEMED (0,01%). Nakon njegove polimerizacije priprema se 4% poliakrilamidni SDS gel na koji se uzorci nanose. Kao pufer za pripremanje ovog gela koristi se 0.5 M Tris HCl pH 6.8. Kao denaturans se koristi SDS (0.1%), a kao inicijatori polimerizacije amonijumpersulfat (0,1%) i TEMED (0,01%).

Nuklearni ekstrakti se pre nanošenja na gel mešaju sa denaturišućim puferom za uzorak (0.125 M Tris HCl pH 6.8; 4% SDS; 20% glicerol; 10% β - markaptoetanol) i bojom (0.25%, brom fenol plavo, 0.25% ksilen cijanol, 30% glicerol), denaturišu na 95°C u toku 5 min i drže na ledu do nanošenja na gel.

U South-Western eksperimentima, u jedan bunar na gelu, nanošeno je 5-20 μ g proteina. Proteini se elektroforetski razdvajaju u prisustvu pufera (0.025 M Tris HCl pH 8.3; 0.192M glicin; 0.1% SDS). Kroz gel za nanošenje uzorci putuju pri konstantnom naponu od 100 V i struji od 20 mA 30 min, dok kroz gel za razdvajanje putuju pod naponom od 170 V i 25 mA 60 min.

Polusuvi transfer proteina na membranu

Proteini se sa gela prenose na membranu (Imobilon P) uz pomoć električne struje (FASTBLOT, Biometra). Nitrocelulozna membrana se koristi jer proteine različitih karakteristika vezuje podjednako dobro. Sa membranom se manipuliše veoma obazrivo, pomoću pincete.

Nakon elektroforeze, dimenzije gela se precizno izmere kako bi membrana i papiri odgovarajuće površine mogli da se pripreme. Gel, papiri (3 mm) i membrana se nakon potapanja u odgovarajuće pufere postavljaju jedan preko drugog formirajući "sendvič" i struja protiče od katode, na kojoj se nalazi gel, ka anodi, tj. ka membrani. Preciznost dimenzija membrane i papira je u slučaju polusuvog transfera bitna jer se tako onemogućava rasipanje struje.

Donja površina aparata – anoda, kvasi se anodnim puferom I (300 mM Tris HCl pH 10.4; 20% (v/v) metanol) i na nju se postavljaju 2 sloja papira predhodno takođe natopljenih anodnim puferom I. Nakon dodavanja svakog sledećeg sloja, sendvič se ravna staklenim štapićem da bi se eliminisali mehurići. Membrana se aktivira kratkom inkubacijom u metanolu. Zatim se ispira u vodi nekih 5 min i inkubira u anodnom puferu II (25 mM Tris HCl pH 10.4; 20% (v/v) metanol) 5 min posle čega se dodaje na sendvič. Direktno na membranu dodaje se gel, koji je predhodno inkubiran najmanje 5 min u katodnom puferu (25 mM Tris HCl pH 9.4; 40 mM glicin 20% (v/v) metanol). Preko gela stavljaju se 3 sloja papira predhodno natopljenih katodnim puferom. Sendvič se preklopa gornjom površinom aparata za transfer – katodom. Transfer proteina se odvija 45 min pri jačini struje koja zavisi od površine membrane (5 mA po 1cm²). Transfer se smatra uspešnim ukoliko je proteinski marker (prestained Bio Rad protein lader) u potpunosti sa gela prešao na membranu.

Ostvarivanje interakcije DNK probe i proteina

Membrana se najpre ispira tri puta po 45 minuta u puferu A (10 mM Tris-Cl pH 7.5; 5% mleko bez masti; 10% glicerol; 0.1 mM DTT; 150 mM NaCl; 2.5% Nonidet P40; pH podesiti na 7.5) uz neprekidno klackanje, a zatim kratko u puferu B (10 mM Tris-Cl pH 7.5; 0.125% mleko bez masti; 8% glicerol; 1 mM DTT; 40 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH podesiti na 7.5). Membrana se zatim zatapa u plastičnu kesicu zajedno sa puferom B. Količina pufera se preračunava u odnosu na površinu membrane (0,15 ml/cm² membrane) i zato je neophodno da kesica bude tek nešto malo veća od membrane. Prilikom zatapanja membrane treba eliminisati mehurove. Blokiranje nespecifičnog vezivanja postiže se preinkubacijom membrane u puferu B u toku 1 h.

U pufer B se dodaju radioaktivno obeležena proba (200000 do 500000 cpm/ml) i nespecifični kompetitori (Poly(dI-dC):Poly(dI-dC) u finalnoj koncentraciji od 20 ng/μ). Ova smeša se zajedno sa membranom zatapa u plastičnu kesicu i inkubira preko noći uz neprekidno klackanje.

Nakon ostvarivanja interakcije između proteina na membrani i probe u puferu, membrana se ispira od nevezane probe inkubacijom u puferu C (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 50 mM NaCl) 6 puta po 30 min.

Nakon kratkog sušenja na vazduhu, formirani kompleksi se vizuelizuju na fosfoimidžeru ili autoradiografski. Molekulsku težinu proteina koji su interagovali sa probom određujemo uz pomoć proteinskog markera koji je zajedno sa uzorcima prenet na nitroceluloznu membranu.

EKSPRESIJA KLONIRANOG GENA U HUMANIM HEP G2 ČELIJAMA (Boshart et al 1992; Luckow i Schutz 1987)

Reporter geni omogućavaju funkcionalnu analizu eukariotskih regulatornih *cis*-elemenata izvođenjem enzimskih esejaja poput CAT esejaja, β-galaktozidaznog esejaja i drugih. U cilju funkcionalne analize dela osmog introna gena za PAH, dužine 200 bp koji sadrži *XmnI* polimorfno mesto, ova sekvenca je uklonjena u pCAT5 plazmid (*XmnI* konstrukt). Izabrani plazmid sadrži bakterijski gen za hloramfenikol acetiltransferazu. CAT gen se često koristi kao reporter gen, jer u eukariotskim ćelijama ne postoji endogena CAT aktivnost i jer se njegova aktivnost utvrđuje brzim i senzitivnim esejajem. Sem toga, pCAT5 sadrži promotor poreklom iz Herpes simpleks virusa koji obezbeđuje ekspresiju reporter gena. Promena

nivoa bazalne ekspresije otkriva funkcionalne karakteristike proučavanog intronskog regiona. U odnosu na pCAT3 koji ima sve do sada navedene karakteristike, kod pCAT5 su napravljene izmene u sekvenci tako da je anuliran „šum“ CAT ekspresije tj. „curenje“ CAT gena. Konstrukt se „unosí“ u odgovarajuće eukariotske ćelije u cilju analize njegove aktivnost.

TRANSFEKCIJA PLAZMIDNE DNK U HEPATOCITE - LIPOFEKTAMINSKA TRANSFEKCIJA

U eksperimentima funkcionalne karakterizacije dela osmog introna gena za *PAH* primenjena je lipofektaminska transfekcija na Hep G2 ćelijama, prema uputstvu proizvođača. Lipofektamin formira komplekse oko DNK i stapajući se sa ćelijskom membranom, eukariotskim ćelijama, doprema stranu DNK.

Za eksperimente transfekcije 2.5×10^5 Hep G2 ćelija zasejano je u 2 ml MEM medijuma bez antibiotika u pojedinači bunar na P-6 šolji (10 cm^2). Antibiotik se ne dodaje kako bi se povećala vijabilnost ćelija i obezbedio dovoljan broj ćelija sposobnih da prime plazmidnu DNK. Ove ćelije se gaje 24h pri standardnim uslovima.

Narednog dana, ćelijama se dodaje svež MEM-a bez antibiotika (2 ml) i priprema se transfekciona smeša. Najpre se 4 μg plazmidne DNK rastvori u 250 μl Opti-MEM-a (Invitrogen) i blago promeša. Zatim se 10 μl Lipofektamina 2000 (Invitrogen) rastvori u 250 μl Opti-MEM-a, blago promeša i inkubira 5 min. Konačno se ove dve smeše sjedine, blago promešaju i inkubiraju 20 min čime se omogućava formiranje kompleksa između lipofektamina i DNK.

Nakon isteka ovog vremena, bez mešanja i nepotrebnog mućkanja, u pojedinačni bunar P-6 šolje dodaje se, kap po kap, 500 μl transfekcione smeše. P-6 se zatim blago zaljulja da bi se medijum bolje sjedinio sa transfekcionom smešom.

Ćelije se u prisustvu transfekcione smeše inkubiraju 4 h, nakon čega se ispiraju i dodaje im se svež medijum.

Transfekovane ćelije se gaje 48 h pre nego što se pokupe i pripreme za eseje.

PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKTA

Nakon 48h od transfekcije, ćelije se detaljno ispiraju PBS-om od medijuma. Nakon tripsinizacije i njihovog sakupljanja, ćelije se resuspenduju u 1 ml TEN pufera (40 mM Tris HCl pH 7.5; 1 mM EDTA pH 8; 150 mM NaCl). Nakon centrifugiranja 2 min na 13000 rpm, ćelijski talog se vorteksovanjem resuspenduje u 100 μl 0.25 M Tris HCl pH 8. Liziranje ćelija se postiže njihovim naizmeničnim stavljanjem u tečni azot (-196°C) i vodeno kupatilo ($+37^\circ\text{C}$) uz vorteksovanje nakon svakog koraka. Nakon centrifugiranja 5 min na 13000 rpm ($+4^\circ\text{C}$), supernatant se alikvotira (po 50 μl za svaki esej) i prebacuje u nove mikro tube.

Pripremljene ekstrakte bi trebalo odmah koristiti za CAT i β -galktozidazni esej ili odmah zalediti i čuvati na -80°C . Da bi se izbegla degradacija CAT enzima i β -galaktozidaze, uzorak bi trebalo brzo zalediti kratkotrajnom inkubacijom u tečnom azotu, i tek tada skladištiti na -80°C .

CAT ELISA ESEJ

CAT ELISA je kolorimetrijski enzimski imunoesej za kvantifikaciju ekspresije hloramfenikol acetiltransferaze (Chloramphenicol acetyltransferase, CAT) u eukariotskim ćelijama transfekovanim sa plazmidom koji nosi CAT reporter gen. Esej se izvodi prema uputstvu proizvođača.

CAT ELISA se bazira na „sendvič“ ELISA principu. Anti-CAT antitelo vezano je za površinu mikrotitar ploče (Roche kit). Za njega se specifično vezuje ukupna hloramfenikol acetiltransferaza prisutna u uzorku (ili standardu). Primarno antitelo je obeleženo digoksigeninom (anti-CAT-DIG) i specifično se vezuje za hloramfenikol acetiltransferazu, a za njega sekundarno antitelo koje je konjugovano sa peroksidazom (anti-DIG-POD). Kvantifikacija hloramfenikol acetiltransferaze obezbeđuje se dodavanjem supstrata peroksidaze (ABTS). Naime, peroksidaza razlaže supstrat dajući obojeni produkt. Absorbanca uzorka određuje se pomoću čitača za mikrotitar ploču (SLT, Lab Instruments) i direktno je proporcionalan nivou hloramfenikol acetiltransferaze prisutne u uzorku.

Pripremljeni ćelijski ekstrakti (50 µl) se pomešaju sa puferom za uzorak (Roche kit) do finalne zapremine od 200 µl, zatim se nanese u bunariće na mikroploči i pokriveni inkubiraju 1h sa 37°C. Nakon vezivanja hloramfenikol acetiltransferaze iz uzorka, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250 µl pufera za ispiranje (Roche kit). Zatim se u bunariće dodaje po 200 µl anti-CAT-DIG antitela (Roche kit) i inkubira pokriveno 1h sa 37°C. Nakon vezivanja primarnog antitela, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250 µl pufera za ispiranje (Roche kit). Zatim se u bunariće dodaje po 200 µl anti-DIG-POD antitela (Roche kit) i inkubira pokriveno 1h sa 37°C. Nakon vezivanja sekundarnog antitela, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250 µl pufera za ispiranje (Roche kit). Na kraju se u bunariće dodaje po 200 µl supstrata (Roche kit) i inkubira pokriveno do razvijanja boje (10-40 min) na sobnoj temperaturi. Merenje absorbance na talasnoj dužini od 405nm vrši se pomoću čitača za mikroploče (SLT, Lab instruments).

Radi određivanja koncentracije proteina u uzorku, neophodno je napraviti standardnu kalibracionu krivu tako što se poznata razblaženja CAT enzima (Roche kit), uključujući blank, pripremaju i mere na identičan način.

BETA GALAKTOZIDAZNI ESEJ

Svrha β-galaktozidaznog eseja je da normalizuje rezultate CAT eseja u odnosu na efikasnost transfekcije u pojedinačnom uzorku. Iz tog razloga se, uz plazmid koji nosi CAT reporter gen (npr. pCAT5), ćelije istovremeno transfekuju i sa β-galaktozidaznim kontrolnim plazmidom (npr. pCH110). S obzirom da u mnogim ćelijskim linijama postoji endogena ćelijska β-galaktozidaza, preporučuje se postojanje negativne kontrole (uzorak koji nije bio transfekovan sa β-galaktozidaznim genom).

Esej se zasniva na sposobnosti β-galaktozidaze da hidrolizuje bezbojni supstrat ONPG (o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid). Kao produkt reakcije nastaje o-nitrofenol koji je žute boje i može se kvantifikovati kolorimetrijski.

Priprema za esej odvija se na ledu. Ćelijski ekstrakti (50 µl) pomešaju se sa istim volumenom pufera za esej (200 mM natrijum fosfatni pufer pH 7.3; 2 mM MgCl₂; 100 mM β-merkaptotanol; 1.33 mg/ml

ONPG, finalna koncentracija 2x) i inkubiraju u pokrivenoj mikrotitar ploči sa ravnim dnom do razvijanja boje (30-45 min) na 37°C. Merenje absorbance na talasnoj dužini od 420nm vrši se pomoću čitača za mikroploče (SLT, Lab instruments).

Radi određivanja koncentracije β -galktozidaze u uzorku, neophodno je napraviti standardnu kalibracionu krivu tako što se poznata razblaženja β -galktozidazne (Promega), uključujući blank, pripremaju i mere na identičan način.

METODA DIZAJNIRANJA MUTAGENIZA KLINIRANI DKA

Metoda dizajnovanja i sinteziranja je metoda kojom se precizno uvodi poznata promena (tačka, delecija, mala delecija ili insercija) u postojeći DNA sekvencu uklonivši i dizajnirajući vektor. Za izvođenje ove metode koristi se QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Metoda obuhvata PCR reakciju, digestiju Dpn I enzimom i transformaciju *E. coli* Blue kompetentnim ćelijama koje se vrše prema uputstvu proizvođača.

U ovom radu, mutacija β -G2D>T (GCT>GTT, a.5231T) kodirajuća za W474 (Gln>Val) (Genbank U49897.1) uklonjena je pM1 ili pMAG-CMV ekspresiji vektorom pomoću sekvence prikazane u tabeli 6.

U prvom koraku, vrši se PCR reakcija. Kao matrica koristi se zapravo dizajnirani dizajnirani DNA vektor (Clontech) koji sadrži insert od interesa (M13mp18). Mutacija se uvodi pomoću dva oligonukleotida oligonukleotidnog pramena koji služe kao primeri za PCR. Oligonukleotidni pramen dugi 25-45 nukleotida i da njihova temperatura topljenja bude veća od 70°C. Mutacija koja se uvodi u sekvencu treba da bude komplementarna u odnosu na pramen i da ulazna sekvencija bude nepromenjena. Svaki od oligonukleotidnih pramenova komplementaran je jednom od lanaca dizajniranog plazmida u kojem se vrši PCR reakcija oligonukleotidni pramen se vezuje za pramen i njegovo umnožavanje se odvija pod dejstvom Taq polimeraze sa visokom procesivnošću. Kao produkt reakcije nastaje mutirani plazmid koji sadrži pramen i "insert" od interesa koji.

PCR meša smesku sastoji se od sledećih komponenti i sadrži sledeće komponente:

- 40-100 ng plazmida
- 10x reakcioni bufer (finalna koncentracija 1x)
- 130 ng sense oligonukleotidnog pramena (veliki vektor)
- 130 ng antisense oligonukleotidnog pramena (veliki vektor)
- 1 μ l dNTP mix (Stratagene kit)

Tak nakon dodavanja svih komponenti u PCR mešu se dodaje:

- 1 μ l Taq polimeraze (Stratagene kit, 2.5U/ μ l)

Temperatura gubljenja PCR meše je:

95°C/1min

METODE ZA ANALIZU EFEKTA MUTIRANOG PROTEINA *IN VITRO*

U ovom odeljku opisane su metode korišćene za karakterizaciju mutiranog proteina S231F PAH u *in vitro* ekspresionim sistemima. Ovaj deo istraživanja obavljen je u Laboratoriji za molekularnu osnovu metaboličkih bolesti, Centra za molekularnu biologiju "Severo Ochoa" u Madridu.

Iako izdvojene u posebnu celinu, među ovim metodama nalaze se neke već opisane ranije. U tim slučajevima, opisane se samo razlike proistekle iz specifičnosti eksperimenta.

MESTO-DIRIGOVANA MUTAGENEZA KLONIRANE DNK

Mesto-dirigovana mutageneza je metoda kojom se precizno uvodi poznata promena (tačkasta mutacija, mala delecija ili insercija) u postojeću DNK sekvencu ukloniranu u dvolančani vektor. Za izvođenje ove metode korišćen je QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Metoda obuhvata: PCR reakciju, digestiju *Dpn I* enzimom i transformaciju XL1-Blue superkompetentnih ćelija koje su vršne prema uputstvu proizvođača.

U ovom radu, mutacija c.692C>T (TCT→TTT, p.S231F) uvedena je u hPAH cDNK (Genbank U49897.1) ukloniranu u pMAL ili pFLAG-CMV ekspresioni vektor pomoću oligonukleotida navedenih u Tabeli 6.

U prvom koraku, vrši se PCR reakcija. Kao matrica koristi se superspiralizovani dvolančani DNK vektor (Qiagen mini ili maxi prep) koji sadrži insert od interesa (PAH cDNK). Mutacija se uvodi pomoću dva sintetička oligonukleotidna prajmera koji sadrže željenu mutaciju. Poželjno je da oligonukleotidi budu dugi 25-45 nukleotida i da njihova temperatura topljenja bude veća od 78°C. Mutacija koja se uvodi trebala bi da bude pozicionirana u sredini prajmera i da okolne sekvence budu nepromenjene. Svaki od oligonukleotidnih prajmera komplementaran je jednom od lanaca dvolančanog plazmida u željenom regionu. U PCR reakciji, oligonukleotidni prajmeri se vezuju za plazmid i njegovo umnožavanje se odvija pod dejstvom *PfuTurbo* DNK polimeraze sa visokom preciznošću. Kao produkt reakcije nastaje mutirani plazmid koji sadrži prekinute („nicked“) cirkularne lance.

PCR smeša finale zapremine 50 µl priprema se na ledu i sadrži sledeće komponente:

- 40-100 ng plazmida
- 10x reakcini pufer (finalna koncentracija 1x)
- 130 ng sense oligonukleotidnog prajmera (veliki višak)
- 130 ng antisense oligonukleotidnog prajmera (veliki višak)
- 1 µl dNTP mix (Stratagene kit)

Tek nakon dodavanja svih komponenti, u PCR smešu se dodaje:

- 1 µl *PfuTurbo* DNK polimeraze (Stratagene kit, 2.5U/µl)

Temperaturni profil PCR reakcije:

95°C/1min

(95°C/30s, 55°C/30s, 68°C/18min) ponovljeno 12 puta
4°C/ ∞

Produkt PCR reakcije proverava se elektroforezom na 0.8% agaroznom gelu. Ukoliko se produkt ne koristi odmah, može da se čuva preko noći na +4°C.

Nakon toga pristupa se reakciji digestije. *Dpn I* endonukleaza (ciljna sekvenca: 5'Gm⁶ATC-3') je specifična za metilovane i hemimetilovane DNK i koristi se za digestiju DNK matrice. DNK izolovana iz većine *E. coli* sojeva je *dam*⁺ metilovana i pogodna za matricu u ovoj metodi. S obzirom da mutirani plazmid, nastao kao produkt PCR reakcije nije metilovan, neće biti digeriran *Dpn I* enzimom. Na taj način vrši se selekcija nosilaca DNK koja sadrži mutaciju. Da bi se izvela reakcija digestije, 10 U *Dpn I* restrikcionog enzima (Stratagene) se direktno dodaje u tubu u kojoj se odvijala PCR reakcija. Smeša se nežno promeša i inkubira 1h na 37°C. Prisutnost produkta nakon digestije proverava se elektroforezom na 0.8% agaroznom gelu. Produkt koji nije odmah iskorišćen može da se čuva preko noći na +4°C. Ukoliko transformacija ne uspe iz prvog puta, preostali produkt može se koristiti za novu transformaciju.

Plazmid koji je nakon PCR dirigovane mutageneze podvrgnut *DpnI* digestiji koristi se za transformaciju XL1-Blue superkompetentnih ćelija (Stratagene). XL1-Blue ćelije (50 µl) se otapaju na ledu i dodaje im se *DpnI* –tretirani mutirani plazmid (1-20 µl). Nakon veoma pažljivog, blagog mešanja, smeša se inkubira 30min na ledu.

Izlaganjem smeše temperaturnim šokovima: led (30min) - 42 °C (45s) - led (2min), propustljivost bakterijskih membrana dostiže maksimum što omogućava efikasnu transformaciju bakterija plazmidnom DNK.

S obzirom da se očekuje mali broj transformanata, čitava transformaciona reakcija razmazuje se po čvrstoj LB podlozi koja sadrži antibiotik. Rast bakterija odvija se najmanje 16h na 37°C, posle čega se uočavaju pojedinačne kolonije na petri šoljama. S obzirom na selektivnost podloge, samo bakterije koje su primile plazmidnu DNK tj. transformanti, mogu da izrastu.

DETEKCIJA PLAZMIDA KOJI NOSI ŽELJENU MUTACIJU

Plazmidna DNK se izoluje mini prep metodom (Qiagen). Sekvenciranje je definitivna potvrda da plazmid sadrži željenu mutaciju i da u čitavoj sekvenci ne postoji promena nastala usled eventualne greške u DNK replikaciji. Sekvenciranje je vršeno pomoću prajmera iz Tabele 7. Prajmeri prepoznaju sekvencu humane PAH cDNK i zato se mogu koristiti za sekvenciranje oba plazmida (pMAL i pFLAG).

EKSPRESIJA WT I MUTIRANOG PAH U *E. COLI* (Martinez et al 1995)

Ekspresijom gena u *E.coli* dobijaju se velike količine mutiranog proteina neophodne za njegovo proučavanje. Radi toga, bakterijski soj transformisan plazmidom određenih karakteristika (wtPAH pMAL, S231F PAH pMAL) gaji se na sledeći način.

U 10 ml tečnog LB medijuma suplementiranog ampicilinom (finalna koncentracija 100µg/ml) inokulira se odgovarajući glicerolski stok (nije ga neophodno otapati, dovoljno je sterilnim žutim nastavkom zagrebat i ledenu površinu i nastavak ubaciti u medijum). Bakterijska kultura u aerisanim uslovima raste preko noći na 37°C.

Narednog dana, prekonoćna kultura se razblažuje (20x) prebacivanjem u 200ml svežeg LB medijuma sa ampicilinom. Inkubacija se nastavlja u aerisanim uslovima na 37°C dok bakterijska kultura ne dostigne eksponencijalnu fazu rasta (oko 90min). Faza rasta se utvrđuje određivanjem gustine bakterijske kulture tj. merenjem absorbance 1ml kulture na 600nm.

Kada absorbanca dostigne 0.6-0.8, pravi je momenat da se izvrši indukcija ekspresije proteina, dodavanjem 1mM IPTG(izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid). Istovremeno se dodaje i 0.2 mM FAS (gvožđe amonijum sulfat) koji je izvor metalnog kofaktora (Fe) neophodnog za aktivnost enzima PAH. Indukovana kultura se inkubira 16-21h na 37°C.

