

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Kristel M. Klaassen

**UTICAJ VARIJANTI U KODIRAJUĆIM I
NEKODIRAJUĆIM REGIONIMA GENA
UZROČNIKA I GENA MODIFIKATORA NA
FENOTIP PACIJENATA SA
HIPERFENILALANINEMIJOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Kristel M. Klaassen

**IMPACT OF VARIANTS IN CODING AND
NONCODING REGIONS OF DISEASE-CAUSING
AND MODIFIER GENES ON PHENOTYPE OF
PATIENTS WITH HYPERPHENYLALANINEMIA**

Doctoral Dissertation

Beolgrade, 2015

MENTORI

dr Maja Stojiljković, naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Sonja Pavlović, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

dr Dušanka Savić Pavićević, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Brajušković, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Belén Pérez González, vanredni profesor

Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares,
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”,
Autonomni Univerzitet u Madridu

Datum odbrane: _____2015. godine

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu.

Najveću zahvalnost dugujem svojim mentorima, dr Sonji Pavlović i dr Maji Stojiljković.

Zahvaljujem se dr Sonji Pavlović na pruženoj šansi da se bavim naukom. Hvala na posvećenom vremenu, hvala na savetima i motivaciji. Hvala na nepresušnoj energiji koja je omogućavala da i kada je teško, uvek idem dalje. Vaša upornost me je naučila da nikada ne odustajem.

Ogromnu zahvalnost dugujem dr Maji Stojiljković, koja je bila uz mene od mojih prvih naučnih koraka pa sve do poslednjih napisanih reči ove teze. Hvala na podršci i pomoći, hvala na strpljenju, hvala na svim prijateljskim savetima, kao i na veri da uvek mogu više i bolje. Majo, hvala ti na svemu što si me naučila i podstakla da sama naučim. Hvala, jer sam uz tebe i tvoj rad zavolela metaboličke bolesti i Španiju, koji su mi omogućili da odsanjam svoje naučne snove, i da napišem ovu tezu.

Dr Dušanki Savić Pavićević sam zahvalna na podršci i saradnji koju sam imala tokom doktorskih studija, a najveću zahvalnost dugujem na dragocenim savetima prilikom pisanja doktorske disertacije i na oceni ovog rada.

Dr Goranu Brajuškoviću hvala na korisnim savetima i oceni ovog rada.

Veliko hvala svim članovima Lab 01. Drage moje ZMZGirls (and boys), hvala na divnom vremenu koje ste podelili sa mnom u toku izrade ove teze. Hvala na razgovorima, kako naučnim tako i zabavnim, na druženju i atmosferi.

Posebno bih želela da se zahvalim Sanji, Nikoli i Biljani. Hvala vam na svemu, na svojoj pomoći u laboratoriji i van nje, na nesebičnoj podršci kakva se retko sreće na radnom mestu. Hvala vam što ste uvek bili tu za mene kad je trebalo. Srećna sam jer vas imam ne samo za kolege, već i za iskrene prijatelje za ceo život.

Veliku zahvalnost dugujem Branki, od koje sam naučila mnogo o svemu, još od svog prvog dana u laboratoriji. Hvala na podršci, savetima i motivaciji. Hvala Goci na mudrim savetima, kako naučnim, tako i životnim. Hvala Dori, Mileni, Nataši, Vesni i Tanji na korisnim savetima i na pomoći u eksperimentalno radu. Hvala Nikoli Novčiću

na pomoći oko VNTR. Hvala Ireni, Peđi, Mladenu, Aniti, Miši, Marini i Ani na svojoj pomoći, ali najviše hvala na divnoj atmosferi, kafama i druženju. Hvala vam što ste rad učinili lepim i prijatnim.

Veliko hvala kolegama sa IMGGI. Hvala vam što ste uvek imali vremena za moja pitanja. Bez vašeg znanja i ogromne pomoći realizacija ove teze bila bi teža. Posebno hvala mojim kolegamicama i drugaricama Sandri, Dragani, Dani, Vlandi i Jeleni, kao i kumi Mini na svom divnom vremenu koje smo provele zajedno, kako na Institutu, tako i van njega.

Bez saradnje sa Insitutom za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije ''Dr Vukan Čupić'' ovaj rad ne bi bio moguć. Zato veliku zahvalnost dugujem dr Maji Đorđević, dr Adrijanu Sarajliji i dr Božici Kecman.

Delovi ove doktorske disertacije su realizovani u toku mog boravka u Laboratoriji za molekularnu osnovu genetičkih bolesti u okviru Centra za molekularnu biologiju ''Severo Ochoa'' u Madridu. Hvala 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. Belén, muchisimas gracias por todo tu apoyo! Takođe sam zahvalna svim članovima laboratorije koji su učinili da moj boravak u Španiji bude nezaboravno i neponovljivo naučno i životno iskustvo.

Veliku zahvalnost dugujem dr Radetu Drmancu i njegovom timu iz Complete Genomics na pomoći oko analize uzoraka. Takođe, hvala Nađi, Bojani i Jeleni na nesebičnoj pomoći oko tumačenja NGS rezultata.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima. Mojim prijateljima hvala na iskrenoj ljubavi i podršci, bez vas nikada ne bih uspela. Hvala mom Milutinu, mom osloncu i najvećoj podršci. Hvala ti na beskrajnom razumevanju, strpljenju i ljubavi. Hvala dedu Đurađu na ljubavi i velikoj podršci na koju sam uvek mogla da računam. Hvala i moj mami, mom anđelu koji me čuva, iako nije ovde da sa mnom proslavi sve moje uspehe. Mojoj baki Dari, kojoj i posvećujem ovaj doktorat, hvala na nesebičnoj ljubavi. Hvala što si me naučila pravim vrednostima u životu.

Uticaj varijanti u kodirajućim i nekodirajućim regionima gena uzročnika i gena modifikatora na fenotip pacijenata sa hiperfenilalaninemijom

REZIME

Hiperfenilalaninemija (HPA) predstavlja najčešći nasledni poremećaj metabolizma aminokiselina (učestalost 1:10 000) koji se karakteriše povišenim nivoom fenilalanina u krvi. Višak fenilalanina ima toksičan efekat na razvoj mozga, i ukoliko se pravovremeno ne uvede odgovarajuća terapija, dolazi do teške i ireverzibilne mentalne retardacije pacijenta. U oko 98% slučajeva, HPA je uzrokovana mutacijama u genu za fenilalanin hidroksilazu (*PAH*) i tada je poremećaj poznat kao fenilketonurija (PKU). U 1-2% slučajeva HPA je posledica deficijencije esencijalnog kofaktora enzima PAH, tetrahidrobiopterina (BH4), koja nastaje usled mutacija u genima odgovornim za biosintezu (gen za piruvoil tetrahidropterin sintazu – *PTS* i gen za GTP ciklohidrolazu – *GCHI*) ili metabolizam BH4 (gen za dihidropteridin reduktazu – *QDPR* i gen za pterin-4a-karbinolamin dehidratazu, *PCBD*). S obzirom na ozbiljne i ireverzibilne posledice koje HPA izaziva, od presudne važnosti je precizno postavljanje dijagnoze i što ranija primena odgovarajuće terapije. U Srbiji je molekularno genetička karakterizacija gena *PAH* uvedena 2004. godine, međutim, neophodno je uspostaviti dodatne metode radi sveobuhvatne identifikacije i funkcionalne karakterizacije varijanti identifikovanih u različitim genima uzročnicima HPA. Ovakav pristup imao bi značajnu primenu za diferencijalnu dijagnostiku pacijenata sa HPA u Srbiji i pravovremeno uvođenje odgovarajuće terapije specifične za genotip pacijenta. U slučaju fenilketonurije, iako mutirani genotip *PAH* predstavlja glavnu odrednicu PKU fenotipa, primećeno je da nije uvek moguće predvideti fenotip samo na osnovu genotipa. Smatra se da genetički faktori koji doprinose razvoju finalnog PKU fenotipa (posebno kognitivnog PKU fenotipa) još uvek nisu dovoljno istraženi. Stoga bi identifikacija novih intra-genskih (npr., novih elementa uključenih u regulaciju transkripcije) modulatora PKU fenotipa, kao i novih gena modifikatora doprinela njegovom boljem razumevanju.

U prvom delu ovog istraživanja je izvršena sveobuhvatna molekularna karakterizacija varijanti u genima uzročnicima kod 76 pacijenata sa HPA u Srbiji. Primenom DNK sekvenciranja kompletnog kodirajućeg regiona gena *PAH*, egzon-intron granica, promotorskog regiona, kao i primenom MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) metode, detektovano je 29 poznatih i 1 nova mutacija. Po prvi put je kod pacijenta iz Srbije detektovana velika delecija (c.510-?_706+?del), i to sa učestalošću od 1,33%. Osim toga, optimizovana je metoda za detekciju mutacija u genu *PTS* (DNK sekvenciranje kompletnog kodirajućeg regiona), zaduženom za biosintezu BH₄, i tom prilikom je kod jednog pacijenta detektovana mutacija p.Asp136Val, u homozigotnom stanju. Ovo je prvi slučaj BH₄ deficijencije u Srbiji, koji je identifikovan zahvaljujući primeni molekularne genetike i uvođenju metoda za detekciju mutacija u genu *PTS*. Učestalost deficijencije *PTS* u analiziranoj grupi HPA pacijenata iznosi 1,31%. Zahvaljujući kombinovanju različitih metoda, postignut je nivo detekcije mutacija od čak 99,34% za HPA u Srbiji, a na osnovu spektra detektovanih mutacija je konstruisan dijagnostički algoritam za Srbiju, koji omogućava bržu, lakšu i pristupačniju detekciju mutacija u genima uzročnicima HPA. Dalje je, na osnovu genotipa analiziranih PKU pacijenata, izvršena i predikcija korisnosti nove suplementacione terapije sa BH₄. Uočeno je da bi 32% pacijenata sa PKU iz Srbije najverovatnije imalo koristi od primene terapije sa BH₄, dok maksimalan procenat pacijenata koji bi mogli imati koristi od ovog novog leka iznosi 79%.

U drugom delu ovog istraživanja je izvršena funkcionalna analiza novootkrivene aminokiselinske zamene p.Gln226Lys PAH (c.676C>A). U *in vitro* hepatoma sistemu je pokazano da količina mutiranog p.Gln226Lys PAH-FLAG detektovanih Western blot metodom, iznosi samo 1,2% u odnosu na nemutirani PAH-FLAG. Dodavanje sepiapterina, intraćelijskog prekursora BH₄ koji ima protektivnu šaperonsku ulogu, nije značajno povećalo količinu mutiranog proteina. Stoga je zaključeno da je p.Gln226Lys patološka mutacija, koja pritom ne odgovara na suplementaciju sa BH₄.

U trećem delu ovog istraživanja je izvršena identifikacija i funkcionalna karakterizacija novih transkripcionih regulatora u nekodirajućim regionima gena *PAH*. U funkcionalnoj CAT esej analizi je pokazano da deo promotora gena *PAH* koji sadrži citozin na poziciji -170 (koji odgovara nemutiranoj sekvenci) funkcioniše kao novi *cis*-

regulatorni element koji dovodi do smanjenja nivoa transkripcije, i to za 50% manje u odnosu na kontrolni plazmid sa bazalnom promotorskom aktivnošću. Dalje je u EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) *supershift* esejima pokazano da ovaj regulatorni element vezuje KLF1 transkripcioni faktor. Osim toga, izvršena je i funkcionalna analiza VNTR regiona u 3' kraju gena *PAH*, pri čemu je pokazano da VNTR region, nezavisno od tipa ponovaka, predstavlja novi regulatorni element, koji dovodi do smanjenja intenziteta transkripcije, i dovodi do oko 60% smanjenja reporterske aktivnosti u odnosu na kontrolni plazmid sa bazalnom promotorskom aktivnošću. U EMSA *supershift* esejima je pokazano da tip ponovka koji je najčešći kod PKU pacijenata u Srbiji, VNTR3, vezuje C/EBP alpha transkripcioni faktor. Dva nova transkripciona regulatorna elementa, identifikovana u nekodirajućim regionima, konkretno promotorskom i 3' regionu gena *PAH*, doprinose razumevanju fine regulacije *PAH* ekspresije i potpunijem shvatanju kompleksnog fenotipa PKU.

U četvrtom delu ovog istraživanja je izvršena analiza varijanti u potencijalnim genima modifikatorima kognitivnog PKU fenotipa. Ova analiza je bila sprovedena korišćenjem dva različita metodološka pristupa, gde je prvi pristup podrazumevao studiju odabranog gena-kandidata, dok je drugi pristup za cilj imao identifikaciju novog gena modifikatora na nivou celog genoma. Prvo je urađena studija asocijacije u literaturi opisane varijante m.10398G>A iz mitohondrijskog gena *MT-ND3* sa kognitivnim fenotipom 64 pacijenata sa PKU (evaluiranom u obliku vrednosti IQ), pri čemu je pokazano da između nosilaca m.10398A i m.10398G nije pronađena statistički značajna razlika u srednjoj vrednosti IQ. Zatim je u istraživanju koje je za cilj imalo identifikaciju novih gena modifikatora kognitivnog PKU fenotipa, kompletna genomska sekvenca 10 nelečenih PKU pacijenata (iz 6 porodica) sa normalnim kognitivnim razvojem analizirana metodom sekvenciranja nove generacije. Tom prilikom su se, nakon ekstenzivne bioinformatičke obrade, kao potencijalni geni modifikatori PKU kognitivnog fenotipa izdvojili *SHANK* geni, s obzirom da su njihovi proteinski produkti uključeni u sinaptičku transmisiju i da su kod čak 4 od 6 analiziranih porodica u nekom od 3 *SHANK* gena (*SHANK1*, *SHANK2* ili *SHANK3*) identifikovane benigne varijante (ukupno 6 varijanti). Za *SHANK* proteine koji nose identifikovane varijante je *in silico* analizom pokazano da mogu zadobiti nove karakteristike, te mogu imati protektivni

modifikatorski efekat na razvoj kognitivnih poremećaja pacijenata sa PKU. Njihovo otkriće može imati ogroman značaj za razvoj nove strategije lečenja pacijenata sa PKU.

Ključne reči: DNK varijante, fenilketonurija, gen *PAH*, genotip-fenotip korelacija, geni modifikatori, hiperfenilalaninemija, regulacija transkripcije, sekvenciranje nove generacije, tetrahidrobiopterin deficijencija.

Naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

Uža naučna oblast: Molekularna genetika

UDK broj: [575.21 + 575.22]:577.218 (043.3)

Impact of variants in coding and noncoding regions of disease-causing and modifier genes on phenotype of patients with hyperphenylalaninemia

ABSTRACT

Hyperphenylalaninemia (HPA) is the most frequent inborn error of amino acid metabolism (incidence 1:10 000) and it is characterized by an increased level of blood phenylalanine. Excessive phenylalanine has a toxic effect on brain development, and if left untreated, leads to a severe and irreversible mental retardation of a patient. In approximately 98% of all cases, HPA is caused by mutations in phenylalanine hydroxylase (*PAH*) gene and in such case the disorder is known as phenylketonuria (PKU). In other 1-2% of the cases, HPA results from deficiency of an essential cofactor of the PAH enzyme, tetrahydrobiopterin (BH₄). BH₄ deficiency can therefore result from mutations in two genes responsible for BH₄ biosynthesis, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase (*PTS*) gene and GTP cyclohydrolase I (*GCHI*) gene, or it can be due to mutations in genes responsible for BH₄ metabolism, dihydropteridine reductase (*DHPR*) gene and pterin-4a-carbinolamine dehydratase (*PCBD*) gene. Due to serious and irreversible consequences of HPA, it is essential to establish an accurate diagnosis of a patient, and start appropriate treatment as soon as possible. In Serbia, molecular genetics characterization of the *PAH* gene was introduced in 2004. However, it is necessary to establish additional methods for comprehensive identification and functional characterization of variants detected in various genes that cause HPA. This approach can have an important application for differential diagnosis of HPA patients in Serbia and it enables a prompt introduction of adequate genotype-specific treatment. In case of PKU, although mutant *PAH* genotype represents the main determinant of PKU phenotype, it is not always possible to predict the phenotype based only on genotype. Genetic factors which attribute to development of final PKU phenotype (especially cognitive PKU phenotype) are still poorly understood. Therefore, the identification of the new intragenic modulators (eg. new elements involved in transcription regulation) of

PKU phenotype, as well as the new modifier genes, would lead to its better understanding.

The first part of this research featured a comprehensive molecular characterization of variants in disease-causing genes in 76 patients with HPA in Serbia. DNA sequencing of the whole coding region of the *PAH* gene, exon-intron boundaries, promoter region and MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) analysis led to a detection of 29 known and 1 new mutation. For the first time in Serbia, a large deletion (c.510-?_706+?del) was detected in one patient in homozygous state, therefore having a frequency of 1,33%. Also, mutation detection in the *PTS*, gene responsible for BH4 biosynthesis, was optimized, and it involved DNA sequencing of the whole coding region. At the time, mutation p.Asp136Val was detected in one patient, in a homozygous state. This is the first case of BH4 deficiency in Serbia, which was identified owing to the application of molecular genetics and optimization of the *PTS* gene mutation detection. Frequency of *PTS* deficiency in the analyzed group of HPA patients is 1,31%. By combining various methods, the level of mutation detection reached 99,34% for HPA in Serbia. Based on the spectrum of detected mutations, a diagnostic algorithm was established for Serbia, which enables faster, easier and more affordable detection of mutations in HPA-causing genes. Furthermore, a prediction of BH4 responsiveness was conducted based on the analyzed PKU patients' genotypes, and it was shown that 32% of PKU patients from Serbia would most probably benefit from BH4 therapy, while the maximum of the patients that could benefit from the BH4 treatment is up to 79%.

The second part of the research consisted of a functional analysis of detected nonsynonymous substitution p.Gln226Lys PAH (c.676C>A). Using an *in vitro* expression hepatoma system, it was demonstrated that the amount of mutant p.Gln226Lys PAH-FLAG detected by Western blot was only 1.2% compared to wt PAH-FLAG. Furthermore, the addition of sepiapterin, intracellular precursor of BH4 with a protective chaperone-like function, did not significantly increase the amount of mutant protein. Therefore, it was concluded that p.Gln226Lys is a disease causing mutation, and it does not respond to BH4.

The third part of the research comprised the identification and functional characterization of new transcription regulators in noncoding regions of the *PAH* gene. Functional CAT assay analysis demonstrated that the *PAH* promoter region with cytosine at -170 position (analogous to wt sequence) functions as new *cis*-regulating element. This element decreases the level of transcription up to 50% compared to the control plasmid with basal promoter activity. In addition, EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) supershift assay showed that this regulatory element binds KLF1 transcription factor. Furthermore, functional analysis of VNTR region at 3' part of *PAH* gene showed that this VNTR region, regardless of the tandem repeat type, acts as a new regulatory element. This element decreases level of transcription approximately up to 60% in comparison with control plasmid with basal promoter activity. EMSA supershift assays demonstrated that the most frequent type of repeats in PKU patients in Serbia, VNTR3, binds C/EBP alpha transcription factor. These two new transcription regulatory elements, identified in noncoding regions (promoter and 3' region of the *PAH* gene) contribute to better understanding of *PAH* expression regulation and can lead to a more comprehensive knowledge of complex PKU phenotype.

The fourth part of the research involved analysis of variants in putative PKU cognitive phenotype modifier genes. This analysis was conducted using two different approaches; the first proposed study of a selected gene-candidate, whereas the second approach aimed at identifying new modifier genes at the level of the whole genome. Firstly, a study was conducted to assess the possible association of m.10398G>A variant in mitochondrial *MT-ND3* gene and cognitive phenotype of 64 patients with PKU (evaluated as IQ scores), which exhibited no statistically relevant difference in average IQ between carriers of m.10398A and m.10398G. Then, in research which aimed to identify new modifier genes of cognitive PKU phenotype, complete genome sequence of 10 untreated PKU patients (from 6 families) with normal cognitive development was analyzed using new generation sequencing method. After extensive bioinformatics analysis, SHANK genes were selected as potential modifier genes of PKU cognitive phenotype, given that their protein products are involved in synaptic transmission. Furthermore, for 4 of 6 analyzed families, benign variants were identified in one of the 3 *SHANK* genes (*SHANK1*, *SHANK2* or *SHANK3*). *In silico* analysis showed that SHANK proteins which carry identified variants could gain new

characteristics, and thus, could have a protective modifier effect on development of cognitive dysfunction in PKU patients. Their discovery could hold great value in development of new strategies for treatment of patients with PKU.

Keywords: DNA variants, genotype – phenotype correlation, hyperphenylalaninemia, modifier genes, new generation sequencing, *PAH* gene, phenylketonuria, regulation of transcription, tetrahydrobiopterin deficiency.

Research area: Molecular biology of eukaryotes

Area of special interest: Molecular genetics

UDC number: [575.21 + 575.22]:577.218 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. HIPERFENILALANINEMIJA	2
1.2. KLINIČKA SLIKA I TERAPIJA PACIJENATA SA HIPERFENILALANINEMIJOM	4
1.3. GENI UZROČNICI HPA.....	7
1.5. MUTACIJE U GENU <i>PAH</i>	8
1.6. TETRAHIDROBIOPTERIN I BH4 DEFICIJENCIJA	9
1.7. GEN <i>GCHI</i> I <i>GTPCH1</i> DEFICIJENCIJA.....	11
1.8. GEN <i>PTS</i> I <i>PTPS</i> DEFICIJENCIJA	12
1.9. GEN <i>PCBD</i> I <i>PCD</i> DEFICIJENCIJA	14
1.10. GEN <i>QDPR</i> I <i>DHPR</i> DEFICIJENCIJA.....	15
1.11. ENZIM PAH – STRUKTURA I EKSPRESIJA	16
1.12. ENZIM PAH – EFEKAT MUTACIJA NA STRUKTURU I FUNKCIJU	19
1.13. ENZIM PAH – STABILNOST I STABILIZACIJA STRUKTURE ŠAPERONIMA	20
1.14. ENZIM PAH – REGULATORNA I ŠAPERONSKA ULOGA BH4	21
1.15. PKU FENOTIP I KORELACIJA SA GENOTIPOM.....	22
1.16. REGULACIJA TRANSKRIPCije GENA <i>PAH</i>	25
1.17. GENI MODIFIKATORI.....	29
2. CILJEVI.....	36
3. MATERIJAL I METODE.....	38
3.1. MATERIJAL.....	39
3.1.1. PACIJENTI.....	39
3.1.2. ĆELIJSKE LINIJE	40
3.1.3. BAKTERIJSKI SOJEVI	41
3.1.4. PLAZMIDNI VEKTORI	41
3.1.5. PRAJMERI I OLIGONUKLEOTIDI	41
3.2.1. METODE ZA DETEKCIJU MUTACIJA U GENIMA UZROČNICIMA HPA	46

3.2.1.2. ANALIZA DNK NA AGAROSNOM GELU	47
3.2.1.3. SEKVENCIRANJE DNK	47
3.2.1.4. DETEKCIJA VELIKIH DELECIJA U GENU PAH MLPA METODOM	50
3.2.1.5. BIOINFORMATIČKA ANALIZA DETEKTOVANIH VARIJANTI U DNK	52
3.2.2. METODE ZA FUNKCIONALNU ANALIZU NOVIH VARIJANTI U KODIRAJUĆIM REGIONIMA GENA-UZROČNIKA HPA.....	53
3.2.2.1. KULTIVISANJE BAKTERIJA	54
3.2.2.2. MESTO-DIRIGOVANA MUTAGENEZA DNK	54
3.2.2.3. DETEKCIJA PLAZMIDA KOJI NOSI ŽELJENU MUTACIJU.....	56
3.2.2.4. IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI.....	56
3.2.2.5. IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA VELIKOJ SKALI.....	57
3.2.2.6. ČUVANJE TRANSFORMANATA	58
3.2.2.7. KULTIVISANJE PERMANENTNIH ĆELIJSKIH LINIJA	59
3.2.2.8. TRANSFEKCIJA PLAZMIDNE DNK U HEPATOCITE - JetPEI TRANSFEKCIJA	60
3.2.2.9. PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKTA	61
3.2.2.10. BRADFORD METODA	61
3.2.2.11. WESTERN BLOT.....	62
3.2.2.12. DENATURIŠUĆI SDS POLIAKRILAMIDNI GEL	62
3.2.2.13. TRANSFER PROTEINA NA MEMBRANU	63
3.2.2.14. IMUNODETEKCIJA PAH-FLAG PROTEINA	63
3.2.2.15. IMUNODETEKCIJA β AKTIN PROTEINA - KONTROLA NANOŠENJA UZORAKA	65
3.2.3. METODE ZA FUNKCIONALNU ANALIZU NOVIH TRANSKRIPCIONI REGULATORA U NEKODIRAJUĆIM REGIONIMA GENA <i>PAH</i>	66
3.2.3.1. METODE ZA ANALIZU VARIJANTI U NEKODIRAJUĆIM DELOVIMA GENA <i>PAH</i>	66
3.2.3.2. ANALIZA PROMOTORSKOG REGIONA GENA <i>PAH</i>	66
3.2.3.3. ANALIZA BROJA PONOVAKA U VNTR REGIONU U 3' KRAJU GENA <i>PAH</i>	67

3.2.3.4. BIOINFORMATIČKA ANALIZA ODABRANIH VARIJANTI.....	68
3.2.3.5. METODOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK	68
3.2.3.6. KULTIVISANJE BAKTERIJA	71
3.2.3.7. PRIPREMANJE KOMPETENTNIH ĆELIJA E. Coli DH5 α	71
3.2.3.8. TRANSFORMACIJA E. Coli DH5 α KOMPETENTNIH ĆELIJA	72
3.2.3.9. DETEKCIJA ŹELJENOG KONSTRUKTA	73
3.2.3.10. EKSPRESIJA KLONIRANOG GENA U HUMANIM HEPG2 ĆELIJAMA	73
3.2.3.11. TRANSFEKCIJA PLAZMIDNE DNK U HEPATOCITE - LIPOFEKTAMINSKA TRANSFEKCIJA.....	74
3.2.3.12. PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKATA.....	74
3.2.3.13. CAT ELISA ESEJ.....	75
3.2.3.14. BETA GALAKTOZIDAZNI ESEJ	76
3.2.3.15. ANALIZA INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA	77
3.2.3.16. IZOLOVANJE JEDARNIH PROTEINA IZ HEPG2 ĆELIJSKE LINIJE	78
3.2.3.17. ESEJ PROMENJENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI	78
3.2.4. ANALIZA VARIJANTI U POTENCIJALNIM GENIMA MODIFIKATORIMA KOGNITIVNOG PKU FENOTIPA	80
3.2.4.1. ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTE m.10398A>G U MITOHONDRIJSKOM <i>MT-ND3</i> GENU SA KOGNITIVNIM FENOTIPOM PACIJENATA SA PKU	80
3.2.4.1.1. STATISTIČKA ANALIZA	82
3.2.4.2. IDENTIFIKACIJA NOVIH POTENCIJALNIH GENA MODIFIKATORA KOGNITIVNOG PKU FENOTIPA	82
3.2.4.2.1. SEKVENCIRANJE KOMPLETNOG HUMANOG GENOMA	82
3.2.4.2.2. BIOINFORMATIČKA ANALIZA REZULTATA SEKVENCIRANJA NOVE GENERACIJE.....	84
4. REZULTATI.....	85
4.1. MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA MUTACIJA U GENIMA UZROČNICIMA KOD PACIJENATA SA HPA U SRBIJI	86
4.1.1. DETEKCIJA MUTACIJA U GENU <i>PAH</i>	86

4.1.2. DETEKCIJA MUTACIJA U GENU <i>PAH</i> – METODE ZA DETEKCIJU VELIKIH DELECIJA	88
4.1.3. DETEKCIJA MUTACIJA U GENU <i>PTS</i> ODGOVORNOM ZA RETKU FORMU HPA.....	90
4.1.4. PREDIKCIJA KORISNOSTI BH4 LEKA U POPULACIJI PACIJENATA SA PKU IZ SRBIJE NA OSNOVU GENOTIPA.....	91
4.2. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVE VARIJANTE U KODIRAJUĆEM REGIONU GENA UZROČNIKA HPA	94
4.2.1. <i>IN SILICO</i> ANALIZA p.Gln226Lys PAH.....	94
4.2.2. <i>IN VITRO</i> FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA p.Gln226Lys PAH PROTEINA U EUKARIOTSKOM EKSPRESIONOM SISTEMU	96
4.3. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U NEKODIRAJUĆIM REGIONIMA GENA <i>PAH</i>	99
4.3.1. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U OKVIRU PROMOTORA GENA <i>PAH</i>	99
4.3.1.1. <i>IN SILICO</i> ANALIZA.....	100
4.3.1.2. FUNKCIONALNA ANALIZA REGULATORNOG ELEMENTA	100
4.3.1.3. ANALIZA INTERAKCIJA DNK-PROTEIN	102
4.3.2. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U OKVIRU VNTR REGIONA U 3' KRAJU GENA <i>PAH</i>	104
4.3.2.1 <i>IN SILICO</i> ANALIZA.....	104
4.3.2.2 FUNKCIONALNA ANALIZA REGULATORNOG ELEMENTA	105
4.3.2.3 ANALIZA INTERAKCIJA DNK-PROTEIN	106
4.4. ANALIZA VARIJANTI U POTENCIJALNIM GENIMA MODIFIKATORIMA KOGNITIVNOG PKU FENOTIPA	110
4.4.1. ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTE m.10398A>G U MITOHONDRIJSKOM <i>MT-ND3</i> GENU SA KOGNITIVNIM FENOTIPOM PACIJENATA SA PKU	110
4.4.2. IDENTIFIKACIJA NOVIH POTENCIJALNIH GENA MODIFIKATORA PKU KOGNITIVNOG FENOTIPA	111
5. DISKUSIJA.....	115
5.1. MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA MUTACIJA U GENIMA UZROČNICIMA KOD PACIJENATA SA HPA U SRBIJI	116

5.1.1. SPEKTAR I UČESTALOST MUTACIJA U GENU <i>PAH</i> KOD PACIJENATA SA HPA U SRBIJI	116
5.1.2. VELIKE DELECIJE U GENU <i>PAH</i> KOD PACIJENATA SA HPA U SRBIJI	119
5.1.3. BH4 DEFICIJENCIJA KOD PACIJENATA SA HPA U SRBIJI.....	120
5.1.4. ALGORITAM ZA OPTIMALNU MOLEKULARNU DIJAGNOSTIKU PACIJENATA SA HPA U SRBIJI.....	122
5.1.5. PREDIKCIJA KORISNOSTI BH4 LEKA U POPULACIJI PACIJENATA SA PKU IZ SRBIJE NA OSNOVU GENOTIPA.....	125
5.2. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVE VARIJANTE U KODIRAJUĆEM REGIONU GENA <i>PAH</i>	126
5.2.1. <i>IN SILICO</i> ANALIZA p.Gln226Lys <i>PAH</i>	127
5.2.2. <i>IN VITRO</i> FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA p.Gln226Lys <i>PAH</i> PROTEINA U EUKARIOTSKOM EKSPRESIONOM SISTEMU	129
5.3. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U NEKODIRAJUĆIM REGIONIMA GENA <i>PAH</i>	130
5.3.1. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U OKVIRU PROMOTORA GENA <i>PAH</i>	131
5.3.2. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U OKVIRU VNTR REGIONA U 3' KRAJU GENA <i>PAH</i>	133
5.4. ANALIZA VARIJANTI U POTENCIJALNIM GENIMA MODIFIKATORIMA KOGNITIVNOG PKU FENOTIPA	135
5.4.1. ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTE m.10398A>G U MITOHONDRIJSKOM <i>ND3</i> GENU SA KOGNITIVNIM FENOTIPOM PACIJENATA SA PKU.....	135
5.4.2. IDENTIFIKACIJA NOVIH POTENCIJALNIH GENA MODIFIKATORA PKU KOGNITIVNOG FENOTIPA	137
6. ZAKLJUČCI	142
7. LITERATURA.....	146

1.UVOD

1.1. HIPERFENILALANINEMIJA

Hiperfenilalaninemija (HPA) predstavlja najčešći nasledni poremećaj metabolizma aminokiselina. Najznačajnija karakteristika ovog oboljenja, kojoj duguje i ime, jeste povišeni nivo aminokiseline fenilalanina u telesnim tečnostima (Scriver et al., 2008). Povećana koncentracija fenilalanina u krvi za krajnju posledicu ima oštećenje nervnog tkiva – naime, ovaj veliki višak fenilalanina prolazi kroz krvno-moždanu barijeru i dovodi do teške i ireverzibilne mentalne retardacije pacijenta, ukoliko se pravovremeno ne uvede odgovarajuća terapija. Hiperfenilalaninemija sa genetičkog stanovišta predstavlja heterogenu grupu bolesti budući da, sa jedne strane, može biti uzrokovana mutacijama u genu koji kodira za enzim fenilalanin hidroksilazu (eng. *phenylalanine hydroxylase, PAH*) i tada se naziva fenilektonurija (eng. *phenylketonuria, PKU*), a sa druge strane, može da nastane i usled deficijencije tetrahidrobiopterina, BH₄, esencijalnog kofaktora enzima PAH. U oba slučaja nisu ispunjeni uslovi za normalno funkcionisanje enzima PAH, pa je stoga i reakcija koju ovaj enzim katalizuje, prevođenje fenilalanina u tirozin, značajno umanjena i nedovoljna da se održi homeostaza fenilalanina u organizmu.

Učestalost hiperfenilalaninemije iznosi oko 1:10 000 za belu populaciju (Scriver et al., 2008). Međutim, učestalosti značajno variraju za različite populacije i kreću se od 1:4000 u Turskoj do 1:100.000 u Finskoj (Özalp et al., 1990; Guldborg et al., 1995), dok procenjena učestalost HPA za Srbiju iznosi 1:15 130 novorođenčadi (Đorđević, 2013).

Hiperfenilalaninemiju je prvi put opisao 1934. godine norveški lekar i biohemičar Følling (Folling, 1934). Proučavajući dvoje dece sa teškom mentalnom retardacijom, primetio je veliku količinu metabolita fenilpiruvata u njihovom urinu. Oboljenje je tada nazvao *imbecillitas phenylpyruvica*, što je kasnije preinačeno u “fenilpiruvična oligofrenija“, a bolest je uvrštena u metaboličke bolesti. Daljim ispitivanjem većeg broja pacijenata Følling je utvrdio da se oboljenje nasleđuje po Mendelovim pravilima, kao autozomalno recesivno, a kao definitivni uzrok je potvrđena nemogućnost organizma pacijenta da metaboliše aminokiselinu fenilalanin. Nešto kasnije, Penrose i Quastel su potvrdili rezultate Folling-ovog rada i preimenovali oboljenje u fenilketonurija – naziv koji je ostao i do danas (Penrose and Quastel, 1937).

Osim toga, Penrose je među prvima primetio da se mentalna retardacija kod ovih pacijenata može izbeći korigovanjem ishrane. Uspešna primena niskoproteinske dijeta u lečenju fenilektonurije je potvrđena tek nakon Drugog svetskog rata, kada je Bickel, uz pomoć hemičara Woolfa, primenio specijalnu formulu sačinjenu od mešavine aminokiselina bez fenilalanina. Prve studije su pokazale da dijeta sa niskim sadržajem fenilalanina dovodi do smanjenja izlučivanja fenilpiruvata, kao i do poboljšanja u razvoju pacijenta (Bickel, 1954). Tako je proteinska formula za PKU postala prva dijetetska terapija za metaboličku bolest, postavši na ovaj način i model za lečenje mnogih drugih metaboličkih bolesti.

U međuvremenu su intenzivna istraživanja na biohemijskoj i molekularnoj osnovi fenilketonurije dovela do otkrića da PKU pacijenti imaju deficitarnu aktivnost enzima jetre, fenilalanin hidroksilaze (Jervis, 1953). Deceniju kasnije, Kaufman je otkrio da je tetrahidrobiopterin neophodan katalitički kofaktor fenilalanin hidroksilaze u reakciji konverzije fenilalanina u tirozin (Kaufman, 1963). Nakon ovog otkrića su zabeleženi slučajevi pacijenata koji su osim povišenog fenilalanina imali i dodatne neurološke komplikacije, tako da im klasična PKU dijeta nije pomogla. Ova neobična forma oboljenja je nazvana “maligna hiperfenilalaninemija”, pri čemu je pokazano da kod ovih pacijenata uzrok bolesti ne leži u deficitarnosti PAH enzima, već kofaktora BH₄, usled mutacija u genima odgovornim za metabolizam BH₄ (Smith, 1975; Kaufman, 1975). Tako je prepoznata posebna forma HPA čije je razlikovanje od PKU od velike važnosti za pravilno lečenje pacijenta.

Početak osamdesetih godina, zahvaljujući brzom razvoju molekularne genetike, uspešno je klonirana cDNK humanog gena *PAH* (Woo et al., 1983), što je omogućilo detekciju i analizu mutacija kod pacijenata iz raznih populacija, dok je kompletna genomska sekvenca gena *PAH* sklopljena nešto kasnije (DiLella et al., 1986). U međuvremenu su Erlandsen i Stevens uspešno kristalizovali enzim PAH i opisali njegovu strukturu, što je omogućilo *in silico* analizu efekta mutacija (Erlandsen and Stevens, 1999). U godinama koje su potom usledile, istraživanja su uglavnom bila usmerena na korelaciju genotipa i fenotipa, dakle, na nastojanje da se na osnovu dve poznate mutacije u genu-uzročniku predvidi težina kliničke slike (Guldberg et al., 1998; Kayaalp et al., 1997). Međutim, rastući broj rezultata je svedočio da korelacija između

genotipa i fenotipa nije uvek jednostavna (Scriver and Waters, 1999), tako da se istraživanja u poslednjoj deceniji okreću dodatnim faktorima koji bi mogli da doprinesu konačnom fenotipu, kao što su geni modifikatori, transkripcioni regulatori koji učestvuju u genskoj ekspresiji, faktori koji utiču na metabolizam fenilalanina u organizmu, kao i transport kroz krvno-moždanu barijeru (Moller et al., 1998; Lichter-Konecki et al., 1999; Moller et al., 2005; Bik-Multanowski et al., 2006; Stojiljković et al., 2010). Posebno interesovanje je usmereno na do sada neistraženi fenomen – na razotkrivanje konkretnog mehanizma kojim višak fenilalanina dovodi do oštećenja mozga.

1.2. KLINIČKA SLIKA I TERAPIJA PACIJENATA SA HIPERFENILALANINEMIJOM

Hiperfenilalaninemija je kroz svoj istorijat ostala zabeležena kao prvi primer nasledne bolesti čoveka koja se leči - ukoliko se pravovremeno uvede dijeta sa niskim sadržajem fenilalanina, mentalna retardacija može biti izbegnuta, tako da je pacijentu omogućeno da ima normalan psihomotorni razvoj, kao i da dostigne koeficijent inteligencije (IQ) koji se nalazi u okviru proseka populacije. Nelečeni pacijenti sa HPA imaju karakterističnu kliničku sliku: usporen psihomotorni razvoj, izraženu mentalnu retardaciju (vrednosti IQ se kreću u opsegu od 35 do 68), epilepsiju i različite oblike poremećaja u ponašanju (hiperaktivnost, iritabilnost, depresija) (Scriver et al., 2008). Na snimcima mozga se uočavaju degenerativne promene na beloju masi, kao i poremećaj mijelinizacije (Phillips et al., 2001). Osim toga, za nelečene pacijente je karakteristična i svetla pigmentacija kože i kose nastala usled manjka melanina, a osim svetle pigmentacije, koža je izazito suva i sklona ekcematoznim promenama. Za razliku od promena na koži i kosi koje su reverzibilne, mentalna retardacija je ireverzibilna ukoliko pacijent nije pravilno lečen od najranijeg uzrasta, dakle, od prvog meseca života. Neophodno je da pacijent bude na odgovarajućoj terapiji bar do adolescentskog perioda, ali se generalno preporučuje da se terapija nastavi tokom čitavog života (Scriver, 2007; Scriver et al., 2008; Weglage et al., 2013).

Lečenje pacijenata sa HPA se razlikuje u zavisnosti da li je reč o fenilketonuriji ili BH4 deficijenciji. Pacijenti sa PKU su od sredine prošlog veka uspešno lečeni navedenom dijetetskom terapijom, dok pacijenti sa BH4 deficijencijom osim dijete zahtevaju i dodatnu terapiju, o čemu će biti reči kasnije. Dijeta za pacijente sa PKU je izrazito restriktivna. Reč je o dijeti sa niskim sadržajem proteina kojoj se dodaje mešavina aminokiselina bez fenilalanina (Bickelova formula), a unos dozvoljenih namirnica pažljivo se prati. Budući da je PKU dijeta izuzetno teška za striktno pridržavanje, veliki broj pacijenata vremenom odustaje od nje i mali broj njih se pridržava tokom čitavog života (Scriver, 2007). Upravo zbog toga, istraživanja su bila usmerena na razvoj alternativnih terapija. Jedna od alternativnih terapija je uključivala suplementaciju velikim neutralnim aminokiselinama, gde je princip zasnovan na kompeticiji ovih aminokiselina sa fenilalaninom za transportere u digestivnom traktu ili na krvno-moždanoj barijeri (Koch, 2003). Drugi pristupi su uključivali terapije koje su korišćene i za druge nasledne bolesti, kao što su genska terapija i enzimska terapija, i može se reći da su i problemi pri ovakvim vrstama terapija bili slični kao i kod drugih bolesti. Problemi genske terapije su, između ostalog, uključivali bezbedno i uspešno dopremanje do ciljnog organa (jetre), kao i izbegavanje toksičnosti i insercione mutageneze (Sarkissian et al., 2009). Sa druge strane, enzimska terapija fenilketonurije uključuje dve mogućnosti, zamenu sa samim enzimom PAH ili supstituciju sa enzimom fenilalanin amonijum liazom (poreklom iz biljaka ili bakterija) koji prevodi višak fenilalanina u neškodljive produkte, trans-cimetnu kiselinu i amonijak. U oba slučaja problem predstavlja uspešno dopremanje, koje je moguće premostiti upotrebom fuzionih proteina, što je predmet intenzivnih istraživanja (Sarkissian et al., 2009). Budući da su svi navedeni vidovi terapije još uvek u različitim fazama kliničkih ispitivanja, pacijentima sa PKU je do skoro jedinu terapeutsku opciju predstavljala restriktivna niskoproteinska dijeta.

Tetrahidrobiopterin (BH4) je do skoro bio u upotrebi samo kao terapija za oblik HPA koji nastaje usled njegove deficijencije. Međutim, 1999. godine, Kure i saradnici su zabeležili slučajeve pacijenata sa PKU kod kojih je unošenje BH4 uzrokovalo smanjenje koncentracije fenilalanina u krvi, dok su pritom bili na normalnoj ishrani (Kure et al., 1999). Rezultati su ubrzo potvrđeni i u drugim brojnim studijama, i tada je primećeno da pozitivan odgovor na BH4 nije moguć kod svih pacijenata sa PKU

(Spaapen et al., 2001; Matalon et al., 2004; Matalon et al., 2005). Stoga su naredna istraživanja bila usmerena u pravcu rasvetljavanja mehanizma kojim BH4 dovodi do sniženja koncentracije fenilalanina kod određenih pacijenata. Tako je otkriveno da je BH4 u stanju da se veže za mutirane, ali donekle funkcionalne proteine PAH i tako ih stabilizuje, omogućavajući njihovu aktivnost, pa samim tim i sniženje hiperfenilalaninemije kod pacijenata (Erlandsen et al., 2004). Međutim, za razliku od svih prethodno navedenih vidova terapije, terapija sa BH4 zavisi od genotipa pacijenta, naime, pozitivan odgovor na BH4 se može očekivati kod pacijenata kod kojih mutacije u genu *PAH* dovode do delimično aktivnih enzima (Desviat et al., 2004; Perez et al., 2005; Trefz et al., 2009). Mutirani, ali delimično aktivni proteini PAH će u interakciji sa BH4 zauzeti stabilniju formu koja je manje podložna degradaciji, tako da se smatra da je glavni mehanizam delovanja BH4 zaštitni, tj. uloga slična šaperonskoj (Erlandsen et al., 2004). BH4 je nedugo potom ušao i u klinička ispitivanja, a na tržište lekova je dospelo početkom 2008. godine kada je odobren od strane Evropske agencije za lekove i to pod imenom KUVAN. KUVAN je po strukturi sapropterin dihidrohlorid, sintetička forma 6R-izomera BH4, i njegova upotreba kod nekih pacijenata može u potpunosti da zameni niskoproteinsku PKU dijetu, dok se kod drugih savetuje kombinovanje dijete i leka KUVAN (Blau et al., 2009). Da bi se utvrdilo da li je pacijent dobar kandidat za terapiju sa BH4, neophodno je uraditi standardizovani BH4 test opterećenja. Međutim, budući da odgovor pacijenta na BH4 zavisi od genotipa, korisno je izvršiti predikciju odgovora na osnovu mutacija prisutnih u genu *PAH* (Quirk et al., 2012; Heintz et al., 2013).

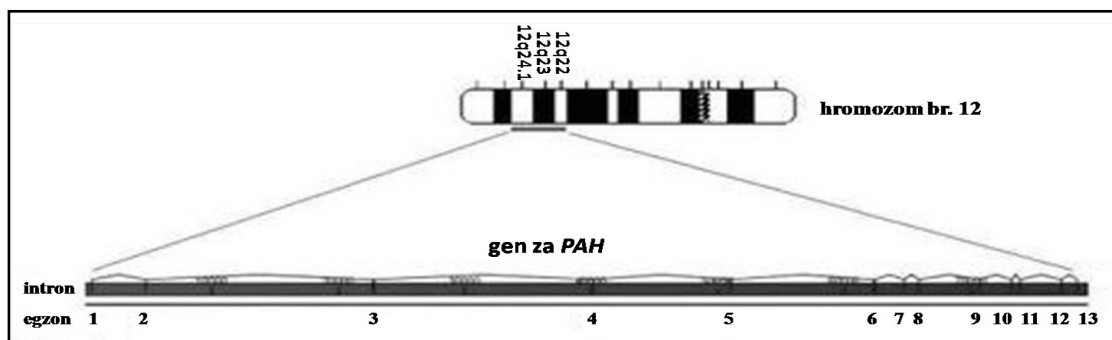
S obzirom na teške i ireverzibilne posledice koje HPA izaziva, a pritom imajući u vidu da se te iste posledice mogu izbeći pravovremenom primenom odgovarajuće terapije, većina zemalja sprovodi skrining novorođenčadi na povišeni nivo fenilalanina u krvi. Na ovaj način je pacijentu omogućeno da, uz pravilno sprovođenje terapije, od najranijeg uzrasta ostvari normalan psihomotorni razvoj i očuva kognitivne sposobnosti. Nakon što se na neonatalnom skriningu utvrdi povišeni nivo fenilalanina, neophodno je dijagnozu potvrditi i molekularnogenetičkom analizom koja će u genu-uzročniku ukazati na prisustvo mutacije koja dovodi do razvoja bolesti i samim tim definitivno potvrditi dijagnozu i ukazati na moguće terapijske mogućnosti.

1.3. GENI UZROČNICI HPA

Kao što je već napomenuto, moguće je razlikovati dve forme HPA, gde daleko učestaliju formu predstavlja PKU, nastala usled mutacija u genu *PAH* (98% slučajeva HPA), dok ostatak slučajeva HPA nastaje usled mutacija u nekom od gena zaduženih za metabolizam kofaktora BH4. U ovoj, znatno ređoj formi HPA, mutacije mogu pogoditi bilo gene za biosintezu (gen za piruvil tetrahidropterin sintazu – *PTS* i gen za GTP ciklohidrolazu – *GTPCH*), bilo gene za regeneraciju BH4 (gen za dihidropteridin reduktazu – *QDPR* i gen za pterin-4a-karbinolamin dehidratazu, *PCBD*) (Blau et al., 2001).

1.4. GEN *PAH*

Gen za fenilalanin hidroksilazu se u humanom genomu nalazi na hromozomu 12, u regionu 12q23.2 koji se prostire na oko 1,5 Mbp (Slika 1) (Lidsky et al., 1985; DiLella et al., 1986; Venter et al., 2001). Genomska sekvenca *PAH* i njeni okolni regioni prostiru se na 171 266 bp, pri čemu 5' UTR zauzima oko 27 Kb, a 3' sekvenca nizvodno od poly(A) mesta u poslednjem egzonu oko 64,5 Kb. Gen *PAH* ima 13 egzona, pri čemu na njih odlazi samo 2,88% genomske sekvence između start kodona i 3' poly(A) signala. U trinaestom egzonu su prisutna tri poliadenilaciona signala (AATAAA), pri čemu se treći najčešće koristi. Najkraći egzon je dug samo 57 bp (egzon 9), dok je najduži egzon 13 dužine 892 bp, pri čemu je srednja dužina egzona 170 bp. Svi egzoni su kodirajući, a dužina iRNK je 2,4 kb. U slučaju introna, najkraći iznosi 556 bp (intron 10), dok je najduži 17 874 bp (intron 2), tako da je srednja dužina introna 6 390 bp (Scriver, 2007; Scriver et al., 2008).



Slika 1. Šema gena *PAH* sa pozicijom na hromozomu 12. Preuzeto i modifikovano sa <https://genetics2012disease.wikispaces.com/PKU>.

1.5. MUTACIJE U GENU *PAH*

Od otkrića prvog mutiranog PKU alela pa do danas, otkriven je veliki broj mutacija u genu *PAH* koje dovode do razvoja fenilketonurije. Do sada je u BIOPKU bazi podataka registrovano 859 različitih tipova genetičkih varijanti, dakle, promena u sekvenci, od kojih je za preko 750 pokazano da je reč o mutacijama koje dovode do nastanka oboljenja (www.biopku.org, www.hgmd.cf.ac.uk). Oko 63% svih mutacija predstavljaju nesinonimne aminokiselinske zamene (eng. *missense mutations*) koje nastaju usled promene samo jednog nukleotida, dok su promene koje obuhvataju veći broj nukleotida znatno ređe. Male delecije su prisutne sa oko 13%, zatim slede mutacije koje menjaju mesto iskrajanja transkripta (eng. *splice mutations*) sa 11%, potom po učestalosti slede mutacije koje dovode do preuranjenog stop kodona (eng. *nonsense mutations*) sa 5%, dok su velike delecije koje mogu obuhvatiti i ceo egzon ređe i pojavljuju se u oko 3% slučajeva. Najređi tip mutacija predstavljaju male insercije i njihova učestalost iznosi oko 1% svih mutacija (Sriver, 2007; Kozak et al., 2006).

Uprkos velikom broju otkrivenih mutacija i raznovrsnosti PKU alela, kada se posmatra mutacioni spektar određene populacije, moguće je primetiti da se gotovo uvek mali broj mutacija nalazi na preko polovine PKU alela (Zschocke, 2003; Stojiljkovic et al., 2006; Karačić et al., 2009). Tako je u objedinjenom pregledu postojećih podataka o PKU mutacijama u Evropi Zschocke pokazao da se 29 mutacija mogu smatrati čestim u evropskim populacijama, dok su kao najčešće označene p.Arg408Trp, IVS10–11G>A, IVS12+1G>A, p.Tyr414Cys i p.Ile65Thr (Zschocke,

2003). Međutim, učestalost pojedinih mutacija varira od populacije do populacije, pri čemu je uputno utvrditi spektar mutacija za svaku zemlju ponaosob.

