

Polimorfizam gena za serotonininski prijenosnik u osoba oboljelih od epilepsije

Prodić, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:435639>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Jelena Prodić

**Polimorfizam gena za serotonininski prijenosnik
u osoba oboljelih od epilepsije**

Diplomski rad

Zagreb, 2011.

ISKAZ

Ovaj diplomski rad, izraden u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Jasminke Štefulj (Institut Ruđer Bošković), predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Jasminke Štefulj.

Zahvaljujem se dr. sc. Jasminki Štefulj na pomoći i korisnim savjetima tijekom eksperimentalnog rada, te pisanja diplomskog rada. Posebno zahvaljujem na strpljivosti, razumijevanju i dragocjenom vremenu koje mi je posvetila.

Zahvaljujem se suvoditeljici prof. dr. sc. Dubravki Hranilović na susretljivosti i razumijevanju, te dr. sc. Tatjani Bordukalo Nikšić na svim savjetima koji su mi pomogli u izvođenju eksperimentalnog dijela. Također, hvala i svima ostalima koji su na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Polimorfizam gena za serotoninski prijenosnik u osoba oboljelih od epilepsije

Jelena Prodić
Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet
Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Serotonin (5-HT) je neurotransmiter s ulogom u brojnim fiziološkim funkcijama, te u etiopatogenezi različitih neuropsihijatrijskih poremećaja. Razna istraživanja otkrila su sposobnost serotonina da utječe na nastanak i tijek epileptičkih napadaja. Serotoninski prijenosnik (5-HTT), transmembranski je protein odgovoran za uklanjanje serotonina iz sinaptičke pukotine, a smatra se glavnim regulatorom 5-HT neurotransmisije. Promotor i drugi intron gena za 5-HTT sadrže funkcionalne polimorfizme koji utječu na efikasnost genske ekspresije. Ovim radom ispitivana je njihova povezanost s epilepsijom temporalnog režnja (TLE). Istraživanjem je obuhvaćena 101 osoba oboljela od TLE-a i 155 zdravih osoba. Usporedbom frekvencija alela i genotipova promotorskog (5-HTTLPR) i intronskog (VNTR-2) polimorfizma gena za 5-HTT, nisu pronađene statistički značajne razlike između promatranih skupina. Dobiveni rezultati upućuju da istraživani polimorfizmi nemaju veliku ulogu u etiopatogenezi TLE-a u hrvatskoj populaciji, no zbog relativno malog broja ispitanika ne može se isključiti njihov mali utjecaj na etiopatogenezu ove kompleksne bolesti.

(37 stranica, 14 slika, 7 tablica, 26 literaturnih navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Centralnoj biblioteci Biološkog odsjeka, Rooseveltov trg 6, Zagreb.

Ključne riječi: asocijacijsko istraživanje / epilepsija temporalnog režnja / polimorfizam / serotonin / serotoninski prijenosnik

Voditelji: dr. sc. Jasminka Štefulj, viša znanstvena suradnica
prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenjivači: dr. sc. Jasminka Štefulj, viša znanstvena suradnica
prof. dr. sc. Dubravka Hranilović
doc .dr. sc. Nataša Bauer
doc .dr. sc. Damjan Franjević

Rad je prihvaćen: 19. listopada 2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Serotonin Transporter Gene Polymorphism in Patients with Epilepsy

Jelena Prodić
Department of Biology, Faculty of Science
Rooseveltova trg 6, Zagreb

ABSTRACT

Serotonin is a neurotransmitter with a role in many physiological functions and in the etiopathogenesis of different neuropsychiatric disorders. Various studies have revealed the ability of serotonin to affect the generation and the course of epileptic seizures. Serotonin transporter (5-HTT), a transmembrane protein responsible for the removal of 5-HT from the synaptic cleft, is considered to be the main regulator of the 5-HT transmission. The promoter and the second intron of the 5-HTT gene contain functional polymorphisms that affect efficiency of the gene expression. The present work has investigated their association with the temporal lobe epilepsy (TLE). The study included 101 patients suffering from TLE and 155 healthy individuals. Comparison of allelic and genotypic frequencies of promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR-2) polymorphisms, demonstrated no statistically significant difference between the investigated groups. These results indicate that investigated polymorphisms do not play a major role in the etiopathogenesis of TLE in Croatian population, however due to relatively small sample size, their minor effects on the etiopathogenesis of this complex disorder could not be excluded.

(37 pages, 14 pictures, 7 tables, 26 references, Croatian language)

Thesis deposited at: The Central Biological Library, Rooseveltov trg 6, Zagreb.

Key words: association study / temporal lobe epilepsy / polymorphism / serotonin / serotonin transporter

Supervisors: PhD Jasminka Štefulj, Higher Research Associate
PhD Dubravka Hranilović, Associate Professor

Reviewers: PhD Jasminka Štefulj, Higher Research Associate
PhD Dubravka Hranilović, Associate Professor
PhD Nataša Bauer, Assistant Professor
PhD Damjan Franjević, Assistant Professor

Thesis accepted: October 19th 2011

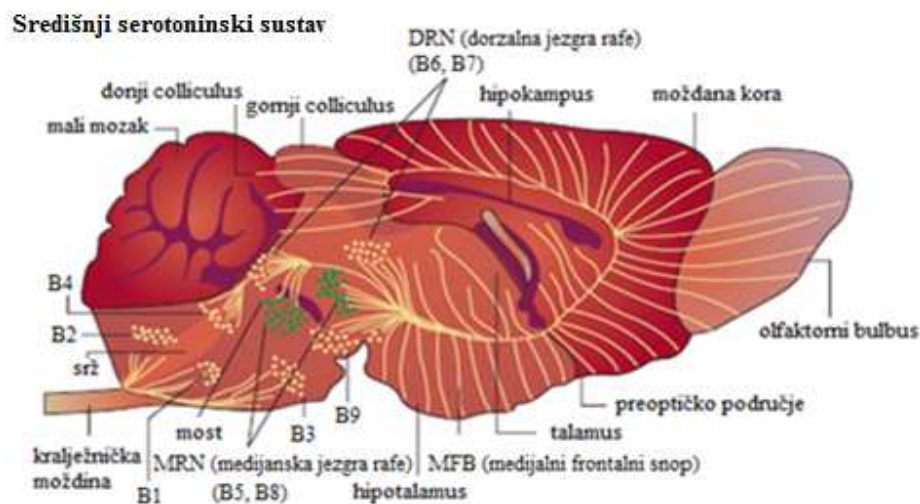
SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Serotoninski sustav u mozgu	1
1.2. Serotoninski prijenosnik: uloga, smještaj i građa	3
1.3. Polimorfizmi gena za 5-HTT	6
1.4. Epilepsija	9
1.5. Uloga serotonina u epilepsiji	11
1.6. Povezanost epilepsije i polimorfizma gena za 5-HTT	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Ispitanici	15
3.2. Materijali	15
3.2.1. Uzorci krvi	15
3.2.2. Oligonukleotidne početnice	15
3.2.3. Kemikalije i otopine	16
3.2.4. Tehnička oprema i pribor	17
3.3. Metode	17
3.3.1. Izolacija genomske DNA	17
3.3.2. Određivanje koncentracije, čistoće i cjelovitosti DNA	18
3.3.3. Genotipizacija promotorskog polimorfizma gena za 5-HTT (5-HTTLPR)	19
3.3.4. Elektroforeza kod genotipizacije promotorskog polimorfizma	20
3.3.5. Genotipizacija intronskog polimorfizma gena za 5-HTT (VNTR-2)	21
3.3.6. Elektroforeza kod genotipizacije intronskog polimorfizma	22
3.4. Statistička obrada podataka	22
4. REZULTATI	23
4.1. Istraživanje učestalosti polimorfizma gena za 5-HTT	23
4.2. Izolacija genomske DNA	23
4.3. Raspodjela alela promotorskog polimorfizma u testiranim populacijama	24
4.4. Raspodjela alela intronskog polimorfizma u testiranim populacijama	26
4.5. Raspodjela haplotipova promotorskog i intronskog polimorfizma gena za 5-HTT	28
5. RASPRAVA	30
6. ZAKLJUČCI	34
7. LITERATURA	35

