Zdravotně sociální fakulta
Faculty of Health and Social Sciences

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
University of South Bohemia in České Budějovice

Optimalizace metody PCR-RFLP pro analýzu polymorfizmu Val/Met v genu *COMT*.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Lenka Vokálková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Optimalizace metody PCR-RFLP pro analýzu polymorfizmu Val/Met v genu COMT jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5. 2018 .....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Ing. Tomášovi Nixovi Ph. D. za vedení mé bakalářské práce, cenné rady a odborný dohled. Děkuji také genetické laboratoři Genlabs, s. r. o za poskytnutí vzorků nezbytných k provedení praktické části bakalářské práce.

Optimalizace metody PCR-RFLP pro analýzu polymorfizmu Val/Met v genu *COMT*.

Abstrakt

Tématem této bakalářské práce je Optimalizace metody PCR-RFLP pro analýzu polymorfizmu Val/Met v genu *COMT.*

Prvním cílem práce bylo seznámení se s faktory souvisejícími s vrozeným rizikem pro schizofrenii. Tomuto cíli je věnována teoretická část, ve které je definováno onemocnění schizofrenie.

Nejprve je zmíněná historie a etiologie onemocnění. Dále jsou zde popsány klinické projevy schizofrenie, diagnostika a následná léčba.

Důležitou částí je i vysvětlení souvislost mezi schizofrenií a polymorfismy v genu *COMT* a s tím související role dopaminu. Vedle toho jsou zde vysvětleny i souvislosti vzniku schizofrenie s dalšími negenetickými faktory.

V dalších kapitolách je popsána funkce genu *COMT* a role stejnojmenného enzymu COMT. Další části se věnují polymorfismu val158/met v genu *COMT* a metodám vhodných pro detekci tohoto typu mutace. Především jsou rozvinuty metody použité v praktické části bakalářské práce.

Jako další cíle bakalářské práce jsem si stanovila optimalizaci metody PCR-RFLP pro vyšetření polymorfizmů Val/Met v genu *COMT*, který zvyšují riziko pro schizofrenii a následně analýzu několika vzorků jedinců s výskytem schizofrenie v rodině. Těmto cílům je věnovaná praktická část práce, ve které jsou popsané postupy, pomocí kterých jsem výsledků dosáhla.

Kromě metody PCR-RFLP byla využita i metoda ARMS-PCR. Vhodnost použití těchto metod je diskutována v závěru bakalářské práce.

Klíčová slova

Schizofrenie; *COMT*; dopamin; PCR-RFLP; ARMS-PCR

The Optimalization of the method PCR-RFLP for the analysis of polymorphism Val/Met in the gene COMT.

Abstract

The topic of this bachelor thesis is the optimalization of the method PRC-RFLP for the analysis of polymorphism Val/Met in the gene COMT.

The first goal of this thesis was to familiarization with factors of congenital risks for schizophrenia. The theoretical part is devoted to this matter, in which the disease of schizophrenia is defined.

In the First part the history and etiology of this disease is mentioned. Then the clinical signs of schizophrenia, the diagnostics and threatment of the disease.

The important part is also the explanation of the connection between the schizophrenia and polymorphisms in the gene COMT and the role of dopamine connected with it. Next to this issue, the connection of the onset of schizophrenia with other non-genetic factors is being explained.

In the next chapters the function of the gene COMT and the role of the enzyme COMT is being described. Other chapters are devoted to the polymorphism val158/met in the gene COMT and the methods appropriate for detection of this type of mutation. Primarily the methods used in the practical part of this bachelor thesis are being developed.

I have set as other goals of my bachelor thesis the optimalization of the method PRC-RFLP for the examination of polymorphisms Val/Met in the gene COMT, which are increasing the risks of schizophrenia and also the analysis of several samples of individuals with the incidence of schizophrenia in the family. The practical part of this thesis is dedicated to these goals, in which the above procedures, that helped me to archive my results, are being described.

I have used the method PRC-RFLP and also the method ARMS-PCR. The suitability of the use of these methods is discused in the last part of this bachelor thesis.

Keywords:
Schizophrenia; COMT; dopamine; PCR-RFLP;ARMS-PCR

Obsah

1 TEORETICKÁ ČÁST 11

1.1 Schizofrenie 11

1.1.1 Historie 11
1.1.2 Epidemiologie 12
1.1.3 Klinický obraz 12
1.1.4 Laboratorní vyšetření schizofrenie 12
1.1.5 Symptomy 13
1.1.6 Formy onemocnění 14
1.1.7 Faktory ovlivňující vznik schizofrenie 16
1.1.8 Léčba 17

1.2 Gen COMT 17

1.2.1 Funkce COMT 17
1.2.2 Polymorfismy genu COMT 21

2 PRAKTICKÁ ČÁST 27

2.1 Cíle práce 27

2.2 Informace o pracovišti 27

2.3 Výzkumný materiál 27

2.4 Potřebné vybavení k vykonání praktické části 27

2.4.1 Spotřební materiál 28

2.5 Izolace DNA z bukálních stěrů 28

2.5.1 Reagencie 28
2.5.2 Postup 28

2.6 Precipitace DNA 29

2.6.1 Reagencie 29
2.6.2 Postup 29

2.7 Měření koncentrace DNA 30

2.8 Příprava gelu a elektroforéza 30

2.8.1 Reagencie 30
2.8.2 Postup 30

2.9 Vyšetření genu COMT metodou ARMS-PCR 31

2.10 Vyšetření genu COMT metou PCR-RFL 34

2.10.1 Reagencie 35
2.10.2 Postup restrikčního štěpení PCR produktu 36

3 VÝSLEDKY 38

3.1 Měření koncentrace 38

3.2 Optimalizace metody ARMS-PCR 40

3.2.1 Vyšetření č . 1 40
3.2.2 Vyšetření č. 2 41
3.2.3 Vyšetření č. 3 44
3.2.4 Vyšetření č. 4 46
3.2.5 Vyšetření č. 5 47
3.3 Vyšetření vzorků metodou ARMS-PCR 50
3.4 Optimalizace metody PCR-RFLP 52
3.4.1 Vyšetření č. 1 52
3.4.2 Vyšetření č. 2 53
3.5 Vyšetření vzorků metodou PCR-RFLP 54
4 DISKUZE 57
5 ZÁVĚR 59
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ 61
Seznam Obrázků 64
Seznam tabulek 64

Úvod

Schizofrenie je onemocnění, které lidstvo doprovází již od nepaměti. Již před několika tisíci lety bylo popsáno nejen v lékařské literatuře, ale i v životopisech několika známých osobností, jako byla například Johanka z Arku nebo Isaac Newton.

Jedná se o psychické onemocnění postihující muže i ženy s nejčastějším projevem během dospívání. Diagnostika schizofrenie může být v některých případech obtížná, neboť příznaky mohou být různorodé a nejčastěji pacient trpí kombinacemi různých symptomů.

Mezi nejčastější příznaky, které také bývají často důvodem k návštěvě psychologa, patří zejména halucinace jak vizuální, tak i sluchové nebo fyzické, bludy nebo poruchy myšlení.

Mezi další symptomy, které zpravidla nejsou na první pohled zřetelné a pro jejich určení je zapotřebí důkladnějšího vyšetření, řadíme ztrátu sociálního cítění, uzavírání se do sebe, neschopnost prožitku radosti nebo například ztrátu empatie.

V dnešní době se prevalence onemocnění pohybuje přibližně kolem jednoho procenta. Nelze určit jednoznačnou příčinu vzniku schizofrenie. Ke vzniku psychózy přisuzujeme více důvodů.

Předpoklady pro pozdější propuknutí onemocnění mohou být dány podmínkami během vývoje plodu ještě před narozením. Negativní vliv na vývoj plodu jako jsou například hladovění matky nebo prodělání virové infekce mohou ovlivnit vývoj mozku.

Další příčinou může být např: užívaní omamných látek, kdy simulanty ovlivňují dopaminový systém a způsobují nadměrné uvolňování dopaminu. A to i po několika měsících abstinence.

V posledních letech se také spojuje vznik schizofrenie s genetickými předpoklady. Nejznámější gen spojený se schizofrenií je gen *COMT*. Tento gen řídí aktivitu enzymu katechol-O-methyltransferázy (COMT), který udržuje optimální hladinu neurotransmiterů v prefrontální oblasti.

Na pozici 158 se vyskytuje polymorfizmus známý jako Val/Met. Gen *COMT* se tak může vyskytovat ve třech různých genotypech. Nejčastější genotyp je Val/Met. Jedinci s tímto genotypem bývají označovány jako zdraví, neboť aktivita enzymu COMT je optimální.

Méně častý genotyp je Met/Met. Lidé s tímto genotypem mívají sníženou aktivitu enzymu COMT, čímž dochází k pomalejšímu odbourávání neurotransmiterů. Hromaděním zejména noradrenalinu může pak dojít ke zvýšené agresi.