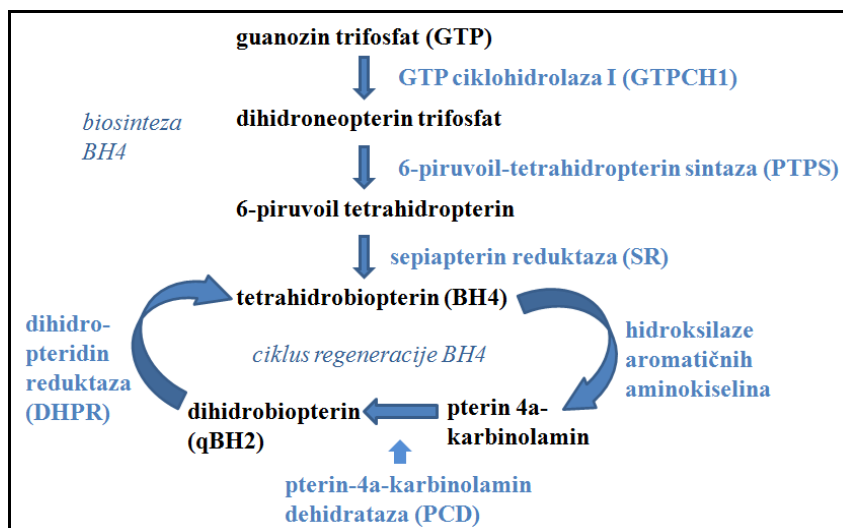
Poznavanje mutacionog spektra jedne populacije je od velike važnosti za planiranje dijagnostičkog pristupa. Ukoliko je utvrđeno da je u datoj populaciji jedna mutacija prisutna na velikom broju PKU alela, kao što je to npr. slučaj u Letoniji, gde učestalost p.Arg408Trp iznosi čak 76% (Pronina et al., 2003), poželjno je kao prvi korak uraditi ciljanu detekciju date mutacije, a potom nastaviti sa pretraživanjem ostalih mutacija. U populacijama gde nekoliko različitih mutacija ima približne učestalosti, tj. ni jedna pojedinačna mutacija ne doprinosi značajno ukupnoj učestalosti, dijagnostički pristup bi trebalo da bude prvenstveno usmeren na pretraživanje svih delova gena.

Prvu studiju koja je otkrila spektar PKU mutacija u Srbiji su sproveli Stojiljković i saradnici 2006. godine (Stojiljković et al., 2006). Tom prilikom je utvrđeno da je pet najčešćih mutacija (p.Leu48Ser sa učestalošću od 21%, p.Arg408Trp sa 18%, p.Pro281Leu sa 9%, p.Glu390Gly sa 7% i p.Arg261Gln sa 6%) prisutno na oko 60% analiziranih PKU alela. Budući da ni za jednu od mutacija nije pokazana pojedinačna značajna učestalost, odabrani dijagostički pristup je pretpostavljao pretraživanje sekvenci egzona (zajedno sa egzon-intron granicama) uz otkrivanje onih kod kojih je prisutna neka promena u odnosu na referentnu sekvencu, sa posledičnom identifikacijom otkrivene promene. Metodološki pristup je stoga uključivao elektroforezu na gelu sa denaturišućim gradijentom (DGGE) širokog raspona praćenu sekvenciranjem DNK segmenata za koje je pokazano da nose neku promenu. Na ovaj način je bila omogućena detekcija malih promena u čitavom genu *PAH*. Međutim, velike delecije koje obuhvataju čitave egzone su na ovaj način ostajale neidentifikovane.

1.6. TETRAHIDROBIOPTERIN I BH4 DEFICIJENCIJA

Tetrahydrobiopterin (6R-L-eritro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin) je esencijalni kofaktor grupe važnih enzima u koju spadaju hidrosilaze aromatičnih aminokiselina (fenilalanin hidrosilaza, triptofan hidrosilaza i tirozin hidrosilaza), alkilglicerol mono-oksigenaza, kao i tri izoforme NO (eng. *nitric oxide*, azot-monoksid) sintaze

(Werner et al., 2011). Upravo zato BH4 ima značajnu ulogu u velikom broju bioloških procesa i patoloških stanja koja uključuju metabolizam aromatičnih aminokiselina, sintezu monoaminskih neurotransmitera, kardiovaskularnu i endotelnu disfunkciju, imuni odgovor i osećaj bola (Werner et al., 2011). Postoje dva puta nastanka BH4 u organizmu: *de novo* sinteza i regeneracija (Slika 2). BH4 se *de novo* sintetise od guanozin trifosfata, GTP, kroz niz od tri reakcije koje vrše enzimi GTP ciklohidrolaza I (GTPCH1), 6-piruvoil-tetrahydropterin sintaza (PTPS) i sepiapterin reduktaza (SR). Budući da *de novo* biosinteza BH4 ne može da obezbedi dovoljne količine kofaktora kako za hepaticnu hidroksilaciju fenilalanina, tako i za homeostazu neurotransmitera u mozgu, regeneracija BH4 je neophodna. Regeneracija BH4 počiva na već postojećim dihidropterinima i uključuje aktivnost druga dva enzima, dihidropteridin reduktaze (DHPR) i pterin-4a-karbinolamin dehidrataze (PCD). Nedostatak bilo kog od ovih enzima, usled mutacija u odgovarajućim genima, dovodi do BH4 deficijencije koja se nasleđuje autozomno-recesivno i dovodi do pojave HPA. Zahvaljujući povišenom nivou fenilalanina ovi pacijenti bivaju otkriveni na neonatalnom skriningu što omogućava njihovo pravovremeno dijagnostifikovanje i lečenje. Izuzetak predstavlja jedino nedostatak enzima sepiapterin reduktaze, koji se manifestuje bez povišenog nivoa fenilalanina.



Slika 2. Šema reakcija biosinteze i regeneracije BH4.

Osim povišenog nivoa fenilalanina, pacijenti sa BH4 deficijencijom imaju niz drugih neuroloških poremećaja, do kojih dolazi prvenstveno usled manjka dopamina i serotonina u centralnom nervnom sistemu zbog poremećenog metabolizma njihovih prekursora - aminokiselina triptofana i tirozina. Klinički tok bolesti je sličan kod nelečenih pacijenata bilo da je reč o GTPCH1, PTPS, ili DHPR deficijenciji, dok pacijenti sa deficijencijom PCD uglavnom imaju znatno blažu kliničku sliku koja ne zahteva dugotrajnu terapiju. Različiti, ali često prisutni simptomi uključuju mentalnu retardaciju, usporen psihomotorni razvoj, konvulzije, poremećaj kretanja, mišićnog tonusa ili držanja tela, iritabilnost, hipertermiju bez infekcija i otežano gutanje (Blau et al., 2001). Stoga, osim dijete sa niskim sadržajem fenilalanina (ista kao za PKU pacijente) ili BH4 suplementacije, ovi pacijenti zahtevaju dodatnu terapiju u vidu suplementacije sa prekursorima neurotransmitera (L-dopa i 5-hidroksitriptofan). Budući da različite forme HPA zahtevaju različito lečenje, od velike je važnosti pravovremeno razlikovanje PKU od BH4 deficijencija. Stoga se, kod pacijenata kod kojih je na neonatalnom skriningu već uočen povišen nivo fenilalanina, rade dodatne analize kao što su analiza pterina (u urinu ili iz uzorka krvi na filter-papiru) ili BH4 test opterećenja, pomoću kojih je moguće razdvojiti PKU pacijente od pacijenata sa BH4 deficijencijom. Još jedan od dijagnostičkih pristupa predstavlja analiza nivoa biogenih amina u cerebrospinalnoj tečnosti kod pacijenata kod kojih postoji sumnja na BH4 deficijenciju. Na kraju, konačnu i definitivnu potvrdu dijagnoze predstavlja molekularno genetička analiza koja će pokazati prisustvo mutacija u nekom od gena-uzročnika.

1.7. GEN *GCHI* I GTPCH1 DEFICIJENCIJA

Gen za guanozin trifosfat ciklohidrolazu tip 1 se u humanom genomu nalazi na hromozomu 14, u regionu 14q21-q22 i prostire se na oko 30 kb (Thony et al., 1995). Gen *GCHI* ima 6 egzona i svih 6 su kodirajući (Ichinose et al., 1995). Enzim GTPCH1 je homodekamer (dimer pentamera) koji pripada familiji GTP ciklohidrolaza, pri čemu svaka subjedinica ima 250 aminokiselina i veličine je 27,9 kDa. Ovaj enzim katalizuje

prvu reakciju u okviru biohemijskog puta sinteze BH₄, prevodeći purinski nukleotid GTP u D-eritro-7,8- dihidroneopterin trifosfat (Slika 3) (Blau et al., 2001).

Važno je napomenuti da, osim HPA fenotipa koji se nasleđuje autozomno recesivno, mutacije u genu *GCHI* mogu da dovedu i do distonije bez HPA (Segawa sindrom ili *DOPA responsive dystonia, DRD*), ali u tom slučaju se ovo oboljenje nasleđuje autozomno dominantno sa smanjenom penetrabilnošću (Segawa et al., 1976; Ichinose et al., 1994). Može se smatrati da fenotipski spektar GTPCH1 deficijencije zapravo obuhvata čitav opseg između blažeg dominantnog oblika i znatno ozbiljnijeg recesivnog, pri čemu pacijenti mogu ispoljavati niz simptoma, od blažih poremećaja u kretanju do težih neuroloških oštećenja. Recesivna forma se po pravilu prepoznaje upravo usled prisustva viška fenilalanina pa se kao takva može otkriti na neonatalnom skriningu. Međutim, u kliničkoj praksi su zabeleženi i retki slučajevi GTPCH1 deficijencije usled recesivne forme bez HPA, što znatno komplikuje dijagnostiku ovog oboljenja (Opladen et al., 2011). Budući da je kod ovog poremećaja sinteza BH₄ prekinuta na prvom koraku, nedostatak GTPCH1 se u profilu pterina u urinu karakteriše veoma niskim ili čak odsutnim neopterinom i biopterinom, što ima dijagnostički značaj pri razlikovanju od drugih formi BH₄ deficijencije.

Do sada je u literaturi zabeležen samo 31 slučaj recesivne forme GTPCH1 deficijencije (Opladen et al., 2012), dok su u BIOPKU bazi podataka prijavljene 144 varijante, od čega je za 6 pokazano da dovode do nastanka HPA. Osim jedne *nonsense* mutacije u prvom egzonu, ostale su sve *missense* tipa i nalaze se u 5. i 6. egzonu. (www.biopku.org).

1.8. GEN *PTS* I *PTPS* DEFICIJENCIJA

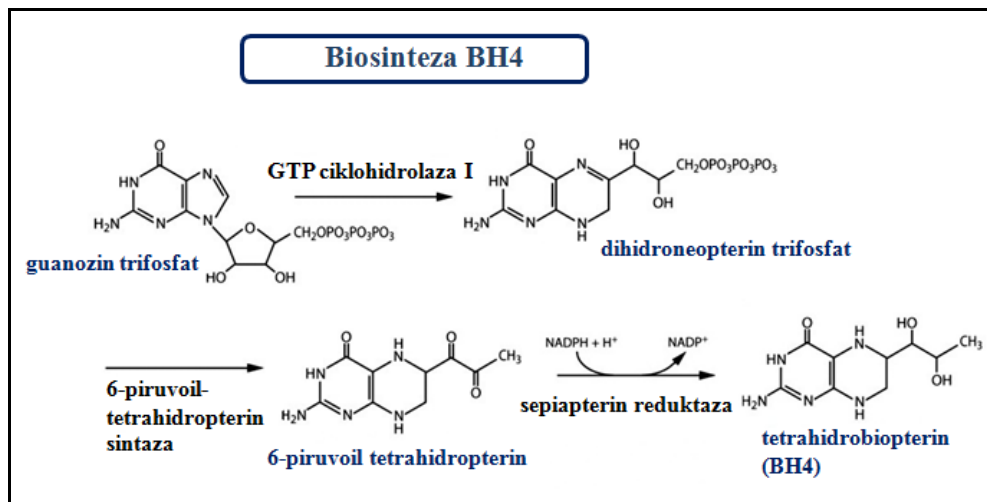
Gen za 6-piruvoil tetrahidropterin sintazu je u humanom genomu lociran na hromozomu 11, u regionu 11q22.3-q23.3. (Kluge et al., 1996). Gen *PTS* ima 6 egzona koji su svi kodirajući. Funkcionalni enzim je homoheksamer veličine 97,5 kDa, pri čemu svaku od subjedinica čini 145 aminokiselina. Ovaj enzim je metaloprotein koji sadrži cink, pri čemu svaka od subjedinica ima vezivno mesto za po jedan Zn²⁺ jon.

PTPS katalizuje drugu po redu reakciju na putu biosinteze BH₄, pri čemu prevodi dihidroneopterin trifosfat u 6-piruvoil tetrahidropterin (Slika 3) (Bürgisser et al., 1994; Kluge et al., 1996).

PTPS deficijencija se grubo može podeliti na teške („tipična“ PTPS deficijencija) i blage fenotipove, koristeći nivo biogenih amina (dopamina i serotonina) u cerebrospinalnoj tečnosti kao dijagnostički marker (Leuzzi et al., 2010). Najveći broj pacijenata koji su klasifikovani kao blaži slučajevi, osim pojave povišenog fenilalanina, uglavnom imaju normalan neurološki razvoj, dok jedan deo njih može ostati i asimptomatski, zahvaljujući očuvanoj homeostazi neurotransmitera, na šta ukazuje nivo biogenih amina u cerebrospinalnoj tečnosti koji je blizak normalnom. Nasuprot tome, kod pacijenata sa teškom deficijencijom PTPS najčešće dolazi do izraženog poremećaja mentalnog razvoja, kao i poremećaja u kretanju različitog opsega, usled značajnog nedostatka neurotransmitera (Opladen et al., 2012). PTPS deficijencija se od drugih formi BH₄ deficijencije može razlikovati po karakterističnom profilu pterina u urinu: u ovom slučaju, prisutan je veoma visok nivo neopterina u kombinaciji sa niskim ili čak i odsutnim biopterinom. Još jedan dijagnostički parametar karakterističan za pacijente sa PTPS deficijencijom je izrazito visok nivo fenilalanina u poređenju sa drugim formama BH₄ deficijencije (Opladen et al., 2012).

PTPS deficijencija je ubedljivo najučestaliji oblik BH₄ deficijencije. U objedinjenom istraživanju pacijenata iz više populacija, sprovedenom od strane Opladena i saradnika, pacijenti sa PTPS deficijencijom su predstavljali 56,7% svih slučajeva BH₄ deficijencija sa HPA, od čega je samo jedna petina njih imala blag fenotip (Opladen et al., 2012). Za pojedine populacije procenat učestalosti može biti i znatno veći, kao u kineskoj populaciji, gde je PTPS deficijencija zaslužna za čak 96% svih slučajeva BH₄ deficijencije (Ye et al., 2013). Do sada je u BIOPKU bazi podataka prijavljeno 88 mutacija u genu *PTS* (www.biopku.org). Mutacije su raspoređene duž svih šest egzona i prva tri introna, pri čemu je samo za azijske populacije pokazano prisustvo relativno čestih mutacija, kao u Kini gde se 4 najčešće mutacije nalaze na preko $\frac{3}{4}$ svih mutiranih alela (Ye et al., 2013), dok je za evropske populacije karakteristična izraženija alelska heterogenost (Thony and Blau 1997; Leuzzi et al., 2009).

Poslednju reakciju na putu biosinteze BH4 katalizuje enzim sepiapterin reduktaza, koji prevodi 6-piruvoil tetrahydropterin u BH4 uz prisustvo NADPH. Kao što je već napomenuto, nedostatak ovog enzima ne dovodi do pojave HPA, tako da neće biti dalje razmatran.



Slika 3. Šematski prikaz enzimskih reakcija koje učestvuju u biosintezi tetrahydrobiopterina. Preuzeto i modifikovano sa <http://www.sandiego.edu>

1.9. GEN *PCBD* I PCD DEFICIJENCIJA

Gen za pterin-4-alfa-karbinolamin dehidratazu se u humanom genomu nalazi na desetom hromozomu, u regionu 10q22 i prostire se na oko 5 kb (Thony et al., 1994). Kasnije je otkriven i paralog ovog gena na petom hromozomu, koji je označen kao DCoH2 (Rose et al., 2004). Gen *PCBD* ima 4 egzona (od čega je prvi nekodirajući), pri čemu i paralog ima istu strukturu. Funkcionalni enzim PCD je homotetramer veličine 47,6 kDa, pri čemu svaka od subjedinica ima 104 aminokiseline. Enzim PCD za supstrat ima 4-alfa-karbinolamin-tetrahydrobiopterin (4-alfa-hidroksi-tetrahydrobiopterin), oblik BH4 koji nastaje pri reakciji hidrosilacije od strane aromatičnih aminokiselina. Dakle, PCD katalizuje reakciju prevođenja 4-alfa-karbinolamin-tetrahydrobiopterina u kinonoidni dihydrobiopterin uklanjanjem vode (Slika 4). Osim enzimske, ovaj protein ima i drugu ulogu, naime, on se vezuje za protein HNF1 (eng. *hepatic nuclear factor*, hepatični nuklearni faktor 1) i ovom interakcijom pojačava njegovu transkripciju

aktivnost. Stoga je PCD poznat i pod nazivom DCoH – (eng. *dimerization cofactor of HNF1 alpha*).

Pacijenti sa deficijencijom PCD su često na početku dijagnostifikovani kao blaže forme deficijencije PTPS, međutim, kod njih je pojava HPA prolazna (prisutna samo u ranom neonatalnom periodu), i sa vremenom povišeni nivo fenilalanina uočen na rođenju opada. Takođe, u retkim slučajevima gde su zabeleženi neurološki poremećaji, oni su bili blaži i prolazni, tako da se terapija suplementacije sa BH4 sprovodi samo u prvih par meseci života (Blau et al., 2001). Smatra se da je za blagu kliničku sliku ovog oblika BH4 deficijencije odgovoran mehanizam kompenzacije od strane DCoH2 paraloga (Hevel et al., 2006). PCD deficijenciju je od PTPS deficijencije moguće razlikovati po profilu pterina u urinu, budući da ove pacijente, osim povišenog neopterina i niskog biopterina, odlikuje i prisustvo primapterina (izomera biopterina) u urinu (Blau et al., 1989).

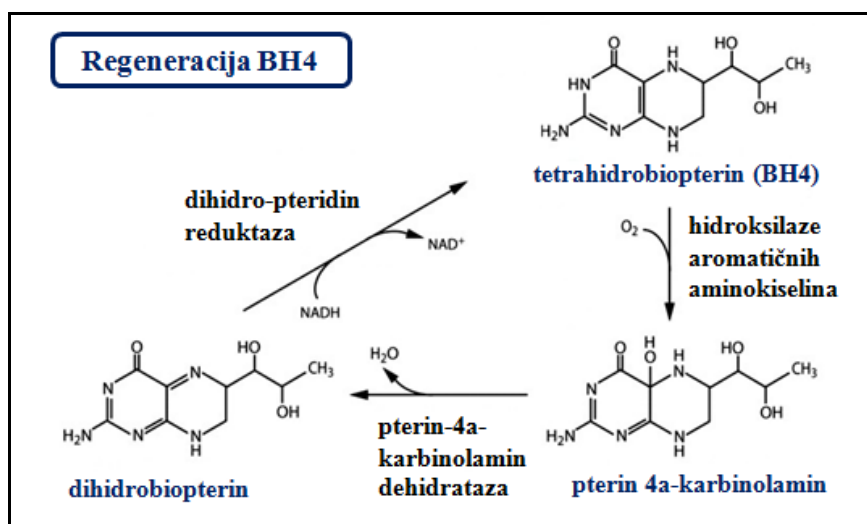
Do sada je u literaturi zabeleženo samo 23 slučaja PCD deficijencije (Opladen et al., 2012), dok je u BIOPKU bazi podataka prijavljeno samo 10 mutacija u genu *PCBD*, pri čemu se 7 od njih nalazi u četvrtom egzonu. Osim jedne male delecije, sve mutacije su rezultat promene samo jednog nukleotida (www.biopku.org).

1.10. GEN *QDPR* I *DHPR* DEFICIJENCIJA

Gen za kinonoidnu dihidropteridin reduktazu je označen simbolom *QDPR* (eng. *quinonoid dihydropteridine reductase*) i u humanom genomu se nalazi na četvrtom hromozomu, u regionu 4p15.3. Ovaj gen ima 7 egzona koji su svi kodirajući. Enzim *DHPR* je homodimer, pri čemu svaka od subjedinica ima 244 aminokiseline i veličine je oko 26 kDa. Enzim *DHPR* katalizuje NADH-zavisnu redukciju kinonoidnog dihidrobiopterina u tetrahidrobiopterin, oblik koji je potom pogodan za korišćenje od strane hidroksilaza aromatičnih aminokiselina (Slika 4). Osim uloge u regeneraciji BH4, smatra se da ovaj enzim ima pomoćnu ulogu u metabolizmu folata u mozgu gde, održavajući folat u aktivnoj, tetrahidro formi, obezbeđuje njegovu homeostazu zajedno sa enzimom dihidrofolat reduktazom (Pollock and Kaufman, 1978). Stoga se kod

terapije pacijenata sa DHPR deficijencom preporučuje i suplementacija sa folnom kiselinom. Što se tiče urinarnog profila pterina, za ove pacijente je karakterističan povišen biopterin u kombinaciji sa normalnim nivoom neopterina, međutim, kao dijagnostički test se sve češće koristi analiza aktivnosti DHPR enzima iz uzorka krvi na filter-papiru.

DHPR deficijencija po učestalosti zauzima drugo mesto među BH4 deficijencijama, posle PTPS deficijencije. U studiji Opladen i saradnika, pacijenti sa DHPR deficijencijom su predstavljali 34,7% svih slučajeva BH4 deficijencija sa HPA (Opladen et al., 2012). Do sada je u BIOPKU bazi podataka prijavljeno 40 mutacija u genu *QDPR*. Mutacije su raspoređene duž svih egzona, pri čemu su najčešće *missense* (preko 60%), dok su u okviru četvrtog i petog introna uočene i *splice* mutacije (www.biopku.org).

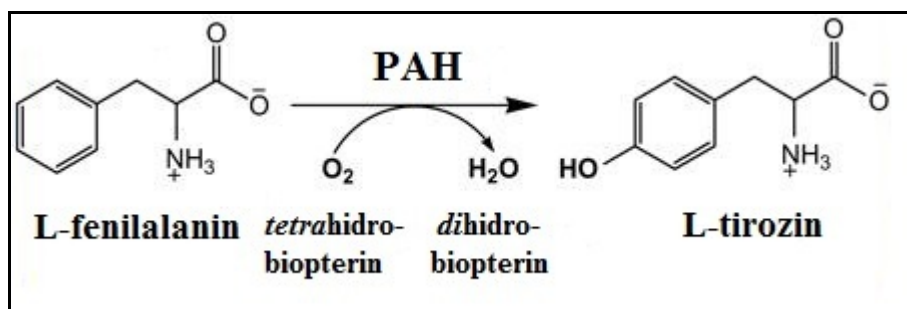


Slika 4. Šematski prikaz enzimskih reakcija koje učestvuju u regeneraciji tetrahidrobiopterina. Preuzeto i modifikovano sa <http://www.sandiego.edu>

1.11. ENZIM PAH – STRUKTURA I EKSPRESIJA

Enzim fenilalanin hidrosilaza katalizuje konverziju L-fenilalanina (L-Phe) u L-tirozin (L-Tyr) u prisustvu esencijalnog kofaktora BH4 i kiseonika (Slika 5). U toku ove reakcije, molekularni kiseonik se heterolitički raskida, a potom dolazi do ugradnje po

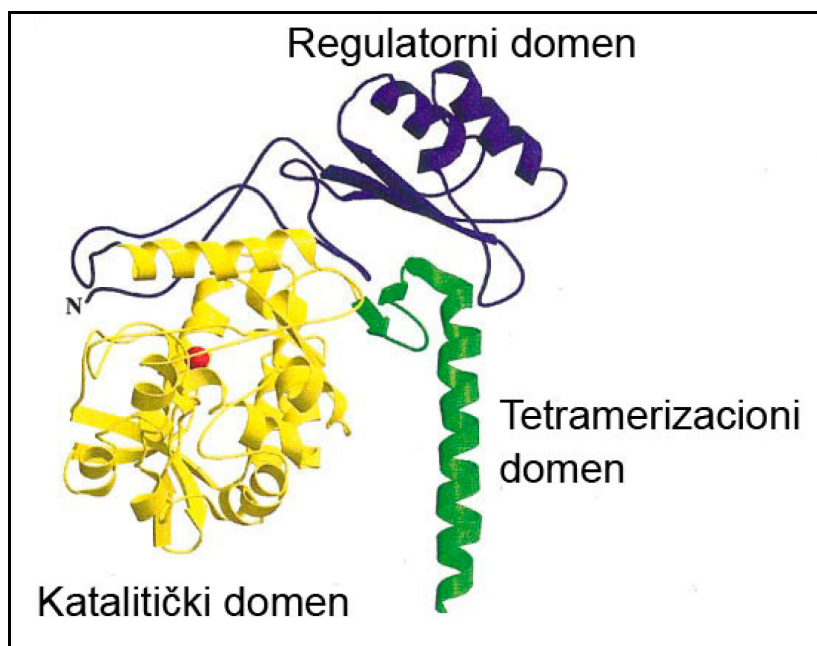
jednog atoma kiseonika u supstrat fenilalanin i kofaktor BH₄. S obzirom da atom kiseonika koji se uvodi u sastav tirozina potiče od molekularnog kiseonika, a ne od molekula vode, može se reći da je fenilalanin hidroksilaza zapravo oksigenaza, i to monooksigenaza (Kaufman et al., 1962). Ovaj metaloprotein zahteva gvožđe (Fe II) za katalitičku aktivnost (Fisher et al., 1972; Woo et al., 1974).



Slika 5. Reakcija katalizovana enzimom PAH u kojoj se, uz pomoć kofaktora tetrahidrobiopterina (BH₄) i kiseonika (O₂), fenilalanin prevodi u tirozin. Preuzeto i modifikovano sa <http://openwetware.org>.

Aktivna forma fenilalanin hidroksilaze je homotetramer, pri čemu se protein u fiziološkim uslovima nalazi u obliku homodimera i homotetramera, koji su u ravnoteži. Svaku subjedinicu čine 452 aminokiseline, dok molekulska težina jedne subjedinice iznosi oko 50 kDa (tačnije, između 50 i 53 kDa, u zavisnosti od fosforilacije serina na poziciji 16). Kao i kod druge dve hidroksilaze aromatičnih aminokiselina (tirozin hidroksilaze i triptofan hidroksilaze), i u okviru ovog enzima je moguće razlikovati tri domena: regulatorni N-terminalni domen, katalitički domen i C-terminalni domen zadužen za oligomerizaciju (Slika 6). Regulatorni domen (koji se prostire od 1. do 142. aminokiseline) ima standardni α - β sendvič motiv, koji se inače sreće kod regulatornih domena. Sa jedne strane β -ploče, koja se sastoji od četiri antiparalelna lanca, nalaze se dve kratke α -spirale, dok je sa druge strane pozicioniran katalitički domen (Kobe et al., 1999). Katalitički domen (od 143. do 410. aminokiseline) čini 14 α -spirala i 8 β -lanaca, i u okviru ovog dela se nalazi gvožđe, koje je koordinativno vezano za His285, His290 i Glu330 aminokiselinske ostatke i tri molekula vode. Blizu atoma gvožđa se nalaze i mesta vezivanja kofaktora i supstrata, pri čemu do aktivnog mesta vodi uzak tunel kojim se usmerava supstrat. Domen za tetramerizaciju (od 411. do 452. aminokiseline) čine dva antiparalelna β -lanca i jedna C-terminalna α -spirala koja se prepliće sa α -spiralama

ostalnih subjedinica na taj način formirajući jezgro tetramera. (Flatmark and Stevens 1999; Erlandsen et al., 2000; Andersen et al. 2001; Andersen et al., 2002).



Slika 6. Strukturni model strukture humane fenilalanin hidroksilaze: struktura jedne subjedinice PAH, pri čemu je atom gvožđa prikazan kao crvena sfera. Preuzeto i modificirano iz Erlandsen and Stevens, 1999.

Zahvaljujući opsežnim kristalografskim analizama koje su najpre sprovedene na odvojenim regionima fenilalanin hidroksilaze, a potom i uspešnom sklapanju dobijenih podataka, bilo je naposljetku omogućeno konstruisanje potpunog strukturnog modela PAH enzima (Erlandsen et al., 1997; Fusetti et al., 1998, Kobe et al., 1999). Uz detaljno poznavanje strukture PAH proteina, ubrzo je bilo omogućeno i proučavanje efekta konkretnih mutacija koje dovode do nastanka fenilketonurije (Flatmark, 1997). S vremenom su razvijeni i mnogobrojni kompjuterski algoritmi uz pomoć kojih je moguće uraditi *in silico* analizu efekta detektovane promene u strukturi PAH proteina, i na taj način pretpostaviti da li je reč o mutaciji (Pey, 2007). Međutim, za definitivnu potvrdu efekta mutacije neophodno je sprovesti *in vitro* analize – eksprimirati mutirani protein u kontrolisanom okruženju, tj. u odabranom eksperimentalnom modelu, kako bi se podrobno ispitala njegova svojstva.

Prva *in vitro* ekspresiona analiza enzima PAH je pretpostavljala kloniranje normalne, nemutirane (*wild type, wt*) cDNK gena *PAH* čoveka u plazmidni vektor, zatim njegovu transfekciju u ćelije u kojima nema endogene ekspresije PAH proteina, i na kraju karakterizaciju nastalog funkcionalnog enzima (Ledley et al., 1985; Ledley et al., 1987). Sledeći koraci su obuhvatili analizu različitih mutiranih enzima, gde je uz pomoć mesto-specifične mutageneze uvođena željena mutacija u gen *PAH*. Osim definitivne potvrde da li je analizirana promena zapravo mutacija koja dovodi do razvoja bolesti, kao i koliki je njen efekat na funkcionalnost proteina, *in vitro* ekspresiona analiza takođe doprinosi razumevanju molekularnog mehanizma tj. načina na koji mutacija dovodi do narušavanja funkcionalnosti enzima. Kao eksperimentalni modeli *in vitro* ekspresione analize enzima PAH su uglavnom korišćene permanentne sisarske ćelijske linije (humane hepatoma ćelije, COS ćelije, itd.), koje u najvećoj meri oponašaju ćelijsko okruženje u kome je PAH inače i ekspresiran kod čoveka, a to su jetra i u znatno manjoj meri bubrezi (Zhang et al., 1997; Gamez et al., 2000). U slučaju da u odabranom ćelijskom modelu već postoji endogena ekspresija PAH, ona je izbegnuta detektovanjem isključivo enzima PAH ekspresiranog sa transfekovanog vektora, što je postignuto upotrebom specifičnih antitela (Aguado et al., 2006). Takođe, za *in vitro* ekspresione analize su korišćeni i prokariotski sistemi (npr. bakterija *E. coli*), u kojima je proučavana stabilnost mutiranog proteina (Martinez et al., 1995). Osim toga, ekspresija u *E. coli* je omogućavala i proizvodnju, kao i prečišćavanje velikih količina enzima PAH koje su bile neophodne za dalje detaljnije strukturne i funkcionalne analize.

1.12. ENZIM PAH – EFEKAT MUTACIJA NA STRUKTURU I FUNKCIJU

Mutacije u genu *PAH* dovode do poremećaja u funkciji i/ili strukturi enzima PAH, što uzrokuje smanjenu ili potpuno odsutnu aktivnost fenilalanin hidroksilaze. Efekat na protein zavisi od prirode same mutacije. Velike delecije (kao što su delecije nekoliko desetina nukleotida, ili čak čitavih egzona) dovode do ogromnih promena u primarnoj strukturi proteina i samim tim dovode do potpunog ukidanja aktivnosti

enzima. Mutacije koje pogađaju iskrajanje transkripta imaju sličan efekat, jer u najvećem broju slučajeva dovode do izostanka funkcionalnog transkripta i proteina. Aminokiselinske zamene koje uzrokuju nastanak preuranjenog stop kodona dovode do prestanka translacije pri čemu nastaje skraćeni i u najvećem broju slučajeva potpuno nefunkcionalan protein. Delecije i insercije koje dovode do izmenjenog okvira čitanja (eng. *frameshift mutations*) dovode do sinteze izmenjenog polipeptida, i najčešće takođe do preuranjenog stop kodona. Ove mutacije su označene kao funkcionalno nulte mutacije, budući da dovode do potpunog izostanka aktivnosti enzima PAH. Pored navedenih tipova mutacija, funkcionalno nultom mutacijom se smatraju i *missense* mutacije za koje je u *in vitro* esejima potvrđena enzimaska aktivnost manja od 10% nemutiranog PAH enzima (Guldborg et al., 1998). Ostale *missense* mutacije dovode do manjeg ili većeg poremećaja u funkciji i/ili strukturi enzima PAH, što uzrokuje širok opseg mogućeg smanjenja aktivnosti. Podaci iz *in vitro* studija ukazuju da aktivnost mutiranih enzima PAH varira od 0% do skoro 100% u odnosu na aktivnost wtPAH (Waters, 2003).

1.13. ENZIM PAH – STABILNOST I STABILIZACIJA STRUKTURE ŠAPERONIMA

Kombinovanje podataka dobijenih iz strukturnih analiza sa rezultatima *in vitro* analiza je otvorilo vrata temeljnom istraživanju efekta pojedinačnih mutacija kako na trodimenzionalnu proteinsku strukturu, tako i na način na koji izmenjena struktura proteina ima uticaj na njegovu funkciju. Tako je primećeno da najveći broj zabeleženih *missense* mutacija zapravo ne pogađa aktivno mesto enzima te da na taj način dovodi do izostanka aktivnosti PAH enzima (i samim tim nastanka PKU), već da najveći broj *missense* mutacija dovodi do pogrešnog savijanja PAH proteina, poremećaja u oligomerizaciji, njegove smanjene stabilnosti i ubrzane degradacije (Waters, 1999; Waters et al., 2000; Gamez et al., 2000; Waters 2003, Pey et al., 2003; Pey et al., 2007). Budući da pri savijanju peptidnog lanca u funkcionalni protein, a potom i pri oligomerizaciji, često udaljene aminokiseline stupaju u interakciju, teško je predvideti efekat samo na osnovu aminokiselinskih karakteristika i pozicije u proteinu. Ponekad

određena aminokiselina ima presudnu ulogu u postizanju pravilne konformacije proteina, tako da će neka druga aminokiselina na datoj poziciji dovesti do pogrešnog savijanja polipeptida. Međutim, ponekad je moguće uočiti da određena mutacija dovodi do poremećaja važne interakcije između pojedinih aminokiselina, ili da mutirani aminokiselski ostatak fizički ne može da bude smešten u predviđeni prostor a da pritom konformacija enzima ne bude narušena (Erlandsen and Stevens, 1999; Jennings et al., 2000). Dalje, budući da eukariotski enzimi podležu post-translacionoj obradi, treba imati na umu da mutacija može da dovede do ukidanja predviđene ili do nastanka nove post-translacione modifikacije, što opet, može da dovede do smanjene stabilnosti i narušene funkcije enzima (Karve and Cheema, 2011).

1.14. ENZIM PAH – REGULATORNA I ŠAPERONSKA ULOGA BH4

Osim uloge obligatnog kofaktora, BH4 je i na drugi način uključen u pravilno funkcionisanje fenilalanin hidroksilaze. Naime, BH4 (zajedno sa supstratom fenilalaninom) ima ulogu u finoj regulaciji enzimske aktivnosti. Fenilalanin se, osim u katalitičkom domenu, vezuje i u regulatornom domenu, pri čemu funkcioniše kao pozitivni regulator, prevodeći enzim u aktivnu formu. Ovom interakcijom je obezbeđena povećana enzimska aktivnost pri povišenim koncentracijama fenilalanina u hepatocitima (Erlandsen et al., 2004). Sa druge strane, BH4 se takođe vezuje za regulatorni domen fenilalanin hidroksilaze, pri čemu tada enzim zauzima konformaciju u kojoj je njegova aktivnost inhibirana, tačnije, onemogućena je aktivacija fenilalaninom. Ova inhibicija se uklanja kada se fenilalanin, usled povišene koncentracije, veže za regulatorni domen (Jennings, 2001). Valja napomenuti da je za optimalnu aktivnost enzima PAH neophodna i fosforilacija aminokiselskog ostatka Ser-16 (Doskerland et al., 1996).

Pored toga što vezivanje BH4 čini enzim neaktivnim, ova interakcija ima veoma značajnu ulogu u stabilizaciji kako normalnog, tako i mutiranih proteina PAH. Držeći enzim stabilizovanim u konformaciji niske aktivnosti, BH4 na taj način sprečava njegovu ubikvitin-zavisnu degradaciju (Erlandsen et al., 2004; Pey et al., 2004; Perez et

al., 2005; Aguado et al., 2006). Samim tim je povećana količina proteina PAH, tako da se može reći da BH4 ima generalni protektivni efekat sličan šaperonskom na fenilalanin hidroksilazu.

Već je napomenuto da BH4 ima važnu ulogu u terapiji određenog broja pacijenata sa PKU, pri čemu pozitivan odgovor zavisi od genotipa. Poznavajući mehanizam kojim BH4 deluje na enzim PAH, može se zaključiti da će vezivanjem za BH4 i delimično funkcionalne, mutirane forme proteina PAH biti sačuvane od degradacije. Za pozitivan odgovor na BH4 je stoga neophodna rezidualna aktivnost enzima. Budući da funkcionalno nulte mutacije dovode do potpunog izostanka aktivnosti PAH, one neće imati odgovor na BH4. Sa druge strane, za neke *missense* mutacije je moguće očekivati pozitivan odgovor na BH4. Upravo su destabilizujuće mutacije, koje dovode do pogrešnog savijanja proteina PAH najbolji kandidati za pozitivan odgovor na BH4. Interakcija sa BH4 će ovakve mutirane proteine držati u stabilnijoj, kompaktnijoj formi koja je manje podložna ubikvitin-zavisnoj degradaciji, što će dovesti do veće količine proteina koji ima rezidualnu aktivnost, što će na kraju dovesti do fiziološki značajnog sniženja nivoa fenilalanina u krvi pacijenta. Stoga je pri funkcionalnoj karakterizaciji *missense* mutacija u eukariotskom *in vitro* sistemu poželjno ispitati i dejstvo BH4. Pri proučavanju efekta mutacija na pravilno savijanje proteina, BH4 se dodaje u obliku prekursora sepiapterina i potom se analizira količina mutiranog proteina. Na osnovu ovih podataka je moguće okarakterisati mutaciju kao onu koja odgovara ili ne odgovara na BH4, što ima presudan uticaj na odabir terapije za pacijenta sa PKU.

1.15. PKU FENOTIP I KORELACIJA SA GENOTIPOM

Iako se fenilketonurija može smatrati školskim primerom monogenске bolesti, asocirani PKU fenotip je izuzetno složen, i zapravo predstavlja čitav spektar različitih fenotipova u zavisnosti od težine kliničke slike. Među pacijentima sa PKU ima onih čija je klinička slika toliko blaga da im dijeta nije obavezna, međutim, mnogo su brojniji oni koji bez pravovremenog lečenja razvijaju karakterističan PKU fenotip – izraženu mentalnu retardaciju. Sa druge strane, PKU fenotip se može posmatrati iz više različitih

uglova u smislu da li je reč o nivou enzimske aktivnosti mutiranog enzima PAH, nivoa fenilalanina u krvi, ili, kao krajnje konsekvence, IQ vrednosti pacijenta. Stoga se PKU fenotip može raščlaniti na enzimatski fenotip (koji obuhvata nivo aktivnosti enzima), metabolički fenotip (nivo fenilalanina u krvi) i na kraju kognitivni fenotip – stepen mentalne retardacije u odsustvu pravovremene primene terapije (Scriver and Waters, 1999; Scriver et al., 2008).

U kliničkoj praksi je bilo neophodno ovaj kontinuum fenotipova podeliti u nekoliko kategorija, zbog lakše primene u dijagnostici i pri određivanju terapije, a za klasifikaciju pacijenata sa PKU je korišćen metabolički fenotip. Tako su pacijenti sa PKU razvrstani u tri fenotipske kategorije na osnovu koncentracije fenilalanina u krvi pre početka terapije (Trefz et al., 1985). Pacijenti kod kojih nivo fenilalanina iznosi preko 1200 $\mu\text{mol/l}$ su svrstani u kategoriju klasične fenilketonurije, pacijenti kod kojih se nivo fenilalanina kreće od 600-1200 $\mu\text{mol/l}$ su svrstani u kategoriju blage fenilketonurije, i na kraju, pacijenti kod kojih nivo fenilalanina ne prelazi 600 $\mu\text{mol/l}$ su svrstani u kategoriju blage hiperfenilalaninemije. Pacijenti sa blagom hiperfenilalaninemijom imaju najblažu kliničku sliku, i kod njih najčešće nije neophodna primena PKU niskoproteinske dijeta. Sa druge strane, pacijenti sa blagom i klasičnom PKU zahtevaju striktno pridržavanje lečenja da bi postigli normalan psihomotorni razvoj i izbegli nastanak mentalne retardacije (Guldberg et al., 1998; Güttler, 1980; Guttler and Guldberg 2000; Scriver et al., 2008). Klasifikacija se može izvršiti i u odnosu na drugi parametar - u odnosu na toleranciju fenilalanina u ishrani (Guldberg et al., 1998). Iako se vrednosti iz ova dva dijagnostička testa uglavnom poklapaju za većinu pacijenata, zabeleženi su i pacijenti kod kojih to nije slučaj (Đorđević et al., 2013), što sugeriše da je poželjno izvršiti oba testa kad god je to moguće.

Već je napomenuto da rezidualna aktivnost enzima PAH kod različitih mutiranih formi obuhvata širok opseg koji se kreće od nemerljive pa do skoro 100%. Kada se uzme u obzir da je do sada u bazama podataka prijavljeno preko 750 mutacija u genu *PAH* (www.biopku.org), kao i da najveći broj pacijenata u svom genotipu nosi dve različite mutacije, postaje jasno koliko se rezultujući fenotip usložnjava. Osim toga, kod ovakvih pacijenata (složenih ili kombinovanih heterozigota) ponekad dolazi do pojave

interalelske komplementacije između pojedinačnih oligomera sa različitim mutacijama u okviru heteromernog enzima PAH (Leandro, 2006; Leandro et al., 2011). Pored prisustva mutacija koje dovode do razvoja PKU, na fenotip pacijenata bi mogle da utiču i druge varijante u okviru inače malo istraženog lokusa *PAH*, koje bi, formirajući gensko okruženje, imale uticaja na transkripciju i ekspresiju gena *PAH* (Scriver and Waters, 1999). Međutim, da bi se u potpunosti razumela genetička osnova jedne bolesti, nije dovoljno posmatrati samo jedan lokus, čak i u slučaju monogenских oboljenja. Neophodno je otkriti sve gene koji bi mogli da doprinesu konačnom ishodu bolesti kroz različite biohemijske puteve, kako na nivou ćelije, tako i na nivou čitavog organizma. Dakle, da bi se dobila kompletna slika, treba identifikovati ove gene modifikatore i što bolje upoznati njihovu ulogu u funkcionisanju mutiranog enzima PAH u okviru hepatocita, i dalje proučiti koji to proteini sve mogu imati uticaj na put fenilalanina u organizmu, od trenutka kada uđe u organizam, pa sve do njegovog prelaska kroz krvno-moždanu barijeru i oštećenja neurona. Geni modifikatori PKU fenotipa su novo i još uvek nedovoljno proučeno polje istraživanja i o njima će biti reči kasnije.

S obzirom na mnogobrojne faktore koje treba uzeti u obzir, ponekad je teško uvideti jasnu vezu između PKU fenotipa i njegove glavne odrednice - mutiranog genotipa *PAH*. Međutim, korelacija genotip – fenotip (nivo fenilalanina u krvi) je primećena u velikom broju slučajeva. Studije koje su uključivale veliki broj pacijenata iz nekoliko različitih metaboličkih centara sugerisale su da je korelacija često prisutna, i na ovaj način je analiziran efekat velikog broja mutacija (Kayaalp et al., 1997; Guldborg et al., 1998). Korelacija genotip – fenotip je vršena samo kod pacijenata kod kojih je bilo moguće pratiti izolovan efekat samo jedne mutacije. U takve pacijente se ubrajaju homozigoti za datu mutaciju, kao i funkcionalno hemizigotni pacijenti, koji nose jednu funkcionalno nultu mutaciju, tako da sva aktivnost zapravo potiče od druge mutacije prisutne u genotipu. U ovim studijama je pokazana konzistentnost u odnosu na efekat za većinu mutacija, te je za ovakve slučajeve čak bilo moguće relativno precizno predvideti fenotip na osnovu prisustva određene mutacije (Kayaalp et al., 1997; Guldborg et al., 1998). Međutim, kroz brojne studije su zabeleženi slučajevi mutacija koje su u nekim studijama povezivane sa blažom kliničkom slikom, dok je u drugima njihovo prisustvo nedvosmisleno ukazivalo na klasičnu PKU, dakle, reč je o fenotipski inkonzistentnim mutacijama (Bercovich et al., 2008; Santos et al., 2010; Zhu et al.,

2013; Đorđević et al., 2013). Za objašnjavanje efekta inkonzistentnih mutacija je predložen model „praga“ gde se pretpostavlja postojanje dva nivoa funkcionalnosti mutiranog proteina. Ovaj model predlaže da postoji nivo ispod koga će uvek biti uočena teška klinička slika – dakle, „teške“ mutacije će uvek dovesti do nastanka teže kliničke slike, dok će, sa druge strane, u slučaju „lakih“ mutacija biti obezbeđen dovoljan nivo funkcionalnosti mutiranog proteina da bi se ispoljila blaža klinička slika. Između ova dva praga se nalazi neodređeni opseg u okviru koga mutacije ne koreliraju sa fenotipom, te stoga dodatni faktori (genetički i sredinski) imaju uticaja na finalni fenotip (Dipple and McCabe, 2000). Dakle, dodatni faktori imaju znatno uži prostor delovanja u slučaju izrazito teških i izrazito lakih mutacija, dok u slučaju mutacija koje dovode do delimično aktivnog proteina ovi faktori više dolaze do izražaja što dovodi do pojave inkonzistentnih mutacija. Iako je u vreme prvih studija o korelaciji između genotipa i fenotipa postojala nada da će identifikacija dve poznate mutacije u genu *PAH* biti dovoljna za predviđanje težine kliničke slike i uvođenje optimalne terapije, ubrzo je bilo jasno da je za uspešnu primenu u medicinskoj praksi neophodno otkriti sve faktore koji dovode do formiranja finalnog PKU fenotipa (Scriver and Waters, 1999).

Prvi korak ka razumevanju komplikovanog odnosa genotip – fenotip je svakako što bolje upoznavanje samog *PAH* lokusa, i što opsežnije proučavanje genskog okruženja – genetičke sekvence uključene u finu regulaciju transkripcije *PAH* gena.

1.16. REGULACIJA TRANSKRIPCije GENA *PAH*

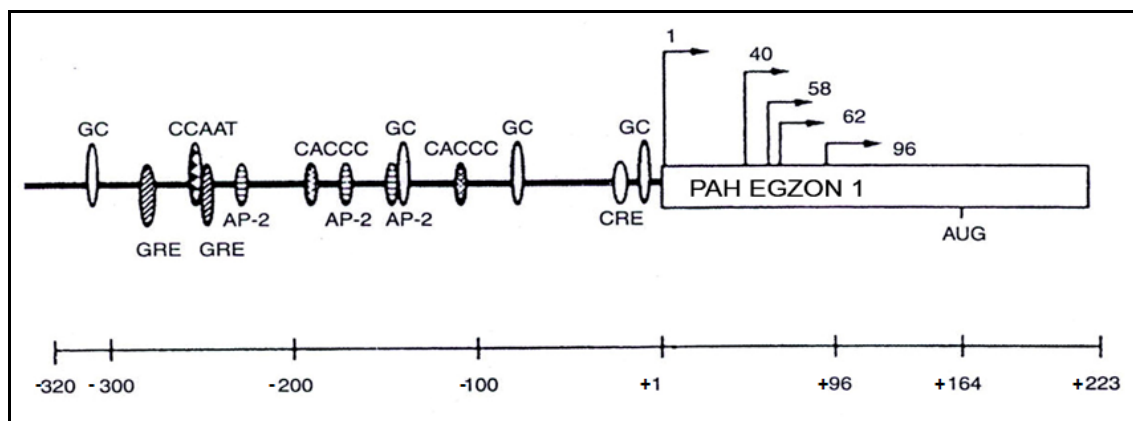
Regulacija transkripcije podrazumeva vremenski i prostorno precizno organizovane procese koji uključuju proteinske transkripcione faktore, kao i *cis*-regulatorne elemente prisutne u okviru gena (Orphanides and Reinberg, 2002). Promotorska sekvenca, koja je pozicionirana uzvodno od gena koji se prepisuje (blizu starta transkripcije gena) predstavlja jedan od glavnih regulatornih regiona. Međutim, za finu regulaciju transkripcije su često neophodni i drugi regulatorni elementi koji se mogu naći i u drugim regionima gena, uzvodno ili nizvodno od kodirajuće sekvence (3' i/ili 5' regionu gena), a mogu se naći i u okviru introna. Ovi regulatorni elementi mogu imati funkciju pojačivača transkripcije (enhanseri) kada se za njih vezuju transkripcioni

faktori koji imaju ulogu aktivatora, dok su regulatorni elementi koji smanjuju nivo transkripcije poznati kao utišivači (sajlenseri) i za njih se vezuju transkripcioni faktori sa ulogom represora (Maston et al., 2006).

Najveći deo istraživanja na polju regulacije transkripcije gena *PAH* je sproveden krajem prošlog veka. Nakon kloniranja cDNK (Woo et al., 1983), a potom i genomske sekvence (DiLella et al., 1986), započeta je potraga za regulatornim elementima koji omogućavaju ekspresiju gena *PAH*. Utvrđeno je da je ekspresija gena *PAH* specifična kako za tkivo, tako i za fazu razvića. Iako se dugo smatralo da je ekspresija fenilalanin hidroksilaze specifična samo za jetru, istraživanja koja su sprovedeli Konecki i saradnici su dokazala prisustvo transkripata gena *PAH* i u bubrezima (gde je pokazano i da dolazi do sinteze funkcionalnog enzima PAH), a u znatno manjoj količini i u pankreasu i mozgu čoveka (Lichter-Konecki et al., 1999). Aktivnost u fetalnoj jetri je primećena već u osmoj nedelji gestacije (Raiha, 1977), dok je u bubrezima uočena nešto kasnije, oko 13. nedelje (Lichter-Konecki et al., 1999). Budući da je u oba slučaja aktivnost PAH zabeležena istovremeno kada i pojava transkripta, pretpostavlja se da je ekspresija gena *PAH* predominantno regulisana na nivou transkripcije (Wang et al., 1992).