1. UVOD

1.1. Serotoninski sustav u mozgu

Serotonin, 5-hidroksitriptamin (5-HT, engl. *5-hydroxytryptamine*), biogeni je amin i neurotransmitter značajan za neurorazvoj, funkciju i oblikovanje mozga ljudi i životinja. Takvo djelovanje pokazuje zbog rane ekspresije svojih gena zahvaljujući kojoj ima udjela u nizu morfogogenetskih aktivnosti važnih za embrionalni razvoj središnjeg živčanog sustava (CNS-a, engl. *Central Nervous System*). Ti procesi uključuju proliferaciju stanica, njihovu migraciju u preteče pojedinih regija mozga i konačno diferencijaciju u aktivne neurone (*Lesch i Mössner, 1998.*). Iako serotonin dobiva svoj naziv 40-ih godina prošlog stoljeća prema krvnom serumu (izolacijom iz trombocita) (*Owens i Nemeroff, 1994.*), u enterokromafinim stanicama probavnog sustava većina je njegovog ukupnog sadržaja u tijelu. Serotonin je prisutan i u mozgu, plućima, srcu, te tkivu gušterače. Uz mozak, i druga tkiva pohranjuju 5-HT u vezikulama i otpuštaju ga pod utjecajem lokalnih podražaja, tvoreći tako periferni serotoninski sustav (*Murphy i Lesch, 2008.*).

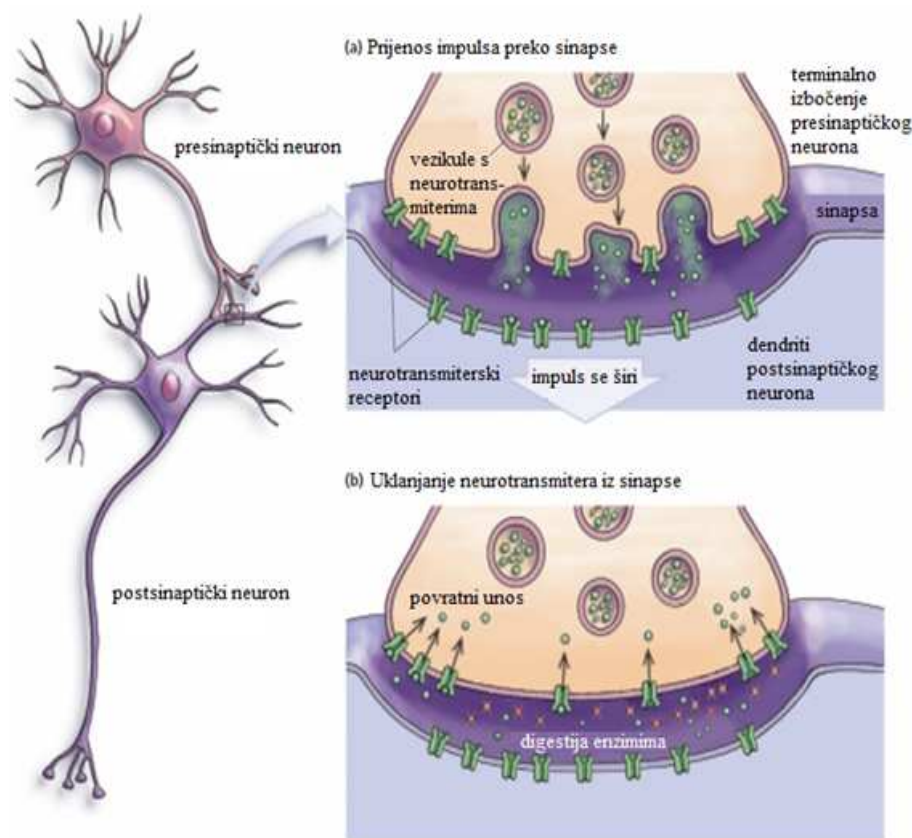


Slika 1.1. Središnji serotoninski sustav štakora/miša. Tijela serotonergičkih neurona u CNS-u grupirana su u devet nakupina nazvanih jezgre rafe, koje se označavaju s B1 do B9. Prikazane su kaudalne rafe (B1–B3), rostralne rafe koje se dijele na dorzalne rafe (B6 i B7; prikazane žutom bojom) i medijane rafe (B5 i B8; prikazane u zelenoj boji) (*Murphy i Lesch, 2008.*).

Sinteza serotonina u CNS-u odvija se u tijelima serotonergičnih neurona smještenim u tzv. jezgrama rafe u središnjem dijelu moždanog debla, odakle pružaju projekcije u razne

dijelove CNS-a (Slika 1.1.). S obzirom na smještaj, jezgre rafe dijele se na kaudalne rafe čije projekcije idu duboko u unutrašnjost moždanog tkiva i prema kralježničkoj moždini i perifernim sustavima, te rostralne jezgre rafe, koje se dalje dijele na dorzalne i medijane i šalju projekcije u područje talamusa, hipotalamusa, hipokampusa, amigdale i drugih moždanih struktura (Murphy i Lesch, 2008.).

Serotonin se sintetizira iz aminokiseline triptofana, a u tom kratkom metaboličkom putu enzim triptofan hidrosilaza (TPH, engl. *Tryptophan Hydroxylase*) katalizira korak u sintezi koji ograničava brzinu čitavog puta. Zatim nespecifična dekarboksilaza aromatskih L-aminokiselina (AADC, engl. *Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase*) brzo pretvara 5-hidroksitriptofan, kratko živući intermedijer, u molekulu 5-HT (Owens i Nemeroff, 1994.).



Slika 1.2. Širenje živčanog impulsa između neurona putem kemijske sinapse.

(a) Neurotransmiteri se otpuštaju iz presinaptičkog neurona, putuju kroz sinaptičku pukotinu do postsinaptičkog neurona i ondje vežu na membranske receptore. (b) Nakon što neurotransmiter izazove odgovor, uklanja se iz sinapse enzimima prisutnim u sinapsi koji razgrade neurotransmiter ili putem povratnog unosa u presinaptičku stanicu (Belk i Borden, 2003.).

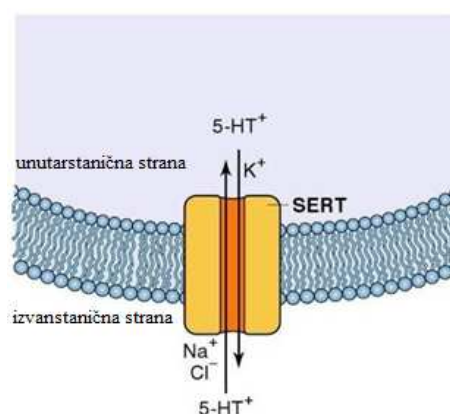
Hidroksilna skupina na indolnom prstenu i proton-akceptorski karakter amino skupine, daju serotoninu izrazito hidrofilan karakter (*Siegel i sur., 2006.*). Stoga pri fiziološkom pH, 5-HT ne može prijeći krvno-moždanu barijeru, ali u tome uspijevaju triptofan i njegovi metaboliti putem specifičnih nosača (*Owens i Nemeroff, 1994.*). Pod utjecajem živčanih impulsa, 5-HT se otpušta iz vezikula u sinaptičku pukotinu, te se veže na receptorski protein na membrani postsinaptičkog neurona uzrokujući njegovu ekscitaciju ili inhibiciju (Slika 1.2.) (*Guyton i Hall, 2006.*). Kako je u neuronskoj citoplazmi 5-HT u ioniziranom obliku, on ne prolazi staničnu membranu difuzijom, već se izlučuje egzocitozom. Njezin glavni okidač je struja ekstracelularnih kalcijevih iona koji neovisno o depolarizaciji, potiču stapanje membrane vezikule i plazma membrane (*Siegel i sur., 2006.*). Signalna molekula zatim difundira preko sinapse, veže i aktivira specifične receptore, te mijenja membransku permeabilnost postsinaptičkog neurona (*Guyton i Hall, 2006.*). Na taj način okida se kaskada intracelularnih reakcija koje omogućuju daljnje širenje signala. Prijenos se zaustavlja kad je na presinaptičkim završecima pokrenuta obrnuta reakcija povratnog unosa (engl. *re-uptake*) serotonina. Uneseni 5-HT može biti ponovo uskladišten u sekretorne vezikule neurona ili razgrađen pomoću enzima monoamino-oksidge (MAO) koja oksidira razne monoaminske neurotransmitere (*Owens i Nemeroff, 1994.*).