Nejméně častý je potom genotyp Val/Val, který má za následek zvýšenou aktivitu enzymu COMT a tudíž nízkou hladinu dopaminu. To může mít za následek zvýšenou náchylnost k závislostem. Nedostatku dopaminu také přisuzujeme vznik psychóz a vyšší riziko ke vzniku schizofrenie.

Detekce polymorfizmu Val/Met na pozici 158 v genu bývá v poslední době důležitou součástí při posuzování stavu pacienta. Mezi nejpoužívanější metody pro vyšetření patří alel specifická PCR a PCR-RFLP. Tyto metody jsou rychlé a relativně levné. Dále je pak možné využít metody, jako jsou například sekvenovaní nebo Real time PCR. Tyto metody jsou ale nákladnější a je zapotřebí speciálního vybavení.

1 Teoretická část

1.1 Schizofrenie

Již několik tisíc let se v lékařské literatuře objevují popisy příznaků, které jsou typické pro schizofrenii. První ucelená zmínka pochází z roku 1853 od B. A. Morela. Ten jí popisuje jako projevy psychózy, které se začínají projevovat v adolescentním věku. Nazval ji „démence précoce “ (Uhrová, 2011).

Pojem psychóza vyjadřuje těžkou duševní poruchu. Vztahy pacienta k okolí, realitě i sobě samotnému jsou narušeny nebo úplně chybí. To vede ke změně chování pacienta. Schizofrenik také trpí halucinacemi a bludy. (Češková a kolektiv, 2006)

Pojem schizofrenie zavedl Bleueler ve 20. století. Termín schizofrenie lze přeložit jako „rozštěp mysli. “ Podle Bleuelera tento pojem vystihuje rozštěpení mentálních funkcí člověka (Uhrová, 2011).

1.1.1 Historie

Schizofrenie je onemocnění, které lidstvo provází už od nepaměti. Dříve byli lidé trpící duševním onemocněním společnosti k posměchu nebo dokonce obav, ze kterých se stala předpojatost vůči nemocným (Orel, 2012).

Často se můžeme se schizofrenií setkat i v životopisech některých známých historických osobností. Například u francouzské hrdinky Johanky z Arku, fyzika a matematika Isaaca Newtona, nebo hudebního skladatele Georgeho Friedricha Händela (Orel, 2012).

Nejstarší doložená zmínka pochází z období cca 2000 let př. n. l. ze středověkého Egypta. Konkrétně z *Ebersova papirusu.* Zmínky o schizofrenii můžeme také nalézt v hebrejské bibli, odkud pochází pojem „mešuge“[1], kterým se tato nemoc označovala (Orel, 2012).

O schizofrenii projevovali zájem rovněž staří Řekové (427-377 př.n.l.). Nejznámějšími badateli z tohoto období jsou Platon, Aristoteles, nebo Hippokrates (Orel, 2012).

Teprve až Benedict Augustin Morel (1809-1873) vypracoval srozumitelnou charakteristiku psychického onemocnění, které dnes nazýváme schizofrenie. Popis toho onemocnění představil ve své práci *Léčba duševních onemocnění* (Orel, 2012).

[1] [1] „mešuge“ = bláznivý, potrhlý

Až 24. dubna 1908 zpochybnil švýcarský psychiatr a profesor Univerzity v Curychu Paul Eugen Bleuler pojem „demence precle“. Zpochybnil také názor, že za duševním onemocněním stojí organické poškození mozku. Bleuer byl přesvědčen, že za jejich příčiny může i psychický původ (Orel, 2012).

1.1.2 Epidemiologie

V současné době se prevalence tohoto onemocnění pohybuje kolem jednoho procenta. V Evropě schizofrenie postihuje přibližně 5 milionů lidí (Mohr, 2012).

Jedná se o jednu z nejzávaznějších chorob nejen v oboru psychiatrie, ale i v celé medicíně. Postihuje stejně muže i ženy. Nejčastěji se začíná projevovat v období dospívání (Mohr, 2012).

Schizofrenie má negativní dopad na okolí a rodinu postiženého jedince, ale i na celou společnost. Léčba je nákladná, pracovní neschopnost při léčbě je až 100 dnů. Schizofrenie zvyšuje mortalitu, pacientům se schizofrenií se průměrně zkracuje život až 25 let oproti běžné populaci. A tento rozdíl stále narůstá. Příčinou jsou sebevraždy, ale také zdravotní komplikace, jako například kardiovaskulární choroby, metabolické nebo endokrijní poruchy (Mohr, 2012).

1.1.3 Klinický obraz

Nástup nemoci bývá nejčastěji v období dospívání a v mladém věku. Málo kdy se schizofrenie objeví nečekaně. Většinou jí předchází období, které může trvat měsíce nebo roky. Během toho období se postupně mění chování dítěte. Uzavírají se do sebe a přerušují sociální kontakty. Přestávají rozumět světu kolem nich. Proto se také v tomto období stávají členy různých sekt, hledají tam vysvětlení (Praško, 2005).

Diagnóza schizofrenie bývá obtížná. Schizofrenie se vyznačuje více příznaky a symptomy. Tyto symptomy mohou být příčinou i jiných psychických poruch. Například halucinace a bludy mohou být způsobeny psychózou ale i vlivem drog, metabolickým nebo neurologickým onemocněními, nebo nádorem mozku (Zvolský, 1997).

1.1.4 Laboratorní vyšetření schizofrenie

V poslední době nabývá laboratorní vyšetření v psychiatrické praxi na významu. Zejména jsou důležitá biochemická vyšetření, vyšetření CNS použitím zobrazovacích

technik, endokrinologická vyšetření nebo genetická vyšetření. U alkoholiků nebo drogově závislých pacientů je také možné kontrolovat léčbu monitorováním koncentrace omamných látek v krvi (Zima, 2007).

V případě schizofrenie psychiatr doporučuje následující vyšetření:

- Biochemická vyšetření: stanovení iontů (Na, K, Cl, Ca), glykémie, urea, kreatin, jaterní enzymy, fT_4, TSH, koncentrace B_{12}
- Hematologické vyšetření: krevní obraz, diferenciální rozpočet bílých krvinek
- Toxikologické vyšetření moči
- Screening na syfilis, lymeskou boreliózu, HIV
- EKG, EEG- CT, neurologická vyšetření
- Rtg hrudníku, má-li lékař podezření na onemocnění plic nebo srdce
- Stanovení koncentrací použitých léčiv v krvi během terapie
- Genetická vyšetření

(Zima, 2007)

1.1.5 Symptomy

Symptomy schizofrenie řadíme do dvou kategorií. Pozitivní psychotické příznaky a negativná příznaky (Češková a kolektiv, 2006).

1.1.5.1 Pozitivní symptomy

Pozitivní symptomy jsou ty, které jsou pro psychiatra prvně viditelné. Často to bývají halucinace, bludy nebo porucha myšlení. Tyto příznaky bývají často důvodem hospitalizace pacienta (Češková a kolektiv, 2006).

1.1.5.2 Negativní symptomy primární

Negativní primární příznaky jsou důsledkem snížené dopaminergní aktivity. Mezi tyto příznaky patří ochuzení řeči a myšlení, ztrátu sociálního cítění, neschopnost prožitku radosti. Pacient se uzavírá do sebe, ztrácí motivaci a emotivitu. Právě ty tyto příznaky mají za následek funkční neschopnost člověka (Češková a kolektiv, 2006).

1.1.5.3 Negativní symptomy sekundární

Negativní sekundární příznaky jsou spojené s pozitivními. Například halucinace mají za následek ztrátu schopnosti komunikace s okolím (Češková a kolektiv, 2006).

1.1.5.4 Charakteristické symptomy schizofrenie

Rozdělení symptomů na pozitivní a negativní z publikace Psychiatrie (Eva Malá, Pavel Pavlovský).

Pozitivní symptomy

- Bludné představy a myšlenky
- Halucinace
- Dezorganizace řeči
- Dezorganizované chování, katatonií projevy

Negativní symptomy

- Otupění a oploštění emocí
- Úpadek vůle, iniciativy a spontánnosti
- Chudost řeči
- Ztráta zájmů, bezcílnost, nečinnost
- Ztráta vztahů k okolí a výrazná sociální izolace

(Malá a Zvoský, 2002)

1.1.6 Formy onemocnění

Pacienti trpící schizofrenií mají velmi různé, proměnlivé příznaky. Díky tomu došlo k rozdělení do několika forem. Členění schizofrenního obrazu pomáhá ke zlepšení diagnózy, lepší komunikaci s pacientem a také diferenciovanou péčí o ně (Höschl, 2002).

1.1.6.1 Paranoidní forma schizofrenie

Tato forma schizofrenie je charakteristická bludy, které jsou často doprovázené halucinacemi. Bludy se vyvíjí různým tempem. Mají za následek narušení osobnosti a jejích vztahů. Pacient je bludy ovlivňován (Höschl, 2002; Raboch, 2001).

Halucinace bývají nejčastěji sluchové komplexní halucinace verbální. Pacient slyší hlasy nebo hovory komentující jeho osobu. Tyto sluchové halucinace bývají často

doprovázeny halucinacemi tělovými, čichovými, chuťovými, kinestetickými nebo viscentrálními (Höschl, 2002).