KO-EKSPRESIJA SA PROKARIOTSKIM ŠAPERONIMA U *E. COLI*
(Gamez et al, 2000)

Ovakav eksperimentalni sistem, dobija se istovremenom transformacijom XL1-Blue ćelija (Stratagene) sa pMAL, za koji je potvrđeno da nosi željenu mutaciju u genu za PAH, i plazmidom koji nosi gene za GroES i GroEL prokariotske šaperone (pGroESL).

Za razliku od pMAL koji ima ampicilinsku rezistenciju, pGroESL nosi rezistenciju na hloramfenikol. Dodavanjem oba antibiotika u LB medijum (100 µg/ml ampicilin; 100 µg/ml hloramfenikol) vrši se selekcija onih transformanata koji poseduju oba plazmida.

Prilikom indukcije bakterijske kulture pomoću IPTG-a, dolazi do povećane ekspresije kako PAH-MBP, tako i GroES i GroEL proteina. Značaj ovog sistema je što šaperoni prisutni tokom ekspresije mutiranog PAH proteina, utičući na njegov folding, mogu dovesti do stabilizacije njegove strukture i odložiti proteolitičku degradaciju.

PRIPREMANJE PROTEINSKOG EKSTRAKTA
(Martinez et al 1995)

Iz indukovane bakterijske kulture koja je rasla preko noći, priprema se proteinski ekstrakt. Čitava procedura izvodi se na ledu.

Bakterije iz kulture talože se centrifugiranjem 15min na 5000 rpm/ +4°C (Sorvall centrifuga, GS-3) i resuspenduju na hladnom u 20 ml pufera suplementiranog sa proteaznim inhibitorom (1x Na-Hepes; 0.2mM Pefabloc).

Liza bakterijskih ćelija vrši se sonifikacijom: tri ciklusa vibracija (45s) i pauza (45s), nakon čega suspenzija postaje opalescentna. Solubilni proteinski ekstrakt dobija se centrifugiranjem 20 min na 11000 rpm/+4°C (Sorvall, SS-34).

Pripremljene ekstrakte bi trebalo odmah koristiti za prečišćavanje pomoću afinitetne hromatografije (kolona od amiloze).

PRIPREMA AMILOZNE KOLONE

(Martinez et al 1995)

S obzirom da je hPAH cDNK fuzionisana sa proteinom koji vezuje maltozu - MBP (maltose binding protein), prečišćavanje PAH-MBP fuzionog proteina na amiloznoj koloni je znatno olakšano.

Za pakovanje kolone koja ima kapacitet da prečisti proteinske ekstrakte dobijene iz 200ml bakterijske kulture neophodna je plastična kolona (New England Biolabs) od 25 ml i 2-2.5 ml amiloznog matriksa.

Plastična kolona se postavi na odgovarajući držač i matriks se sipa u nju. Odlomi se plastični vrh kolone i dopusti da iscuri etanol (štiti od kontaminacije u toku čuvanja) koji je bio pomešan sa amilozom. Nakon što tečnost iscuri iz kolone (matriks kolone nikada ne sme da ostane suv), ona se zatvara donjim poklopcem i u nju se sipa 25 ml filtriranog hladnog pufera (20 mM Hepes, 200 mM NaCl, finalni pH 7). Zatim se kolona zatvara i sa gornje strane, oba otvora se dodatno osiguraju para filmom i kolona se okreće 20min na +4°C da bi se matriks pomešao sa puferom i dobro isprao od zaostalog etanola. Kolona se vraća na držač i otvara sa obe strane da bi pufer iscurio. Na ovaj način, završeno je pakovanje kolone i nadalje njena struktura ne bi trebala da se remeti.

Pre nego što pufer u potpunosti iscuri, u kolonu se sipa 10-25 ml pufera. Ovakvo ispiranje se ponavlja dok kroz kolonu ne prođe zapremina pufera 50 puta veća od zapremine matriksa (100ml). Na ovaj način kolona se ekvilibriše u Na-Hepes pH7 puferu. Pre nego što pufer iscuri do kraja (2-3 ml), kolona se zatvara sa obe strane i do upotrebe čuva na +4°C (obično 24-48h).

PREČIŠĆAVANJE FUZIONIH MBP-PAH PROTEINA

(Martinez et al 1995)

Iz ukupnih solubilnih proteina dobijenih sonifikacijom bakterija (oko 20 ml), prečišćavanjem na afinitetnoj amiloznoj koloni, izdvaja se fuzioni PAH-MBP protein. Proces prečišćavanja se odvija na sobnoj temperaturi. Koriste se hladni puferi (+4°C) i svi eluati se skupljaju na ledu.

U pripremljenu kolonu sipa se ukupni proteinski ekstrakt. Ekstrakt prolazi kroz kolonu i za nju se vezuje fuzioni PAH-MBP. Eluat se sakuplja da bi se čitav proces ponovio tri puta.

Kolona se zatim ispira od nevezanih proteina. Ispiranje se vrši hladnim puferom (20 mM Hepes, 200 mM NaCl, finalni pH 7), zapreminom 50 puta većom od zapremine matriksa (100 ml).

Kada u koloni ostane vrlo malo pufera iznad njene površine, donji kraj kolone se zatvara i dodaje se 3ml sveže napravljenog pufera za eluciju (10 mM maltoza, rastvorena u 1x Hepesu). Nakon 3min inkubacije, afinitetno vezani proteini eluiraju se sa kolone.

Opciono, purifikovani proteini se centrifugiraju 15min na 13000 rpm/ +4°C (Eppendorf) da bi se odbacili talozi tj. proteini koji su formirali agregate.

Solubilni proteini se nekoliko sati mogu čuvati na +4°C. Da bi se proteinska aktivnost održala duže, supernatanti se alikvotiraju (po 500 µl), brzo zaleđuju u tečnom azotu i čuvaju na -80°C do korišćenja.

DETEKCIJA I ANALIZA PURIFIKOVANIH PROTEINA NA SDS GELU KOMAZI BOJENJEM

Radi poređenja količine različitih eksprimiranih proteina, iste zapremine se nanose na SDS gel. Uz pomoć proteinskog markera (Bio Rad protein lader) određuje se molekulska težina purifikovanih proteina.

Denaturišući 10% SDS gel i uzorci pripremaju se na isti način, opisan ranije u okviru ovog poglavlja. Proteini se elektroforetski razdvajaju u prisustvu pufera (0.025 M Tris HCl pH 8.3; 0.192 M glicin; 0.1% SDS) pri konstantnom naponu od 100 V i struji od 30 mA, dok boja ne dođe do dna gela.

Gel za razdvajanje odvoji se od gela za nanošenje i boji 1x Komazi bojom (0.025% Coomassie plavo; 45% metanol; 10% sirćetna kiselina) u toku 30 min uz neprekidno klackanje. Nakon toga boja, koja se nije vezala za proteine u gelu, ispira se odbojivačem (40% metanol; 10% sirćetna kiselina) u toku 10-15 min na klackalici. Ispiranje se ponavlja nekoliko puta, dok se ne dobiju plave proteinske trake na belo podlozi.

ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI FENILALANIN HIDROKSILAZE

(Pey et al 2004)

Specifična aktivnost enzima PAH *in vitro* određuje se merenjem produkovanog L-Tyr iz tačno određene količine L-Phe pri zadatim uslovima reakcije.

Da bi precizno odredili aktivnost enzima PAH, neophodno je da prečišćeni solubilni proteini budu sveže pripremljeni ili pravilno zaleđeni i čuvani. S obzirom da se određuje specifična aktivnost enzima (iz određene količine proteina), precizno merenje koncentracije proteina (Bradford et al 1976) koji ulaze u reakciju veoma je bitno. Ukoliko je izmerena koncentracija visoka, proteini se razblažuju u puferu (20 mM Hepes, 200 mM NaCl, finalni pH 7) do koncentracije 0.05-0.2 mg/ml, s tim što se uvek dodaje BSA (1/20 finalne zapremine) koji imastabilizacionu ulogu.

Takođe, važno je da reagensi budu sveže pripremljeni, da se u reakciju dodaju posle tačno određenog vremena i da temperatura na kojoj se esej izvodi bude stabilna, zbog čega se reakcije izvode u termobloku.

Da bi se utvrdio nivo aktivacije enzima supstratom, izvode se dva tipa reakcije: sa pre-inkubacijom sa L-Phe i bez predhodne inkubacije sa Phe. Blank za reakciju sadrži sve sem BH₄, umesto koga se dodaje 5 mM DTT.

Pre-inkubacijom sa L-Phe

Reakciona smeša sadrži 0.15-1 µg PAH-MBP rastvorenih u 1x Na-Hepesu pH 7 i u prisustvu katalaze (0.04mg/ml), albumina iz seruma govečeta (0.5 mg/ml) i L-Phe 1mM, inkubira se 4min na 25°C. Zatim se dodaje gvožđe amonijum sulfat 100 µM i nakon 1 min, reakcija odpočinje dodavanjem BH₄ 75 µM u DTT 5 mM do finalne zapremine od 50 µl. Reakcija se odvija 1 min na 25°C i stopira se dodavanjem 3

volumena hladne 12% HClO_4 (v/v) (Allen et al, 1999.) Smeša se inkubira najmanje 1h na $+4^\circ\text{C}$ i preko noći na -20°C . Sledećeg dana, smeša se centrifugira 15 min na 13000 rpm/ $+4^\circ\text{C}$ i supernatanti se čuvaju na -20°C do nanošenja na HPLC.

Bez predhodne inkubacije sa L-Phe

Umesto preinkubacije proteina sa L-Phe 1mM, on se dodaje istovremeno sa BH4 u trenutku odpočinjanja reakcije.

Količina L-Tyr koji se formirao u toku *in vitro* reakcije određuje se razdvajanjem amino kiselina pomoću tečne hromatografije visokog pritiska tj. na HPLC-u. (Allen et al 1999). Koristi se kolona sa hidrofbnim matriksom (Eclipse XDB 250 x 4.6 mm Zorbax XDB-C₁₈, Agilent Technologies) ekvilibrisana sa 5% acetonitrilom (v/v) i hromatografsko razdvajanje se odvija na 25°C u toku 10 min. Zapremina nanetog uzorka je 50 μl . Detekcija L-Phe i L-Tyr odvija se uz pomoć fluorimetra na talasnoj dužini ekscitacije od 274 nm i talasnoj dužini emisije od 304 nm. Radi određivanja koncentracije formiranog L-Tyr u uzorku, neophodno je napraviti standardnu kalibracionu krivu tako što se poznata razblaženja čistog L-Tyr mere na identičan način.

USLOVI GAJENJA ČELIJA U KULTURI

(Aguado et al 2006)

Rad sa ćelijama izvodi se na način predhodno opisan u ovom poglavlju. Za kultivaciju Hep 3B ćelija koristi se MEM suplementiran sa glutaminom, 10% FCS i mešavinom antibiotika. Čelije se od podloge odvajaju tripsinizacijom i talože centrifugiranjem.

TRANSFEKCIJA PLAZMIDNE DNK U HEPATOCITE - JetPEI TRANSFEKCIJA

(Aguado et al 2006)

Za eksperimente tranzitorne ekspresije wt ili mutiranog PAH-FLAG proteina, 5×10^5 Hep 3B ćelija zaseje se u 2 ml MEM medijuma u pojedinači bunar na P-6 šolji (10 cm^2). U slučaju jetPEI reagensa (PolyPlus Transfection), antibiotik ne dovodi do smanjenja vijabilnosti, pa se dodaje u medijum u standardnoj koncentraciji. Ove ćelije gaje se 24h pri standardnim uslovima.

Narednog dana, ćelijama se dodaje svež MEM-a (2 ml) i priprema se transfekciona smeša. Najpre se 3 μg plazmidne DNK rastvori u 100 μl NaCl (150 mM, sterilisan autoklaviranjem) i pomeša kratkim vorteksovanjem. Zatim se 6 μl jetPEI rastvori u 100 μl NaCl i pomeša kratkim vorteksovanjem. Konačno se ove dve smeše sjedine, pomešaju kratkim vorteksovanjem i inkubiraju 15-30 min čime se omogućava formiranje kompleksa između DNK i jetPEI.

Nakon isteka ovog vremena, bez mešanja i nepotrebnog mućkanja, u pojedinačni bunar P-6 šolje dodaje se, kap po kap, 200 μl transfekcione smeše. P-6 se zatim blago zaljulja da bi se medijum bolje sjedinio sa transfekcionom smešom.

Ćelije se u prisustvu transfekcione smeše inkubiraju 4-5 h, nakon čega se ispiraju i dodaje im se svež medijum. U nekim od eksperimenata, umesto standardnog medijuma, dodaje se medijum

suplementiran sepiapterinom (100 μ M, filtriran pomoću MILLEX GS filter 0.22 μ m). Sepiapterin je prekursor intracelularne BH4 biosinteze, koji je kofaktor i prirodni šaperon enzima PAH. Prisustvo sepiapterina tokom ekspresije mutiranog proteina PAH, utičući na njegovo savijanje, može dovesti do stabilizacije strukture i odložiti proteolitičku degradaciju.

Nakon 48h od transfekcije, ćelije se podrobno ispiraju PBS-om od medijuma. Nakon tripsinizacije (sa 500 μ l) i njihovog sakupljanja, ćelije se resuspenduju u 1 ml PBS-a. Nakon centrifugiranja 5 min na 12000 rpm, ćelijski talog se ponovo ispira u 1 ml PBS-a. Talog se pažljivo resuspenduje plavim nastankom. Nakon centrifugiranja pod istim uslovima, supernatant se odvadi i talog se čuva na -70°C do korišćenja.

PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKTA

Ćelijski talog se žutim nastavkom resuspenduje u 35-50 μ l pufera (20mM Hepes, 200mM NaCl, 0.2 mM Pefablock, finalni pH 7). Liziranje ćelija se postiže njihovim naizmeničnim stavljanjem u tečni azot (-96°C) i vođeno kupatilo (+37°C) uz vorteksovanje nakon svakog koraka. Nakon centrifugiranja 5 min na 13000 rpm (+4°C), supernatant se prebacije u nove mikro tube. Bradford metodom meri se koncentracija proteina u uzorcima.

WESTERN BLOT

(Aguado et al 2006)

Western blot je analitička metoda koja se koristi za detekciju specifičnih proteina u ukupnom proteinskom ekstraktu. Metoda obuhvata: razdvajanje solubilnih ćelijskih proteina prema molekularnoj težini na denaturišućem SDS-poliakrilamidnom gelu, transfer razdvojenih proteina na nitroceluloznu membranu, imunodetekcija PAH-FLAG uz pomoć komercijalnog primarnog antitela (anti-FLAG M2, Sigma) i anti-mouse-Ig sekundarnog antitela konjugovanog sa horseredish peroksidazom (Santa Cruz). Za detekciju se koristi hemiluminescentni detekcioni sistem (ECL).

Denaturišući SDS poliakrilamidni gel

Pripremljeni uzorci (10-100 μ g) nanose se na denaturišući SDS gel (opisan ranije u ovom poglavlju), i razdvajaju elektroforetski pri konstantnom naponu od 100 V, 90 min.

Transfer proteina na membranu

Ovo je metoda koja se za razliku od polusuvog transfera izvodi u istoj kadi u kojoj se odvijala elektroforeza na SDS poliakrilamidnom gelu.

Pre nego što se pristupi transferu, važno je dobro oprati kadicu od predhodnog pufera koji sadrži SDS. Transfer se odvija u puferu sledećeg sastava: 25 mM Tris, 190 mM glicin, 20% metanol, pH 8.5.

Nitrocelulozna membrana i filter papiri se iseku tako da odgovaraju veličini gela. Zatim se filter papiri i sunđer potope u transfer pufer (oko 15 min). Pre dodavanja u sendvič, i gel se potapa u transfer pufer.

Nosač za transfer okrene se tako da crni poklopac (katoda) bude na dnu. Na njega se ređaju sledećim redosledom: sunđer, filter papir, gel, nitrocelulozna membrana, filter papir, sunđer, beli poklopac

(anoda). Kada je sve uredno poređano (uz istiskivanje mehurova pomoći staklenog štapića u svakom koraku), nosač se pažljivo zatvara.

Nosač se postavlja u kadicu u odgovarajućoj orijentaciji i transfer se vrši pri konstantnom naponu od 100 V i jačini struje od 250 mA u toku 60 min, u prisustvu leda („Bio-ice“) koji sprečava pregrevanje sistema za transfer.

Nakon završenog transfera, aparatura se razmontira i membrana se nekoliko minuta inkubira u Ponceau S (0.1% Ponceau S; 1% sirćetna kiselina), radi potvrde da je transfer uspešno i ravnomerno obavljen. Membrana se zatim potpuno odbojava tako što se nekoliko puta ispira PBS-Tween-om (1x PBS; 0.05% Tween).

Blokiranje nespecifičnog vezivanja

S obzirom da se nitrocelulozna membrana koristi upravo zbog svoje sposobnosti da podjednako vezuje proteine različitih karakteristika, a antitela su takođe proteini, takva interakcija se mora sprečiti. Blokiranje nespecifičnog vezivanja postiže se inkubiranjem membrane u zatopljenoj plastičnoj kesici zajedno sa 10 ml pufera (1x PBS; 0.05% Tween; 500 mg nemasnog suvog mleka) uz klackanje najmanje 1h na sobnoj temperaturi. Proteini mleka vezuju se za membranu na svim mestima za koja se proteini iz gela nisu vezali. Na taj način, kada se doda antitelo, ne postoji mogućnost da se ono veže direktno za membranu. Zahvaljujući ovom koraku, jedina mogućnost je da se antitelo specifično veže za ciljani protein. Na taj način, smanjuje se „šum“, rezultati su jasniji, a lažno pozitivni rezultati eliminisani.

Imunodetekcija

Imunodetekcija se odvija u dva koraka. U prvom koraku se primarno antitelo (anti-FLAG M2) specifično vezuje za ciljani protein (PAH-FLAG). U drugom koraku se sekundarno antitelo (anti-mouse-Ig) vezuje za anti-FLAG M2.

Membrana se zatapa u plastičnu kesicu zajedno sa 10 ml pufera (2.5 µg/ml anti-FLAG M2, razblaženje antitela je 1/1000 (v/v); 1x PBS; 0.05% Tween; 500 mg nemasnog suvog mleka) i inkubira, uz klackanje, preko noći na +4°C. Inkubacijom na niskoj temperaturi smanjuje se nespecifično vezivanje.

Sledećeg dana, membrana se ispira od nevezanog primarnog antitela pet puta po 5min u puferu (1x PBS; 0.05% Tween). Primarno antitelo koje se nije vezalo za membranu ostalo je u rastvoru mleka. Ovaj rastvor može se čuvati na -20°C i ponovo koristiti nekoliko puta.

Membrana se zatim zatapa u plastičnu kesicu zajedno sa 10 ml pufera (razblaženje sekundarnog antitela je 1/10000 (v/v); 1x PBS; 0.05% Tween; 500 mg nemasnog suvog mleka) i inkubira, uz klackanje, 1h na +4°C.

Nakon toga, membrana se ispira od nevezanog sekundarnog antitela pet puta po 5min u puferu (1xPBS; 0.05% Tween). Rastvor sa sekundarnim antitelom obično se ne koristi više puta.

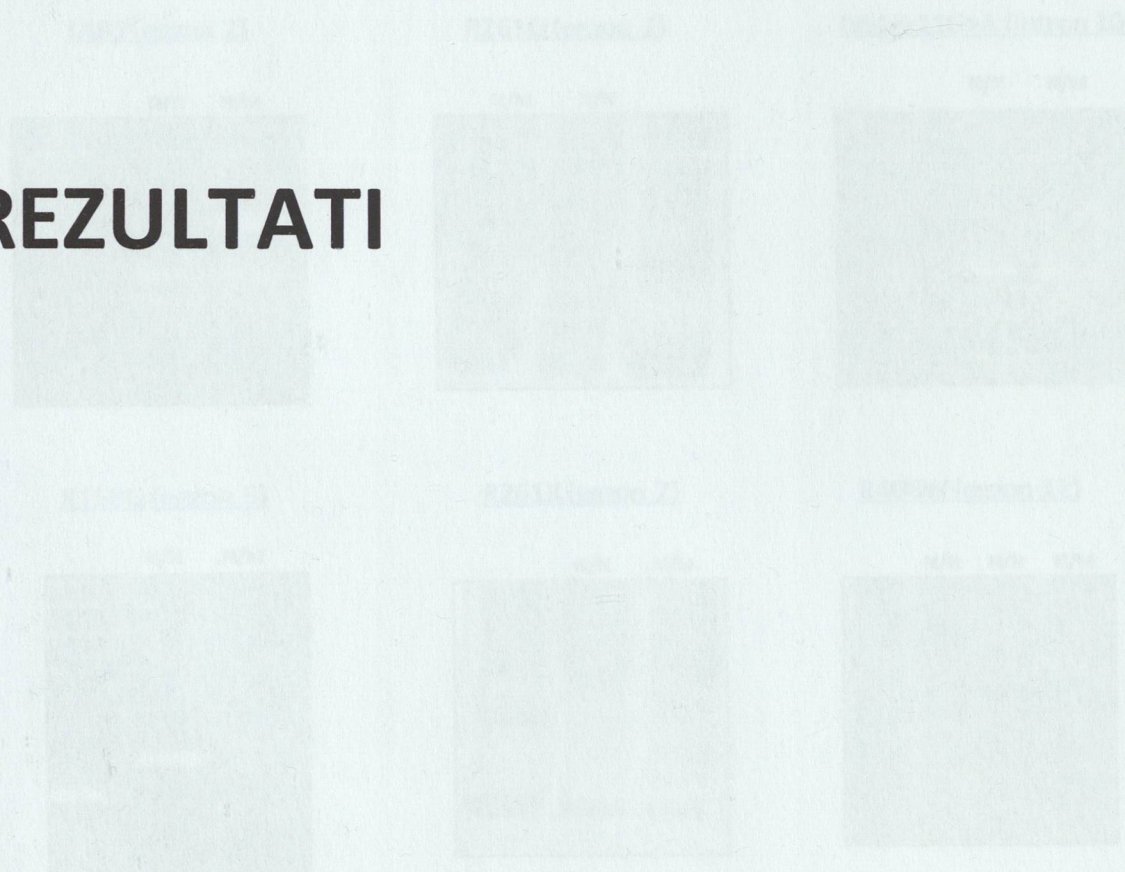
S obzirom da je za sekundarno antitelo vezana horseradish peroksidaza, vizuelizacija formiranih kompleksa ostvaruje se dodavanjem hemiluminescentnog agensa (ECL, Amersham Pharmacia Biotech). U reakciji koja se razvija, produkuje se luminescencija proporcionalna količini ciljnog proteina u uzorku.

Kada se senzitivni film inkubira preko membrane u kaseti (3 min), svetlost koja se razvija u reakciji pravi sliku koja predstavlja raspored sekundarnih antitela na membrani.

Relativna kvantifikacija proteina vrši se densitometrijski (Bio-Rad GS-710 Calibrated Imaging Densitometer).