Serotonin pokazuje svoju izuzetnu važnost u fiziološkim procesima kao što su osjetljivost na okolišne podražaje, percepciju i definiranje osjeta boli, promjene raspoloženja i stvaranje emocija, te procese učenja i pamćenja (*Lovinger, 2008.*). Djeluje i kao posrednik u neuroendokrinim funkcijama i cirkadijalnim ritmovima kao što su unos hrane, spavanje, tjelesna temperatura, brzina metabolizma i seksualna aktivnost. Smatra se da je uz dobru inerviranost mozga, podloga te funkcionalne svestranosti i to što serotonin može upravljati aktivnostima i interakcijama i nekoliko drugih neurotransmiterskih sustava (*Lesch i Mössner, 1998.*). Sve navedeno čini ga jednim od osnovnih komponenata potrebnih za uravnoteženo funkcioniranje organizma u cijelosti.

1.2. Serotoninski prijenosnik: uloga, smještaj i građa

Jedan od ključnih faktora u regulaciji serotonergične transmisije je serotoninski prijenosnik (5-HTT, engl. *5-HT Transporter*). Kod ljudi je kodiran genom u jednoj kopiji (engl. *single-*

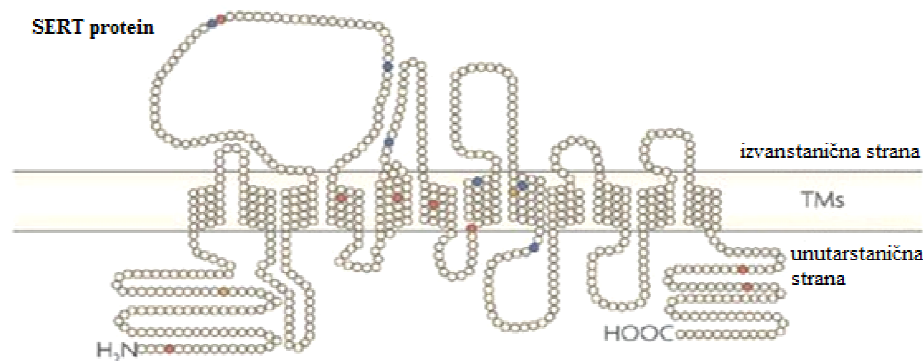
copy gene) smještenim na duljem kraku 17. kromosoma (17q11.1–q12), poznatim još pod nazivom *SLC6A4* (engl. *Solute Carrier Family 6 Member 4*) (Manna i sur., 2007.). Translacijom mRNA ovog gena nastaje membranski protein od 630 aminokiselina, molekularne težine oko 68 kDa. Serotonin posjeduje karakterističnu građu od 12 transmembranskih domena (evolucijski konzervirana područja), zajedničku i drugim monoaminskim prijenosnicima iz ove obitelji proteina kao što su prijenosnici za noradrenalin/adrenalin, dopamin, GABA-u (engl. *gamma-Aminobutyric acid*). Serotoninski prijenosnik ili SERT (engl. *Serotonin Transporter*) također je član skupine natrij-simportera (Hahn i Blakely, 2002., Siegel i sur., 2006.). Oni koriste transport Na^+ i Cl^- iona (u istom) i K^+ iona (u suprotnom smjeru) za dobivanje energije potrebne za prijenos molekule neurotransmitera u stanicu nasuprot koncentracijskom gradijentu (Slika 1.3.). Za inicijalni korak prijenosa potrebno je da se sva tri sudionika procesa (natrij, klor i serotonin) sekvencijalno vežu na 5-HTT kako bi on mogao proći kroz konformacijske promjene koje prethode uspješnoj translokaciji vezanih molekula (Tavoulari i sur., 2009.).



Slika 1.3. Serotoninski prijenosnik (SERT) (Siegel i sur., 2006.).

Serotoninski prijenosnik smješten je na presinaptičkim membranama neurona i glija stanica i pokazuje vrlo visoki afinitet za svoj ligand - serotonin, što je velika prednost pri brzom uklanjanju otpuštenog neurotransmitera iz ekstracelularnih područja. Njegov N- i C-kraj nalaze se s intracelularne strane kao i domene za fosforilaciju (Slika 1.4.). One su meta serin, treonin ili tirozin kinaza tijekom citoplazmatskog prijenosa signala, te mjesta potencijalne posttranslacijske regulacije (Owens i Nemeroff, 1994.). Receptorska mjesta lokalizirana su na omčama koje strše u izvanstanični prostor, te sadrže intralančane sulfidne veze kao i mjesta za N-glikozilaciju. Pretpostavlja se da ta mjesta nemaju značaj u prepoznavanju i vezanju liganda, no vezanjem molekula šećera vjerojatno stabiliziraju

prijenosnik pomažući pravilno smatanje proteina i štiteći ga od degradacije (*Blakely i sur., 1994., Hahn i Blakely, 2002.*). Sam 5-HTT reguliran je s više putova transdukcije signala u koje, ovisno o tipu stanice, mogu biti uključeni cAMP, cGMP, kalmodulin, protein kinaza A (PKA), protein kinaza C (PKC), p38 MAP (engl. *Mitogen-Activated Protein*) kinaza, a u defosforilacijski put fosfataze; protein fosfataza 2A (*Zhang i sur., 2007.*).



Slika 1.4. Serotoninski prijenosnik građen je od 12 transmembranskih (TM) segmenata, izvanstaničnih omći i unutarstaničnog amino i karboksi kraja (*Murphy i Lesch, 2008.*).