1.1.6.2 Heberferenní forma schizofrenie

Tato forma schizofrenie připomíná symptomy předčasnou demenci. Pacienti s touto formou schizofrenie se vyznačují pošetilostí, nepřiléhavostí chování a emocí a dezorganizací duševního života (Höschl, 2002; Raboch, 2001).

Heberfrenici se často při řešení životních událostí vracejí k dětinským způsobům. Jsou emočně proměnlivý a jejich projevy chování bývají nepředvídatelné. Kontakt s nemocným bývá složitý, projevit i agresi (Höschl, 2002).

1.1.6.3 Katatonní forma schizofrenie

Pacienti trpící katatonií formou mívají poruchy hybnosti. Motorická aktivita může být extrémně zvýšena vedoucí až k bezcílnému neklidu, nebo naopak výrazně snížena Velice často se u nich objevuje bezcílnost, neodůvodněnost a nepřiměřenost motorických projevů (Höschl, 2002; Raboch, 2001).

Katatonní forma se také vyznačuje stereotypy v jednání, verbálním projevu nebo chování. Pacient není schopen zformovat složitější postupy, proto setrvává v určitém programovém bloku. Negativističtí katatonici setrvávají často i sebepoškozujícím jednání (Höschl, 2002).

1.1.6.4 Simplexní forma schizofrenie

Simplexní forma schizofrenie je popisována změnami v chování. Pacient ztrácí vztah s okolním světem. Může se zdát, že ztrácí chuť do života. Nezvládá nároky běžného života a jeho emotivita se zplošťuje (Höschl, 2002; Raboch, c2001).

Symptomy bývají neurotického charakteru, například úzkost nebo hysterické projevy. Mění vztah vůči rodině, škole či zaměstnání (Höschl, 2002).

1.1.6.5 Nediferencovaná forma schizofrenie

Do této kategorie spadají pacienti, u kterých se objevuje více příznaků z jiných forem. Nelze je tak tedy zařadit do žádné skupiny (Höschl, 2002).

1.1.6.6 Reziduální schizofrenie

Reziduální schizofrenie označuje stav, kdy příznak jsou málo intenzivní. Mezi hlavní projevy patří lenošnost, nemotivovanost, zanedbávání sebe a svého okolí

a emotivní zploštělost. Tito schizofrenici bývají označováni jako podivíni (Höschl, 2002).

1.1.7 Faktory ovlivňující vznik schizofrenie

1.1.7.1 Omamné látky

Jednou z teorií je, že užívání konopí či jiných omamných látek může vyvolat onemocnění schizofrenie. I několik dávek stimulantu může senzibilizovat dopaminový systém, což může vést k trvalému nadměrnému uvolňování dopaminu. A to i po několika měsících abstinence (Howes, 2009).

1.1.7.2 Prenatální vlivy

Komplikace během perinatálního vývoje mohou mít za následek zvýšené riziko onemocnění schizofrenií. Rizikový je především druhý trimestr. Vlivy prostředí mohou narušit vývoj fetálního mozku plodu (Bankovská Motlová a Španiel, 2017).

Například prodělání virové infekce může poškodit fetální mozek plodu. Dalším rizikovým faktorem může být hladovění během těhotenství. Dochází k poškození metabolismu a mozek není dostatečně vyživován tak, aby se mohl správě vyvíjet. Jedním z faktorů může být i stáří otce. Čím je otec starší, tím větší je riziko, že potomek bude nemocný. Vysvětlením může být vytváření de novo mutací u starších otců. Jedná se o mutaci, která není přítomná ani u jednoho z rodičů nemocného potomka. Ke vzniku mutace dochází až v pohlavní buňce (Bankovská Motlová a Španiel, 2017).

1.1.7.3 Genetické faktory

Vedle vnějších faktorů jako jsou špatné vlivy na plod během vývoje nebo užívání konopí, může být schizofrenie geneticky podmíněná. Trpí-li schizofrenií jeden z rodičů, je šance že jí bude mít potomek přibližně 10% (Compton, 2006).

Nejedná se přímo genetické onemocnění. Dědí se pouze dispozice onemocnět. Aby onemocnění propuklo, musí se u člověka sejít více genů. Některé geny mohou být předávány z generace na generaci, bez toho aniž by se nějak projevily (Compton, 2006).

Nejznámější gen, který je spojován se schizofrenií, je gen *COMT*. Konkrétně polymorfismus val158/met (Compton, 2006).

1.1.8 Léčba

V dnešní době je cílem lékařů nejen odstranit symptomy schizofrenie, ale i celkové uzdravení pacienta. Nejčastěji se pro uzdravení používá kombinace farmakoterapie a psychosociálních intervencí (Bankovská Motlová a Španiel, 2017).

Farmakoterapie využívá antipsychotika k odstranění příznaků. Psychosociální intervence pomáhá vyřešit problémy, které farmakoterapií vyléčit nelze. Například strach z relapsu onemocnění, bezradnost z důsledku nedostatku informací o nemoci a její léčbě, výskyt tělesných onemocnění nebo neschopnost zvládat běžné životní situace (Bankovská Motlová a Španiel, 2017).

1.2 Gen COMT

Gen *COMT* se je lokalizován na 22 chromozomu v oblasti dlouhého ramena (q) na pozici 11. 21. Tento gen kóduje 271 aminokyselin a jeho molekulární hmotnost je rovna 30037 Da (COMT gene, © 2007).

Jedná se o gen, který reguluje produkci enzymu COMT (celým názvem katechol-O-methyltransferáza). COMT se vyskytuje ve dvou formách- delší forma se nazývá membránově vázaná katechol-O-methyltransferáza (MB-COMT), která je produkována nervovými buňkami v mozku. Kratší forma enzymu nazvaná rozpustná katechol-O-methyltransferáza (S-COMT) se tvoří ve tkáních, játrech, ledvinách a v krvi. Tato forma pomáhá kontrolovat hladiny určitých hormonů (COMT gene, © 2007).

1.2.1 Funkce COMT

COMT je důležitý zejména v oblasti zvané perfrontální kůra. Je to část mozku, která organizuje a reguluje veškeré informace z ostatních oblastí mozku. Perfrontální kůra je také spojována s tvorbou osobnosti, plánováním, sebekontrolou, abstraktním myšlením, emocemi a krátkodobou pamětí (Tunbridge, 2013).

Pro správné fungování prefrontální kůry je důležitá přiměřená hladina neurotransmiterů, kterou pomáhá regulovat enzym COMT (Tunbridge, 2013).

1.2.1.1 Neurotransmitery

Neurotransmiter je chemická látka uvolňována z nervového zakončení na synapsi. Slouží k přenosu signálu z jedné nervové buňky do druhé, a následně z nervové buňky na buňku cílovou (např. buňky svalových vláken). Mezi nejdůležitější neurotransmitery patří například dopamin nebo noradrenalin (Vodrážka, 1996).

1.2.1.1.1 Serotin

Serotin je neurotransmiter vznikající přeměnou aminokyseliny tryptofan, která je získávána z potravy. Je lokalizován především v raphe nuclei ve středním mozku, mostu a míše. Periferně se nachází v trombocytech, žírných buňkách nebo enterochromafinních buňkách gastro-intestinálního traktu (Höschl et al, 2004).

Zhruba 1 milion mozkových neuronů jsou serotiny. Každý serotonergní neuron může ovlivňovat až 500 000 cílových buněk (Höschl et al, 2004).

Funkce serotinu je spolupodílení na některých psychických proces, jako jsou například deprese, úzkost, agresivita, spánek, příjem potravy, bolest, nebo sexuální chování. Při deficitu serotinu může dojít k špatnému vývoji mozku (Höschl et al, 2004).

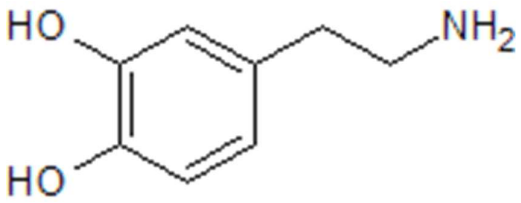
1.2.1.1.2 Dopamin

Dopamin, nebo-li dopaminrgní neuron, se nachazí především v substantia nigra a ventrální tegmentální oblasti, dále také v periakvenduktální šedi, hypotalamu, bulbus olfactorius nebo v retině. Jejich zastoupení v CNS není příliš vysoké. Pouze 1 z milionu neuronu má funkci dopaminu. Vzniká syntézou z tyrozinu (Höschl et al, 2004).

Nejdůležitější roly hraje tento neurotransmiter ve třech dopaminových drahách. Těmi jsou nigrostrinální dráha, mezokortikolimbická dráha a tuberofundibulární dráha. Nigrostrinální dráha má vliv například na motorické funkce nebo psychotické projevy (Höschl et al, 2004).