REZULTATI

REZULTATI

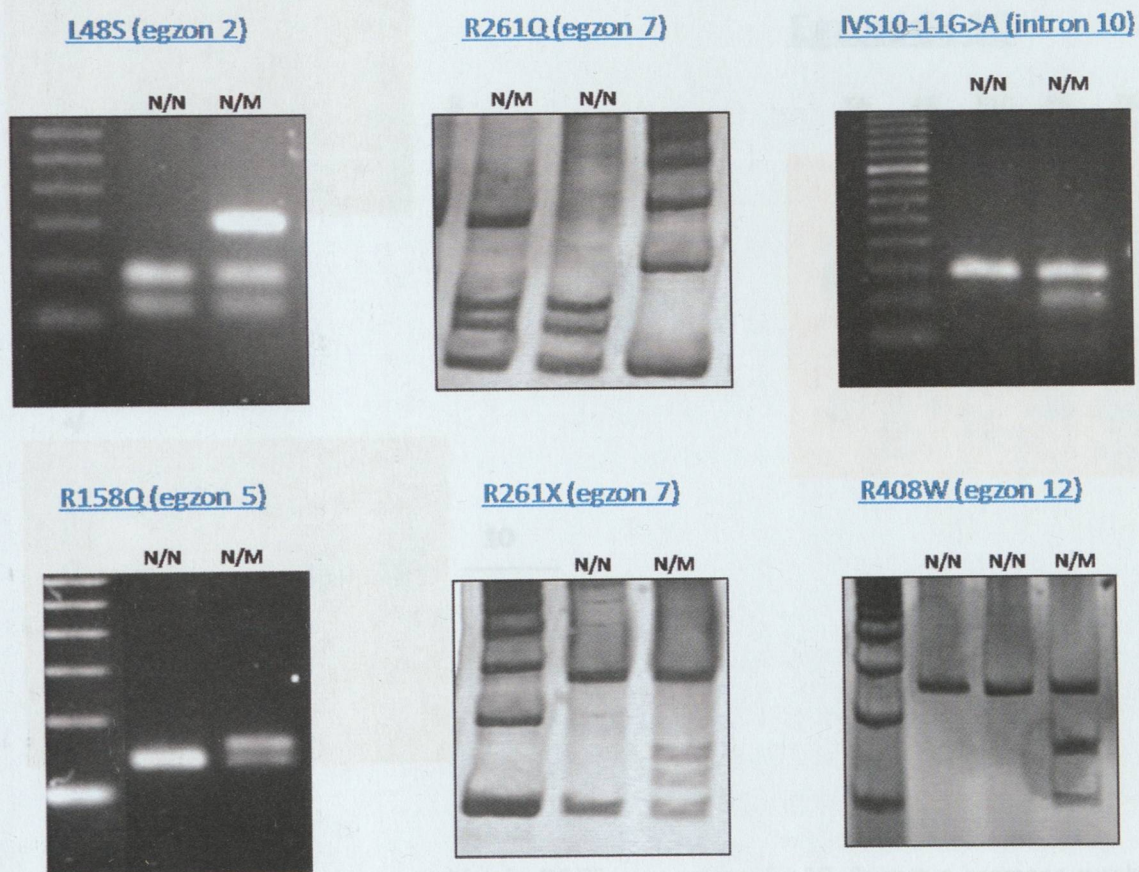


MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE PACIJENATA SA FENILKTENURIJOM U SRBIJI

Strategije za detekciju mutacija

U studiju o molekularnim karakteristikama gena za fenilalanin hidroksilazu u srpskoj populaciji, uključeno je 34 nesrodih pacijenata obolelih od fenilketonurije. Njihovi roditelji i srodnici analizirani su kada je to bilo moguće.

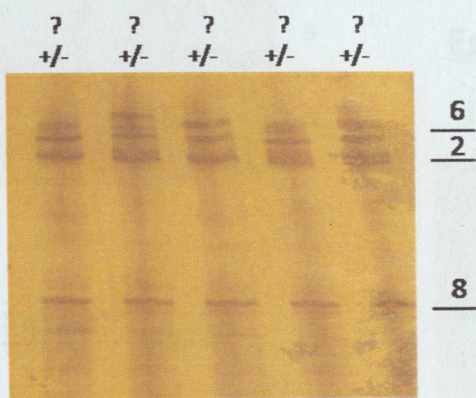
Radi detekcije mutacija u genu za fenilalanin hidroksilazu koje uzrokuju bolest, naša preliminarna strategija zasnivala se na detekciji 6 mutacija za koje je predhodno utvrđeno da su prisutne sa velikom učestalošću u slovenskim i/ili geografski bliskim populacijama. Odlučili smo se za detekciju mutacija R408W, R261Q, R261X i L48S pomoću PCR-RFLP metode i mutacije R158Q pomoću PCR-ACRS metode (Slika 9). Međutim, na ovaj način, nivo detekcije mutacija iznosio je 53%, a obe mutacije su detektovane u svega 15% pacijenata.



Slika 9. Detekcija mutacija na 2% agaroznom (L48S, IVS10-11G>A), 4% agaroznom (R158Q) i 8% PAGE (R261Q, R261X, R408W) gelu, primenom PCR-RFLP ili PCR-ACRS metode. U svim analizama korišćen je 100bp DNK marker. Prisustvo normalne sekvence označeno je sa N, a sekvence koja nosi traženu mutaciju sa M.

Da bismo detektovali sve promene u genu za *PAH*, kako mutacije koje dovode do razvoja bolesti, tako i polimorfizame koji naizgled nisu povezani sa modulacijom fenotipa, naša finalna strategija se proširila na analizu svih 13 egzona i njihovih okolnih intronskih regiona. Koristili smo multipleks DGGE metodu širokog spektra (gradijent denaturišućeg gela je u opsegu 0-80%). U toku optimizacije, napravljene su kombinacije egzona koje je moguće istovremeno analizirati, pri čemu se informacija o promenama u svakom pojedinačnom egzonu ne remeti prisustvom ostalih aktera multipleksa (Slika 10).

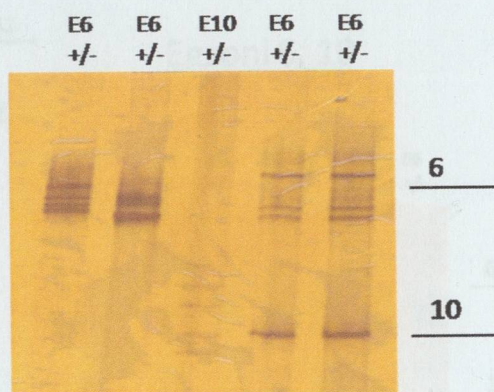
Egzone 2, 6, 8



Egzon 10

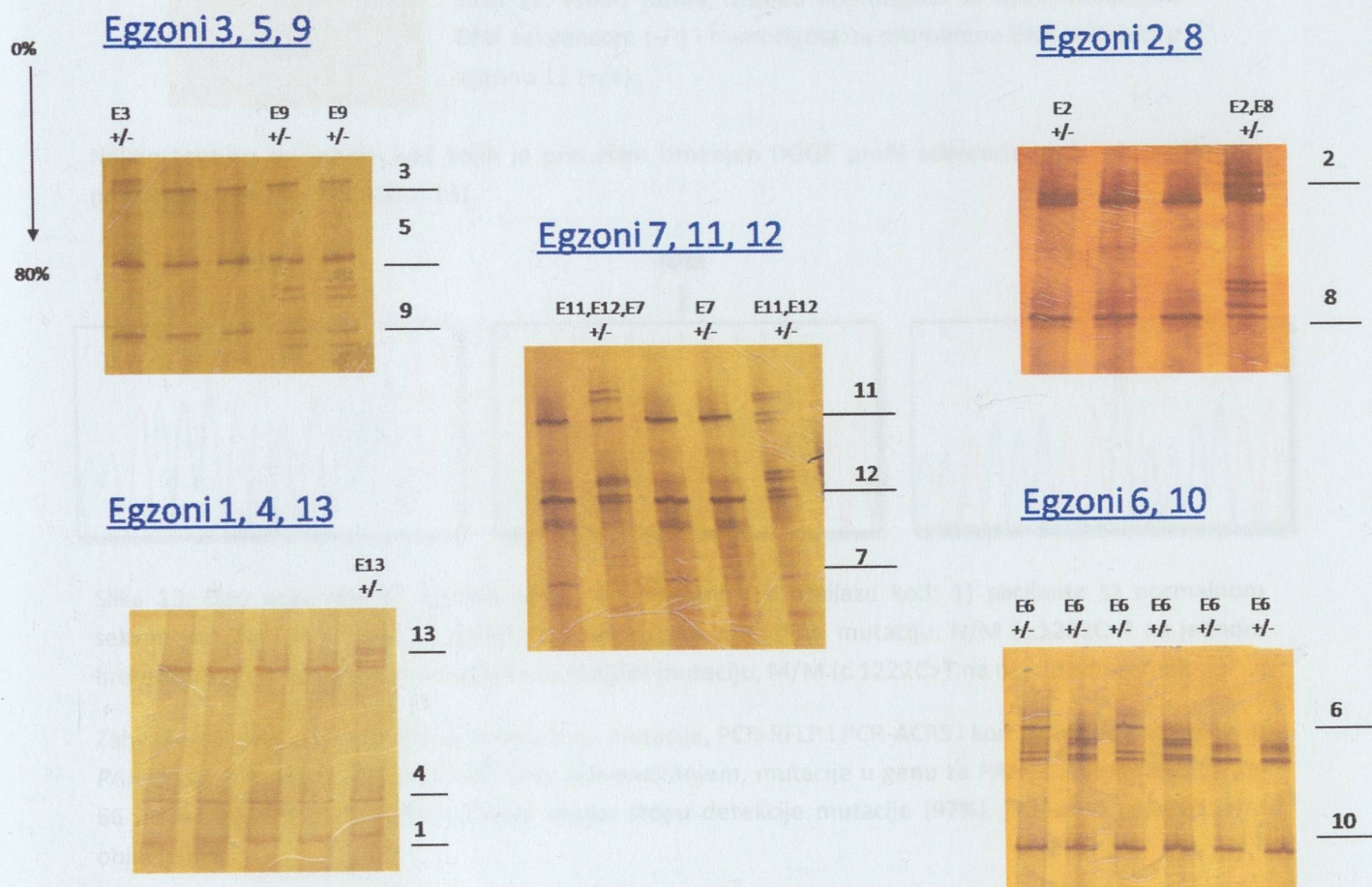


Egzone 6 i 10



Slika 10. Formiranje informativnog multipleks DGGE-a za egzone 6 i 10. Prisustvo promene u sekvenci datog egzona označeno je sa +, a odsustvo promene tj. normalna sekvenca sa -, dok je znakom pitanja označena promena za koju nije bilo moguće utvrditi kom egzonu pripada.

Odlučili smo se za pet informativnih kombinacija: I) egzoni 3, 5 i 9, II) egzoni 7, 11 i 12; III) egzoni 2 i 8; IV) egzoni 1, 4 i 13; V) egzoni 6 i 10 (Slika 11).



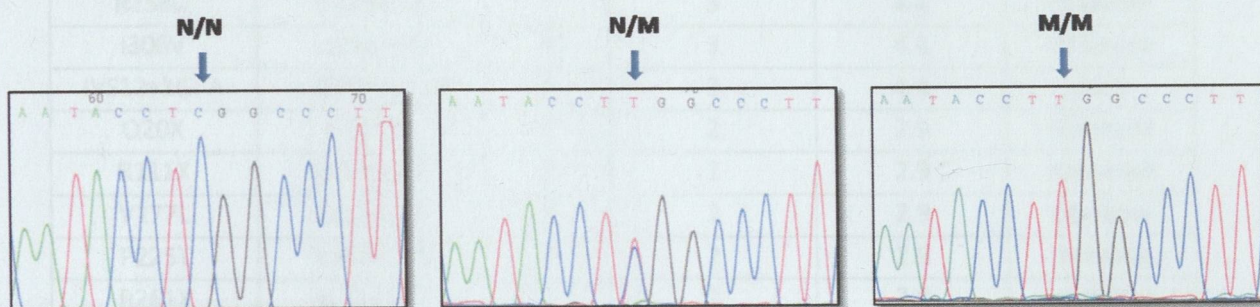
Slika 11. Optimalnih pet kombinacija multipleks DGGE-a. Prisustvo promene u sekvenci datog egzona označeno je sa +, a odsustvo promene tj. normalna sekvenca sa -.

Na ovaj način moguće je analizirati čitav kodirajući deo gena za *PAH* pacijenta sa fenilketonurijom u samo 5 PCR reakcija. Takođe, ukoliko bismo imali i uzorke roditelja, sva tri člana porodice bi bilo moguće istovremeno analizirati na jednom standardnom DGGE gelu, što značajno skraćuje vreme potrebno za postavljanje dijagnoze. U okviru ove studije, uzorci roditelja su retko bili dostupni, pa je analiza istih regiona različitih pacijenata rađena istovremeno. Ovo je doprinosilo lakšem uočavanju razlike između homozigota sa nepromenjenom DNK sekvencom i homozigota za promenu u DNK sekvenci (Slika 12).



Slika 12. Prikaz razlike između homozigota sa nepromenjenom DNK sekvencom (-/-) i homozigota za promenu u DNK sekvenci u egzonu 12 (+/+).

Nakon toga su svi egzoni kod kojih je primećen izmenjen DGGE profil sekvencirani radi identifikacije promene u genu za *PAH* (Slika 13).



Slika 13. Deo sekvence 12 egzona gena za fenilalanin hidroksilazu kod: 1) pacijenta sa normalnom sekvencom, N/N (c.1222C), 2) pacijenta heterozigota za R408W mutaciju, N/M (c.1222C>T na jednom hromozomu) i 3) pacijenta homozigota za R408W mutaciju, M/M (c.1222C>T na oba hromozoma).

Zahvaljujući kombinaciji metoda za detekciju mutacija, PCR-RFLP i PCR-ACRS i kompletni skrining gena za *PAH* DGGE metodom koji je praćen DNK sekvenciranjem, mutacije u genu za *PAH* su identifikovane na 66 od 68 nezavisnih PKU alela dajući visoku stopu detekcije mutacija (97%), jednu od najvećih ikad objavljenih.

Spektar i učestalost mutacija u genu za PAH u srpskoj populaciji

Identifikovano je 19 različitih mutacija u genu za *PAH* koje dovode do razvoja bolesti (Tabela 14). Trinaest njih je menjalo jednu amino kiselinu u proteinskoj sekvenci ("missense"), tri su uzrokovale promenu amino kiseline u stop kodon ("nonsense"), dve su menjale mesto iskrajanja introna (splajsing) i jedna je dovela do male delecije od dva nukleotida što je uzrokovalo pomeranje koda čitanja (delecija/frameshift). Sem promena u sekvenci gena za *PAH* koje izazivaju bolest, detektovane su i uobičajene tihe tačkaste mutacije kod kojih postoji promena u kodirajućem delu gena, ali zahvaljujući izrođenosti DNK koda, ne dolazi do promene amino kiseline i struktura proteina ostaje nepromenjena (Q232Q, V245V i L385L). Takođe, detektovane su i promene u intronima koje nemaju efekat na fenotip (IVS2+19T>C, IVS5-54A>G, IVS12-35C>T). Učestalosti mutacija unete su u srpsku nacionalnu bazu podataka o učestalosti mutacija (www.goldenhelix.org/serbian/).

Tabela 14. Spektar i učestalost mutacija koje uzrokuju fenilketonuriju u srpskoj populaciji.

Mutacije		Egzon	Broj hromozoma	Relativna učestalost (%)	Tip mutacije
Trivijalno ime	Sistematsko ime				
L48S	c.143T>C	2	14	21	missense
R408W	c.1222C>T	12	12	18	missense
P281L	c.842C>T	7	6	8.8	missense
E390G	c.1169A>G	11	5	7.4	missense
R261Q	c.782G>A	7	4	5.9	missense
R158Q	c.473G>A	5	3	4.4	missense
I306V	c.916A>G	9	3	4.4	missense
IVS12+1G>A	c.1315+1G>A	*	3	4.4	splice
Q20X	c.58C>T	1	2	2.9	nonsense
R111X	c.331C>T	3	2	2.9	nonsense
V177L	c.529G>C	6	2	2.9	missense
P225T	c.673C>A	6	2	2.9	missense
R261X	c.781C>T	7	2	2.9	nonsense
p.S16>XfsX1	c.47_48delCT	1	1	1.5	frameshift
S231F	c.692C>T	6	1	1.5	missense
R252Q	c.755G>A	7	1	1.5	missense
R297H	c.890G>A	8	1	1.5	missense
IVS10-11G>A	c.1066-11G>A	*	1	1.5	splice
R413P	c.1238G>C	12	1	1.5	missense
Neidentifikovano			2	2.9	
Ukupno			68		

*Mutacije koje pogađaju splajsing mesto nalaze se u intronskim regionima gena za PAH.

Čak jedanaest mutacija detektovanih u srpskoj populaciji spada među mutacije koje se smatraju najčešćim evropskim mutacije. Pet najčešćih mutacija predstavlja 60% svih mutantnih alela. Genotipska homozigotnost, odnosno učestalost homozigota je niska i iznosi 8.82% (3/34). Po prvi put je bilo moguće odrediti alelsku heterogenost lokusa PAH za srpsku populaciju, tj. izračunati homozigotnu vrednost na osnovu alelskih frekvencija. Homozigotna vrednost za srpsku populaciju je prilično niska i iznosi 0.10. Svi navedeni parametri ukazuju na heterogenost srpske populacije.

Po prvi put je data procena dobrobiti od primene terapije sa BH4 u Srbiji. Naime, među mutacijama detektovanim u srpskoj populaciji nađeno je 5 mutacija (L48S, E390G, R261Q, R158Q, i R413P) za koje je ranije pokazana povezanost sa odgovorom na terapiju sa BH4. Ukupna učestalost mutacija koje bi potencijalno pozitivno reagovala na BH4 iznosi 40.2% u srpskoj populaciji.

KORELACIJA GENOTIPA PAH I FENOTIPA PKU

Među analiziranim pacijentima identifikovali smo 28 različitih genotipova. S obzirom da su pacijenti na osnovu koncentracija fenilalanina u krvi pre terapije bili svrstani u tri fenotipske kategorije, imali smo priliku da uradimo korelaciju genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od fenilketonurije poreklom iz Srbije (Tabela 15).

Tabela 15. Genotip-fenotip korelacija kod 34 pacijenata sa fenilketonurijom iz Srbije

Genotipovi	Klasična fenilketonurija (Phe >1200 µmol/l)	Blaga fenilketonurija (600 < Phe < 1200 µmol/l)	Blaga hiperfenilalaninemija (< 600 µmol/l)
L48S+L48S	1		
L48S+R408W	3		
L48S+ P281L	2		
L48S+R261Q	1		
L48S+R158Q	2		
L48S+I306V		1	
L48S+ Q20X	1		
L48S+V177L		1	
L48S+S231F	1		
R408W+R408W	1		
R408W+E390G		3	
R408W+P225T	1		
R408W+R252Q	1		
R408W+R413P	1		
R408W+?	1		
P281L+P281L	1		
P281L+IVS12+1G>A	1		
P281L+P225T	1		
E390G+R158Q		1	
E390G+ R261X		1	
R261Q+I306V		1	
R261Q+ IVS12+1G>A		1	
R261Q+L15/S16fs	1		
IVS12+1G>A+R297H		1	
Q20X+V177L		1	
R111X+IVS10-11G>A	1		
R111X+ ?	1		
R261X+I306V		1	
Ukupno	22	12	0

Mutacije su analizirane u homozigotnim i funkcionalno hemizigotnim pacijenatima u kojima je "missense" mutacija u kombinaciji sa mutacijom čija je aktivnost nula, pa ukupna aktivnost potiče samo od proučavane "missense" mutacije. Svega tri pacijenta su homozigoti i to upravo za najčešće mutacije prisutne u srpskoj populaciji (L48S, R408W i P281L). U mutacije čija je aktivnost nula spadaju "nonsense" (Q20X, R111X, R261X), frameshift (L15/S16fs) i splajsing mutacije (IVS10-11G>A, IVS12+1G>A), kao i "missense" mutacije čija je rezidualna aktivnost *in vitro* manja od 10%, npr. R408W i P281L. Od 19 mutacija, zastupljenih na 68 hromozoma, 8 mutacija koje se nalaze na ukupno 29 hromozoma, ima nultu funkcionalnost. S obzirom da su u 4 genotipa obe mutacije bile nulte, a da u dva genotipa jedna od mutacija nije bila detektovana, ovi genotipovi su bili izuzeti iz analize. Konačno, u genotip-fenotip korelaciju bili su uključeni jedan homozigot i 19 funkcionalnih hemizigota, na osnovu kojih je analiziran efekat 9 "missense" mutacija.

Rezultati ove studije za mutacije P225T, R297H i R413P predstavljaju prve podatke o efektu mutacija na osnovu genotip-fenotip analize. Mutacije P225T i R413P asocirane su sa klasičnom PKU, a R297H sa blagom PKU. U slučaju većine mutacija efekat je bio u skladu sa podacima iz predhodnih genotip-fenotip korelacija i podacima iz *in vitro* analiza. U slučaju L48S mutacije, najčešće mutacije u srpskoj populaciji, povezanost sa klasičnom PKU bila je nedvosmislena, s obzirom da su L48S homozigot i svi funkcionalni hemizigoti imali tešku kliničku sliku – klasičnu PKU.

S obzirom na veliki broj nultih mutacija i mutacija kojima se na osnovu analize genotipa i fenotipa može pripisati težak efekat, možemo zaključiti da je većina mutacija u srpskoj populaciji asocirana sa klasičnom fenilketonurijom.

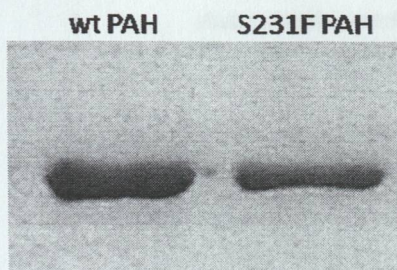
Od "missense" mutacija (R261Q, R158Q i S231F) koje su se našle u genotipu sa L48S mutacijom (Tabela 14) i dovele do klasične fenilketonurije, jedino efekat S231F mutacije, ranije nije bio proučavan u *in vitro* sistemima. Ukoliko bi se ispostavilo da je i S231F nulta mutacija, konzistentno težak efekat L48S mutacije u srpskoj populaciji bio bi potvrđen. Iz tog razloga, odlučili smo se da funkcionalno okarakterišemo enzim S231F PAH u *in vitro* sistemima.

IN VITRO FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA S231F PAH

Po prvi put je mutacija S231F PAH analizirana u prokariotskom i eukariotskom ekspresionom sistemu. Biohemijska karakterizacija S231F mutirane PAH obuhvatala je određivanje specifične enzimske aktivnosti i nivoa aktivacije supstratom kao i mogućnost stabilizaciju strukture mutiranog proteina pomoću šaperona (GroEL/GroES i BH4).

Prokariotski ekspresioni sistem

Radi dobijanja velike količine prečišćene fenilalanin hidroksilaze, fuzioni protein MBP-PAH eksprimiran je u *E. coli*. U ovom, dobro opisanom, prokariotskom ekspresionom sistemu, pri standardizovanim eksperimentalnim uslovima, prinos mutiranog proteina bio je znatno manji u odnosu na protein wtPAH (Slika 14).



Slika 14. SDS-PAGE analiza prečišćene frakcije wt i S231F MBP-PAH fuzionih proteina eksprimiranih u *E.coli*.

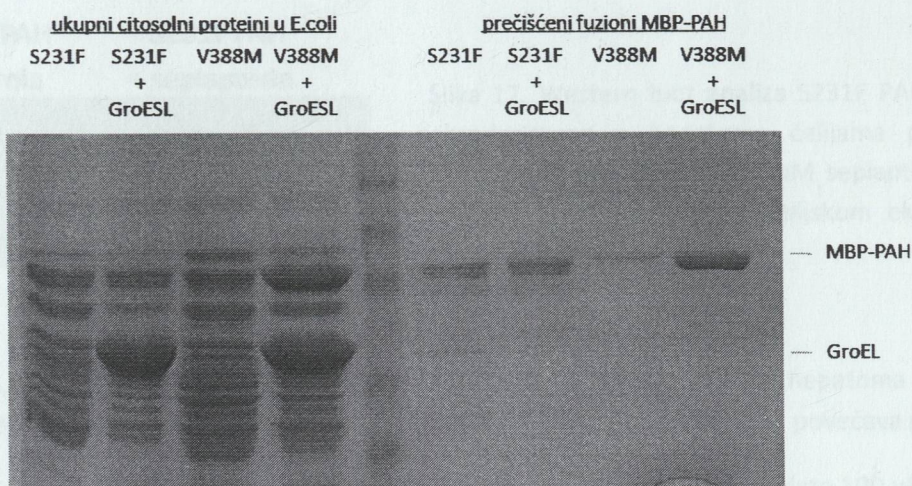
In vitro određivanje aktivnosti fenilalanin hidroksilaze, pokazalo je da S231F mutacija drastično smanjuje njenu specifičnu aktivnost (Tabela 16). Specifična aktivnost enzima S231F PAH je ~1% u poređenju sa wt PAH.

Tabela 16. Specifična aktivnost normalnog (wt) i mutiranog (S231F) MBP-PAH fuzionog proteina eksprimiranog u *E. coli* (L-Phe – označava reakciju bez predhodne inkubacije sa L-Phe, dok L-Phe + označava reakciju koja uključuje preinkubaciju sa L-Phe).