U prvim eksperimentima koji su se bavili regulatornim elementima odgovornim za ekspresiju gena *PAH* je proučavan 5' kraj gena *PAH* čoveka. Fragment dužine 9 kb koji uključuje 5' kraj i deo prvog egzona gena *PAH* čoveka je bio fuzionisan sa reporterskim *CAT* genom i proučavan u *in vivo* mišjem modelu. Tada je pokazano da su mišje transgene linije eksprimirale konstrukt sa datim fragmentom predominantno u jetri, u isto vreme kada je u toku razvića eksprimiran i endogeni *PAH* gen. Iako je u ovim funkcionalnim esejima pokazano da ispitivani fragment sadrži *cis*-elemente odgovorne za specifičnost ekspresije gena *PAH*, istovremeno je primećeno da ovom fragmentu ipak nedostaju još neki *cis*-elementi koji bi bili uključeni u finu regulaciju ekspresije gena za *PAH* (Wang et al., 1992). Iste godine su okarakterisani i regulatorni elementi u okviru promotora gena *PAH*, i ovom prilikom je otkriveno da se u 5'UTR regionu gena *PAH* nalazi pet potencijalnih mesta inicijacije transkripcije (CAP), od kojih se najudaljenije nalazi 154 nukleotida uzvodno od prvog kodona gde započinje translacija (Konecki et al., 1992). Za promotor gena *PAH* je pokazano da nema TATA blok, kao i da ekspresiju ovog gena reguliše veliki broj različitih transkripcionih faktora

(Slika 7). Naime, u okviru promotora gena *PAH* su identifikovane sledeće regulatorne sekvence: GC boks, CACCC boks, CCAAT boks, aktivator protein 2 (Ap-2) mesto, kao i delimični GRE (eng. *glucocorticoid response elements*, glukokortikoid-odgovarajući elementi) i delimični CRE (eng. *cAMP response elements*, cAMP-odgovarajući elementi) (Konecki et al., 1992). U skorije vreme kada je objavljena referentna sekvenca gena *PAH* (GeneBank Accession#: AF404777) ispostavilo se da je pri karakterizaciji promotora korišćena sekvenca bez citozinskog nukleotida na -170 poziciji. Međutim, ovakva kompletna sekvenca nikada nije dodatno analizirana. Naredne studije koje su obuhvatale isti fragment od 9 kb sa 5' kraja gena *PAH* su dovele do karakterizacije minimalnog promotora koji sadrži dva funkcionalna regulatorna elementa, PAH-A i PAH-B, pri čemu su oba elementa neophodna za transkripcionu aktivnost (Wang et al., 1994). Transkripcioni faktori koji se vezuju za ova dva elementa su prisutni i u drugim ćelijskim tipovima, tako da u ovim eksperimentima u okviru proksimalnog promotora nisu otkrivene tkivno-specifične sekvence (Wang et al., 1994). Nešto kasnije su, takođe u okviru istog 9-kb fragmenta sa 5' kraja gena *PAH*, otkrivena i mesta za koja se vezuje hepatični nuklearni faktor 1 (HNF1), transkripcioni faktor uključen u tkivno-specifičnu ekspresiju brojnih gena kao što su α - i β -fibrinogen, α -fetoprotein i albumin (Lei and Kaufman, 1998).



Slika 7. Šematski prikaz proksimalnog promotora gena *PAH*. Prikazani su regulatorni elementi u odnosu na mesto početka transkripcije. Preuzeto i modifikovano iz Konecki et al., 1992.

Imajući na umu da udeo kodirajućih sekvenci u genu *PAH* iznosi manje od 3%, kao i da je u navedenim studijama proučavan samo fragment od 9 kb iz 5' kraja gena

PAH, može se zaključiti da je zapravo najveći deo gena *PAH* ostao neistražen. Stoga su studije sprovedene u Laboratoriji za molekularnu hematologiju (danas Laboratorija za molekularnu biomedicinu) Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, imale za cilj identifikaciju novih *cis*-regulatornih elemenata u okviru nekodirajućih regiona gena *PAH*. U ovoj studiji je kao region od interesa odabran deo osmog introna gena *PAH* čoveka, i to region u koji ulazi poznato polimorfno mesto *XmnI* za koji je *in silico* predikcija pokazala vezivanje transkripcionog faktora. Funkcionalni eseji su pokazali da analizirana sekvenca ima ulogu regulatornog elementa koji dovodi do povećanja transkripcione aktivnosti reporterskog *CAT* gena čak više od tri puta u hepatičnom *in vitro* sistemu. Sa druge strane, kada je ista sekvenca analizirana u nehepatičnom sistemu - eritroleukemičnoj ćelijskoj liniji, nivo aktivnosti reporterskog gena bio je blizu bazalnog. Dalje, u analizama interakcije DNK i proteina je uočeno da se za ispitivanu sekvencu vezuje GATA-1 transkripcioni faktor. Prema tome, zaključeno je da deo osmog introna gena *PAH* predstavlja transkripcioni regulatorni *cis*-element koji vezuje GATA-1 transkripcioni faktor i funkcioniše kao tkivno-specifični enhanser (Stojiljković et al., 2010). Ovo je prvo istraživanje koje je ukazalo na postojanje regulatornog elementa u okviru introna gena *PAH*. Može se reći da ovo otkriće otvara vrata daljem proučavanju novih modulatora transkripcije u okviru do sada neistraženih nekodirajućih regiona gena *PAH* koji bi mogli da doprinesu što boljem razumevanju kompleksnog PKU fenotipa.

Osim bialelskih polimorfnih mesta koja su prisutna u nekodirajućim regionima gena *PAH*, i koja su analizirana u prethodnoj studiji (Stojiljković et al., 2010), u 3' kraju gena *PAH* prisutan je i multialelski, VNTR region. Ovaj AT-bogat (70%) minisatelitski region se nalazi 3 kb nizvodno od poslednjeg egzona (Goltsov et al., 1992). Pokazano je da se ponovci u istom alelu međusobno malo razlikuju po sekvenci i da postoje razlike u broju ponovaka između alela, dok veličina pojedinačnog ponovka iznosi 30 bp (Goltsov et al., 1992). Do sada zabeleženi brojevi ponovaka VNTR su 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12 i 13 (Goltsov et al., 1992; Kamkar et al., 2003). Ponovci podležu tipičnom Mendelovskom nasleđivanju i često su povezani sa određenim mutacijama u genu *PAH*, zbog čega su bili u fokusu istraživanja u cilju prenatalne dijagnostike PKU devedesetih godina prošlog veka (Eisensmith et al., 1994). Međutim, sa unapređenjem dijagnostičkih pristupa, interesovanje za primenu ovih markera vremenom opada.

U poslednje vreme VNTR regionima se pridaje značaj ne samo u populacionim studijama, već su ovi polimorfni markeri sve više prepoznati kao potencijalni regulatori genske ekspresije (Zukić et al., 2010; Brookes, 2013). Ovi multialelski markeri su interesantni upravo zbog svoje polimorfnosti, pa su tako zabeleženi primeri gde alel koji odgovara određenom tipu ponovka ima specifičnu ulogu u regulaciji transkripcije – vezuje određeni transkripcioni faktor (Zukić et al., 2010). Zabeleženi su i primeri VNTR regiona koji se nalaze u 3' kraju gena koji predstavljaju transkripcione elemente za regulaciju ekspresije gena. Tako je pokazano da VNTR koji se nalazi nizvodno od gena za H-RAS1 dovodi do povećanja intenziteta transkripcije (Spandidos and Holmes, 1987). Imajući na umu polimorfnost VNTR regiona u 3' kraju gena za *PAH*, koja se ogleda kako u broju, tako i u arhitekturi pojedinačnih ponovaka, moguće je pretpostaviti da bi neki od alela mogao da ima ulogu regulatornog elementa.

1.17. GENI MODIFIKATORI

Koncept gena modifikatora u nauku je uveo Haldane četrdesetih godina prošlog veka. Još tada su bili primećeni slučajevi pacijenata obolelih od poznate monogenske bolesti, koji su, iako su bili bliski krvni srodnici, imali različite kliničke slike (Haldane, 1941). Poznate monogenske bolesti predstavljaju odličan model sistem za identifikaciju gena modifikatora upravo zbog uniformne etiologije, detaljno istraženog fenotipa i pojavljivanja u porodicama. Gen modifikator se može definisati kao gen koji ima uticaj na fenotipsku ekspresiju drugog gena, pri čemu taj uticaj može biti toliko značajan da nekada izmeni klinički tok bolesti pacijenta. Poznati primeri iz literature uključuju bolesti kao što su cistična fibroza, beta-talasemija i srpasta anemija. U slučaju cistične fibroze do sada je otkriven veliki broj varijanti u različitim genima za koje je pokazano da imaju uticaja na različite aspekte fenotipa, a neki od njih su *MBL2* (Garred et al., 1999; Yarden et al., 2004) i *TGFBI* (Arkwright et al., 2000) za plućni fenotip, *CFMI* za gastrointestinalni fenotip (Zielenski et al., 1999), *TCF7L2* za dijabetes (Blackman et al., 2009). U slučaju beta talasemije i srpaste anemije su otkriveni geni modifikatori koji uzrokuju naslednu perzistenciju fetalnog hemoglobina, stanje koje kod pacijenata sa

deficijencijom funkcionalnih beta globinskih lanaca dovodi do znatno blaže kliničke slike (*BCL11A* (Uda et al., 2008) i *KLF1* (Borg et al., 2010)).

Već je napomenuto da je za sveobuhvatno razumevanje fenilketonurije neophodno na umu imati sve faktore (genetičke i sredinske) koji bi mogli da doprinesu konačnom fenotipu. Pojedini genetički faktori bi mogli da imaju uloge gena modifikatora, i da kodiraju za proteine koji bi imali uticaja kako na mutirani enzim unutar ćelije, tako i na svaku pojedinačnu fazu puta fenilalanina kroz organizam. Kada se ima na umu da najveći broj mutacija u okviru gena *PAH* dovodi do nestabilnog proteina, fenilketonurija se može posmatrati kao konformaciona bolest, budući da je karakterišu povećana degradacija nepravilno savijenih polipeptidnih lanaca (Gregersen et al., 2001). Mutirani protein PAH je tako izložen dejstvu unutarćelijskog sistema za kontrolu kvaliteta proteina koga čine šaperoni, proteaze kao i komponente ubikvitin-zavisne degradacije (Doskerland and Flatmark, 1996; Waters, 2003). Iako se još uvek ne zna koji sve mehanizmi utiču na ubranu degradaciju mutiranog enzima PAH u hepatocitima, može se pretpostaviti da bi varijante u nekom od gena odgovornih za pojedine konstituente ovih sistema mogle da doprinesu kompleksnosti PKU fenotipa.

Poznato je da koncentraciju fenilalanina u organizmu određuju mnogobrojni faktori kao što su: apsorpcija fenilalanina u gastrointestinalnom traktu i potom njegova dalja distribucija po organizmu, unos u jetru preko odgovarajućeg transportera (Salter et al., 1986), zatim transport do bubrega gde se u manjoj meri vrši prevođenje u tirozin (Lichter-Konecki et al., 1999), dalje, treba imati na umu potrebe organizma za sintezom proteina od kojih će zavisiti ugradnja fenilalanina u proteine, i na kraju, degradaciju fenilalanina putem hidrosilacije, transaminacije i dekarboksilacije (Salter et al., 1986). Budući da je očigledno da na ovaj niz složenih procesa može da utiče veliki broj gena, moguće je zamisliti da varijacije u bilo kom od njih mogu da dovedu do dodatnog uslozňavanja PKU fenotipa. Međutim, imajući na umu da glavno obeležje kliničke slike nelečenog pacijenta sa PKU predstavlja mentalna retardacija, kao i da upravo kognitivni PKU fenotip beleži najviše inkonzistencija sa genotipom, posebna pažnja je posvećena proučavanju transporta fenilalanina kroz krvno-moždanu barijeru, kao i načinu na koji fenilalanin u mozgu dovodi do oštećenja neurona (Scriver and Waters, 1999).

Kada je reč o osetljivosti na povišeni nivo fenilalanina, primećeno je da je odgovor pacijenata izrazito individualan, te su tako u kliničkoj praksi uočeni pacijenti sa istim genotipovima (uključujući i bliske srodnike), ali sa potpuno različitim intelektualnim fenotipovima (Ramus et al., 1999). Osim toga, u kliničkoj praksi su čak zabeleženi i slučajevi nelečenih pacijenata sa klasičnom fenilketonurijom koji su imali normalnu inteligenciju (Primrose, 1983). Patogeneza različitih kliničkih slika uprkos sličnim nivoima fenilalanina u krvi je tako ostala nepoznanica, dok nije predloženo objašnjenje u vidu interindividualnih varijacija u koncentraciji fenilalanina u mozgu. Tako je pokazano da neki nelečeni pacijenti sa klasičnom PKU i normalnom inteligencijom, uprkos visokom nivou fenilalanina u krvi, imaju niži nivo fenilalanina u mozgu, u poređenju sa nelečenim pacijentima koji su razvili mentalnu retardaciju (Moller et al., 1998; Weglage et al., 1998). Ovi rezultati su ukazivali na interindividualne razlike u transportu fenilalanina kroz krvno-moždanu barijeru. Stoga su kao mogući geni modifikatori prepoznati geni odgovorni za transportere fenilalanina kroz krvno-moždanu barijeru.

Transport fenilalanina kroz krvno-moždanu barijeru vrši izmenjivački L-tip transporter velikih neutralnih aminokiselina prisutan u membranama endotelnih ćelija kapilara u mozgu (Choi and Pardridge, 1986). Osim fenilalanina, ovaj transporter prenosi i druge velike neutralne aminokiseline (eng. *LNAA*, *large neutral amino acid*) kao što su leucin, izoleucin, valin, tirozin, triptofan, metionin i histidin, pri čemu je pokazano da najveći afinitet ima za fenilalanin (Hargreaves and Pardridge, 1988). Budući da aminokiseline kompetiraju za mesto na transporteru, uočeno je da je, pri povišenim koncentracijama fenilalanina, ovaj transporter inhibiran za prenos drugih aminokiselina (Shulkin et al., 1995). Ovaj heterodimerni transporter je kodiran od strane dva gena, *LATI* i *4F2hc* (Kanayi et al., 1998). U studiji koja je za odabranu grupu imala pacijente sa klasičnom PKU i niskim nivoom fenilalanina u mozgu, proučavani su upravo ovi geni, ali njihovom analizom nisu uočene varijante koje bi mogle da dovedu do sinteze izmenjenog proteina (Moller et al., 2005). U drugoj studiji je u okviru *LATI* gena identifikovana jedna varijanta koja dovodi do promene u strukturi proteina (Bik-Multanowski and Pietrzyk, 2006). Međutim, još uvek nema dovoljno dokaza da analizirani geni uključeni u transport fenilalanina imaju značajan uticaj na kognitivni

fenotip pacijenata sa PKU, tako da je potraga za novim genima modifikatorima nastavljena.

Proučavanje transporta fenilalanina kroz krvno-moždanu barijeru je značajno jer je otvorilo i jedno novo gledište o mehanizmu nastanka mentalne retardacije kod pacijenata sa PKU. Naime, iako se dugo smatralo da je višak fenilalanina sam po sebi primarni uzročnik mentalne retardacije, dakle da fenilalanin ima direktan neurotoksični efekat, jedno od drugačijih mišljenja je da zapravo taj veliki višak fenilalanina remeti transport drugih aminokiselina kroz krvno-moždanu barijeru i tako doprinosi kognitivnoj disfunkciji (van Spronsen et al., 2009; de Groot et al., 2010). Imajući na umu da veliki višak fenilalanina kompetitivno inhibira transport drugih velikih neutralnih aminokiselina, izvesno je očekivati da će nedostatak ovih aminokiselina uzrokovati poremećaj sinteze proteina u mozgu. Sa druge strane, nedostatak određenih aminokiselina kao što su triptofan i tirozin može da dovede do poremećaja u sintezi neurotransmitera (dopamin, serotonin, adrenalin i noradrenalin). I zaista, u istraživanjima na animalnom modelu fenilketonurije, Pah^{enu} mišu, pokazano je smanjenje sinteze proteina i neurotransmitera u mozgu (Smith and Kang, 2000; Surtees and Blau, 2000; Puglisi-Allegra et al., 2000). Međutim, i dalje se ne može sa sigurnošću tvrditi da je ovo smanjenje uzrokovano isključivo nedostatkom aminokiselina usled poremećenog transporta kroz krvno-moždanu barijeru, i da definitivno treba uzeti u obzir i druge moguće mehanizme nastanka mentalne retardacije.

Sa druge strane, postoje brojni podaci koji ukazuju na to da fenilalanin sam po sebi ispoljava toksični efekat na osetljivi centralni nervni sistem u razvoju (Huttenlocher, 2000; Gazit et al., 2003). Morfološka i histoanatomska zapažanja sa autopsije mozgov nelečenih pacijenata sa PKU su ukazala na gubitak neurona usled neurodegeneracije, gubitak sinapsi, kao i smanjeno grananje dendritskih nastavaka (Bauman and Kemper, 1983). Studije na mišjim primarnim kortikalnim neuronima su pokazale da povećana koncentracija fenilalanina dovodi do smanjenja sinaptičke gustine i poremećaja u grananju dendritskih nastavaka (Horster et al., 2006). Osim toga, pokazano je da visoka koncentracija fenilalanina ima funkciju modulatora glutamatergičkih sinapsi koje su važne za učenje i memoriju (Yarotsky et al., 2005). Tačan mehanizam putem koga fenilalanin uzrokuje sve ove promene još uvek nije u

potpunosti istražen. Jedno od mogućih objašnjenja leži u rastućem broju podataka da fenilalanin zapravo dovodi do oksidativnog stresa i da upravo na taj način dovodi do neurodegeneracije (Kienzle Hagen et al., 2002; Sirtori et al., 2005; Vargas et al., 2011). Tako je pokazano da fenilalanin izaziva oksidativni stres u hipokampusu, delu mozga zaduženom za učenje i memoriju, kao i u cerebralnom korteksu, koji je takođe oštećen kod pacijenata sa PKU (Fernandes et al., 2009). U skorašnjim studijama je pokazano da fenilalanin čak dovodi i do oštećenja DNK u mozgu pacova (Simon et al., 2013). Svi ovi podaci ukazuju da je neurodegeneracija, nastala usled oksidativnog stresa i povećanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species, ROS*), bar donekle uključena u nastanak mentalne retardacije kod PKU pacijenata. Stoga bi mogući geni modifikatori mogli da uključuju i gene sa varijantama za koje literaturni podaci upućuju da imaju uticaja na neurodegeneraciju i oksidativni stres.

Jedna od varijanti za koju u literaturi postoje podaci koji ukazuju na povezanost sa neurodegeneracijom i oksidativnim stresom je m.10398A>G u mitohondrijskom *MT-ND3* genu. Ovaj gen kodira za subjedinicu 3 nikotinamid adenin dinukleotid dehidrogenaze, enzima koji pripada Kompleksu I elektron-transportnog lanca na unutrašnjoj membrani mitohondrija, pri čemu varijanta m.10398A>G rezultuje u nesinonimnoj aminokiselinskoj zameni treonina alaninom. Interesantno je napomenuti da ova varijanta pokazuje izraženu populacionu specifičnost, tako da je za evropske populacije karakteristična znatno veća učestalost m.10398A alela, dok je za azijske i afričke populacije alel m.10398G znatno učestaliji (Torroni et al., 1994). Ova varijanta je u nizu studija bila asocirana sa različitim neuropsihijatrijskim i neurodegenerativnim oboljenjima, kao što je bipolarni poremećaj (Mc Mahon et al., 2000) i Alchajmerova bolest (Kato et al., 2003), pri čemu je u ovim studijama m.10398A alel prepoznat kao rizični alel. U studiji koja je ispitala povezanost sa Parkinsonovom bolešću je m.10398G alel prepoznat kao protektivni faktor (Van der Walt et al., 2003). Funkcionalne analize su pokazale da prisustvo m.10398A u *MT-ND3* genu remeti pH i nivo kalcijuma u mitohondrijama, što vodi ka povećanom oksidativnom stresu i povišenoj koncentraciji ROS (Kazuno et al., 2006). Mehanizmi koji bi objasnili mogući uticaj ove varijante na neurodegeneraciju predlažu povećanu produkciju ROS i povećanu apoptozu neurona usled oksidativnog stresa. Pretpostavlja se da prisustvo m.10398A menja strukturu Kompleksa I što vodi povećanoj produkciji ROS upravo na

ovom delu elektron-transportnog lanca, a na to ukazuje i podatak da ćelije koje nose m.10398A imaju povećanu koncentraciju ROS u poređenju sa ćelijama sa m.10398G (Kulawiec et al., 2009).

Imajući na umu veliki broj podataka iz literature koji ukazuju da fenilalanin dovodi do oksidativnog stresa i povećane produkcije ROS, što može da vodi ka neurodegeneraciji, moglo bi se pretpostaviti da su stoga pacijenti sa PKU koji imaju m.10398A alel osetljiviji na oštećenje neurona usled oksidativnog stresa koji uzrokuje višak fenilalanina, i samim tim, da bi mogli ispoljiti izraženiji kognitivni deficit. U tom slučaju bi pacijenti sa PKU koji su nosioci m.10398A alela trebalo da se što duže pridržavaju dijeta sa niskim sadržajem fenilalanina kako bi izbegli dodatna oštećenja mozga. Ukoliko bi se ova hipoteza ispostavila kao tačna, to bi sa jedne strane bilo od značaja za kliničku praksu, dok bi, sa druge strane, dodatno rasvetlilo mehanizam nastanka oksidativnog stresa i kognitivnog deficita kod pacijenata sa PKU, što bi mitohondrijski *MT-ND3* gen sa m.10398A>G varijantom označilo kao potencijalnog kandidata za ulogu gena modifikatora kognitivnog PKU fenotipa.

Sagledavajući ogroman broj faktora iz najrazličitijih biohemijskih i fizioloških puteva koji bi mogli da imaju uticaja na formiranje konačnog kognitivnog PKU fenotipa, otkrivanje potencijalnih gena modifikatora može da deluje kao traženje igle u plastu sena. Međutim, određeni pristupi u istraživanju mogu da budu manje ili više uspešni. Jedan od pristupa predstavlja studija genetičke asocijacije, gde kandidate čine pojedine varijante i geni za koje literaturni podaci ukazuju da su povezane sa nekim od uočenih aspekata PKU fenotipa (kao npr. m.10398A>G varijanta sa neurodegeneracijom). Međutim, najveći problem u studijama genetičkih asocijacija predstavlja veličina uzorka, koja mora biti dovoljno velika da bi studija imala zadovoljavajuću statističku moć. Imajući na umu da je fenilketonurija retka bolest, gde su pacijenti sa dovoljno ujednačenim fenotipovima još ređi, može se odmah uvideti da su takve studije asocijacije teže izvodljive. Sa druge strane, zahvaljujući ubrzanom napretku tehnologije, moguće je za identifikaciju gena modifikatora odabrati sofisticirane tehnologije koje omogućavaju da se veliki broj gena analizira odjednom, kao što je sekvenciranje nove generacije. U takve studije je stoga moguće uključiti i

manji broj pacijenata, pri čemu njihov izbor mora biti baziran na izuzetno dobro definisanom fenotipu, što homogenijem unutar odabrane grupe. Za ovakve studije su posebno interesantni pacijenti sa karakterističnim kognitivnim fenotipovima, kao što su neleženi pacijenti sa genotipom karakterističnim za klasičnu fenilketonuriju koji nisu razvili mentalnu retardaciju. Za ovakve pacijente je moguće pretpostaviti da u svojim genomima imaju određene protektivne faktore, koji su, svojim uticajem na neku od komponenti složenog puta od fenilalanina do neurona, doveli do ispoljavanja sasvim neočekivane kliničke slike.

2. CILJEVI

Budući da hiperfenilalaninemija obuhvata fenilketonuriju i BH4 deficijenciju, njena genetička osnova je heterogena (geni *PAH*, *PTS*, *GTPCH*, *QDPR* i *PCBD*). Iako je molekularnogenetička karakterizacija gena *PAH* otpočela 2004. godine u Srbiji, neophodno je uspostaviti dodatne metode radi sveobuhvatne identifikacije i funkcionalne karakterizacije varijanti identifikovanih u različitim genima uzročnicima HPA. Ovakav pristup imao bi značajnu primenu za diferencijalnu dijagnostiku pacijenata sa HPA u Srbiji i pravovremeno uvođenje odgovarajuće terapije specifične za genotip pacijenta. U slučaju fenilketonurije, iako mutirani genotip *PAH* predstavlja glavnu odrednicu PKU fenotipa, primećeno je da nije uvek moguće predvideti fenotip samo na osnovu genotipa. Smatra se da genetički faktori koji doprinose razvoju finalnog PKU fenotipa (posebno kognitivnog PKU fenotipa) još uvek nisu dovoljno istraženi. Stoga bi identifikacija novih intra-genskih (novi elementi uključeni u regulaciju transkripcije) modulatora PKU fenotipa, kao i identifikacija novih gena modifikatora doprinela njegovom boljem razumevanju.

S tim u vezi, cilj ove studije je proučavanje uticaja varijanti u kodirajućim i nekodirajućim regionima gena uzročnika i gena modifikatora na fenotip pacijenata sa HPA, i to:

1. Uvođenje metode za detekciju velikih delecija u genu *PAH* i detekciju promotorskih varijanti, kao i metoda za detekciju varijanti u ostalim genima uzročnicima HPA - neophodnih za upotpunjavanje spektra varijanti koje su genetički uzrok HPA u Srbiji. Na osnovu dobijenog mutacionog spektra i genotipa pacijenata uključenih u studiju biće izvršena i procena dobrobiti od primene terapije sa BH4 u Srbiji.
2. Funkcionalna karakterizacija novih mutacija u kodirajućim regionima gena uzročnika HPA u cilju rasvetljavanja efekta na funkcionalnost proteina.
3. Identifikacija i funkcionalna karakterizacija novih transkripcionih regulatora u nekodirajućim regionima gena *PAH*, sa fokusom na promotorski i VNTR region u 3' kraju gena.
4. Analiza varijanti u potencijalnim genima modifikatorima kognitivnog PKU fenotipa: analiza varijante m.10398A>G u mitohondrijskom genu *MT-ND3* i analiza kompletnog genoma pacijenata sa karakterističnim kognitivnim fenotipom radi identifikacije novih gena modifikatora kognitivnog PKU fenotipa.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. PACIJENTI

U okviru ove studije korišćeni su uzorci 76 pacijenata sa HPA (iz 71 nesrodne porodice) i 50 ispitanika kontrolne grupe iz Srbije čije prikupljanje je počelo 2004. godine. U prethodnoj studiji o molekularnogenetičkim karakteristikama pacijenata sa HPA u Srbiji bilo je analizirano 34 pacijenta sa mutacijama u genu *PAH* (Stojiljković et al., 2006). Ova grupa pacijenata je dopunjena sa 42 nova pacijenta kojima su mutacije detektovane u okviru ove studije, tako da je kohorta pacijenata sa HPA u Srbiji na kraju brojala 76 pacijenata.

U istraživanju koje je obuhvatalo molekularnu karakterizaciju mutacija u genima uzročnicima HPA, bilo je uključeno 75 pacijenata sa PKU i 1 pacijent sa BH4 deficijencijom. U istraživanju koje je za cilj imalo identifikaciju novih transkripcionih elemenata bilo je uključeno 30 pacijenata sa PKU. U studiju asocijacije mitohondrijske varijante m.10398A>G sa kognitivnim PKU fenotipom bilo je uključeno 64 pacijenta sa PKU i 50 ispitanika kontrolne grupe. Kontrolna grupa ispitanika se sastojala od zdravih osoba iz Srbije, koje su po polu i godinama odgovarale analiziranoj kohorti PKU pacijenata. U istraživanju koje je za cilj imalo identifikaciju novih potencijalnih gena-modifikatora PKU fenotipa bilo je uključeno ukupno 10 pacijenata sa PKU, uključujući 4 para srodnika. Roditelji pojedinih pacijenata su analizirani radi potvrde statusa nosioca mutacije kada je to bilo moguće.

HPA je kod pacijenata dijagnostikovana prilikom neonatalnog skrininga ili u starijem uzrastu, na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukan Čupić". Pacijenti su klasifikovani u odnosu na nivo fenilalanina (Phe) u krvi pre početka terapije i/ili u odnosu na toleranciju Phe u ishrani. Prema ovim kriterijumima, pacijenti su bili svrstani u sledeće tri fenotipske kategorije: klasičnu fenilketonuriju (Phe > 1 200

$\mu\text{mol/l}$; tolerancija Phe $< 20 \text{ mg/kg/dan}$), blagu fenilketonuriju (Phe $600 - 1\ 200 \mu\text{mol/l}$; tolerancija Phe $20 - 25 \text{ mg/kg/dan}$) i blagu hiperfenilalaninemiju - MHP (Phe $< 600 \mu\text{mol/l}$; tolerancija Phe $> 25 \text{ mg/kg/dan}$).

Zatim, uzimajući u obzir razlike u trenutku postavljanja dijagnoze, pacijenti su svrstani u dve grupe: jednu grupu su činili pacijenti koji su otkriveni na neonatalnom skriningu (DBNS), dok je druga grupa bila sačinjena od pacijenata koji su otkriveni nakon navršenih 6 meseci života - kasno dijagnostifikovani (LD). Dalje, imajući u vidu važan uticaj pravilnog lečenja, ove dve grupe su dalje stratifikovane po načinu pridržavanja PKU dijeta: na pacijente kod kojih je dijeta dobro kontrolisana (LPD), i na one kod kojih dijeta nije bila dobro kontrolisana (PC).

Kognitivni fenotip pacijenata sa PKU je određivan u zavisnosti od uzrasta. Za decu ispod 3 godine starosti je korišćena Brunet-Lezine skala za procenu psihomotornog razvoja, dok su za pacijente starije od 3 godine (uključujući i odrasle pacijente) za određivanje koeficijenta inteligencije korišćene Vekslerove skale za odgovarajući uzrast.

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 Univerziteta u Beogradu gde je vršena izolacija DNK.

Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“.

3.1.2. ĆELIJSKE LINIJE

U studiji funkcionalne karakterizacije proteina p.Gln226Lys PAH korišćena je humana hepatoma ćelijska linija Hep3B (Laboratorija Dr Lourdes Desviat u Madridu). U studiji funkcionalne karakterizacije nekodirajućih regiona gena *PAH* korišćena je humana hepatoma HepG2 ćelijska linija, kako za dobijanje nuklearnih ekstrakata korišćenih u EMSA eksperimentima, tako i za eksperimente tranzijentne transfekcije.

HepG2 ćelijska linija je dobijena ljubaznošću Laboratorije za humanu molekularnu genetiku, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

3.1.3. BAKTERIJSKI SOJEVI

U studiji funkcionalne karakterizacije proteina p.Gln226Lys PAH korišćen je XL1-Blue (*Stratagen*) *E. coli* soj, dok je u studiji funkcionalne karakterizacije nekodirajućih regiona gena *PAH* korišćen DH5 α *E. coli* soj.

3.1.4. PLAZMIDNI VEKTORI

U studiji funkcionalne karakterizacije proteina p.Gln226Lys PAH korišćen je pFLAG-CMV PAHwt u koji je uklonirana celokupna cDNK za fenilalanin hidrosilazu (Aguado et al., 2006). U ovaj vektor je metodom mesto-specifične dirigovane mutageneze uvedena zamena Gln sa Lys na mestu 226. U studiji funkcionalne karakterizacije nekodirajućih regiona gena *PAH* korišćen je pBLCAT5 vektor (Boshart et al., 1992). Kao kontrola efikasnosti transfekcije korišćen je pCH110 (*Amersham Pharmacia Biotech*) koji eksprimira β -galaktozu.

3.1.5. PRAJMERI I OLIGONUKLEOTIDI

U različitim PCR reakcijama korišćeni su odgovarajući specifični prajmeri, čiji su nazivi, sekvence i regioni koje umnožavaju navedeni u Tabelama 1 – 7. Oligonukleotidi korišćeni u EMSA esejima navedeni su u Tabeli 8. Prajmeri i probe korišćeni za MLPA analizu su iz komercijalno dostupnog kita SALSA MLPA P055 PAH (*MRC-Holland*) i njihove sekvence su dostupne na adresi www.mlpa.com.

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za PCR reakcije i reakcije sekvenciranja u okviru detekcije mutacija u genu *PAH*. Prajmeri su preuzeti iz Guldborg et al., 1993.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Region koji se umnožava
PAH1F	5'-[50GC]-TTAAAACCTTCAGCCCCACG-3'	Egzon 1
PAH1R	5'-TGGAGGCCCAAATCCCCTAACTG-3'	
PAH2F	5'-GAGGTTTAAACAGGAATGAATTGCT-3'	Egzon 2
PAH2R	5'-[40GC]-TCCTGTGTTCTTTTCATTGC-3'	
PAH3F	5'-[40GC]-GCCTGCGTTAGTTCCTGTGA-3'	Egzon 3
PAH3R	5'-CTTATGTTGCAAATTCCTC-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'-CAATCCTCCCCCACTTTCT-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]-GACACTTGAAGAGTTTTTGC-3'	Egzon 13
PAH13R	5'-TTTTCGGACTTTTTCTGATG-3'	

Legenda: [40GC]=CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG, [50GC]=CCCGCCGCCCCGCGCTCGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG

Tabela 2. Prajmeri korišćeni za PCR reakcije i reakcije sekvenciranja u okviru detekcije mutacija u genu *PTS*. Prajmeri su preuzeti iz Brasil et al., 2011.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Region koji se umnožava
PTS-1S	5'-GTGGGAGGAGGCACCGGCCG-3'	Egzon 1
PTS-1AS	5'-GATGCTGGAGGCCGTCCGAAG-3'	
PTS-2S	5'-AAGGAACAGAGAAGGGGGTTTG-3'	Egzon 2
PTS-2AS	5'-CACTGTGTCCGTAAGTTTTCCC-3'	
PTS-3-4S	5'-GTTGCCAACTTGTGCTTGTAT-3'	Egzoni 3 i 4
PTS-3-4AS	5'-TAGATAGGGGGCCACCAAAT-3'	
Ex 5-6A PTS new	5'-TGATAAGGTGAGGTTTAGAGGC-3'	Egzoni 5 i 6
Ex 5-6B PTS new	5'-CTCCAGAGCACAATGTGTACG-3'	

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za PCR reakcije i reakcije sekvenciranja odabranih nekodirajućih regiona gena *PAH*. Prajmeri su dizajnirani uz pomoć programa Oligoanalyzer (www.idtdna.com/calc/analyzer).

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Region koji se umnožava
PAH prom FW	5'-CAGCAAGGCAGTGTGCTTAG -3'	deo promotora
PAH prom RV	5'-CTCAGGTACAGGCAGGTTTG -3'	
VNTR3 FW	5'-GCTTGAAACTTGAAAGTTGC-3'	deo 3' regiona
VNTR3 RV	5'-GCTTGAAACTTGAAAGTTGC-3'	

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za kloniranje. Prajmeri su dizajnirani uz pomoć programa Oligoanalyzer (www.idtdna.com/calc/analyzer).

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Region koji se umnožava
PAH prom FWHindIII upstream	5'- <u>CCCAAGCTT</u> GCAGCAAGGCAGTGTGCTTAG -3'	deo promotora
PAH prom RV upstream	5'- CCTGACGCAGGAGGCCAGGGCAGCCTG -3'	
PAH prom FW downstream	5'-CTGCGTCAGGCGAGGGGCGTTACTGTGC-3'	
PAH prom	5'-GCTCTAGAGCCTCAGGTACAGGCAGGTTTG -3'	

RVXbaI downstream		
HindVNTR F	5'- <u>CCCAAGCTTGGCTTGAACTTGAAAGTTGC</u> -3'	deo 3'
XbaVNTR R	5'- <u>GCTCTAGAGCGGAACTTAAGAATCCCATC</u> -3'	regiona

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

Tabela 5. Prajmeri korišćeni u PCR reakciji u okviru mesto-specifične dirigovane mutageneze. Prajmeri su dizajnirani uz pomoć programa PrimerX (www.bioinformatics.org/primerx).

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
PAH-Q226K-F	5'-CCATGAAGATAACATTCCCAAGCTGGAAGACGTTTCTC-3'
PAH-Q226K-R	5'-GAGAAACGTCTTCCAGCTTGGGAATGTTATCTTCATGG-3'

Tabela 6. Prajmer korišćen za sekvenciranje *cPAH* ukloniranog u pFLAG vektor. Prajmeri su dizajnirani uz pomoć programa Oligoanalyzer (www.idtdna.com/calc/analyzer).

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
PAH-seq	5'-GGAAGCAGTTTGCTGACATTGCCT-3'

Tabela 7. Prajmeri korišćeni za PCR reakciju i reakcije sekvenciranja mitohondrijskog *MT-ND3* gena. Prajmeri su dizajnirani uz pomoć programa Oligoanalyzer (www.idtdna.com/calc/analyzer).

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Region koji se umnožava
ND3 F	5'-CTCCATCTATTGATGAGGGTCTT-3'	ND3 gen
ND3 R	5'-TACTACCACTGACATGACTTCC-3'	

Tabela 8. Oligonukleotidi korišćeni za EMSA eseje. Oligonukleotidi su dizajnirani za potrebe ovog istraživanja.

Naziv oligonukleotida	Sekvenca oligonukleotida
-170C_cod	-GTCAGGACAACGCCACGAG-3'
-170C_noncod	5'-CTCGTGGGCGTTGTCCTGAC-3'
a1 coding	5'-CACATATATGTATATGCATATGTACGTATG-3'
a1 noncoding	5'-CATACGTACATATGCATATACATATATGTG-3'
a2 coding	5'-CACATATATGTATATGCATACGTACGTATG-3'
a2 noncoding	5'-CATACGTACGTATGCATATACATATATGTG-3'
b2 coding	5'-CACATATATGTATGTGCATATGTACATAGG-3'
b2 noncoding	5'-CCTATGTACATATGCACATACATATATGTG-3'
b5 coding	5'-CACATATATGTATGTGCATATGTACGTATG-3'
b5 noncoding	5'-CATACGTACATATGCACATACATATATGTG-3'
c1 coding	5'-CACATATATGTATGTGCATATGTATGTATA-3'
c1 noncoding	5'-TATACATACATATGCACATACATATATGTG-3'
c3 noncoding	5'-CACATATATGTATGTGCATATGTATGTATG-3'
c3 noncoding	5'-CATACATACATATGCACATACATATATGTG-3'
EBPa1 coding	5'-TGCATATGTACGTATGCACATATATGTAT-3'
EBPa1 noncoding	5'-ATACATATATGTGCATACGTACATATGCA-3'
EBPa2 coding	5'-TGCATACGTACGTATGCACATATATGTAT-3'
EBPa2 noncoding	5'-ATACATATATGTGCATACGTACGTATGCA-3'
EBPb2 coding	5'-TGCATATGTACATAGGCACATATATGTAT-3'
EBPb2 noncoding	5'-ATACATATATGTGCCTATGTACATATGCA-3'
VNTR3 coding	5'-CACATATATGTATATGCATACGTACGTATGCACATATATGTATGTGCATATGTACATAGGCACATATATGTATGTGCATATGTATGTATA-3'
VNTR3 noncoding	5'-TATACATACATATGCACATACATATATGTGCCTATGTACATATGCACATACATATATGTGCATACGTACGTATGCATATACATATATGTG-3'

3.2. METODE

3.2.1. METODE ZA DETEKCIJU MUTACIJA U GENIMA UZROČNICIMA

HPA

Identifikacija mutacija u genima za fenilalanin hidroksilazu, kao i u genima za sintezu i metabolizam BH₄ bila je vršena metodom sekvenciranja DNK. Sekvenciranju regiona DNK od interesa prethodi njihovo umnožavanje u lančanoj reakciji polimeraze, PCR (eng. *polimerase chain reaction*). Reakcija lančanog umnožavanja omogućava umnožavanje željenog fragmenta DNK iz minimalne količine početnog materijala, korišćenjem termostabilne *Taq* polimeraze.

3.2.1.1. IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI NA KOLONI

(Prema upustu za korišćenje QIAamp DNA Blood Mini Kit, *QIAGEN*)

U mikrotube od 1,5ml je dodavano 20 µl *QIAGEN* proteinaze K, 200 µl nekoagulisanog uzorka periferne krvi i 200 µl pufera AL. Smeša je zatim vorteksovana 15s i potom inkubirana na 56°C u toku 10 min da bi se obezbedilo liziranje ćelija i oslobađanje DNK od proteina. Nakon toga je dodavano 200 µl 100% etanola i smeša je ponovo mešana vorteksovanjem u toku 15s. Smeša je potom pažljivo nanošena na QIAamp kolonu i centrifugirana na 8 000 rpm tokom 1 min da bi sadržaj prošao kroz kolonu. Eluat je odbacivan budući da se DNK afinitetno vezala za kolonu, a sama kolona je prebacivana u novu tubu za sakupljanje eluata. Zatim je na kolonu dodavano 500 µl pufera AW1 praćeno centrifugiranjem na 8 000 rpm tokom 1 min. U ovom koraku se DNK, koja se vezala za kolonu, ispira od nečistoća. Eluat je ponovo odbacivan, a kolona prebacivana u novu epruvetu za sakupljanje eluata. U sledećem koraku, dodavan je pufer AW2 koji dodatno oslobađa DNK od nečistoća, a kolona centrifugirana na 13 000 rpm tokom 3 min. Nakon toga, kolona je prebacivana u novu epruvetu i ponovo centrifugirana na istoj brzini u toku 1 min, kako bi se uklonili tragovi pufera. Konačno je kolona prebacivana u sterilnu mikrotubu od 1,5 ml. DNK je eluirana dodavanjem pufera AE, inkubiranjem 1 min na sobnoj temperaturi, i na kraju

centrifugiranjem na 8 000 rpm tokom 1 min. Izolovana DNK čuvana je na -20°C do daljeg korišćenja. Za merenje koncentracije DNK je korišćen spektrofotometar *NanoVue* (*GEHealthcare, Life sciences*), po uputstvu za rad na aparatu.

3.2.1.2. ANALIZA DNK NA AGAROZNOM GELU

(Maniatis et al., 1982)

Analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (1 - 4%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. Kao pufer za pripremanje gelova korišćen je 1xTAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA pH 8,0), pri čemu je isti pufer korišćen i za elektroforezu. Elektroforeza se izvodi pri jačini struje od 100 mA i naponu od 100 V. U gelove je pre polimerizacije dodavana fluorescentna boja etidijum bromid (finalna koncentracija 0,5 µg/ml), koja interkalira u DNK i omogućava vizuelizaciju. DNK je vizualizovana osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 312 nm. Nakon elektroforeze gelovi su dokumentovani CCD kamerom sa *BioDocAnalyze* sistemom. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćeni su odgovarajući komercijalni DNK markeri (*Fermentas*).

3.2.1.3. SEKVENCIRANJE DNK

(prema protokolu za *BigDyeTerminator Ready Reaction Kit - Applied Biosystems*)

Metodom sekvenciranja se određuje redosled nukleotida u molekulu DNK. Metoda se zasniva na sposobnosti DNK polimeraze da sintetiše komplementarni lanac DNK, nastavljajući oligonukleotidni lanac vezan za jednolančanu DNK, pri čemu koristi smešu dezoksiribonukleotida i didezoksiribonukleotida (Sanger et al., 1977). Reakcija sinteze komplementarnog lanca se zaustavlja ugrađivanjem didezoksiribonukleotida koji ne poseduje 3'-OH grupu na molekulu dezoksiriboze neophodnu za elongaciju molekula DNK. Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom (asimetrični PCR) tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Na ovaj način se dobija serija jednolančanih

fragmenata čija se dužina razlikuje za po jedan bazni par. Svaki od četiri didezoksinukleotida je obeležen različitom fluorescentnom bojom, čime je omogućeno da se reakcija sekvenciranja i detekcija produkata vrše u jednoj reakciji umesto u četiri odvojene. Za sekvenciranje DNK korišćen je *BigDyeTM Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)*. Produkti reakcije sekvenciranja su analizirani kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (*3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*).

Egzoni gena *PAH*, zajedno sa okolnim intronskim sekvencama, su najpre umnoženi u PCR reakciji, uz pomoć odgovarajućih prajmera navedenih u Tabeli 1.

PCR smeša finalne zapremine 25 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 200 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 (finalna koncentracija svakog 25 pmol)
- Taq polimeraza (*Qiagen HotStart*, 5U/ μ l) 1U

Temperaturni profil PCR reakcija:

94°C/5min

(94°C/45s, 57°C/45s, 72°C/45s) X 35ciklusa

72°C/10min

Egzoni gena *PTS*, zajedno sa okolnim intronskim sekvencama, su umnoženi u PCR reakciji uz pomoć odgovarajućih prajmera navedenih u tabeli 2.

PCR smeša finalne zapremine 25 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 200 ng DNK
- 10x PCR pufer sa 15 mM $MgCl_2$ (finalna koncentracija 1x PCR pufer, 1,5 mM $MgCl_2$)

- 25 mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1,5 mM)
- dNTPs (finalna koncentracija svakog 200 μM)
- prajmeri (finalna koncentracija svakog 25 pmol)
- Taq polimeraza (*Qiagen HotStart*, 5U/μl) 1U

Temperaturni profil PCR reakcije:

95°C/15min

(95°C/25s, T_A*/25s, 72°C/40s) X 38 ciklusa

72°C/10min

(*temperatura anilinga (T_A) za egzon 1 je 58°C, za egzon 2 je 50°C, za PCR fragment za egzone 5 i 6 je 60°C, a za ostale je 55°C)

PCR produkti su potom proveravani elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Zatim je vršeno prečišćavanje produkta na koloni korišćenjem kompleta *QIAquick PCR Purification kit* (*QIAGEN*) prema uputstvu proizvođača. U mikrotubu sa PCR smešom je dodavano 85 μl PB pufera, nakon čega je smeša vorteksovana i centrifugirana tokom 5 s. Čitava zapremina je nanošena na QIAquick spin kolonu i centrifugirana na 13 000 rpm tokom 1 min radi vezivanja umnoženog PCR produkta za kolonu. Eluat je odbacivan, nakon čega je kolona ispirana sa 750 μl pufera PE a zatim i centrifugirana na 13 000 rpm tokom 1 min. Nakon odbacivanja eluata, kolona je dodatno centrifugirana na 13 000 rpm tokom 1 min, zbog dodatnog uklanjanja preostale tečnosti. QIAquick kolona je na kraju prebacivana u čistu mikrotubu od 1,5 ml i vršeno je eluiranje sa kolone uz pomoć EB pufera, centrifugiranjem na 13 000 rpm tokom 1 min.

U reakciji sekvenciranja su korišćeni isti prajmeri kao i za umnožavanje fragmenta u PCR reakciji.

Smeša za reakciju sekvenciranja, finalne zapremine 8μl, sadržala je 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 profil PCR reakcije za sekvenciranje bio je:

96°C/1min

(96°C/10s, 50°C/5s, 60°C/4min) X 25 ciklusa

4°C/∞

Nakon završene reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani precipitacijom Na-acetatom. U 8 µl smeše je dodavano po 40 µl 0,1M Na-acetata pH 5,2 rastvorenog u etanolu. Zatim je vršeno centrifugiranje na 13 000 rpm tokom 20 min, uz odlivanje supernatanta. Na talog je potom dodavano 200 µl 70% etanola, praćeno centrifugiranjem 10 min na 13000 rpm, posle čega je supernatant uklanjan. Ovaj korak je ponavljan dva puta. Nakon toga talog je u potpunosti osušen. Osušeni talog je rastvaran u 25 µl formamida (*HiDi Formamide, Applied Biosystems*) i celokupna zapremina je korišćena za kapilarnu elektroforezu. Za analizu dobijenih sekvenci korišćen je *Sequencing Analysis Software v5.3.2 with KB Basecaller v1.4 (Applied Biosystems)*.

3.2.1.4. DETEKCIJA VELIKIH DELECIJA U GENU PAH MLPA METODOM

(Prema upustvu za korišćenje kita SALSA MLPA P055 PAH (*MRC-Holland*))

U slučaju da metodom sekvenciranja kod pacijenata sa HPA nisu detektovane dve mutacije, pristupljeno je detekciji velikih delecija u genu *PAH* MLPA metodom. Ovaj deo istraživanja urađen je u Laboratoriji za molekularnu osnovu metaboličkih bolesti, Centra za molekularnu biologiju “Severo Ochoa” u Madridu.

MLPA (eng. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) je metoda nastala modifikacijom multipleks PCR metode. U multipleks PCR postupku se u jednoj reakcionoj smeši koristi više pari prajmera uz pomoć kojih će se amplifikovati željeni broj fragmenata DNK. Neophodno je da fragmenti budu različite dužine, što omogućava međusobno razlikovanje pri analizi. U slučaju MLPA, upotrebom proba specifičnih za analizirane regione i samo jednog para prajmera amplifikuje se do 50 različitih DNK fragmenata (Schouten et al., 2002). U prvom koraku se vrši denaturacija DNK matrice i hibridizacija proba. Svaku probu čine dva oligonukleotida koji će na matrici

hibridizovati jedan neposredno do drugog. Samo ukoliko je došlo do hibridizacije oba oligonukleotida, u sledećem koraku će se izvršiti njihova uspešna ligacija i tako će se formirati kompletna proba koja će zatim biti amplifikovana u PCR reakciji. Parovi oligonukleotida su dizajnirani tako da, osim sekvence koja će hibridizovati sa matricom, jedan oligonukleotid sadrži i univerzalnu sekvencu koju prepoznaje uzvodni prajmer, dok drugi sadrži univerzalnu sekvencu koju prepoznaje nizvodni prajmer, što omogućava njihovo umnožavanje. Uzvodni prajmer koji se koristi za PCR amplifikaciju je fluorescentno obeležen, pa su stoga i nastali PCR produkti fluorescentno obeleženi. Svaka kompletna proba ima jedinstvenu dužinu, tako da rezultujući amplikoni mogu biti razdvojeni i identifikovani kapilarnom elektroforezom. Sledi softverska obrada intenziteta pojedinačnih signala (upoređuju se sa istovremeno analiziranim kontrolnim uzorcima), i kao rezultat se dobija relativna količina svakog amplikona u analiziranom uzorku.

Sve reakcije u okviru MLPA analize su izvedene korišćenjem SALSA MLPA P055 PAH kita (*MRC-Holland*). Za sve korake inkubacije na specifičnim temperaturama korišćen je PCR aparat (*Applied Biosystems*). U prvom koraku je 200 ng genomske DNK u zapremini od 5 μ l denaturisano na 98°C tokom 5 min, a zatim je, nakon hlađenja na 25°C, DNK podvrgnuta hibridizaciji.

Hibridizaciona smeša finalne zapremine 8 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 5 μ l denaturisane genomske DNK
- 1,5 μ l MLPA pufera
- 1,5 μ l mešavine specifičnih proba (*probemix*)

Smeša je, nakon inkubacije od 1 min na 95°C, inkubirana na 60°C tokom 16-20 sati radi uspešne hibridizacije. Nakon toga, smeša je ohlađena na 54°C neposredno pred reakciju ligacije.

Sledeći korak je bila reakcija ligacije. Ligaciona smeša je sadržala sledeće komponente:

- 25 μ l vode
- 3 μ l Ligase pufera A
- 3 μ l Ligase pufera B
- 1 μ l Ligase-65 enzima

Ligaciona smeša je dodavana direktno u mikrotube sa uzorcima, dok su još uvek unutar PCR aparata na temperaturi od 54°C. Radi same reakcije ligacije, uzorci sa ligacionom smešom su inkubirani 15 minuta, posle čega je usledilo inaktiviranje enzima na 98°C tokom 5 minuta. Nakon isteka ovog vremena, uzorci su ohlađeni na 20°C radi pripreme za sledeći korak – PCR reakciju.

PCR smeša je sadržala sledeće komponente:

- 7,5 µl vode
- 2 µl SALSALSA PCR mešavine prajmera (eng. *primer mix*)
- 0,5 µl SALSALSA polimeraze za svaki uzorak

Po 10 µl PCR smeše je dodavano direktno u mikrotube sa uzorcima, dok su još uvek unutar PCR aparata na temperaturi od 20°C.

Temperaturni profil PCR reakcije:

(95°C/30s, 60°C/30s, 72°C/60s) X 35 ciklusa

72°C/20min

15°C/∞

Produkti PCR reakcije su zatim bili pripremljeni za kapilarnu elektroforezu na sledeći način: 2 µl PCR reakcije je bilo pomešano sa 0,2 µl markera za veličinu (*GeneScan™ - 500 LIZ, AppliedBiosystems*) i 13 µl formamida (*HiDi Formamide, Applied Biosystems*). Smeša je inkubirana 2 minuta na 80°C, zatim ohlađena na 4°C i nanosena na aparat za automatsko sekvenciranje (*3730 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*). Za analizu dobijenih fragmenata korišćen je *Peakscanner* softver (*Applied Biosystems*).