Nadbytek a nedostatek této zásadní chemické látky je příčinou několika chorobných stavů. Parkinsonova nemoc a drogová závislost jsou některé z příkladů problémů spojených s abnormálními hladinami dopaminu (Mandal, 2017).

Chemická struktura dopaminu je znázorněná na obrázku 1 (Obr 1).



Obr. 1 -Chemická struktura dopaminu (zdroj: autor).

1.2.1.1.2.1 Funkce dopaminu v pohybu

Část mozku nazývaná bazální ganglia reguluje pohyb. Funkce bazálních ganglií závisí na určitém množství dopaminu. Účinek dopaminu se přenáší prostřednictvím

dopaminových receptorů, D1-5. Dochází tak k přeměně abstraktní myšlenky na vykonaný pohyb (Mandal, 2017).

Pokud je v mozku nedostatek dopaminu, pohyby mohou být zpožděny a nekoordinované. Na druhou stranu nadbytek dopaminu způsobuje, že tělo dělá zbytečné pohyby, jako jsou například opakované tiky (Mandal, 2017).

1.2.1.1.2.2 Vliv dopaminu na prožívání radosti

Dopamin je látka, která zprostředkovává potěšení v mozku. Je uvolněna během příjemných situací a povzbuzuje, abychom hledali příjemnou činnost nebo povolání (Mandal, 2017).

To znamená, že jídlo a některé návykové látky jsou také stimulátory uvolňování dopaminu v mozku (Mandal, 2017).

1.2.1.1.2.3 Vztah dopaminu k závislosti

Amfetaminy mají podobnou strukturu jako dopamin a mohou tak vstoupit do presynaptického neuronu přes transportéry dopaminu. Vstupováním amfetaminy vytlačí molekuly dopaminu ze svých skladových váčků. Zvyšováním koncentrace dopaminu, vede k většímu příjemnému pocitu a závislostem (Mandal, 2017).

1.2.1.1.2.4 Ovlivňování pozornosti hladinou dopaminu

Dopamin pomáhá v soustředění a pozornosti. Vidění usnadňuje dopaminu reakci v mozku a to zase pomáhá zaměření a nasměrování pozornosti. Dopamin je zodpovědný za určení toho, co zůstává v krátkodobé paměti na základě předpokládané odpovědi na určité informace. Zdá se, že snížené koncentrace dopaminu v prefrontální kůře přispívají k poruchám pozornosti (Mandal, 2017).

1.2.1.1.2.5 Regulace sekrece prolaktinu hladinou dopaminu

Dopamin je hlavní neuroendokrinní inhibitor sekrece prolaktinu z přední hypofýzy. Dopamin produkovaný neurony v obloukovitém jádře hypotalamu se uvolňuje v hypotalamo-hypofyzálních cévách. Tento proces působí na buňky laktotropu, které produkují prolaktin. Dopamin je příležitostně nazýván inhibitorem prolaktinu (PIF), hormonem inhibujícím prolaktin (PIH) nebo prolaktostatinem (Mandal, 2017).

1.2.1.1.2.6 Vliv dopaminu na sociální fungování

Nízká vazba na receptor D2 se vyskytuje u lidí se sociální úzkostí nebo sociální fobií. Některé znaky schizofrenie (sociální zdrženlivost, apatie) jsou v některých oblastech mozku spojeny s nízkým dopaminergním stavem (Mandal, 2017).

Na druhou stranu lidé s bipolární poruchou v manických stavech se stávají hypersociálními, stejně jako hypersexuálními. To je způsobeno zvýšenou hladinou

dopaminu. Mánie může být snížena anti-psychotiky blokujícími dopamin (Mandal, 2017.)

1.2.1.1.2.7 Hladiny dopaminu a psychózy

Abnormálně vysoký dopaminergní přenos byl spojen s psychózou a schizofrenií. Jak typická tak i atypická antipsychotika fungují převážně inhibicí dopaminu na úrovni receptoru (Mandal, 2017).

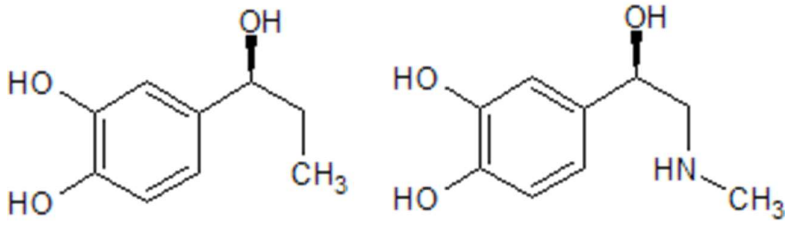
1.2.1.1.3 Noradrenalin a adrenalin

Noradrenalin je syntetizován z aminokyseliny tyrozin, která je přeměňována na dopamin a následně prostřednictvím β-hydrolázy dochází ke vzniku noradrenalinu. Nachází se v mostu a prodloužené míše (Höschl et al, 2004).

Ovlivňuje především cyklus bdění a spánku, proces učení, pozornost, bolest, úzkost, drogové závislosti, nebo deprese (Höschl et al, 2004).

Adrenalin vzniká konvertací noradrenalinu fenylanolamin-N-methyltransferázou. Jeho funkce v CNS není příliš objasněna (Höschl et al, 2004).

Chemická struktura adrenalinu a noradrenalinu je znázorněná na obrázku 2 (Obr 2).



Obr. 2 -Chemická struktura noradrenalinu (vlevo) a adrenalinu (vpravo) (zdroj: autor).

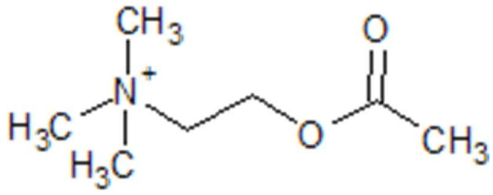
1.2.1.1.4 Acetylcholin

Acetylcholin vzniká z cholinu za účasti acetylkoenzymu A a cholinacetyltransferázy.

Acetylcholin má vliv na nikotinové a muskarinové receptory. Nikotinové receptory ovlivňují mechanizmus konginitivních poruch a uvolňování jiných neurotransmiterů. Tyto receptory jsou lokalizované v mozku a mozkovém kmeni.

Muskarinové receptory se nacházejí po celém těle a v CNS. Ovlivňují schopnost učení a paměti. Při jejich poruše dochází k poruchám spánků, či vzniku psychických onemocnění jako je např. schizofrenie (Höschl et al, 2004).

Na obrázku 3 je znázorněná chemická struktura acetylcholinu (Obr 3).



Obr. 3 -Chemická struktura acetylcholinu (zdroj: autor).

1.2.2 Polymorfismy genu COMT

Genový polymorfimus je stav, kdy pro určitý gen existují v populaci různé normální alely, které se vyskytují aspoň u 1 % populace. Mohou ovlivňovat některé vlastnosti výsledného proteinu, intenzitu jeho transkripce apod. Studium g. p. u genů pro nejrůznější molekuly (např. cytokiny, enzymy) je důležité pro možný vztah k určitým nemocem či procesům (funkční genomika) (Genový polymorfismus, © 2018).

V genu *COMT* se může vyskytnout jednonukleoidový polymorfismu. Jedním z polymorfismu může být například záměna guaninu (G) za adenosin (A) na pozici 158. Tento polymorfismus v sekvenci genu *COMT* je známý jako Val158Met. Může být také označován jako rs4680 (Matsuzaka, 2017).

V populaci se tak vyskytují tři různé genotypy s různou aktivitou enzymu COMT. Vysoká aktivita v genotypu Val/Val, střední aktivita ve Val/Met a nízká aktivita Met/Met. Rozdíl v aktivitě COMT může být trojnásobný až čtyřnásobný (Val/Val vs. Met/Met) (Matsuzaka, 2017).

Heterozygot Val/Met se vyznačuje optimální enzymatickou aktivitou. Je proto označován za zdravého jedince. Tento genotyp se v populaci objevuje nejčastěji (Compton, 2006).

Lidé, u kterých se objevuje genotyp Met/ Met, mívají sníženou aktivitu enzymu COMT. Dochází tak k pomalejšímu odbourávání neurotrasmiterů. Ty se pak hromadí a mohou způsobovat nadměrnou agresivitu jedince. Za tento jev je zodpovědný zejména noradrenalin (Compton, 2006).

Nejméně často se v populaci vyskytuje homozygot Val/Val, který má naopak enzymatickou aktivitu vysokou. Tím pádem dochází k rychlejšímu odbourávání neurotrasmiterů. Lidé s tímto genotypem jsou náchylnější k závislostem a při užívání omamných látek mají vysokou pravděpodobnost ke vzniku schizofrenie (Compton, 2006).

Vzhledem k jednoznačnému účinku tohoto polymorfismu na funkci COMT a k důkazu kritické role dopaminu v patofyziologii a léčbě psychózy existují silná předchozí očekávání, že Val/Met ovlivňuje náchylnost k schizofrenii a dalším psychiatrickým fenotypům (Williams et al. 2002).