Fuzioni protein MBP-PAH	Specifična aktivnost (nmol Tir/min*mg)		Nivo aktivacije
	L-Phe -	L-Phe +	
wt	361.12±111.85	621.25±191.75	1.72
S231F	5.22±3.87	4.90±3.86	0.94
S231F+GroESL	1.94±1.83	2.04±1.63	0.95

Kako bi ispoljio maksimalnu specifičnu aktivnost, PAH je preinkubirana sa svojim supstratom L-Phe. Nivo aktivacija predstavlja odnos specifične aktivnosti detektovane u reakciji preinkubiranoj sa L-Phe u odnosu na specifičnu aktivnost detektovanu u reakciji koja nije preinkubirana sa L-Phe. U slučaju S231F PAH, nivo aktivacije od 0.94 pokazao je da mutirani enzim nije aktiviran preinkubacijom sa supstartom u istoj meri kao normalni PAH čiji nivo aktivacije iznosi 1.72 (Tabela 16).

Da bismo razjasnili da li S231F mutacija uzrokuje promenu u savijanju proteina koju je moguće ispraviti pomoću šaperona, eksprimirali smo S231F i V388M PAH proteine u prisustvu šaperona GroEL i GroES. V388M PAH je eksprimirana paralelno kao kontrola jer se radi o tipičnoj folding mutaciji. Ranije je utvrđeno da prisustvo šaperona dovodi do povećanog prinosa i povećane aktivnosti V388M mutacije. U odsustvu šaperona, količina oba mutirana proteina, S231F i V388M PAH, bila je značajno niža od količine wt PAH. Nakon dodavanja šaperona, količina S231F PAH je ostala nepromenjena, dok se količina V388M PAH povećala pri istim uslovima (Slika 15).



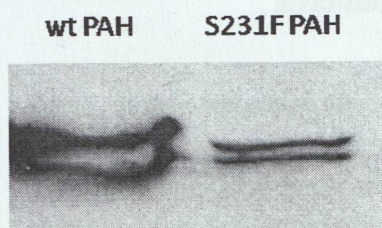
Slika 15. SDS-PAGE analiza uticaja GroEL/GroES šaperona na stabilizaciju mutiranih S231F i V388M MBP-PAH proteina eksprimiranih u *E.coli*. Pored prečišćenih fuzionih MBP-PAH proteina (94 kD), prikazani su i ukupni proteinski ekstrakti sa obogaćeni frakcijama MBP-PAH i GroEL usled indukovane ekspresije. Zbog male molekulske težine, GroES se ne vidi na ovom gelu.

Dodavanje šaperona, nije uticalo ni na povećanje specifične aktivnosti S231F PAH, niti na promenu u nivou aktivacije supstratom (Tabela 16).

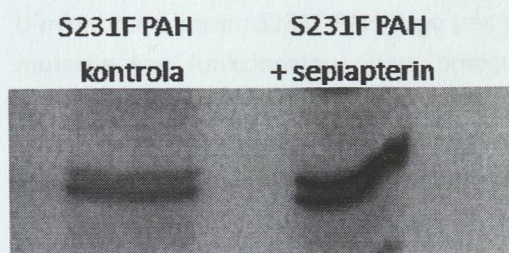
Smanjena stabilnost i izuzetno niska *in vitro* aktivnost S231F PAH, kao i nemogućnost da se na ove karakteristike utiče dodavanjem šaperona, svrstavaju S231F među izuzetno teške mutacije. S obzirom na njenu skoro nepostojeću aktivnost, treba je smatrati funkcionalno nultom mutacijom.

Eukariotski ekspresioni sistem

Radi proučavanja S231F PAH u sistemu koji je po svojim karakteristikama najpribližniji *in vivo* miljeu, koristili smo humani hepatoma ćelijski model. I ovom sistemu, količina S231F PAH je znatno redukovana u odnosu na normalnu PAH (10%). Dve trake koje se karakteristično zapažaju kada se PAH analizira u eukariotskom sistemu, potiču od fosforilisane i defosforilisane forme fenilalanin hidroksilaze (Slike 16 i 17).



Slika 16. Western blot analiza fuzionih wt i S231F PAH-FLAG proteina eksprimiranih u humanoju hepatoma ćelijskoj liniji. PAH-FLAG proteini detektovani su u ćelijskom ekstraktu pomoću anti-FLAG antitela.

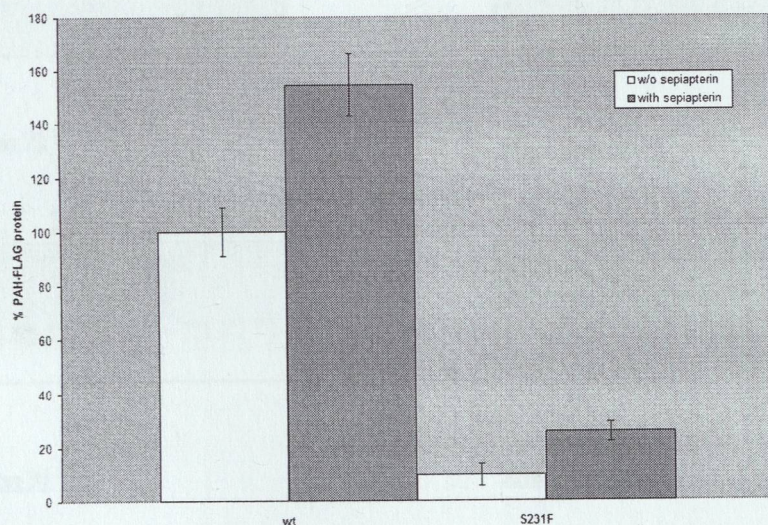


Slika 17. Western blot analiza S231F PAH-FLAG proteina eksprimiranog u hepatoma ćelijama pri standardnim uslovima ili u prisustvu 100 μ M sepiapterina. PAH-FLAG proteini detektovani su u ćelijskom ekstraktu pomoću anti-FLAG antitela.

Sepiapterin, koji je prekursor unutarćelijske biosinteze BH4, dodavan je hepatoma ćelijama radi ispitivanja efekta BH4 na mutirani protein. Količina S231F PAH se u tom slučaju povećava (Slike 17 i 18).

Količine S231F PAH iz kontrolnih ekstrakata ćelijske kulture i kulture kojoj je dodato 100 μ M sepiapterina kvantifikovane su densitometrijski i vrednosti su prikazane na slici 18.

Pokazali smo da postoji statistički značajna razlika u prinosu S231F PAH pri standardnim uslovima i prinosu S231F PAH kada je u medijumu prisutan BH4 čija je uloga slična šaperonskoj. Međutim, s obzirom da je, i u slučaju povećanja, količina S231F PAH i dalje relativno niska (25%), povećanje do koga dovodi BH4 verovatno nema fiziološki značaj.



Slika 18. Steady-state nivo normalnog i S231F PAH-FLAG proteina privremeno eksprimiranih u hepatoma ćelijama, bez ili sa sepiapterinom kao unutarćelijskim BH4 prekursorom. PAH-FLAG proteini detektovani su u ćelijskom ekstraktu pomoću anti-FLAG antitela i kvantifikovani pomoću densitometrijske analize. Prikazane vrednosti su srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija dobijena iz najmanje dva nezavisna eksperimenta. Razlika u nivou S231F PAH-FLAG proteina bez/sa sepiapterina dostiže statističku značajnost ($p=0.003$)

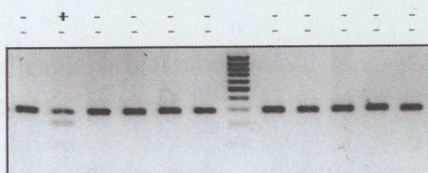
U ovom radu, enzim S231F PAH je po prvi put funkcionalno okarakterisan. Šta više, karakterizacija S231F mutacije kao funkcionalno nulte, omogućila je njenu upotrebu u analizama korelacije genotipa i fenotipa. S obzirom da je pokazano da se u slučaju S231F mutacije, radi o još jednoj funkcionalno nultoj mutaciji, genotip L48S/S231F je uključen u analizu efekta L48S mutacije na osnovu genotip-fenotip korelacije, potvrdivši njenu konzistentnu povezanost samo sa klasičnim fenotipom PKU.

U narednom koraku analizirali smo haplotipove povezane sa L48S mutacijom kod devet pacijenata sa klasičnom fenilketonurijom.

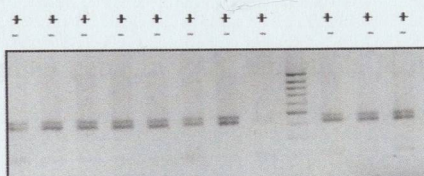
HAPLOTIPSKA ANALIZA L48S MUTACIJE

Haplotipska analiza urađena je kako bi rasvetlila da li je mutacija L48S povezana sa istim genetskim okruženjem kod svih devet pacijenata sa klasičnom fenilketonurijom u srpskoj populaciji. Analizirani su ekstenzivni haplotipovi koji obuhvataju RFLP bialelske polimorfizme i VNTR multialelski polimorfizam. Analizirano je svih šest bialelskih polimorfnih mesta (*BglII*, *PvuIIa*, *PvuIIb*, *EcoRI*, *MspI* i *XmnI*) koje je moguće detektovati pomoću PCR-RFLP metode (Slika 19).

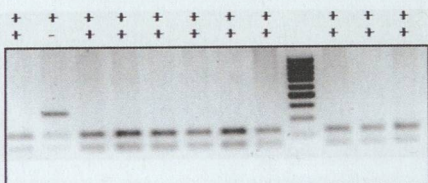
***BglII* (intron 1)**



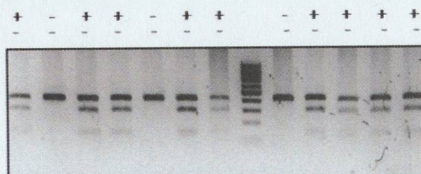
***EcoRI* (intron 5)**



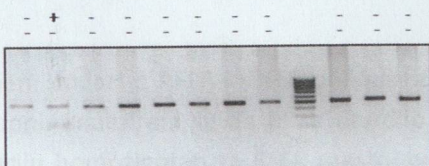
***PvuIIa* (intron 2)**



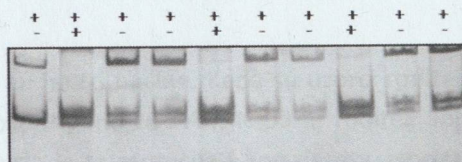
***MspI* (intron 7)**



***PvuIIb* (intron 3)**

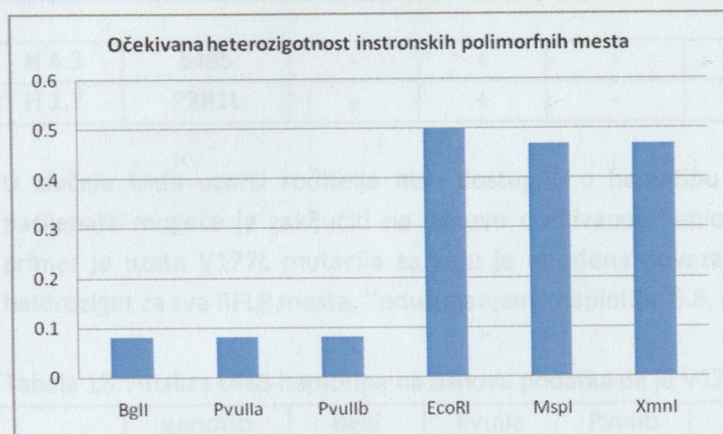


***XmnI* (intron 8)**



Slika 19. PCR-RFLP analiza polimorfnih mesta na 2% agaroznom (*BglII*, *PvuIIa*, *PvuIIb*, *EcoRI*, *MspI*) i 8% PAGE (*XmnI*) gelu. U svim analizama korišćen je 100bp DNK marker. Odsustvo mesta koje prepoznaje i seče odgovarajući restrikcioni enzim označeno je sa -, a prisustvo sa +.

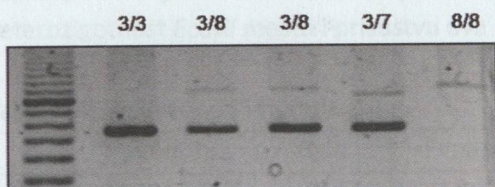
Na osnovu učestalosti + i - alela, izračunata je očekivana heterozigotnost za RFLP polimorfna mesta u srpskoj populaciji (Slika 20). Za *BglII*, *PvuIIa* i *PvuIIb* polimorfna mesta, koja se nalaze u 3' regionu gena za *PAH* uočena je niska očekivana heterozigotnost (0.08), dok je za *EcoRI*, *MspI* i *XmnI*, koja se nalaze u 5' regionu gena za *PAH* uočena visoka očekivana heterozigotnost (0.47 – 0.5).



Slika 20. Očekivane heterozigotnosti za *BglII*, *PvuIIa*, *PvuIIb*, *EcoRI*, *MspI* i *XmnI* polimorfna mesta, izračunate prema formuli: $1 - \sum p_i^2$.

Određivanje broja tandemskih ponovaka (VNTR) u 3' regionu gena za *PAH*, omogućila je potpuniju haplotipsku analizu.

VNTRs



Slika 21. Analiza broja varijabilnih tandemskih ponovaka na 4% agarozu uz pomoć 50 bp DNK markera (O'Range Ruler, Fermentas). Dužina fragmenta od 380 bp odgovara prisustvu 3 tandemskih ponovaka, i sa porastom dužine za 30 bp, broj ponovaka se povećava za 1.

Dobijeni podaci o RFLP i VNTR polimorfizmima, analizirani su na tri načina. Kada su uzorci roditelja bili dostupni, analizirani su da bi se utvrdilo koju mutaciju nose u genu za *PAH*. Kada je roditelj koji nosi mutaciju homozigotan za RFLP mesto, onda nema sumnje da je ta mutacija i kod deteta asocirana sa istom formom polimorfizma. Analizom onih RFLP polimorfniha mesta kod roditelja koja su kod deteta ispoljila heterozigotnost, moguće je utvrditi asociranost L48S mutacije i odgovarajućeg haplotipa (Tabela 17).

Tabela 17. Analiza haplotipa povezanog sa L48S na osnovu porodične studije.

	genotip	BglII	PvuIIa	PvuIIb	EcoRI	MspI	XmnI	VNTR
pacijent	L48S/P281L	-/-	+/+	-/-	+/-	+/-	+/-	3, 7
otac	L48S/-				+/-	-/-	+/+	3
majka	P281L/-				+/-	+/-	+/-	7

H 4.3	L48S	-	+	-	+	-	+	3
H 1.7	P281L	-	+	-	-	+	-	7

U slučaju kada uzorci roditelja nisu dostupni, o haplotipu L48S kod kombinovanih heterozigotnih pacijenata moguće je zaključiti na osnovu očekivanog haplotipa za drugu mutaciju (Tabela 18). Kao primer je uzeta V177L mutacija za koju je utvrđena povezanost sa haplotipom 6.8. Iako je pacijent heterozigot za sva RFLP mesta, "oduzimanjem" haplotipa 6.8, nedvosmisleno je dobijen haplotip 28.3.

Tabela 18. Analiza L48S haplotipa na osnovu podatka da je V177L mutacija asocirana sa H 6.8.

	genotip	BglII	PvuIIa	PvuIIb	EcoRI	MspI	XmnI	VNTR
pacijent	L48S/V177L	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	3, 8

H 28.3	L48S	-	+	-	-	-	+	3
H 6.8	V177L	+	-	+	+	+	-	8

U slučaju L48S homozigota, koji je homozigot za 5 od 6 RFLP mesta, jasno su zaključeno sa kojim haplotipovima je asocirana mutacija. Intron 5 gena za *PAH* je sekvenciran radi dodatne potvrde o heterozigotnosti *EcoRI* mesta i prisustvu dva različita haplotipa (Tabela 19).

Tabela 19. Analiza L48S homozigota

	genotip	BglII	PvuIIa	PvuIIb	EcoRI	MspI	XmnI	VNTR
pacijent	L48S/L48S	-/-	+/+	-/-	+/-	-/-	+/+	3, 3

H 4.3	L48S	-	+	-	+	-	+	3
H 28.3	L48S	-	+	-	-	-	+	3

Sumirajući rezultate dobijene na tri opisana načina, odredili smo haplotipove na kojima se nalazi L48S mutacija kod pacijenata obolelih od klasične fenilketonurije iz srpske populacije (Tabela 20). Analiza je pokazala asociranost mutacije L48S sa dva različita haplotipa (4.3 i 28.3) kod ove grupe pacijenata. Na 7 od 10 L48S alela, ustanovljen je haplotip 4.3 (70%), a na 2 alela je ustanovljen haplotip 28.3 (20%). U jednom slučaju haplotip nije mogao da bude određen ni na jedan od opisanih načina.

Tabela 20. Haplotipovi povezani sa L48S mutacijom kod pacijenata sa klasičnom fenilketonurijom.

	Fenotip	Genotip					
		1° Hromozom			2° Hromozom		
		Mutacija	Haplotip	VNTRs	Mutacija	Haplotip	VNTRs
1	Klasičan	L48S	4	3	Q20X	1	8
2*	Klasičan	L48S	28	3	L48S	4	3
3	Klasičan	L48S	28	3	R158Q	4	3
4	Klasičan	L48S	nd	3	S231F	Nd	8
5	Klasičan	L48S	4	3	R261Q	1	8
6	Klasičan	L48S	4	3	P281L	1	7
7	Klasičan	L48S	4	3	P281L	1	7
8	Klasičan	L48S	4	3	R408W	2	3
9	Klasičan	L48S	4	3	R408W	2	3

*L48S homozigot; nd- nedefinisan haplotip.

Naši rezultati isključuju mogućnost da L48S mutacija vodi poreklo iz Srbije i sugerišu da je u srpsku populaciju uneta iz populacija sa različitim genetičkim osnovama. S obzirom na nehomogenu genetičku osnovu zaključili smo da konzistentan efekat L48S mutacije nije nastao kao posledica transkripcione regulacije.

Što se tiče S231F mutacije, koju smo analizirali u ekspresionim sistemima i za koju ne postoje podaci o haplotipu, ni u okviru ove studije nije sa sigurnošću određen haplotip. Ukoliko bismo predpostavili da se L48S mutacija u kombinovanom L48S/S231F heterozigotu nalazi na haplotipu 4.3, mogli bismo da zaključimo da je S231F mutacija asocirana sa haplotipom 1.8. Međutim, ukoliko je L48S na haplotipu 28.3, onda je S231F asocirana sa haplotipom 10.8. Ostali mogući haplotipovi, 8 i 41, eliminisani su jer do sada nije pokazana njihova povezanost sa VNTR 8.

Iako je pokazano da L48S mutacija nije povezana sa jedinstvenom genetičkom osnovom, i da promena ekspresije verovatno nije objašnjenje za njen konzistentan fenotip, našu pažnju je privukla ideja o RFLP polimorfizmima u intronima koji bi potencijalno mogli da budu regulatori ekspresije gena za PAH.

XMNI POLIMORFIZAM KAO REGULATOR EKSPRESIJE GENA ZA PAH

In silico analiza

S obzirom da je do sada analiziran jedino 9-kb 5' fragment gena za PAH, mogućnost postojanja transkripcionih regulatornih elemenata u čak oko 90% preostale sekvence, a koji bi imali ulogu u finom regulisanju njegove transkripcije, nikada nije ispitana. S obzirom da su u literaturi opisani slučajevi kada se za polimorfno mesto pokazalo da je regulatorni element (Labie et al 1985), u pokušaju da pronađemo nove *cis* elemente, prvo smo analizirali dobro poznate intronske regione u čiji sastav ulaze bialelni polimorfizmi.

Za analizu oko 40 bp dugih intronskih sekvenci gena za *PAH* koje sadrže RFLP polimorfizme, korišćen je TFSEARCH program, verzija 1.3 (<http://www.cbrc.jp/htbin/nph-tfsearch>). Program omogućava identifikaciju sekvenci koje pokazuju visoku korelaciju u odnosu na TFMATRIX bazu podataka (verzija 3.3) u kojoj su sakupljena okarakterisana mesta vezivanja transkripcionih faktora (Heinemeyer et al 1998). Pretraga je bila ograničena na mesta vezivanja transkripcionih faktora prisutnih kod vertebrata i na nivo značajnosti preko 85.

U okviru analize ~40 bp obe bialelske varijante 6 RFLP mesta, program je identifikovao vezivna mesta različitih transkripcionih faktora. Zanimljivo je da je jedino *XmnI* polimorfno mesto bilo deo TF vezivnog mesta i to za eritroidno specifični transkripcioni faktor – GATA-1 (Slika 22). U narednim eksperimentima analiziran je deo osmog introna gena za *PAH* koji sadrži *XmnI* polimorfizam.

TTTGGGAAGT GGAAGTGTTT XGGGATTAGT TGAAC TTAA C

→
GATA-1

Slika 22. Prikaz dela osmog introna gena za *PAH* koji je analiziran pomoću TFSEARCH programa. Strelicom je označen region koji je prepoznat kao mesto vezivanja GATA-1 transkripcionog faktora. Sa X je označeno *XmnI* polimorfno mesto koje se javlja u varijantama C/G i A/T i koje ulazi u sastav vezivnog mesta. X se nalazi na poziciji g.66989 u genu za *PAH*.

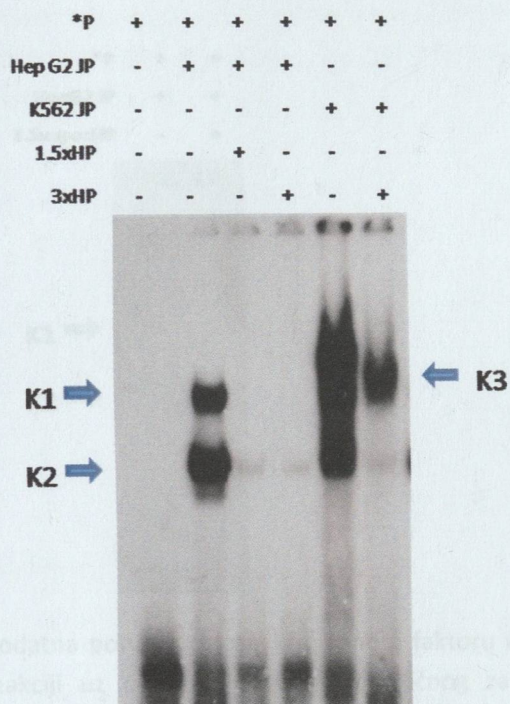
Analiza interakcija DNK sa proteinima

S obzirom da je *in silico* analiza predvidela vezivanje transkripcionog faktora za deo sekvence osmog introna gena za *PAH* koji sadrži *XmnI* polimorfizam, kreirali smo dve *XmnI* oligonukleotidne probe, G/C i A/T, sa razlikom u jednom nukleotidu. Da bismo utvrdili da li se za dati region vezuju transkripcioni faktori, koji transkripcioni faktori su u pitanju, kao i ima li razlike u formiranju kompleksa između dve probe primenili smo metodu usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA) i South-Western metodu.

Probe su inkubirane sa jedarnim proteinima iz HepG2 i K562 ćelijskih linija. Ekstrakti humane hepatoma ćelijske linije, HepG2, korišćeni su jer najpribližnije predstavljaju sredinu u kojoj se normalno odvija ekspresija gena za *PAH*. Ekstrakti humane eritroleukemične ćelijske linije, K562, uključeni su u analizu zbog prisustva GATA-1 transkripcionog faktora među jedarnim proteinima.