3.2.1.5. BIOINFORMATIČKA ANALIZA DETEKTOVANIH VARIJANTI U

DNK

Sve varijante identifikovane u okviru kodirajućih regiona gena *PAH* i gena *PTS* su pretražene u odgovarajućim bazama podataka kako bi se potvrdio njihov eventualni

patološki efekat. Korišćene su sledeće baze podataka: HGMD (eng. *The Human Gene Mutation Database*, <http://www.hgmd.org>), BIOPKUdb (eng. *Database of Patients and Genotypes Causing HPA/PKU incl. BH4-Responsive Phenotype*, <http://www.biopku.org>) i PAHDB (eng. *Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase*, <http://www.pahdb.mcgill.ca>).

U slučaju da detektovana promena nije prisutna ni u jednoj od baza podataka, takva promena je podvrgnuta *in silico* analizi uz pomoć odgovarajućih bioinformatičkih softvera koji predviđaju efekat varijante. U slučaju nesinonimnih aminokiselinskih zamena korišćeni su sledeći softveri: PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), SIFT (<http://sift.jcvi.org>) i MutPred (<http://mutpred.mutdb.org>). Ovim programima se predviđa da li je ispitivana promena sekvence mutacija koja dovodi do razvoja bolesti ili benigna varijanta koja nema patološki efekat. PolyPhen-2 predviđa mogući efekat aminokiselinske zamene na strukturu i funkciju humanih proteina, dok SIFT ispituje sličnost sekvenci srodnih proteina i ne zahteva informacije o strukturi i funkciji proteina. U slučaju malih delecija i/ili insercija korišćen je PROVEAN program, koji funkcioniše po istom principu kao SIFT (<http://www.provean.jcvi.org>). Za proveru evolutivne očuvanosti izmenjene aminokiseline je korišćen program Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Ovaj program vrši poravnanje većeg broja proteinskih sekvenci iz različitih organizama što, između ostalog, omogućava proveru prisustva date aminokiseline na određenoj poziciji kod manje ili više evolutivno udaljenih vrsta. Proteinski model je konstruisan uz pomoć Swiss-PdbViewer programa (<http://www.expasy.org/spdbv>), pri čemu je korišćena PDB šifra 2PAH.pdb.

3.2.2. METODE ZA FUNKCIONALNU ANALIZU NOVIH VARIJANTI U KODIRAJUĆIM REGIONIMA GENA-UZROČNIKA HPA

Novootkrivena varijanta u genu *PAH*, c.676C>A (p.Gln226Lys), koja nije bila prisutna ni u jednoj od baza podataka, a za koju *in silico* analiza predviđa patološki

efekat, bila je podvrgnuta funkcionalnoj analizi. Ovaj deo istraživanja obavljen je u Laboratoriji za molekularnu osnovu metaboličkih bolesti, Centra za molekularnu biologiju “Severo Ochoa” u Madridu.

3.2.2.1. KULTIVISANJE BAKTERIJA

(Maniatis et al., 1982)

U toku rada sa bakterijama neophodno je održavati sterilne uslove. Stoga su se sve manipulacije odvijale u neposrednoj blizini plamenika. Takođe, svi rastvori, posude i alatke 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 su sterilisani autoklaviranjem na 120°C u toku 20 min. Bakterije su kultivisane na temperaturi od 37°C. I u tečni i u čvrsti medijum je dodavan odgovarajući antibiotik. S obzirom da pFLAG nosi rezistenciju na ampicilin, ovaj antibiotik je dodavan u finalnoj koncentraciji 100 μ g/ml.

3.2.2.2. MESTO-DIRIGOVANA MUTAGENEZA DNK

(Prema uputstvu za korišćenje *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit*, *Agilent Technologies*)

U ovom delu istraživanja, varijanta c.676C>A (p.Gln226Lys) je uvedena u hPAH cDNK (Genbank U49897.1) ukloniranu u pFLAG-CMV ekspresioni vektor, korišćenjem oligonukleotida navedenih u Tabeli 5.

Mesto-dirigovana mutageneza je metoda kojom je omogućeno precizno uvođenje željene promene (tačkaste mutacije, male delecije ili insercije) u postojeću DNK sekvencu ukloniranu u dvolančani ekspresioni vektor. Za izvođenje metode korišćen je *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Agilent Technologies*), prema uputstvu proizvođača. Ovom metodom su obuhvaćeni sledeći koraci: PCR

reakcija, digestija *Dpn* I enzimom i transformacija XL1-Blue superkompetentnih ćelija. U PCR reakciji se kao matrica koristi superspiralizovani dvolančani plazmidni DNK vektor koji sadrži insert od interesa (*PAH* cDNK). Mutacija se uvodi uz pomoć dva prajmera koji su dizajnirani tako da u sredini sekvence sadrže željenu mutaciju. Svaki od 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 *Pfu* Turbo DNK polimeraze sa visokom preciznošću. Kao produkt reakcije nastaje plazmid koji nosi željenu mutaciju u sekvenci.

PCR smeša finalne zapremine 50 μ l sadržala je sledeće komponente:

- 40 ng plazmida
- 10x reakcioni pufer (finalna koncentracija 1x)
- 130 ng sense oligonukleotidnog prajmera (veliki višak)
- 130 ng antisense oligonukleotidnog prajmera (veliki višak)
- 1 μ l dNTP mix (*Agilent Technologies* kit)
- 1 μ l *Pfu* Turbo DNK polimeraze (*Agilent Technologies* kit, 2.5U/ μ l)

Temperaturni profil PCR reakcije:

95°C/1min

(95°C/30s, 55°C/30s, 68°C/18min) X12 ciklusa

4°C/ ∞

Nakon toga je usledio korak reakcije digestije sa *Dpn* I restrikcionim enzimom. *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 stoga će biti podložna digestiji ovim enzimom. S obzirom da je mutirani plazmid nastao kao produkt PCR reakcije te kao takav nije metilovan, on neće biti digeriran od strane *Dpn* I enzima. Na ovaj način vrši se selekcija novosintetisane DNK koja sadrži mutaciju. Da bi se izvela reakcija digestije, 10 U *Dpn*

I (1 μ l) restrikcionog enzima (*Agilent Technologies*) je direktno dodato u mikrotubu u kojoj se odvijala PCR reakcija, nakon čega je usledila inkubacija od 1 h na 37°C. Plazmid koji je nakon PCR dirigovane mutageneze podvrgnut *Dpn* I digestiji koristi se za transformaciju XL1-Blue superkompetentnih ćelija (*Agilent Technologies*). XL1-Blue ćelije (50 μ l) su otopljene na ledu nakon čega im je dodat mutirani plazmid tretiran sa *Dpn* I (1-20 μ l). Nakon veoma pažljivog, blagog mešanja, smeša je inkubirana 30 min na ledu. Izlaganjem smeše temperaturnim šokovima: led (30 min) - 42 °C (45 s) - led (2 min), propustljivost bakterijskih membrana dostiže maksimum što omogućava efikasnu transformaciju bakterija plazmidnom DNK (Maniatis et al., 1982). Imajući u vidu da se očekuje mali broj transformanata, čitava transformaciona reakcija je razmazana po čvrstoj LB podlozi koja sadrži antibiotik ampicilin. Nakon rasta bakterija tokom najmanje 16 h na 37°C, bilo je moguće uočiti pojedinačne kolonije na petri šoljama. S obzirom na selektivnost podloge, samo bakterije koje su primile plazmidnu DNK, tj. transformanti, mogu da izrastu.

3.2.2.3. DETEKCIJA PLAZMIDA KOJI NOSI ŽELJENU MUTACIJU

Sekvenciranje je definitivna potvrda da plazmid sadrži željenu mutaciju i da u čitavoj sekvenci ne postoji promena nastala usled eventualne greške nastale prilikom umnožavanja plazmida u PCR reakciji. Sekvenciranje pFLAG je vršeno pomoću prajmera iz Tabele 6. koji je bio dizajniran tako da prepoznaje sekvencu humane *PAH* cDNK. Za dobijanje male količine plazmidne DNK koja može uspešno da se sekvencira, plazmidna DNK je izolovana *mini prep* metodom (*Qiagen*), dok je za potrebe transfekcije, gde je neophodna veća količina plazmida dobrog kvaliteta, za izolaciju korišćena *maxi prep* metoda (*Qiagen*).

3.2.2.4. IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI

(Prema upustvu za korišćenje *QIAprep Spin Miniprep Kit*, *QIAGEN*)

Pojedinačne bakterijske kolonije su zasejavane u 5 ml tečnog LB medijuma sa ampicilinom i inkubirane preko noći na 37°C uz aeraciju na 180 rpm. Prekonoćne kulture se prebacivane u mikrotube i centrifugirane na 13 000 rpm tokom 5 min. Bakterijski talog je resuspendovan vorteksovanjem u 250 µl pufera P1. Zatim je dodavano 250 µl pufera P2, praćeno invertovanjem tube 4 do 6 puta. Zatim je dodavano 350 µl pufera N3, nakon čega je takođe bilo neophodno momentalno i temeljno promešati sadržaj na isti način. Navedeni koraci su omogućili lizu bakterijskih ćelija. Potom je smeša centrifugirana na 13 000 rpm tokom 10 min. Supernatant koji sadrži plazmidnu DNK je direktnim presipanjem iz mikrotube nanošen na QIAprep kolonu. Nakon toga je vršeno centrifugiranje na 13 000 rpm 1 min i eluat je odbacivan. U ovom koraku DNK je ostala vezana za kolonu i potrebno ju je isprati od nečistoća. Stoga je na kolonu prvo dodato 0,5 ml pufera PB praćeno centrifugiranjem u toku 1 min. Dodavanjem 0,75 ml pufera PE i centrifugiranjem na 13 000 rpm tokom 1 min DNK je dalje bila oslobađana od nečistoća. Posle svakog od do sada navedenih centrifugiranja, eluat je odbacivan. Da bi se odstranili i poslednji tragovi pufera, kolona je ponovo centrifugirana na 13 000 rpm tokom 1 min. Kolona je na kraju prebačena u sterilnu mikrotubu u koju će biti eluirana DNK. Na kolonu je tada dodato 100 µl pufera EB koji će osloboditi DNK sa kolone. Nakon inkubacije od 1 min na sobnoj temperaturi, DNK je eluirana centrifugiranjem na 13 000 rpm tokom 1 min.

3.2.2.5. IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA VELIKOJ SKALI

(Prema upustu za korišćenje *Plasmid Purification Maxi Kit*, QIAGEN)

Pojedinačne bakterijske kolonije su zasejavane u 250 ml tečnog LB medijuma sa ampicilinom i inkubirane preko noći na 37°C uz aeraciju na 180 rpm. Ukoliko bakterijski soj nije dostupan na petri šolji, može se koristiti i glicerolski stok. Prekonoćna kultura je prebačena u sterilnu plastičnu tubu i potom centrifugirana na 6000rpm u toku 20 min na +4°C (*Sorvall* centrifuga, rotor GS-3) nakon čega je talog resuspendovan u 10 ml pufera P1 koji obezbeđuje lizu bakterijskih ćelija. Svi koraci su bili izvođeni na ledu. Nakon što je talog u potpunosti rastvoren, sadržaj je prebačen u sterilnu plastičnu tubu od 30 ml, u koju je zatim dodato 10 ml pufera P2 a sadržaj

pomešan invertovanjem tube 4 do 6 puta. Nakon toga, smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi u toku 5 min. Zatim je dodato 10 ml pufera P3 nakon čega je smeša temeljno promešana invertovanjem tube 4 do 6 puta a potom inkubirana na ledu u toku 20 min. Smeša je zatim centrifugirana na 13 000 rpm tokom 30 min na +4°C (*Sorvall* centrifuga, rotor SS-34). Za to vreme je *Qiagen* kolona pripremljena propuštanjem 10 ml pufera QBT, koji uz pomoć sile gravitacije prolazi kroz kolonu. Nakon centrifugiranja je supernatant u kome se nalazi plazmidna DNK naliven u prethodno pripremljenu *QIAGEN* kolonu. Nakon prolaska supernatanta, plazmidna DNK ostaje vezana za kolonu. Sledi ispiranje vezane DNK od nečistoća dodavanjem 30 ml pufera QC, što je ponovljeno dva puta. Kolona je zatim pričvršćena za sterilnu staklenu epruvetu od 30 ml radi elucije. U sledećem koraku je DNK eluirana sa kolone dodavanjem 15 ml pufera QF. DNK je potom precipitirana dodavanjem 10,5 ml izopropanola a potom centrifugirana na 8 000 rpm u toku 30 min na +4°C (*Sorvall* centrifuga, rotor SS-34). Supernatant je pažljivo odliven, a DNK talog ispran sa 5 ml 70% etanola. Nakon centrifugiranja na 8 000 rpm u toku 10 min, supernatant je u potpunosti uklonjen, a DNK talog osušen i rastvoren u 200 µl 1xTE.

3.2.2.6. ČUVANJE TRANSFORMANATA

(Maniatis et al., 1982)

Transformanti su nekoliko nedelja vijabilni na čvrstim LB podlogama suplementiranim sa antibiotikom, ukoliko su petri šolje zatvorene parafilmom i čuvane na +4°C okrenute naopako. Za duže čuvanje transformanata pripremljeni su glicerolski stokovi - 150 µl sterilnog 100% glicerola i 850 µl tečne prekonoćne kulture je pomešano vorteksovanjem i čuvano na -80°C. Za pripremu glicerolskog stoka su odabrane prekonoćne kulture korišćene za izolaciju plazmidne DNK na maloj skali, za koje je sekvenciranje pokazalo da nose željenu mutaciju.

3.2.2.7. KULTIVISANJE PERMANENTNIH ĆELIJSKIH LINIJA

(Shannon et al., 1973, Aguado et al., 2006)

U eksperimentima funkcionalne analize mutacije *PAH* p.Gln226Lys bila je korišćena Hep 3B humana hepatoma ćelijska linija, dok je u eksperimentima funkcionalne analize nekodirajućih regiona gena *PAH* bila korišćena Hep G2 ćelijska linija. Obe ćelijske linije su poreklom humane hepatoma ćelijske linije.

Hep3B i HepG2 su ustaljene (permanentne, imortalizovane) ćelijske linije. Obe linije spadaju u adherentne ćelije, dakle, lepe se 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). Za gajenje ćelija su korišćeni odgovarajući medijumi koji sadrže sve komponente neophodne za neprekidno razmnožavanje ćelija. Za gajenje Hep3B je korišćen MEM (*Eagle's minimal essential medium*) suplementiran sa 5% fetalnog telećeg seruma i 1% L-glutamina. Za gajenje HepG2 je korišćen DMEM *Low Glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA Laboratories)* sa L-glutaminom i glukozom u koncentraciji 1 g/l suplementiran sa 10% fetalnog telećeg seruma (*FCS, PAA Laboratories*). U oba slučaja je medijum suplementiran i sa mešavinom antibiotika (penicilin – streptomycin) u finalnoj koncentraciji od 1%, osim pri izvođenju eksperimenata lipofektaminske transfekcije. Zasejavanje ćelija u kulturu je vršeno brzim odmrzavanjem alikvota ćelija direktno iz tečnog azota (-196°C) i resuspendovanjem ukompletnom medijumu zagrejanom na 37°C. Brzim otapanjem, kristalne strukture leda brzo nestaju i smanjuje se opasnost da probiju ćelijske membrane. Ćelije su gajene u Petri šoljama u inkubatoru sa automatskim protokom 5% CO₂ u vazduhu i na temperaturi od 37°C. Pasažiranje ćelija je vršeno pri konfluentnosti od približno 80%, svaka 3 - 4 dana. Nakon usisavanja medijuma vakuumom, ćelijski sloj je ispiran PBS-om (*Phosphate Buffered Saline*), kojina 1 litar sadrži: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄ i 1,15 g Na₂HPO₄ × 2H₂O. Nakon toga je izvršeno odvajanje ćelija od podloge dodavanjem 0,1% rastvora tripsina u PBS-u. Nakon kraćeg delovanja enzima (5 min) na 37°C, reakcija je zaustavljena dodavanjem medijuma sa serumom u odnosu 1:1 prema dodatoj količini tripsina. Ćelije su temeljno resuspendovane i potom subkultivisane u odgovarajućem odnosu (najčešće

u odnosu 1:2). U slučaju pripreme za eksperiment transfekcije, ćelije su nakon resuspendovanja izbrojane. Ćelije su brojane pod mikroskopom pomoću hemocitometra. 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. Pri brojanju je korišćena boja tripan-plavo (0,1%) koja omogućava razlikovanje živih od mrtvih ćelija - tripan-plavo ulazi u mrtve ćelije i boji ih, dok žive ćelije ostaju svetle, sa zlatnim oreolom. Zamrzavanje je vršeno u fazi logaritamskog rasta ćelija pri čemu su bile pripremljene na sledeći način: ćelije su isprane od medijuma, tripsinizovane i potom centrifugirane 10 min na 1200 rpm. Nakon pažljivog usisavanja medijuma, ćelijski talog je opran PBS-om, a zatim još jednom centrifugiran pod istim uslovima. Nakon toga su ćelije resuspendovane u medijumu za zamrzavanje (10% dimetilsufoksid (DMSO) u FCS-u). DMSO ima krioprotektivnu ulogu, jer obezbeđuje vezivanje vode i time smanjuje verovatnoću stvaranja kristala leda koji mogu da oštete ćelije. Ćelija suspenzija je razdeljivana u kriotube i potom podvrgnuta postupnom zamrzavanju, da bi se izbeglo stvaranje intracelularnih kristala leda: ćelije su prvo držane na +4°C (1 sat), zatim na -20 °C (1 do 16 sati), i konačno na -80°C (16 do 72 sati). Tek tada su ćelije smeštene u tečni azot (-196 °C), gde ostaju vijabilne godinama.

3.2.2.8. 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 je bilo zasejano u 2 ml MEM medijuma u pojedinačni bunar na P-6 šolji (10 cm²). Ćelije su gajene 24h pri standardnim uslovima, sa standardnom koncentracijom antibiotika, budući da antibiotik nema uticaja na vijabilnost ćelija pri *JetPEI* transfekciji. Sutradan je ćelijama dodat svež MEM (2 ml) i pristupljeno je pripremi transfekcione smeše. Najpre je 3 µg plazmidne DNK rastvoreno u 100 µl 150 mMNaCl, dok je, sa druge strane, 6 µl *JetPEI* reagensa (*PolyPlus Transfection*) rastvoreno u 100 µl NaCl. Na kraju su ove dve smeše sjedinjene, pomešane i inkubirane 15-30 min čime je omogućeno formiranje kompleksa između DNK i *JetPEI* reagensa.

Nakon isteka ovog vremena je u pojedinačni bunar P-6 šolje dodato, kap po kap, po 200 μ l transfekcione smeše. P-6 šolja je zatim blago zaljuljana da bi se medijum bolje sjedinio sa transfekcionom smešom. Čelije su u prisustvu transfekcione smeše inkubirane 4-5 h, nakon čega su isprane PBS-om i tom prilikom im je dodat svež medijum. U nekim od eksperimenata je umesto standardnog medijuma dodat medijum suplementiran sepiapterinom (finalna koncentracija 100 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 48 h od transfekcije, ćelije su temeljno isprane PBS-om. Nakon tripsinizacije i njihovog sakupljanja, ćelije su resuspendovane u 1 ml PBS-a. Nakon centrifugiranja 5 min na 12000 rpm, ćelijski talog je ponovo ispran sa 1 ml PBS-a. Nakon centrifugiranja pod istim uslovima, supernatant je pažljivo odvađen a talog se pohranjen na -70°C do korišćenja.

3.2.2.9. PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKTA

(Aguado et al., 2006)

Ćelijski talog je otopljen na ledu i potom resuspendovan u 35-50 μ l pufera (20 mM Hepes, 200 mM NaCl, 0,2 mM proteazni inhibitor, finalni pH 7). Liziranje ćelija je postignuto njihovim naizmeničnim stavljanjem u tečni azot (-196°C) i vodeno kupatilo (+37°C) uz vorteksovanje nakon svakog koraka, što je ponovljeno 3 puta. Nakon centrifugiranja tokom 5 min na 13 000 rpm (+4°C), supernatant je prebačen u nove mikrotube. Koncentracija proteina u uzorcima je izmerena Bradford metodom.

3.2.2.10. BRADFORD METODA

(Bradford et al., 1976)

Bradford metoda se koristi za utvrđivanje koncentracije proteina u uzorku. Po 10 μ l proteinskog uzorka je rastvoreno u 790 μ l vode, a zatim pomešano sa 200 μ l Bradford reagensa (*Protein Assay Due Reagent, Bio Rad*). Nakon inkubacije od 5 min u

mraku na sobnoj temperaturi, apsorpcija se određuje spektrofotometrijski 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 kao i uzorci.

3.2.2.11. WESTERN BLOT

(Aguado et al., 2006)

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

3.2.2.12. DENATURISUĆI SDS POLIAKRILAMIDNI GEL

Denaturišući SDS poliakrilamidni gel sastoji se iz gela za nanošenje (eng. *stacking gel*) i gela za razdvajanje (eng. *running gel*). Prvo je pripremljen gel u kome će se proteini iz uzorka razdvojiti, 10% poliakrilamidni SDS gel. Kao pufer za pripremanje gela korišćen je 1,5 M Tris-HCl pH 8,8. Za oba gela je kao denaturišući agens korišćen 0,1% SDS, dok su kao inicijatori polimerizacije korišćeni 0,1% APS (amonijumpersulfat) i 0,01% TEMED (tetrametiletildiamin). Nakon što je gel za razdvajanje polimerisao, pripremljen je 4% poliakrilamidni SDS gel na koji se nanose uzorci. Kao pufer za pripremanje ovog gela korišćen je 0,5 M Tris HCl pH 6,8. Uzorci su neposredno pre se pre nanošenja na gel pomešani 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), denaturisani na

95°C u toku 5 min i čuvani na ledu do nanošenja na gel. Pripremljeni uzorci (40-100 µg po bunariću) su nanošeni na gel i razdvajani elektroforetski pri konstantnom naponu od 100 V tokom 90 min. Radi određivanja veličine proteina, uporedo sa uzorcima su na gel nanošeni i komercijalni proteinski markeri (*Lonza* i *Invitrogen*).

3.2.2.13. TRANSFER PROTEINA NA MEMBRANU

Za potrebe transfera proteina korišćena je nitrocelulozna membrana. Pripremljen je pufer za transfer sledećeg sastava: 25 mM Tris, 190 mM glicin, 20% metanol, pH 8,5. Nakon elektroforeze su nitrocelulozna membrana i filter papiri isečeni tako da odgovaraju veličini gela. Zatim su filter papiri i suđeri potopljeni u pufer za transfer (oko 15 min). Pre postavljanja na filter papir je i sam gel potopljen u transfer pufer. Nosač za transfer je okrenut tako da katoda bude na dnu. Na njega su redani sledećim redosledom: suđer, filter papir, gel, nitrocelulozna membrana, filter papir, suđer, i na vrhu anoda, uz istiskivanje mehurića pri svakom koraku. Nosač je na kraju zatvoren i postavljen u kadu u odgovarajućoj orijentaciji. Ovakav raspored je omogućio da struja teče od od katode, na kojoj se nalazi gel, ka anodi, tj. ka membrani. Transfer je izvršen pri konstantnom naponu od 100 V i jačini struje od 250 mA u toku 60 min. Nakon završenog transfera, aparatura je pažljivo razmontirana, dok je membrana nekoliko minuta inkubirana u rastvoru Ponceau S (0,1% Ponceau S boja; 1% sirćetna kiselina), radi potvrde da je transfer uspešno i ravnomerno obavljen. Membrana je zatim nekoliko puta ispirana PBS-Tween puferom (1xPBS; 0,1% Tween) radi potpunog odbojavanja.

3.2.2.14. IMUNODETEKCIJA PAH-FLAG PROTEINA

Detekcija PAH-FLAG proteina je pretpostavljala tri koraka. U prvom koraku, bilo je neophodno izvršiti blokiranje membrane od nespecifičnog vezivanja antitela koja će kasnije biti dodata. Radi blokiranja nespecifičnog vezivanja antitela, membrana je inkubirana sa 10 ml pufera (1xPBS; 0,1% Tween; 500 mg nemasnog suvog mleka) u zatopljenoj plastičnoj kesici, uz klackanje najmanje 1h na sobnoj temperaturi, što je

omogućilo da se proteini mleka vežu za membranu na svim mestima za koja se proteini iz gela nisu vezali. Na ovaj način je sprečeno direktno vezivanje primarnog antitela za samu membranu, što minimizira pojavu lažno pozitivnih rezultata.

U drugom koraku se primarno antitelo specifično vezuje za ciljni protein (PAH-FLAG), dok se u trećem koraku sekundarno antitelo vezuje za anti-FLAG i detektuje se hemiluminiscencijom. Primarno antitelo korišćeno u eksperimentima je anti-FLAG M2, monoklonalno antitelo proizvedeno u mišu, koncentracije 10 µg/ml (*Sigma*). Sekundarno antitelo je anti-mišji imunoglobulin (eng. *anti-mouse Ig*), proizveden u kozi (*Sigma*).

Nakon inkubacije sa mlekom, membrana je inkubirana u odgovarajućem razblaženju primarnog anti-FLAG M2 (1/1000 (v/v) razblaženje). 10 µl anti-FLAG M2 je bilo rastvoreno u 10 ml pufera (1xPBS; 0,1% Tween; 500 mg nemasnog suvog mleka) i membrana sa puferom inkubirana u zatopljenoj plastičnoj kesici preko noći na +4°C uz klackanje. Inkubacijom na niskoj temperaturi je smanjena mogućnost nespecifičnog vezivanja. Sledećeg dana, membrana je ispirana od nevezanog primarnog antitela tri puta po 10 min u puferu (1xPBS; 0,1% Tween). Membrana je zatim zatopljena u plastičnu kesicu zajedno sa 10 ml pufera (razblaženje sekundarnog antitela je 1/5000 (v/v); 1xPBS; 0,1% Tween; 500 mg nemasnog suvog mleka) i inkubirana, uz klackanje, 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga, membrana je ispirana od nevezanog sekundarnog antitela tri puta po 10 min u puferu (1xPBS; 0,05% Tween). S obzirom da je za sekundarno antitelo vezana peroksidaza rena, vizuelizacija formiranih kompleksa ostvarena je dodavanjem hemiluminescentnog agensa (*ECL, Amersham Pharmacia Biotech*). Membrana je inkubirana sa agensom 1 min, nakon čega je uklonjen višak agensa. U reakciji koja se razvija, produkuje se luminescencija proporcionalna količini ciljnog proteina u uzorku. Kada se senzitivni film inkubira preko membrane u kaseti, svetlost koja se razvija u reakciji pravi sliku koja predstavlja raspored sekundarnih antitela na membrani. Radi dobijanja optimalnog signala, film je inkubiran sa membranom tokom različitih vremenskih intervala (1 s, 5 s, 30 s, 5 min i 45 min). Relativna kvantifikacija proteina vršena je densitometrijski (*GS-710 Calibrated Imaging Densitometer, Bio Rad*).

3.2.2.15. IMUNODETEKCIJA β AKTIN PROTEINA - KONTROLA

NANOŠENJA UZORAKA

Da bi nivo detektovanog proteina mogao da bude normalizovan među različitim uzorcima, poželjno je potvrditi da je količina početnog nanesenog uzorka jednaka u okviru gela. Tada se pribegava detekciji drugog proteina iz početnog uzorka, što je poznato pod nazivom kontrola nanošenja (eng. *loading control*). Kao kontrole se najčešće koriste proteini koji su produkti gena koji imaju konstitutivnu ekspresiju u većini ćelijskih linija ili tkiva, poznati i kao “*housekeeping genes*”. Nivo ekspresije kontrole nanošenja stoga ne bi trebalo da varira u uzorcima u okviru jednog gela. Kao kontrola za nivo ekspresije PAH-FLAG proteina je korišćen β aktin. Korišćeno je anti- β aktin antitelo proizvedeno u mišu (*Sigma*), za koje je istovremeno vezana i peroksidaza rena. Membrana je najpre oslobođena od vezanog primarnog i sekundarnog antitela inkubiranjem na 80°C tokom 20 min zatopljena u plastičnoj kesici sa puferom (1xPBS; 0,2M glicin, 0,05% Tween). Nakon toga, membrana je ispirana tri puta po 10 min u puferu (1xPBS; 0,1% Tween). Membrana je zatim zatopljena u plastičnu kesicu zajedno sa 10 ml pufera (razblaženje antitela je 1/25000 (v/v); 1xPBS; 0,1% Tween; 500 mg nemasnog suvog mleka) i inkubirana, uz klackanje, 45 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, membrana je ispirana tri puta po 10 min u puferu (1xPBS; 0,1% Tween) posle čega je usledila prethodno opisana detekcija hemiluminiscencije, kao i densitometrijska analiza.

3.2.3. METODE ZA FUNKCIONALNU ANALIZU NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U NEKODIRAJUĆIM REGIONIMA GENA *PAH*

3.2.3.1. METODE ZA ANALIZU VARIJANTI U NEKODIRAJUĆIM DELOVIMA GENA *PAH*

U cilju identifikacije varijanti koje bi mogle biti okarakterisane kao mogući regulatori transkripcije, odabrani nekodirajući regioni gena *PAH* (deo promotora kao i VNTR region u 3' kraju) su najpre analizirani metodom sekvenciranja, na način kako je već opisano ranije u poglavlju, korišćenjem prajmera iz tabele 3.

3.2.3.2. ANALIZA PROMOTORSKOG REGIONA GENA *PAH*

Deo promotora gena *PAH* od pozicije c.-40 do c.-551 (u odnosu na mesto početka transkripcije) je najpre umnožen, a potom i sekvenciran.

PCR smeša finalne zapremine 25 μ l sadržala je sledeće komponente:

- 200 ng DNK
- 10x PCR pufer sa 15 mM $MgCl_2$ (finalna koncentracija 1xPCR pufer, 1,5 mM $MgCl_2$)
- 5xQ pufer (finalna koncentracija 1x)
- 25 mM $MgCl_2$ (finalna koncentracija 1,5 mM)
- dNTPs (finalna koncentracija svakog 200 μ M)
- prajmeri navedeni u tabeli 3 (finalna koncentracija svakog 20 pmol)
- KAPA Taq DNA polimeraza, 5U/ μ l (finalno 1U)

Temperaturni profil PCR reakcije bio je sledeći:

95°C/5min

(95°C/30s, 60°C/30s, 72°C/45s) ponovljeno 35 puta

72°C/10min

Dobijeni PCR produkt je proveravan elektroforezom na 2% agaroznom gelu, a potom analiziran sekvenciranjem.

3.2.3.3. ANALIZA BROJA PONOVAKA U VNTR REGIONU U 3' KRAJU GENA *PAH*

(Goltsov et al., 1992)

Za određivanje broja ponovaka u VNTR, u okviru 3' regiona gena *PAH*, korišćena je PCR metoda. U kombinaciji sa metodom sekvenciranja, bilo je moguće utvrditi i arhitekturu ponovaka.

PCR smeša finalne zapremine 25 µl sadržala je sledeće komponente:

- 200 ng DNK
- 10x PCR pufer sa 15mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1xPCR pufer, 1,5 mM MgCl₂)
- 5xQ pufer (finalna koncentracija 1x)
- 25 mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1,5 mM)
- dNTPs (finalna koncentracija svakog 200 µM)
- prajmeri navedeni u tabeli 3 (finalna koncentracija svakog 20 pmol)
- *Qiagen HotStart Taq* DNK polimeraza, 5U/µl (finalno 1U)

Temperaturni profil PCR reakcije bio je sledeći:

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 je analiziran elektroforezom na 4% agaroznom gelu. Na osnovu dužine PCR produkta vršeno je određivanje broja ponovaka, što je dodatno potvrđeno sekvenciranjem.

3.2.3.4. BIOINFORMATIČKA ANALIZA ODABRANIH VARIJANTI

Retke genske varijante identifikovane u promotoru gena *PAH*, kao i različiti aleli u pogledu broja i arhitekture ponovaka su analizirani *in silico*, korišćenjem bioinformatičkih softvera koji vrše predikciju potencijalnih vezivnih mesta transkripcionih faktora. Za analizu VNTR regiona je korišćen TFSEARCH program, verzija 1.3 (<http://www.cbrc.jp/htbin/nph-tfsearch>), pri čemu su uzimana u obzir samo vezivna mesta pronađena kod kičmenjaka. Za analizu varijanti iz promotora gena *PAH* je korišćen MatInspector algoritam (<http://www.genomatix.de>). Odabrane varijante su zatim podvrgnute funkcionalnoj analizi.

3.2.3.5. METODOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

(Maniatis et al., 1982)

Radi funkcionalne analize odabranih nekodirajućih regiona gena *PAH*, željeni DNK regioni koji sadrže potencijalna vezivna mesta za transkripcione faktore su metodama rekombinantne DNK (digestija restrikcionim enzimima, defosforilacija i ligacija) klonirani u pBLCAT5 plazmidne vektore. Dobijeni konstrukti označeni su sa pBLCAT5_-170C, pBLCAT5_-170delC, pBLCAT5_VNTR3, pBLCAT5_VNTR7 i pBLCAT5_VNTR8.

U slučaju VNTR regiona, u prvom koraku je željeni DNK region umnožen u PCR reakciji uz pomoć specifičnih prajmera navedenih u Tabeli 4. Uslovi PCR reakcije su bili isti kao pri umnožavanju VNTR regiona, kao što je već navedeno. PCR produkti su proveravani elektroforezom na 2% agaroznom gelu i potom korišćeni u reakciji digestije sa *HindIII* i *XbaI* restrikcionim enzimima.

U slučaju dela promotora gena *PAH*, fragment koje će biti korišćen za kloniranje je konstruisan u tri konsektivne PCR reakcije da bi se obezbedilo nastajanje dva različita konstrukta, sa i bez potencijalnog vezujućeg mesta za transkripcione faktore. U slučaju konstrukta koji nosi potencijalno vezivno mesto, željeni promotorski region od c.-551 do c.-40 je u celosti umnožen u PCR reakciji uz pomoć odgovarajućih prajmera navedenih u Tabeli 4. Za konstrukt bez vezivnog mesta, pBLCAT5_-170delC, da bi se iz željenog regiona deletiralo potencijalno vezivno mesto koje obuhvata region od c.-173 to -165, najpre su umnožena dva nezavisna fragmenta korišćenjem odgovarajućih prajmera iz tabela 4, koji su u trećoj PCR reakciji (nakon prečišćavanja na koloni, kao što je opisano ranije) iskorišćeni kao matrice i tako obezbedili nastajanje fragmenta koji na krajevima sadrži mesta za sečenje restrikcionim enzimima. Uslovi PCR reakcije su bili isti kao pri umnožavanju promotorskog regiona, kao što je već navedeno. PCR produkti su proveravani elektroforezom na 2% agaroznom gelu i potom korišćeni u reakciji digestije sa *HindIII* i *XbaI* restrikcionim enzimima.

Sledeći korak je podrazumevao formiranje lepljivih krajeva na plazmidu i PCR fragmentu što je postignuto u reakciji digestije odabranim restrikcionim enzimima. Plazmid pBLCAT5 sadrži polilinker sa mestima sečenja za veliki broj restrikcionih enzima, između ostalih *HindIII* i *XbaI*. U slučaju PCR fragmenata, restrikciona mesta su kreirana pomoću prajmera u PCR reakciji.

Smeša za digestiju finalne zapremine 20 μ l sadržala je sledeće komponente:

- 400ng pBLCAT5 plazmida ili 300-800ng prečišćene PCR smeše
- 10xM pufer (finalno 1x)
- 0,1% BSA (*Sigma*) (finalno 0,01%)
- *HindIII*, Pharmacia 15U/ μ l (finalno 3U)

- *Xba*I, Pharmacia 15U/ μ l (finalno 3U)

Smeše za digestiju su inkubirane 16 h 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 bila potvrda aktivnosti oba restrikciona enzima.

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

Smeša za defosforilaciju finalne zapremine 35 μ l sadržala je sledeće komponente:

- 1,5-2 μ g pBLCAT5 plazmida
- 10x pufer (finalno 1x)
- CIAP 10U/ μ l (finalno 2U)

Smeša za defosforilaciju je inkubirana 30 minuta na 37°C. Dejstvo alkalne fosfataze je zaustavljeno izlaganjem smeše temperaturi od 85°C u trajanju od 15 minuta.

Formiranje rekombinantnog DNK molekula spajanjem plazmida i PCR fragmenta sa komplementarnim lepljivim krajevima je izvršeno u reakciji ligacije.

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 itd.

Ligaciona smeša finalne zapremine 10 μ l sadržala je sledeće komponente:

- 100 ng digeriranog, defosforilovanog, prečišćenog pBLCAT5
- odgovarajuća količina digeriranog prečišćenog PCR fragmenta u ng da bi molarni odnos plazmida i fragmenta bio 1:10
- 10xpufer, sadrži Mg i ATP (finalno 1x)

- T4 DNK Ligaza (*Thermo Scientific*), 5 U/ μ l (finalno 1 U)

Ligaciona smeša je inkubirana 16 h na 16°C. Produkti ligacije su analizirani elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

3.2.3.6. KULTIVISANJE BAKTERIJA

Kultivisanje bakterija *E.coli* DH5 α soja je obavljeno na način opisan ranije u poglavlju. Budući da je pBLCAT5 nosi rezistenciju na ampicilin, ovaj antibiotik je pri kultivaciji dodavan u finalnoj koncentraciji 100 μ g/ml.

3.2.3.7. PRIPREMANJE KOMPETENTNIH ĆELIJA *E. Coli* DH5 α

(Maniatis et al., 1982)

Za razliku od dela istraživanja funkcionalne analize varijante p.Gln226Lys gde su pri transformaciji mutiranog plazmida korišćene komercijalno dostupne XL1-Blue superkompetentne bakterijske ćelije, u eskperimentima funkcionalne analize nekodirajućih regiona gena *PAH* su korišćene bakterijske ćelije DH5 α soja koje su pripremljene za transformaciju stranom DNK. Ovim postupkom je postignuto da sećelijska membrana bakterija učini propustljivijom, a da se pritom ne umanjuje vijabilnost samih ćelija i njihova sposobnost umnožavanja.

Pojedinačna bakterijska kolonija je inokulirana u 5 ml tečnog LB medijuma bez antibiotika (DH5 α soj nije rezistentan na antibiotike). Kultivacija je vršena preko noći, uz aeraciju i šejkiranje na 37 °C. Narednog dana je u 20 ml svežeg LB medijuma inokulirano 1 ml prekonoćne kulture. Bakterije su gajene na 37°C do postizanja gustine od 0,3 - 0,5 OD/ml, koja je određena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 620 nm. Po 2 ml bakterija iz ove kulture je potominokulirano u 20 ml svežeg tečnog LB medijuma. Rast bakterijske kulture je nastavljen na 37°C do gustine 0,5 OD₆₂₀/ml. Na ovaj način je bilo moguće dobiti veliki broj bakterijskih ćelija u eksponencijalnoj fazi rasta. Potom je bakterijska kultura centrifugirana na 7000 rpm na +4°C u toku 10 minuta (Sorvall centrifuga, SS-34 rotor). Dobijeni talog je resuspendovan u 10 ml

hladnog 0,1 M CaCl₂, inkubiran na ledu 10 minuta i ponovo centrifugiran pri istim uslovima. Bakterijski talog je potom resuspendovan u 2 ml ohlađenog rastvora sačinjenog od 0,1 M CaCl₂ i 15% glicerola. Kompetentne bakterijske ćelije su čuvane se u alikvotima od 200 µl na -80°C.

3.2.3.8. TRANSFORMACIJA E. Coli DH5α KOMPETENTNIH ĆELIJA

(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 kao primaoci strane DNK upravo zbog svoje značajne reproduktivne sposobnosti, te stoga replikuju primljenu DNK jednako efikasno kao i svoju sopstvenu.

Kompetentne ćelije (200 µl) su najpre otopljene na ledu, a potom im je dodat produkt ligacije plazmida i DNK fragmenta uz veoma pažljivo, blago mešanje. Smeša je inkubirana 30 min na ledu. Izlaganjem smeše temperaturnim šokovima: led - 42 °C (2 min) - led (10 min), propustljivost bakterijskih membrana dostiže maksimum što omogućava efikasnu transformaciju kompetentnog soja *E.coli* bakterija plazmidnom DNK. Transformisanim ćelijama je potom dodato 800 µl tečnog LB bez antibiotika te su inkubirane u aerisanim uslovima na 37°C u toku 30-60 min. Oporavak je nastavljen dodavanjem 1 ml svežeg LB medijuma sa antibiotikom i rastom u aerisanim uslovima na 37°C u toku 1-2 h. Nakon toga je alikvot bakterijske kulture (20-100 µl) razmazan po čvrstoj LB podlozi koja sadrži antibiotik. Bakterije na podlozi su rasle preko noći na 37°C, posle čega su uočene pojedinačne kolonije na petri šoljama. S obzirom na selektivnost podloge, samo bakterije koje su primile plazmidnu DNK tj. transformanti, mogu da izrastu.

3.2.3.9. 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 4. U slučaju transformacije bakterija odabranim konstruktima dobijen je veliki broj transformanata. Da bi se smanjio broj onih koji će biti proveravani sekvenciranjem, izvršena je digestija konstrukata istim restrikcionim enzimima kojima su plazmid i fragment bili pripremljeni pre reakcije ligacije. Na taj način DNK fragment je bio “izbačen” iz plazmida, što je proveravano elektroforezom na agaroznom gelu.

Za dalje potrebe eksperimenata, plazmidna DNK iz transformanata je izolovana na maloj i velikoj skali, na način koji je opisan ranije u poglavlju.

3.2.3.10. EKSPRESIJA KLONIRANOG GENA U HUMANIM HEPG2 ĆELIJAMA

(Boshart et al., 1992; Luckow and Schutz, 1987)

Reporter geni omogućavaju funkcionalnu analizu eukariotskih regulatornih *cis*-elemenata izvođenjem enzimskih esejja poput CAT esejja, β -galaktozidaznog esejja i drugih. U cilju funkcionalne analize odabranih nekdirajućih regiona gena *PAH*, fragmenti koji sadrže potencijalna vezujuća mesta za transkripcione faktore su uklonirani u pBLCAT5 plazmidne vektore. Izabrani plazmid sadrži bakterijski gen za hloramfenikol acetiltransferazu, *CAT*. *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 esejjem. Osim toga, pBLCAT5 sadrži timidin kinazni promotor poreklom iz Herpes simpleks virusa koji obezbeđuje ekspresiju reporter gena. Promena nivoa bazalne ekspresije otkriva funkcionalne karakteristike proučavanih regiona. Konstrukt se transfekcijom unosi u odgovarajuće eukariotske ćelije u cilju analize njegove aktivnosti.

3.2.3.11. TRANSFEKCIJA PLAZMIDNE DNK U HEPATOCITE - LIPOFEKTAMINSKA TRANSFEKCIJA

(Zukić et al., 2010)

U eksperimentima funkcionalne karakterizacije odabranih nekodirajućih regiona gena *PAH* primenjena je lipofektaminska transfekcija na HepG2 ćelijama, prema uputstvu proizvođača. Lipofektamin formira komplekse oko DNK i stapajući se sa ćelijskom membranom, eukariotskim ćelijama doprema stranu DNK.

Za eksperimente transfekcije $0,5 \times 10^6$ HepG2 ćelija zasejano je u 2 ml DMEM medijuma bez antibiotika u pojedinačni 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 su gajene 24 h pri standardnim uslovima.

Narednog dana, ćelijama je dodat svež DMEM bez antibiotika i potom je pristupljeno pripremi transfekcione smeše. Najpre je 6 μg plazmidne DNK konstrukta i 2 μg pCH plazmida (koji ekspirmira beta galaktozidazu) rastvoreno u 250 μl Opti-MEM-a (*Invitrogen*) i blago promešano. Zatim je 10 μl Lipofektamina 2000 (*Invitrogen*) rastvoreno u 250 μl Opti-MEM-a, blago promešano i inkubirano 5 min. Na kraju su ove dve smeše sjedinjene, blago promešane i inkubirane 20 min čime je omogućeno formiranje kompleksa između lipofektamina i DNK. Nakon isteka ovog vremena, u pojedinačni bunar P-6 šolje dodavano je, kap po kap, 500 μl transfekcione smeše. P-6 šolja je zatim blago zaljuljana da bi se medijum bolje sjedinio sa transfekcionom smešom. Ćelije su u prisustvu transfekcione smeše inkubirane 4 h, nakon čega su ispirane PBS-om nakon čega im je dodat svež medijum. Transfekovane ćelije su gajene 48 h pre nego što su pokupljene i pripremljene za eseje.

3.2.3.12. PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKATA

(Zukić et al., 2010)

Nakon 48h od transfekcije, ćelije su temeljno isprane PBS-om od medijuma. Nakon tripsinizacije i njihovog sakupljanja, ćelije su resuspendovane u 1 ml TEN

pufera (40 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8; 150 mM NaCl). Nakon centrifugiranja na 13 000 rpm tokom 2 min, ćelijski talog je vorteksovanjem resuspendovan u 100 μ l 0,25 M Tris HCl pH 8. Liziranje ćelija je postignuto njihovim naizmeničnim stavljanjem u tečni azot (-196°C) i vodeno kupatilo (+37°C) uz vorteksovanje nakon svakog koraka, što je ponovljeno 3 puta. Nakon centrifugiranja na 13 000 rpm tokom 5 min (+4°C), supernatant je alikvotiran (po 50 μ l za svaki esej) i prebačen u nove mikrotube. Pripremljeni ekstrakti su do korišćenja za CAT i β -galktozidazni esej čuvani na -80°C.

3.2.3.13. CAT ELISA ESEJ

(Prema uputstvu kita *CAT ELISA, Roche*)

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. Bazalni nivo transkripcije reporterskog CAT gena je obezbeđen jakim promotorom, tako da promena nivoa bazalne ekspresije kod analiziranih konstrukata ukazuje na funkcionalne karakteristike potencijalnog regulatora transkripcije. Esej je izveden prema uputstvu proizvođača (*Roche*). CAT ELISA se bazira na „sendvič“ ELISA principu. Anti-CAT antitelo vezano je za površinu mikrotitar ploče (*CAT ELISA* kit). Za njega se specifično vezuje ukupna hloramfenikol acetiltransferaza prisutna u uzorku (ili standardu). Primarno antitelo je obeleženo digoksinom (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 μ l) su pomešani sa puferom za uzorak (*Roche* kit) do finalne zapremine od 200 μ l, a zatim nanoseni u bunariće na mikroploči i inkubirani 1 h sa 37°C, pokriveni. Nakon vezivanja hloramfenikol acetiltransferaze iz

uzorka, bunarići su pet puta ispirani sa po 250 μ l pufera za ispiranje (*Roche* kit). Zatim je u bunariće dodavano po 200 μ l anti-CAT-DIG antitela (*Roche* kit) nakon čega su bunarići pokriveni i inkubirani 1 h na 37°C. Nakon vezivanja primarnog antitela, bunarići su pet puta ispiraju sa po 250 μ l pufera za ispiranje (*Roche* kit). Zatim je u bunariće dodavano po 200 μ l anti-DIG-POD antitela (*Roche* kit) nakon čega su bunarići pokriveni i inkubirani 1 h na 37°C. Nakon vezivanja sekundarnog antitela, bunarići su pet puta ispirani sa po 250 μ l pufera za ispiranje (*Roche* kit). Na kraju je u bunariće dodavano po 200 μ l supstrata (*Roche* kit) nakon čega su inkubirani pokriveni do razvijanja boje (10-40 min) na sobnoj temperaturi. Merenje absorbance na talasnoj dužini od 405 nm vršeno je 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.

3.2.3.14. BETA GALAKTOZIDAZNI ESEJ

(Prema uputstvu *Beta-galactosidase assay kit, Promega*)

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

Priprema za esej se odvijala na ledu. Ćelijski ekstrakti (50 μ l) su pomešani sa istim volumenom pufera za esej (200 mM natrijum fosfatni pufer pH 7,3; 2 mM MgCl₂; 100 mM β -merkaptioetanol; 1,33 mg/ml ONPG, finalna koncentracija 2x) i inkubirani u pokrivenoj mikrotitar ploči sa ravnim dnom do razvijanja boje (30-45 min) na 37°C. Merenje absorbance na talasnoj dužini od 420nm vršeno je pomoću čitača za

mikroploče (*SLT, Lab instruments*). Radi određivanja koncentracije β -galaktozidaze u uzorku, neophodno je napraviti standardnu kalibracionu krivu tako što se poznata razblaženja β -galaktozidazne (*Promega*), uključujući blank, pripremaju i mere na identičan način.

3.2.3.15. ANALIZA INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA

Radi proučavanja regulatornog potencijala odabranih nekodirajućih regiona gena *PAH*, sintetisane su odgovarajuće probe - parovi komplementarnih jednolančanih oligonukleotida (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. Za proučavanje interakcija potencijalno regulatornih DNK sekvenci i transkripcionih faktora korišćena je metoda promenjene elektroforetske pokretljivosti (eng. *electrophoretic mobility shift assay, EMSA*). U eksperimentima su, pored radioaktivno obeleženih proba, korišćene i neobeležene probe koje su imale ulogu specifičnih kompetitora (tzv. „hladna proba“).

Reakcija obeležavanja 5' kraja oligonukleotida vršena je pomoću T4 polinukleotidne kinaze (*Thermo Scientific*) prema uputstvu proizvođača.

Reakciona smeša za obeležavanje finalne zapremine 20 μ l sadržala je sledeće komponente:

- 10 pmol jednolančanog oligonukleotida, navedenog u tabeli 8.
- 1 μ l γ -³²P dATP-a
- 10xpufer A
- 10 U T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μ L)

Reakcija je inkubirana na 37°C u toku 30 min, nakon čega su neugrađeni radioaktivni nukleotidi uklanjani iz reakcije metodom molekuskog sejanja kroz G-25 sefadeks kolonice (*GE Healthcare*). Obeleženi jednolančani oligonukleotid je u potpunosti uparavan u vakuum centrifugi i rastvaran 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; 1 mM DTT). Zatim je dodavan 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 postignuta je kratkom denaturacijom na temperaturi od 90°C u toku 3 minuta i renaturacijom – sporim hlađenjem do sobne temperature. Specifični aktivitet oligonukleotidne probe određivan je merenjem na scintilacionom brojaču (*LKB*). Reakcija prevođenja neobeleženih proba u dvolančanu formu je vršena na isti način.

3.2.3.16. IZOLOVANJE JEDARNIH PROTEINA IZ HEPG2 ĆELIJSKE LINIJE

(Schreiber et al., 1989)

Kultivisanje HepG2 ćelijske linije je vršeno na način koji je opisan ranije u poglavlju. Za izolaciju jedarnih proteina iz HepG2 ćelijske linije bilo je potrebno oko 1×10^6 ćelija. Ćelije su resuspendovane u 1 ml TBS (*Tris-Buffered Saline*) i prebačene u mikrotubu. Nakon kratkog centrifugiranja na 10 000 rpm, talog je resuspendovan u 400 μ l 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). Ćelije su zatim inkubirane 15 minuta na ledu, nakon čega im je dodato 25 μ l 10% rastvora Nonidet NP-40. Nakon intenzivnog vorteksovanja, homogenat je centrifugiran 30 sekundi na 10 000 rpm. Talog koji sadrži ćelijska jedra je resuspendovan u 50 μ l hladnog pufera C (20 mM HEPES pH 7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) i potom snažno protresan 15 minuta na +4°C (*MultiBio RS-24, LKB*). Jedarni ekstrakt je centrifugiran 5 min na 10 000 rpm na +4°C a supernatant u alikvotima čuvan na -70°C.