1.2.2.1 Vyšetření polymorfismu genu COMT

V současné době můžeme zaznamenat velký rozvoj DNA a RNA diagnostiky. Čím dál více se také molekulární biologie začíná uplatňovat v různých lékařských oborech, jako jsou například mikrobiologie, imunologie nebo například i v psychiatrii (Zima, 2007).

Diagnostika DNA a RNA molekul umožňuje lépe chápat podstatu onemocnění a nasadit tak co nejúčinnější léčbu (Zima, 2007).

1.2.2.1.1 Metody izolace DNA

Jako biologický materiál pro izolaci DNA se požívá nesrážlivá krev nebo bukální stěr. Materiál by měl být kvalitní a čerstvý. Nejprve je zahájena lýza buněk. Do lyzátu se z buňky kromě DNA uvolní proteiny, RNA, lipidy, sacharidy a další nízkomolekulární látky, které je nutné odstranit (Šmarda, 2005).

Metody izolace DNA jsou založeny na rozdílné rozpustnosti makromolekul, adsorpce na pevný podklad, nebo ultracentrifugace v gradientních roztocích (Šmarda, 2005).

1.2.2.1.1.1 Izolace DNA pomocí fenol-chloroformu

Tato metoda se používá k odstranění proteinů z lyzátu. Fenol-chloroform je látka, která se nemísí s vodou. Po smíchání dochází k vytvoření dvou fází. Po důkladném promíchání dojde k denaturaci proteinů, které se následně vysráží. Je to způsobeno tím, že jednotlivé aminokyseliny mají různou polaritu. Část řetězce je rozpustná ve vodě a část ve fenolu. To má za následek, že se proteiny usazují na rozhraní fází. Opakovaným přidáváním fenol-chloroformu a odebíráním vody dochází k čištění DNA od proteinů a tuků (Šmarda, 2005).

1.2.2.1.1.2 Izolace DNA pomocí gravitačních kolonek

Jedná se o metodu, která je v dnešní době nejčastěji používanou. Metoda je rychlá a spolehlivá. K Izolaci DNA se používají speciální kolonky, které jsou součástí komerčního kitu (Novotný, © 2014).

Na gravitačních kolonkách je přítomný metrix, na který se naváže DNA z lyzátu. Poté se přidáním promývacího pufru DNA pročistí. V posledním kroku se DNA z metrixu oddělí elučním pufrem a centrifugací (Novotný, © 2014).

1.2.2.1.1.3 Izolace DNA pomocí chelexu

Tato metoda je vhodná pro PCR reakce. Jedná se o rychlou metodu, ale izolovaná DNA není příliš čistá. Proto pro jiné analýzy není vhodná (Novotný, © 2014).

Chelex je pryskyřice, která obsahuje párové iminodiacetátové ionty. Tyto ionty působí chelatačně a váží polyvalentní kovové ionty. Pro izolaci DNA jsou důležité ionty Mg^{2+} , které jsou důležité pro aktivitu nukleáz a také při vysoké teplotě (95 – 100 °C) vedou k poškození DNA (Novotný, © 2014).

1.2.2.1.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda PCR se začala používat v roce 1985 Kary B. Mullisem. Její objevení znamenalo pro molekulární biologii velký přínos. PCR je metoda, která se používá k rychlé amplifikaci úseku DNA. PCR je založená na podobném principu replikace nukleových kyselin v buňce (Šmarda, 2005).

Úsek, který chceme amplifikovat je ohraničený primery. Primery jsou oligonukleotidy, které jsou komplementární ke koncům vybraného úseku. Od primerů, které ohraničují úsek genu, probíhá syntéza DNA (Šmarda, 2005).

DNA polymeráza je získávána z termofilních mikroorganismů *Termus aquaticus*. Tyto mikroorganismy jsou odolné vůči vysokým teplotám, během kterých dochází

k denaturaci DNA. Takto izolovanou polymerázu nazýváme Taq DNA-polymeráza (Šmarda, 2005).

Nejprve při 94°C dochází k denaturaci DNA. Řetězce dvouvláknové DNA se od sebe oddělí. Na jednotlivá vlákna nasedají primery při teplotě 30-65°C. Při teplotě 65-75°C od těchto ohraničujících primerů dochází k syntéze nového řetězce DNA za pomoci DNA polymerázy. Tento cyklus se několikrát opakuje. Pro reakci využíváme přístroj termocykler (Šmarda, 2005).

1.2.2.1.2.1 Stanovení polymorfismu délky restrikčních fragmentů u produktů PCR (PCR-RFLP)

Metoda PCR-RFLP se skládá z několika kroků. Nejprve k izolované DNA přidáme primery a provedeme PCR. Podle použitých primerů, které nasedají na koncové oblasti, tak naklonujme určitou sekvenci DNA, často nějaký gen. Tyto sekvence mají stejnou délku. Produkty amplifikace detekujeme elektroforeticky (Šmarda, 2005).

Poté přidáváme restrikční endonukleázu, která PCR produkt specificky štěpí. Pro odečítání výsledků opět používáme elektroforézu (Šmarda, 2005).

1.2.2.1.2.1.1 Restrikční endonukleáza

Restrikční endonukleázy jsou enzymy získané izolací z celé řady bakteriálních rodů. Jsou pojmenovány pomocí prvního písmenka z názvu rodu a prvních dvou písmen názvu druhu bakterie. Bakterie používají tyto enzymy jako ochranu DNA proti virům (Stephenson, 2016).

Tyto enzymy štěpí molekuly DNA v místě přesně určeném pořadím bazí. Místa, která jsou enzymy schopny rozpoznat, mají obvykle délku 4 až 6 párů bází. Obecně platí, že čím je rozpoznávací sekvence kratší, tím větší počet fragmentů je štěpen (Stephenson, 2016).

1.2.2.1.2.2 Alelově specifická PCR (AS-PCR)

Jedná se o metodu využívající tzv. alelově specifické oligonukleotidy jako primery. Tyto speciálně vytvořené primery hybridizují k stadartní a mutavované alele. Metodou AS-PCR je tedy možné využít pro detekci bodových mutací a malých delecí. Nejčastěji využívaná varianta AS-PCR je ARMS-PCR (Zima, 2007).

1.2.2.1.2.2.1 Amplifikaci refrakční mutační systém (ARMS-PCR)

Tato meta využívá k reakci čtyři alelově-specifické primery. Využívá se k odhalení 1- nukleotidové záměny. Dva primery se váží na koncové oblasti sledované sekvence a

další dva se váží na bodovou mutaci. Není-li mutace v genu přítomna, tak se primery nenavážou. Výsledky odečítáme elektroforeticky (Šmarda, 2005; Mazura, 1999).

ARMS-PCR je metoda jednoduchá a přesná, pomocí které můžeme snadno odlišit heterozygoty od homozygotů. V posledních letech prodělaly metody AS-PCR velký vývoj. Kromě manuálních postupů můžeme využít i automatizované přístupy (Zima, 2007).

1.2.2.1.3 Elekroforéza nukleových kyselin

Princip elektroforézy spočívá v pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Nukleové kyseliny nesou negativní náboj. Má-li prostředí, ve kterém se nacházejí, neutrální pH, mohou se v elektrickém poli pohybovat. Po puštění proudu se záporně nabité částice pohybují směrem k opačně nabité elektrodě- k anodě (Šmarda, 2005; Mazura, 1999).

Elektoforetickou separaci provádíme na gelu, který vytváří složitou síťovou strukturu. V elektrickém poli se chová jako síto, které odděluje různě dlouhé fragmenty nukleových kyselin. Rychlost pohybu DNA je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti (Šmarda, 2005; Mazura, 1999).

Gel používáme buď agarózový nebo polyakrylamidový. Agarózový gel je vhodný pro separování fragmentů o velikosti nad 250 bp. Fragmenty, které jsou kratší, je vhodné separovat v polyakrylamidovém gelu (Šmarda, 2005; Mazura, 1999).

Abychom mohly identifikovat polohu fragmentu, je potřeba DNA obarvit vhodným barvivem. Nejčastěji se používá barva ethidiumbromid, která pod UV světlem svítí červeně. Fragmenty nukleových kyselin se nám v gelu jeví jakou proužky. Pro určení velikosti používáme standarty velikostí nebo hmotnostní standarty (Šmarda, 2005).

1.2.2.1.4 Sekvenování nukleových kyselin

Sekvenování nukleových kyselnin je metoda využívaná pro čtení sekvencích bází. Výsledkem, ze kterého čteme pořadí bází, může být buď řada vrcholů v grafu, nebo žebříček proužků. Pro popis mutací je nutné znát sekvenci bází DNA v místě chyby (Pritchard, 2007).

Touto metodou můžeme určit sekvence nukleotidů úseků DNA a RNA o velikosti až několika stech bází. Nejčastěji se sekvenování provádí na principu standardní Sangerovy metody, nebo nověji pomocí cyklického sekvenování za použití termocykleru. K detekci produktů se dále používá kapilární elektroforéza (Zima, 2007).

