

# Enzymatische activiteit bij het GAA-gen

Lauren Foccart

## Introductie

Het GAA gen is gelegen op 17q25.3. Dit betekent dat het gelegen is op chromosoom 17 op plaats 25.3. Het gen bevat 20 exons waarvan het eerste exon niet-coderend is. Het GAA gen codeert voor het alpha-1,4-glucosidase enzym dat glycogeen afbreekt in de lysosomen. Mutaties in het gen kunnen gelinkt worden aan de ziekte van Pompe. De ziekte uit zich in spiervzwakking en ademhalingsproblemen op volwassen leeftijd. De diagnose kan op twee manieren worden gesteld. De eerste manier is een moleculaire test. Namelijk Sanger Sequencing. Anderzijds kan er een biochemische test worden uitgevoerd naar de activiteit van alpha-1,4-glucosidase. Hierbij is het staal positief bij een lage waarde. Om te kijken of er een correlatie is tussen SNP's in het DNA en hun enzymatische activiteit worden enkele stalen met elkaar vergeleken. De SNP's dat hier vergeleken worden zijn p.Asp91Asn, p.His199Arg, p.Arg223His, p.Glu689Lys en p.Val780Ile.

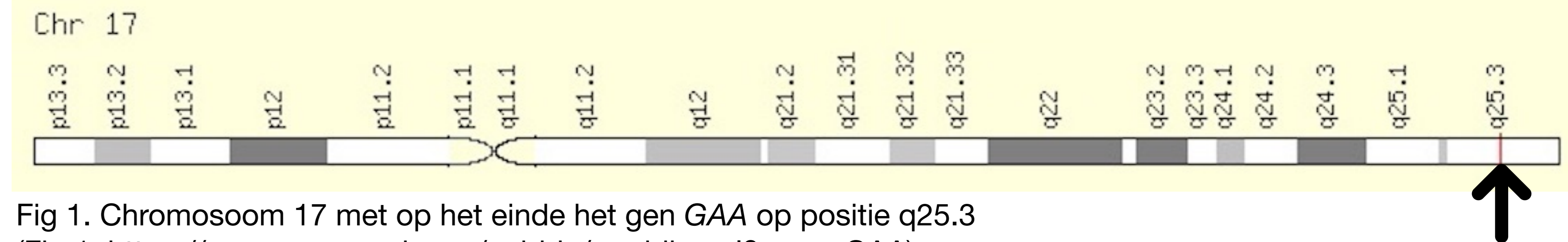
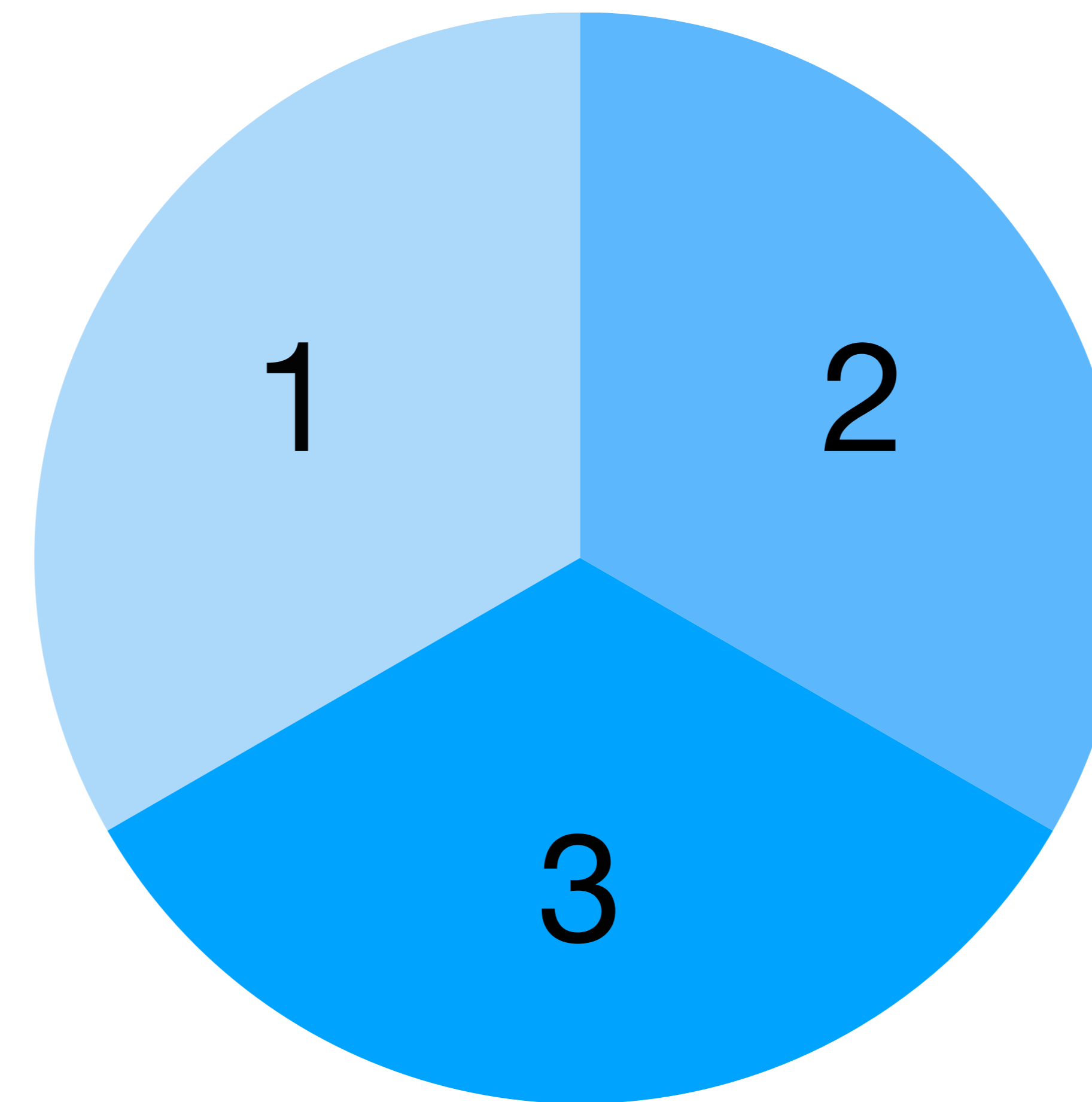