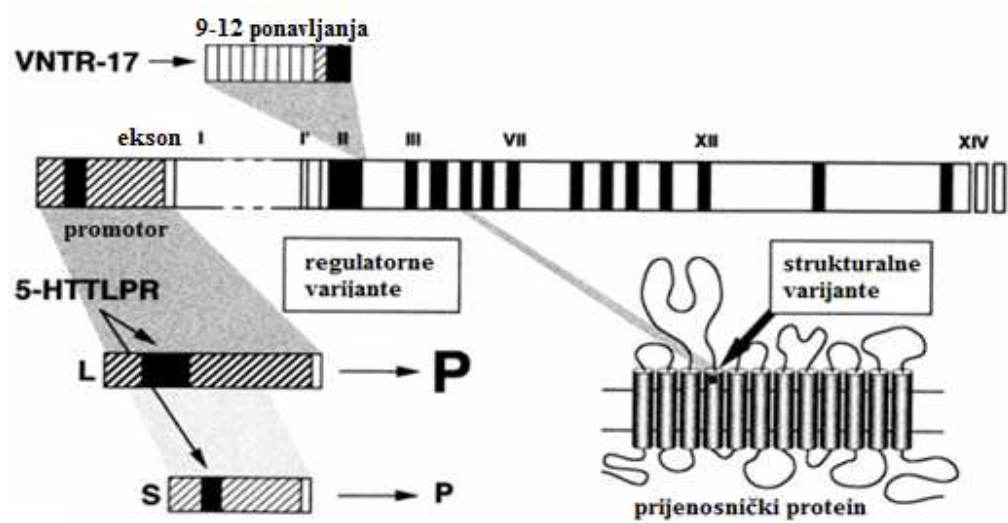
U početku je pretpostavljano da će delecija gena za 5-HTT djelovati letalno zbog važne uloge serotonina u embriogenezi, ali miševi s deletiranim genom za 5-HTT (5-HTT^{-/-}) se nisu značajno razlikovali u neurorazvojnog putu i stopi mortaliteta u odnosu na kontrolu. No otkriven je značajni porast ekstracelularne razine 5-HT zbog nemogućnosti pohranjivanja neurotransmitera putem povratnog unosa, te manjak inhibicije za njegovu sintezu (*Gainetdinov i Caron, 2003.*). Najistaknutije promjene bile su povećana količina stresnog hormona ACTH-a (adrenokortikotropnog hormona, engl. *Adrenocorticotropic Hormone*) u plazmi što je povezano sa slabijim snalaženjem u stresnim situacijama, te bihevioralna obilježja povećane anksioznosti, strašljivosti i smanjene agresije (*Murphy i sur., 2001.*). Također je došlo do smanjenja 5-HT koncentracije unutar živčanih stanica čak za 40-60% (*Murphy i Lesch, 2008.*).

Serotoninski prijenosnik ranije je došao u središte interesa farmakoloških istraživanja u odnosu na genetička zato što predstavlja ciljno mjesto vezanja antidepresiva iz skupine inhibitora povratnog unosa serotonina (SSRI-a, engl. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*). Mehanizam djelovanja tih lijekova sastoji se od kompeticije za ista vezna mjesta na prijenosniku kao serotonin čime dolazi do inhibicije povratnog unosa serotonina

i ostvarivanja dugotrajnijeg učinka samog neurotransmitera. Osim antidepresiva, na 5-HTT se vežu i neki neurotoksini, droge i drugi psihostimulansi, a njihovo djelovanje također ovisi o vremenu potrebnom za desenzitizaciju somatodendritičnih autoreceptora (*Mainardi i sur., 2008.*).

1.3. Polimorfizmi gena za 5-HTT

Gen za 5-HTT sadrži oko 35 kb, a sastoji se od 14 egzona s konzerviranom egzonsko-intronskom organizacijom, regulatornom regijom, te dodatnim regulatornim sljedovima. Također sadrži alternativne promotore dok su u samo alternativno prekrajanje gena uključeni eksoni 1A, 1B i 1C (*Murphy i Lesch, 2008.*). Svi oni, kao i varijabilnost prisutna u 3' netranslatirajućoj regiji, pridonose nastanku raznih vrsta mRNA i regulaciji ekspresije gena. Na transkripcijsku aktivnost samog gena utječe i postojanje polimorfnih regija od kojih su se dvije pokazale značajnima: varijacija duljine promotorskog dijela i broj uzastopnih ponavljanja u drugom intronu.



Slika 1.5. Funkcionalni polimorfizmi gena za serotoninski prijenosnik (5-HTT). Transkripcijska aktivnost promotora gena za 5-HTT modulirana je polimorfizmom smještenim u toj regiji, nazvanim 5-HTTLPR, koji sadrži dvije uobičajene varijante, dugu (L) i kratku (S). U drugom intronu nalazi se polimorfizam različitog broja ponavljanja tandemskih slijedova (VNTR-17), s dva češća alela (s 10 i 12 ponavljanja) i jednim rijetkim alelom (s 9 ponavljanja). Također je naznačen rijetki polimorfizam u kodirajućoj regiji gena za 5-HTT, koji dovodi do aminokiselinske zamjene u proteinu (*Lesch i Mössner, 1998.*).

Ostali polimorfizmi odnose se na zamjene pojedinačnih nukleotida (SNPs, engl. *Single Nucleotide Polimorphisms*) (Murphy i Lesch, 2008.). Pojam polimorfizam odnosi na pojavu dvije ili više formi (alela) na istom mjestu unutar gena. Gen za 5-HTT je „single-copy gene“ što ukazuje da bi utjecaj polimorfnih regija u samom genu mogao biti jači zbog male vjerojatnosti da će njegov učinak biti kompenziran drugim genskim produktom (Hahn i Blakely, 2002.).

Jedan od polimorfizama u genu za 5-HTT, za koji je pokazano da ima utjecaj na efikasnost transkripcije ovog gena, nazvan je 5-HTTLPR, od engleskog: *Serotonin-Transporter-Gene-Linked Polymorphic Region* (Slika 1.5.). Sastoji se od serije nepotpunih ponavljanja slijeda od 20-ak nukleotida, a s obzirom na broj ponavljanja razlikuju se dvije najčešće varijante - S (short), s 14 ponavljanja i L (long), s 16 ponavljanja (Slika 1.5.). Smatra se da je dominantni alel S nastao delecijom odsječka dugog 44 bp. Osim alela S i L, kod ljudi su pronađeni i iznimno rijetki aleli s 18 (XL) i 20 (XXL) ponavljanja (Lesch i Mössner, 1998.). Točno podrijetlo 5-HTTLPR slijeda nije poznato, no zna se da je jedinstven samo ljudima i čovjekolikima majmunima, tj. našim najbližim evolucijskim srodnicima (Lesch i Mössner, 1998.). Pretpostavlja se da bi preteča ovog slijeda mogla biti viralna DNA ili neki transpozabilni element koji se pojavio u genomu prije oko 40 milijuna godina (uoči divergencije predaka hominida i čovjekolikih majmuna) (Lesch i Mössner, 1998.). Udjeli alela S i L variraju među etnološko-geografskim populacijama ljudi, pa se tako unutar populacije prevladavajućeg europskog porijekla kreću otprilike u odnosu 55%–60% za alel L naspram 40%–45% za alel S. Raspodjela genotipova u istoj pokazuje više homozigota LL (32%) u odnosu na SS (19%) dok polovicu po zastupljenosti čine heterozigoti LS (49%) (Lesch i Mössner, 1998.).

Informacija dovoljna da potakne stanično-specifičnu ekspresiju sadržana je unutar 2 kb promotorskog slijeda, dok se sama 5-HTTLPR regija nalazi oko 1 kb uzvodno od mjesta inicijacije transkripcije. Istraživanje njezine uloge otkrilo je da su promotorski fragmenti aktivni u svim stanicama s konstitutivnom ekspresijom 5-HTT, kao što su serotonergične jezgre rafe. Smatra se da je regulacija ekspresije gena za 5-HTT rezultat kombinacije pozitivnih i negativnih cis elemenata koji svoj učinak izvršavaju putem bazalnog promotora s TATA-nalik motivom (Lesch i Mössner, 1998.). Koliko je transkripcijska aktivnost ovisna o prisutnim varijantama polimorfizma 5-HTTLPR, proučavano je

metodom fuzije gena reportera (npr. luciferaze) na promotorski slijed od interesa i zatim njegovom transfekcijom u ljudske stanične linije (*Lesch i Mössner, 1998.*). Korištene su najčešće limfoblastoidne kulture stanica koje konstitutivno ekspimiraju funkcionalni 5-HTT čime je omogućeno *in vitro* praćenje aktivnosti promotora u nativnim uvjetima. Po razini povratnog unosa 5-HT u limfocite uvidjelo se da homozigoti LL stvaraju više mRNA za 5-HTT nego što je su to činile stanice s jednom ili obje kopije alela S. Alel L može imati za posljedicu i do 3 puta veću bazalnu transkripcijsku aktivnost kao i veću aktivnost serotoninskog prijenosnika. Testiranje jačine vezanja inhibitornih molekula na prijenosnik, također je proizvelo znatno jaču reakciju vezanja na homozigote LL (*Hahn i Blakely, 2002.*).