3.2.3.17. ESEJ PROMENJENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI

(Fried and Crothers, 1981; Wall et al., 1988)

Interakcija jedarnih proteina sa odabranim fragmentima gena *PAH* analizirana je modifikovanom standardnom metodom promenjene elektroforetske pokretljivosti.

Pri određenim uslovima, jedarni protein 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. Ukoliko se u reakcionu smešu doda i antitelo koje prepoznaje neki od proteina u formiranom kompleksu, rezultujući formirani kompleks će imati još manju elektroforetsku pokretljivost, dakle, još više će zaostajati na gelu u odnosu na slobodan fragment, što je označeno kao *supershift*. Alternativno, ukoliko dodato antitelo prepoznaje DNK vezujući domen proteina iz kompleksa, ono će kompetirati za vezivno mesto sa obeleženom probom što će rezultirati u tzv. hlađenju kompleksa – formirani kompleks će na gelu imati manji intenzitet.

Reakciona smeša finalne zapremine 25 μ l sadržala je sledeće komponente:

- 1-5 ng 32 P obeležene dvolančane probe (finalna specifična aktivnosti oko 10 000 cpm)
- 3-10 μ g jedarnih proteina
- 10 x pufer (50 mM Tris-Cl, 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:

- Specifični kompetitor (ista, ali neobeležena dvolančana proba, dodata u velikom višku u odnosu na obeleženu probu)
- Nespecifični dvolančani kompetitor, *Poly(dI-dC):Poly(dI-dC)*, 10U (*Sigma*), 50 ng/ μ l po reakciji
- Antitela: anti-KLF1 (*Abcam*, 0,5mg/ml), 2 μ g po reakciji; anti-C/EBP alpha (*Abcam*, 1 mg/ml), 2 μ g po reakciji

Reakciona smeša je pripremana na ledu, dok je za optimalne uslove vezivanja transkripcionih faktora za DNK probe inkubirana na 37°C tokom 30 min. U slučaju *supershift* analize, reakcija vezivanja antitela za protein je preinkubirana na ledu 30 min pre dodavanja radioaktivno obeležene probe. Nakon inkubacije jedarnih proteina sa probom (i po potrebi dodatnih navedenih komponenti), reakcionoj smeši je dodato 6 μ l

boje (0,25%, brom fenol plavo, 0,25% ksilen cijanol, 30% glicerol) i potom je nanešena na gel. Za razdvajanje fragmenata korišćen je vertikalni 4% poliakrilamidni gel (akrilamid : N,N'-metilenbisakrilamid, u odnosu 29 : 1). Kao inicijatori polimerizacije korišćeni su 0,1% APS i 0,01% TEMED, dok je za pripremanje gela korišćen 0,5xTBE pufer (100 mM Tris, 83 mM borna kiselina, 1 mM EDTA pH 8,0), koji je takođe korišćen i kao pufer za elektroforezu. Elektroforeza se odvijala pri konstantnom naponu od 250 V i struji od 65 mA u toku jednog sata za kraće fragmente, odnosno 3 sata za velike fragmente. Poliakrilamidni gel je sušen i analiziran na fosfoimidžeru (*Cyclone, Perkin Elmer*) ili autoradiografski.

3.2.4. ANALIZA VARIJANTI U POTENCIJALNIM GENIMA MODIFIKATORIMA KOGNITIVNOG PKU FENOTIPA

3.2.4.1. ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTE m.10398A>G U MITOHONDRIJSKOM *MT-ND3* GENU SA KOGNITIVNIM FENOTIPOM PACIJENATA SA PKU

Varijanta m.10398A>G je u grupi pacijenata sa PKU bila detektovana metodom sekvenciranja, kao što je opisano ranije u poglavlju. Region mitohondrijske DNK od 9968nt do 10814 nt je bio umnožen uz pomoć prajmera navedenih u Tabeli 7.

PCR smeša finalne zapremine 25 µl sadržala je sledeće komponente:

- 200 ng DNK
- 10x PCR pufer sa 15 mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1xPCR pufer, 1,5 mM MgCl₂)
- 5xQ pufer (finalna koncentracija 1x)
- 25 mM MgCl₂ (finalna koncentracija 1,5 mM)

- dNTPs (finalna koncentracija svakog 200 μ M)
- prajmeri navedeni u tabeli 7 (finalna koncentracija svakog 10 pmol)
- KAPA Taq DNA polimeraza, 5U/ μ l (finalno 1U)

Temperaturni profil PCR reakcije bio je sledeći:

95°C/5min

(95°C/30s, 60°C/30s, 72°C/45s) ponovljeno 35 puta

72°C/10min

PCR produkti su proveravani elektroforezom na 2% agaroznom gelu i potom korišćeni u reakciji sekvenciranja.

Varijanta m.10398A>G je kod ispitanika kontrolne grupe bila detektovana PCR-RFLP metodom. PCR-RFLP (eng. *Polimerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism*) je metoda koja se koristi za direktnu detekciju prisustva genskih varijanti. Zasniva se na tome da postojanje promene u sekvenci kreira novo ili ukida postojeće mesto prepoznavanja odgovarajućeg restrikcionog enzima. Na taj način, umnoženi fragment DNK će nakon delovanja restrikcionog enzima imati različite dužine u zavisnosti od prisustva/odsustva varijante. U ovom delu istraživanja je korišćen *DdeI* restrikcioni enzim (*New England Biolabs*).

Smeša za digestiju finalne zapremine 20 μ l sadržala je sledeće komponente:

- 6 μ l PCR produkta
- 10xNEBpuffer 3 (finalno 1x)
- *DdeI*, 15U/ μ l (finalno 3U)

Smeša za digestiju je inkubirana 16 h na 37°C i potom analizirana na 4 agaroznom gelu.

3.2.4.1.1. STATISTIČKA ANALIZA

Za utvrđivanje razlika u distribuciji učestalosti alela između pacijenata i ispitanika kontrolne grupe je korišćen χ^2 test. Za analizu razlike u vrednostima koeficijenta inteligencije između grupa pacijenata je korišćen Studentov t-test. Sve vrednosti p smatrale su se statistički značajnim ako su bile manje od 0,05.

3.2.4.2. IDENTIFIKACIJA NOVIH POTENCIJALNIH GENA

MODIFIKATORA KOGNITIVNOG PKU FENOTIPA

3.2.4.2.1. SEKVENCIRANJE KOMPLETNOG HUMANOG GENOMA

(Drmanac et al, 2010)

Tehnologija sekvenciranja nove generacije (eng. *New Generation Sequencing, NGS*) predstavlja novu i revolucionarnu tehnologiju kojom je moguće analizirati hiljade gena u samo jednom koraku. NGS tehnologija omogućava širok spektar mogućih primena, od analize grupe ciljnih gena kod velikog broja pacijenata, do čak sekvenciranja čitavih genoma, uključujući i humani genom. Sekvenciranje kompletnog humanog genoma velikog broja individua, između ostalog, doprinosi razumevanju, lečenju i prevenciji mnogih bolesti. Sekvenciranje kompletnog humanog genoma sa velikom pokrivenošću je daleko najmoćnije sredstvo za otkrivanje čitavog niza genetičkih varijacija, uključujući aminokiselinske zamene, insercije, delecije, inverzije, kompleksne rearanžmane i varijante u broju kopija. Takođe, primenom ove tehnologije je moguće doći do otkrivanja novih, do sada neokarakterisanih gena, a takođe je moguće i razjašnjavanje funkcije već poznatih gena.

U istraživanje identifikacije novih potencijalnih gena-modifikatora kognitivnog PKU fenotipa bili su uključeni pacijenti sa PKU koji su po metaboličkom fenotipu bili svrstani u klasičnu PKU (Phe > 1 200 $\mu\text{mol/l}$), koji, međutim, nikada nisu razvili mentalnu retardaciju, i pored toga što nikada nisu bili na PKU dijeti (ili je ta dijeta bila izrazito loše sprovedena). U ovu studiju je bilo uključeno ukupno 10 pacijenata sa PKU

iz 6 porodica, uključujući 4 para srodnika. Karakteristike odabranih pacijenata su predstavljene u Tabeli 9. Uzorci pacijenata su bili analizirani primenom NGS tehnologije, pri čemu je je analizirana kompletna genomska DNK (eng. *Whole Genome Sequencing, WGS*). Genomska DNK visoke čistoće je izolovana iz periferne krvi na koloni prema uputstvu *QIAGEN*-a, kao što je ranije objašnjeno, a ukupna količina DNK korišćena za analizu je iznosila 5 µg po uzorku. Sekvenciranje je izvršeno u kompaniji Complete Genomics u Kaliforniji, SAD (<http://www.completegenomics.com>), ljubaznošću dr R. Drmanca.

Tabela 9. Karakteristike pacijenata sa PKU uključenih u analizu kompletnog humanog genoma. Parovi srodnika su: P1 i P9; P2 i P10; P5 i P8; P6 i P7. Za P1 i P2 nije dostupan podatak o godini rođenja.

pacijent	godina rođenja	pol	genotip <i>PAH</i>	koncentracija fenilalanina u krvi (µmol/l)	IQ vrednost
P1	-	ž	p.Leu48Ser/p.Leu48Ser	1 200	80-85
P2	-	ž	p.Leu48Ser/p.Leu48Ser	1 200	80-85
P3	2007.	ž	p.Leu48Ser/p.Leu48Ser	1 200	85
P4	1974.	ž	p.Leu48Ser/p.Arg408Trp	1 200	110
P5	2002.	ž	p.Arg408Trp/p.Glu390Gly	1 000	95
P6	2007.	ž	p.Leu48Ser/p.Leu48Ser	1 200	110
P7	2007.	ž	p.Leu48Ser/p.Leu48Ser	1 200	110
P8	2003.	ž	p.Arg408Trp/p.Glu390Gly	1 200	95
P9	2008.	ž	p. Leu48Ser/p.Arg158Gln	1 200	85-90
P10	2008.	m	p.Leu48Ser/p.Leu48Ser	600	80

3.2.4.2.2. BIOINFORMATIČKA ANALIZA REZULTATA SEKVENCIRANJA NOVE GENERACIJE

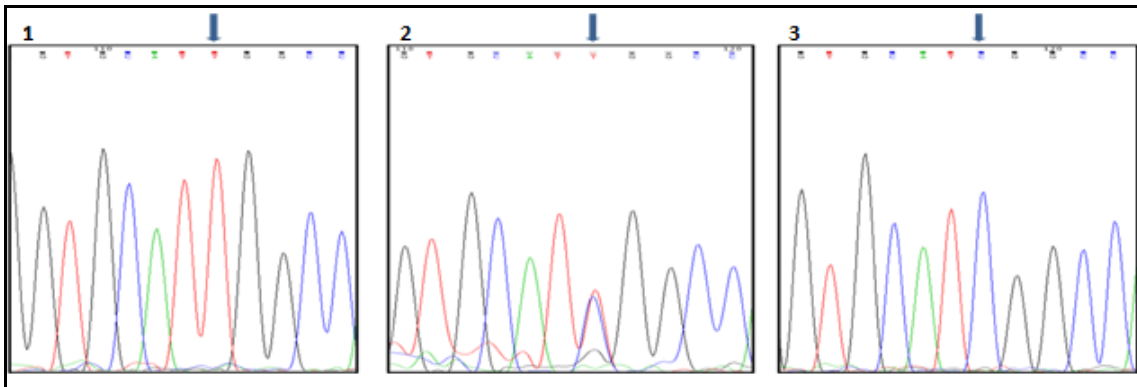
Nakon sekvenciranja kompletnog genoma pacijenata sa PKU, izvršeno je njihovo poređenje sa referentnim humanim genomom, pri čemu je korišćena verzija GRCh37 (eng. *Genome Reference Consortium human genome build 37*). Varijante koje su detektovane u uzorcima pacijenata, a nisu prisutne u referentnom genomu su zapisane u vcf formatu (eng. *Variant Call Format*). Vcf predstavlja generički format koji se koristi za skladištenje podataka o varijantama DNK, pri čemu omogućava prikaz širokog opsega različitih varijacija u odnosu na referentnu sekvencu. Za analize funkcije gena u kojima su detektovane varijante, korišćene su sledeće baze podataka: NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), GeneCards (<http://www.genecards.org>) i Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Takođe, vcf fajlovi su analizirani u programu IGV eng. (*Integrative Genomic Viewer*) radi preciznog pozicioniranja varijantnih nukleotida. Na kraju pretraživanja baza podataka (engl. "*data mining*"), u analizi je primenjena i selekcija gena koji su zajednički za više analiziranih porodica (engl. „*cross sample analysis*“). Za predikciju efekta pojedinih detektovanih varijanti su korišćeni sledeći softveri: PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), SIFT (<http://sift.jcvi.org>), MutPred (<http://mutpred.mutdb.org>) i PROVEAN (<http://www.provean.jcvi.org>).

4. REZULTATI

4.1. MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA MUTACIJA U GENIMA UZROČNICIMA KOD PACIJENATA SA HPA U SRBIJI

4.1.1. DETEKCIJA MUTACIJA U GENU *PAH*

Kod svih pacijenata je analiza započeta detekcijom malih promena u genu *PAH* i to metodom DNK sekvenciranja (Slika 8).



Slika 8. Deo sekvence drugog egzona gena *PAH* kod: 1) pacijenta sa normalnom sekvencom, (c.143T na oba hromozoma), 2) pacijenta heterozigota za p.Leu48Ser mutaciju (c.143T>C na jednom hromozomu) i 3) pacijenta homozigota za p.Leu48Ser mutaciju, (c.143C na oba hromozoma).

Tabela 10. Spektar i učestalost mutacija u genu *PAH* kod pacijenata sa PKU u Srbiji

HGVS nomenklatura		Egzon	Broj hromozoma	Relativna učestalost (%)	Tip mutacije
DNK	Protein				
c.47_48delCT	p.Ser16*	1	1	0,67	<i>frameshift</i>
c.58C>T	p.Gln20*	1	3	2	<i>nonsense</i>
c.143T>C	p.Leu48Ser	2	47	31,33	<i>missense</i>
c.331C>T	p.Arg111*	3	3	2	<i>nonsense</i>
c.473G>A	p.Arg158Gln	5	4	2,67	<i>missense</i>
c.529G>C	p.Val177Leu	6	4	2,67	<i>missense</i>
c.529G>A	p.Val177Met	6	1	0,67	<i>missense</i>
c.638T>C	p.Leu213Pro	6	1	0,67	<i>missense</i>
c.673C>A	p.Pro225Thr	6	3	2	<i>missense</i>
c.676C>A	p.Gln226Lys	6	2	1,33	<i>missense</i>
c.692C>T	p.Ser231Phe	6	2	1,33	<i>missense</i>
c.510-?_706+?del	-	6	2	1,33	velika delecija
c.727C>T	p.Arg243*	7	2	1,33	<i>nonsense</i>
c.734T>C	p.Val245Ala	7	1	0,67	<i>missense</i>
c.755G>A	p.Arg252Gln	7	1	0,67	<i>missense</i>
c.781C>T	p.Arg261*	7	3	2	<i>nonsense</i>
c.782G>A	p.Arg261Gln	7	6	4	<i>missense</i>
c.842C>T	p.Pro281Leu	7	7	4,67	<i>missense</i>
c.890G>A	p.Arg297His	8	1	0,67	<i>missense</i>
c.916A>G	p.Ile306Val	9	10	6,67	<i>missense</i>
c.1065+3A>G	-	**	1	0,67	<i>splice</i>
c.1066-11G>A	-	**	2	1,33	<i>splice</i>
c.1089delG	p.Lys363Asnfs*37	11	1	0,67	<i>frameshift</i>
c.1169A>G	p.Glu390Gly	11	10	6,67	<i>missense</i>
c.1208C>T	p.Ala403Val	12	3	2	<i>missense</i>
c.1222C>T	p.Arg408Trp	12	21	14	<i>missense</i>
c.1238G>C	p.Arg413Pro	12	1	0,67	<i>missense</i>
c.1241A>G	p.Tyr414Cys	12	2	1,33	<i>missense</i>
c.1247C>A	p.Pro416Gln	12	1	0,67	<i>missense</i>
c.1315+1G>A	-	**	3	2	<i>splice</i>
neidentifikovano			1	0,67	-
ukupno			150		

**Mutacije koje pogađaju mesta iskrajanja i koje se nalaze u obližnjim intronskim regionima (IVS10+3A>G, IVS10-11G>A, IVS12+1G>A)

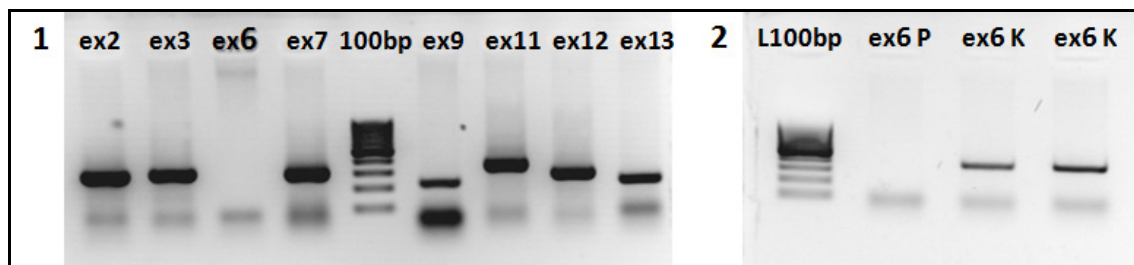
U okviru ovog dela studije je detektovano 29 poznatih i 1 nova mutacija u genu *PAH* koje dovode do razvoja bolesti kod 75 pacijenta (Tabela 10, Slika 8) iz Srbije. Od toga, 20 mutacija je dovelo do nesinonimne aminokiselinske zamene u proteinskoj sekvenci (*missense*), četiri su uzrokovale promenu amino kiseline u stop kodon (*nonsense*), tri su menjale mesto iskrajanja introna (*splice*), dve su dovele do male delecije (od jednog i dva nukleotida), što je uzrokovalo pomeranje okvira čitanja (*frameshift*). Takođe, detektovana je i jedna velika delecija. Ubedljivo najčešća mutacija u populaciji pacijenata sa PKU iz Srbije je p.Leu48Ser (31,33%). Osim promena u sekvenci gena *PAH* koje dovode do razvoja bolesti, u okviru kodirajućih regiona su

detektovane i sinonimne aminokiselinske zamene koje ne dovode do promene u proteinu (p.Gln232Gln, p.Val245Val i p.Leu385Leu). U promotorskoj sekvenci nije detektovana nijedna varijanta kod PKU pacijenata u Srbiji.

4.1.2. DETEKCIJA MUTACIJA U GENU *PAH* – METODE ZA DETEKCIJU VELIKIH DELECIJA

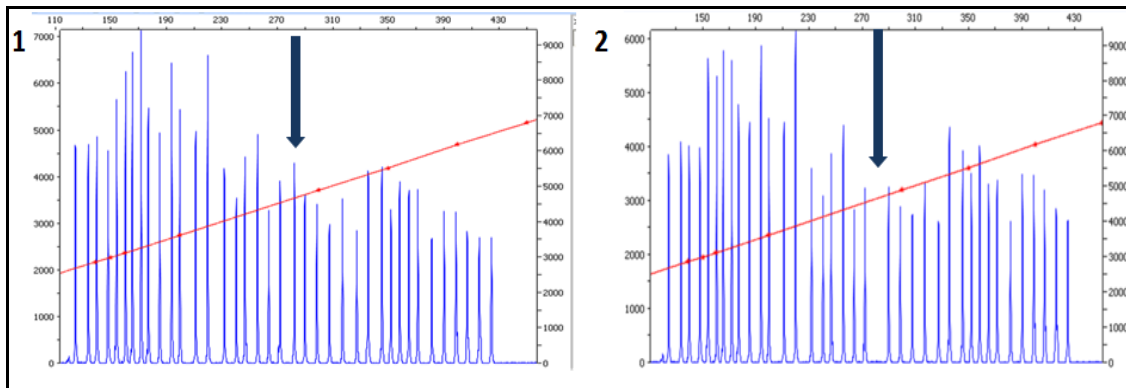
U slučaju pacijenata sa HPA kod kojih nisu bile detektovane obe patološke mutacije, u okviru ove studije je po prvi put vršena i detekcija velikih delecija u genu *PAH* primenom MLPA metode.

Među analiziranim pacijentima je identifikovan pacijent kod koga nije bilo moguće u PCR reakciji umnožiti šesti egzon gena *PAH* (Slika 9). U preostalim analiziranim egzonima nije bila pronađena nijedna patološka mutacija. Zbog sumnje na prisustvo velike delecije, na uzorku ovog pacijenta je nastavljena analiza i to MLPA metodom.



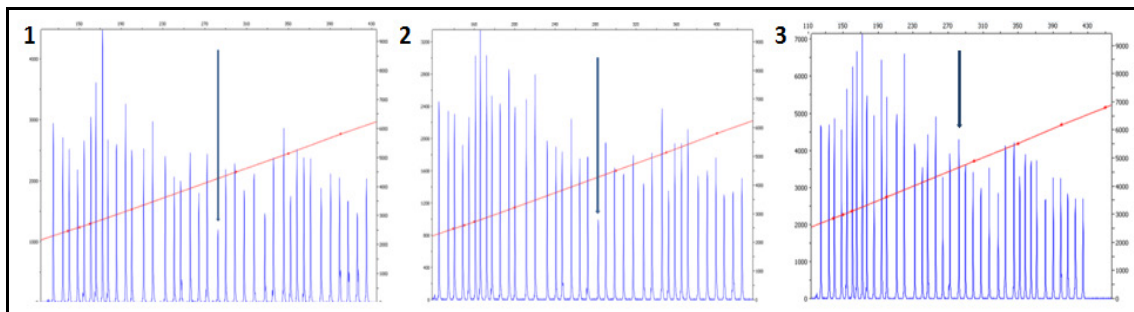
Slika 9. Provera uspešnosti amplifikacije egzona gena *PAH*: 1) amplifikacija različitih egzona kod pacijenta sa izostankom amplifikacije egzona 6, 2) izostanka amplifikacija šestog egzona kod pacijenta (označenog kao ex6 P) i uspešna amplifikacija kod kontrolnih uzoraka (označenih kao ex6 K).

MLPA metoda je kod ispitivanog pacijenta pokazala prisustvo delecije čitavog šestog egzona, c.510-?_706+?del, i to u homozigotnom stanju (Slika 10).



Slika 10. MLPA analiza gena *PAH*: 1) kontrolni uzorak sa prisutnim svim signalima, uključujući i signal za šesti egzon, 2) pacijent kod koga je signal koji odgovara šestom egzonu u potpunosti odsutan.

Radi potvrde statusa nosioca, roditelji pacijenta su takođe podvrgnuti MLPA analizi, koja je pokazala da su oboje heterozigotni nosioci delecije koja obuhvata šesti egzon gena *PAH* (Slika 11). Osim što je na ovaj način dodatno potvrđeno prisustvo mutacija kod pacijenta, takođe je i isključeno prisustvo uniparentalne dizomije za ovaj region kao uzroka bolesti.

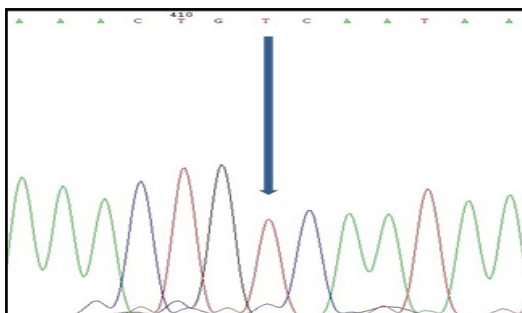


Slika 11. MLPA analiza heterozigotnih nosilaca delecije egzona 6 gena *PAH* i kontrolnog uzorka: 1) otac, 2) majka, 3) kontrolni uzorak. Kod oba roditelja je signal koji odgovara šestom egzonu smanjenog intenziteta u poređenju sa kontrolom.

Budući da je nakon detekcije mutacija pretragom čitavog gena *PAH* metodom DNK sekvenciranja jedan PKU alel ostao neokarakterisan, uzorak ovog pacijenta je takođe analiziran MLPA metodom. Međutim, kod ovog pacijenta nije detektovano prisustvo velikih delecija. Kombinovanjem metoda DNK sekvenciranja i MLPA analize je na ovaj način detektovano prisustvo mutacija na 149 od 150 analiziranih PKU alela.

4.1.3. DETEKCIJA MUTACIJA U GENU *PTS* ODGOVORNOM ZA RETKU FORMU HPA

U slučaju pacijenta sa HPA kod kojeg ni metodom sekvenciranja kao ni analizom prisustva velikih delecija (MLPA metodom) nisu detektovane patološke mutacije u genu *PAH*, sledeći korak je pretpostavljao potragu za mutacijama u genima odgovornim za BH4 deficijenciju. Budući da najveći broj pacijenata sa BH4 deficijencijom ima mutacije u genu za piruvoil tetrahidropterin sintazu, *PTS* (Opladen et al., 2012), upravo ovaj gen je najpre analiziran kao potencijalni gen-uzročnik. Svih šest egzona (sa egzon-intron granicama) su umnoženi a zatim i sekvencirani. Sekvenciranje je pokazalo da je analizirani pacijent homozigotni nosilac mutacije c.407A>T (p.Asp136Val), u šestom egzonu, koja je prisutna u HGMD bazi podataka pod brojem CM971285 (Slika 12). Za ovu mutaciju postoje podaci iz literature da dovodi do razvoja bolesti (Oppliger et al., 1997; Dudesek et al., 2001). Analizom roditeljskih uzoraka je pokazano da su oba roditelja heterozigotni nosioci za datu mutaciju, čime je potvrđeno da se mutacije kod pacijenta nalaze na različitim hromozomima. Zahvaljujući primeni molekularne genetike i optimizaciji metode za detekciju mutacija u genu *PTS*, prvi put u Srbiji je otkriven pacijent sa BH4 deficijencijom.



Slika 12. Deo sekvence šestog egzona gena *PTS* kod pacijenta homozigota za p.Asp136Val mutaciju, (c.407A>T na oba hromozoma).

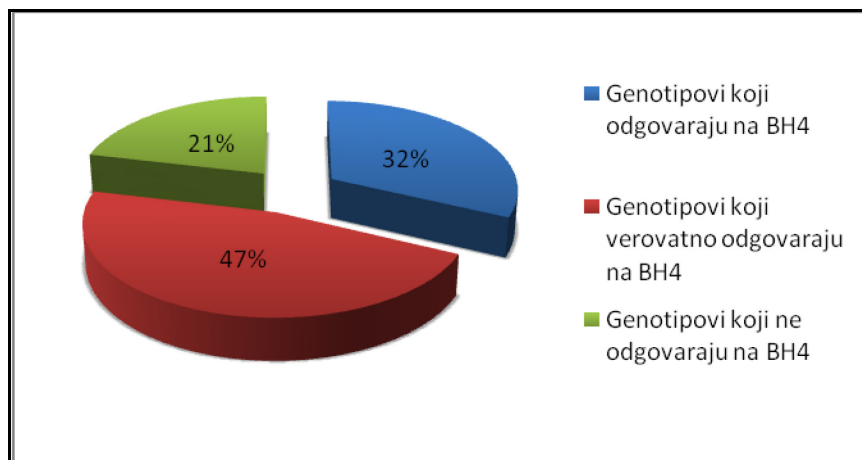
4.1.4. PREDIKCIJA KORISNOSTI BH4 LEKA U POPULACIJI PACIJENATA SA PKU IZ SRBIJE NA OSNOVU GENOTIPA

S obzirom da je utvrđen spektar mutacija kod pacijenata sa HPA u Srbiji, a imajući na umu da odgovor na terapiju sa BH4 zavisi upravo od mutacija koje pacijent ima u *PAH* genotipu, sledeći korak je obuhvatao procenu dobrobiti od primene terapije sa BH4 u Srbiji. Naime, među detektovanim mutacijama u genu *PAH* bilo je 9 mutacija (p.Leu48Ser, p.Arg158Gln, Val245Ala, p.Arg261Gln, p.Ile306Val, p.Glu390Gly, p.Ala403Val, p.Arg413Pro i p.Tyr414Cys) za koje literaturni podaci ukazuju na pozitivan odgovor na terapiju sa BH4 (Blau and Erlandsen, 2004; Zurfluh et al., 2008; Trefz et al., 2009; Karačić et al., 2009; Sarkissian et al., 2011; Sterl et al., 2012). Ukupna učestalost mutacija koje bi potencijalno pozitivno reagovala na BH4 iznosi 56%. Međutim, kada je reč o predviđanju odgovora na terapiju sa BH4, primećeno je da prisustvo određenog genotipa (a ne samo prisustvo određene mutacije, tj određenog alela) ima znatno pouzdanije rezultate (Trefz et al., 2009). Osim toga, dodatnu komplikaciju čine inkonzistencije u literaturnim podacima za pojedine mutacije. Upravo zato, radi što preciznije predikcije odgovora na terapiju sa BH4, izvršena je klasifikacija svih *PAH* genotipova iz populacije pacijenata sa PKU iz Srbije na one koji odgovaraju na BH4 (32%), na one koji verovatno odgovaraju na BH4 (47%), i na kraju na one koji ne odgovaraju na BH4 (21%) (Tabela 11, Slika 13). Osim toga, uzeta je u obzir i razlika između genotipova sa jednim i genotipova sa dva alela koji odgovaraju na BH4.

Tabela 11. Predikcija odgovora na terapiju sa BH4 zasnovana na genotipu kod PKU pacijenata

Odgovaraju na BH4		Verovatno odgovaraju na BH4		Ne odgovaraju na BH4
O + IO	O + N	IO + IO	IO + N	N + N
32%		47%		21%
9 (12%)	15 (20%)	16 (21,3%)	19 (25,3%)	16 (21,43%)
Ile306Val/Leu48Ser (2)	Ile306Val/Arg261* (1)		Leu48Ser/Gln20* (1)	Arg408Trp/Val177Leu (1)
Ile306Val/Arg261Gln (2)	Ile306ValArg408Trp (1)		Leu48Ser/Val177Leu (1)	Arg408Trp/Pro225Thr (1)
Ile306Val/Ile306Val (1)	Ile306Val/Pro416Gln (1)		Leu48Ser/Val177Met (1)	Arg408Trp/Arg252Gln (1)
Val245Ala/Leu48Ser (1)	Ile306Val/Gln226Lys (1)		Leu48Ser/Pro225Thr (1)	Arg408Trp/IVS10+3A>G (1)
Glu390Gly/Arg261Gln (1)	Glu390Gly/Arg261* (1)	Leu48Ser/Leu48Ser (12)	Leu48Ser/Ser231Phe (2)	Arg408Trp/Lys363* (1)
Glu390Gly/Glu390Gly (1)	Glu390Gly/Pro281Leu (1)	Leu48Ser/Arg158Gln (3)	Leu48Ser/Arg261* (1)	Arg408W/R408W (1)
Glu390Gly/Arg158Gln (1)	Glu390Gly/Arg408Trp (4)	Leu48Ser/Arg261Gln (1)	Leu48Ser/Pro281Leu (2)	Pro281Leu/Pro225Thr (1)
	Ala403Val/Arg408Trp (1)		Leu48Ser/Arg408Trp (7)	Pro281Leu/Pro281Leu (1)
	Ala403Val/? (1)		Arg261Gln/Ser16* (1)	Pro281Leu/IVS12+1G>A (1)
	Ala403Val/Val177Leu (1)		Arg261Gln/IVS12+1G>A(1)	Arg111*/Arg111* (1)
	Tyr414Cys/IVS1011G>A(1)		Arg413P/Arg408Trp (1)	Arg111*/IVS10-11G>A (1)
	Tyr414Cys/Leu213Pro (1)			Val177Leu/Gln20* (1)
				Arg243*/Arg243* (1)
				Gln226Lys/Gln20* (1)
				IVS12+1G>A/Arg297His (1)
				c.510-?_706+?del / c.510- ?_706+?del (1)

Mutacije u genu *PAH* su označene kao: **O** – one koje odgovaraju na BH4, **IO** – inkonzistentne u odgovoru na BH4 i **N** – one koje ne odgovaraju ili nije poznato da li odgovaraju na BH4 prema podacima iz prethodnih studija (Blau and Erlandsen, 2004; Zurfluh et al., 2008; Trefz et al., 2009; Karačić et al., 2009; Sarkissian et al., 2011; Sterl et al., 2012).



Slika 13. Šematski prikaz predikcije odgovora na BH4 na osnovu genotipa PKU pacijenata. U pacijente koji odgovaraju na BH4 su svrstani pacijenti koji u genotipu imaju jednu mutaciju za koju je pokazano da odgovara na BH4, dok je druga inkonzistentna u odgovoru na BH4. U pacijente koji verovatno odgovaraju na BH4 su svrstani pacijenti koji u genotipu imaju jednu mutaciju koja je inkonzistentna u odgovoru na BH4, pri čemu druga mutacija može biti ili takođe inkonzistentna ili mutacija koja ne odgovara na BH4. U pacijente koji ne odgovaraju na BH4 su svrstani pacijenti koji u genotipu imaju obe mutacije za koje je pokazano da ne odgovaraju na BH4.

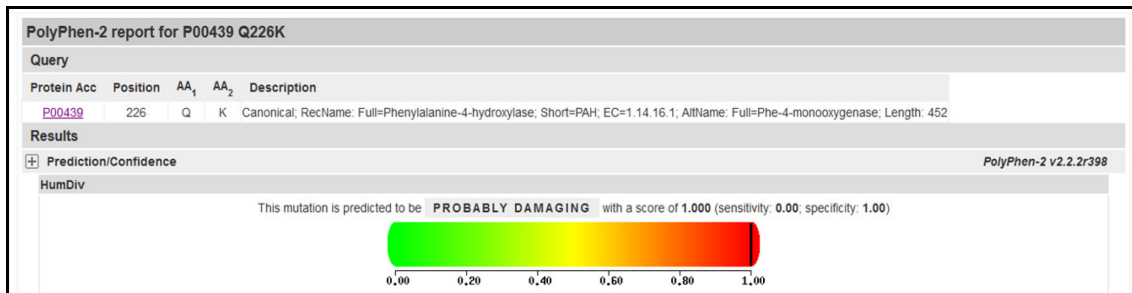
Pretragom čitavog gena *PAH* (svih 13 egzona zajedno sa egzon-intron granicama), promotorskog regiona, korišćenjem MLPA analize, kao i uvođenjem dijagnostike za BH4 deficijenciju, uspešno je izvršena detekcija mutacija u genima uzročnicima HPA. Ukupan broj pacijenata sa HPA u Srbiji koji su analizirani je 76, dakle, ukupno je analizirano 152 hromozoma, pri čemu je prisustvo mutacije koja dovodi do razvoja bolesti detektovano na čak 151 analiziranom hromozomu. Kombinovanjem navedenih različitih metoda, stopa detekcije mutacija u analiziranoj kohorti pacijenata sa HPA je dostigla veoma visoku stopu od 99,34%, čime je značajno unapređena molekularnogenetička dijagnostika za HPA u Srbiji. Osim toga, ovakav pristup je omogućio otkrivanje nove mutacije. Takođe, s obzirom na sprovedenu studiju o odgovoru na terapiju sa BH4 u odnosu na genotip pacijenata, data je i procena dobiti od terapije sa BH4 u Srbiji, Uočeno je da bi 32% pacijenata sa PKU iz Srbije najverovatnije imalo koristi od primene terapije sa BH4, dok maksimalan procenat pacijenata koji bi mogli imati koristi od ovog novog leka iznosi 79%.

4.2. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVE VARIJANTE U KODIRAJUĆEM REGIONU GENA UZROČNIKA HPA

4.2.1. *IN SILICO* ANALIZA p.Gln226Lys PAH

Prilikom detekcije mutacija u genu *PAH* bila je otkrivena nukleotidna zamena c.676C>A (p.Gln226Lys) i to kod dva nesrodna pacijenta sa PKU iz Srbije. Kod ova dva pacijenta je pritom bila detektovana samo po jedna mutacija za koju je poznato da dovodi do razvoja bolesti. Za ovu promenu je ustanovljeno da nije prisutna ni u jednoj od tri korišćene baze podataka (HGMD, BIOPKUdb i PAHDB), niti u dostupnoj literaturi tako da je sledeći korak predstavljala *in silico* analiza uz pomoć odgovarajućih bioinformatičkih softvera koji predviđaju patološki efekat. U *in silico* analizi p.Gln226Lys PAH su korišćeni PolyPhen-2, SIFT, MutPred i Clustal Omega.

PolyPhen-2 program je za datu promenu predviđao da je reč o najverovatnije teškoj mutaciji, pri čemu je odgovarajući skor iznosio 1,000 (Slika 14). SIFT program je za datu promenu predvideo da je teška, pri čemu je odgovarajući skor iznosio 0 (Slika 15). Skorovi ova dva programa ukazali su da je promena p.Gln226Lys u genu *PAH* najverovatnije mutacija koja dovodi do oboljenja. Dodatno, MutPred precizira i mehanizam kojim nastaje nefunkcionalan protein – ovaj program predlaže da, budući da se radi o zameni glutamina lizinom, zapravo pri promeni dolazi do metilacije na poziciji 226 (Slika 16). Korišćenjem programa Clustal Omega je utvrđeno da se u sekvencama svih analiziranih organizama na datoj poziciji uvek nalazi aminokiselina glutamin, što je potvrdilo njenu evolutivnu očuvanost na poziciji 226 u humanom PAH proteinu (Slika 17).



Slika 14. Predikcija efekta p.Gln226Lys aminokiselinske zamene sa PolyPhen-2 programom. Skor za PolyPhen-2 može imati vrednosti od 0 do 1, pri čemu vrednosti bliže nuli označavaju najverovatnije benigne, dok vrednosti bliže jedinici označavaju promene koje najverovatnije narušavaju funkciju proteina.

SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000448059, Q226K	ENSP00000448059	226	Q	K	DAMAGING	0	2.99	216

Slika 15. Predikcija efekta p.Gln226Lys aminokiselinske zamene sa SIFT programom. Skor za SIFT može imati vrednosti od 0 do 1, pri čemu vrednosti bliže nuli označavaju promene koje najverovatnije narušavaju funkciju proteina, dok su vrednosti bliže jedinici najčešće benigne, tj. tolerisane.

MutPred

BUCK INSTITUTE FOR RESEARCH ON AGING INDIANA UNIVERSITY

Sean Mooney Lab Home Predrag Radivojac Lab Home About MutPred

Site prediction results in protein ENST00000553106 peptide: ENSP00000448059 pep:KN...

Mutation	Probability of deleterious mutation	MOLECULAR MECHANISM DISRUPTED			Top 5 features	Exact PTM Match	Neighbor PTM Match
		Actionable Hypotheses	Confident Hypotheses	Very Confident Hypotheses			
Q226K	0.899		Gain of ubiquitination at Q226 (P = 0.0177) Gain of glycosylation at Q226 (P = 0.0462)	Gain of methylation at Q226 (P = 0.009)	Gain of methylation at Q226 (P = 0.009) Gain of ubiquitination at Q226 (P = 0.0177) Gain of glycosylation at Q226 (P = 0.0462) Gain of disorder (P = 0.1519) Loss of stability (P = 0.3725)		

Slika 16. Predikcija efekta p.Gln226Lys aminokiselinske zamene sa MutPred programom. Navedeno je nekoliko hipoteza, pri čemu su sticanje metilacije i ubikvitinacije na poziciji 226 najverovatnije. Vrednosti P odgovaraju verovatnoći za opisani događaj, gde je događaj utoliko verovatniji ukoliko je vrednost P niža. Skor za MutPred predstavlja verovatnoću da je reč o teškoj mutaciji, i može imati vrednosti od 0 do 1, pri čemu vrednosti bliže nuli označavaju najverovatnije benigne, dok vrednosti bliže jedinici označavaju promene koje najverovatnije narušavaju funkciju proteina.

ENSDART00000011943	TAEKATWGTVFRELKTLYPHACREHNRVFPLEKYCGYREDNIPQLEDISHYLQSGCTG
ENSKETT00000042482	TDQEKKTWGTVFRELKTLYPHACYEHNHVFPLLECYGYNENNIPQLEDVSNFLQKCTG
ENSMUST00000020241	TEEERKTWGTVFRILKALYKTHACYEHNHIFPPLLEKYCGFREDNIPQLEDVVSQFLQICTG
ENST00000553106	MEEEKKTWGTVFKTLKSLYKTHACYEYNHIFPPLLEKYCGFHEDNIPQLEDVVSQFLQICTG
ENSPTRT00000009860	MEEEKKTWGTVFKTLKSLYKTHACYEYNHIFPPLLEKYCGFHEDNIPQLEDVVSQFLQICTG
	:*: *****: **: ** **** *: **: *****: ***: *: *****:***: **

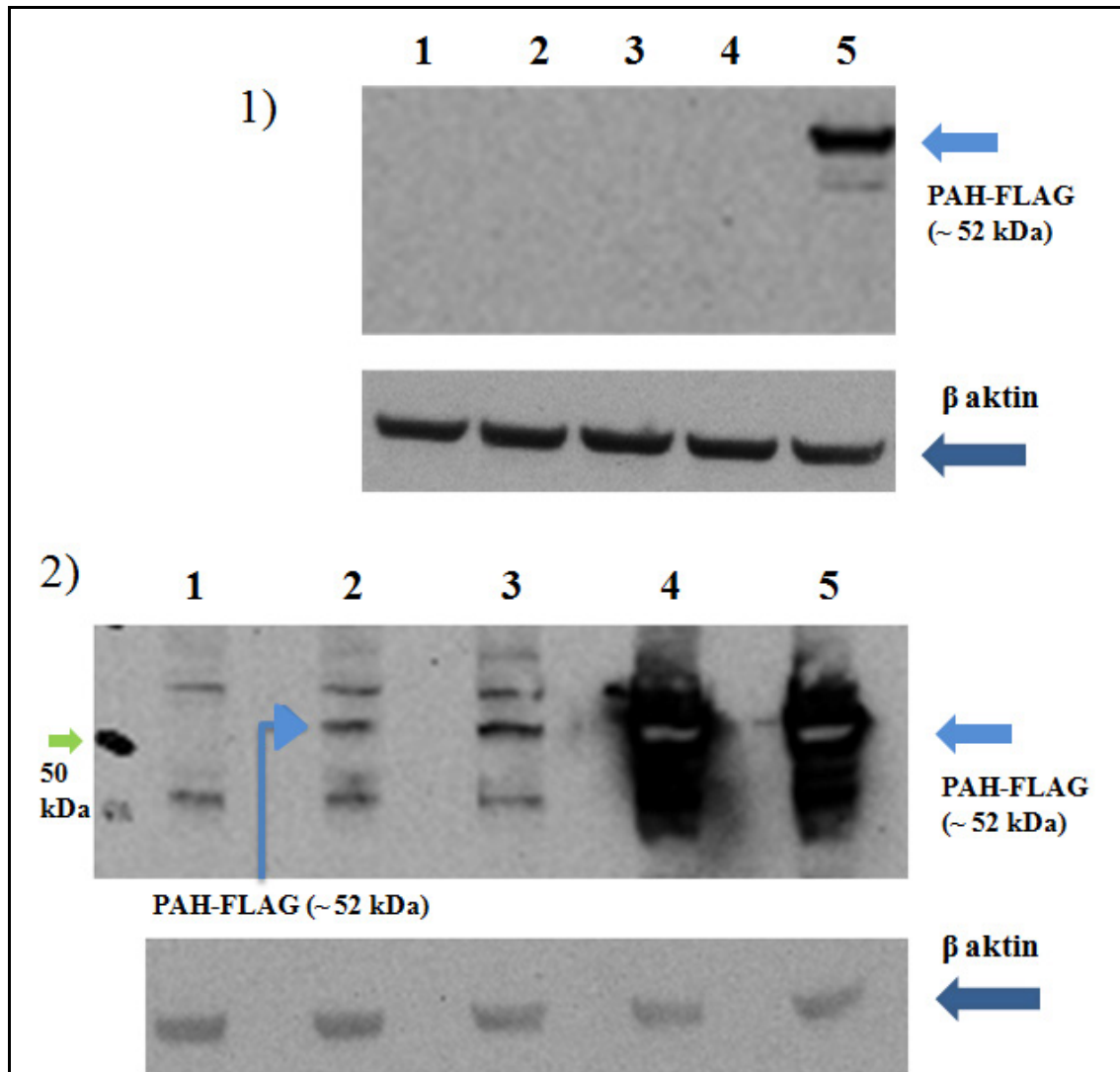
Slika 17. Analiza evolutivne očuvanosti aminokiseline glutamina na poziciji 226 u humanom PAH proteinu uz pomoć Clustal Omega programa. Simbolom zvezdice (*) su označene pozicije na kojima se nalaze evolutivno očuvane aminokiseline. Redom su poravnate sekvence dela PAH proteina iz sledećih organizama: *Danio rerio* (zebrafish), *Xenopus sp.* (afrička kandžasta žaba), *Mus musculus* (miš), *Homo sapiens* (čovjek) i *Pan troglodytes* (šimpanza).

4.2.2. IN VITRO FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA p.Gln226Lys PAH PROTEINA U EUKARIOTSKOM EKSPRESIONOM SISTEMU

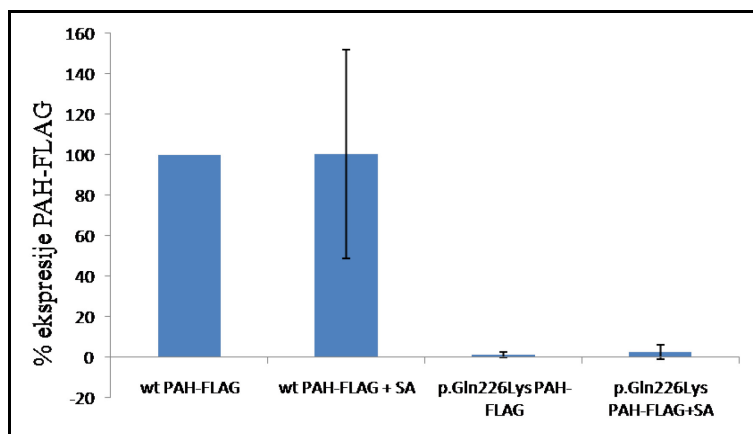
Budući da je za p.Gln226Lys *in silico* analiza predvidela patološki efekat, sledeći korak je bio da se ova promena okarakteriše i funkcionalno. U tu svrhu je eksprimiran mutirani protein p.Gln226Lys PAH-FLAG. Imajući na umu da se PAH eksprimira u jetri, kao odabrani sistem je korišćen humani hepatoma ćelijski model (Hep3B ćelijska linija), koji je po svojim karakteristikama najpribližniji *in vivo* miljeu. Da bi se ispitao eventualni efekat novog leka (koji funkcioniše kao farmakološki šaperon) na mutirani protein, ćelijama je prilikom transfekcije dodavan i sepiapterin koji je prekursor u putu unutarćelijske biosinteze BH4. PAH-FLAG proteini detektovani su u ćelijskom ekstraktu pomoću anti-FLAG antitela, pri čemu je na ovaj način izbegnuta detekcija endogenog PAH proteina poreklom od Hep3B ćelija.

Korišćenjem Western blot metode, pokazano je da količina mutiranog p.Gln226Lys PAH-FLAG proteina iznosi svega oko 1,2% u odnosu na wt PAH-FLAG. Ovaj rezultat ukazuje da Lys na poziciji 226 verovatno onemogućava zauzimanje pravilne konformacije proteina i/ili da dovodi do njegove ubrzane degradacije (Slika 18). Količina mutiranog p.Gln226Lys PAH-FLAG je bila neznatno povećana u slučaju kada je pri transfekciji dodavan sepiapterin, i tada je iznosila 2,7% u odnosu na wt PAH-FLAG. Količine wt PAH-FLAG (sa i bez dodavanja sepiapterina) i mutiranog

p.Gln226Lys PAH-FLAG (sa i bez dodavanja sepiapterina) su semikvantifikovane densitometrijski, a vrednosti su prikazane na Slici 19.



Slika 18. Western Blot analiza p.Gln226Lys PAH-FLAG i wt PAH-FLAG. PAH-FLAG proteini privremeno eksprimirani u HEP 3B ćelijskoj liniji, detektovani su u ćelijskom ekstraktu pomoću anti-FLAG antitela, dok je β aktin detektovan pomoću anti β -aktin antitela. 1) prikaz imunodeteckije nakon inkubacije filma sa membranom u toku 30 sekundi; 2) prikaz imunodeteckije nakon inkubacije filma sa membranom u toku 45 minuta. Na obe slike je prikazano: 1- HEP 3B ćelijski ekstrakt (kontrola); 2 - p.Gln226Lys PAH-FLAG; 3 - p.Gln226Lys PAH-FLAG + 100 μ M sepiapterin; 4 - wt PAH-FLAG; 5 - wt PAH-FLAG + 100 μ M sepiapterin. Zelenom strelicom je označen proteinski marker od 50 kDa, dok je svetlo plavom strelicom označen detektovani PAH-FLAG i to na visini od oko 52 kDa. Prikazana je i kontrola nanošenja – β aktin (tamno plava strelica). Slika 1) i slika 2) predstavljaju dva različita eksperimenta.



Slika 19. Relativna kvantifikacija količine wt i mutiranog p.Gln226Lys PAH-FLAG proteina privremeno eksprimiranih u hepatoma ćelijama, bez ili sa sepiapterinom kao unutarćelijskim prekursorom BH4. PAH-FLAG proteini detektovani su u ćelijskom ekstraktu pomoću anti-FLAG antitela i semikvantifikovani pomoću densitometrijske analize. Prikazane vrednosti su srednja vrednost±standardna devijacija dobijena iz tri nezavisna eksperimenta. Razlika u nivou p.Gln226Lys PAH-FLAG proteina bez/sa sepiapterina ne dostiže statističku značajnost ($p=0,37$).

U okviru ovog istraživanja je funkcionalno okarakterisan mutirani protein p.Gln226Lys PAH koji nastaje kao posledica nove mutacije u genu *PAH*, c.676C>A. Niska ekspresija mutiranog p.Gln226Lys PAH proteina u hepatičnom *in vitro* sistemu potvrđuje da je efekat nukleotidne zamene c.676C>A patološki i da dovodi do razvoja bolesti. Osim toga, i klinička slika pacijenata pokazuje da je reč o teškoj mutaciji. Jedan od pacijenata je odrasli nelečeni pacijent sa tipičnom kliničkom slikom klasične fenilektonurije (visok nivo fenilalanina u krvi i teška mentalna retardacija), dok je drugi pacijent nedavno otkriven na neonatalnom skriningu, sa nivoom fenilalanina pre uvođenja dijete koji ga takođe svrstava u klasičnu PKU. Imajući sve navedeno u vidu, ova mutacija može da se uvrsti u baze podataka kao patološka mutacija. Budući da je nivo mutiranog p.Gln226Lys PAH proteina tek neznatno povećan pri dodavanju sepiapterina i da to povećanje ne dostiže statističku značajnost, može se zaključiti da ova mutacija ne odgovara na BH4.

4.3. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U NEKODIRAJUĆIM REGIONIMA GENA *PAH*

Budući da su prethodne studije sprovedene u Laboratoriji za molekularnu hematologiju (danas Laboratorija za molekularnu biomedicinu), IMGGI, po prvi put pokazale postojanje transkripcionih regulatora u okviru introna gena *PAH*, sledeći korak u potrazi za novim *cis*-elementima je pretpostavljao analizu dodatnih nekodirajućih elemenata - promotora i VNTR regiona u 3' kraju gena *PAH*. S obzirom da je *PAH* eksprimiran u jetri, kao odabrani *in vitro* sistem za funkcionalnu analizu je korišćen humani hepatoma ćelijski model (HepG2 ćelijska linija), koji je po svojim karakteristikama najpribližniji *in vivo* uslovima. Takođe, za analize interakcije DNK sa proteinima su korišćeni jedarni ekstrakti poreklom iz HepG2 ćelijske linije.