Fig 1. Chromosoom 17 met op het einde het gen GAA op positie q25.3  
(Fig 1. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GAA>)

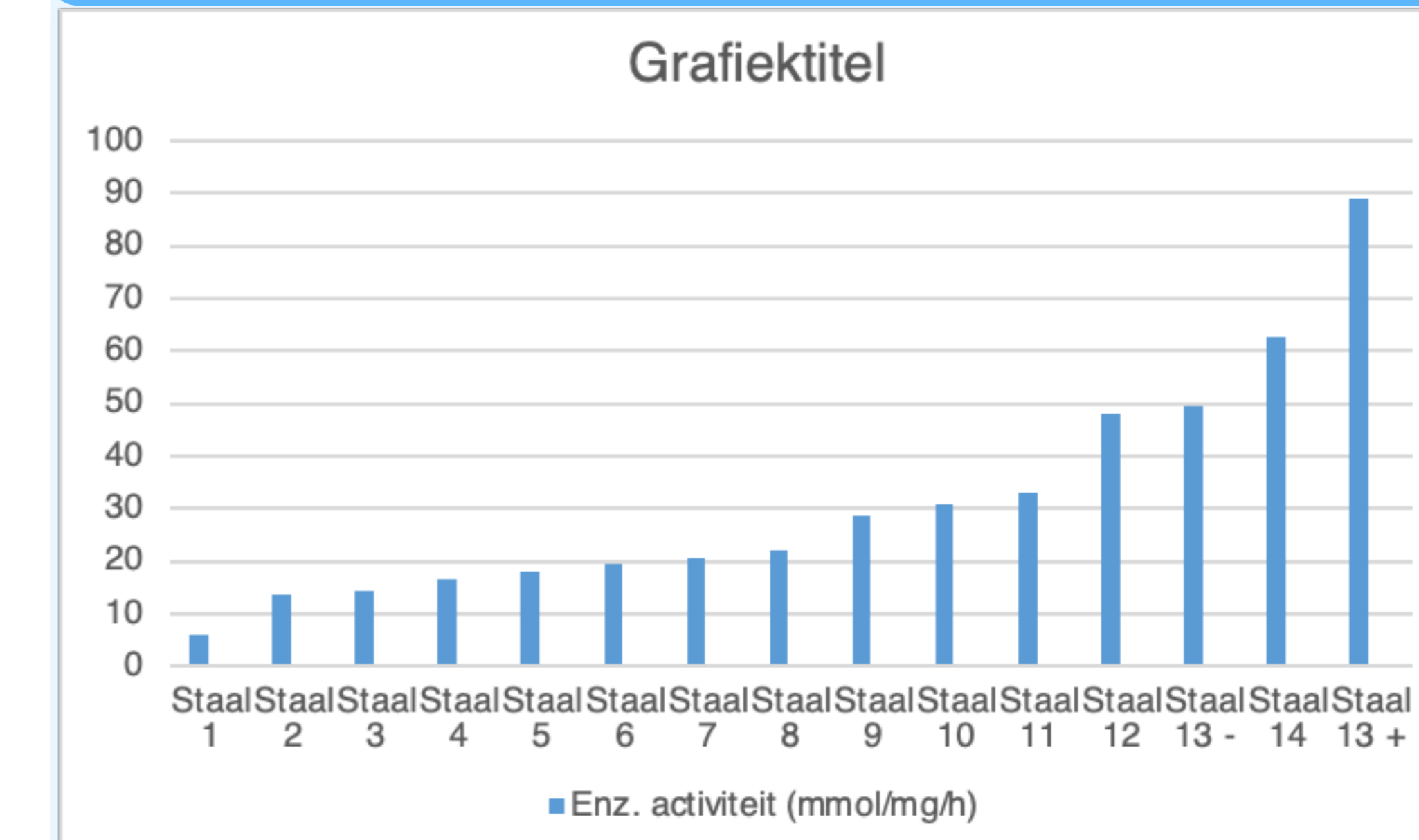
## 1. Materiaal & Methode

- Amplificeren van het DNA met PCR (met onderstaande PCR cycli)
- Controle PCR fragmenten met Microchip Elektroforese
- Verwijderen overige dNTP's met enzymatische zuivering
- Binden van de M13 Forward en Reverse primers
- Verlenging van DNA ketens aan de M13 primers met dNTP's en ddNTP's
- Automatisch aflezen van de DNA ketens

PCR Cyclus	Voor IDT			Voor MgCl3		
	Tijd	Temp.	Cycli	Tijd	Temp.	Cycli
Denaturatie	3'	95°C	1X	5'	95°C	
Denaturatie	15"	95°C		30"	95°C	
Annealing	15"	65°-54°C	22X	30"	63°C	32X
Extensie	30"	72°C		30"	72°C	
Denaturatie	15"	95°C				
Annealing	15"	54°C	10X			
Extensie	30"	72°C				
Finale extensie	7'	72°C	1X	30"	72°C	1X
Koeling		10°C			10°C	



## 2. Resultaten



In de grafiek is de enzymatische activiteit van de stalen weergegeven. De referentiewaarden zijn 18,6-56,7 mmol/mg/h.

SNP's	Heterozygoot	Homozygoot	Totaal
p.Asp91Asn	8,10,13	/	3
p.His199Arg	1,4,8,9,10,11,12	2,3,5,13,14	12