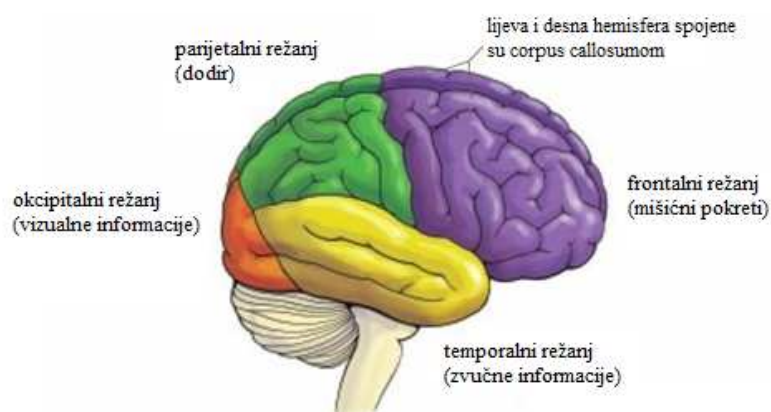
Sljedeća polimorfna regija odnosi na varijaciju duljine slijeda u drugom intronu, a ponekad se naziva STin2, od engleskog: *Serotonin Transporter intron 2* (Slika 1.5.). Ovaj polimorfizam pripada malobrojnoj skupini funkcionalnih intronskih polimorfizama koji osim mjesta uključenih u alternativno prekrajanje, sadrže i regulatorne elemente koji utječu na efikasnost transkripcije. VNTR (engl. *Variable Number Tandem Repeat*) je dio DNA sastavljen od različitog broja ponavljanja određenog slijeda, omeđen nerepetitivnim sljedovima. Najčešće nastaju kao posljedica uklanjanja ili dodavanja pojedinih ponavljanja putem rekombinacije ili replikacijskih pogrešaka. Ako se izmijenjene varijante uspiju fiksirati u populaciji, njihovim se nasljeđivanjem broj ponavljanja počinje razlikovati među jedinkama i razvija se polimorfizam (*Lynch, 2002.*). Ponavljajući slijed u intronu 2 dugačak je 17 bp, a broj njegovih ponavljanja kreće se između 9 i 12 (Slika 1.5). Najprisutniji alel je onaj od 12 ponavljanja, te alel od 10 ponavljanja koji je ujedno i dominantan. Alel 11 otkriven je zasad samo u jednoj afričkoj populaciji, a alel 9 iako zastupljeniji i dalje je prilično rijedak zbog čega se često ne može uključiti u statističke obrade (*Hahn i Blakely, 2002.*). Udjeli pojedinih alela i ovdje se razlikuju ovisno o populaciji, a općenite vrijednosti za europsko stanovništvo kreću se u rasponu od 1%–3% za alel 9, te u znatno višim postotcima od 32%–42% za alel 10 i 56%–66% za alel 12 (*Hranilović i sur., 2003.*).

Svoju ulogu u regulaciji gena za 5-HTT, polimorfizam VNTR-2 ispunjava ponašajući se kao pojačivač (engl. *enhancer*) transkripcije. U obavljanju svoje funkcije pojačivača transkripcije, VNTR-2 stupa u interakciji s određenim aktivacijskim proteinima; vjerojatno

s obližnjim aktivacijskim proteinom 1 (AP-1, engl. *Activator Protein-1*) (Manna i sur., 2007.). Zatim AP-1 može reagirati s medijatorskim kompleksom koji će mobilizirati RNA polimerazu II, potrebne transkripcijske faktore i otpočeti prepisivanje (Brown, 2002.). Na taj posredni način pojačivač utječe na promotor uzvodno od sebe, a kao i kod prethodnog polimorfizma, istraživanja su pokazala da pritom nastaju kvantitativne razlike u razini transkripciji, ovisno o alelu. Do takvih zaključaka došlo se putem *in vitro* modela - promatranjem razine ekspresije gena za 5-HTT u kulturama embrionalnih matičnih stanica koji su imale različite alele. To se interpretiralo u skladu s pretpostavkom da bi regija VNTR-2 mogla funkcionirati kao transkripcijski regulator gena za 5-HTT aktivno sudjelujući u procesu transkripcije. Pokazalo se da alel 12 ima jača pojačivačka svojstva, nego aleli s manjim brojem ponavljajućih jedinica (Hranilović i sur., 2004.). Pretpostavlja se da je to zato što manji broj ponavljanja djeluje destabilizirajuće na transkripcijske komplekse i stvaranje poželjnih konformacija pri vezanju DNA i transkripcijskih faktora (Hahn i Blakely, 2002., Manna i sur., 2007.). Time je broj ponavljanja doveden u izravnu korelaciju s aktivnošću serotoninske signalizacije.

1.4. Epilepsija

Epilepsija pripada heterogenoj skupini neuroloških poremećaja s različitom etiološkom, elektrografskom i bihevioralnom podlogom, kao i farmakološkom osjetljivošću (Bagdy i sur., 2007.). Uzroci epilepsije variraju ovisno o tipu, ali svim tipovima epilepsije zajednička je karakteristika abnormalno sinkrono izbijanje živčanih impulsa u pojedinim regijama mozga. Osim onih nastalih kao rezultat neke traume, većina epilepsija pokazuje određenu nasljednu komponentu. Do sada je pronađeno više od 70 gena čije mutacije mogu destabilizirati provođenje živčanih signala, poremetiti membransku ekscitabilnost ili inhibitorno-ekscitacijske krugove mozga (Noebels, 2003.). Prema oštećenjima na molekularnoj razini, epilepsije se dijele na one nastale primarnim poremećajima membranske i sinaptičke signalizacije, one uzrokovane plastičnošću mozga i metaboličkim promjenama, te one koje su rezultat deficitarnog razvoja živčanih mreža (Noebels, 2003.).



Slika 1.6. Struktura mozga. Moždana kora podijeljena je središnjom linijom na lijevu i desnu hemisferu, a svaka hemisfera na četiri režnja (*Belk i Borden, 2003.*).

Klinički, epilepsije se dijele prema raspodjeli abnormalnih izboja na fokalne ili parcijalne, u kojima izbijanja ostaju lokalizirana, te generalizirane u kojima su zahvaćene obje hemisfere mozga (*Bagdy i sur., 2007.*). Na fokalni tip otpada i do 60% epilepsija u odraslih. Često nastaju zbog lokalnih lezija ili funkcionalnih abnormalnosti nekog moždanog područja, kao što su tkivni ožiljci koji utječu na susjedna živčana tkiva, tumori koji pritišću dijelove mozga, oštećenje tkiva ili prirodni poremećaji lokalnog provođenja živčanih impulsa (*Guyton i Hall, 2006.*). Najčešća forma među fokalnim epilepsijama je epilepsija temporalnog režnja (TLE, engl. *Temporal Lobe Epilepsy*). Radi se o kroničnom neurološkom stanju s ponavljajućim napadajima čije je žarište u jednom ili oba temporalna režnja mozga (Slika 1.6.). Na osnovu poznavanja njihovih uzroka, epilepsije se mogu razvrstati u simptomatske i idiopatske (nepoznati uzroci) (*Bagdy i sur., 2007.*).