4.3.1. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U OKVIRU PROMOTORA GENA *PAH*

Jedina funkcionalna karakterizacija promotorskog regiona gena *PAH* izvršena je 1992. godine (Konecki et al., 1992). Tom prilikom, analizirana je sekvenca koja se od aktuelne sekvence gena *PAH* (GeneBank Accession#: AF404777) razlikuje u jednom nukleotidu, i to nedostatku citozina na poziciji 170 uzvodno od mesta početka transkripcije (-170delC). Analizom 5' regiona gena *PAH* kod PKU pacijenata iz Srbije potvrđeno je slaganje sa aktuelnom sekvencom. Osim toga, nije detektovano prisustvo drugih varijanti u 5' regionu gena *PAH*.

Cilj daljeg rada bio je analiza 5' regiona gena *PAH* koji, u skladu sa aktuelnom referentnom sekvencom, kao i sekvencom kod pacijenata iz Srbije sadrži citozin na poziciji -170. Ova sekvenca će u daljem tekstu biti označena kao -170C ili wt.

4.3.1.1. *IN SILICO* ANALIZA

Razlika između dve promotorske sekvence dužine 20 nukleotida koja okružuje varijantno mesto -170C ili -170delC, analizirana je uz pomoć MatInspector programa.

MatInspector program je za -170C sekvencu predvideo vezivanje transkripcionih faktora iz KLF familije (Slika 20). KLF (Kruppel like family) transkripcioni faktori su DNK vezujući proteini sa motivom cinkanih prstiju koji regulišu ekspresiju velikog broja ciljnih gena, pri čemu mogu biti aktivatori ili represori transkripcije. MatInspector program predviđa da se transkripcioni faktor vezuje za analiziranu sekvencu od 2. do 20. nukleotida, pri čemu jezgro vezivanja (11. nukleotid) predstavlja upravo C na poziciji -170 (Slika 20).

Ova preliminarna analiza ukazala je da wt sekvenca promotora gena *PAH* potencijalno može sadržati dodatni, do sada neokarakterisan regulatorni element.



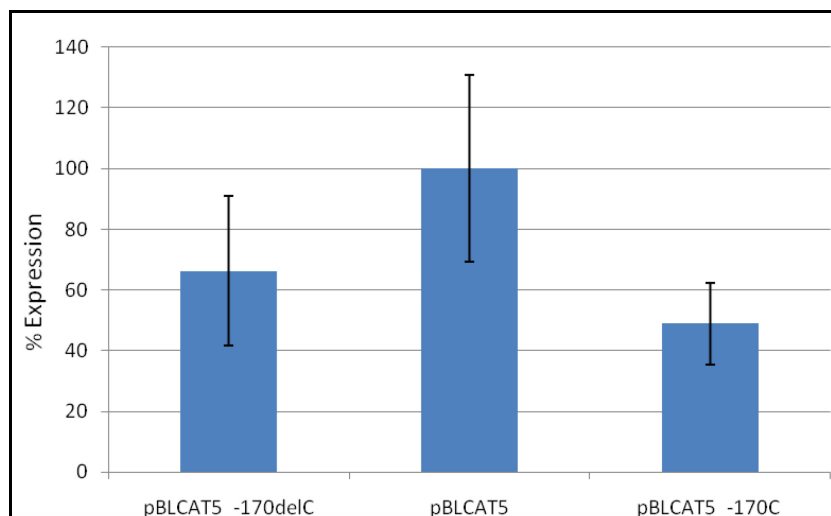
Slika 20. *In silico* analiza odabranog promotorskog regiona korišćenjem MatInspector programa. Prikazana je analizirana sekvenca u odnosu na potencijalno mesto vezivanja KLF transkripcionog faktora.

4.3.1.2. FUNKCIONALNA ANALIZA REGULATORNOG ELEMENTA

U cilju potvrđivanja uloge odabranog dela promotora gena *PAH* u regulaciji transkripcije, izvršeni su ekspresioni eseji korišćenjem odgovarajućih konstrukata. Konstrukt pBLCAT5_-170C, koji nosi potencijalno mesto vezivanja transkripcionih faktora, kao i konstrukt pBLCAT5_-170delC, bez vezujućeg mesta (dobijeni na način

opisan u poglavlju Materijal i metode), su potom transfekcijom uneti u HepG2 ćelije. Za potrebe normalizacije efikasnosti transfekcije korišćen je β galaktozidazni esej.

Rezultati funkcionalne analize su pokazali da konstrukt koji nosi potencijalno vezujuće mesto (pBLCAT5_-170C), ima za 50% smanjen nivo reporterske aktivnosti u odnosu na kontrolni plazmid sa bazalnom promotorskom aktivnošću - pBLCAT5 (Slika 21). Značajnost razlike između srednjih vrednosti u odnosu na standardnu devijaciju potvrđena je Studentovim t-testom ($p=0,01$). Sa druge strane, konstrukt bez vezujućeg mesta (pBLCAT5_-170delC), nije pokazao statistički značajnu razliku u smanjenju nivoa reporterske aktivnosti pri poređenju sa pBLCAT5. Stoga je utvrđeno da analizirani promotorski region, koji odgovara wt sekvenci, ima ulogu u regulaciji transkripcione aktivnosti.



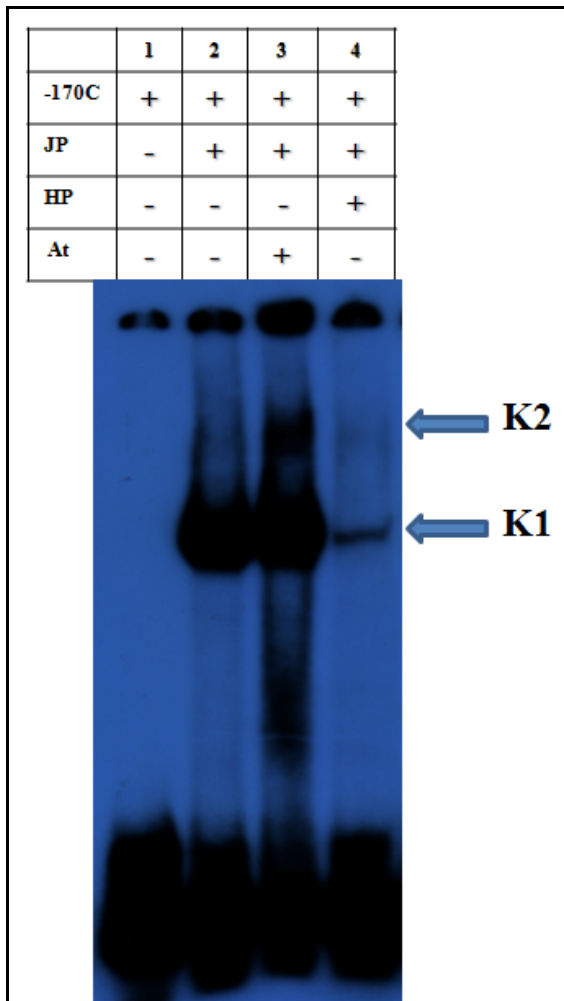
Slika 21. Funkcionalna analiza potencijalnog regulatornog elementa iz promotora gena PAH korišćenjem CAT ekspresionog eseja. Normalizovana CAT aktivnost analiziranih konstrukata izražena je procentualno u odnosu na bazalnu aktivnost pBLCAT5 konstrukta, čija aktivnost je označena sa 100%. Prikazane vrednosti su srednja vrednost±standardna devijacija dobijena iz pet nezavisnih eksperimenata. Razlika u nivou ekspresije pBLCAT5 i pBLCAT5_-170C konstrukta je statistički značajna ($p=0,01$).

4.3.1.3. ANALIZA INTERAKCIJA DNK-PROTEIN

Radi karakterizacije dela promotorskog regiona kao novog regulatornog elementa, analizirana je interakcija transkripcionih faktora sa odabranom DNK sekvencom iz promotora gena *PAH*, primenom EMSA eseja. Za potrebe istraživanja je generisana oligonukleotidna proba koje odgovara wt sekvenci dela promotorskog regiona gena *PAH* (-170C). Proba je inkubirana sa ekstraktima jedarnih proteina izolovanih iz HepG2 ćelijske linije.

Pri interakciji probe sa jedarnim ekstraktom HepG2 ćelija je utvrđeno da dolazi do formiranja jednog DNK-protein kompleksa, K1 (Slika 22). Specifičnost formiranog kompleksa K1 potvrđena je u eseju kompeticije sa specifičnom neobeleženom (tzv. “hladnom”) probom (Slika 22).

U cilju identifikacije transkripcionog faktora koji je prisutan u kompleksu K1, urađen je EMSA *supershift* esej. Proba je, uz ekstrakt jedarnih proteina, inkubirana i sa antitelom koje specifično prepoznaje KLF1 protein, što je rezultiralo u pojavi dodatnog kompleksa, K2 tj. karakterističnog pomeraja trake na gelu - “supersifta” (Slika 22).



Slika 22. Analiza interakcije radioaktivno obeležene dvolančane -170C probe sa jedarnim proteinima iz HepG2 ćelija. U koloni 2 je prikazan specifični kompleks između probe i HepG2 jedarnih proteina, označen kao K1. U koloni 4 je prikazan eksperiment kompeticije neobeleženom probom koja je dodata u 2X molarnom višku u odnosu na obeleženu probu. U koloni 3 je prikazana identifikacija transkripcionog faktora koji učestvuje u formiranju kompleksa korišćenjem anti-KLF1 antitela. Kompleks karakterističan za supershift označen je sa K2. (Legenda: -170C: obeležena proba koja odgovara wt sekvenci iz promotora; JP: jedarni proteini; HP: neobeležena -170C proba; At: anti-KLF1 antitelo.)

Uzimajući u obzir rezultate EMSA *supershift* eseja, uz rezultate ekspresionih eseja, može se zaključiti da deo promotora gena *PAH* koji sadrži C na poziciji -170 predstavlja dodatni, po prvi put okarakterisan *cis*-regulatorni element u okviru promotora gena *PAH* za koji se vezuje KLF1 transkripcioni faktor.

4.3.2. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U OKVIRU VNTR REGIONA U 3' KRAJU GENA *PAH*

Analiza VNTR regiona u 3' kraju gena *PAH* je započeta sekvenciranjem VNTR regiona kod pacijenata sa PKU iz Srbije, u cilju utvrđivanja arhitekture i učestalosti različitih ponovaka. Detektovani su sledeći tipovi ponovaka: VNTR3, VNTR7 i VNTR8, pri čemu je VNTR3 bio daleko najzastupljeniji (prisutan na 80% analiziranih hromozoma), što je prikazano u Tabeli 12. Sva tri tipa ponovaka prisutnih kod pacijenata sa PKU iz Srbije su već opisana u literaturi (Goltsov et al., 1992).

Tabela 12. Rezultati analize broja i arhitekture VNTR ponovaka iz 3' kraja gena *PAH* kod pacijenata sa PKU

Aleli	Arhitektura alela VNTR	Broj analiziranih hromozoma	Učestalost
VNTR3	a ₂ b ₂ c ₁	48	80%
VNTR7	a ₁ a ₁ a ₁ a ₁ b ₅ c ₁	6	10%
VNTR8	a ₁ a ₁ a ₁ a ₁ a ₁ b ₅ b ₂ c ₁	6	10%
Ukupno		60	100%

Napomena: sekvence pojedinačnih ponovaka u okviru VNTR su sledeće:

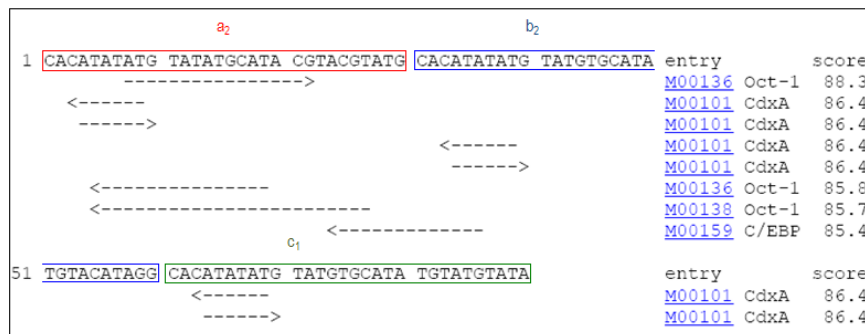
- a1: 5'-CACATATATGTATATGCATATGTACGTATG-3'
- a2: 5'-CACATATATGTATATGCATACGTACGTATG-3'
- b2: 5'-CACATATATGTATGTGCATATGTACATAGG-3'
- b5: 5'-CACATATATGTATGTGCATATGTACGTATG-3'
- c1: 5'-CACATATATGTATGTGCATATGTATGTATA-3'

4.3.2.1 *IN SILICO* ANALIZA

Tri tipa ponovaka koji odgovaraju alelima detektovanih kod pacijenata sa PKU u Srbiji (VNTR3, VNTR7 i VNTR8) su podvrgnuti bioinformatičkoj analizi korišćenjem TFSearch programa.

Kod sva tri tipa ponovaka, *in silico* analiza je ukazala na vezivanje istih transkripcionih faktora: OCT-1, CDXA i C/EBP. Analiza je predvidela da se OCT-1 vezuje samo u okviru ponovaka a₁ i a₂, dok se CDXA vezuje za početne sekvence svih

tipova analiziranih ponovaka (a_1 , a_2 , b_5 , b_2 i c_1). Analiza je dalje predvidela da se proteini iz C/EBP familije vezuju za spoj ponovaka a_1/a_1 , a_1/b_2 , a_1/b_5 kao i za spoj b_5/b_2 i b_5/c_1 , a pri nižim vrednostima praga predikcije i za spoj b_2/c_1 (Slika 23).

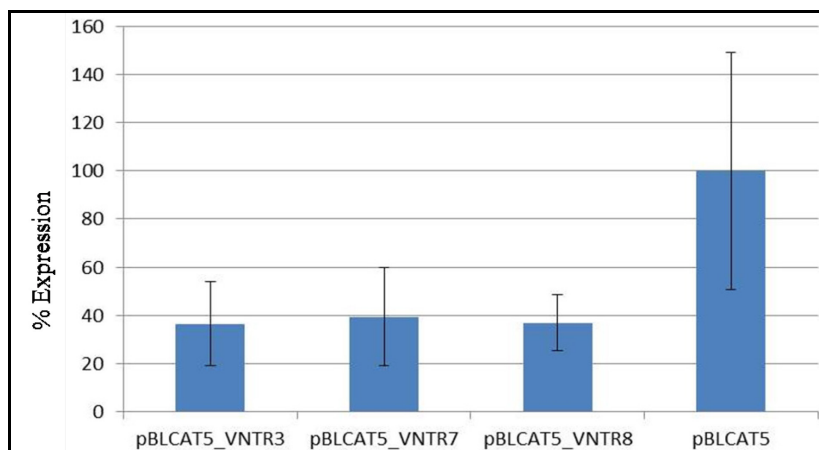


Slika 23. *In silico* analiza VNTR3 sekvence korišćenjem TFSearch programa. Prikazana je analizirana sekvenca u odnosu na potencijalna mesta vezivanja transkripcionih faktora (označena isprekidanim strelicama).

4.3.2.2 FUNKCIONALNA ANALIZA REGULATORNOG ELEMENTA

U cilju rasvetljavanja funkcije VNTR ponovaka gena *PAH* u regulaciji transkripcije, izvršeni su ekspresioni eseji korišćenjem odgovarajućih konstrukata poreklom od pBLCAT5 plazmida, koji ekspirira CAT gen. Konstrukti VNTR_3, VNTR_7 i VNTR_8, nastali unošenjem sekvence odgovarajućeg VNTR ponovka u pBLCAT5 plazmidni vektor, su potom transfekcijom uneti u HepG2 ćelije. Za potrebe normalizacije efikasnosti transfekcije korišćen je β galaktozidazni esej.

Rezultati funkcionalne analize su pokazali da sva tri konstrukta imaju za oko 60% smanjen nivo reporterske aktivnosti u odnosu na kontrolni plazmid sa bazalnom promotorskom aktivnošću - pBLCAT5 (Slika 24). Značajnost razlike između srednjih vrednosti u odnosu na standardnu devijaciju potvrđena je Studentovim t-testom ($p=0,04$). Ovim je pokazano da VNTR region, nezavisno od tipa ponovka, ima ulogu u regulaciji transkripcione aktivnosti.



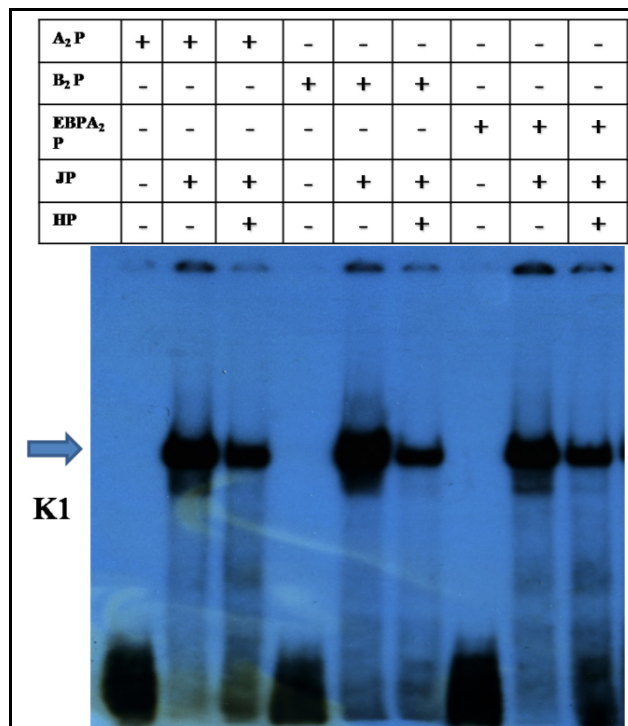
Slika 24. Funkcionalna analiza potencijalnog regulatornog elementa u okviru VNTR regiona gena *PAH* korišćenjem CAT ekspresionog eseja. Normalizovana CAT aktivnost analiziranih konstrukata izražena je procentualno u odnosu na bazalnu aktivnost pBLCAT5 konstrukta, čija aktivnost je označena sa 100%. Prikazane vrednosti su srednja vrednost±standardna devijacija dobijena iz četiri nezavisna eksperimenta. Razlika u nivou ekspresije pBLCAT5 i sva tri analizirana konstrukta je statistički značajna ($p=0,04$).

4.3.2.3 ANALIZA INTERAKCIJA DNK-PROTEIN

Radi karakterizacije VNTR regiona kao novog regulatornog elementa, analizirana je interakcija transkripcionih faktora sa VNTR3 sekvencom primenom eseja promenjene elektroforetske mobilnosti (EMSA). Budući da je prethodna funkcionalna analiza pokazala da između različitih ponovaka nema razlike u intenzitetu transkripcije, a VNTR3 tip ponovka se pokazao kao daleko najčešći u populaciji pacijenata sa PKU u Srbiji, dalje je ispitivana samo VNTR3 sekvenca. Da bi bilo razjašnjeno da li je za vezivanje transkripcionih faktora neophodna kompletna arhitektura ponovka, ili su dovoljni manji regioni u okviru njega, generisane su probe različitih dužina. Proba dužine 90 bp odgovara kompletnoj sekvenci VNTR3, a probe dužine 30 bp odgovaraju pojedinačnim ponovcima u okviru VNTR3 (a2, b2 i c1), kao i spoju između dva pojedinačna ponovka (EBPa2 i EBPb2). Probe su zatim inkubirane sa ekstraktima jedarnih proteina izolovanih iz HepG2 ćelijske linije.

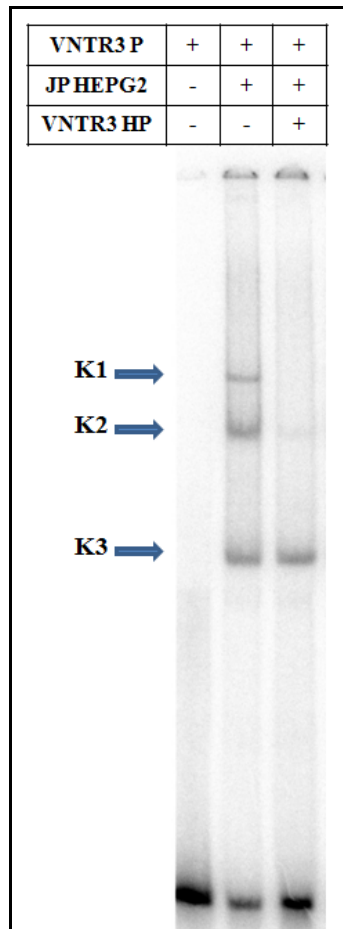
Pri interakciji proba a2, b2, c1, EBPa2 i EBPb2 sa jedarnim ekstraktom HepG2 ćelija je utvrđeno da dolazi do formiranja jednog DNK-protein kompleksa (K1), čija je

specifičnost potvrđena esejem kompeticije sa specifičnom neobeleženom (tzv. “hladnom”) probom (Slika 25).



Slika 25. Analiza interakcije radioaktivno obeleženih dvolančanih proba dužine 30 bp sa jedarnim proteinima iz HepG2 ćelija. Formirani specifični kompleks je označen kao K1. Prikazani su eksperimenti kompeticija neobeležnim probama koje su dodate u 3X molarnom višku u odnosu na obeleženu probu. (Legenda: A₂P: - A₂ obeležena proba; B₂P: B₂ obeležena proba; EBPA₂P: - EBPA₂ obeležena proba; JP: jedarni proteini; HP: odgovarajuća neobeležena (hladna) proba.)

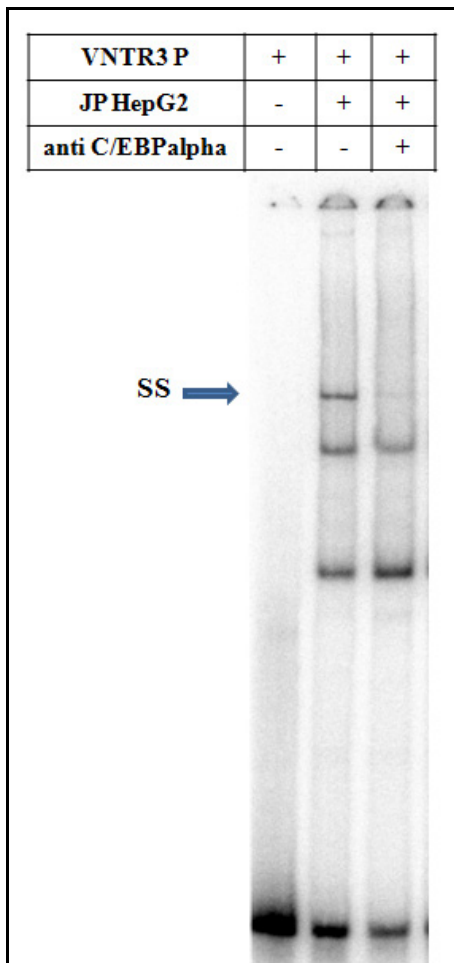
Sa druge strane, pri interakciji VNTR3 probe sa jedarnim ekstraktom HepG2 ćelija je utvrđeno da dolazi do formiranja tri DNK-protein kompleksa: K1, K2 i K3 (Slika 26). U kompeticionom esejju sa “hladnom” probom potvrđena je specifičnost dva sporija kompleksa, K1 i K2, koji su “ohlađeni” dodavanjem VNTR3 neobeležene probe, dok je kompleks K3 nespecifičan (slika 26).



Slika 26. Analiza interakcije radioaktivno obeležene dvolančane VNTR3 probe sa jedarnim proteinima iz HepG2 ćelija. Formirani kompleksi su označeni kao K1, K2 i K3. Prikazan je eksperiment kompeticije neobeleženom probom koja je dodata u 10X molarnom višku u odnosu na obeleženu probu. (Legenda: VNTR3 P: VNTR3 obeležena proba; JP HEPG2: jedarni proteini iz HepG2 ćelijske linije; VNTR3 HP: odgovarajuća neobeležena (hladna) proba.)

U cilju identifikacije transkripcionog faktora koji je prisutan u specifičnim kompleksima, urađen je EMSA *supershift* esej. Budući da je *in silico* analiza predvidela vezivanje tri različita transkripciona faktora, pažnja je usmerena na C/EBP familiju proteina, budući da je reč o transkripcionim faktorima za koji je već pokazana regulatorna uloga u hepatičnom tkivu (Schrem et al., 2004). Probe su stoga, uz ekstrakt jedarnih proteina, inkubirane i sa antitelom koje specifično prepoznaje C/EBP alpha protein. U slučaju VNTR3 probe, prilikom dodavanja anti-C/EBP alpha, došlo je do nestajanja specifičnog kompleksa K1, tj “hladenja”, što je pokazalo da dodato antitelo

prepoznaje protein iz kompleksa, i to preko njegovog DNK-vezujućeg domena, pa ga na taj način “odvlači” iz kompleksa sa obeleženom VNTR3 probom (Slika 27). Međutim, u slučaju proba koje odgovaraju pojedinačnim ponovcima, nije došlo ni do nestajanja kompleksa, ni do karakterističnog pomeranja trake u vidu “superšifta” (neprikazani rezultati). Na ovaj način je pokazano da je za vezivanje C/EBP alpha neophodno prisustvo kompletne strukture VNTR3 tipa ponovaka.



Slika 27. Identifikacija transkripcionog faktora koji učestvuje u formiranju kompleksa korišćenjem anti-C/EBPalpha antitela. Kompleks karakterističan za „superšift“ označen je sa SS. (Legenda: VNTR3 P: VNTR3 obeležena proba; JP HepG2: jedarni proteini iz HepG2 ćelijske linije; anti-C/EBP alpha: antitelo koje je dodato u reakciji.)

Imajući u vidu rezultate EMSA *supershift* eseja, uz rezultate ekspresionih eseja, može se zaključiti da VNTR region predstavlja novi *cis*-regulatorni element koji se nalazi u 3' kraju gena *PAH*. Dalja karakterizacija pokazala je da tip ponovka koji je

najčešći kod pacijenata sa PKU u Srbiji (VNTR3) vezuje C/EBP alpha transkripcioni faktor.

4.4. ANALIZA VARIJANTI U POTENCIJALNIM GENIMA MODIFIKATORIMA KOGNITIVNOG PKU FENOTIPA

4.4.1. ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTE m.10398A>G U MITOHONDRIJSKOM *MT-ND3* GENU SA KOGNITIVNIM FENOTIPOM PACIJENATA SA PKU

U ovom delu istraživanja je ispitivana povezanost mitohondrijske varijante m.10398A>G sa kognitivnim fenotipom pacijenata sa PKU, koji je evaluiran kao IQ vrednost. Kao dve najbitnije odrednice za razvoj odgovarajućeg PKU kognitivnog fenotipa izdvojili su se vreme uspostavljanja dijagnoze i sprovedenje dijete sa niskim sadržajem fenilalanina. Stoga su za potrebe ovog istraživanja pacijenti svrstani u četiri grupe (DBNS, LD, LPD i PC), kao što je već naglašeno u poglavlju Materijal i metode. Kod svih pacijenata, kao i kod ispitanika kontrolne grupe, uspešno je izvršena detekcija varijante m.10398A>G. Ni kod jedne osobe nije bila detektovana pojava heteroplazmije za ovo nukleotidno mesto.

Za utvrđivanje razlika u distribuciji učestalosti alela između pacijenata i ispitanika kontrolne grupe je korišćen χ^2 test. Kod pacijenata sa PKU, alel m.10398A je bio prisutan kod 53 od 64 osoba (82,81%), dok je kod ispitanika kontrolne grupe učestalost bila gotovo jednaka: 41 od 50 osoba (82%) su bili nosioci m.10398A alela. Iako je za m.10398A>G varijantu uočena uniformna raspoređenost među pacijentima sa PKU, prisustvo ove varijante je dalje analizirano u okviru četiri različite grupe pacijenata (DBNS+LPD, DBNS+PCD, LD+LPD i LD+PCD). Saglasno sa visokom učestalošću m.10398A u kohorti pacijenata sa PKU, primećeno je da m.10398A alel ima veću učestalost od m.10398G alela u svakoj od pojedinačnih grupa (Tabela 12).

Dalje je analizirana povezanost između vrednosti IQ pacijenata i prisustva m.10398A ili m.10398G alela u njihovoj mitohondrijskoj DNK. U grupi pacijenata koji su otkriveni na neonatalnom skriningu i bili na dobro kontrolisanoj dijeti, nije pronađena statistički značajna razlika u srednjoj vrednosti IQ između nosioca m.10398A i m.10398G ($p=0,89$). Takođe, nije bilo razlike ni među pacijentima koji su imali niže vrednosti IQ usled zakasnele dijagnoze ($p=0,86$). Međutim, u ovoj drugoj grupi je uočena nešto niža vrednost IQ kod pacijenata sa m.10398A u odnosu na one sa m.10398G (Tabela 13).

Tabela 13. Učestalosti alela i distribucija IQ vrednosti po grupama pacijenata sa PKU (DBNS – dijagnoza na neonatalnom skriningu, LD – kasna dijagnoza, LPD – dobro kontrolisana dijeta, PCD – loše kontrolisana dijeta).

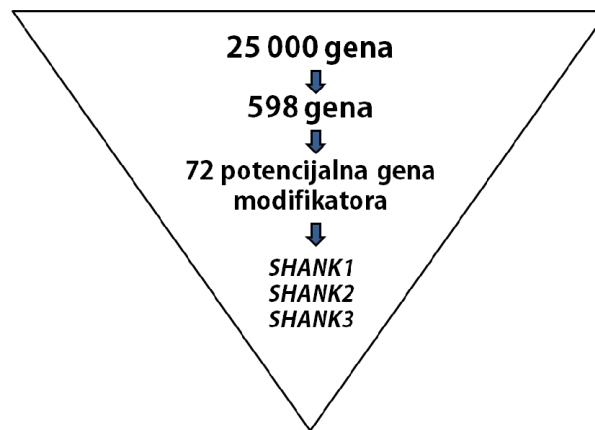
Pacijenti sa PKU	m.10398A			m.10398G		
	Učestalost alela	Procenat	IQ (srednja vrednost)	Učestalost alela	Procenat	IQ (srednja vrednost)
DBNS+LPD	26/31	83,87%	97,08	5/31	16,13%	96,6
DBNS+PCD	6/6	100%	77,08	0/6	0%	NA
LD+LPD	5/6	83,33%	74,30	1/6	16,67%	60
LD+PCD	2/4	50%	47,50	2/4	50,00%	55

4.4.2. IDENTIFIKACIJA NOVIH POTENCIJALNIH GENA MODIFIKATORA PKU KOGNITIVNOG FENOTIPA

U ovom delu istraživanja je kompletna genomska sekvenca 10 nelečenih pacijenata (iz 6 porodica) sa karakterističnim kognitivnim fenotipom analizirana Next Generation Sequencing metodom. Ovi pacijenti su po genotipu i metaboličkom fenotipu svrstani u klasičnu fenilketonuriju, ali imaju normalan kognitivni razvoj (nisu razvili mentalnu retardaciju). Oni stoga predstavljaju pogodnu grupu za identifikaciju potencijalnih gena modifikatora PKU kognitivnog fenotipa.

Nakon preliminarne bioinformatičke obrade (poređenje sa referentnim humanim genomom, selekcija varijanti u kodirajućim regionima, isključivanje sinonimnih

varijanti itd.), kod analiziranih uzoraka selektovano je 598 različitih gena sa ukupno 1984 varijanti.



Slika 28. Prikaz toka obrade podataka pri identifikacija novih potencijalnih gena - modifikatora PKU kognitivnog fenotipa

U sledećem koraku oformljen je panel gena koji imaju odgovarajuću fiziološku ulogu. Prilikom pretraživanja baza podataka (eng. “*data mining*”), uzimani su u obzir samo geni koji kodiraju za transportere (posebno ukoliko se nalaze na krvno-moždanoj barijeri), geni koji kodiraju za jonske kanale (npr. kalcijumove kanale) eksprimirane u mozgu, geni koji su uključeni u razviće mozga, geni koji kodiraju za receptore u mozgu, geni koji su uključeni u transdukciju signala u neuronima, geni koji su u literaturi dovođeni u vezu sa poremećajima funkcionisanja neurona, kao i geni koji su dovođeni u vezu sa neurodegenerativnim oboljenjima. Od početnog broja ispitivanih gena, kod analiziranih uzoraka selektovano je 72 gena - potencijalna modifikatora kognitivnog PKU fenotipa (Slika 28).

Kako bi bile identifikovane varijante koje se mogu dovesti u vezu sa normalnim kognitivnim razvojem u analiziranoj grupi PKU pacijenata, dalje su selektovani samo geni zajednički za više analiziranih porodica (eng. „*cross sample analysis*“). Nakon ovog koraka se izdvojila *SHANK* (SH3 and multiple ankyrin repeat domains) familija gena, pri čemu su detektovane varijante u svakom od 3 člana ove familije - *SHANK1*, *SHANK2* i *SHANK3* genu. Budući da *SHANK* proteini predstavljaju proteine uključene u sinaptičku transmisiju (Naisbitt et al., 1999), i da pritom postoje literaturni podaci koji

ukazuju da su promene u ovim genima povezane sa različitim neuropsihijatrijskim poremećajima i intelektualnom ometenošću (Guilmatre et al., 2014), kao i uzevši u obzir da su varijante prisutne kod 4 od 6 porodica sa karakterističnim kognitivnim fenotipom, nastavljena je analiza individualnih varijanti koje su detektovane u okviru *SHANK* gena.

U *SHANK1* i *SHANK3* genima detektovana je po jedna *missense* varijanta, a u *SHANK2* genu tri *missense* varijante i jedna mala insercija od dve aminokiseline koja ne menja okvir čitanja (Tabela 14). Sve varijante su detektovane u heterozigotnom stanju. Pretraživanjem Ensembl baze podataka ustanovljeno je da su sve identifikovane varijante, osim *SHANK2*: p.Gly46Ser (rs201642016), nove. Takođe, nijedna od njih nije bila prisutna ni u laboratorijskoj populaciono-specifičnoj TruSight One bazi podataka. Radi *in silico* predikcije efekta varijanti na odgovarajući SHANK protein, i u slučaju ovih novih varijanti primenjeni su odgovarajući bioinformatički softveri PolyPhen-2, SIFT, PROVEAN i MutPred. Predikcija je pokazala da se u svim slučajevima radi o benignim promenama. Šta više, za SHANK proteine koji nose identifikovane varijante je *in silico* analizom pokazano da mogu da zadobiju nove karakteristike, te stoga mogu imati protektivni modifikatorski efekat na kognitivni razvoj pacijenata sa PKU.

Tabela 14. Pregled varijanti detektovanih u *SHANK* genima kod pacijenata sa PKU sa normalnim kognitivnim razvojem. Za svaki od korišćenih programa za predikciju je naznačen odgovarajući skor, kao i odgovarajuća verovatnoća za predloženu hipotezu u slučaju Mutpred programa.

Porodica	Gen	Alel1	Alel2	Referentna sekvenca	tip mutacije	HGVS nomenklatura		PolyPhen-2	SIFT/PROVEAN	MutPred
						DNK	Protein			
P2	<i>SHANK1</i>	C	G	G	<i>missense</i>	c.4792 G>C	p.Pro1591Ala	benign, 0,188	tolerated, 0,92	0,202; Loss of glycosylation at P, p=0,016
P1	<i>SHANK2</i>	G	C	C	<i>missense</i>	c.3474C>G	p.Ala1141Pro	/	/	0,103; Gain of glycosylation at P, p=0,0064
P3	<i>SHANK2</i>	AATGGC			insercija	c.4247insAATGGC	p.Phe1389_Pro1390insLeuPro	/	deleterious, -3,53	/
P3	<i>SHANK2</i>	T	C	C	<i>missense</i>	c.216C>T	p.Gly46Ser	0,02*	1*	0,187; Gain of loop, p=0,0045
P4	<i>SHANK2</i>	T	C	C	<i>missense</i>	c.132C>T	p.Asp18Asn	/	/	0,089; Loss of stability, p=0,885
P2	<i>SHANK3</i>	A	C	C	<i>missense</i>	c.5010C>A	p.Pro1670Thr	benign, 0,041	tolerated, 0,41	0,308; Gain of phosphorylation at P, p=0,0063

* podaci o efektu *SHANK2*: p.Gly46Ser varijante su preuzeti sa Ensembl baze podataka, dok u slučaju drugih *missense* varijanti u *SHANK2* genu analiza sa PolyPhen-2 i SIFT programom nije bila moguća zbog postojanja nekoliko različitih varijanti transkripta

5. DISKUSIJA

5.1. MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA MUTACIJA U GENIMA UZROČNICIMA KOD PACIJENATA SA HPA U SRBIJI

Prvi deo ovog istraživanja je za cilj imao molekularnu karakterizaciju i kompletiranje spektra mutacija u genima-uzročnicima kod 76 pacijenata sa hiperfenilalaninemijom u Srbiji.

U okviru ove studije je prikazana molekularna karakterizacija ukupno 150 mutiranih *PAH* alela i 2 mutirana *PTS* alela, pri čemu je detektovano 30 različitih mutacija u *PAH* i 1 mutacija u *PTS* genu. U okviru ove studije je identifikovana i jedna nova mutacija - p.Gln226Lys, promena u genu *PAH* za koju je pokazano da do sada nije bila prijavljena ni u jednoj drugoj PKU populaciji (www.biopku.org).

5.1.1. SPEKTAR I UČESTALOST MUTACIJA U GENU *PAH* KOD PACIJENATA SA HPA U SRBIJI

Kada je reč o mutacijama detektovanim u genu *PAH* kod pacijenata sa PKU iz Srbije, može se uočiti da daleko najveći procenat svih mutacija obuhvataju *missense* mutacije (86%). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa drugim populacijama, gde je takođe zabeležena najviša učestalost za *missense* mutacije (Zschocke, 2003; Scriver et al., 2003). Za pojedine evropske populacije učestalost je zapravo vrlo bliska vrednosti dobijenoj za Srbiju, pa je tako za Španiju uočena učestalost od 78,7% (Couce et al., 2013), dok za nama još bližu populaciju, Sloveniju, učestalost *missense* mutacija iznosi 80% (Grošelj et al., 2012). Svi ostali tipovi mutacija (*nonsense*, *frameshift*, *splice* i velike delecije) imaju znatno niže učestalosti, pri čemu ni jedna od pojedinačnih mutacija koja spada u neki od ovih tipova mutacija ne prelazi 2%. Sa druge strane, među *missense* mutacijama takođe ima retkih mutacija koje su prisutne na samo nekoliko alela, od čega su neke toliko retke da su zabeležene samo na po jednom alelu (kao npr. p.Leu213Pro, p.Arg413Pro, p.Pro416Gln). Međutim, ubedljivo najveći

procenat svih *missense* mutacija odlazi na mali broj najčešćih mutacija, tako da zbirna učestalost dve najčešće mutacije, p.Leu48Ser i p.Arg408Trp, iznosi čak 45%.

Mutacija p.Leu48Ser (c.143T>C) je u ovoj studiji detektovana na čak 47 hromozoma. Učestalost ove mutacije, koja iznosi 31%, najveća je ikada zabeležena za sve do sada analizirane populacije. I u prethodnoj studiji koju su sprovedi Stojiljković i saradnici, p.Leu48Ser je zauzela prvo mesto po učestalosti koja je iznosila 21% (Stojiljković et al., 2006). Ova mutacija je prvi put detektovana kod turskog pacijenta sa PKU (Konecki et al., 1991). Od tada je bila prijavljivana u mnogim evropskim populacijama, ali uvek sa niskom učestalošću, od oko 2–5% (Zschocke, 2003). Nešto veće učestalosti su bile zabeležene samo za populacije koje su geografski i istorijski povezane sa srpskom populacijom. Tako je zabeležena učestalost od 10% u Hrvatskoj (Karačić et al., 2009), 7% u Turskoj (Dobrowolski et al., 2011) i 7,84% u južnoj Italiji (Daniele et al., 2009). Iako priprada južnoslovenskim populacijama, Slovenija beleži nisku učestalost od samo 2% za p.Leu48Ser (Grošelj et al., 2012), dok sličnu učestalost (2,27%) ima i susedna Rumunija (Popescu et al., 1998). Moguće je uočiti opadajući gradijent učestalosti ove mutacije u okviru Balkanskog poluostrva, sa najvišom vrednosti na teritoriji Srbije. Takođe, i u okviru same Italije postoji gradijent u učestalosti p.Leu48Ser, budući da su studije koje su obuhvatale pojedinačne regione pokazale da je u severnoj Italiji ova mutacija gotovo odsutna (Giannattasio et al., 2001). Iako bi se usled ovako visoke učestalosti mutacije p.Leu48Ser na prvi pogled moglo zaključiti da je ova mutacija nastala upravo u Srbiji, a odatle bila proširena na bliske populacije, rezultati haplotipskih analiza ukazuju na drugačije poreklo. Naime, u studiji koju su sprovedi Stojiljković i saradnici pokazano je da ova mutacija nema autohtono srpsko poreklo, već da je u Srbiju uneta iz drugih populacija sa različitom genetičkom osnovom (Stojiljković et al., 2007). Stoga se dalje može zaključiti da su dodatni faktori, kao što je genetički drift, doprineli ovako visokoj učestalosti p.Leu48Ser u Srbiji.

Na drugom mestu po učestalosti kod pacijenata sa PKU iz Srbije je p.Arg408Trp (c.1222C>T) sa 14%. Ova mutacija je bila na drugom mestu po učestalosti i u prethodnoj studiji (Stojiljković et al., 2006). Mutacija p.Arg408Trp je inače najčešća PKU mutacija u svetu, pri čemu je izuzetno česta u slovenskim populacijama (sa najvećom učestalošću u populacijama sa severoistoka Evrope), kao i u Velikoj Britaniji,

sa najvećom učestalošću u Škotskoj i Irskoj (Zschocke, 2003; Tighe et al., 2003). Uočeno je da je ova mutacija povezana sa dva različita haplotipa, koja odgovaraju navedenim centrima visoke učestalosti, tako da se smatra da je nezavisno nastala dva puta (Eisensmith et al., 1995). Slovenski haplotip koji nosi p.Arg408Trp mutaciju ima karakterističan opadajući gradijent koji ide od baltičkih pa sve do mediteranskih zemalja. Tako je najviša učestalost za ovu mutaciju uočena u Letoniji (76%) i Litvaniji (73,5%) (Pronina et al., 2003, Kasnauskiene et al., 2003), pa se, prateći opadajući gradijent, stiže do Poljske sa 61,8% (Bik-Multanowski et al., 2013), Češke sa 42,1% (Reblova et al., 2013), Slovačke sa 47% (Polak et al., 2013), pa sve do Slovenije sa 29% (Grošelj et al., 2012), i Hrvatske sa 36% (Karačić et al., 2009). Osim slovenskih, i geografski bliske populacije kao što su Mađarska i druge, takođe prate ovaj gradijent (Zschocke et al., 2003, Tighe et al., 2003). S obzirom da učestalost p.Arg408Trp za Tursku iznosi 6,4% (Dobrowolski et al., 2011), može se zaključiti da se Srbija, sa učestalošću od 14%, dobro uklapa u gradijent koji opada od severa ka jugu.

Među mutacijama sa nešto većom učestalošću su uočene p.Glu390Gly, p.Ile306Val i p.Pro281Leu. Ove mutacije su relativno česte na Balkanu, ali retke u drugim evropskim populacijama (Zschocke, 2003). Mutacija p.Glu390Gly u Srbiji populaciji ima gotovo identičnu učestalost kao i u hrvatskoj i slovenačkoj populaciji (oko 7%), dok je učestalost p.Pro281Leu u Srbiji (4,7%) nešto niža nego u ove dve susedne zemlje (Karačić et al., 2009, Grošelj et al., 2012).

Najveći broj mutacija detektovanih kod pacijenata sa PKU iz Srbije čine znatno ređe mutacije, čija učestalost iznosi manje od 3%. Sve ove mutacije, osim p.Gln226Lys, su prethodno prijavljene u nekoj od PKU populacija u svetu i prisutne u odgovarajućim bazama podataka (www.biopku.org). S obzirom na veliki broj različitih mutacija, čak 30 u odnosu na ukupan broj alela, može se zaključiti da se analizirana kohorta pacijenata sa PKU iz Srbije odlikuje značajnom heterogenošću *PAH* lokusa. Osim toga, interesantno je istaći da se u odnosu na prethodnu studiju u kojoj je detektovano 19 mutacija, spektar mutacija povećao za preko 50% (Stojiljković et al., 2006).

5.1.2. VELIKE DELECIIJE U GENU *PAH* KOD PACIJENATA SA HPA U SRBIJI

U ovom istraživanju je po prvi put primenjena MLPA metoda radi analize *PAH* gena kod pacijenata iz Srbije. MLPA metoda predstavlja tehniku visoke osetljivosti i efikasnosti koja se primenjuje za detekciju delecija i duplikacija velikih regiona u genomu. MLPA je za detekciju velikih delecija u genu za *PAH* prvi put primenjena 2006. godine (Desviat et al., 2006) i od tada se koristi ukoliko sekvenciranjem svih 13 egzona (sa egzon-intron granicama) i promotorskog regiona nisu pronađene dve patološke mutacije. Osim toga, kandidate za MLPA analizu predstavljaju i pacijenti kod kojih za pojedine egzone nije moguće amplifikovati fragment u PCR reakciji, što vodi ka pretpostavci o homozigotnosti za deleciju tog egzona. Upravo to je bio slučaj u ovom istraživanju, kada nije bilo moguće umnožiti šesti egzon gena za *PAH*, i kada je MLPA analizom bilo potvrđeno da je pacijent homozigotni nosilac za deleciju čitavog šestog egzona.

Učestalost velikih delecija u genu za *PAH* varira za različite populacije, ali je uglavnom niska. Za populacije bliske Srbiji, dakle, slovenske populacije, učestalost ne prelazi 3%. Tako je za Češku ustanovljena učestalost od 3% (Kozak et al., 2006, Reblova et al., 2013), za Sloveniju 2% (Grošelj et al., 2012), za Poljsku 2-3% (Bik-Multanowski et al 2008), i 2,2% za Slovačku (Polak et al., 2013). U poslednjoj studiji koja je obuhvatila hrvatsku populaciju nisu detektovane velike delecije (Karačić et al., 2009). Međutim, budući da su tom prilikom korišćene samo standardne metode za pretraživanje malih promena u genu *PAH*, kao i da su 3 alela ostala neokarakterisana, moguće je pretpostaviti prisustvo velike delecije na nekom od ovih alela. Takođe, i u drugim populacijama sa Balkanskog poluostrva (Rumunija i Bugarska) gde su poslednje studije vršene krajem prošlog veka je veliki broj alela (>10%) ostao neokarakterisan, tako da je i ovde moguće pretpostaviti da određeni procenat ovih alela odlazi na velike delecije (Kalaydjieva et al., 1993, Popescu et al., 1998). S tim u vezi se može pretpostaviti da je učestalost velikih delecija u *PAH* genu u evropskim populacijama potcenjena. Pacijent koji je analiziran u okviru ove studije je prvi zabeleženi slučaj u Srbiji koji ima velike delecije u genu *PAH*. Kod pacijenta je delecija prisutna na oba alela, pa stoga izračunata učestalost ovog tipa mutacija za analiziranu populaciju iznosi

1,33%. Može se zaključiti da ova vrednost u potpunosti odgovara vrednostima zabeleženim za slovenske i druge evropske populacije.

U navedenom slučaju, kod oba roditelja pacijenta homozigotnog za deleciju šestog egzona, dokazan je status heterozigotnog nosioca. Budući da su u literaturi poznati slučajevi nastanka retkih metaboličkih oboljenja usled uniparentalne dizomije (Perez et al., 2011), važno je istaći da u slučaju homozigotnih pacijenata treba analizirati i roditeljske uzorke kako bi se isključila ova mogućnost.

Valja napomenuti i da je u okviru ovog istraživanja MLPA analiza primenjena i na jedini preostali neidentifikovani *PAH* alel iz analizirane grupe pacijenata, no međutim, u ovom uzorku nisu detektovane velike delecije. S obzirom da je kod pacijenta već utvrđeno prisustvo jedne mutacije u genu za *PAH*, kao i da u promotorskom regionu nisu detektovane promene, može se pretpostaviti da se druga mutacija verovatno nalazi duboko unutar nekog od introna gde aktivira skriveno (kriptično) mesto za iskrajanje transkripta, što vodi ka inkorporiranju dela intronske sekvence (tzv. pseudoegzona) u transkript koji time postaje nefunkcionalan. Međutim, budući da očiglednu prepreku uspešnom proučavanju transkripata kod pacijenata predstavlja činjenica da je gen *PAH* u dovoljnoj meri eksprimiran samo u jetri, ovakve mutacije najčešće ostaju neokarakterisane. Ovaj tip mutacija je izuzetno redak u genu za *PAH*, tako da je u BIOPKU bazi podataka prijavljeno samo nekoliko ovakvih mutacija (www.biopku.org).

5.1.3. BH4 DEFICIJENCIJA KOD PACIJENATA SA HPA U SRBIJI

U okviru ove studije je molekularnogenetička dijagnostika HPA, koja je do sada obuhvatala samo gen *PAH*, proširena i na gene-uzročnike BH4 deficijencije. BH4 deficijenciju koja uzrokuje HPA je, zahvaljujući neonatalnom skriningu, moguće otkriti već u najranijem uzrastu. Izuzetak predstavlja jedino nedostatak enzima sepiapterin reduktaze, koji rezultuje fenotipom koji ne uključuje povišeni nivo fenilalanina u krvi. Međutim, ukoliko ne postoje adekvatni biohemijski testovi neophodni za diferencijalnu

dijagnostiku, postoji mogućnost da pacijenti sa BH4 deficijencijom budu pogrešno svrstani među PKU pacijente.

Budući da kod jednog pacijenta iz analizirane grupe pacijenata sa hiperfenilalaninemijom molekularnogenetičkom analizom čitavog gena za *PAH* (uključujući i MLPA metodu za detekciju velikih delecija) nije otkriveno prisustvo mutacija, dijagnostika je usmerena na BH4 deficijenciju. Analizirani pacijent je usled izrazito visokog nivoa fenilalanina u krvi bio otkriven na neonatalnom skriningu, međutim, zbog nedostupnosti analiza profila pterina u urinu, njegova prvobitna dijagnoza je bila klasična fenilketonurija. Uočena visoka vrednost fenilalanina, kao i podatak da je najčešća forma BH4 deficijencije PTPS deficijencija usmerili su dalji tok analize na *PTS* gen. (Opladen et al 2012; www.biopku.org). Analiza *PTS* gena je pokazala da je pacijent nosilac mutacije c.407A>T (p.Asp136Val), i to u homozgotnom stanju. I u ovom slučaju je analizom roditeljskih uzoraka (oboje heterozigotni nosioci) isključena uniparentalna dizomija.

Mutacija p.Asp136Val je prvi put prijavljena kod italijanskog pacijenta sa deficijencijom PTPS, kod koga je prisustvo ove mutacije u heterozigotnom stanju bilo povezano sa težom kliničkom slikom i visokim nivoom fenilalanina u krvi (Oppliger et al., 1997). Međutim, za ovu mutaciju se, prema postojećim literaturnim podacima, ne može uočiti jasna korelacija sa kliničkim fenotipom. Kada je bio eksprimiran u *in vitro* sistemu (COS ćelijska linija), mutirani p.Asp136Val PTPS protein je ipak imao značajnu rezidualnu aktivnost od 31% (Dudesek et al., 2001). Takođe, pacijent iz Poljske kod koga je uočena blaža klinička slika je imao ovu mutaciju u homozigotnom stanju (Zekanowski et al., 1998). Kao što je već ranije napomenuto, PTPS deficijencija se grubo može podeliti na teške („tipična“ PTPS deficijencija) i blage fenotipove, gde pacijenti sa blagim fenotipovima uglavnom imaju normalan neurološki razvoj (Leuzzi et al., 2010). Budući da pacijent analiziran u ovoj studiji nije imao težih neuroloških komplikacija, kao i da je imao je samo blaži kognitivni zastoj, može se svrstati u umereno tešku PTPS deficijenciju.