p.Arg223His	1,4,8,9,10,11,12	2,3,5,13,14	12
p.Glu689Lys	13	/	1
p.Val780Ile	1,4,8,9,10,11,12	2,3,5,13,14	12

De tabel geeft weer welke SNP's er zijn onderzocht en in welke stalen ze voorkomen. Ook wordt er een onderscheid tussen heterozygoot en homozygoot gemaakt. Staal 6 en 7 hebben geen SNP's

## 3. Discussie & conclusie

Het p.Glu689Lys komt maar voor bij 1 staal. Dit staal heeft ook een hoge enzymatische waarde. Deze SNP bevindt zich in het katalytische deel van het enzym en kan dus een oorzaak zijn voor een hoge enzymatische waarde. Om dit verder te bewijzen zou dit staal verder kunnen vergeleken worden met stalen dat deze SNP ook bevatten. Of de mutatie in een referentiestreng plaatsen en eiwit te laten produceren. Daarna kan dan de enzymatische activiteit gemeten worden. De SNP komt maar voor bij 3,5% voor bij de totale bevolking dus het is niet evident om nog andere stalen te vinden met deze SNP. Er zijn ook 2 stalen dat geen van deze 5 SNP's hebben. Deze stalen zijn dus exact hetzelfde als de referentiestreng.

Er kan geen sluitend antwoord gegeven worden op de vraag of enkele SNP's de enzymatische activiteit kunnen verhogen.