Jednom izazvana ekscitacija širi se diljem neuralnih mreža tako dugo dok ne izazove odgovor inhibitornog mehanizma koji će ju zaustaviti. Ako je sposobnost sustava redukcije signala oslabljena, bilo zbog nemogućnosti održavanja homeostaze pH ili abnormalne ionske provodljivosti membrana doći će do facilitirane, tj. olakšane transmisije (*Bagdy i sur., 2007.*). Istraživanja na animalnim modelima (miševima, štakorima) potvrdila su da se u podlozi neuralnih smetnji koje prethode pojavi epileptičnih napadaja nalaze normalni neuroni koji povremeno stvaraju abnormalne izboje živčanih impulsa (*Murthy i sur., 2010.*). Transfekcija ljudskih gena s mutacijama za podjedinice membranskih kanala u stanice sisavaca, pokazala je da je najistaknutija devijacija upravo neodgovarajuća natrijska struja tijekom faze depolarizacije, čime inaktivacija signala postaje nepotpuna

(Noebels, 2003.). Kako se radi o neadekvatnom vremenskom okviru i jačini akcijskih potencijala u koji su direktno ili indirektno uključeni razni receptori i kanali za provođenje signala, među njima su i komponente serotoninskog sustava.

1.5. Uloga serotonina u epilepsiji

Sve do početka 90-ih godina nije zapažena potencijalna uloga serotonina u patogenezi epilepsije osim što je primjećeno da oboljeli od epilepsije nerijetko imaju i neki oblik depresije (Mainardi i sur., 2008.). Kod oboljelih od epilepsije često su zabilježeni depresivni poremećaji već prije pojavljivanja epilepsije. Također, u njihovim je obiteljima pronađena veća predispozicija za depresiju u odnosu na obitelji bez članova s epilepsijom (Kanner i Balabanov, 2002.). Oba poremećaja karakterizira promjena u serotonergičnoj funkciji, a u slučaju depresije to potkrepljuju i smanjene koncentracije 5-HIAA (5-hidroksiindol octene kiseline, glavnog serotoninskog metabolita) u cerebrospinalnoj tekućini pacijenata koji nisu primali antidepresive (Owens i Nemeroff, 1994.). Epidemiološke studije pokazale su da zaista postoji veliki komorbiditet tih dviju bolesti, no do 90-ih godina oboljelima od epilepsije u kombinaciji s depresijom nisu davani antidepresivi što je inače bila uobičajena praksa za pacijente koji bi razvili "samo" depresiju (Mainardi i sur., 2008.).

Razlog tome leži u nepovoljnim ili nedostatnim informacijama prikupljenima dotadašnjim istraživanjima zbog kojih su antidepresivi smatrani prokonvulzivnima - onima koji uzrokuju napadaje. Novija istraživanja ipak su došla do suprotnih rezultata nakon testiranja antidepresivnih lijekova na pacijentima koji nisu odgovarali na antiepileptičnu terapiju (Mainardi i sur., 2008.). Njima je pokazan utjecaj 5-HT transmisije na modulaciju eksperimentalno izazvanih napadaja, te da su agensi koji djeluju na aktivnost serotoninskog prijenosnika (blokatori povratnog unosa serotonina) ili na anabolizam serotonina (5-hidroksitriptamin, prekursor serotonina), oni koji najefikasnije povećavaju koncentraciju ekstracelularnog 5-HT (Bagdy i sur., 2007.). Osim što ovi rezultati upućuju na to da antidepresivi pojačavaju rad serotoninskog sustava i moduliraju epileptičke napadaje, pronađeno je kako pojedini antiepileptički lijekovi također dovode do porasta 5-HT u sinapsama (Bagdy i sur., 2007.). Antidepresivi pomažu kontroli fokalnih i

generaliziranih napadaja, a isti lijek u nekim slučajevima može biti jednako učinkovit pri liječenju depresije i epilepsije (*Mainardi i sur., 2008.*).

Do sličnog je ishoda došlo i putem animalnih modela (posebno s miševima) gdje je pad aktivnosti neurotransmitera kao što su serotonin, norepinefrin, dopamin i GABA olakšavao procese koji vode do napadaja i pojačavao im frekvenciju. Sve ovo pokazalo se mogućim obrnuti ili blokirati primjenom farmakoloških supstanci koje mijenjaju izvanstanična razina 5-HT ili se ponašaju kao agonisti ili antagonisti mjesta na koja se serotonin veže (*Bagdy i sur., 2007., Kanner i Balabanov, 2002.*).

1.6. Povezanost epilepsije i polimorfizma gena za 5-HTT

Gore navedeni polimorfizmi gena za 5-HTT pripadaju grupi alteracija DNA koje ne mijenjaju konačni slijed aminokiselina, a takve „neškodljive“ varijante obično su prisutne u većem broju nego one koje bi mogle imati ozbiljnije posljedice na građu i funkciju proteinskog produkta. Ove varijacije, kao što je navedeno, utječu na razinu ekspresije gena, putem mijenjanja transkripcijske ili translacijske efikasnosti (*Hahn i Blakely, 2002.*). Smatra se da alelne varijante mogu utjecati na sinaptičku plastičnost, tj. da aktivno djeluju na ispoljavanje kompleksnih osobina ličnosti i njima pridruženog ponašanja.

Budući da je 5-HTT jedna od kritičnih točki u serotoninskoj signalizaciji, provedena su istraživanja koja su testirala mogu li varijacije u genu za ovaj prijenosnik pridonijeti podložnosti epileptičkim napadajima. Učinak promotorskog polimorfizma praćen je u idiopatskim generaliziranim epilepsijama (IGE), odabranim kao tip epilepsije za koji se zna da nasljedni faktori imaju prevladavajuću ulogu. No asocijacija između ovog polimorfizma i epilepsije je izostala, čak i kod alela S koji inače karakterizira reducirana transkripcijska efikasnost u odnosu na alel L. Također, IGE nisu dale čvrstu potporu ni pretpostavci da ponavljajuća regija promotora može modulirati prag podražaja za napadaj (*Sander i sur., 2000.*).

Studija na oboljelima od medijalnog oblika TLE-a, koji su patili od hipokampalne skleroze, pratila je kako alelne varijante utječu na odgovor na antiepileptičke lijekove.

Pronađena je veza između polimorfizma VNTR-2 i reakcije na medicinski tretman. Većina pacijenata koji nisu odgovarali na terapiju bili su upravo nosioci genotipa 1212. Pokazano je da su homozigoti 1212 imali čak 4 puta veći rizik da ne odgovore na terapiju u odnosu na nosioce alela s 10 ponavljanja (*Kauffman i sur., 2009.*). Nalaz je potvrdilo i drugo istraživanje s istim ciljem, te skupinom oboljelih u odnosu na zdrave ispitanike. I tu se pokazalo da pacijenti s TLE-om imaju nižu frekvenciju alela 10 i manji udio homozigota 1010 od kontrolne skupine (*Manna i sur., 2007.*). Ovo se tumači povećanom ekspresijom 5-HTT (*Hranilović i sur., 2004.*). Kako je pronađeno da nizak serotonin obično znači višu vjerojatnost napadaja, ovi su rezultati u skladu s time zato što povećani povratni unos serotonina ostavlja manje neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini (*Kauffman i sur., 2009.*).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Brojna istraživanja pokazala su da neurotransmiter serotonin (5-HT) modulira ravnotežu između ekscitatornih i inhibitornih signala u kortikalnim i subkortikalnim regijama mozga, te je na taj način upleten u mehanizme epileptogeneze.

Serotoninski prijenosnik (5-HTT), membranski protein odgovoran za uklanjanje serotonina iz sinaptičke pukotine, jedan je od najvažnijih regulatora jačine serotoninske neurotransmisije. Gen za ovaj protein sadrži u promotorskoj regiji polimorfizam 5-HTTLPR i u drugom intronu polimorfizam VNTR-2. Za oba ova polimorfizma pokazano je da utječu na efikasnost transkripcije gena za 5-HTT, te time i na aktivnost ovog prijenosnika.