Meota se skládá ze čtyř fází. Nejprve je nutná hybridizace primerů k analyzovanému fragmentu DNA (Zima, 2007).

V další fázi se primery označí. Dříve se ke značení primerů využívaly radioizotopy. V modernějším sekvenování, které je plně automatizované se používá značení pomocí fluorescenčních látek (Zima, 2007).

V další fázi dochází k syntéze komplementárních bází pomocí T7 DNA polymerázy. Dochází tak k prodlužování primeru (Zima, 2007).

V polední fázi dochází k ukončení reakce včleněním dideoxynukleotidu (Zima, 2007).

2 Praktická část

2.1 Cíle práce

1) Seznámení s faktory souvisejícími s vrozeným rizikem pro schizofrenii
2) Optimalizace metody PCR-RFLP pro vyšetření polymorfizmů Val/Met v genu *COMT*, který zvyšují riziko pro schizofrenii.
3) Analýza několika vzorků jedinců s výskytem schizofrenie v rodině.

2.2 Informace o pracovišti

Výzkumná část bakalářské práce byla vykonána v laboratoři na Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity českých Budějovicích, J. Boreckého 1167/27, 370 11 České Budějovice pod odborným vedením Ing. Tomáše Nixe, Ph. D.

2.3 Výzkumný materiál

Cílem práce byla optimalizace metody ARMS-PCR a metody PCR-RFLP k vyšetření polymorfismu genu *COMT*. K vyšetření jsme měla k dispozici vzorky DNA, které jsem izolovala z bukálních stěrů a vzorky, které mi poskytla genetická laboratoř Genlabs, s. r. o (Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.).

2.4 Potřebné vybavení k vykonání praktické části

Přístroje a potřebné vybavení, které byly použity při vyšetření polymorfismu genu *COMT*:

- Laminární box (digestoř), TELSTAR AV-100
- Nanodrop UV/VIS Shimadz BioSpec-nano
- Termocykler MJ Mini^{TM}, Personal Thermal Cycler
- Inkubátor, Mini Dry Bath
- Centrifuga, MiniSpin eppendorf
- Minicentrifuga, Prism^{TM}Mini
- Vortex mixer, Labnet international, Inc.
- Elektroforetický systém, MS major science Safe Blue MBE-150 PLUS
- Mikrovlnná trouba pro přípravu agarózového gelu
- Analytické váhy
- Laboratorní sklo
- Stojánky na zkumavky a mikrozkumavky

- Iluminátor a detekční systém pro pozorování a focení gelu Uvitec Cambridge, UVISAVE HD5
- Automatické mikropipety, Autoclavable

2.4.1 Spotřební materiál

- Špičky na automatické mikropipety
- Rukavice
- Zkumavky, mikrozkumavky

2.5 Izolace DNA z bukálních stěrů

Izolace DNA byla provedena z bukálních stěrů. Vzorky byly odeprány pacientům, kteří souhlasili s vyšetřením genu *COMT* pro výzkumnou část bakalářské práce. Výsledky pacientů budou zcela anonymní a nebudou jim sděleny, neboť se nejedná o akreditované pracoviště, které je oprávněné výsledky prezentovat.

K izolaci DNA z odebraného vzorku byl použit komerční kit ExtractNow^{TM}DNA Mini Kit; Minerva BioLabs, BioConsult dle doporučení výrobce

2.5.1 Reagencie

- Buffer AL lysis (lyzační pufr
- Proteinase K (proteináza K)
- Binding Buffer C (vazebný pufr)
- Wash Buffer E (promývací pufr)
- Elution buffer (eluční pufr)

2.5.2 Postup

1) Připravit zkumavky o objemu 1,5 ml, pro vložení ustřižených konců výtěrových tampónů se vzorkem z bukálních stěrů.
2) Do každé zkumavky s tampónem automatickou pipetou přidat 400 µl bufferu AL lysis (lyzačního pufru) a 25 µl a proteinázy K. Zkumavky 5 sekund vortexovat a krátce stočit v centrifuze.
3) V inkubátoru nastaveném na 56°C vzorky inkubovat po dobu 15 minut
4) Vyjmout tampony ze zkumavek.
5) Do zkumavek s lyzátem přidat 200 µl Binding Bufferu C (vazebného pufru C). Zkumavky krátce vortexovat a stočit v centrifuze.

6) Obsah ze zkumavek přelít do kolonek vložených do zkumavek. Kolonky uzavřít a stočit v centrifuze 2 minuty při otáčkách 13 000 rpm.
7) Zkumavky vyhodit a kolonky vložit do nových. Připipetovat do každé kolonky 700 µl Wash Bufferu E (promývacího pufru E). Kolonky uzavřít a v centrifuze stočit 1 minutu při otáčkách 13 000 rpm.
8) Obsah ze zkumavek vylít a kolonky do nich vrátit. Znovu promýt Wash Buffrem E (promývacím pufrem E) a znovu zkumavky stočit.
9) Obsah zkumavek vylít a vrátit do nich kolonky. Stočit v centrifuze po dobu dvou minut, při maximálním výkonu.
10) Zkumavky vyhodit a kolonky vložit do nových zkumavek. Do kolonek napipetovat 200 µl elučního pufru A při pokojové teplotě nechat 5 minut inkubovat. Po té vložit na 2 minuty do centrifugy při výkonu 10 000 rpm.
11) Pipetou nasát eluát a nalít do kolonek. Nechat 5 minut inkubovat při pokojové teplotě a 2 minuty stočit v centrifuze při otáčkách 10 000 rmp.

2.6 Precipitace DNA

Precipitace DNA je metoda, která se využívá k přečištění DNA nebo ke zvýšení její koncentrace.

2.6.1 Reagencie

- Octan sodný (3 M)
- Absolutní etanol (98,8 %)
- Etanol (75 %)
- PCR voda

2.6.2 Postup

1) Do zkumavek s DNA přidat 25 µl vychlazeného octanu sodného (3 M) a 565 µl absolutního etanolu (98,8 %). Zkumavky vortexovat a krátce stočit v centrifuze.
2) Nechat minimálně jednu hodinu v mrazáku (-20 °C)
3) Stočit v centrifuze při 1300 rpm 20 minut.
4) Odstranit supernatan a přilít 565 µl etanolu (75 %). Na 2 minuty centrifugovat při otáčkách 13000 rpm.

5) Odstranit supernatan a zbytky etanolu nechat odpařit (otevřené zkumavky vložit do inkubátoru, nastaveném na 37 °C)
6) Sediment rozpustit v 15 µl PCR vody, vortexovat a stočit.

2.7 Měření koncentrace DNA

Aby bylo možné s DNA, která byla naizolována dále pracovat, je nutné změřit její koncentraci. K měření koncentrace DNA se používá Nanodrop. Jedná se o spektrofotometr, který kromě koncentrace DNA dokáže změřit i koncentraci nečistot. Výsledné koncentrace jsou uváděny v ng/µl.

Nejprve se do přístroje nepipetuje PCR voda, která byla použita při precipitaci DNA. PCR Voda slouží jako blank. Poté postupně měříme koncentraci vzorků, které musí být dobře zvortexované a stočené v centrifuze. Do Nanodropu stačí použít malé množství DNA-1,5 µl.

Každý vzorek měříme dvakrát a výsledek by měl být přibližně stejný. Máme-li u jednoho vzorečku dvě rozdílné koncentrace, musíme DNA pořádně zvortexovat a stočit, poté měření provést ještě jednou.

2.8 Příprava gelu a elektroforéza

2.8.1 Reagencie

- Roztok 10x TBE buffer (TBE pufr)
- Top Vision Agarose, thermoscientific (Agarózový prášek pro přípravu gelu)
- Ethidium bromide aqueous solution 1 % w/v, SERVA
- 6x loading buffer (vkládací pufr)
- 100 bp-DNA-Ladder equalized, Carl Roth GmbH+ Co. +Co. KG Karlsruhe (Hmotnostní marker)

2.8.2 Postup

1) Nejprve navážit do baňky vhodné množství agarózy (Tab 1). Přidat 100 ml 1xTBE bufferu. Ten se připraví smícháním 100 ml 10xTBE a 900 ml destilované vody.
2) Dobře promíchat a vložit do mikrovlnné trouby. V krátkých intervalech kontrolovat a vařit tak dlouho, dokud nebude směs čirá a bez pěny.
3) Poté chladit pod studenou tekoucí vodou, dokud nebude teplota cca 70 °C.

4) Do vychlazeného gelu nepipetovat 1,50 µl ethidium bromidu a dobře promíchat. Obsah baňky vylít do připravené formy na gel. Vzniknou-li na gelu bubliny, je nutné je odstranit. Necháme ztuhnout.
5) Gel vložit do elektroforetické vany, která je naplněná 1xTBE bufferem.
6) PCR produkty, které jdou obarvené loading bufferem, nanést do jamek v gelu.
7) Mezi vzorky dát do jedné jamky 10 µl ladderu, aby bylo možné odečíst správnou délku amplifikovaného fragmentu.
8) Zapnou elektroforetický systém nastavený na 70 V a 250 mA. Po třiceti minutách zkontrolovat po UV světlem. V případě potřeby vrátit do elektroforetické vany a nechat tam tak dlouho, dokud nebude možné odečíst výsledek. Gel pravidelně v intervalech přibližně 30 min kontrolovat a průběžně fotit.