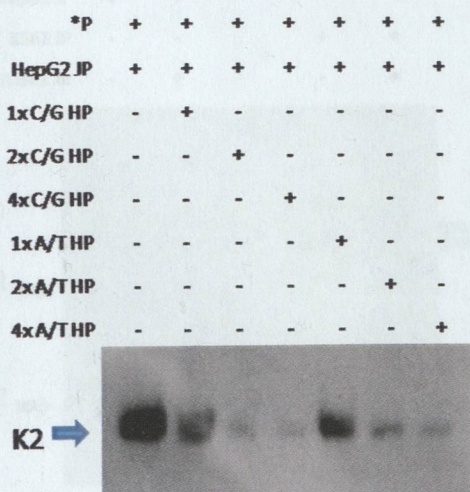
Inkubacija C/G i A/T proba sa jedarnim proteinima iz HepG2 i K562 ćelija dovela je do pojavljivanja istog paternog traka kod obe probe. S obzirom da razlika ne postoji, prikazana je samo proba koja sadrži C/G varijantu (Slika 23). Iako analizirana proba formira dva kompleksa kako sa jedarnim proteinima iz HepG2, tako i sa jedarnim proteinima iz K562, uočena je razlika između gornjih kompleksa. U slučaju jedarnih proteina iz HepG2 ćelija, prisutna su dva specifična protein-DNK kompleksa, K1 i K2. Donji kompleks HepG2 jedarnih proteina (K2) uočen je i kod jedarnih proteina iz K562 ćelija. Međutim, gornji kompleks K562 jedarnih proteina (K3) je intenzivniji i pokazuje dodatno zaostajanje u odnosu na K1. Razlika

između K2 i K3 verovatno je posledica razlike u jedarnim proteinima HepG2 i K562 ćelija. S obzirom da je K3 kompleks nešto teži, možemo pretpostaviti da u njegov sastav ulaze dodatni proteini, asocirani sa karakteristikama ekspresije u K562 ćelijama.



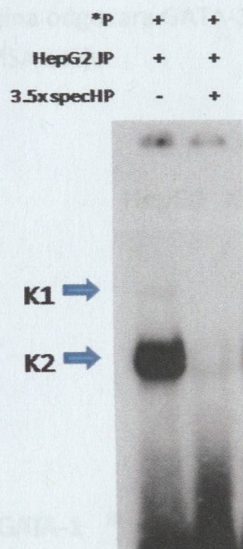
Slika 23. Analiza interakcije radioaktivno obeležene dvolančane G/C probe (*P) sa jedarnim proteinima (JP) iz HepG2 i K562 ćelija metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA). Radi potvrde specifičnosti formiranih kompleksa, ista neobeležena tj. hladna proba (HP) dodavana je u naznačenom višku. Formirani kompleksi označeni su sa K1, K2 i K3.

Specifičnost kompleksa K2, demonstrirana je kompeticionim esejima. Kompeticioni esej rađeni su dodavanjem iste (C/G) ili različite (A/T) hladne probe. Na taj način dodatno je pokazano da promena jednog nukleotida u DNK probi ne dovodi do promene rezultata i ne remeti specifičnost interakcije sa jedarnim proteinima (Slika 24).



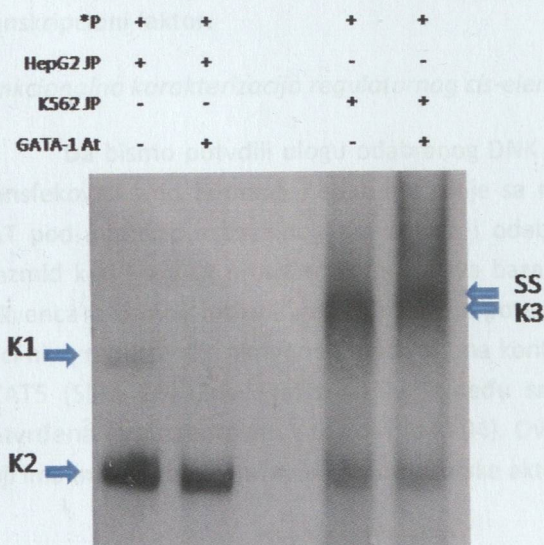
Slika 24. Analiza specifičnosti kompleksa formiranog u interakciji radioaktivno obeležene dvolančane G/C probe (*P) sa jedarnim proteinima (JP) iz HepG2 ćelija kompetitivnim EMSA esejem. Ista (C/G) ili različita (A/G) hladna proba (HP) dodavana je u naznačenom višku.

Da bismo identifikovali transkripcioni faktor koji formira ove komplekse, uradili smo kompeticioni esej sa hladnom oligonukleotidnom probom specifičnom za GATA-1 sekvencu. S obzirom da ovaj oligonukleotid specifično vezuje GATA-1 transkripcioni faktor, kada se doda u reakciju, kompleksi nestaju usled kompeticije za isti protein (Slika 25).



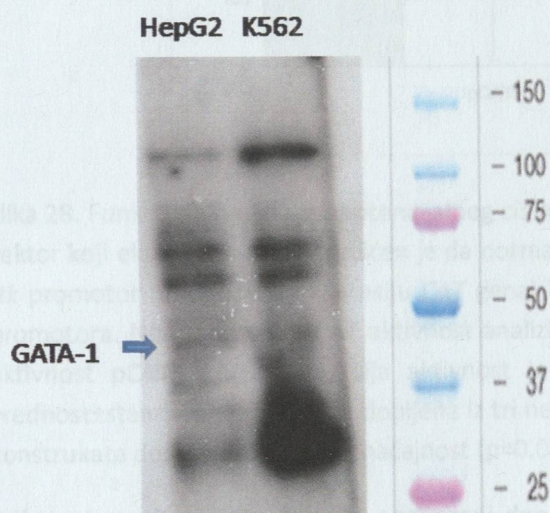
Slika 25. Analiza specifičnosti kompleksa formiranih u interakciji radioaktivno obeležene dvolančane G/C probe (*P) sa jedarnim proteinima (JP) iz HepG2 ćelija kompetitivnim EMSA esejem. GATA-1 specifična hladna proba (specHP) dodata je u naznačenom višku.

Dodatna potvrda o transkripcionom faktoru vezanom unutar kompleksa, dobijena je u superšift EMSA reakciji uz primenu antitela specifičnog za GATA-1 (Slika 26). Ranije je pokazano da formiranje kompleksa između DNK, GATA-1 i GATA-1 antitela zavisi od odnosa koncentracija GATA-1 i GATA-1 antitela u reakciji (Pavlović et al 2004). S obzirom da postoji razlika u količini GATA-1 transkripcionog faktora u dve analizirane ćelijske linije, a u esej je korišćena ista količina GATA-1 antitela (10 µl), to je u slučaju analize jedarnih proteina iz HepG2 dovelo do nestajanja DNK-proteinskog kompleksa, dok je u slučaju jedarnih proteina iz K562 dovelo do karakterističnog pomeranja trake (SS).



Slika 26. Identifikacija transkripcionog faktora koji učestvuje u formiranju kompleksa sa radioaktivno obeleženom dvolančanom G/C probom (*P) pomoću GATA-1 specifičnog antitela (GATA-1 At) u superšift EMSA esej. Kompleks karakterističan za superšift označen je sa SS.

Dodatna analiza proteina koji stupaju u interakciju sa *XmnI*/probom izvršena je South-Western metodom (Slika 27). U ovom slučaju protein-protein interakcije među jedarnim proteinima narušene su razdvajanjem proteina na denaturišućen poliakrilamidnom gelu. Uz pomoć proteinskog standarda, moguće je proceniti molekulske težine proteina koji su stupili u interakciju sa obeleženom probom. Kako u K562, tako i u HepG2, identifikovan je protein molekulske težine od oko 43 kDa. Ova molekulaska težina odgovara GATA-1 proteinu čija interakcija sa probom je već pokazana u kompetitivnom i superšift EMSA eseju.

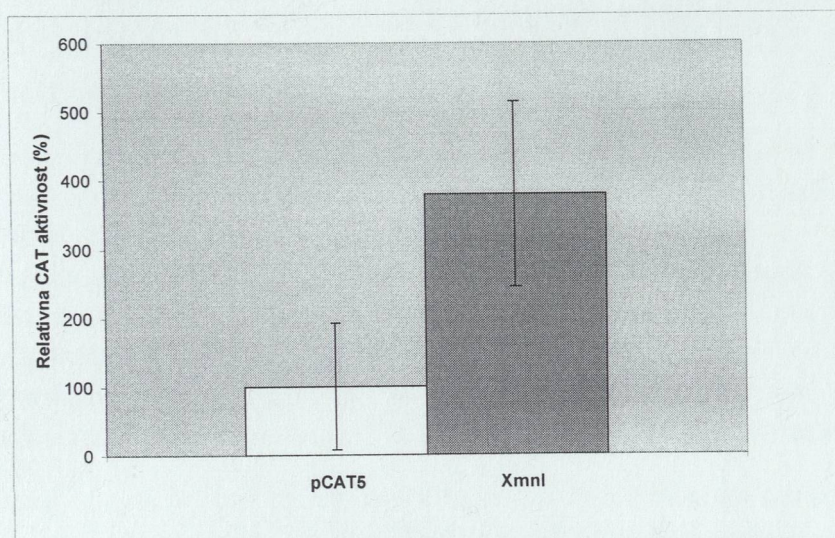


Slika 27. Analiza interakcije radioaktivno obeležene dvolančane G/C probe sa jedarnim proteinima iz HepG2 i K562 ćelija South-Western metodom. U analizi molekulskih težina korišćen je Prestained BioRad protein standard. Strelicom je označen GATA-1 protein, identifikovan prema molekulskoj težini (43 kDa).

Razlike koje su primećene u EMSA i South-Western blot analizama, svakako su posledica razlike u sastavu i količini jedarnih proteinima HepG2 i K562 ćelija. Ove razlike posledica su različitih funkcija analiziranih ćelijskih linija. Uprkos razlikama, pokazano je da se u oba miljea proba vezuje za GATA-1 transkripcioni faktor.

Funkcionalna karakterizacija regulatornog cis-elementa

Da bismo potvrdili ulogu odabranog DNK segmenta u regulaciji ekspresije gena za *PAH* *in vitro*, transfekovali smo humane hepatoma ćelije sa reporterskim plazmidnim konstruktom koji eksprimira CAT pod kontrolom bazalnog promotora i odabranog DNK segmenta. Konkretno, korišćen je pCAT5 plazmid kod koga *tk* promotor omogućava bazalnu ekspresiju CAT gena, a ispitivana 200 bp dugačka sekvenca iz osmog introna gena za *PAH* je potencijalni regulator. Konstruk *XmnI*, pokazao je 3.8 puta veći nivo reporterske aktivnosti u odnosu na kontrolni plazmid sa bazalnom promotorskom aktivnošću - pCAT5 (Slika 28). Značajnost razlike između srednjih vrednosti u odnosu na standardnu devijaciju potvrđena je studentovim t-testom ($p=0.04$). Ovo pokazuje da je analizirani DNK segment *cis*-element koji ima mogućnost pojačavanja promotorske aktivnosti.



Slika 28. Funkcionalna analiza potencijalnog *cis* regulatornog elementa gena za *PAH* kod čoveka. pCH110 vektor koji eksprimira β -gal korišćen je da normalizuje razlike u transfekcionoj efikasnosti. Vektor pCAT5 (*tk* promotor omogućava ekspresiju *CAT* gena) korišćen je kao pokazatelj bazalnog nivoa ekspresije *tk* promotora. Normalizovana *CAT* aktivnost analiziranog konstrukta izražena je procentualno u odnosu na aktivnost pCAT5 konstrukta, čija aktivnost je označena sa 100%. Prikazane vrednosti su srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija dobijena iz tri nezavisna eksperimenta. Razlika u aktivnosti pCAT5 i *XmnI* konstrukata dostiže statističku značajnost ($p=0.04$).

Prikazani rezultati potvrđuju da analizirani deo osmog introna gena za *PAH* predstavlja transkripcioni regulatorni *cis*-element koji vezuje GATA-1 transkripcioni faktor i funkcioniše kao enhanser. Ovo je prvi put da je za neki region u okviru introna gena za *PAH*, pokazano da je regulatorni transkripcioni element.

MUTACIJE U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU KAO MODULATORI FENOTIPA

Broj i heterogenost mutacija u genu za PAH u srpskoj populaciji

Na osnovu prve kompletne analize kodirajućeg dela gena za fenilalanin hidroksilazu kod pacijenata sa fenilketonurijom iz srpske populacije, identifikovano je 19 mutacija (Tabela 13) već opisanih u *PAH* bazi podataka. Činjenica da nisu detektovane nove mutacije nije iznenađujuća jer se analize mutacija u evropskim populacijama vrše od početka 90-tih godina XX veka. Jos 1996. godine, Guldborg i saradnici su primetili da je stepen karakterizacije mutacija u evropskim populacijama dostigao nivo kada detekcija novih mutacija postaje retka (Guldborg et al 1996). Zaista, sve mutacije, njih 22, koje su prijavljene u poslednje četiri godine, pronađene su u azijskim populacijama (Lee et al 2006; Song et al 2005). Trenutno je u bazi podataka opisana 531 mutacija u genu za *PAH* (<http://www.pahdb.mcgill.ca>).

Bliskost sa evropskim populacijama ogleda se i u zapažanju da 11 mutacija detektovanih u srpskoj populaciji spada među 29 mutacija koje je Zschocke okarakterisao kao najčešće evropske mutacije (Zschocke 2003). Opažanje da pet mutacija predstavlja 60% svih mutiranih alela u srpskoj populaciji, je još jedna potvrda da mali broj mutacija pokriva većinu relativnih alelskih učestalosti. Weiss je bio prvi koji je ukazao da rastuća količina genetičkih podataka navodi da se promene ustaljeni načini razmišljanja. Ukazao je na generalnu pojavu da na većini genskih lokusa postoji veliki broj različitih alela, ali da mali broj mutacija čini oko 2/3 svih alela, dok je većina mutacija retka, tzv. "privatna" (Weiss 1996).

Međutim, za razliku od nekih populacija, srpska populacija se odlikuje parametrima koji ukazuju na njenu heterogenost. Genotipska homozigotnost, odnosno učestalost homozigota je niska i iznosi 8.82% (3/34). Homozigotna vrednost (j), koja je izračunata na osnovu alelskih frekvencija i ukazuje na alelsku heterogenost lokusa za *PAH* u srpskoj populaciji, prilično je niska (0.10).

Što je homozigotna vrednost veća, to je populacija homogenija u odnosu na mutacije u genu za *PAH* (Guldborg et al 1996). Najhomogenija do sada opisana populacija su Jemenski Jevreji kod kojih postoji samo jedan molekularni defekt (delecija u trećem egzonu gena za *PAH*) koji je odgovoran za sve slučajeve fenilketonurije u ovoj populaciji. Prema tome, homozigotna vrednost iznosi 1 u ovoj populaciji (Avigad et al 1990). Severne i istočne slovenske populacije (Litvanija, Letonija, Južna Poljska) su takođe prilično homogene (Zschocke et al 2003). Međutim, u slučaju srpske populacije, homozigotna vrednost je prilično niska i sličnija etnički raznolikim populacijama, kao što su nemačka ili američka, nego malim izolovanim populacijama. Bilo bi interesantno uporediti homogenost srpske populacije u odnosu na druge populacije koje su nastanjene na Balkanskom poluostrvu. Međutim, u većini balkanskih populacija, nivo detekcije mutacija u genu za *PAH* manji je od 90% (Eisensmith et al 1992; Kalaydjieva et al 1993; Popescu et al 1998; Traeger-Synodinos 1994). Kada veliki broj mutacija ostane neokarakterisan, nivo heterogenosti se ne može ustanoviti (Guldborg et al 1996). Što se tiče regiona bivše Jugoslavije, podaci za Bosnu i Hercegovinu, Makedoniju i Sloveniju ne postoje. Izuzetak je Hrvatska, gde je homozigotna vrednost 0.17 i ukazuje na umereno homogenu populaciju (Zschocke et al 2003) (Tabela 21).

Tabela 21. Homozigotnost lokusa za PAH kod različitih populacija

Populacija	Σx_i^2	Broj hromozoma	Stepen detekcije mutacija (%)	Referenca
Jemenski Jevreji	1.00	44	100	Avigad et al 1990
Letonija	0.58*	96	98	Pronina et al 2003
Litvanija	0.54*	184	95	Kasnauskiene et al 2003
Južna Poljska	0.44	80	91.3	Zygulska et al 1994
Rumunija	0,26*	44	88	Popescu et al 1998
Hrvatska	0.17	78	99.0	Zschocke et al 2003
Severna Irska	0.14	242	99.6	Zschocke et al 1995
Srbija	0.10	68	97.0	Stojiljkovic et al 2006
Nemačka	0.08	90	95.6	Zschocke and Hoffmann 1999
SAD	0.06	294	94.9	Guldborg et al 1996

Σx_i^2 - homozigotna vrednost;

* vrednosti koje su izračunate u okviru ovog istraživanja, a na osnovu podataka iz navedene reference.

Heterogenost srpske populacije oslikava brojne istorijski dokumentovane migracije, suživot različitih populacija u ovom delu balkanskog poluostrva, kao i potvrdu da se protok gena dešavao između populacija.

Homozigotna vrednost mora se uzeti u obzir kada se razmatra strategija za detekciju mutacija u datoj populaciji. S obzirom da je homozigotna vrednost za srpsku populaciju niska, potrebno je bilo dizajnirati strategiju za dijagnostiku sa potencijalom da identifikuje veliki broj mutacija. Mi smo u skrining mutacija uključili svih 13 egzona gena za PAH, kao i njima okolne sekvence i preliminarnu detekciju obavljali DGGE metodom, nakon čega je mutacija bila identifikovana sekvenciranjem. Na ovaj način postignut je nivo detekcije od 97% što je samo po sebi potvrda da je prvobitna strategija bila pravilno odabrana.

Zahvaljujući osmišljenoj strategiji i uspešnoj optimizaciji odabranih metoda stvorena je osnova za dalje istraživanje fenilketonurije u Srbiji. Takođe, uvedena molekularna dijagnostika gena za PAH ima značaj za postavljanje preciznije dijagnoze, planiranje dijetetskog režima, genetičko savetovanje i otvara mogućnost za odabir pacijenata kojima bi koristila terapija tetrahidrobiopterinom.

Spektar i učestalost mutacija u genu za PAH u srpskoj populaciji

Podaci o spektru i učestalosti mutacija u genu za fenilalanin hidroksilazu uneti su u nacionalnu bazu podataka (www.goldenhelix.org/serbian/). Na taj način postali su lako dostupni kako istraživačima iz oblasti molekularne genetike, tako i pacijentima i lekarima.

Jedanaest mutacija (L48S, R111X, R158Q, R252W, R261Q, R261X, P281L, IVS10-11G>A, E390G, R408W i IVS12+1G>A) detektovanih u srpskoj populaciji su bar u dve druge evropske populacije prisutne sa

relativnom učestalošću preko 3%. Sve ostale, retke, mutacije (Q20X, V177L, P225T, S231F, R297H i R413P) su i u srpskoj populaciji prisutne sa učestalošću manjom <3%, sa izuzetkov I306V, koja je nađena sa učestalošću od 4.4%,

Najčešća mutacija kod pacijenata sa fenilketonurijom u Srbiji je **L48S** sa relativnom frekvencijom 21%. Ovo je najveća ikad prijavljena frekvencija za L48S. Ova mutacija je prvi put prijavljena kod turskog pacijenta (Konecki et al 1991). U narednim studijama, L48S je otkrivena u mnogim evropskim populacijama, ali uvek sa niskom frekvencijom (Bugarska, Rumunija, Češka, Nemačka, Belgija-2%, Hrvatska, Sicilija-5%) (Zschocke 2003; Zschocke et al 2003). Diansani i saradnici su ukazali da je L48S važna mutacija u Južnoj Italiji (12.6%), ali da je njena učestalost u Severnoj Italiji svega 1.5% (Diansani et al 1994). U Turskoj populaciji u Nemačkoj, L48S je nađena na 13.3% mutiranih hromozoma (Aulehla-Scholz i Heilbronner 2003). Ovaj podatak treba uzeti sa određenom rezervom jer se radi o malom i verovatno nereprezentativnom uzorku turske populacije. Iako su Srbi južnoslovenski narod, L48S mutacija je retka mutacija u drugim slovenskim populacijama (Zschocke 2003).

Rastući gradijent od severa ka jugu u frekvenciji L48S mutacije koji je primećen u Italiji, verovatno je posledica kolonizacije pre-istorijske Italije neolitskim farmerima koji su se širili sa Bliskog Istoka (Diansani et al 1994; Zschocke 2003). Poput distribucije u Severnoj Italiji, mutacija L48S u severnim i centralnim slovenskim evropskim populacijama je retka, ukoliko je uopšte prisutna. Činjenica da je L48S nešto češća među južnoslovenskim populacijama (Hrvatska 5%; Srbija 21%) može se objasniti mešanjem pridošlih južnoslovenskih naroda sa starosedelačkim populacijama koje su nastanjivale područje pod uticajem neolitskih migracija od istoka ka zapadu (Diansani et al 1994). Takođe, i u novijoj istoriji, srpska populacija je bila povezana sa turskom i italijanskom populacijom. Ova zapažanja mogu da objasne prisustvo L48S mutacije u Srbiji. Međutim, da bi L48S u Srbiji dostigla tako visoku frekvenciju, verovatno su morali da budu uključeni i dodatni faktori: osnivački efekat, genetički drift ili moguće autohtono srpsko poreklo L48S.

R408W, najčešća mutacija u svim populacijama slovenskog porekla (Estonija 84%; Litvanija 73%), kao i u geografski bliskim populacijama (Mađarska 49%, Rumunija 48%, Hrvatska 37%, Bugarska 35%), u Srbiji je tek druga po učestalosti sa 18% (Eisensmith et al 1992; Kalaydjieva et al 1993; Kasnauskiene et al 2003b; Lillevali et al 1996; Popescu et al 1998; Zschocke et al 2003; Stojiljkovic et al 2006.). Ipak, ova vrednost je znatno veća od učestalosti u mediteranskim populacijama (Španija 0%, Italija 1%) (Diansani et al 1994; Perez et al 1994). Podatak o učestalosti R408W mutacije za Srbiju u skladu je sa opadajućim, od severa ka jugu, gradijentom R408W mutacije asocirane sa slovenskim 2.3 haplotipom (Slika 2) (Eisensmith et al 1995, Tighe et al 2003).

Mutacija **P281L** je u Srbiji detektovana sa učestalošću (9%), koja je slična kao i u nekim drugim balkanskim zemljama (Hrvatska 11%, Grčka 10%) (Baric et al 1994; Traeger-Synodinos 1994; Zschocke et al 2003). Zanimljivo je da se P281L javlja sa sličnom učestalošću još samo u Belgiji (6%), Holandiji (6%) i na Islandu (19%), dok je u ostalim evropskim populacijama njena učestalost veoma niska (0-3%). S obzirom da ova mutacija pogađa CpG ostrvce, postojali su pokušaji da se dokaže multicentrično poreklo, međutim u svim populacijama mutacija je povezana sa haplotipom 1 (Barić et al 1994). Iako za sada ne

postoji jasno objašnjenje, može se pretpostaviti ili da se P281L dva puta nezavisno dogodila na istom haplotipu ili da je efekat osnivača imao značajnu ulogu.

I u slučaju **E390G** mutacije, učestalost u srpskoj populaciji (7.4%) je slična kao u Hrvatskoj (9%) (Zschocke et al 2003), dok je u ostalim evropskim populacijama, iako prisutna, zastupljena sa niskom učestalošću. I u ovom slučaju možemo pretpostaviti da se radi o efektu osnivača.

Mutacija **R261Q** koja se sa umerenom učestalošću (3% - 33%) javlja u mnogim evropskim populacijama i za koju za sada ne postoje logična objašnjenja o distribuciji (Zschocke 2003) i u Srbiji je detektovana sa učestalošću od 6%.



Slika 29. Na karti Evrope prikazane su neke od čestih evropskih mutacija, za koje su poznati migracioni putevi: R408W H2.3 (Estonija 84%), IVS10-11G>A (Turska 32%) i IVS12+1G>A (Danska 37%). Takođe, prikazane su mutacije (L48S, P281L i E390G) koje su se izdvojile visokom učestalošću na Balkanu. (Na osnovu podataka iz Eisensmith et al 1995; Cali et al 1997; Ozguc et al 1993; Zschocke 2003; Stojiljkovic et al 2006).