Kada je reč o populacijama koje su bliske Srbiji, u literaturi je opisan veoma mali broj studija koje su se bavile molekularnom karakterizacijom mutacija u genima-uzročnicima BH4 deficijencije. Od slovenskih populacija podaci postoje samo za

Poljsku (Zekanowski et al., 1998), dok podaci za južnoslovenske narode ne postoje. Stoga se podaci iz ove studije mogu ujedno smatrati i prvim podacima koji se tiču spektra mutacija za Balkansko poluostrvo i među prvima za slovenske populacije.

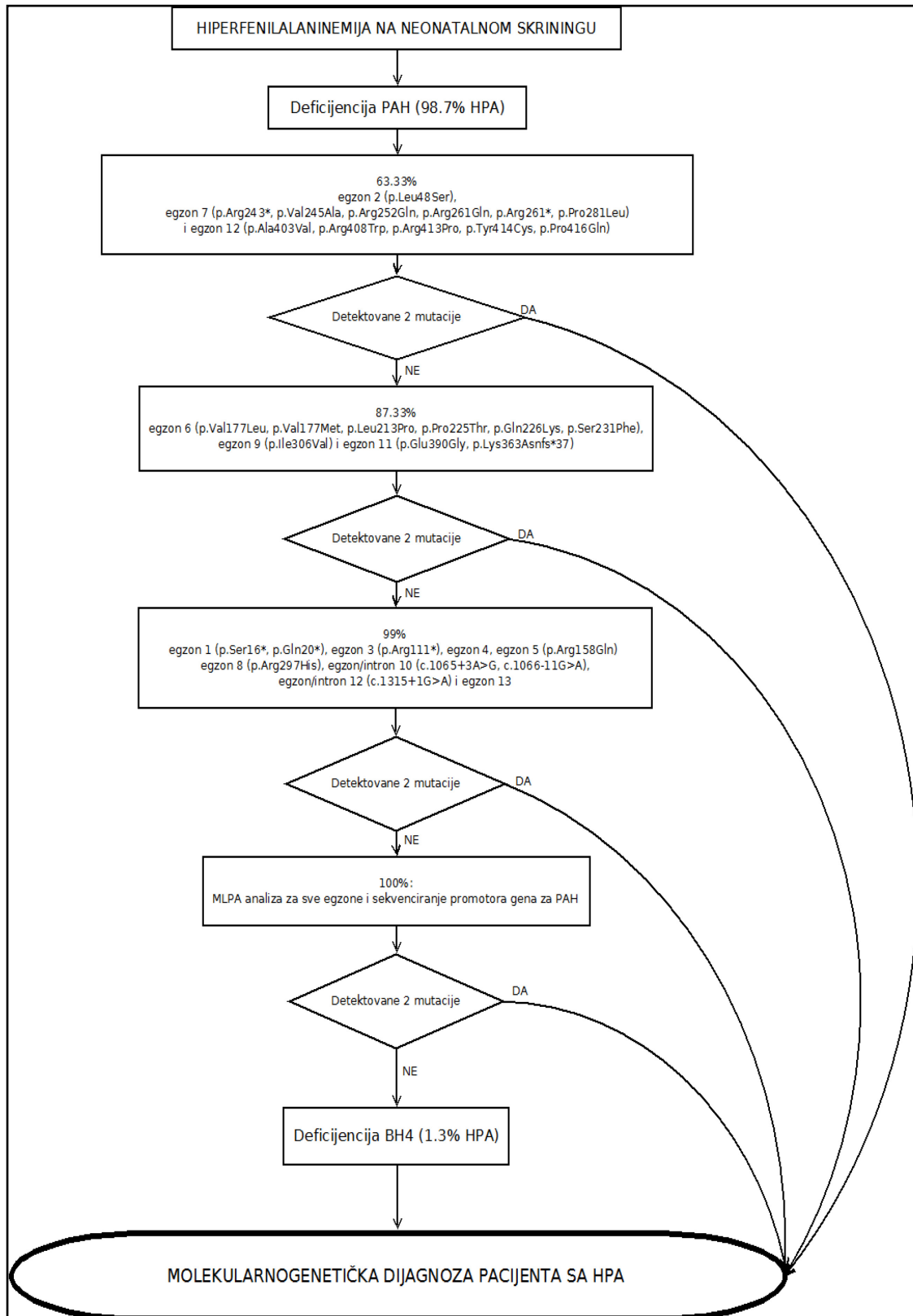
Pacijent analiziran u ovoj studiji je prvi slučaj BH4 deficijencije u Srbiji, koji je identifikovan zahvaljujući primeni molekularne genetike i optimizaciji metode za detekciju mutacija u genu *PTS*. Imajući na umu da učestalost BH4 deficijencije iznosi oko 1-2% svih slučajeva HPA (Blau et al., 2001), može se reći da se učestalost od 1,31% dobijena u ovoj studiji u potpunosti slaže sa očekivanom vrednošću. Takođe, analiza pacijenata sa HPA iz Srbije ukazuje na neophodnost razlikovanja BH4 deficijencije od fenilketonurije. Ukoliko potrebni biohemijski testovi (BH4 test opterećenja i analiza pterina u urinu) nisu dostupni, neophodno je pravovremeno sprovesti molekularnogenetičku analizu gena za *PAH* kako bi se otkrili pacijenti sa mogućom dijagnozom BH4 deficijencije. Na ovaj način će genetičke analize ukazati na odabir terapije za ovu retku grupu pacijenata, i samim tim dovesti do boljih izgleda za njihov što optimalniji psihomotorni i neurološki razvoj.

5.1.4. ALGORITAM ZA OPTIMALNU MOLEKULARNU DIJAGNOSTIKU PACIJENATA SA HPA U SRBIJI

Zahvaljujući temeljnom pretraživanju promena u svim egzonima (zajedno sa egzon-intron granicama) i promotorskom regionu gena za *PAH*, uvođenju metoda za detekciju velikih delecija u genu za *PAH*, kao i primeni i optimizaciji metoda za detekciju mutacija u genima odgovornim za BH4 deficijenciju, postignuta je izuzetno visoka stopa detekcije mutacija od 99,34%. Studija molekularne karakterizacije mutacija u genima-uzročnicima kod pacijenata sa HPA nije bitna samo sa stanovišta populacione genetike, već izuzetno značajnu primenu ima i u osmišljavanju dijagnostičkog pristupa. Imajući u vidu navedene podatke o učestalosti PKU u odnosu na BH4 deficijencije, kao i učestalosti mutacija do sada detektovanih u analiziranoj populaciji, može se konstruisati odgovarajući dijagnostički algoritam za Srbiju (Slika 29). Uz primenu ovog algoritma, analizom samo 3 egzona gena *PAH* (egzoni 2, 7 i 12) u kojima su inače mutacije za koje je ova studija pokazala da su najčešće u Srbiji,

moguće je detektovati mutacije kod 63,33% pacijenata, dok se uz analizu još dva egzona (egzoni 6 i 9) mutacije mogu detektovati kod 87,33% pacijenata. Na kraju, nakon analize svih egzona (sa egzon-intron granicama), mutacije će biti detektovane kod gotovo 99% pacijenata, te je, u slučaju da nisu detektovane obe mutacije u genu *PAH*, neophodno primeniti MLPA analizu i sekvencirati promotor gena. Ukoliko ni posle tih analiza nisu otkrivene obe mutacije u genu *PAH*, treba otpočeti sa molekularnogenetičkom analizom gena odgovornih za BH4 deficijenciju.

Ovakav dijagnostički algoritam bi, uzimajući u obzir učestalost svake pojedinačne mutacije, kao verovatnoće da bude detektovana kod pacijenta sa HPA u Srbiji, omogućio bržu, lakšu i pristupačniju detekciju mutacija kod pacijenata kod kojih se uoči povišeni nivo fenilalanina na neonatalnom skriningu. Stoga bi korišćenje ovakvog algoritma u rutinskoj dijagnostici pacijenata sa HPA u Srbiji dovelo do brzog i preciznog postavljanja odgovarajuće dijagnoze, koja bi, sa svoje strane, omogućila što raniju primenu odgovarajuće terapije specifične za detektovani genotip.



Slika 29. Dijagnostički algoritam HPA za pacijente iz Srbije.

Sa druge strane, ubrzani razvoj novih tehnologija je od nedavno otvorio novo poglavlje u dijagnostici hiperfenilalaninemije. Pristup zasnovan na sekvenciranju nove generacije je omogućio ciljano rekvenciranje četiri gena-uzročnika HPA (*PAH*, *GCHI*, *PTS* and *QDPR*) (Trujillano et al., 2014). Ovakav pristup se pokazao znatno moćnijim i efikasnijim u poređenju sa konvencionalnim metodama molekularne dijagnostike koji su zasnovani na sekvenciranju jednog po jednog gena. Samim tim se u bliskoj budućnosti može očekivati da se, primenom ovakvih tehnologija, još više uštedi na vremenu potrebnom za molekularnogenetičke testove, tako da se odgovarajuća terapija uspostavi samo nekoliko dana po rođenju pacijenta.

5.1.5. PREDIKCIJA KORISNOSTI BH4 LEKA U POPULACIJI PACIJENATA SA PKU IZ SRBIJE NA OSNOVU GENOTIPA

Od kako su krajem prošlog veka Kure i saradnici (Kure et al., 1999) pokazali da BH4 dovodi do sniženja nivoa fenilalanina u krvi kod nekih pacijenata sa PKU, predviđanje odgovora na terapiju sa BH4 je predmet velikog broja studija. U kliničkoj praksi se kao metod izbora najčešće koristi BH4 test opterećenja, uz pomoć koga je moguće utvrditi fiziološko dejstvo za konkretan slučaj pacijenta sa PKU (Desviat et al., 2004, Blau et al., 2009). Međutim, imajući na umu da odgovor na terapiju sa BH4 zavisi od mutacija koje pacijent ima u genu za *PAH*, često je korisno predvideti odgovor na BH4 na osnovu poznatog *PAH* genotipa.

Prva studija koja je predložila da se odgovor na BH4 može izvesti iz *PAH* genotipa je pretpostavljala da je za fiziološki odgovor pacijenta dovoljno prisustvo samo jedne mutacije za koju se zna da odgovara na BH4 (Zurfluh et al., 2008). U okviru studije molekularne karakterizacije mutacija, u genotipovima pacijenata sa PKU iz Srbije je detektovano ukupno 9 različitih mutacija za koje je poznato da odgovaraju na BH4, dok ukupna učestalost ovih mutacija iznosi 56%.

Međutim, kada je reč o predviđanju odgovora na BH4, ubrzo je postalo jasno da prisustvo određenog *PAH* genotipa ipak ima mnogo veću prediktivnu moć u odnosu na prisustvo samo jedne mutacije (Trefz et al., 2009). Naime, u literaturi su uočene inkonzistencije u odnosu na odgovor na BH4 za pojedine mutacije (Karačić et al., 2009;

Quirk et al 2012; Đorđević et al., 2013; Reblova et al., 2013; Anjema et al., 2013). Primećeno je da odgovor ponekad zavisi od prisustva druge mutacije u genotipu, te su tako beleženi različiti odgovori u zavisnosti da li je mutacija u homozigotnom ili hemizigotnom stanju, ili je u kombinaciji sa drugom *missense* mutacijom, koja, sa svoje strane, ima ili nema odgovor na BH4 (Nielsen et al., 2010; Anjema et al., 2013). Stoga je u okviru ove studije po prvi put izvršeno predviđanje odgovora na terapiju sa BH4 na osnovu genotipa kod pacijenata sa PKU iz Srbije.

U cilju što verodostojnije predikcije odgovora na terapiju sa BH4, *PAH* genotipovi pacijenata sa PKU u Srbiji su svrstani u tri grupe: one koji odgovaraju na BH4, one koji verovatno odgovaraju na BH4, i na kraju na one koji ne odgovaraju na BH4. Shodno tome, primećeno je da samo 21% pacijenata ne bi imalo koristi od terapije sa BH4, dok bi za 32% pacijenata (maksimalno čak 79% pacijenata) preporuka bila da budu podvrgnuti BH4 testu opterećenja. Bez sumnje, BH4 test opterećenja je jedini način da se odredi kako će određeni pacijent reagovati na terapiju (Blau et al., 2009). Međutim, predikciju na osnovu genotipa je korisno uraditi u slučaju kada se BH4 test opterećenja ne radi rutinski iz finansijskih razloga, tako da tada karakterizacija genotipa pacijenata sa PKU može da ukaže na moguće kandidate za uspešnu terapiju sa BH4. Osim toga, ukoliko terapija sa BH4 nije uopšte dostupna u zemlji (kao u slučaju Srbije), ovakva procena može da ukaže kolikom procentu pacijenata sa PKU bi ona bila od koristi. Ova studija, koja predstavlja prvu procenu odgovora na novi lek za fenilketonuriju kod pacijenata iz Srbije, pokazala je da bi većina pacijenata iz Srbije mogla da ima koristi od terapije sa BH4.

5.2. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVE VARIJANTE U KODIRAJUĆEM REGIONU GENA *PAH*

Drugi deo ovog istraživanja je za cilj imao funkcionalnu karakterizaciju novootkrivene varijante u kodirajućem regionu gena *PAH*.

Nukleotidna zamena c.676C>A (p.Gln226Lys) koja je identifikovana pri molekularnoj karakterizaciji mutacija kod pacijenata sa PKU iz Srbije nije bila zabeležena ni u jednoj od tri korišćene baze podataka. S obzirom da je reč o potencijalnoj mutaciji koja dovodi do razvoja fenilketonurije, ova promena je najpre podvrgnuta *in silico* analizi, a zatim i funkcionalnoj analizi, u cilju potvrde patološkog efekta.

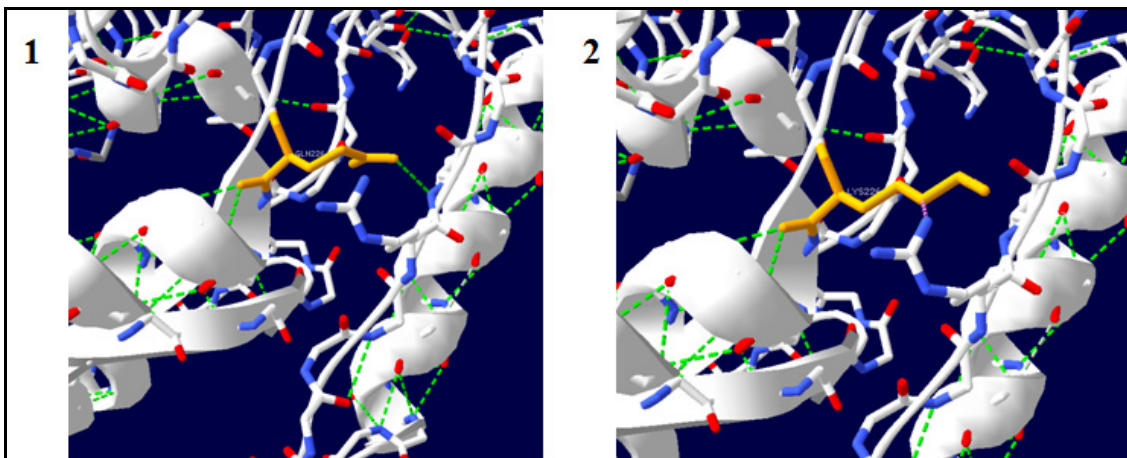
5.2.1. *IN SILICO* ANALIZA p.Gln226Lys PAH

Budući da je pri *in silico* analizi uputno koristiti nekoliko različitih bioinformatičkih softvera radi verodostojnosti rezultata, pri analizi p.Gln226Lys su korišćena 3 različita programa za predikciju efekta aminokiselinskih zamena, pri čemu su rezultati sva tri nedvosmisleno ukazivali da je reč o patološkoj mutaciji. I u slučaju analize programom PolyPhen-2, kao i programom SIFT, odgovarajući skor koji određuje verovatnoću teške mutacije imao je najvišu moguću vrednost (1 za PolyPhen-2 i 0 za SIFT). Ova dva rezultata ukazala su da je promena p.Gln226Lys u genu *PAH* najverovatnije mutacija koja dovodi do oboljenja, dok je korišćenjem programa MutPred, osim što je takođe potvrđena verovatnoća teške mutacije sa visokim skorom (0,899), ukazano i na najverovatniji mehanizam kojim dolazi do narušavanja funkcije. Naime, MutPred pretpostavlja da zamenom glutamina u lizin, dolazi do metilacije na mutiranom lizinu, i to sa velikom verovatnoćom ($P=0,009$). Osim toga, MutPred predviđa i ubikvitinaciju na ovom istom aminokiselinskom ostatku ($P=0,0177$).

U slučaju metilacije mutiranog lizina, lako je zaključiti da dodatak velike metilgrupe na protein doprinosi nestabilnosti, što može da dovede do pogrešnog savijanja proteina i ubrzane degradacije. Osim toga, metilacija je jedna od čestih posttranslacionih modifikacija proteina koja ima regulatornu ulogu. Pokazano je da kod nekih proteina metilacija pojedinih lizinskih ostataka vodi ka ubikvitinaciji i poliubikvitinaciji drugih lizinskih ostataka u okviru istog proteina, što dalje vodi proteolitičkoj degradaciji na ovaj način obeleženog proteina (Hamamoto et al., 2015) Sa druge strane, budući da je MutPred sa visokom verovatnoćom predvideo i ubikvitinaciju lizina na poziciji 226, moguće je da je i ovaj direktniji vid obeležavanja za degradaciju mogući uzrok narušavanja funkcije p.Gln226Lys. Dalje, poravnanje sekvenci pet

odabranih kičmenjačkih vrsta koje je vršeno uz pomoć Clustal Omega programa je pokazalo da se kod svih na poziciji 226 nalazi upravo aminokiselina glutamin, što je ukazalo na evolutivnu očuvanost ovog aminokiselinskog ostatka u proteinu PAH kod vrsta koje su manje ili više evolutivno udaljene. Na evolutivnu očuvanost ove aminokiseline takođe ukazuje i podatak da je na ovoj poziciji već detektovano prisustvo dve različite mutacije za koje je pokazano da dovode do nastanka fenilketonurije, p.Gln226His (c.678G>C) i p.Gln226* (c.676C>T) (www.biopku.org).

Kada se poredi proteinski model wt PAH sa p.Gln226Lys PAH, može se uočiti još jedan mogući mehanizam narušavanja funkcije. Naime, u wt proteinu PAH, glutamin na poziciji 226 formira tri vodonične veze, sa Asp229, Val230 i Val 177, od čega u formiranju veze sa Val177 učestvuje glutaminski bočni lanac (Slika 30). Promena iz glutamina u lizin remeti vodoničnu vezu sa Val177, što može da vodi ka pogrešnom savijanju i nestabilnosti proteina. Osim toga, u jednom od mogućih pozicija lizinskog ostatka dolazi i do „sudaranja“ sa Arg176, što takođe može da vodi ka nestabilnosti.



Slika 30. Prikaz interakcija aminokiseline na poziciji 226 u humanom proteinu PAH: 1) wt PAH sa glutaminom na poziciji 226; 2) p.Gln226Lys PAH. Varijantna aminokiselina je prikazana narandžastom bojom, vodonične veze su predstavljene zelenim isprekidanim crticama, dok je „sudaranje“ prikazano ljubičastim isprekidanim crticama. Proteinski model je konstruisan uz pomoć Swiss-PdbViewer programa (<http://www.expasy.org/spdbv>), korišćenjem PDB šifre 2PAH.pdb.

Dakle, iako je mutirana aminokiselina sličnih fizičko-hemijskih osobina kao i nemutirana (obe su baze), korišćenjem nekoliko bioinformatičkih programa za predikciju je pokazano da je najverovatnije reč o patološkoj mutaciji, kao i da će, usled evolutivne očuvanosti pozicije 226 u humanom proteinu PAH, zamena glutamina na toj poziciji verovatno dovesti do nastanka aberantnog proteina. Stoga je ova promena podvrgnuta funkcionalnoj karakterizaciji.

5.2.2. *IN VITRO* FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA p.Gln226Lys PAH PROTEINA U EUKARIOTSKOM EKSPRESIONOM SISTEMU

Kada je mutirani p.Gln226Lys PAH-FLAG protein ekspimiran u *in vitro* sistemu koji je najpribližniji situaciji u organizmu - humanom hepatoma ćelijskom modelu (Hep 3B ćelije), pokazano je da je količina mutiranog proteina izuzetno niska, i iznosi svega oko 1,2% u odnosu na nemutirani wt PAH-FLAG. Ovakav rezultat pokazuje da lizinski ostatak na poziciji 226 onemogućava zauzimanje pravilne konformacije proteina, kao i da dovodi do njegove ubrzane degradacije. Imajući na umu rezultate iz analize MutPred programom, moguće je pretpostaviti i da neka od predviđenih post-translacionih modifikacija doprinosi maloj količini p.Gln226Lys PAH. Bilo bi interesantno potvrditi rezultate ove predikcije, međutim, izuzetno male količine ekspimiranog mutiranog proteina onemogućavaju takvu vrstu analiza. Takođe, ovo je i glavna prepreka analizi nivoa aktivnosti p.Gln226Lys PAH – budući da je nivo ekspimiranog proteina gotovo zanemarljiv, nije bilo moguće analizirati enzimsku rezidualnu aktivnost.

Imajući u vidu da je p.Gln226Lys *missense* mutacija, bio je istražen i eventualni efekat novog leka (koji funkcioniše kao farmakološki šaperon) na ovaj mutirani protein. U slučaju pozitivnog odgovora ove mutacije na BH₄, protektivni stabilizujući efekat na strukturu PAH bi se ispoljio u vidu značajno povećane količine mutiranog proteina, usled sprečavanja proteolitičke degradacije (Perez et al., 2005). Međutim, količina mutiranog p.Gln226Lys PAH-FLAG je bila samo neznatno povećana u slučaju dodavanja sepiapterina, prekursora u putu unutarćelijske biosinteze BH₄, što ukazuje da ova mutacija ne odgovara na BH₄.

Mutacija p.Gln226Lys je prvi put detektovana u Srbiji kod odraslog nelečenog pacijenta (p.Gln226Lys/p.Gln20*), koji je ispoljavao kliničku sliku klasične fenilketonurije, sa visokim nivoom fenilalanina u krvi i izraženom mentalnom retardacijom. Drugi pacijent (p.Gln226Lys/p.Ile306Val) je otkriven na neonatalnom skriningu, sa nivoom fenilalanina koji takođe odgovara klasičnoj PKU. U oba slučaja korelacija genotipa i teškog kliničkog fenotipa pacijenata predstavlja još jedan dokaz o patološkom efektu p.Gln226Lys mutacije na protein PAH.

S obzirom na izrazito malo povećanje količine mutiranog proteina pri dodavanju sepiapterina, može se zaključiti da stabilizacioni uticaj BH4 ne bi imao fiziološki značaj u kontekstu terapije sa BH4. Međutim, radi dodatne potvrde, bilo bi uputno sprovesti BH4 test opterećenja kod pacijenata koji imaju ovu mutaciju.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju, može se zaključiti da je nukleotidna zamena c.676C>A koja dovodi do sinteze mutiranog p.Gln226Lys PAH proteina zapravo patološka mutacija koja dovodi do razvoja fenilketonurije, i kao takva se može uvrstiti u baze podataka. Osim toga, u okviru ove studije je pokazano i da ova mutacija ne odgovara na BH4.

5.3. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U NEKODIRAJUĆIM REGIONIMA GENA *PAH*

Treći deo ovog istraživanja je za cilj imao proučavanje novih transkripcionih regulatora u okviru nekodirajućih regiona gena *PAH*. Imajući na umu da nekodirajućih regioni zapravo čine najveći deo gena *PAH* (preko 97%), kao i da je u dosadašnjim istraživanjima bio analiziran samo mali deo ovih regiona, posebna pažnja je bila posvećena identifikaciji novih regulatornih elemenata, koji, formirajući gensko okruženje gena za *PAH*, mogu imati uticaja na njegovu finu regulaciju ekspresije.

5.3.1. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U OKVIRU PROMOTORA GENA *PAH*

Najveći deo istraživanja koja su imala za cilj analizu promotorskog regiona gena *PAH* su sprovedena krajem prošlog veka. Funkcionalna karakterizacija promotora gena *PAH* je tom prilikom otkrila da je ekspresija regulisana velikim brojem različitih transkripcionih faktora (Konecki et al., 1992, Wang et al., 1994). Naime, u okviru promotora gena *PAH* je identifikovano nekoliko regulatornih sekvenci, za koje se vezuju raznovrsni transkripcioni faktori, kako opšti, tako i specifični za tkivo i fazu razvika. Međutim, kada je u skorije vreme objavljena referentna sekvenca gena *PAH* (GeneBank Accession#: AF404777), primećeno je da je pri karakterizaciji promotora korišćena sekvenca kojoj nedostaje citozinski nukleotid na poziciji -170. Budući da ovakva kompletna sekvenca nikada nije dodatno analizirana, jedan od ciljeva ovog istraživanja je bila analiza 5' regiona gena *PAH* sa citozinom na poziciji -170, u skladu sa aktuelnom referentnom sekvencom - wt sekvencom, koja je uočena i kod svih pacijenata analiziranih u okviru ove studije.

Preliminarna *in silico* analiza korišćenjem MatInspector programa je ukazala na vezivanje transkripcionih faktora iz KLF familije za wt sekvenču, pri čemu je kao jezgro vezivanja od strane ovog programa prepoznat upravo citozin na poziciji -170. Funkcionalna analiza potencijalnog regulatornog elementa je pokazala da konstrukt pBLCAT5_-170C koji nosi potencijalno vezujuće mesto, ima za 50% smanjen nivo reporterske aktivnosti u odnosu na bazalni nivo aktivnosti plazmida pBLCAT5. Nasuprot tome, konstrukt bez vezujućeg mesta nije pokazao statistički značajnu razliku u smanjenju nivoa reporterske aktivnosti pri poređenju sa pBLCAT5. Ovi rezultati pokazuju da je analizirano vezujuće mesto sa wt sekvencom neophodno za transkripcionu aktivnost analiziranog regulatora. Upravo zbog toga ovo vezujuće mesto nije okarakterisano u radu Koneckog i saradnika (Konecki et al., 1992), jer je korišćenoj sekvenci nedostajao citozin na -170, što je onemogućilo identifikaciju ovog mesta. Međutim, s obzirom na rezultate ekspresionog eseja, može se zaključiti da promotorski region koji obuhvata sekvencu sa C na -170 ima ulogu regulatornog elementa koji ima mogućnost smanjenja nivoa ekspresije gena, dakle ima ulogu transkripcionog utišivača (sajlensera).

Dalje, u EMSA esejima je potvrđena interakcija promotorske sekvence (sa citozinom na -170) sa transkripcionim faktorima iz hepatoma ćelijske linije, dok je u superšift esejima pokazano da tako formirani kompleks uključuje i KLF1 transkripcioni faktor, čime je potvrđen rezultat *in silico* analize. KLF1 je presudni regulator funkcije eritroidnih ćelija i predstavlja prvog otkrivenog člana velike KLF familije transkripcionih faktora (Miller and Bieker, 1993). KLF1 je eksprimiran u hematopoetskim tkivima kroz sve stadijume razvića, uključujući tako i fetalnu jetru kod čoveka, gde se hematopoeza odvija od šeste nedelje do petog meseca gestacije (Handin et al., 2003; Southwood et al., 1996). Imajući na umu da je ekspresija PAH u fetalnoj jetri primećena već u osmoj nedelji gestacije (Raiha, 1977), kao i da stoga u jednom periodu razvića koincidira sa ekspresijom KLF1 (štaviše, ekspresija KLF1 unekoliko prethodi ekspresiji PAH), moguće je pretpostaviti potencijalnu ulogu KLF1 u ranim događajima koji vode ka uspešnom uspostavljanju pravilne ekspresije PAH u jetri.

Iako KLF1 najčešće ima ulogu transkripcionog aktivatora (Bieker, 2005), u literaturi su zabeleženi i primeri njegove represorske funkcije (Chen and Bieker, 2001). Izgleda da određene post-translacione modifikacije (kao što je sumoilacija) vode ka njegovoj represorskoj ulozi (Siatecka et al., 2007). Budući da regulatorni element u promotoru gena PAH identifikovan u ovoj studiji ima ulogu transkripcionog represora pri vezivanju KLF1, bilo bi interesantno analizirati post-translacione modifikacije u ovom slučaju. Potrebna su dalja istraživanja koja će doprineti razumevanju uloge ovog promotorskog elementa u regulaciji transkripcije gena PAH.

S obzirom na rezultate dobijene u okviru ove studije, deo PAH promotora sa citozinom na poziciji -170, kao novi regulatorni element koji vezuje KLF1 transkripcioni faktor, može da se uvrsti u niz regulatornih sekvenci za koje se već dvadesetak godina zna da funkcionišu kao regulatorni elementi u okviru promotora gena PAH.

5.3.2. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVIH TRANSKRIPCIONIH REGULATORA U OKVIRU VNTR REGIONA U 3' KRAJU GENA *PAH*

Iako promotor predstavlja region koji ima presudnu ulogu u regulaciji ekspresije gena na transkripcionom nivou, vrlo često su za preciznu regulaciju transkripcije neophodni i drugi regulatorni elementi. Ovi regulatorni elementi mogu da se nađu i u drugim regionima gena, uzvodno ili nizvodno od kodirajuće sekvence (5' ili 3' regionu gena), a mogu se naći i u intronima. Tako je u osmom intronu gena *PAH* nedavno otkriven regulatorni element koji funkcioniše kao pojačivač transkripcije (enhanser) (Stojiljković et al., 2010). S obzirom na to da se ovaj regulatorni element nalazi u okviru bialelskog polimorfnog mesta, u ovoj studiji je pažnja bila usmerena na još jedan poznati polimorfni region gena *PAH*, multialelski VNTR region koji se nalazi u 3' regionu gena (Goltsov et al., 1992).

Iako VNTR region gena *PAH* pokazuje potencijal za izuzetnu varijabilnost kako po broju, tako i po arhitekturi pojedinačnih ponovaka, samo ograničen broj mogućih kombinacija je do sada uočen u različitim populacijama (Woo 1988; Goltsov et al., 1992). Tako su u populaciji pacijenata sa PKU iz Srbije u okviru ove studije primećena tri različita alela: VNTR3, VNTR7 i VNTR8, pri čemu je VNTR3 bio ubedljivo najzastupljeniji. *In silico* analiza detektovanih ponovaka je ukazala na vezivanje istih transkripcionih faktora za sva tri ispitivana tipa ponovaka, VNTR3, VNTR7 i VNTR8 (OCT-1, CDXA i C/EBP). Funkcionalna analiza je pokazala da sva tri tipa VNTR ponovaka imaju za oko 60% smanjen nivo reporterske aktivnosti u odnosu na bazalni nivo promotorske aktivnosti (pBLCAT5 plazmid). Ovim je pokazano da VNTR region, nezavisno od tipa ponovka, ima ulogu u regulaciji transkripcione aktivnosti, tako da se može zaključiti da analizirani VNTR region ima funkciju transkripcionog utišivača (sajlensera).

S obzirom da je funkcionalna analiza pokazala da između različitih ponovaka nema razlike u intenzitetu transkripcije, ali da analizirani VNTR region ima ulogu u transkripciji gena, dalje istraživanje bilo je usmereno na VNTR3, kao najčešći tip alela kod pacijenata sa PKU iz Srbije. U EMSA esejima je pokazana interakcija sa transkripcionim faktorima iz hepatoma ćelijske linije, i to kako sa pojedinačnim

ponovcima u okviru VNTR3, tako i sa kompletnom VNTR3 sekvencom. Međutim, u supersift analizama je samo za kompletnu VNTR3 sekvencu pokazano da ova specifična interakcija uključuje i C/EBP alpha transkripcioni faktor. Na ovaj način je pokazano da je za vezivanje C/EBP alpha neophodno prisustvo kompletne strukture VNTR3 tipa ponovaka. Uzimajući u obzir rezultate ekspresionih eseja, može se zaključiti da VNTR3 region ima ulogu regulatornog elementa za koji se vezuje C/EBP alpha transkripcioni faktor, pri čemu u ovoj interakciji C/EBP alpha funkcioniše kao transkripcioni represor.

C/EBP alpha je prvi otkriveni član široko rasprostranjene C/EBP familije transkripcionih faktora (Friedman et al., 1989). Za C/EBP alpha protein je karakteristična visoka ekspresija u jetri, gde reguliše ekspresiju mnogih hepaticnih gena kao što su albumin, alfa-fetoprotein, transtiretin i alfa-antitripsin (Schrem, 2004; Gerlach et al., 2014). C/EBP alpha funkcioniše predominantno kao aktivator, međutim, postoje i primeri gde ima ulogu represora (Guzman et al., 2013). Stoga se može pretpostaviti da bi vezivanje C/EBP alpha za VNTR3 region koji ima funkciju transkripcionog utišivača moglo da utiče na finu regulaciju ekspresije gena *PAH*.

Za multialelske VNTR regione postoje literaturni podaci koji ukazuju na značaj ovakvih markera u regulaciji transkripcije različitih gena (Zukić et al., 2010; Brookes, 2013). Budući da rezultati ove studije pokazuju da je za vezivanje C/EBP alpha neophodna kompletna VNTR3 sekvenca, kao i da je *in silico* analiza predvidela da se C/EBP alpha vezuje na spojevima pojedinačnih ponovaka, bilo bi interesantno analizirati vezivanje ovog transkripcionog faktora za druge VNTR alele prisutne i u drugim populacijama. Takođe, bilo bi uputno analizirati VNTR region u zdravoj populaciji iz Srbije da bi se utvrdilo da li dobijene učestalosti različitih alela odstupaju od učestalosti dobijenih za pacijente sa PKU iz Srbije. Ovakva studija bi mogla dodatno da rasvetli moguću ulogu koju ovaj regulatorni element ispoljava na ekspresiju gena *PAH*.

Imajući u vidu rezultate EMSA *supershift* eseja, uz rezultate ekspresionih eseja, može se zaključiti da VNTR region predstavlja novi regulatorni element koji se nalazi u 3' kraju gena *PAH*. Osim toga, pokazano je i da VNTR3 alel vezuje C/EBP alpha transkripcioni faktor, koji ima ulogu transkripcionog represora.

Ovo istraživanje se nastavlja na trend identifikacije dodatnih mesta regulacije transkripcije u nekodirajućim regionima, konkretno promotorskom i 3' regionu gena *PAH*, što upotpunjuje razumevanje fine regulacije *PAH* ekspresije i nastanak kompleksnog fenotipa PKU.

5.4. ANALIZA VARIJANTI U POTENCIJALNIM GENIMA MODIFIKATORIMA KOGNITIVNOG PKU FENOTIPA

Četvrti i ujedno poslednji deo ovog istraživanja je za cilj imao analizu potencijalnih gena modifikatora kognitivnog PKU fenotipa. Ova analiza je bila sprovedena korišćenjem dva različita metodološka pristupa, gde je prvi podrazumevao kovencionalne metode asocijativne studije gde je izučavana povezanost jedne u literaturi dobro opisane varijante i aspekta PKU fenotipa od interesa, u ovom slučaju vrednosti IQ. Drugi pristup je uključivao korišćenje nove i sofisticirane tehnologije koja omogućava analizu velikog broj gena u jednom koraku. Upotrebom tehnologije sekvenciranja nove generacije bilo je stoga moguće uključiti znatno manji broj pacijenata, pri čemu su pacijenti bili pažljivo selektovani tako da ispoljavaju izuzetno interesantan ekstrem širokog opsega PKU fenotipa, a to je normalan kognitivni razvoj uprkos izloženosti visokim koncentracijama fenilalanina u toku čitavog života.

5.4.1. ANALIZA POVEZANOSTI VARIJANTE m.10398A>G U MITOHONDRIJSKOM *ND3* GENU SA KOGNITIVNIM FENOTIPOM PACIJENATA SA PKU

U slučaju prvog metodološkog pristupa, za genetičku asocijativnu studiju je bila odabrana varijanta za koju literaturni podaci ukazuju na povezanost sa određenim aspektom PKU fenotipa (neurodegeneracijom). Budući da sve veći broj podataka ukazuje na to da fenilalanin i njegovi metaboliti uzrokuju nastanak oksidativnog stresa i

na taj način dovode do neurodegeneracije, koja sa svoje strane uzrokuje kognitivni deficit uočen kod pacijenata sa PKU (Kienzle Hagen et al., 2002; Sirtori et al., 2005; Vargas et al., 2011. Ribas et al., 2011), pažnja je bila usmerena na m.10398A>G varijantu u mitohondrijskom *MT-ND3* genu.

Imajući u vidu da je u kohorti analiziranih pacijenata sa PKU bio zastupljen širok opseg kognitivnih fenotipova, od izražene mentalne retardacije pa sve do normalne inteligencije, pacijenti su svrstani u četiri grupe, pri čemu su korišćena dva kriterijuma: vreme uspostavljanja dijagnoze i sprovođenje dijeta sa niskim sadržajem fenilalanina. S obzirom na populacionu specifičnost učestalosti m.10398A>G (Torrioni et al., 1994), najpre je utvrđena razlika u distribuciji učestalosti alela između pacijenata i ispitanika kontrolne grupe, gde je za obe grupe dobijena ista učestalost m.10398A (82%), što je i razumljivo s obzirom na zajedničko poreklo. Takođe, alel m.10398A je imao znatno veću učestalost u svakoj od četiri grupe pacijenata sa PKU.

Kada je analizirana povezanost između vrednosti IQ pacijenata i prisustva m.10398A ili m.10398G alela, u okviru grupe rano otkrivenih i dobro tretiranih pacijenata nije pronađena statistički značajna razlika u srednjoj vrednosti IQ između nosilaca m.10398A i m.10398G. Takođe, nije bilo razlike ni među pacijentima koji su imali niže vrednosti IQ usled zakasnele dijagnoze, iako su pacijenti sa m.10398A imali nešto niže vrednosti IQ. Međutim, već na prvi pogled je moguće uočiti da su grupe pacijenata koje su dobijene ovakvom stratifikacijom nedovoljno velike za studije genetičke asocijacije sa zadovoljavajućom statističkom moći. Kao što je već naglašeno, PKU je retka bolest, gde je pritom moguće razlikovati čitav spektar različitih fenotipova u zavisnosti od težine kliničke slike i uticaja sredinskih faktora, kao što je ubedljivo najbitniji – kontrola unosa fenilalanina u ishrani. Stoga bi za ovakav pristup istraživanju valjalo formirati znatno veće grupe, koje su što uniformnijeg fenotipa. Osim toga, bilo bi uputno izbeći i inkonzistencije koje bi mogle da proisteknu iz genotipa, pa bi, u slučaju dovoljno velike grupe pacijenata, osim postojećih sredinskih (dijeta i vreme dijagnoze), u dalju stratifikaciju pacijenata bio uključen i najuticajniji genetički faktor – *PAH* genotip, gde bi idealne grupe činili pacijenti koji su homozigotni ili hemizigotni za pojedine česte mutacije. Ovakvi podaci bi mogli da pruže uvid u kompleksnu povezanost genotipa *PAH*, varijanti u mitohondrijskoj DNK i kognitivnom deficitu

pacijenata sa PKU. Sa druge strane, ovi rezultati još jednom podvlače važnost pravovremene dijagnoze i odgovarajuće terapije za postizanje normalnog intelektualnog fenotipa pacijenata sa PKU.

Ovo je prva studija koja se bavila asocijacijom varijante m.10398A>G i kognitivnog fenotipa pacijenata sa PKU. Međutim, bilo bi poželjno istražiti povezanost u većim grupama i drugim populacijama. Studije u većim i fenotipski homogenijim grupama bi mogle da razjasne eventualnu asocijaciju, da ukažu na neke druge mitohondrijske gene modifikatore, kao i da doprinesu rasvetljavanju mehanizma nastanka mentalne retardacije kod PKU, koji, s obzirom na veliki broj podataka iz literature, verovatno ipak u određenoj meri uključuje oksidativni stres.

5.4.2. IDENTIFIKACIJA NOVIH POTENCIJALNIH GENA MODIFIKATORA PKU KOGNITIVNOG FENOTIPA

Drugi metodološki pristup korišćen u identifikaciji potencijalnih gena modifikatora PKU kognitivnog fenotipa je podrazumevao analizu kompletne genomske sekvence 10 nelečenih PKU pacijenata sa karakterističnim kognitivnim fenotipom. Ovi pacijenti su po genotipu i metaboličkom fenotipu svrstani u klasičnu fenilketonuriju, međutim, sasvim neočekivano su razvili normalan kognitivni fenotip. Primena tehnologije sekvenciranja nove generacije na ovakav tip uzoraka ima velike prednosti. Osim činjenice da su ovakvi slučajevi izuzetno retki u kliničkoj praksi (Ramus, 1999), tako da bi bilo izuzetno teško prikupiti odgovarajući broj pacijenata za standardnu asocijativnu studiju, još jedna od prednosti ovog pristupa je mogućnost otkrivanja potpuno novih gena modifikatora. Dok se konvencionalne metode studija asocijacije oslanjaju na već postojeće podatke u literaturi, primena ovakve tehnologije može da ukaže na do tada neistraženu funkciju poznatog gena, da rasvetli do tada malo poznati mehanizam, ili čak da otkrije postojanje potpuno novog gena.

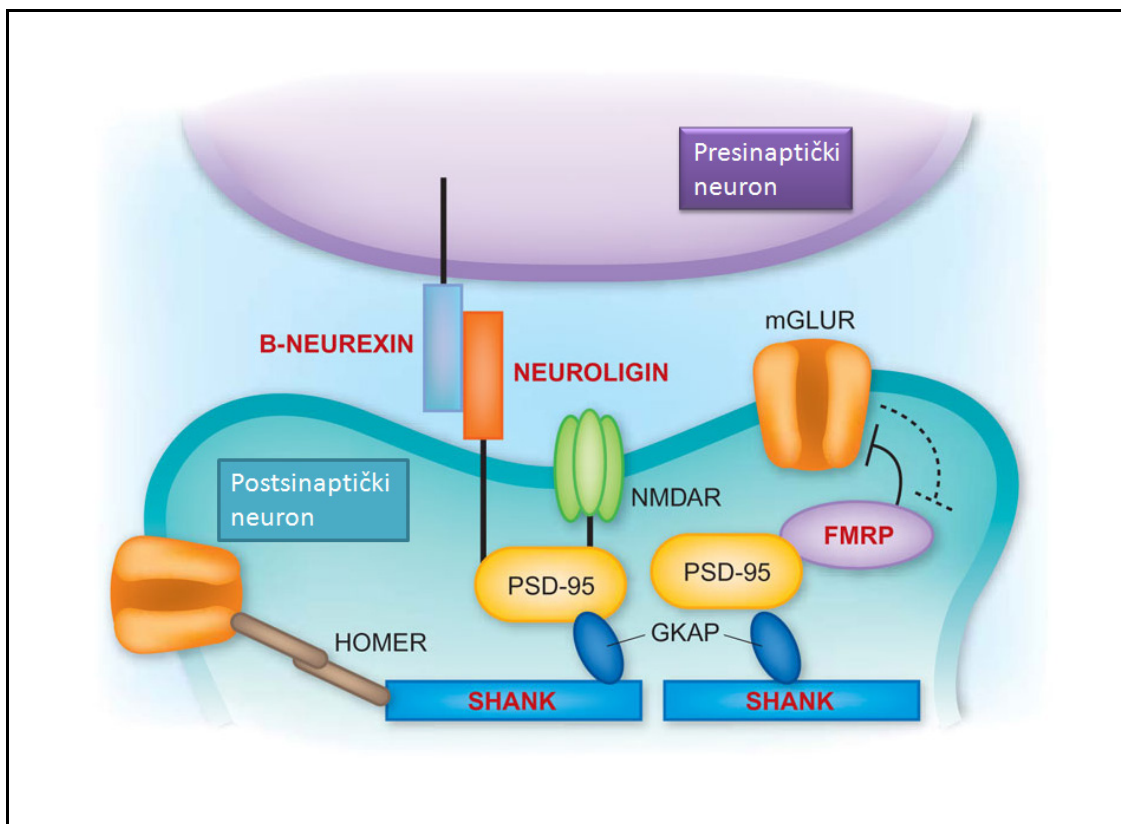
U okviru ove studije je sekvencirano 10 pacijenata iz 6 porodica. Nakon odgovarajuće preliminarne bioinformatičke obrade je kod analiziranih uzoraka selektovano 598 različitih gena sa ukupno 1984 detektovanih varijanti, koje su dalje analizirane pretraživanjem baza podataka (eng. “*data mining*”). Imajući na umu

složenost biohemijaskog puta fenilalanina u organizmu, postavljeno je pitanje, koje gene uzeti u obzir pri analizi? Međutim, budući da glavno obeležje kliničke slike nelečenog pacijenta sa PKU predstavlja mentalna retardacija, kao i da upravo kognitivni PKU fenotip beleži najviše inkonzistencija sa genotipom (Scriver and Waters, 1999), u panel odabranih gena su uvršteni geni sa odgovarajućom fiziološkom ulogom – prvenstveno geni čiji proteinski produkti su uključeni u funkcionisanje centralnog nervnog sistema. Tako je od početnog broja ispitivanih gena kod analiziranih uzoraka selektovano ukupno 72 gena - potencijalna modifikatora kognitivnog PKU fenotipa. Interesantno je da ovom prilikom nisu detektovane varijante u dva gena koja kodiraju za subjediniče transportera aminokiselina (LAT1 i 4F2hc), za koje su ranije studije ukazivale da bi mogli biti potencijalni geni modifikatori PKU fenotipa (Bik-Multanowski and Pietrzyk, 2006). Nakon sledećeg koraka u analizi, prilikom koga su selektovani geni zajednički za više analiziranih porodica, izdvojila se *SHANK* familija gena, sa sva tri svoja člana: *SHANK1*, *SHANK2* i *SHANK3*.

SHANK geni su u fokus interesovanja došli kada je uočena njihova uloga u različitim neuropsihijatrijskim poremećajima i intelektualnoj disfunkciji. Tako je pokazano da delecije koje zahvataju *SHANK3* u heterozigotnom stanju dovode do nastanka autizma (Durand et al., 2007), a slični rezultati su nešto kasnije pokazani i za *SHANK1* (Sato et al., 2012) i *SHANK2* (Berkel et al., 2010; State, 2010). Osim toga, *SHANK3* je dovođen u vezu i sa šizofrenijom (Gauthier et al., 2010) i bipolarnim poremećajem, kao i kognitivnim deficitom (Vucurovic et al., 2012). Niz neurofizioloških disfunkcija sa kojima se ovi geni dovode u vezu raste iz dana u dan, tako da je od nedavno u kliničku praksu uveden i termin „*shankopathies*“ kojim se označavaju poremećaji nastali usled promena u nekom od ovih gena (Wang et al., 2014).

Članovi proteinske familije *SHANK* se u mozgu nalaze u okviru postsinaptičkih membrana dendritskih spina ekscitatornih sinapsi gde predstavljaju tzv. „skele“ proteine (eng. *scaffold protein*) (Naisbitt et al., 1999). Ovi multidomenski proteini se organizuju u velike molekularne platforme u okviru postsinaptičke gustine, strukture koja koordiniše dolazeće signale i usmerava ih ka nizvodnim efektorima. *SHANK* proteini učestvuju u organizaciji sinapse i to putem povezivanja receptorskih proteina na samoj

postsinaptičkoj membrani sa aktinskim citoskeletom dendritske spine. Za SHANK proteine je pokazano da posredno interaguju sa NMDA receptorskim kompleksom, članovima metabotropnih glutamatskih receptora, kao i proteinima pridruženim aktinskom citoskeletu, tako da se mogu smatrati ključnim za pravilno funkcionisanje glutamatergičkih sinapsi (Boeckers et al., 2002; Guilmatre et al., 2014) (Slika 31). Osim toga, pokazano je da SHANK proteini takođe posreduju i u sazrevanju dendritskih spina kod neurona, procesa koji je od izuzetne važnosti za plastičnost nervnog sistema (Durand et al., 2007).



Slika 31. Organizacija postsinaptičke gustine sa SHANK proteinima kao centralnim adapterskim molekulima. Preuzeto i modifikovano iz State, 2010.

Interesantno je da su upravo promene na dendritskim spinama i poremećaji u funkcionisanju glutamatergičkih sinapsi primećeni u animalnim modelima PKU (Horster et al., 2006). Tako su studije na mišjim i pacovskim primarnim kortikalnim neuronima pokazale da povećana koncentracija fenilalanina uzrokuje poremećaj u grananju dendritskih nastavaka (Horster et al., 2006), kao i smanjen broj dendritskih

spina (Zhang et al., 2007). Sa druge strane, veliki broj studija je dokazao disfunkciju glutamatergičkih sinapsi pri povišenim koncentracijama fenilalanina (Yarotsky et al., 2005; Glushakov et al., 2005). Na mogući mehanizam ovog poremećaja ukazuje otkriće da fenilalanin, u koncentraciji koja odgovara onoj izmerenoj u mozgu pacijenata sa klasičnom PKU, uzrokuje značajno i selektivno smanjenje funkcije jonotropnih glutamatskih receptora, i to smanjenjem struje NMDA receptora, budući da deluje kao njegov delimični agonist (Glushakov et al., 2002; Glushakov et al., 2003). Imajući na umu važne uloge koje SHANK proteini imaju u funkcionisanju glutamatergičkih sinapsi, kao i njihovu interakciju sa NMDA receptorom, a osim toga i uticaj na rast dendritskih spina, može se naslutiti da su ovi proteini na neki način uključeni u formiranje finalnog kognitivnog fenotipa kod pacijenata sa PKU. Stoga se može pretpostaviti da bi postojanje varijanti sa protektivnim efektom u *SHANK* genima moglo da ublaži razvoj kognitivnog deficita kod nelečenih pacijenata sa PKU koji su nosioci ovakvih varijanti.

Varijante koje su detektovane kod analiziranih pacijenata sa PKU u okviru ove studije su po tipu *missense* i jedna mala insercija. *In silico* analiza je ukazala da se u skoro svim slučajevima radi o benignim promenama. Promene u *SHANK* genima koje dovode do nastanka neuropsihijatrijskih poremećaja i intelektualne disfunkcije su uglavnom velike delecije koje ukidaju funkciju gena (Durand et al., 2007). Nasuprot tome, za promene detektovane u okviru ove studije bi se moglo pretpostaviti da je reč o varijantama koje mogu da dovedu do sinteze proteina očuvane funkcije, ali donekle izmenjenih osobina, tzv. *gain of function* varijantama. Analiza uz pomoć MutPred programa za neke od njih predviđa sticanje novih, ili gubitak postojećih post-translacionih modifikacija, kao što su glikozilacija i fosforilacija. Imajući u vidu da post-translacione modifikacije mogu da dovedu do novih ili izmenjenih funkcija proteina, može se pretpostaviti da SHANK proteini koji nose identifikovane varijante mogu imati protektivni modifikatorski efekat na kognitivni razvoj pacijenata sa PKU. Rezultate ove studije bi trebalo validirati kroz replikativnu studiju, koja bi uključivala veći broj pacijenata, i to po mogućstvu iz različitih populacija. Međutim, zahvaljujući uspešnoj primeni neonatalnog skrininga na PKU u većini razvijenih zemalja, nelečenih pacijenata ima vrlo malo, dok su nelečeni pacijenti sa normalnim kognitivnim razvojem izuzetno retki. Ukoliko bi poteškoće u dizajniranju takve replikativne studije bile

prevaziđene, a rezultati validirani, kao sledeći korak u rasvetljavanju protektivne uloge detektovanih varijanti u *SHANK* genima na kognitivni deficit pacijenata sa PKU, trebalo bi sprovesti dalje funkcionalne studije u odgovarajućim *in vitro* i *in vivo* sistemima.