Cilj ovog istraživanja bio je provjeriti postoji li statistički značajna povezanost polimorfizama 5-HTTLPR i VNTR-2 s epilepsijom temporalnog režnja (TLE) u hrvatskoj populaciji, usporedbom raspodjele alela i genotipova navedenih polimorfizama između skupine osoba oboljelih od TLE-a i skupine zdravih ispitanika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Uzorci krvi osoba oboljelih od epilepsije temporalnog režnja (TLE) sakupljani su u suradnji s Centrom za epilepsiju (Odjel za neurologiju) Sveučilišne bolnice "Sestre milosrdnice", u Zagrebu. U istraživanje je bila uključena 101 osoba (68 žena, 33 muškarca prosječne dobi $35 \pm 13,7$ godina) oboljelih od TLE-a. Kontrolnu skupinu činilo je 155 zdravih kontrolnih ispitanika (105 žena, 50 muškaraca prosječne dobi $37 \pm 13,5$ godina), darovatelja krvi, bez osobne ili obiteljske anamneze neuropsihijatrijskih poremećaja (prema odgovorima u anonimno ispunjavanom upitniku). Gotovo 70% ispitanika u svakoj skupini činile su žene (oboljeli – 67,3%, kontrola – 67,7%). Svi su uzorci dobiveni uz suglasnost ispitanika. Istraživanja su odobrena od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Materijali

3.2.1. Uzorci krvi

Genomska DNA izolirana je iz 3 ml periferne krvi, vađene na antikoagulans EDTA, pomoću komercijalnog kompleta za izolaciju DNA iz krvi sisavaca:

The DNA Isolation Kit for Mammalian Blood (Roche Applied Science)

3.2.2. Oligonukleotidne početnice (MWG Biotech, Njemačka)

Genotipovi istraživanih polimorfizma detektirani su umnažanjem odgovarajućih odsječaka DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR-om, engl. *Polymerase Chain Reaction*) s odgovarajućim oligonukleotidnim početnicama:

promotorske: „forward“ 5' - GGCGTTGCCGCTCTGAATGC - 3'

(Tablica 3.1.) „reverse“ 5' - GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC - 3'

intronske: „forward“ 5' - GTCAGTATCACAGGCTGCGAG - 3'

(Tablica 3.3.) „reverse“ 5' - TGTTCTAGTCTTACGCCAGT - 3'

3.2.3. Kemikalije i otopine

- **Otopine za izolaciju genomske DNA** (Roche Applied Science, Njemačka)

A. Red Blood Cell Lysis Buffer

B. White Blood Cell Lysis Buffer

C. Protein Precipitation Solution

Dodatne otopine potrebne za izolaciju:

96% etanol (Kemika, Hrvatska)

70% etanol (Kemika, Hrvatska)

TE pufer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 (Kemika, Hrvatska)

- **Kemikalije korištene u lančanoj reakciji polimerazom (PCR)**

sterilna voda (Ambion, SAD)

10 x PCR pufer II (Applied Biosystems, SAD)

25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, SAD)

10 mM dATP, dCTP, dTTP i dGTP (Applied Biosystems, SAD)

10 mM 7-deaza-dGTP (Roche, Njemačka)

Taq polimeraza 5U/μl (Applied Biosystems, SAD)

otopina Q (Qiagen, Njemačka)

- **Kemikalije korištene pri elektroforezi na 0,5%-, 2%- i 3%-tnom agaroznom gelu**

agarozna (Serva, Njemačka)

1 x TAE pufer: 10 mM Tris-HCl, 5 mM natrij-acetat, 0.5 mM EDTA

(Kemika, Hrvatska)

pufer za nanošenje uzoraka DNA: glicerol

(Kemika, Hrvatska)

50% boja

bromfenol plavo, 25%

1 mM EDTA

etidij-bromid 10 mg/ml (Sigma, SAD)

standard: DNA molecular weight marker XII, 50 base pair ladder, 250 μg/ml

(Boehringer Mannheim, Njemačka)

3.2.4. Tehnička oprema i pribor

- **Izolacija genomske DNA**

Uzorci krvi držani su u zamrzivaču, a za samu izolaciju korištene su Falcon epruvete (od 15 ml), plastične epruvete bez čepa (od 10 ml) i Eppendorf-epruvete (od 1,5 i 0,2 ml). U postupku korišteni su vodena kupelj, centrifuga, nastavci za pipete, parafilm, vodena vakuum sisaljka i autoklav.

- **Spektrofotometrija**

Pipete i nastavci za pipete za stavljanje uzoraka u kivete, te spektrofotometar na očitavanje.

- **PCR**

Za pripremu uzoraka korištene su pipete, nastavci za pipete, Eppendorf epruvete, vortex uređaj (miješalica) i posuda s ledom. Nakon uređaja za PCR, uzorci su stavljeni u hladnjak.

- **Gel elektroforeza**

Otopina agaroze zagrijana je u tikvicama, u mikrovalnoj pećnici. Za izlivanje gela bila je potrebna plastična kadica, češljevi za jažice, a pipete i nastavci za pipete za same uzorke. Osim uređaja s elektrodama za stvaranje električnog polja, važni su bili i UV lampa, te aparat za snimanje gela spojen s računalom.

3.3. Metode

3.3.1. Izolacija genomske DNA

Prije početka postupka otopine A, B, C iz kompleta za izolaciju DNA temperirane su na sobnu temperaturu, a uočeni precipitati otopljeni u vodenoj kupelji pri 37 °C. Uzorci krvi koji su čuvani u zamrzivaču pri -20 °C također su zagrijani na sobnu temperaturu. Alikvot od 3 ml krvi prelijet je u Falcon epruvetu u koju je dodana otopina A, te vorteksiran na rotoru za kružno miješanje oko 15 min. Nakon toga centrifugiran je 10 min na 650 x g što

je omogućilo razdvajanje taloga leukocita od supernatanta koji je odličen. Talog je resuspendiran vorteksiranjem i dodano mu je 1,5 ml otopine B nakon čega je vorteksiranje ponovljeno. Slijedila je 20-30 minutna inkubacija u vodenoj kupelji poslije koje je dodano 780 μ l otopine C i kratko vorteksirano (25 s).

Uzorak je potom prenesen u novu plastičnu epruvetu, zatvoren parafilmom, te centrifugiran 10 min, 12000 x g. Ovaj put talog je bačen jer su se u njemu nalazili precipitirani proteini, a supernatant je odličen u novu Falcon epruvetu. Dodana su mu 2 volumena (4-6 ml) 96% etanola (sobne temperature), a nakon laganog miješanja inverzijom postale su vidljive precipitirane niti DNA. Slijedilo je centrifugiranje 10 min, 875 x g, ali taj put je zadržan talog na koji je dodan 1 ml hladnog 70% etanola.

Pomoću vodene vakuum-sisaljke, talog je zatim odlijepljen od stijenke epruvete i skupa s etanolom prenet u Eppendorf epruvetu (1,5 ml). Nakon centrifugiranja 5 min, 12000 x g, supernatant je odstranjen pomoću vodene vakuum sisaljke i ponovno pomiješan s 1 ml hladnog 70% etanola. Ponovljeno je centrifugiranje i micanje supernatanta, a epruvete su nakon toga ostavljene otvorene 5 min kako bi višak etanola ispario. Na talog je zatim dodano 200 μ l TE pufera, a resuspendiranje DNA je pospješeno inkubacijom uzoraka na 37 °C u vodenoj kupelji preko noći. Gotova otopina s izoliranom DNA pohranjena je pri 4 °C do određivanja koncentracije i kvalitete, a nakon toga držana u zamrzivaču na -20 °C.