Tab. 1 -Příprava agarózového gelu

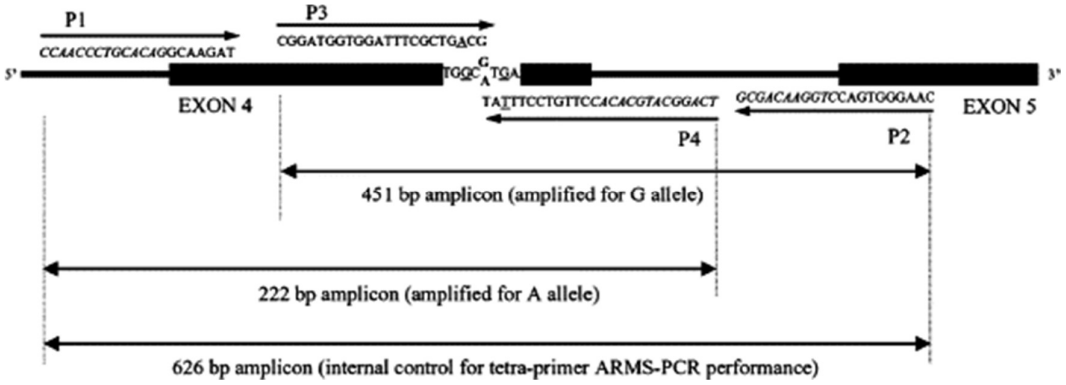
Hustota gelu	Množství agarózy	1xTBE
1,5%	1,5 g	100 ml
2%	2g	100 ml
2,5%	2,5 g	100 ml
3%	3 g	100 ml
4%	4 g	100 ml

Hustota gelu	Množství agarózy	1xTBE
1,5%	2,25 g	150 ml
2%	3 g	150 ml
2,5%	3,75 g	150 ml
3%	4,5 g	150 ml
4%	6 g	150 ml

Zdroj: autor

2.9 Vyšetření genu COMT metodou ARMS-PCR

Metoda ARMS-PCR využívá k detekci polymorfismu v genu *COMT* čtyři primery. Primery P1 a P2 ohraničují gen, který chceme amplifikovat. Primery P3 a P4 jsou komplementární k odpovídajícímu polymorfismu (Obr. č. 4).



Obr. 4 -Amplifikace genu COMT a přisedání komplementárních primerů k odpovídajícímu polymorfismu (zdroj: RUIZ-SANZ; Detection of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism by a simple one-step tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR, 2007)

2.9.1.1 Reagencie:

- dNTP set 1 (pH 7) 100mM, Carl Roth GmbH + Co. KG. (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Set nukleotidů)
- Primery Generi biotech (100 pmol/µl) : COMT_P1_F, COMT_P2_R, COMT_P3_F, COMT_P4_R (Tab. č. 2)
- Taq DNA Polymerase, 5000 U/ml, BioLabs (DNA polymeráza)
- 10x ThermoPol Reaction Buffer, BioLabs (PCR pufr)
- Templát DNA

Tab. 2 -Sekvence primerů

Primer	**Sekvence (5´–3´)**
P1 (forward)	CCAACCCTGCACAGGCAAGAT
P2 (reverse)	CAAGGGTGACCTGGAACAGCG
P3 (forward)	CGGATGGTGGATTTCGCTGaCG
P4 (reverse)	TCAGGCATGCACACCTTGTCCTTtAT

zdroj: RUIZ-SANZ; Detection of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism by a simple one-step tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR, 2007

2.9.1.2 Postup:

Aby nedošlo ke kontaminaci DNA, je potřeba pracovat v laminárním boxu (digestoři), který musí být dekontaminován. Dekontaminace se provádí vysvícením UV světlem.

1) Připravit zkumavku (0,5 ml), do které bude připraven PCR reakční směs.
2) Reakční směs na jeden vzorek obsahuje 0,25 µl každého nukleotidu, 0,5 µl každého primeru, 4 µl pufru a 0,25 µl polymerázy. Polymeráza musí být stále v chladícím stojánku.
3) Do tenkostěnných zkumavek (0,2 ml) nepipetovat 7,25 µl z připravené reakční směsi. Přidat 20-40 ng DNA a PCR vodou doplnit na 40 µl.
4) Zkumavky zvortexovat a stočit.
5) Poté vložit do Termocykleru, kde je nastaven příslušný PCR reakční protokol (tab 3).
6) Do zkumavek s PCR produktem přidat 6 µl loading bufferu (nanášecí pufr) a celý obsah nepipetovat na agarózový gel (1,5%).
7) Vložit do elektroforézy s napětím 70 V. Po 30 min vložit pod UV světlo a odečíst výsledek.

Tab. 3 -PCR reakční protokol pro gen COMT

	Teplota	**Čas**
1 Cyklus		
Počáteční denaturace	94 °C	4 min
30 Cyklů		
Denaturace	94 °C	30 s
Anealing	62 °C	30 s
Extenze	72 °C	20 s
1 Cyklus		
Terminální extenze	72 °C	5 min
Chlazení	4 °C	10 min

zdroj: RUIZ-SANZ; Detection of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism by a simple one-step tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR, 2007

2.9.1.3 Vyhodnocení

Při použití této metody by se měl na gelu vždy objevit produkt o velikosti 626 bp. Jedná se celý gen, který slouží jako kontrola. V případě heterozygota budou na gelu tři pruhy a v případě homozygota 2 pruhy (Tab 4) (Ruiz-Sanz et al., 2006).

Tab. 4 -Velikosti frangmentů genotypů genu COMT

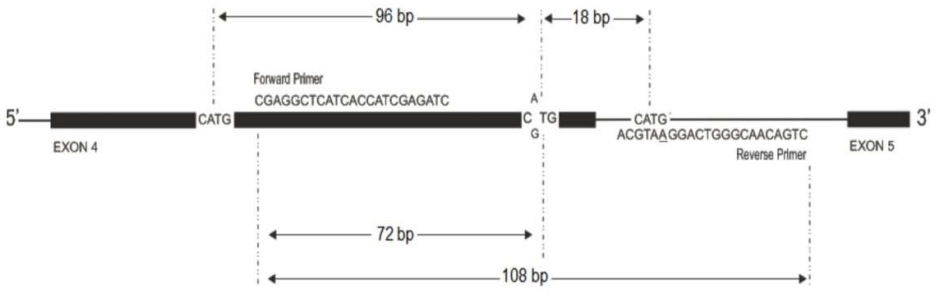
Genotyp	velikost fragmentů
Heterozygot^{HL} val158/met158	626+451+222 bp
Homozygot^{HH} val158/val158	626+451 bp
Homozygot^{LL} met158/met158	626+222 bp

zdroj: RUIZ-SANZ; Detection of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism by a simple one-step tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR, 2007

2.10 Vyšetření genu COMT metou PCR-RFL

Metoda PCR-RFLP se skládá ze dvou kroků. Nejprve se PCR reakcí amplifikuje gen, který bude vyšetřen. K amplifikaci genu se používají dva ohraničující primary.

Ve druhém kroku se k amplifikovanému genu přidá restrikčním enzymem. Pro detekci polymorfismu genu *COMT* se požívá enzym izolovaný z bakterie *Haemophilus influenzae*, který se označuje jako Hin1II (NlaIII). Hin1II štěpí DNA na fragmenty v sekvenci CATG (Obr 5).



Obr. 5 -Schématická ilustrace amplifikace genu a jeho štěpení enzymem Hi1II v místě sekvence CATG (zdroj: LAJIN; Detection of catechol o methyltransferase (COMT) Val58Met Polymophism by a New Optimalized PCR-RFLP Method, 2011).

2.10.1 Reagencie

- PPP Master Mix 2xconc+Mg^{2+}
- PCR voda
- Templát DNA
- Hin1II (NlaIII) 5U/µl, ThermoScientific (restrikční enzym)
- 10x Buffer G, ThermoScientific (Pufr G)
- Primery generi biotech (100pmol/µl) : COMT_1, COMT_P (Tab. č. 5)

Tab. 5 -Sekvence primerů

Primer	**Sekvence (5´–3´)**
P1 (forward)	CTCATCACCATCGAGATCAA
P2 (reverse)	CCAGGTCTGACAACGGGTCA

zdroj: LAJIN; Detection of catechol o methyltransferase (COMT) Val58Met Polymophism by a New Optimalized PCR-RFLP Method, 2011

2.10.1.1 Postup:

1) Připravit zkumavku (0,5 ml), do které bude připraven PCR reakční směs.
2) Reakční směs na jeden vzorek obsahuje 12,5 µl PPP Master Mixu a 0,5µl každého primeru.
3) Do tenkostěnných zkumavek (0,2ml) nepipetovat 13,5 µl z připravené reakční směsi. Přidat 100-160 ng DNA a PCR vodou doplnit na 25 µl.
4) Zkumavky zvortexovat a stočit.
5) Poté vložit do Termocykleru, kde je nastaven příslušný PCR reakční protokol (Tab 6).
6) 10µl PCR produktu smíchat s 2µl loading bufferu (nanášecí pufr) a obsah nepipetovat na agarózový gel (2,5%).
7) Vložit do elektroforézy s napětím 70 V. Po 30 min vložit pod UV světlo a odečíst výsledek.