Tabela 22. Učestalosti mutacija u balkanskim zemljama u odnosu na maksimalnu učestalost u Evropi

	R408W	IVS12+1G>A	IVS10-11G>A
Najveća učestalost u Evropi	84%	37%	32%
Grčka	-	1%	13%
Hrvatska	37%	2.5%	1.3%
Srbija	18%	4.4%	1.5%

Podaci iz Traeger-Synodinos 1994; Zschocke 2003; Zschocke et al 2003; Stojiljkovic et al 2006.

Dok neke od najčešćih evropskih mutacija R408W, IVS12+1G>A i IVS10-11G>A u balkanskim populacijama imaju niske učestalosti u skladu sa migratornim putevima ovih mutacija (Tabela 22; Slika 29), dotle najveću učestalost u Srbiji i Hrvatskoj imaju mutacije, L48S, P281L i E390G, koje su u drugim evropskim populacijama prisutne sa niskom učestalošću (~3%). Možemo pretpostaviti da se migratorni putevi R408W i IVS12+1G>A završavaju a mutacije imaju najmanju učestalost u regionu Balkana, dok migratorni put IVS10-11G>A skoro potpuno zaobilazi Balkansko poluostrvo (Slika 29).

Uzevši u obzir i niske homozigotne vrednosti za lokus *PAH* u Srbiji (0.10) i Hrvatskoj (0.17), karakteristične za populacije koje su pretrpele migracije, očigledno je da je na Balkanu - raskršću puteva, protok gena između populacija ostavio karakterističan pečat.

Učestalost mutacija u genu za PAH koje odgovaraju na terapiju tetrahidrobiopterinom

Od kada su Kure i saradnici opisali pacijente koji su odgovorili na BH4 terapiju, urađen je veliki broj studija o uspešnosti BH4 terapije koja značajno menja kvalitet života pacijenata sa fenilketonurijom (Kure et al 1999). Međutim, ne odgovaraju svi pacijenti na ovu terapiju. Procenjeno je da više od 30% PKU pacijenata uspešno odgovara na terapiju tetrahidrobiopterinom. (Bernegger i Blau 2002). S obzirom da je primećeno da odgovor na terapiju zavisi od mutacija u genu za *PAH*, Zurfluh i saradnici su na osnovu BIOPKU baze podataka, koja sadrži podatke o genotipu pacijenata koji uspešno odgovaraju na BH4 terapiju, klasifikovali mutacije u genu za *PAH* na one koje odgovaraju, one koje ne odgovaraju i one čiji je odgovor nejasan (Zurfluh et al 2008).

Među mutacijama detektovanim u srpskoj populaciji nađeno je 5 mutacija (L48S, E390G, R261Q, R158Q, i R413P) za koje je ranije pokazana povezanost sa odgovorom na terapiju tetrahidrobiopterinom. Na osnovu toga, ukupna učestalost mutacija koje bi potencijalno pozitivno reagovala na BH4 iznosi 40.2% u srpskoj populaciji.

S obzirom da u Srbiji nije dostupan test opterećenja tetrahidrobiopterinom pomoću koga se identifikuju pacijenti kojima bi BH4 terapija bila od koristi, karakterizacija genotipa *PAH* igra važnu ulogu u odabiru pacijenata koji bi mogli da odgovore na BH4 terapiju.

ANALIZA EFEKTA MUTACIJE NA MODULACIJU FENOTIPA

Genotip-fenotip korelacija

Iako je mali broj pacijenata bio uključen u ovu studiju, prisustvo funkcionalno nultih mutacija u različitim genotipovima (funkcionalnim hemizigotima) i homozigota, omogućilo je analizu efekta devet "missense" mutacija (Tabela 23).

Za mutacije koje se retko javljaju u evropskim populacijama, P225T, R297H i R413P, ovo su prvi podaci o njihovom efektu na osnovu genotip-fenotip analize. Ujedno, ovo su i jedini podaci o mutacijama P225T i R297H, obema lociranim u katalitičkom domenu fenilalanin hidrosilaze. Mutacija **P225T** nalazi se na samom početku Ca⁵ spirale. Smatra se da je potrebna za započinjanje spirale i da zamena prolina nekim drugim aminokiselinским ostatkom dovodi do značajne promene u α-spirali. U

skladu sa tim, nije iznenađenje da je P225T povezana sa klasičnom PKU. Nasuprot njoj, mutacija **R297H** ne remeti značajno proteinsku strukturu i zaista dovodi do blage PKU kod pacijenta iz naše studije.

Tabela 23. Efekat mutacija na osnovu analize korelacije genotipa i fenotipa kod jednog homozigota i 19 funkcionalnih hemizigota (Guldborg et al 1998; Kayaalp et al 1997; Pey et al 2007 i PAHdb).

Mutacija	Srpska populacija	Evropske populacije	Rezidualna aktivnost (%)
L48S	Klasična PKU 1/1 homoz. Klasična PKU 6/6	Klasična PKU Umerena PKU* Blaga PKU	39
E390G	Blaga PKU 4/4	Blaga PKU MHP	75
R261Q	Klasična PKU 1/2 Blaga PKU 1/2	Klasična PKU Blaga PKU	51±26
I306V	Blaga PKU 1/1	MHP	39
V177L	Blaga PKU 1/1	MHP	-
P225T	Klasična PKU 2/2	-	-
R252Q	Klasična PKU 1/1	Klasična PKU	2.5
R297H	Blaga PKU 1/1	-	-
R413P	Klasična PKU 1/1	-	35±45

*Umerena PKU je fenotipska kategorija koja se javlja u nekim studijama i predstavlja graničnu kategoriju koja je lakša od klasične PKU a teža od blage PKU.

Mutacija **R413P** se nalazi u tetramerizacionom domenu, u sredini Tβ1 ploče. Prolin koji se nađe na mestu arginina ometa pakovanje tetramerizacionog dela. Ova mutacija je predhodno i okarakterisana u *in vitro* sistemu, gde je pokazana njena rezidualna aktivnost 35±45% (Pey et al 2007), a genotip-fenotip korelacija je pokazala povezanost R413P sa klasičnom PKU.

U slučaju većine ostalih analiziranih mutacija, efekat je bio u skladu sa podacima iz predhodnih genotip-fenotip korelacija i podacima iz *in vitro* analiza. Mutacija **R252Q** je u ovoj, kao i u predhodnim studijama bila asocirana sa klasičnom PKU, što je u skladu sa njenom niskom rezidualnom aktivnošću (2.5%) koja bi trebala da se smatra nultom (Bjorgo et al 1999).

Mutacija **R261Q** je nađena kod pacijenta sa klasičnom PKU, ali i kod pacijenta sa blagom PKU, što je u skladu sa predhodnim podacima za ovu mutaciju i njenom polovičnom rezidualnom aktivnošću (Guldborg et al 1998). Naime, ova mutacija se nalazi u petlji između Cα6 i Cβ2 i bilo koja zamena arginina ometa vodonične veze sa Gln304 i Thr238 koje si bitne za stabilizaciju sekundarne strukture i aktivnog mesta fenilalanin hidroksilaze. Možemo pretpostaviti da prisustvo faktora koji mogu da nadomeste stabilizaciju sekundarne strukture dovodi do varijabilnosti rezidualne aktivnosti ove mutacije, za koju je pokazana rezidualna aktivnost od 51±26% (Pey et al 2003). R261Q mutacija je poznati primer nekonzistentne, nepredvidive mutacije, čiji se efekat menja u prisustvu šaperona (npr. BH4) (Zurfluh et al 2008). Ujedno, ovo je i jedina mutacija u okviru naše studije koja je asocirana sa više od jedne fenotipske kategorije.

Mutacije **E390G**, **I306V** i **V177L** su u našoj studiji bile klasifikovane u blagu PKU kategoriju. Kada se uzme u obzir da su koncentracije fenilalanina u krvi ovih pacijenata bile blizu granice između blage PKU i blage hiperfenilalaninemije (MHP), može se reći da je efekat i ovih mutacija u skladu sa predhodnim studijama u kojima su one okarakterisane kao izuzetno blage, tipične MHP mutacije. Sve tri mutacije nalaze se u katalitičkom domenu PAH, ali na pozicijama koje nisu značajne za strukturu proteina. U *in vitro* sistemima je za E390G pokazana vrlo visoka rezidualna aktivnost - 75%, a za I306V - 39% (Gjetting et al 2001), dok V177L nije ranije analizirana.

Mutacija **L48S** je lokalizovana u regulatornom domenu enzima PAH ali se na osnovu strukture ne može predvideti njen efekat (Erlandsen i Stevens 1999). Ipak, neki autori poziciju 48 karakterišu kao bitnu za strukturu domena u kome se nalazi, iz čega proističe da aminokiselinska zamena doprinosi smanjenju stabilnosti fenilalanin hidrosilaze (Jennings et al 2000). L48S mutacija je predhodno okarakterisana u nekoliko ekspresionih sistema i pokazano je da je njena rezidualna aktivnost 39% (Waters et al 2000). S obzirom na rezultate funkcionalne analize, L48S je klasifikovana kao blaga mutacija. U predhodnim evropskim studijama, L48S je asocirana sa klasičnom, blagom i umerenom fenilketonurijom (Aulehla-Scholz and Heilbronner 2003; Desviat et al 1999; Guldberg et al 1998; Kayaalp et al 1997). Takođe, svi do sada opisani homozigoti su doveli do blage fenilketonurije (Blau and Trefz 2002; Konecki et al 1991; Yildirim et al 2007; Zurfluh et al 2008). Svi dosadašnji podaci ukazuju da je i L48S primer mutacije koja je nekonzistentna i veoma nepredvidiva.

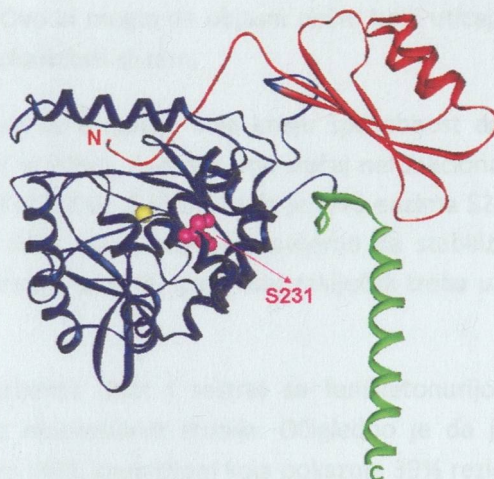
Zato je bilo veoma interesantno što je u studiji o PKU pacijentima iz srpske populacije, L48S u svim kombinacijama sa nultim mutacijama, uvek dovela do klasične fenilketonurije. Čak je i pacijent sa L48S/L48S genotipom imao klasičnu fenilketonuriju što ukazuje na konzistentan efekat L48S mutacije u srpskoj populaciji.

U genotipovima pacijenata sa klasičnom PKU, L48S se našla i u kombinaciji sa "missense" mutacijama: R261Q, R158Q i S231F. U ovakvim genotipovima ne može da se analizira pojedinačni efekat mutacija jer ne postoji način da se odredi koliko koja mutacija doprinosi. Međutim, među "missense" mutacijama, efekat S231F mutacije, ranije nije bio proučavan u *in vitro* sistemima. S obzirom da ranije nije zabeleženo u kakvom genotipu se našla i do kakvog fenotipa je to dovelo, o ovoj mutaciji ne postoje nikakvi podaci o efektu. Iz tog razloga odlučili smo se da analiziramo efekat S231F mutacije u *in vitro* sistemima. Takođe, ukoliko bi se pokazalo da se i kod ovog pacijenta ukupan fenotip zasniva samo na efektu L48S mutacije (S231F efekat je jednak nuli), konzistentno težak efekat L48S mutacije u srpskoj populaciji bio bi potvrđen.

In vitro funkcionalna karakterizacija S231F PAH

Ovo je prva studija u kojoj je analiziran efekat S231F PAH mutacije. Radi funkcionalne karakterizacije, protein S231F PAH eksprimiran je u hepatoma i bakterijskim ćelijama pokazujući da je S231F zaista patogena mutacija. S obzirom da efekat mutacije može da varira u različitim prokariotskim, eukariotskim sistemima i *in vivo*, usled pojačavanja ili prigušivanja foldinga i defekta u stabilnosti u okviru različitih sistema (Waters et al 2006), bitno je istaći da su rezultati u svim sistemima bili uniformni.

Mutacija p.S231F (c.692C>T; TCT/TTT) nalazi se u katalitičkom domenu proteina PAH (Slika 30). Promena iz polarne nearomatične hidroksilne grupe (serin) u nepolarnu aromatičnu (fenilalanin) na datoj poziciji remeti vodonične veze sa Leu242 i sugerije distorziju Cα5 heliksa.



Slika 30. Trakasti (ribbon) dijagram monomere fenilalanin hidroksilaze čoveka koji oslikava poziciju amino kiseline S231 (u CPK reprezentaciji). Proteinski model konstruisan je na način koji je opisan u radu Perez et al 2005. Monomerna struktura obojena je prema domenskoj organizaciji (regulatorni : crveno, katalitički: plavo i tetramerizacioni: zeleno).

Efekat deformisane strukture na enzimsku aktivnost određivan je *in vitro*. Utvrdili smo da je specifična aktivnost S231F PAH oko 1% u odnosu na wtPAH. Takođe, stepen aktivacije je ukazao da mutirani protein ima poremećenu aktivaciju fenilalaninom. Ova pojava je česta kod PAH mutanata (Pey et al 2004; Perez et al 2005) i oslikava defekt u strukturi.

Za neke mutacije, prisustvo šaperona *in vitro*, poboljšava savijanje proteina čija je struktura poremećena i kao rezultat povećava njegovu rezidualnu aktivnost. GroEL i GroES asistiraju u savijanju polipeptida tako što delimično odvijaju nefunkcionalne proteinske konformacije i one tako izmiču degradaciji i ponovo ulaze u proces savijanja. (Feldman et al 2000). Posledica porasta količine šaperona je povećanje funkcionalnih proteinskih konformacija. U slučaju V388M, koekspresija šaperona jasno pomera oligomerni profil u smeru dominacije frakcije tetramera i oko dva puta povećava rezidualnu katalitičku aktivnost (Gamez et al 2000). Međutim, istovremena prekomerna ekspresija šaperona GroEL i GroES nije uspeła da poveća prinos S231F PAH niti da spasi njegovu specifičnu aktivnost. Nemogućnost da se „pomogne“ mutaciji pri savijanju predhodno je pokazana u slučaju teških mutacija Y277D, E280K, L311P and IVS10-11g>a PAH (Pey et al 2003).

Prinos fuzionog proteina S231F MBP-PAH nakon prečišćavanja značajno je manji u odnosu na wtPAH. Ovo opažanje potvrđeno je i u hepatoma ćelijama, gde je steady-state nivo transfekovanog mutiranog S231F PAH oko 10% u odnosu na wtPAH.

S obzirom da BH4 poseduje protektivni efekat sličan šaperonskom na strukturu PAH, tako što stabilizuje PAH i sprečava proteolitičku degradaciju (Perez et al 2005), proučavali smo efekat BH4 na S231F u hepatoma ćelijama. Kada su ćelije bile inkubirane sa sepiapterinom, steady-state nivo mutiranog proteina neznatno je porastao (25%) sugerišući pozitivan efekat BH4 na stabilizaciju S231F mutacije. U hepatoma ćelijama moramo da uzmemo u obzir prisustvo endogenog wtPAH koji bi mogao da interaguje sa transfekovanim proteinom. Ovo bi moglo da objasni nešto bolji uticaj šaperona na mutiranu PAH u eukariotskom u odnosu na u prokariotski sistem.

Iako je generalno prihvaćeno da su mutacije koje imaju sposobnost da odgovaraju na terapiju BH4 parcijalno aktivne (Erlandsen et al 2004), ovo nije prvi slučaj nefunkcionalnog alela PAH na koji je BH4 ispoljio pozitivan efekat (Kim et al 2006). S obzirom da je nivo enzima S231F PAH u hepatoma ćelijama kojima je dodat sepiapterin i dalje nizak, predpostavljamo da stabilizacioni uticaj BH4 ne bi imao fiziološki značaj u kontekstu terapije sa BH4. Ipak, ovaj zaključak treba uzeti sa rezervom s obzirom na odsustvo *in vivo* potvrde.

Kliničke karakteristike dva pacijenta (brat i sestra) sa fenilketonurijom koji nose S231F mutaciju upoređene su sa podacima iz ekspresionih studija. Očigledno je da je S231F asocirana sa teškim fenotipom čak i u kombinaciji sa L48S, mutacijom koja pokazuje 39% rezidualnu enzimsku aktivnost. Na taj način, pokazali smo slaganje rezultata iz *in vitro* i *in vivo* studija.

Druga mutacija, identifikovana u istom kodonu, ali koja uzrokuje zamenu u drugačiju amino kiselinu, S231P (serin u prolin; c.692T>C; TCT/CCT), pokazala je kompletan gubitak enzimске aktivnosti (Dianzani et al 1995). S obzirom na ranije opisanu filogenetsku konzerviranost amino kiselinske pozicije S231 (Hennermann et al 2000), možemo zaključiti da serin na datoj poziciji igra važnu ulogu u strukturnom očuvanju arhitekture proteina PAH.

U našoj studiji su dobijeni prvi podaci o efektu mutacije S231F. Svi prikazani rezultati pokazuju da bi retka, predhodno neokarakterisana mutacija S231F, trebala da bude klasifikovana kao „funkcionalno nulta“. S obzirom da je mutacija S231F koja dovodi do kompletnog gubitka funkcije, može da se koristiti kao alatka u budućim genotim-fenotip korelacionim studijama kod pacijenata sa fenilketonurijom.

U skladu sa novim podacima o efektu S231F mutacije, zaključili smo da sama L48S mutacija i kod pacijenata sa L48S/S231F genotipom dovodi do klasične fenilketonurije. S obzirom da je i u ovom slučaju pokazano da L48S dovodi do istog – klasičnog PKU fenotipa, potvrđeno je opažanje o konzistentnom efektu L48S mutacije u srpskoj populaciji.

Pošto se radi i o najčešćoj mutaciji u srpskoj populaciji koja je u ostalim evropskim populacijama relativno retka, predpostavili smo da je moguće da se L48S kod svih analiziranih pacijenata nalazi u istom genetskom okruženju (potencijalno autohtono poreklo). U tom slučaju, konzistentan fenotipski efekat L48S mutacije u Srbiji mogao bi da bude u vezi sa dodatnim promenama u okviru gena PAH koji modifikuju njegovu ekspresiju. Da bismo analizirali genetičko okruženje L48S mutacije, odredili smo haplotipove na kojima se L48S nalazi kod pacijenata obolelih od fenilketonurije u srpskoj populaciji.

POLIMORFIZMI U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU KAO POPULACIONO-GENETIČKI MARKERI

Kao što je već rečeno, prisustvo L48S mutacije u srpskoj populaciji, može biti objašnjeno mešanjem južnoslovenskih naroda sa starosedelačkim populacijama koje su nastanjivale područje pod uticajem neolitskih migracija od istoka ka zapadu, od Turske ka Italiji (Dianzani et al 1994). Međutim, visoka frekvencija L48S, najviša ikad prijavljena za neku populaciju (Zschocke et al 2003; PAH baza podataka), mora biti objašnjena dodatnim faktorima, kao što su efekat osnivača, genetički drift ili možda autohtono, nezavisno poreklo L48S mutacije u srpskoj populaciji.

Treba spomenuti da je u slučaju drugih bolesti opisana povezanost određenog haplotipa sa specifičnom kliničkom slikom bolesti. Dobro poznat primer su pacijenti sa β -talasemijom i srpastom anemijom kod kojih se visok nivo γ -globinske genske ekspresije i time visok nivo fetalnog hemoglobina javlja u jasnoj korelaciji sa specifičnim haplotipom (Labie et al 1985).

Da bismo otkrili da li su visoka učestalost kao i konzistentni fenotipski efekat L48S mutacije u srpskoj populaciji posledica njenog ponovnog nezavisno nastanka u karakterističnom genetičkom okruženju na ovim geografskim prostorima, analizirali smo polimorfizme u genu za *PAH*. Tako su polimorfizmi gena za *PAH*, koji formiraju ekstenzivni haplotip, po prvi put korišćeni kao markeri genetičkih varijacija u srpskoj populaciji. Sem informacije o poreklu mutacije, polimorfni *PAH* haplotipovi, mogu da ukažu i na protog gena među populacijama i njihova migratorna kretanja.

Prema dosadašnjim podacima iz PAH baze podataka, L48S mutacija je nađena na haplotipu 3 (sa nepoznatim VNTR brojem), haplotipu 4.3, haplotipu 16.3 i haplotipu 28.3. Navedeni haplotipovi su u 3' delu gena za *PAH* identični, dok razlike u po jednom RFLP mestu postoje u 5' delu gena za *PAH* (Tabela 24). Jedan od mogućih mehanizama formiranja različitih haplotipova je intragenski kros-over (Okano et al 1990). U slučaju haplotipova 3 i 4 postoji i hipoteza da su evoluirali od istog predačkog haplotipa (Lichter-Konecki et al 1994).

Tabela 24. Razlika u RFLP mestima između jedinih *PAH* haplotipova koji su asocirani sa L48S mutacijom - prema podacima iz sveobuhvatne lokus specifične baze podataka o genu za *PAH* (PAHdb).

	<i>Bgl</i> II (intron1)	<i>Pvu</i> IIa (intron2)	<i>Pvu</i> IIb (intron3)	<i>Eco</i> RI (intron5)	<i>Msp</i> I (intron7)	<i>Xmn</i> I (intron8)	<i>Eco</i> RV (3' kraja)
3	-	+	-	+	-	+	-
4	-	+	-	+	-	+	+
16	-	+	-	+	-	-	+
28	-	+	-	-	-	+	+

Povezanost L48S sa različitim haplotipovima nije podjednaka, ona se daleko najčešće nalazi na **haplotipu 4.3**. Asocijacija sa H 4.3 pokazana je u većini evropskih populacija: italijanskoj, turskoj, moravskoj, engleskoj, škotskoj, nemačkoj, španskoj i drugim (Aulehla-Scholz za PAHdb 1999; Kozak za PAHdb 1995; Perez et al 1994; Tyfield et al 1997; Zschocke i Hoffman 1999). L48S je takođe opisana na haplotipu 4 kod jugoslovenskog PKU pacijenta kome je postavljena dijagnoza u Nemačkoj.

L48S je takođe nađena na **haplotipu 3** kod jednog turskog pacijenta u Nemačkoj (Konecki et al 1991) i kod jednog italijanskog pacijenta u Belgiji (Michiels za PAHdb 1995).

L48S je samo jednom prijavljena na **haplotipu 28.3** (Romano et al 1994). U ovoj studiji, L48S je detektovana na jednom H 4.3 i na jednom H 28.3 hromozomu, kao i na još jednom hromozoma sa neidentifikovanim haplotipom.

Takođe kod jednog pacijenta hrvatskog porekla, L48S je nađena na **haplotipu 16.3** (Aulehla-Scholz, communication to PAHdb, 1999).

U okviru ove studije, analizirali smo *BgIII*, *PvuIIa*, *PvuIIb*, *EcoRI*, *MspI*, *XmnI* i VNTR-ove kod 9 pacijenata sa klasičnom fenilketonurijom iz srpske populacije. Haplotipska analiza pokazala je asociranost mutacije L48S sa haplotipovima 4.3 i 28.3 kod pacijenata sa fenilketonurijom iz srpske populacije. Haplotip 4.3, koji je prevalentan širom Evrope, razlikuje se od haplotipa 28.3 samo na *EcoRI* polimorfnom mestu. Visoka heterozigotnost upravo ovog polimorfnog mesta, *EcoRI* (Slika 21), odraz je pomešanosti haplotipova 4.3 i 28.3 u srpskoj populaciji. Šta više i kod pacijenta koji je homozigot za L48S detektovana su dva različita haplotipa, 4.3 i 28.3 (Tabela 20).

Jedan jedinstveni haplotip povezan sa L48S sugerisao bi nezavisno, srpsko poreklo L48S mutacije. Čak i u slučaju dominacije nekog od haplotipova koji su u evropskim populacijama retko asocirani sa L48S, mogli bismo da spekuliramo da su visoka frekvencija i dominacija retkog haplotipa odraz autohtonog srpskog porekla. Međutim, u srpskoj, kao i u evropskim populacijama, H 4.3 je daleko zastupljeniji (70%).