3.3.2. Određivanje koncentracije, čistoće i cjelovitosti DNA

Radi mjerenja apsorbancije (A), otopina DNA razrijeđena je u omjeru 1:20, odnosno 190 μ l TE pufer i 10 μ l otopine DNA. Takva otopina stavljena je u spektrofotometar koji je očitao vrijednosti A na 260 nm. Iz A na 260 nm je izračunata koncentracija DNA u svakom uzorku, prema Beer-Lambertovom zakonu: $c = A / (\epsilon \times l)$ ng/ μ l

Pokazatelj čistoće DNA uzorka bio je omjer A na 260 i 280 nm čije se prihvatljive vrijednosti kreću u rasponu od 1,6 do 2,0. Cjelovitost DNA određena je elektroforezom na 0,5%-tnom agaroznom gelu. Uzeto je 2 μ l DNA uzorka, nanoseno na gel i pomiješano s 2 μ l pufera za nanošenje uzoraka. Intaktna DNA na gelu bila je vidljiva kao jedna cjelovita visokomolekularna vrpca.

- **Priprema radnih otopina**

Iz svakog uzorka DNA pripremljena je radna otopina koja je korištena kasnije za PCR. Koncentracija radnih otopina iznosila je 100 ng/μl, a volumen je bio 100 μl. Volumen DNA, uzet za pripremu iz matične otopine, izračunao se prema formuli:

$$V_1 = c_2 \times V_2 / c_1 \text{ } \mu\text{l}$$

pri čemu je V_1 -volumen matične otopine DNA, c_1 -koncentracija izolirane DNA u matičnoj otopini (prema Beer-Lambertovom zakonu), c_2 -koncentracija radne otopine (zadana) i V_2 -volumen radne otopine (zadan). Volumen radne otopine je zatim nadopunjen pojedinačno za svaku radnu otopinu s TE puferom do 100 μl ukupnog volumena, nakon čega su otopine pohranjene na -20 °C.

3.3.3. Genotipizacija promotorskog polimorfizma gena za 5HTT (5-HTTLPR)

Najprije je napravljen izračun za jednu reakciju PCR-a koji je zatim pomnožen s brojem uzoraka koji će se staviti u uređaj za PCR (uzorci DNA i negativna kontrola s vodom umjesto DNA). Tako je dobiven „master mix“, tj. ukupna smjesa za PCR koja je nakon pripreme razdjeljena podjednako u svaku epruveticu za PCR (Tablica 3.1.).

Tablica 3.1. Sastav smjese za lančanu reakciju polimerazom pri genotipizaciji polimorfizma 5-HTTLPR.

REAGENS	POLAZNA KONCENTRACIJA	KONAČNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN (μl) JEDNE REAKCIJE
dH ₂ O			4,29
PCR pufer II	10 x	1 x	1,50
MgCl ₂	25 mM	2 mM	0,90
otopina Q			3,00
dNTP	2,5 mM	250 μM	1,20
5-HTTLPR „forward“ početnica	10 μM	0,5 μM	0,75
5-HTTLPR „reverse“ početnica	10 μM	0,5 μM	0,75
Taq polimeraza	5 U/μl	0,55 U	0,11
DNA kalup		100 ng/μl	2,50
Konačni volumen	15,00		

Volumen pojedinih komponenata računa se iz formule: $V_2 = c_1 \times V_1 / c_2$

pri čemu je c_1 -koncentracija radne otopine, c_2 -konačne koncentracije otopina, V_1 -ukupni volumen smjese za PCR i V_2 -volumen pojedine otopine. Omjer nukleotida u dodanoj smjesi dNTP-a bio je 1/4 dATP, 1/4 dCTP, 1/4 dTTP, 1/8 dGTP. Zbog sklonosti gvanozina stvaranju sekundarnih struktura koje otežavaju dobro razdvajanje na gelu, dodana je dGTP:7-deaza-GTP. Ona se ugrađuje u DNA poput dGTP-a, ali stvara stabilnije intralančane veze. Otopina Q također je dodana radi poboljšanja uvjeta PCR-a kojim se umnožavaju kalupi s velikim potencijalom formiranja sekundarnih struktura ili koji sadrže mnogo GC regija. Tijekom pripreme svi su sastojci osim uzoraka DNA i Taq polimeraze vorteksirani i kratko centrifugirani, a sve su komponente tijekom postupka držane na ledu. Nakon toga slijedilo je umnožavanje u uređaju za PCR kroz 40 ciklusa prema odgovarajućim parametrima (Tablica 3.2.), a gotovi produkti PCR-a čuvani su na 4 °C.

Tablica 3.2. Temperaturni i vremenski profil za lančanu reakciju polimerazom za genotipizaciju polimorfizma 5-HTTLPR.

parametri	početna denaturacija	denaturacija	nalijeganje početnica	produljivanje lanaca	završna ekstenzija
temperatura	95 °C	95 °C	61 °C	72 °C	72 °C
vrijeme	5 min	30 s	30 s	1 min	10 min

3.3.4. Elektroforeza kod genotipizacije promotorskog polimorfizma

Za identifikaciju uzoraka korišten je 2%-tni agarozni gel (2 g agaroze na 100 ml pufera). Sam volumen gela ovisio je o veličini kadice za gel. Agaroz je najprije otopljen u puferu, a zatim postupno zagrijana u mikrovalnoj pećnici. U dovoljno ohlađenu, dodan je etidij-bromid. Gel je izliven u kadicu, namješteni su češljici i pušten da polimerizira. Potom je nadslojen puferom, češljici su izvađeni, a uzorci stavljeni u jažice (10 µl po jažici). U produkte PCR-a prije stavljanja na gel dodano je 1,5 µl pufera za nanošenje uzoraka DNA. Elektroforeza je tekla najprije na 60 V dok uzorci nisu izišli iz jažica, a zatim na 80 V, 90 min ili više (ovisno o veličini gela).

3.3.5. Genotipizacija intronskog polimorfizma gena za 5-HTT (VNTR-2)

Kao i kod prethodnog polimorfizma, prvo je napravljen izračun za jednu reakciju PCR-a koji je zatim pomnožen s brojem uzoraka koji će se staviti u uređaj za PCR; uzorci DNA i negativna kontrola (voda umjesto DNA). Dobivena ukupna smjesa za PCR nakon pripreme razdijeljena je podjednako u svaku epruveticu za PCR (Tablica 3.3.).

Tablica 3.3. Sastav smjese za lančanu reakciju polimerazom pri genotipizaciji polimorfizma VNTR-2.

REAGENS	POLAZNA KONCENTRACIJA	KONAČNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN (μl) JEDNE REAKCIJE
dH ₂ O			3,69
PCR pufer II	10 x	1 x	1,50
MgCl ₂	25 mM	2 mM	1,20
otopina Q			3,00
dNTP	2,5 mM	250 μM	1,50
VNTR-2 „forward“ početnica	10 μM	0,5 μM	0,75
VNTR-2 „reverse“ početnica	10 μM	0,5 μM	0,75
Taq polimeraza	5 U/μl	0,55 U	0,11
DNA kalup		100 ng/μl	2,50
Konačni volumen			15,00

Volumen pojedinih komponenata izračunat je iz iste formule kao i za prethodni polimorfizam, a omjer nukleotida u dodanoj smjesi i postupak pripreme također su bili jednaki. Umnažanje u uređaju za PCR odvijalo se kroz 45 ciklusa prema odgovarajućim parametrima (Tablica 3.4.), a gotovi produkti PCR-a čuvani su na 4 °C.

Tablica 3.4. Temperaturni i vremenski profil za lančanu reakciju polimerazom za genotipizaciju polimorfizma VNTR-2.

parametri	početna denaturacija	denaturacija	naliježanje početnica	produljivanje lanaca	završna ekstenzija
temperatura	95 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
vrijeme	90 s	25 s	25 s	20 s	7 min