Geni modifikatori predstavljaju interesantno, novo i još uvek nedovoljno proučeno polje istraživanja. Na osnovu dosadašnjih podataka iz literature je jasno da u cilju potpunog razumevanja genetičke osnove jedne monogenske bolesti nije dovoljno posmatrati samo jedan lokus. Naprotiv, treba usmeriti istraživanja na identifikaciju što većeg broja gena koji bi mogli da doprinesu konačnom ishodu bolesti. Preveden u kliničku praksu, ovakav pristup će, na osnovu dobijenih genetičkih informacija, omogućiti predviđanje fenotipa pacijenta sa velikom preciznošću, kao i primenu individualne terapije. Kada je reč o fenilketonuriji, neophodno je proučiti koji to sve geni mogu imati uticaj na put fenilalanina u organizmu, od trenutka kada uđe u organizam, pa sve do njegovog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i oštećenja neurona. Upoznavanje genetičkih faktora koji mogu imati protektivni modifikatorski efekat na kognitivni razvoj pacijenata sa PKU će stoga imati značaj ne samo za kliničku praksu kroz razvoj nove strategije lečenja pacijenata sa PKU, već će doprineti i razotkrivanju velike nepoznanice u nauci, mehanizma kojim višak fenilalanina dovodi do oštećenja mozga.

6. ZAKLJUČCI

1. Izvršena je sveobuhvatna molekularnogenetička molekularna karakterizacija varijanti u genima uzročnicima kod 76 pacijenata sa HPA u Srbiji, pri čemu je u genu *PAH* detektovano 29 poznatih i 1 nova mutacija (p.Gln226Lys). Najčešća mutacija u populaciji pacijenata sa PKU iz Srbije je p.Leu48Ser sa učestalošću od 31,33%, što je ujedno i najveća učestalost koja je ikad prijavljena za ovu mutaciju.
2. Optimizovana je MLPA metoda radi analize velikih delecija u genu *PAH* i tom prilikom je kod jednog pacijenta detektovana delecija koja obuhvata ceo šesti egzon gena *PAH* (c.510-?_706+?del) u homozigotnom stanju. Ovo je prva velika delecija u genu *PAH* detektovana u Srbiji, i to sa učestalošću od 1,33%.
3. Optimizovana je metoda za detekciju mutacija u genu *PTS*, zaduženom za biosintezu BH4, i tom prilikom je kod jednog pacijenta detektovana mutacija p.Asp136Val, u homozigotnom stanju. Ovo je prvi slučaj BH4 deficijencije u Srbiji, koji je identifikovan zahvaljujući primeni molekularne genetike i uvođenju metoda za detekciju mutacija u genu *PTS*. Učestalost PTS deficijencije u analiziranoj grupi HPA pacijenata iznosi 1,31%.
4. U ovoj studiji postignut je nivo detekcije mutacija od čak 99,34%. Na osnovu kompletiranog spektra mutacija pacijenata sa HPA, konstruisan je odgovarajući dijagnostički algoritam za Srbiju, koji omogućava bržu, lakšu i pristupačniju detekciju mutacija u genima uzročnicima HPA. Uz primenu ovog algoritma, analizom samo 3 egzona (egzoni 2, 7 i 12) moguće je detektovati mutacije kod 63,33% pacijenata, dok se uz konsektivnu analizu još dva egzona (egzoni 6 i 9) mutacije mogu detektovati kod 87,33% pacijenata.
5. Izvršena je predikcija korisnosti novog leka BH4 u populaciji pacijenata sa PKU iz Srbije. Utvrđeno je da ukupna učestalost mutacija za koje je poznato da odgovaraju na BH4 iznosi 56%, a s obzirom da je data procena i u odnosu na genotip pacijenata, pokazano je da bi 32% pacijenata sa PKU iz Srbije najverovatnije imalo koristi od primene terapije sa BH4, dok maksimalan procenat pacijenata koji bi mogli imati koristi od ovog novog leka iznosi 79%.

6. Urađena je funkcionalna analiza novootkrivene aminokiselinske zamene p.Gln226Lys PAH, nastale usled nukleotidne zamene c.676C>A koja se nalazi u kodirajućem regionu gena *PAH*. *In silico* analiza ove promene je ukazala da je najverovatnije reč o patološkoj mutaciji, što je i potvrđeno funkcionalnom analizom. U *in vitro* hepatoma sistemu je pokazano da količina mutiranog p.Gln226Lys PAH-FLAG iznosi samo 1,2% u odnosu na nemutirani wt PAH-FLAG, pri čemu dodavanje sepiapterina nije značajno povećalo količinu p.Gln226Lys PAH-FLAG. Imajući sve ovo u vidu, kao i tešku kliničku sliku pacijenata kod kojih je mutacija detektovana, može se zaključiti da je p.Gln226Lys patološka mutacija, koja pritom ne odgovara na suplementaciju sa BH4.
7. Izvršena je funkcionalna analiza promotorskog regiona gena *PAH*. U ekspresionim esejima je pokazano da deo promotora gena *PAH* koji sadrži citozin na poziciji -170 (koji odgovara wt sekvenci) funkcioniše kao novi *cis*-regulatorni element koji dovodi do smanjenja intenziteta transkripcije, dok je u EMSA *supershift* esejima pokazano da ovaj regulatorni element vezuje KLF1 transkripcioni faktor.
8. Izvršena je funkcionalna analiza VNTR regiona koji se nalazi u 3' kraju gena *PAH*. U ekspresionim esejima je pokazano da VNTR region, nezavisno od tipa ponovaka, predstavlja novi *cis*-regulatorni element, koji dovodi do smanjenja intenziteta transkripcije. Osim toga, u EMSA *supershift* esejima je pokazano da tip ponovka koji je najčešći kod pacijenata sa PKU u Srbiji, VNTR3, vezuje C/EBP alpha transkripcioni faktor.
9. Urađena je analiza povezanosti varijante m.10398A>G u mitohondrijskom *MT-ND3* genu sa kognitivnim fenotipom pacijenata sa PKU. Najpre je primećeno da alel m.10398A, u odnosu na m.10398G, ima znatno višu učestalost, kako u kontrolnoj grupi, tako i u svim grupama pacijenata. Kada je potom analizirana povezanost između vrednosti IQ pacijenata i prisustva m.10398A, nije pronađena statistički značajna razlika u srednjoj vrednosti IQ između nosilaca m.10398A i m.10398G.

10. Kompletna genomska sekvenca 10 nelečenih PKU pacijenata (iz 6 porodica) sa normalnim kognitivnim razvojem je analizirana metodom sekvenciranja nove generacije, pri čemu su se, nakon ekstenzivne bioinformatičke obrade, kao potencijalni geni modifikatori PKU kognitivnog fenotipa izdvojili *SHANK* geni. Kod 4 od 6 analiziranih porodica su u nekom od 3 *SHANK* gena (*SHANK1*, *SHANK2* ili *SHANK3*) identifikovane varijante (ukupno 6 varijanti). Za *SHANK* proteine koji nose identifikovane varijante je *in silico* analizom pokazano da zadobijaju nove povoljne karakteristike, te mogu imati protektivni modifikatorski efekat na kognitivni razvoj pacijenata sa PKU.

7. LITERATURA

- Aguado C, Pérez B, Ugarte M, Desviat LR. Analysis of the effect of tetrahydrobiopterin on PAH gene expression in hepatoma cells. *FEBS Lett.* 2006; 580(7): 1697-701.
- Andersen OA, Flatmark T, Hough E. 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.* 2001; 314: 279-291.
- Andersen OA, Flatmark T, Hough E. 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.* 2002; 320: 1095-1108.
- Anjema K, van Rijn M, Hofstede FC, Bosch AM, Hollak CE, Rubio-Gozalbo E, de Vries MC, Janssen MC, Boelen CC, Burgerhof JG, Blau N, Heiner-Fokkema MR, van Spronsen FJ. Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria: prediction with the 48-hour loading test and genotype. *Orphanet J Rare Dis.* 2013; 8:103.
- Arkwright PD, Laurie S, Super M, Pravica V, Schwarz MJ, Webb AK, Hutchinson IV. TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 2000; 55(6): 459-62.
- Bauman ML, Kemper TL. Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol.* 1982; 58: 55-63.
- Bercovich D, Elimelech A, Zlotogora J, Korem S, Yardeni T, Gal N, Goldstein N, Vilensky B, Segev R, Avraham S, Loewenthal R, Schwartz G, Anikster Y. Genotype-phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. *J Hum Genet.* 2008; 53(5): 407-18.
- Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, Endris V, Roberts W, Szatmari P, Pinto D, Bonin M, Riess A, Engels H, Sprengel R, Scherer SW, Rappold GA. Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat Genet.* 2010; 42(6): 489-91.
- Bieker JJ. Probing the onset and regulation of erythroid cell-specific gene expression. *Mt Sinai J Med.* 2005; 72(5): 333-8.
- Bik-Multanowski M, Kaluzny L, Mozrzymas R, Oltarzewski M, Starostecka E, Lange A, Didycz B, Gizewska M, Ulewicz-Filipowicz J, Chrobot A, Mikoluc B, Szymczakiewicz-Multanowska A, Cichy W, Pietrzyk JJ. Molecular genetics of PKU in Poland and potential impact of mutations on BH4 responsiveness. *Acta Biochim Pol.* 2013; 60(4): 613-6.
- Bik-Multanowski M, Pietrzyk JJ. LAT1 gene variants--potential factors influencing the clinical course of phenylketonuria. *J Inher Metab Dis.* 2006; 29(5): 684.

- Bik-Multanowski M, Pietrzyk JJ. Single exon deletions in the PAH gene in Polish PKU-patients. *Mol Genet Metab.* 2008; 94(2): 267.
- Blackman SM, Hsu S, Ritter SE, Naughton KM, Wright FA, Drumm ML, Knowles MR, Cutting GR. A susceptibility gene for type 2 diabetes confers substantial risk for diabetes complicating cystic fibrosis. *Diabetologia.* 2009; 52(9): 1858-65.
- Blau N, Thony B, Cotton GH, Hyland K. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: Scriver AL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill; 2001: 1725–1776.
- Blau N, Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2004; 82: 101–111.
- Blau N, Bélanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, Trefz FK, van Spronsen FJ. Optimizing the use of sapropterin (BH(4)) in the management of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2009; 96(4): 158-63.
- Blau N, Curtius HC, Kuster T, Matasovic A, Schoedon G, Dhondt JL, Guibaud P, Giudici T, Blaskovics M. Primapterinuria: a new variant of atypical phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 1989; 12 Suppl 2:335-8.
- Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED. ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem.* 2002; 81(5): 903-10.
- Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, Gutierrez L, Grech G, Fanis P, Phylactides M, Verkerk AJ, van der Spek PJ, Scerri CA, Cassar W, Galdies R, van Ijcken W, Özgür Z, Gillemans N, Hou J, Grosveld FG, von Lindern M, Felice AE, Patrinos GP, Philipson S. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet.* 2010; 42: 801–805.
- Boshart M, Klüppel M, Schmidt A, Schütz G, Luckow B. Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene.* 1992; 110(1): 129-30.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248–254.
- Brasil S, Viecelli HM, Meili D, Rassi A, Desviat LR, Pérez B, Ugarte M, Thöny B. Pseudoexon exclusion by antisense therapy in 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Hum Mutat.* 2011; 32(9): 1019-27.
- Brookes KJ. The VNTR in complex disorders: the forgotten polymorphisms? A functional way forward? *Genomics.* 2013; 101(5): 273-81.

- Bürgisser DM, Thöny B, Redweik U, Hunziker P, Heizmann CW, Blau N. Expression and characterization of recombinant human and rat liver 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. Modified cysteine residues inhibit the enzyme activity. *Eur J Biochem.* 1994; 219(1-2): 497-502.
- Chen X, Bieker JJ. Unanticipated repression function linked to erythroid Krüppel-like factor. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(9): 3118-25.
- Choi TB, Pardridge WM. Phenylalanine transport at the human blood-brain barrier. Studies with isolated human brain capillaries. *J Biol Chem.* 1986; 261(14): 6536-41.
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972; 69(8): 2110-4.
- Couce ML, Bóveda MD, Fernández-Marmiesse A, Mirás A, Pérez B, Desviat LR, Fraga JM. Molecular epidemiology and BH4-responsiveness in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency from Galicia region of Spain. *Gene.* 2013; 521(1): 100-4.
- Daniele A, Scala I, Cardillo G, Pennino C, Ungaro C, Sibilio M, Parenti G, Esposito L, Zagari A, Andria G, Salvatore F. Functional and structural characterization of novel mutations and genotype-phenotype correlation in 51 phenylalanine hydroxylase deficient families from Southern Italy. *FEBS J.* 2009; 276(7): 2048-59.
- De Groot MJ, Hoeksma M, Blau N, Reijngoud DJ, van Spronsen FJ. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. *Mol Genet Metab.* 2010; 99 Suppl 1: S86-9.
- Desviat LR, Pérez B, Bèlanger-Quintana A, Castro M, Aguado C, Sánchez A, García MJ, Martínez-Pardo M, Ugarte M. Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. *Mol Genet Metab.* 2004; 83(1-2): 157-62.
- Desviat LR, Pérez B, Ugarte M. Identification of exonic deletions in the PAH gene causing phenylketonuria by MLPA analysis. *Clin Chim Acta.* 2006; 373(1-2): 164-7.
- DiLella AG, Kwok SC, Ledley FD, Marvit J, Woo SL. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry.* 1986; 25(4): 743-9.
- Dipple KM, McCabe ERB. Phenotypes of patients with “simple” mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers and system dynamics. *Am J Hum Genet.* 2000; 66: 1729-1735.
- Djordjevic M, Klaassen K, Sarajlija A, Tosic N, Zukic B, Kecman B, Ugrin M, Spasovski V, Pavlovic S, Stojiljkovic M. Molecular Genetics and Genotype-Based Estimation of BH4-Responsiveness in Serbian PKU Patients: Spotlight on Phenotypic Implications of p.L48S. *JIMD Rep* 2013; 9: 49-58.

- Døskeland AP, Flatmark T. Recombinant human phenylalanine hydroxylase is a substrate for the ubiquitin-conjugating enzyme system. *Biochem J.* 1996; 319(3): 941-5.
- Døskeland AP, Martinez A, Knappskog PM, Flatmark T. Phosphorylation of recombinant human phenylalanine hydroxylase: effect on catalytic activity, substrate activation and protection against non-specific cleavage of the fusion protein by restriction protease. *Biochem J.* 1996; 313(2): 409-14.
- Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, Halpern AL, Burns NL, Kermani BG, Carnevali P, Nazarenko I, Nilsen GB, Yeung G, Dahl F, Fernandez A, Staker B, Pant KP, Baccash J, Borchering AP, Brownley A, Cedeno R, Chen L, Chernikoff D, Cheung A, Chirita R, Curson B, Ebert JC, Hacker CR, Hartlage R, Hauser B, Huang S, Jiang Y, Karpinchyk V, Koenig M, Kong C, Landers T, Le C, Liu J, McBride CE, Morenzoni M, Morey RE, Mutch K, Perazich H, Perry K, Peters BA, Peterson J, Pethiyagoda CL, Pothuraju K, Richter C, Rosenbaum AM, Roy S, Shafto J, Sharanovich U, Shannon KW, Sheppy CG, Sun M, Thakuria JV, Tran A, Vu D, Zaranek AW, Wu X, Drmanac S, Oliphant AR, Banyai WC, Martin B, Ballinger DG, Church GM, Reid CA. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science.* 2010; 327(5961): 78-81.
- Dudsek A, Röschinger W, Muntau AC, Seidel J, Leupold D, Thöny B, Blau N. Molecular analysis and long-term follow-up of patients with different forms of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Eur J Pediatr.* 2001; 160(5): 267-76.
- Đorđević M. Korelacija između genotipa i fenotipa bolesnika sa hiperfenilalaninemijom na teritoriji Srbije (doktorska disertacija). Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2013.
- Eisensmith RC, Goltsov AA, O'Neill C, Tyfield LA, Schwartz EI, Kuzmin AI, Baranovskaya SS, Tsukerman GL, Treacy E, Scriver CR, et al. Recurrence of the R408W mutation in the phenylalanine hydroxylase locus in Europeans. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(1): 278-86.
- Eisensmith RC, Goltsov AA, Woo SL. A simple, rapid, and highly informative PCR-based procedure for prenatal diagnosis and carrier screening of phenylketonuria. *Prenat Diagn.* 1994; 14(12): 1113-8.
- Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 1999; 68(2): 103-25.
- Erlandsen H, Fusetti F, Martinez A, Hough E, Flatmark T, Stevens RC. Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat Struct Biol.* 1997; 4(12): 995-1000.
- Erlandsen H, Bjørge E, Flatmark T, Stevens RC. Crystal structure and site-specific mutagenesis of pterin-bound human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry.* 2000; 39(9): 2208-17.

- Erlandsen H, Pey AL, Gámez A, Pérez B, Desviat LR, Aguado C, Koch R, Surendran S, Tying S, Matalon R, Scriver CR, Ugarte M, Martínez A, Stevens RC. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(48): 16903-8.
- Fernandes CG, Leipnitz G, Seminotti B, Amaral AU, Zanatta A, Vargas CR, Dutra Filho CS, Wajner M. Experimental evidence that phenylalanine provokes oxidative stress in hippocampus and cerebral cortex of developing rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30(2): 317-26.
- Fisher DB, Kirkwood R, Kaufman S. Rat liver phenylalanine hydroxylase, an iron enzyme. *J Biol Chem*. 1972; 247(16): 5161-7.
- Flatmark T, Knappskog PM, Bjørge E, Martinez A. Molecular characterization of disease related mutant forms of human phenylalanine hydroxylase and tyrosine hydroxylase. In: Pfliederer W, Rokos H, editors. *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*. London: Blackwell Science; 1997: 503–508.
- Flatmark T, Stevens RC. Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms. *Chem Rev*. 1999; 99(8): 2137-2160.
- Fried M, Crothers DM. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1981; 9(23): 6505-25.
- Friedman AD, Landschulz WH, McKnight SL. CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells. *Genes Dev*. 1989; 3(9): 1314-22.
- Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem*. 1998; 273(27): 16962-7.
- Gámez A, Pérez B, Ugarte M, Desviat LR. Expression analysis of phenylketonuria mutations. Effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *J Biol Chem*. 2000; 275(38): 29737-42.
- Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Høiby N, Schwartz M, Koch C. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 1999; 104(4): 431-7.
- Gauthier J, Champagne N, Lafrenière RG, Xiong L, Spiegelman D, Brustein E, Lapointe M, Peng H, Côté M, Noreau A, Hamdan FF, Addington AM, Rapoport JL, Delisi LE, Krebs MO, Joobar R, Fathalli F, Mouaffak F, Haghghi AP, Néri C, Dubé MP, Samuels ME, Marineau C, Stone EA, Awadalla P, Barker PA, Carbonetto S, Drapeau P, Rouleau GA; S2D Team. De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(17): 7863-8.

- Gazit V, Ben-Abraham R, Pick CG, Katz Y. beta-Phenylpyruvate induces long-term neurobehavioral damage and brain necrosis in neonatal mice. *Behav Brain Res.* 2003; 143(1): 1-5.
- Giannattasio S, Dianzani I, Lattanzio P, Spada M, Romano V, Cali F, Andria G, Ponzone A, Marra E, Piazza A. Genetic heterogeneity in five Italian regions: analysis of PAH mutations and minihaplotypes. *Hum Hered.* 2001; 52(3): 154-9.
- Glushakov AV, Dennis DM, Morey TE, Sumners C, Cucchiara RF, Seubert CN, Martynyuk AE. Specific inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function in rat hippocampal neurons by L-phenylalanine at concentrations observed during phenylketonuria. *Mol Psychiatry.* 2002; 7(4): 359-67.
- Glushakov AV, Dennis DM, Sumners C, Seubert CN, Martynyuk AE. L-phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses. *J Neurosci Res.* 2003; 72(1): 116-24.
- Glushakov AV, Glushakova O, Varshney M, Bajpai LK, Sumners C, Laipis PJ, Embury JE, Baker SP, Otero DH, Dennis DM, Seubert CN, Martynyuk AE. Long-term changes in glutamatergic synaptic transmission in phenylketonuria. *Brain.* 2005; 128(2): 300-7.
- Goltsov AA et al. Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Am J Hum Genet.* 1992; 51: 627-636.
- Gregersen N, Bross P, Andrese BS, Pedersen CB, Corydon TJ, Bolund L. The role of chaperone-assisted folding and quality control in inborn errors of metabolism: protein folding disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2001; 24(2): 189-212.
- Guilmatre A, Huguet G, Delorme R, Bourgeron T. The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders. *Dev Neurobiol.* 2014 Feb;74(2):113-22. doi: 10.1002/dneu.22128. Epub 2013 Oct 7.
- Guldborg P et al. 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* 1998 63: 71-79.
- Guldborg P, Henriksen KF, Sipilä I, Güttler F, de la Chapelle A. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. *J Med Genet.* 1995; 32(12): 976-8.
- Guldborg P, Henriksen KF, Güttler F. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics.* 1993; 17(1): 141-6.
- Güttler F. Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1980; 280: 1-80.
- Güttler F, Guldborg P. Mutation analysis anticipates dietary requirements in phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 2000; 159 Suppl 2: S150-3.

- Guzmán C, Benet M, Pisonero-Vaquero S, Moya M, García-Mediavilla MV, Martínez-Chantar ML, González-Gallego J, Castell JV, Sánchez-Campos S, Jover R. The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPAR α ; and repressed by C/EBP α : Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1831(4): 803-18.
- Haldane J. The relative importance of principal and modifying genes in determining some human diseases. *Journal of Genetics*. 1941; 41:149–157.
- Hamamoto R, Saloura V, Nakamura Y. Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2015; 15(2): 110-24.
- Handin R, Lux S, Stossel T. *Blood: Principles and Practice of Hematology* (2nd ed.). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2003: 150.
- Hargreaves KM, Pardridge WM. Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier. *J Biol Chem*. 1988; 263(36): 19392-7.
- Heintz C, Cotton RG, Blau N. Tetrahydrobiopterin, its mode of action on phenylalanine hydroxylase, and importance of genotypes for pharmacological therapy of phenylketonuria. *Hum Mutat*. 2013; 34(7): 927-36.
- Hevel JM, Stewart JA, Gross KL, Ayling JE. Can the DCoH α isozyme compensate in patients with 4a-hydroxy-tetrahydrobiopterin dehydratase/DCoH deficiency? *Mol Genet Metab*. 2006; 88(1): 38-46.
- Hörster F, Schwab MA, Sauer SW, Pietz J, Hoffmann GF, Okun JG, Kölker S, Kins S. Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. *Pediatr Res*. 2006; 59(1): 544-8.
- Huttenlocher PR. The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *Eur J Pediatr*. 2000; 159 Suppl 2: S102-6.
- Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, Nomura Y, Endo K, Tanaka H, Tsuji S, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet*. 1994; 8(3): 236-42.
- Ichinose H, Ohye T, Matsuda Y, Hori T, Blau N, Burlina A, Rouse B, Matalon R, Fujita K, Nagatsu T. Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes. Mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency. *J Biol Chem*. 1995; 270(17): 10062-71.
- Jennings IG, Cotton RG, Kobe B. Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids in identifying genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8(9): 683-96.
- Jennings IG, Teh T, Kobe B. Essential role of the N-terminal autoregulatory sequence in the regulation of phenylalanine hydroxylase. *FEBS Lett*. 2001; 488(3): 196-200.

- Kalaydjieva L, Dworniczak B, Kremensky I, Radeva B, Horst J. Population genetics of phenylketonuria in Bulgaria. *Dev Brain Dysfunct.* 1993; 6: 39–54.
- Kamkar M, Saadat M, Saadat I, et al. Report of VNTR with 13 repeats linked to phenylalanine hydroxylase locus in unaffected members of two PKU families. *Iran Biomed J.* 2003;7:89–90.
- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto Ki, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem.* 1998; 273(37): 23629-32.
- Karačić I, Meili D, Sarnavka V, Heintz C, Thöny B, Ramadza DP, Fumić K, Mardesić D, Barić I, Blau N. Genotype-predicted tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness and molecular genetics in Croatian patients with phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency. *Mol Genet Metab.* 2009; 97(3): 165-71.
- Karve TM, Cheema AK. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *J Amino Acids.* 2011; 2011:207691.
- Kasnauskienė J, Giannattasio S, Lattanzio P, Cimbalistienė L, Kucinskas V. The molecular basis of phenylketonuria in Lithuania. *Hum Mutat.* 2003; 21(4): 398.
- Kato T, Kunugi H, Nanko S, Kato N. Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2001; 62: 151–64.
- Kaufman S. The structure of phenylalanine hydroxylation cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1963; 50: 1085-93.
- Kaufman S, Bridgers WF, Eisenberg F, Friedman S. The source of oxygen in the phenylalanine hydroxylase and the dopamine- β -hydroxylase catalyzed reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1962; 9: 497-502.
- Kaufman S, Holtzman NA, Milstien S, Butler LJ, Krumholz A. Phenylketonuria due to a deficiency of dihydropteridine reductase. *N Engl J Med.* 1975; 293(16): 785-90.
- Kazuno AA, Munakata K, Nagai T, Shimosono S, Tanaka M, Yoneda M, Kato N, Miyawaki A, Kato T. Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. *PLoS Genet.* 2006; 2(8): e128.
- Kienzle Hagen ME, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1586(3): 344-52.
- Kluge C, Brecevic L, Heizmann CW, Blau N, Thöny B. Chromosomal localization, genomic structure and characterization of the human gene and a retropseudogene for 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase. *Eur J Biochem.* 1996; 240(2): 477-84.

- Kobe B, Jennings IG, House CM, Michell BJ, Goodwill KE, Santarsiero BD, Stevens RC, Cotton RG, Kemp BE. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat Struct Biol.* 1999; 6(5): 442-8.
- Koch R, Moseley KD, Yano S, Nelson M Jr, Moats RA. Large neutral amino acid therapy and phenylketonuria: a promising approach to treatment. *Mol Genet Metab.* 2003; 79: 110–113.
- Konecki DS, Schlotter M, Trefz FK, Lichter-Konecki U. The identification of two mis-sense mutations at the PAH gene locus in a Turkish patient with phenylketonuria. *Hum Genet.* 1991; 87(4): 389-93.
- Konecki DS, Wang Y, Trefz FK, Lichter-Konecki U, Woo SL. Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry.* 1992; 31(35): 8363-8.
- Kozak L, Hrabincova E, Kintr J, Horky O, Zapletalova P, Blahakova I, Mejstrik P, Prochazkova D. 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.* 2006; 89(4): 300-9.
- Kulawiec M, Owens KM, Singh KK. mtDNA G10398A variant in African-American women with breast cancer provides resistance to apoptosis and promotes metastasis in mice. *J Hum Genet.* 2009; 54(11): 647-54.
- Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y, Narisawa K. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr.* 1999; 135(3): 375-8.
- Leandro J, Nascimento C, de Almeida IT, Leandro P. Co-expression of different subunits of human phenylalanine hydroxylase: evidence of negative interallelic complementation. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762(5): 544-50.
- Leandro J, Leandro P, Flatmark T. Heterotetrameric forms of human phenylalanine hydroxylase: co-expression of wild-type and mutant forms in a bicistronic system. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812(5): 602-12.
- Ledley FD, Grenett HE, DiLella AG, Kwok SC, Woo SL. Gene transfer and expression of human phenylalanine hydroxylase. *Science.* 1985; 228(4695):77-9.
- Ledley FD, Grenett HE, Woo SL. Biochemical characterization of recombinant human phenylalanine hydroxylase produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1987; 262(5): 2228-33.
- Lei XD, Kaufman S. 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 U S A.* 1998; 95(4): 1500-4.
- Leuzzi V, Carducci CA, Carducci CL, Pozzessere S, Burlina A, Cerone R, Concolino D, Donati MA, Fiori L, Meli C, Ponzzone A, Porta F, Strisciunglio P,

- Antonozzi I, Blau N. Phenotypic variability, neurological outcome and genetics background of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Clin Genet* 2010; 77(3): 249-57.
- Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki DS. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab.* 1999; 67(4): 308-16.
 - Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, Woo SL. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82(18): 6221-5.
 - Luckow B, Schütz G. CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 1987; 15(13): 5490.
 - Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
 - Martinez A, Knappskog PM, Olafsdottir S, Døskeland AP, Eiken HG, Svebak RM, Bozzini M, Apold J, Flatmark T. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. *Biochem J.* 1995; 306 (2): 589-97.
 - Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006; 7: 29-59.
 - Matalon R, Koch R, Michals-Matalon K, Moseley K, Surendran S, Tyring S, Erlandsen H, Gamez A, Stevens RC, Romstad A, Møller LB, Guttler F. Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med.* 2004; 6(1): 27-32.
 - Matalon R, Michals-Matalon K, Koch R, Grady J, Tyring S, Stevens RC. Response of patients with phenylketonuria in the US to tetrahydrobiopterin. *Mol Genet Metab.* 2005; 86 Suppl 1: S17-21.
 - McMahon FJ, Chen YS, Patel S, Kokoszka J, Brown MD, Torroni A, DePaulo JR, Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence diversity in bipolar affective disorder. *Am J Psychiatry.* 2000; 157(7): 1058-64.
 - Miller IJ, Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol.* 1993; 13(5): 2776-86.
 - Möller HE, Weglage J, Wiedermann D, Ullrich K. Blood-brain barrier phenylalanine transport and individual vulnerability in phenylketonuria. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998; 18(11): 1184-91.
 - Møller LB, Paulsen M, Koch R, Moats R, Guldborg P, Guttler F. Inter-individual variation in brain phenylalanine concentration in patients with PKU is

- not caused by genetic variation in the 4F2hc/LAT1 complex. *Mol Genet Metab.* 2005; 86 Suppl 1: S119-23.
- Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron.* 1999; 23(3): 569-82.
 - Nielsen JB, Nielsen KE, Güttler F. Tetrahydrobiopterin responsiveness after extended loading test of 12 Danish PKU patients with the Y414C mutation. *J Inher Metab Dis.* 2010; 33(1): 9-16.
 - Opladen T, Hoffmann G, Hörster F, Hinz AB, Neidhardt K, Klein C, Wolf N. Clinical and biochemical characterization of patients with early infantile onset of autosomal recessive GTP cyclohydrolase I deficiency without hyperphenylalaninemia. *Mov Disord.* 2011; 26(1): 157-61.
 - Opladen T, Hoffmann GF, Blau N. An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with hyperphenylalaninaemia. *J Inher Metab Dis.* 2012; 35(6): 963-73.
 - Oppliger T, Thöny B, Kluge C, Matasovic A, Heizmann CW, Ponzzone A, Spada M, Blau N. Identification of mutations causing 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency in four Italian families. *Hum Mutat.* 1997; 10(1): 25-35.
 - Orphanides G, Reinberg D. A unified theory of gene expression. *Cell.* 2002; 108(4): 439-51.
 - Özalp I, Coskun T, Tokol S, Demircin G, Mönch E. Inherited metabolic disorders in Turkey. *J Inher Metab Dis* 1990; 13: 732 – 8.
 - Pérez B, Desviat LR, Gómez-Puertas P, Martínez A, Stevens RC, Ugarte M. Kinetic and stability analysis of PKU mutations identified in BH4-responsive patients. *Mol Genet Metab.* 2005; 86 Suppl 1: S11-6.
 - Pérez B, Nevado J, Lapunzina P, Gallego L, Pérez-Cerdá C, Merinero B, Ugarte M, Desviat LR. Segmental uniparental disomy leading to homozygosity for a pathogenic mutation in three recessive metabolic diseases. *Mol Genet Metab.* 2012; 105(2): 270-1.
 - Pey AL, Desviat LR, Gámez A, Ugarte M, Pérez B. Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat.* 2003; 21(4): 370-8.
 - Pey AL, Pérez B, Desviat LR, Martínez MA, Aguado C, Erlandsen H, Gámez A, Stevens RC, Thórolfsson M, Ugarte M, Martínez A. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum Mutat.* 2004; 24(5): 388-99.
 - Pey AL, Stricher F, Serrano L, Martinez A. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *Am J Hum Genet.* 2007; 81(5): 1006-24.

- Phillips MD, McGraw P, Lowe MJ, Mathews VP, Hainline BE. Diffusion-weighted imaging of white matter abnormalities in patients with phenylketonuria. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2001; 22(8): 1583-6.
- Pollock RJ, Kaufman S. Dihydropteridine reductase may function in tetrahydrofolate metabolism. *J Neurochem.* 1978; 31(1): 115-23.
- Primrose DA. Phenylketonuria with normal intelligence. *J Ment Defic Res.* 1983; 27 (4): 239-46.
- Pronina N, Giannattasio S, Lattanzio P, Lugovska R, Vevere P, Kornejeva A. The molecular basis of phenylketonuria in Latvia. *Hum Mutat.* 2003; 21(4): 398-9.
- Puglisi-Allegra S, Cabib S, Pascucci T, Ventura R, Cali F, Romano V. Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport.* 2000; 11(6): 1361-4.
- Quirk ME, Dobrowolski SF, Nelson BE, Coffee B, Singh RH. Utility of phenylalanine hydroxylase genotype for tetrahydrobiopterin responsiveness classification in patients with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2012; 107(1-2): 31-6.
- Rähä NC. Phenylalanine hydroxylase in human liver during development. *Pediatr Res.* 1973; 7(1): 1-4.
- Ramus SJ, Forrest SM, Pitt DD, Cotton RG. Genotype and intellectual phenotype in untreated phenylketonuria patients. *Pediatr Res.* 1999; 45(4): 474-81.
- Réblová K, Hrubá Z, Procházková D, Pazdírková R, Pouchlá S, Zeman J, Fajkusová L. Hyperphenylalaninemia in the Czech Republic: genotype-phenotype correlations and in silico analysis of novel missense mutations. *Clin Chim Acta.* 2013; 419: 1-10.
- Ribas GS, Sitta A, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence? *Cell Mol Neurobiol.* 2011; 31(5): 653-62.
- Romstad A, Kalkanoglu HS, Coşkun T, Demirkol M, Tokatli A, Dursun A, Baykal T, Ozalp I, Guldberg P, Güttler F. Molecular analysis of 16 Turkish families with DHPR deficiency using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum Genet.* 2000; 107(6): 546-53.
- Rose RB, Pullen KE, Bayle JH, Crabtree GR, Alber T. Biochemical and structural basis for partially redundant enzymatic and transcriptional functions of DCoH and DCoH2. *Biochemistry.* 2004; 43(23): 7345-55.
- Salter M, Knowles RG, Pogson CI. Transport of the aromatic amino acids into isolated rat liver cells. Properties of uptake by two distinct systems. *Biochem J.* 1986; 233(2): 499-506.
- Santos LL, Fonseca CG, Starling AL, Januário JN, Aguiar MJ, Peixoto MG, Carvalho MR. Variations in genotype-phenotype correlations in phenylketonuria patients. *Genet Mol Res.* 2010; 9(1): 1-8.

- Sarkissian CN, Gámez A, Scriver CR. What we know that could influence future treatment of phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2009; 32(1): 3-9.
- Sarkissian CN, Gamez A, Scott P, Dauvillier J, Dorenbaum A, Scriver CR, Stevens RC. Chaperone-like therapy with tetrahydrobiopterin in clinical trials for phenylketonuria: is genotype a predictor of response? *JIMD Rep.* 2012; 5: 59-70.
- Sato D, Lionel AC, Leblond CS, Prasad A, Pinto D, Walker S, O'Connor I, Russell C, Drmic IE, Hamdan FF, Michaud JL, Endris V, Roeth R, Delorme R, Huguet G, Leboyer M, Rastam M, Gillberg C, Lathrop M, Stavropoulos DJ, Anagnostou E, Weksberg R, Fombonne E, Zwaigenbaum L, Fernandez BA, Roberts W, Rappold GA, Marshall CR, Bourgeron T, Szatmari P, Scherer SW. SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet.* 2012; 90(5): 879-87.
- Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(15): 6419.
- Schrem H, Klempnauer J, Borlak J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. *Pharmacol Rev.* 2004; 56(2): 291-330.
- Scriver CR. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat.* 2007; 28(9): 831-45.
- Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple. *Trends Genet.* 1999; 15: 267-272.
- Scriver CR, Levy H, Donlon J. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Childs B, Sly WS, editors. *The online metabolic and molecular basis of inherited disease.* New York: McGraw-Hill; 2008: 1 – 150.
- Segawa M, Hosaka A, Miyagawa F, Nomura Y, Imai H. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Adv Neurol.* 1976; 14: 215-33.
- Shannon JE, Macy ML. Freezing, Storage, and Recovery of Cell Stocks. In: Kruse PF, Patterson MK, editors. *Tissue Culture: Methods and Applications.* Academic Press, New York. 1973: 712–718.
- Shulkin BL, Betz AL, Koeppe RA, Agranoff BW. Inhibition of neutral amino acid transport across the human blood-brain barrier by phenylalanine. *J Neurochem.* 1995; 64(3): 1252-7.
- Siatecka M, Xue L, Bieker JJ. Sumoylation of EKLF promotes transcriptional repression and is involved in inhibition of megakaryopoiesis. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(24): 8547-60.

- Simon KR, Dos Santos RM, Scaini G, Leffa DD, Damiani AP, Furlanetto CB, Machado JL, Cararo JH, Macan TP, Streck EL, Ferreira GC, Andrade VM, Schuck PF. DNA damage induced by phenylalanine and its analogue p-chlorophenylalanine in blood and brain of rats subjected to a model of hyperphenylalaninemia. *Biochem Cell Biol.* 2013; 91(5): 319-24.
- Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak AG, Wajner M, Coelho DM, Llesuy S, Belló-Klein A, Giugliani R, Deon M, Vargas CR. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1740(1): 68-73.
- Smith CB, Kang J. Cerebral protein synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(20): 11014-9.
- Smith I, Clayton BE, Wolff OH. New variant of phenylketonuria with progressive neurological illness unresponsive to phenylalanine restriction. *Lancet.* 1975; 1(7916): 1108-11.
- Southwood CM, Downs KM, Bieker JJ. Erythroid Krüppel-like factor exhibits an early and sequentially localized pattern of expression during mammalian erythroid ontogeny. *Dev Dyn.* 1996; 206(3): 248-59.
- Spaapen LJ, Bakker JA, Velter C, Loots W, Rubio-Gozalbo ME, Forget PP, Dorland L, De Koning TJ, Poll-The BT, Ploos van Amstel HK, Bekhof J, Blau N, Duran M. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Dutch neonates. *J Inherit Metab Dis.* 2001; 24(3): 352-8.
- Spandidos DA, Holmes L. Transcriptional enhancer activity in the variable tandem repeat DNA sequence downstream of the human Ha-ras 1 gene. *FEBS Lett.* 1987; 218(1): 41-6.
- State MW. Another piece of the autism puzzle. *Nat Genet.* 2010; 42(6): 478-9.
- Sterl E, Paul K, Paschke E, Zschocke J, Brunner-Krainz M, Windisch E, Konstantopoulou V, Möslinger D, Karall D, Scholl-Bürgi S, Sperl W, Lagler F, Plecko B. Prevalence of tetrahydrobiopterine (BH4)-responsive alleles among Austrian patients with PAH deficiency: comprehensive results from molecular analysis in 147 patients. *J Inherit Metab Dis.* 2013; 36(1): 7-13.
- Stojiljkovic M, Jovanovic J, Djordjevic M, Grkovic S, Cvorkov Drazic M, Petrucev B, Tosic N, Karan Djurasevic T, Stojanov L, Pavlovic S. Molecular and phenotypic characteristics of patients with phenylketonuria in Serbia and Montenegro. *Clin Genet.* 2006; 70(2): 151-5.
- Stojiljkovic M, Stevanovic A, Djordjevic M, Petrucev B, Tosic N, Karan-Djurasevic T, Aveic S, Radmilovic M, Pavlovic S. Mutations in the PAH gene: a tool for population genetic study. *Arch Biol Sci.* 2007; 59(3): 161–167.
- Stojiljkovic M, Zukic B, Tosic N, Karan-Djurasevic T, Spasovski V, Nikcevic G, Pavlovic S. Novel transcriptional regulatory element in the phenylalanine hydroxylase gene intron 8. *Mol Genet Metab.* 2010; 101(1): 81-3.

- Surtees R, Blau N. The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 2000; 159 Suppl 2: S109-13.
- Thöny B, Blau N. Mutations in the GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase genes. *Hum Mutat.* 1997;10(1):11-20.
- Thöny B, Heizmann CW, Mattei MG. Chromosomal location of two human genes encoding tetrahydrobiopterin-metabolizing enzymes: 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase maps to 11q22.3-q23.3, and pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase maps to 10q22. *Genomics.* 1994; 19(2): 365-8.
- Thöny B, Heizmann CW, Mattei MG. Human GTP-cyclohydrolase I gene and sepiapterin reductase gene map to region 14q21-q22 and 2p14-p12, respectively, by in situ hybridization. *Genomics.* 1995; 26(1): 168-70.
- Tighe O, Dunican D, O'Neill C, Bertorelle G, Beattie D, Graham C, Zschocke J, Cali F, Romano V, Hrabincova E, Kozak L, Nechyporenko M, Livshits L, Guldberg P, Jurkowska M, Zekanowski C, Perez B, Desviat LR, Ugarte M, Kucinkas V, Knappskog P, Treacy E, Naughten E, Tyfield L, Byck S, Scriver CR, Mayne PD, Croke DT. Genetic diversity within the R408W phenylketonuria mutation lineages in Europe. *Hum Mutat.* 2003; 21(4): 387-93.
- Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Chen YS, Lavergne L, Wallace DC. mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 760–76.
- Trefz F, Schmidt H, Bartholome K, Mahle M, Matthis P, Pecht G. Differential diagnosis and significance of various hyperphenylalaninemias. In: Bickel H, Wachtel U, editors. *Inherited Diseases of Amino Acid Metabolism.* Georg Thieme Verlag, New York; 1985: 86–100.
- Trefz FK, Scheible D, Götz H, Frauendienst-Egger G. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2009; 32(1): 22-6.
- Trujillano D, Perez B, González J, Tornador C, Navarrete R, Escaramis G, Ossowski S, Armengol L, Cornejo V, Desviat LR, Ugarte M, Estivill X. Accurate molecular diagnosis of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-deficient hyperphenylalaninemias using high-throughput targeted sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22(4): 528-34.
- Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, Usala G, Busonero F, Maschio A, Albai G, Piras MG, Sestu N, Lai S, Dei M, Mulas A, Crisponi L, Naitza S, Asunis I, Deiana M, Nagaraja R, Perseu L, Satta S, Cipollina MD, Sollaino C, Moi P, Hirschhorn JN, Orkin SH, Abecasis GR, Schlessinger D, Cao A. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 1620–1625.

- Van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH Jr, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scott BL, Schmechel DE, Pericak-Vance MA, Vance JM. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(4): 804-11.
- Van Spronsen FJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ. Brain dysfunction in phenylketonuria: is phenylalanine toxicity the only possible cause? *J Inherit Metab Dis.* 2009; 32(1): 46-51.
- Vargas CR, Wajner M, Sitta A. Oxidative stress in phenylketonuric patients. *Mol Genet Metab.* 2011; 104 Suppl: S97-9.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001; 291: 1304–1351.
- Vucurovic K, Landais E, Delahaigue C, Eutrope J, Schneider A, Leroy C, Kabbaj H, Motte J, Gaillard D, Rolland AC, Doco-Fenzy M. Bipolar affective disorder and early dementia onset in a male patient with SHANK3 deletion. *Eur J Med Genet.* 2012; 55(11): 625-9.
- Wang X, Bey AL, Chung L, Krystal AD, Jiang YH. Therapeutic approaches for shankopathies. *Dev Neurobiol.* 2014; 74(2): 123-35.
- Wang Y, DeMayo JL, Hahn TM, Finegold MJ, Konecki DS, Lichter-Konecki U, Woo SL. Tissue- and development-specific expression of the human phenylalanine hydroxylase/chloramphenicol acetyltransferase fusion gene in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1992; 267(21): 15105-10.
- Wang Y, Hahn TM, Tsai SY, Woo SL. Functional characterization of a unique liver gene promoter. *J Biol Chem.* 1994; 269(12): 9137-46.
- Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Jones AO, Scriver CR. Missense mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) can cause accelerated proteolytic turnover of PAH enzyme: a mechanism underlying phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 1999; 22(3): 208-12.
- Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Scriver CR. 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.* 2000; 69(2): 101-10.
- Waters PJ. How PAH gene mutations cause hyper-phenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression. *Hum Mutat.* 2003; 21(4): 357-69.
- Weglage J, Fromm J, van Teeffelen-Heithoff A, Möller HE, Koletzko B, Marquardt T, Rutsch F, Feldmann R. Neurocognitive functioning in adults with phenylketonuria: results of a long term study. *Mol Genet Metab.* 2013; 110 Suppl: S44-8.

- Weglage J, Wiedermann D, Möller H, Ullrich K. Pathogenesis of different clinical outcomes in spite of identical genotypes and comparable blood phenylalanine concentrations in phenylketonurics. *J Inher Metab Dis.* 1998; 21(2): 181-2.
- Werner ER, Blau N, Thöny B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem J.* 2011; 438(3): 397-414.
- Woo SL, Gillam SS, Woolf LI. The isolation and properties of phenylalanine hydroxylase from human liver. *Biochem J.* 1974; 139(3): 741-9.
- Woo SL. Collation of RFLP haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Am J Hum Genet.* 1988; 43(5): 781-3.
- Woo SL, Lidsky AS, Güttler F, Chandra T, Robson KJ. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature.* 1983; 306(5939): 151-5.
- Yarden J, Radojkovic D, De Boeck K, Macek M Jr, Zemkova D, Vavrova V, Vlietinck R, Cassiman JJ, Cuppens H. Polymorphisms in the mannose binding lectin gene affect the cystic fibrosis pulmonary phenotype. *J Med Genet.* 2004; 41(8): 629-33.
- Yarotsky V, Glushakov AV, Summers C, Gravenstein N, Dennis DM, Seubert CN, Martynyuk AE. Differential modulation of glutamatergic transmission by 3,5-dibromo-L-phenylalanine. *Mol Pharmacol.* 2005; 67(5): 1648-54.
- Ye J, Yang Y, Yu W, Zou H, Jiang J, Yang R, Shang S, Gu X. Demographics, diagnosis and treatment of 256 patients with tetrahydrobiopterin deficiency in mainland China: results of a retrospective, multicentre study. *J Inher Metab Dis.* 2013; 36(5): 893-901.
- Zekanowski C, Nowacka M, Senddecka E, Sowik M, Cabalska B, Bal J. Identification of Mutations Causing 6-Pyruvoyl- Tetrahydrobiopterin Synthase Deficiency in Polish Patients With Variant Hyperphenylalaninemia. *Mol Diagn.* 1998; 3(4): 237-239.
- Zhang M, Hsiao K, Su T, Chao H, Chen R, Gu X. Two novel mutations in phenylalanine hydroxylase gene and in vitro expression analysis on mutation Arg252Gln. *Chin Med Sci J.* 1997; 12(1): 22-5.
- Zhang Y, Zhang H, Yuan X, Gu X. Differential effects of phenylalanine on Rac1, Cdc42, and RhoA expression and activity in cultured cortical neurons. *Pediatr Res.* 2007; 62(1): 8-13.
- Zhu T, Ye J, Han L, Qiu W, Zhang H, Liang L, Gu X. Variations in genotype-phenotype correlations in phenylalanine hydroxylase deficiency in Chinese Han population. *Gene.* 2013; 529(1): 80-7.
- Zielenski J, Corey M, Rozmahel R, Markiewicz D, Aznarez I, Casals T, Larriba S, Mercier B, Cutting GR, Kresova A, Macek M Jr, Langfelder-Schwind E, Marshall BC, DeCelle-Germana J, Claustres M, Palacio A, Bal J, Nowakowska A, Ferec C, Estivill X, Durie P, Tsui LC. Detection of a cystic fibrosis modifier

- locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet.* 1999; 22(2): 128-9.
- Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat.* 2003; 21: 345-356.
 - Zukic B, Radmilovic M, Stojiljkovic M, Tomic N, Pourfarzad F, Dokmanovic L, Janic D, Colovic N, Philipsen S, Patrinos GP, Pavlovic S. Functional analysis of the role of the TPMT gene promoter VNTR polymorphism in TPMT gene transcription. *Pharmacogenomics.* 2010; 11(4):547-57.
 - Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, Stevens RC, Thöny B, Blau N. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat.* 2008; 29(1): 167-75.

Elektronske baze podataka:

- www.biopku.org
- www.hgmd.cf.ac.uk
- www.pahdb.mcgill.ca
- www.ncbi.nlm.nih.gov
- www.genecards.org
- www.ensembl.org

BIOGRAFIJA

Kristel Klaassen je rođena 28.02.1984. godine u Amsterdamu, Holandija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 2003/2004. godine, a diplomirala je u aprilu 2010. godine sa prosečnom ocenom 9.63 i diplomskim radom pod nazivom „Funkcionalna analiza osmog introna gena za *PAH* u *K562 in vitro* sistemu“. Za ovaj rad je dobila nagradu „Goran Ljubijankić“ za najbolji diplomski rad iz oblasti molekularne biologije u Srbiji. Doktorske studije je upisala školske 2010/2011. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. Od januara 2011. je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu hematologiju (od 2013. godine Laboratorija za molekularnu biomedicinu), Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Učesnik je na nacionalnom projektu “Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti“ (MNTRS, broj III 41004, 2011-2015), a bila je učesnik i na bilateralnom projektu naučne i tehnološke saradnje između Republike Srbije i Kraljevine Španije „Molekularna osnova organskih acidurija u Srbiji i primena novih terapijskih strategija baziranih na genotipu“ (broj 451-03-02635/2011-14/14, 2012-2014).

Kristel Klaassen je tokom 2011. godine boravila na Centro di Ricerca Matilde Tettamanti, Univerzitet u Milanu-Bicocca, u Monci, Italija, u okviru letnje škole (stipendija Fondazione Cariplo). U toku 2012. i 2014. godine je boravila na Centro de Biologia Molecular “Severo Ochoa”, Autonomni Univerzitet u Madridu, Španija, o okviru bilateralnog projekta sa Španijom.

Kristel Klaassen je do sada objavila 6 radova u časopisima međunarodnog značaja i imala 23 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Кристел Клаассен

број уписа M3001/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај варијанти у кодирајућим и некодирајућим регионима гена узрочника и гена модификатора на фенотип пацијената са хиперфенилаланинемијом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 16.03.2015.

Kristel Klaassen

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Кристел Клаассен

Број уписа M3001/2010

Студијски програм Молекуларна биологија, модул молекуларна биологија
еукариота

Наслов рада Утицај варијанти у кодирајућим и некодирајућим регионима гена
узрочника и гена модификатора на фенотип пацијената са
хиперфенилаланинемијом

Ментор др Маја Стојиљковић, др Соња Павловић

Потписани Кристел Клаассен

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 16.03.2015.

Kristel Klaassen

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај варијанти у кодирајућим и некодирајућим регионима гена узрочника и гена модификатора на фенотип пацијената са хиперфенилаланинемијом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 16.03.2015.

Kristel Klaassen