S obzirom da su u srpskoj populaciji detektovana dva različita, predhodno opisana haplotipa, smatramo da L48S nije nastala *de novo* u srpskoj populaciji i da je u procesu migracija uneta u srpsku populaciju iz populacija sa različitim genetičkim osnovama (turske i italijanske) posle čega je doživela ekspanziju.

Interesantno je da u našoj populaciji nije pronađena povezanost L48S mutacije sa haplotipom 16.3 prijavljenim kod hrvatskog pacijenta. Takođe, s obzirom da je analiza *EcoRV* polimorfnog mesta morala da bude isključena jer njegova precizna pozicija nije poznata, nismo mogli da odredimo razliku između haplotipova 3 i 4. S obzirom na daleko veću zastupljenost haplotipa 4 i pokazanu asocijaciju sa L48S kod pacijenta iz Jugoslavije, odlučili smo se da nalaz *BgIII* -, *PvuIIa* +, *PvuII* -, *EcoRI* +, *MspI* -, *XmnI* +, VNTR 3, preliminarno označimo sa H 4.3. Da se ispostavila povezanost L48S samo sa ovakvim haplotipom, bilo bi potrebno analizirati i *EcoRV* mesto Southern metodom. Pošto je analiza šest RFLP mesta pokazala povezanost sa dva različita haplotipa i omogućila donošenje zaključka da je više od jednog haplotipa povezano sa L48S mutacijom u srpskoj populaciji, nije bilo potrebe za dodatnom analizom *EcoRV* mesta. Ovo ostavlja mogućnost da je neki od haplotipova 4, zapravo haplotip 3 i da je heterogenost PAH haplotipova u srpskoj populaciji još i veća.

S obzirom da nismo potvrdili povezanost L48S mutacije sa jedinstvenim genetičkim okruženjem lokusa za PAH, smatramo da konzistentno teški efekat L48S mutacije u srpskoj populaciji nije posledica polimorfizama u okviru gena za PAH. Međutim, ne isključujemo mogućnost da bi polimorfizmi u nezavisnim genima modifikatorima, kao što su geni odgovorni za apsorpcija fenilalanina u digestivnom

traktu, efektivnost unosa fenilalanina u jetru, transport preko krvno-moždane barijere i drugi, mogli da utiču na konzistentan efekat L48S mutacije u srpskoj populaciji.

S druge strane ideja o RFLP polimorfizmima u intronima koji bi potencijalno mogli da budu regulatori ekspresije gena za *PAH* (Scriver i Waters 1999) i doprinesu razumevanju kompleksog fenotipa PKU, privukla su našu pažnju.

POLIMORFIZMI U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU KAO REGULATORI GENSKE EKSPRESIJE

U izradi ovog rada želeli smo da istražimo da li je neki od polimorfizama, koji inače obrazuju ekstenzivni haplotip gena za *PAH*, uključen u regulaciju njegove ekspresije. Nakon *in silico* predikcije u okviru koje su analizirane obe bialelske varijante šest polimorfnih mesta, pažnju nam je privukao *Xmnl* polimorfizam, lociran 67 kb nizvodno od +1, kao jedini za koji je predikcija pokazala vezivanje transkripcionog faktora.

EMSA analiza fragmenta dužine 41 bp koji sadži *Xmnl* polimorfno mesto i njegovo neposredno okruženje, potvrdila je da bi DNK sekvenca mogla biti novi regulatorni *cis*-element lociran u osmom intronu gena za *PAH*. EMSA analiza obe bialelske varijante dala je iste rezultate, ukazujući da promena jednog nukleotida ne utiče na sposobnost DNK segmenta da veže transkripcioni faktor. Ako se evropske populacije posmatraju zajedno, očekivana heterozigotnost *Xmnl* polimorfizma iznosi 0.49, kako u populaciji bolesnih, tako i zdravih (ALFRED database; Goltsov et al 1992c), što nije različito od vrednosti za srpsku populaciju koja iznosi 0.47 dobijene u ovom istraživanju. Ovako visoka očekivana heterozigotnost *Xmnl* polimorfizma je u skladu sa odsustvom razlike između C/G i A/T *Xmnl* probe u interakciji sa jedarnim proteinima.

In silico analiza, kompeticioni eseji i superšift analiza pokazali su specifičnu interakciju odabranog regiona sa GATA-1 transkripcionim faktorom, a South-Western analiza pokazala je prisustvo GATA-1 proteina u HepG2 ćelijama. Takođe, povećanje CAT aktivnosti 3.8 puta u odnosu na bazalnu, pokazala je da *Xmnl cis* -element dovodi do aktivacije ekspresije gena za *PAH* u humanom hepatoma *in vitro* ćelijskom sistemu.

Analizirana intronska sekvenca sadrži transkripcioni regulatorni element koji vezuje GATA-1 transkripcioni faktor i dovodi do povećanja nivoa ekspresije gena za *PAH*. Na prvi pogled, povezanost gena za *PAH* predodređenog za ekspresiju u jetri sa GATA-1 transkripcionim faktorom čija je uloga u regulaciji transkripcije gena u jetri čoveka malo je poznata, delovala je neobično. GATA-1 pripada familiji transkripcionih faktora sa dva konzervirana cink finger DNK-vezujuća domena (Evans i Felsenfeld 1989). On je obilno eksprimiran i reguliše transkripciju mnogih gena uključenih u ćelijski ciklus kod eritroidnih ćelija (Tsai et al 1989). Međutim, jedan od novijih radova ukazao je na uključenost GATA-1 transkripcionog faktora u regulaciju ekspresije *HFE* gena – odgovornog za hereditarnu hemohromatozu. *HFE* gen sadrži osam GATA-1 regulatornih elemenata koji su neophodni za njegovu maksimalnu transkripcionu aktivnost u jetri (Mura et al 2004). Takođe, pokazano je da GATA-1 ima esencijalnu ulogu u ekspresiji *ERCC1* gena u humanim hepatoma ćelijama (Andrieux et al 2007). U ovom radu pokazan je još jedan primer uključenosti GATA-1 transkripcionog faktora u regulaciju ekspresije gena u humanim hepatoma ćelijama.

Dokazano je i intenzivno specifično vezivanje jedarnih proteina iz K562 ćelijske linije za regulatorni element lociran u osmom intronu gena za *PAH*, a razlika koja se primećuje u kompleksima formiranim sa HepG2 i K562 jedarnim proteinima može se objasniti različitom količinom i sastavom transkripcionih faktora u ove dve ćelijske linije. S obzirom na postojanje bazalne ekspresije gena za *PAH* u limfocitima, K562 eritroleukemičnim ćelijama i ćelijama iz horionskih vilusa (Sarkar i Sommer 1989) mogli bismo da pretpostavimo da upravo *XmnI* *cis*-regulatorno mesto, uz njegovu specifičnost za GATA-1 transkripcioni faktor i dodatne tkivno-specifične faktore koji interaguju sa GATA-1, omogućavaju ekspresiju gena za *PAH* izvan jetre.

Kao što su pokazali eksperimenti genske terapije koji se zasnivaju na unošenju funkcionalnog gena u heterologa tkiva (mišićno i T-ćelije), fenilalanin hidrosilaza je aktivna uvek kada je prisutan i BH4 kofaktor (Ding et al 2008; Harding et al 1998; Lin et al 1997). Lin i saradnici su na T-limfocitima izolovanim iz krvi dece sa klasičnom fenilketonurijom, pokazali da ove ćelije sadrže malu količinu biopterina (potrebnog za sintezu BH4) i značajnu DHPR aktivnost (potrebnu za regeneraciju BH4). Takođe, pokazano je da su T-limfociti sposobni da efikasno unesu fenilalanin i izbace produkovani tirozin (Lin et al 1997). Iako je nivo ekspresije gena za *PAH* u limfocitima vrlo nizak, mogli bismo da pretpostavimo da ektopična ekspresija u limfocitima predstavlja jedan od mnogih faktora koji doprinose fenotipu PKU. Kao što je otkriće ekspresije u bubrežima objasnilo poremećaj hidrosilacije fenilalanina kod bubrežnih bolesnika (Lichter-Konecki et al 1999), moguće je da će otkriće pojačivača ekspresije gena za *PAH* baciti novo svetlo na ekspresiju u limfocitima i njen uticaj na homeostazu fenilalanina u organizmu.

Ovo je prvo istraživanje koje je pokazalo da intronski region u koji ulazi poznato polimorfno mesto može imati ulogu u regulaciji ekspresije gena za *PAH*. Takođe, ovaj rad doprinosi razumevanju do sada nepoznatih fenomena koji mogu biti uključeni u nastanak kompleksnog fenotipa PKU.

MUTACIJE I POLIMORFIZMI U GENU ZA FENILALANIN HIDROKSILAZU I GENIMA MODIFIKATORIMA DOVODE DO KOMPLEKSNOG FENOTIPA PKU

Kao što je u ovom radu pokazano, promene u genu za *PAH* dovode do promene strukture i funkcije fenilalanin hidrosilaze, kao i do promene u genskoj ekspresiji. Kada se izmenjena količina mutiranog proteina nađe u kontekstu sredine bogate varijabilnošću, kako unutar same ćelije (prisustvo i aktivnost šaperona i proteaza, biosintetski balans), tako i na nivou organizma (karakteristike apsorpcije, transporta i potrošnje fenilalanina) dolazi do varijacija u fenotipu koje su na osnovu sadašnjih znanja manje ili više predvidive. U mnogim slučajevima dovoljno je znati genotip *PAH* pa da se uz kontrolisanu ishranu postigne predviđeni efekat. Međutim, u slučajevima kada osnovni defekt – mutacija u genu za *PAH* ne dovodi do ekstremnih efekata, prisustvo dodatnih faktora dovodi do finih, ponekad nepredvidivih varijacija u fenotipu. Istraživanja gena modifikatora – gena koji kontrolišu sistem kvaliteta unutar ćelije i fiziološke procese unutar organizma koji su značajni za fenilalanin i fenilalanin hidrosilazu, doprineće objašnjenju heterogenosti fenotipske ekspresije. Grupe pacijenata u kojima je primećen fenotip posebnih karakteristika mogu igrati značajnu ulogu u otkrivanju i analizi novih gena modifikatora.

Naizgled komplikovan fenotip postaće jasan kada jednom budu okarakterisani svi mogući uticaji. Kada sem informacije o dve mutacije koje dovode do razvoja bolesti, budu dostupne informacije o svim polimorfizmima u genu za *PAH* i u genima modifikatorima, kao i informacije o međusobnim interakcijama, biće moguće da se u svakodnevnoj medicinskoj praksi, na osnovu genetičkih informacija, u svim slučajevima i sa velikom preciznošću predvidi fenotip pacijenta i primeni individualna terapija. Još je dug put pred naučnicima koji se bave fenilketonurijom do personalizovane medicine i genske terapije ove bolesti.

ZAKLJUČCI

ZAKLJUČCI

1. Ovakvim je istraživanjem potvrđeno da postoji veza između svih promena u genu za fenilalanin hidroksilazu sa fenilketonurijom kod stanovništva u Srbiji, pri čemu je postignut nivo detekcije od 97%. Izvedena hipoteza je da mutacije gena za PAM ima značaj za postavljanje preciznije dijagnostičke slike kod osoba sa fenilketonurijom i otvara mogućnost za odabir pacijenata kojima bi koristilo izražavanje terapeutske terapije.
2. U ovoj studiji je identifikovano 15 mutacija u genu za fenilalanin hidroksilazu koje dovode do različitih bolesti. Podaci o mutacijama imaju važnu ulogu u kliničkoj praksi poštovanja i tretiranja bolesnika (www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC381919/).
3. Najčešća mutacija u srpskoj populaciji je L485 sa procentom učestalosti od 21%, najmanje učestalosti imaju mutacije u jednoj populaciji.
4. Pet najčešćih mutacija (L485, R413P, P231L, S390C i P261C) predstavlja 60% svih mutiranih alela u srpskoj populaciji.
5. Homozigotna vrednost lokusa PAM (0.19), kao i genotipska homozigotnost (0.82%) su niske i ukazuju na heterozigotnost molekularne osnovne fenilketonurije u srpskoj populaciji, što odlikava brojne nacionalne dokumentovane migracije, uključujući različite populacije u ovom delu balkanske polupuvale, kao i pokazuje da se srpski genotip deli sa susednim narodima.
6. Po prvi put na osnovu korelacije genotipa i fenotipa, mutacije P225T, R413P su okarakterisane kao benigni, dok mutacije L485, najčešća mutacija u srpskoj populaciji, kao i mutacije R252Q, R261C, kao i mutacije S390C, imaju negativan efekat. Na osnovu se podaci iz prethodnih genotip-fenotip korelacija podstiču da se vrši analiza.
7. Funkcionalna analiza dodatno karakterizirane S231F mutacije potvrdila je da se radi o mutaciji koja je uzrok fenilketonurije. Funkcionalna aktivnost S231F PAM je izuzetno niska (3%). Karakteristični isporoni (G91L/G103S) namiru efekat, dok isporoni (R914) pokazuju slab efekat na stabilizaciju, narušavaju proteolitičku aktivnost.
8. Mutacija S231F je vezana među funkcionalno mutirane mutacije i promovišana kao sredstvo za studije korelacije genotipa i fenotipa kod pacijenata sa fenilketonurijom.
9. Kod pacijenata sa klasičnom fenilketonurijom iz srpske populacije, L485 je identifikovana na homozigotnom 4.3 (70%) i 25.3 (20%), s obzirom da su u srpskoj populaciji detektovane dva različita, prethodno opisana mutacija, smatrajući da L485 nije nastala de novo u srpskoj populaciji, da je u procesu migracije uneta u srpsku populaciju iz populacije sa različitim genotipom, odnosno može biti je došlo do ekspanzije (efekat osnivača ili genetički drift).
10. U ovoj studiji istraženo je za fenilalanin hidroksilazu utrojeno je povećanje transkripcionog regulatornog elementa koji vezuje GATA-1 transkripcioni faktor i funkcioniše kao enhanser. Ovo je prvi put na koji region u okviru introna gena za PAM, pokazano da je regulatorni transkripcioni element.

1. Osmišljena je strategija i optimizovane su metode za detekciju svih promena u genu za fenilalanin hidroksilazu pacijenata obolelih od fenilketonurije u Srbiji, pri čemu je postignut nivo detekcije od 97%. Uvedena molekularna dijagnostika gena za *PAH* ima značaj za postavljanje preciznije dijagnoze, planiranje dijetetskog režima, genetičko savetovanje i otvara mogućnost za odabir pacijenata kojima bi koristila terapija tetrahidrobiopterinom.
2. U ovoj studiji je identifikovano 19 mutacija u genu za fenilalanin hidroksilazu koje dovode do razvoja bolesti. Podaci o mutacijama uneti su u nacionalnu bazu podataka o mutacijama (www.goldenhelix.org/serbian/).
3. Najčešća mutacija u srpskoj populaciji je L48S sa relativnom učestalošću od 21%, najvišom ikada detektovanom u jednoj populaciji.
4. Pet najčešćih mutacija (L48S, R408W, P281L, E390G i R261Q) predstavlja 60% svih mutiranih alela u srpskoj populaciji.
5. Homozigotna vrednost lokusa *PAH* (0.10), kao i genotipska homozigotnost (8.82%) su niske i ukazuju na heterogenost molekularne osnove fenilketonurije u srpskoj populaciji, što oslikava brojne istorijski dokumentovane migracije, suživot različitih populacija u ovom delu balkanskog poluostrva, kao i potvrdu da se protok gena dešavao između populacija.
6. Po prvi put, na osnovu korelacije genotipa i fenotipa, mutacije P225T, R413P su okarakterisane kao teške, a R297H kao blaga. Mutacija L48S, najčešća mutacija u srpskoj populaciji, nedvosmisleno je okarakterisana kao teška. U slučaju većine ostalih mutacija (R252Q, R261Q, E390G, I306V i V177L) efekat je bio u skladu sa podacima iz predhodnih genotip-fenotip korelacija i podacima iz *in vitro* analiza.
7. Funkcionalna analiza dosad neokarakterisane S231F mutacije potvrdila je da se radi o mutaciji koja je uzrok fenilketonurije. Rezidualna aktivnost S231F *PAH* je izuzetno niska (1%). Prokariotski šaperoni (GroEL/GroES) nemaju efekat, dok eukariotski šaperon (BH4) pokazuje slab efekat na stabilizaciju narušene proteinske strukture.
8. Mutacija S231F je svrstana među funkcionalno nulte mutacije i promovisana kao sredstvo za studije korelacije genotipa i fenotipa kod pacijenata sa fenilketonurijom.
9. Kod pacijenata sa klasičnom fenilketonurijom iz srpske populacije, L48S je identifikovana na haplotipovima 4.3 (70%) i 28.3 (20%). S obzirom da su u srpskoj populaciji detektovana dva različita, predhodno opisana haplotipa, smatramo da L48S nije nastala *de novo* u srpskoj populaciji i da je u procesu migracija uneta u srpsku populaciju iz populacija sa različitim genetičkim osnovama posle čega je doživela ekspanziju (efekat osnivača ili genetički drift).
10. U osmom intronu gena za fenilalanin hidroksilazu utvrđeno je postojanje transkripcionog regulatornog elementa koji vezuje GATA-1 transkripcioni faktor i funkcioniše kao enhanser. Ovo je prvi put da je za neki region u okviru introna gena za *PAH*, pokazano da je regulatorni transkripcioni element.

Abramo V et al (1992) Illegitimate translocation of the phenylalanine hydroxylase gene to lymphocytes for identification of mutations in phenylketonuria. *Hum Mol Genet* 2 (1): 31-4.

Abramo ES and Stanton VP Jr (1990) Use of denaturing gradient gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. *Methods Enzymol* 212: 95-104.

Agudo C et al (2000) Analysis of the effect of tetrahydrobiopterin on PAH gene expression in hepatoma cells. *FEBS Letters* 530: 3687-3700.

Allen LA et al (1999) Measurement of phenylalanine and tyrosine in plasma by high-performance liquid chromatography using the inherent fluorescence of aromatic amino acids. *Ann Clin Biochem* 36 (Pt 2): 207-11.

Anderson DA and Hammett P (2002) High-resolution crystal structures of the catalytic domain of human phenylalanine in the catalytically active (II) atom form and binary complex with tetrahydrobiopterin. *J Mol Biol* 314: 279-291.

Anderson DA et al (2002) Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-hydroxy-1-ethyl)-5-hydroxytryptophan, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *J Mol Biol* 320: 109-1108.

Andrews LC et al (2007) GATA-1 is Essential in EGF-Mediated Induction of Nucleotide Excision Repair Activity and Tumor Suppression through ERK2 in Human Hepatoma Cells. *Cancer Res* 67 (13): 2114.

LITERATURA

Beckwith G et al (2002) Mutational spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mut. Mutation in Brief* 587 Online.

Boigard S et al (1990) A single origin of phenylketonuria in Yemenite Jews. *Nature* 344: 168-70.

Boric F et al (1994) Geographical distribution of the R281L mutation at the phenylalanine hydroxylase locus: possible origin in Southeastern Europe. *J Inher Metab Dis* 17:375-7.

Balman H and Mencer TL (1982) Morphologic and histochemical observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol* 58: 55.

Bernegger C and Blum H (2002) High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,319 patients observed from 1988 to 2002. *Mol Genet Metab* 72: 304-313.

Bent S et al (1997) Mutational effects on inclusion body formation. In: Richards FM, Eisenberg DF, Kim PS, eds. *Advances in protein chemistry 50: protein misassembly*. New York: Academic Press, p 243-264.

Björkel C et al (1954) Influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuric child. *Acta Paediatr* 43:64.

- Abadie V et al (1993) Illegitimate transcription of the phenylalanine hydroxylase gene in lymphocytes for identification of mutations in phenylketonuria. *Hum Mol Genet* 2 (1): 31-4.
- Abrams ES and Stanton VP Jr (1992) Use of denaturing gradient gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. *Methods Enzymol* 212: 71-104
- Aguado C et al (2006) Analysis of the effect of tetrahydrobiopterin on PAH gene expression in hepatoma cells. *FEBS Letters* 580: 1697-1701.
- Allen KR et al (1999) Measurement of phenylalanine and tyrosine in plasma by high-performance liquid chromatography using the inherent fluorescence of aromatic amino acids. *Ann Clin Biochem* 36 (Pt 2): 207-11.
- Anderson OA and Flatmark T (2001) High resolution crystal structures of the catalytic domain of human phenylalanine in the catalytically active Fe (II) atom form and binary complex with tetrahydrobiopterin. *J Mol Biol* 314: 279-291.
- Anderson OA et al (2002) Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *J Mol Biol* 320: 1095-1108.
- Andrieux LO et al (2007) GATA-1 Is Essential in EGF-Mediated Induction of Nucleotide Excision Repair Activity and ERCC1 Expression through ERK2 in Human Hepatoma Cells. *Cancer Res* 67: (5): 2114.
- Aulehla-Scholz C and Heilbronner H (2003) Mutational spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mut: Mutation in Brief* #587 Online.
- Avigad S et al (1990) A single origin of phenylketonuria in Yemenite Jews. *Nature* 344: 168-70.
- Barić I et al (1994) Geographical distribution of the P281L mutation at the phenylalanine hydroxylase locus: possible origin in Southeastern Europe. *J Inher Metab Dis* 17:376-7.
- Bauman ML and Kemper TL (1982) Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol* 58: 55.
- Bernegger C and Blau N (2002) High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002. *Mol Genet Metab* 77: 304-313.
- Betts S et al (1997) Mutational effects on inclusion body formation. In: Richards FM, Eisenberg DF, Kim PS, eds. *Advances in protein chemistry* 50: protein misassembly. New York: Academic Press. p 243–264.
- Bickel H et al (1954) Influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuric child. *Acta Paediatr* 43:64.

- Bjorgo E et al (1998) Partial characterization and three-dimensional structural localization of eight mutations in exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene associated with phenylketonuria. *Eur J Biochem* 257 (1): 1-10.
- Blau N and Erlandsen H (2004) The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 82:101-111.
- Blau N and Trefz FK (2002) Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: Possible regulation of gene expression in a patient with homozygous L48S mutation. *Mol Genet Metab* 75: 186-187.
- Boshart M et al (1992) Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene* 110: 129-130.
- Bowden JA and Mc Arthur CL (1972) Possible biochemical model for phenylketonuria. *Nature* 235: 230.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bristeau A et al (2001) Conserved as well as divergent regulatory elements account for expression of the human and rodent phenylalanine hydroxylase genes. *Gene* 274: 283-291.
- Bross P et al (1999) Protein misfolding and degradation in genetic diseases. *Hum Mutat* 14:186-198.
- Budowle B et al (2000) DNA typing protocols: Molecular biology and forensic analysis. Natick: Eaton Publishing. p117-8.
- Burton BK et al (2007) The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. *J Inher Metab Dis* 30: 700-707.
- Cali F et al (1997) The STR252 – IVS10nt546 – VNTR7 phenylalanine hydroxylase minihaplotype in five Mediterranean samples. *Hum Genet* 100: 350-355.
- Chakraborty et al (1987) Polymorphic DNA haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase locus and their relationship with phenylketonuria. *Hum Genet* 76: 40-46.
- Cohen SN et al (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci* 69: 2110.
- Daiger SP et al (1989) Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus in European families with phenylketonuria (PKU). *Am J Hum Genet* 45: 310-318.
- Danks DM et al (1978) Malignant hyperphenylalaninemia - current status (June 1977). *J Inher Metab Dis* 1: 49-53.
- Desviat LR et al (1999) Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet* 7: 386-392.

- Devi et al (1998) Amplification of phenylalanine hydroxylase and cystathionine beta-synthase transcripts in human peripheral lymphocytes by RT-PCR. *Biochem Mol Biol Int* 45 (4): 643-650.
- Dianzani I et al (1994) Genetic history of phenylketonuria mutations in Italy. *Am J Hum Genet* 55:851-853.
- Dianzani I et al (1995) Novel Missense Mutation in the Phenylalanine Hydroxylase Gene Leading to Complete Loss of Enzymatic Activity. *Hum Mutat* 6:247-249.
- DiLella AG et al (1986) Molecular Structure and Polymorphic Map of the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Biochemistry* 25: 743-749.
- Ding Z et al (2008) Correction of murine PKU following AAV mediated intramuscular expression of a complete phenylalanine hydroxylating system. *Mol Ther* 16: 673-681.
- Dipple KM and McCabe ERB (2000) Phenotypes of patients with "simple" mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers and system dynamics. *Am J Hum Genet* 66: 1729-1735.
- Donlon J et al (2008) Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In: Valle D, Beaudet A, Vogelstein B, Kinzler K, Antonarakis S, Ballabio A, eds.; Scriver CR, Childs B, Sly WS, emeritus eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. Chapter 77. Online. <http://genetics.accessmedicine.com>.
- Dworniczak B et al (1991a) PCR detection of the Pvull (Ea) RFLP at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Nucleic Acids Res* 19: 1958.
- Dworniczak B et al (1991b) PCR detection of the BglII RFLP at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Nucleic Acids Res* 19: 1958.
- Eiken HG et al (1991) Amplification of natural and amplification created sites for diagnosis of PKU mutations. *Nucleic Acids Res* 19 (7): 1427-30.
- Eiken HG et al (1993) Restriction enzyme-based assays for complete genotyping of phenylketonuria patients. *Dev Brain Dysfunct* 1993: 6:53-59.
- Eisensmith RC et al (1992) Multiple Origins for Phenylketonuria in Europe. *Am J Hum Genet* 51: 1355-1365.
- Eisensmith RC and Woo SL (1992) Updated Listing of Haplotypes at the Human Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Locus. *Am J Hum Genet* 51: 1445-1448.
- Eisensmith RC et al (1994) A simple, rapid, and highly informative pcr-based procedure for prenatal diagnosis and carrier screening of phenylketonuria. *Prenat Diagn* 14(12): 1113-8.
- Eisensmith RC et al (1995) Recurrence of the R408W Mutation in the Phenylalanine Hydroxylase Locus in Europeans. *Am J Hum Genet* 56: 278-286.

- Erlandsen H et al (1997) Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nature Struct Biol* 4:995–1000.
- Erlandsen H and Stevens RC (1999) The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 68:103–125.
- Erlandsen H et al (2000) Crystal structure and site-specific mutagenesis of pterin-bound human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 39: 2208–2217.
- Erlandsen H et al (2004) Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16903–16908.
- Evans T and Felsenfeld G (1989) The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell* 58: 877–85.
- Feldman DE and Frydman J (2000) Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones. *Curr Opin Struct Biol* 10:26–33.
- Fiege B and Blau N (2007) Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria. *J Pediatr* 150: 627–630.
- Folling A (1934) Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillitat. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 277:169–176.
- Fried MG and Crothers DM (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrilamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 9: 6505 - 6521.
- Fusetti F et al (1998) Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem* 273:16962–16967.
- Gamez A et al (2000) Expression analysis of phenylketonuria mutations. *J Biol Chem* 275(38): 29737–29742.
- Garrod AE (1902) The incidence of alkaptonuria. A study in chemical individuality. *Lancet* 2:1616–1620.
- Garrod AE (1909) Inborn errors of metabolism. The Croonian Lectures delivered before the Royal College of Physicians in London in June 1908. London. Henry Frowde; Hodder and Stoughton. Oxford University Press. Reprinted in Harris H. 1963. Garrod's Inborn Errors of Metabolism. Reprinted with a supplement. Oxford Monographs on Medical Genetics. London: Oxford University Press. pp ix, 207.
- Gjetting T et al (2001) *In Vitro* Expression of 34 Naturally Occurring Mutant Variants of Phenylalanine Hydroxylase: Correlation with Metabolic Phenotypes and Susceptibility toward Protein Aggregation. *Mol Genet Metab* 72: 132–143.
- Goltsov AA et al (1992a) Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Am J Hum Genet* 51: 627–636.

- Goltsov AA et al (1992b) Detection of the PvuII (b) RFLP at the human PAH locus by PCR. *Nucleic Acids Res* 20: 927.
- Goltsov AA et al (1992c) Detection of the XmnI RFLP at the human PAH locus by PCR. *Nucleic Acids Res* 20: 927.
- Goltsov AA et al (1993) A single polymorphic STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene permits rapid prenatal diagnosis and carrier screening for phenylketonuria. *Hum Mol Genet* 2(5): 577-81.
- Goosens M et al (1983) Prenatal diagnosis of sickle cell anemia in the first trimester of pregnancy. *N Engl J Med* 309: 831.
- Greeves LG et al (2000) Effect of genotype on changes in intelligence quotient after dietary relaxation in phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia. *Arch Dis Child* 82: 216-221.
- Gregersen N et al (2001) The role of chaperone-assisted folding and quality control in inborn errors of metabolism: Protein folding disorders. *J Inher Metab Dis* 24 (2): 189-212.
- Gregory DM et al (1986) Plasma free amino acid values in normal children and adolescents. *Metabolism* 35: 967.
- Guldberg P and Guttler F (1994) "Broad-range" DGGE for single-step mutation scanning of entire genes: the human phenylalanine hydroxylase gene. *Nucleic Acids Res* 22 (5): 880-881.
- Guldberg et al (1995) Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. *J Med Genet* 32 (12): 976-978.
- Guldberg P (1996) Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the maternal PKU collaborative study. *Am J Hum Genet* 59: 84-94.
- Guldberg P et al (1998) A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet* 63: 71-79.
- Guthrie R and Susi A (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32:318-343.
- Güttler F and Guldberg P (2000) Mutation analysis anticipates dietary requirements in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159: S150-S153.
- Harding CO et al (1998) Metabolic engineering as therapy for inborn errors of metabolism-development of mice with phenylalanine hydroxylase expression in muscle. *Gene Ther* 5: 677-683.
- Heinemeyer T et al (1998) Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 26 (1) : 362-367.

- Hennermann JB et al (2000) Phenylketonuria and Hyperphenylalaninemia in Eastern Germany: A Characteristic Molecular Profile and 15 Novel Mutations. *Hum Mutat* 15:254-260.
- Hoeks MP et al (2009) Adult issues in phenylketonuria. *Neth J Med* 67 (1):2-7.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.
- Ivaschenko T and Baranov VS (1993) Rapid and efficient PCR/Styl test for identification of common mutation R408W in phenylketonuria patients. *J Med Genet* 30: 153-4.
- Jennings IG et al (2000) Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids in identifying genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Eur J Hum Genet* 8: 683-696.
- Jennings IG et al (2001) Essential role of the N-terminal autoregulatory sequence in the regulation of phenylalanine hydroxylase. *FEBS Letters* 488: 196-200.
- Jervis GA (1953) Phenylpyruvic oligophrenia: deficiency of phenylalanine oxidizing system. *Proc Soc Exp Biol Med* 82:514.
- Kalaydjieva L et al (1993) Population genetics of phenylketonuria in Bulgaria. *Dev Brain Dysfunct* 6:39–54.
- Kamkar et al (2003) Report of VNTR with 13 Repeats Linked to Phenylalanine Hydroxylase Locus in Unaffected Members of Two PKU Families. *Iran Biomed J* 7(2): 89-90.
- Kapust RB and Waugh DS. 1999. Escherichia coli maltose binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 8:1668–1674.
- Kasnauskiene J et al (2003a) Validation of PAH genotype-based predictions of metabolic phenylalanine hydroxylase deficiency phenotype: investigation of PKU/MHP patients from Lithuania. *Med Sci Monit* 9(3): CR142-6.
- Kasnauskiene J et al (2003b) The molecular basis of phenylketonuria in Lithuania. *Hum Mutat* 21:398.
- Kaufman S (1963) The structure of phenylalanine hydroxylation cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50: 1085–1093.
- Kaufman S (1975) Studies on the mechanism of phenylalanine hydroxylase: Detection of an intermediate. In: Pfeleiderer W, ed. *Chemistry and Biology of Pteridines*. New York: Walter de Gruyter. p291.
- Kaufman S (1976) Phenylketonuria: Biochemical mechanisms. *Adv Neurochem* 2: 1
- Kaufman S et al (1962) The source of oxygen in the phenylalanine hydroxylase and the dopamine- β -hydroxylase catalyzed reaction. *Biochem Biophys Res Acta* 9: 497.

- Kaufman S (1993) The Phenylalanine Hydroxylating System. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 67:77-264.
- Kayaalp E et al (1997) Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: A metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 61: 1309-1317.
- Kidd JR et al (2000) Haplotypes and linkage disequilibrium at the phenylalanine hydroxylase locus, PAH, in a global representation of populations. *Am J Hum Genet* 66: 1882-1899.
- Kim SW et al (2006) Structural and functional analyses of mutations of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Clin Chim Acta* 365: 279-297.
- Knappskog PM et al (1995) The PKU mutation S349P causes complete loss of catalytic activity in the recombinant phenylalanine hydroxylase enzyme. *Hum Genet* 95:171-173.
- Knappskog PM (1996) Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase: Effect of terminal deletions on the oligomerization, activation and cooperativity of substrate binding to the enzyme. *Eur J Biochem* 242: 813-821.
- Kobe B (1999) Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nature Struct Biol* 6: 442-448.
- Koch R et al (2005) Tetrahydrobiopterin and maternal PKU. *Mol Genet Metab* 86 : S139-S141.
- Koeppel RA et al (1990) Use of [¹⁴C] aminocyclohexane carboxylate for the measurement of amino acid uptake and distribution volume in human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 727.
- Konecki DS et al (1991) The identification of two mis-sense mutations at the PAH gene locus in a Turkish patient with phenylketonuria. *Hum Genet* 87(4): 389-393.
- Konecki DS et al (1992) Structural characterisation of the 5' region of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 31: 8363-8.
- Kozak L et al (2006) Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement. *Mol Genet Metab* 89:300-309.
- Krausen W et al (1985) Biochemical and neurophysiological effects of elevated plasma phenylalanine in patients with treated phenylketonuria. *J Clin Invest* 75: 40.
- Kure S et al (1999) Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 135: 375-378.
- Kwok SCM et al (1985) Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 24: 556-561.

Labie et al (1985) Common haplotype dependency of high G gamma-globin gene expression and high Hb F levels in beta-thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2111-2114.

Leandro J et al (2006) Co-expression of different subunits of human phenylalanine hydroxylase: Evidence of negative interallelic complementation. *Biochim Biophys Acta* 1762: 544-550.

Ledley FD et al (1985) Gene transfer and expression of human phenylalanine hydroxylase. *Science* 228: 77-79.

Ledley FD et al (1987) Biochemical characterisation of recombinant human phenylalanine hydroxylase produced in *E. coli*. *J Biol Chem* 262: 2228-2233.

Lee DH et al (2004) The molecular basis of phenylketonuria in Koreans. *J Hum Genet* 49: 617-21.

Lee PJ et al (2003) Maternal phenylketonuria: experiences from the United Kingdom. *Pediatrics* 112:1553-6.

Lei X and Kaufman S (1998) Identification of hepatic nuclear factor 1 binding sites in the 5' flanking region of the human phenylalanine hydroxylase gene: Implication of a dual function of phenylalanine hydroxylase stimulator in the phenylalanine hydroxylation system. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1500.

Levy HL et al (2003) Pregnancy experiences in the woman with mild hyperphenylalaninemia, *Pediatrics* 112: 1548-1556.

Levy HL et al (2007) Efficacy of sapropterin dihydrochloride tetrahydrobiopterin, 6RBH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. *Lancet* 370: 504-510.

Lichter-Konecki U et al (1994) DNA sequence polymorphisms in exonic and intronic regions of the human phenylalanine hydroxylase gene aid in the identification of alleles. *Hum Genet* 94(3): 307-10.

Lichter-Konecki U et al (1999) Human Phenylalanine Hydroxylase Gene Expression in Kidney and Other Nonhepatic Tissues. *Mol Genet Metab* 67: 308-316.

Lidsky AS et al (1985a) Extensive restriction site polymorphism at the human phenylalanine hydroxylase locus and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Am J Hum Genet* 37:619-634.

Lidsky AS et al (1985b) Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 (18): 6221-6225.

Lillevali H et al (1996) Phenylalanine hydroxylase gene mutation R408W is present on 84% of Estonian phenylketonuria chromosomes. *Eur J Hum Genet* 4:296-300.

Lin CM et al (1997) Expression of human phenylalanine hydroxylase activity in T lymphocytes of classical phenylketonuria children by retroviral-mediated gene transfer. *J Inher Metab Dis* 20: 742-754.

- Luckow B and Schutz G (1987) CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 15 (13): 5490.
- Maniatis T et al (1989) *Molecular cloning*. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Lab. pp6.3-6.13.
- Martinez A et al (1995) Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. *Biochem J* 306: 589-597.
- Matalon R et al (2004) Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med* 6: 27-32.
- Meryman HT (1963) Preservation of living cells. *Fed Proc* 22: 81-89.
- Michael N (1988) The DNA-binding properties of the major regulatory protein 4 of Herpes simplex viruses. *Science* 239: 1531-1533.
- Moller N et al (2000) The kidney is an important site for in vivo phenylalanine-to-tyrosine conversion in adult humans: A metabolic role of the kidney. *PNAS* 97: 1242-1246.
- Momma S et al (1987) Phenylalanine transport across the blood-brain barrier as studied with the *in situ* brain perfusion technique. *J Neurochem* 48: 1291.
- Mura C et al (2004) Transcriptional regulation of the human HFE gene indicates high liver expression and erythropoiesis coregulation. *FASEB J* 18: 1922-4.
- Murthy LI and Berry HK (1975) Phenylalanine hydroxylase activity in liver from humans and subhuman primates: its probable absence in kidney. *Biochem Med* 12: 392-397.
- National Institutes of Health Consensus Development Panel (2001) National institutes of health consensus development conference statement: phenylketonuria: screening and management. *Pediatrics* 108: 972-82.
- Okano Y et al (1990) Recurrent mutation at the human phenylalanine hydroxylase gene. *Am J Hum Genet* 46: 919-24.
- Okano Y et al (1994) Molecular characterization of phenylketonuric mutations in Japanese by analysis of phenylalanine hydroxylase mRNA from lymphoblasts. *Hum Mol Genet* 3 (4):659.
- Ozguc M (1993) Mutation analysis in Turkish phenylketonuria patients. *J Med Genet* 30: 129-130.
- Pavlovic S et al (2004) Characterization of transcription factors binding to -120 gata motif of rat β_b^{miny} – globin promoter. *Acta Vet*
- Penrose LS and Quastel JH (1937) Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem J* 31:266-271.
- Pérez B et al (1994) Spectrum and origin of phenylketonuria mutations in Spain. *Acta Paediatr Suppl* 407: 34-36.

- Pérez B et al (2005) Kinetic and stability analysis of PKU mutations identified in BH₄-responsive patients. *Mol Genet Metabol* 86: S11-6.
- Pey AL et al (2003) Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat* 21: 370-378.
- Pey AL et al (2004) Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum Mutat* 24: 388-399.
- Pey AL et al (2007) Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *Am J Hum Genet* 81:1006-1024.
- Popescu T et al (1998) Mutation spectrum and phenylalanine hydroxylase RFLP/VNTR background in 44 Romanian phenylketonuric alleles. *Hum Mutat* 12(5): 314-9.
- Poznanić J (2004) Karakterizacija mutacija u genu za fenilalanin hidroksilazu kod pacijenata sa fenilketonurijom i hiperfenilalaninemijom u Srbiji. Beograd: Biološki fakultet.
- Pronin N et al (2003) The molecular basis of phenylketonuria in Latvia. *Hum Mutat* 21(4):398-9.
- Pruzina S et al (1991) Hypersensitive site 4 of the human β globin locus control region. *Nucleic Acids Res.* 19: 1413-1418.
- Radojković D and Kušić J (2000) Silver staining of DGGE gels. *Clin Chem* 46: 883.
- Rampini S et al (1974) Aromatic acid in urin of healthy infants, persistent hyperphenylalaninemia and phenylketonuria, before and after phenylalanine load. *Pediatr Res* 8: 704.
- Ramus et al (1992) Illegitimate transcription of phenylalanine hydroxylase for detection of mutations in patients with phenylketonuria. *Hum Mutat* 1 (2):154.
- Ristić M (1979) Hematologija za III i IV razred medicinske škole. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. p242-243.
- Rivera I et al (1998) Population genetics of hyperphenylalaninemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *J Med Genet* 35: 301-4.
- Robson KJH et al (1982) Polysome immunoprecipitation of phenylalanine hydroxylase mRNA from rat liver and cloning of its cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4701-4705.
- Romano V et al (1994) Association between haplotypes, HindIII-VNTR alleles and mutations at the PAH locus in Sicily. *Acta Pediatr Suppl* 407: 39-40.
- Romano et al (1996) PAH deficiency in Italy: correlation of genotype with phenotype in the Sicilian population. *J Inherit Metab Dis* 19 (1): 15-24.

- Sanger F et al (1977) DNA sequencing with dideoxynucleotide terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-7.
- Sarkar G and Sommer SS (1989) Access to a messenger RNA sequence or its protein product is not limited by tissue or species specificity. *Science* 244 (4902): 331-4.
- Sarkissian CN et al (2009) What we know that could influence future treatment of phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 32: 3-9.
- Schlotterer C and Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 20:211-215.
- Schreiber E et al (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17 (15): 6419.
- Scriber CR and Rosenberg LE (1973) *Amino Acid Metabolism and Its Disorders*. Philadelphia: WB Saunders. p40.
- Scriber CR et al (1985) Normal plasma free amino acid values in adults: The influence of some common physiological variables. *Metabolism* 34: 868.
- Scriber CR (1998) Commentary on: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, by Robert Guthrie and Ada Susi, *Pediatrics* 1963; 32318-43. *Pediatrics* (S): 236-7.
- Scriber CR and Waters PJ (1999) Monogenic traits are not simple. *Trends Genet* 15: 267-272.
- Scriber et al (2000) PAHdb: a locus-specific knowledgebase. *Hum Mutat* 15:99-104.
- Scriber CR and Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriber CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill. 1667-1724.
- Scriber CR et al (2003) PAHdb 2003: What a locus-specific knowledgebase can do. *Hum Mutat* 21: 333-344.
- Scriber CR (2007) The PAH Gene, Phenylketonuria and a Paradigm Shift. *Hum Mutat* 28(9): 831-845.
- Shannon JR et al (1973) Freezing, storage and recovery of cell stocks. *Tissue Culture Methods and Application*. New York: Academic Press Inc. p112 - 718.
- Solstad T et al (2003) Studies on the regulatory properties of the pterin cofactor and dopamine bound at the active site of human phenylalanine hydroxylase. *Eur J Biochem* 270: 981-990.
- Song F et al (2005) Phenylketonuria mutations in Northern China. *Molec Genet Metab* 86: S107-S118.

- Stojiljkovic M et al (2006) Molecular and phenotypic characteristics of phenylketonuria patients in Serbia and Montenegro. *Clin Genet* 70: 151-155.
- Strachan T and Read AP (1999) *Human Molecular Genetics*. Second Edition. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd. Chapter 8.
- Takahashi K et al (1992) Novel phenylketonuria mutation detected by analysis of ectopically transcribed phenylalanine hydroxylase mRNA from lymphoblast. *Lancet* 340 (8833): 1473.
- Tessari P et al (1999) Phenylalanine hydroxylation across the kidney in humans. *Kidney Int* 56: 2168-2172.
- Tighe O et al (2003) Genetic diversity within the R408W phenylketonuria mutation lineages in Europe. *Hum Mutat* 21: 387-393.
- Traeger-Synodinos J et al (1994) Preliminary mutation analysis in the phenylalanine hydroxylase gene in Greek PKU and HPA patients. *Hum Genet* 94: 573-575.
- Trefz FK et al (1985) Differential diagnosis and significance of various hyperphenylalaninurias. In: Bickel H, Wachtel U, eds. *Inherited Diseases of Amino Acid Metabolism*. Stuttgart: Thieme, p86-100.
- Trefz FK et al (2009a) Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Pediatr* 154 (5): 700-707.
- Trefz FK et al (2009b) Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 32 (1): 22-6.
- Tsai SF (1989) Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339: 446-51.
- Tyfield LA et al (1997) Sequence variation at the phenylalanine hydroxylase gene in the British Isles. *Am J Hum Genet* 60 (2): 388-396.
- Venter JC et al (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- Wall L (1988) The human β -globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes & Dev*. 2: 1089 - 1100.
- Wang Y et al (1992) Tissue- and Development-specific Expression of the Human Phenylalanine Hydroxylase/Chloramphenicol Acetyltransferase Fusion Gene in Transgenic Mice. *J Biol Chem* 267(21): 15105-15110.
- Wang Y et al (1994) Functional Characterization of A Unique Liver Gene Promoter. 269(12): 9137-9146.

Waters PJ (1999) Missense mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) can cause accelerated proteolytic turnover of PAH enzyme: a mechanism underlying phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 22:208–212.

Waters PJ et al (2000) Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. *Mol Genet Metab* 69: 101-110.

Waters PJ (2001) Degradation of mutant proteins, underlying "loss of function" phenotypes, plays a major role in genetic disease. *Curr Issues Mol Biol* 3:57–65.

Waters PJ (2003) How PAH Gene Mutations Cause Hyper-phenylalaninemia and Why Mechanism Matters: Insights From In Vitro Expression *Hum Mutat* 21:357-369.

Waters PJ (2006) Molecular bases of phenylketonuria: insights from functional studies *in vitro*. In: Blau N, ed. PKU and BH₄: advances in phenylketonuria and tetrahydrobiopterin. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft, p277-310.

Weber JL and Wong C (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 2: 1123-1128.

Wedemeyer N et al (1991) PCR detection of the MspI (Aa) RFLP at the human phenylalanine (PAH) locus. *Nucleic Acids Res* 19: 1959.

Weglage J et al (2002) Individual blood-brain barrier phenylalanine transport in siblings with classical phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 25: 431-436.

Weiss KM (1996) Is There a Paradigm Shift in Genetics? Lessons from the Study of Human Diseases. *Mol Phylogenet Evol* 5(1):259-265.

Weiss KM and Buchanan AV (2003) Evolution by phenotype: a biomedical perspective. *Perspect Biol Med* 46 (2): 159-82.

Wickner S et al (1999) Posttranslational Quality Control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286:1888–1893.

Woo SLC et al (1983) Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature* 306: 151–155.

Yildirim S et al (2007) Assessment of tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish hyperphenylalaninemic patients. *Turk J Pediatr* 49: 1-6.

Young GA and Parsons FM (1973) Impairment of phenylalanine hydroxylation in chronic renal insufficiency. *Clin Sci Mol Med* 45:89–97.

Young VR and Pellett PL (1987) Protein intake and requirements with reference to diet and health. *Am J Clin Nutr* 45:1323.

Zhou C et al (1990) Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* 8: 172 - 173.

Zschocke J et al (1994) The STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene: true fragment length obtained with fluorescent labelled PCR primers. *Acta Paediatr Suppl* 407: 41-2.

Zschocke J et al (1995) Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: a rapid stepwise approach. *Am J Hum Genet* 57(6): 1311-7.

Zschocke J and Hoffmann GF (1999) Phenylketonuria mutations in Germany. *Hum Genet* 104: 390-398.

Zschocke J (2003) Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat* 21: 345-356.

Zschocke J et al (2003) The molecular basis of phenylalanine hydroxylase deficiency in Croatia *Hum Mutat: Mutation in Brief* #586 Online.

Zurflüh MR et al (2008) Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 29(1): 167-175.

Zygulska M et al (1994) Phenylketonuria in southern Poland: a new splice mutation in intron 9 at the PAH locus. *Hum Mutat* 4: 297-299.

ELEKTRONSKE BAZE PODATAKA

Allele FREquency Database: <http://www.alfred.med.yale.edu/>

Enzyme Commission: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

Human Genetics in Lithuania: <http://www.geneticahumana.lt/>

Human Genome Variation Society: <http://www.hgvs.org/>

The Serbian National Mutation Frequency Database: <http://www.goldenhelix.org/serbian/>

Online Mendelian Inheritance in Man: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>

PAH Mutation Database: <http://www.pahdb.mcgill.ca/>

Универзитет у Београду
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА ФИЗИОЛОГИЈУ И БИОХЕМИЈУ
БИБЛИОТЕКА

Инв. бр. 50117
БЕОГРАД