Tab. 6 -PCR reakční protokol pro gen COMT

	Teplota	**Čas**
1 Cyklus		
Počáteční denaturace	94 °C	4 min
32 Cyklů		
Denaturace	94 °C	30 s
Anealing	62 °C	30 s
Extenze	72 °C	10 s
1 Cyklus		
Terminální extenze	72 °C	5 min
Chlazení	4 °C	10 min

zdroj: LAJIN; Detection of catechol o methyltransferase (COMT) Val58Met Polymophism by a New Optimalized PCR-RFLP Method, 2011

2.10.1.2 Vyhodnocení

Protože byly požity pouze dva ohraničující primery, objeví se na gelu pouze jeden pruh. Ten by měl odpovídat amplifikovanému genu o velikosti 109 bp. Jestli na gelu není žádný pruh, znamená to, že PCR reakce neproběhla.

2.10.2 Postup restrikčního štěpení PCR produktu

1) Ke zbylému PCR produktu (15 µl) napipetovat 27 µl PCR vody, 3 µl Bufferu G a 3 µl enzymu. Enzym před použitím krátce stočit ale nevortexovat. S enzymem pracovat na chladící podložce.
2) Směs zvortexovat a stočit. Poté vložit do inkubátoru předem vyhřátého na 37°C nejméně na 1 hodinu.
3) Po vyjmutí z inkubátoru přidat do zkumavek 4 µl 6x loading bufferu a celý obsah nepipetovat na agarózový gel (4%).
4) Vložit do elektroforézy s napětím 70V. Po 30min vložit pod UV světlo a odečíst výsledek.

2.10.2.1 Vyhodnocení

Restrikční enzym štěpí gen v místě sekvence CATG. Podle velikosti a počtu produktů můžeme určit genotyp pacienta (Tab. 7).

Tab. 7 -Velikosti frangmentů genotypů genu COMT

Genotyp	velikost fragmentů
Heterozygot^{HL} val158/met158	86+68+23+18 bp
Homozygot^{HH} val158/val158	86+23 bp
Homozygot^{LL} met158/met158	68+23+18 bp

zdroj: LAJIN; Detection of catechol o methyltransferase (COMT) Val58Met Polymophism by a New Optimalized PCR-RFLP Method, 2011

3 Výsledky

3.1 Měření koncentrace

Koncentrace byla měřena na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích pomocí přístroje UV/VIS Shimadz BioSpec-nano.

Tento přístroj kromě koncentrace DNA dokáže změřit i nečistoty. Poměr absorbancí 260/280 udává obsah kontaminujících bílkovin. Poměr absorbancí 260/230 značí kontaminaci nečisto, jako jsou například karbohydráty, fenolické sloučeniny nebo aromatické složky.

V tabulce č. 8 jsou zaznamenané hodnoty koncentrací vzorků, které poskytla Mgr. Dagmar Bystřické, Ph. D. V tabulce č. 9 jsou naměřené koncentrace ze vzorků, které jsem izolovala sama (Tab 8; Tab 9).

Tab. 8 -Koncentrace vzorků DNA

No.	Vzorek	Koncentrace DNA[ng/µl]	OD 260/280	OD 260/230
1	PET 1	54,04	1,68	0,71
2	PET 2	22,27	1,61	0,54
3	PET 3	15,45	1,48	0,62
4	PET 4	158,76	1,73	0,98
5	PET 5	40,61	1,65	0,81
6	PET 6	16,47	1,4	0,3
7	PET 6	14,95	1,31	0,28
8	PET 7	33,23	1,69	0,63

9	PET 8	41,18	1,74	0,85
10	PET 9	21,77	1,7	0,41
11	PET 9	20,27	1,6	0,4
12	PET 10	17,65	1,68	0,36
13	PET 10	16,61	1,5	0,34
14	PET 11	33,38	1,54	0,41
15	PET 11	35,31	1,55	0,44
16	PET 13	70,77	1,73	0,6
17	PET 13	69,06	1,74	0,6
18	PET 16	55,2	1,7	0,96
19	PET 17	151,31	1,76	1,15
20	PET 18	60,56	1,67	1,05
21	PET 18	58,95	1,76	1,06
22	PET 19	286,41	1,72	0,78
23	PET 19	302,3	1,72	0,77
24	PET 20	82,06	1,7	0,72
25	PET 21	31,56	1,75	0,64
26	PET 21	29,91	1,73	0,69
27	PET 22	44,82	1,7	0,64
28	PET 22	44,72	1,57	0,65
29	PET 23	351,52	1,74	0,75
30	PET 23	348,45	1,5	0,75
31	PET 24	70,85	1,67	0,45
32	PET 24	69,92	1,62	0,46

Zdroj: Autor

Tab. 9 -Koncentrace DNA izolovaná z bukálních stěrů

No.	Vzorek	Koncentrace DNA[ng/µl]	OD 260/280	OD 260/230
1	Pacient 1	35,98	2,15	1,09
2	Pacient 1	32,57	1,99	1,18
3	Pacient 2	18,94	2,24	1,13
4	Pacient 2	18,32	2,22	1,17
5	Pacient 3	42,49	1,92	0,95
6	Pacient 3	40,75	1,91	0,99
7	Pacient 4	28,4	2	1,26
8	Pacient 4	27,7	2,04	1,27

Zdroj: Autor

3.2 Optimalizace metody ARMS-PCR

Aby byly výsledky vyšetření pacientských vzorků co nejpřesnější, je nutné použitou metodu optimalizovat.

Jedná se o proces, který vede ke správě zvolenému poměru reagencií použitých při vyšetření a správnému zacházení se vzorkem.

3.2.1 Vyšetření č . 1

Při prvním měření jsem dodržela poměr reagencí, který vycházel z článku. Jedná se o postup, který je popsán v kapitole Vyšetření genu COMT metodou ARMS-PCR.

Nejprve jsem připravila reakční směs. V tabulce 10 je vypočítané množství reagencí pro vyšetření 4 vzorků. Reakční směs jsem rozpipetovala do mikrozkumavek a do každé jsem přidala DNA (Tab 10).

K vyšetření jsem použila vzorky, které jsem izolovala z bukálních stěrů. Množství DNA jsem přizpůsobila koncentraci DNA (Tab 11). Pro PCR reakci jsem použila reakční protokol, který je uveden v tabulce č. 3 (Tab 3).

Tab. 10 -Rekční směs pro 4 vzorky

Reagencie	Objem
PCR voda	143 µl
primer P1	2,25 µl
primer P2	2,25 µl
primer P3	2,25 µl
primer P4	2,25 µl
Pufr	18 µl
Polymeráza	1,125 µl
dATP	1,125 µl
DTP	1,125 µl
DTP	1,125 µl
dTTp	1,125 µl

Zdroj: Autor

Tab. 11 -Použité množství DNA

No.	Vzozek	Koncentrace DNA	Objem
Vzorek. č 1	Pacient 1	34 ng/µl	1 µl
Vzorek. č 2	Pacient 2	18 ng/µl	1 µl
Vzorek. č 3	Pacient 3	41 ng/µl	1 µl
Vzorek. č 4	Pacient 4	28 ng/µl	1 µl

Zdroj: Autor

3.2.1.1 Výsledek

Po provedení elektroforézy jsem na gelu pod UV světlem neměla žádné produkty. Měření bylo neúspěšné a musela jsem dále pracovat na optimalizaci metody ARMS-PCR.

3.2.2 Vyšetření č. 2

Při druhém měření jsem zvýšila koncentraci DNA, nukleotidů, polymerázy a primerů (reakční směs č 1). V tabulce č. 12 je znázorněn upravený poměr reagencií pro

3 vzorky (Tab 12). Kromě vzorků izolované DNA z bukálních stěrů jsem použila i referenční DNA, která sloužila jako kontrola. V tabulce 13 je uvedeno množství a koncentrace použité DNA (Tab 13).

Zároveň jsem také připravila druhou reakční směs, ve které jsem použila MasterMix. Množství reagencií použitých v této reakční směsi je znázorněn v tabulce 14 (Tab 14). Vzorky jsem použila stejné jako v reakční směsi č 1- viz tabulka 13 (Tab 13).

Tab. 12- Rekční směs pro 3 vzorky

Reagencie	Objem
PCR voda	103,95 µl
primer P1	1,75 µl
primer P2	1,75 µl
primer P3	1,75 µl
primer P4	1,75 µl
Pufr	14 µl
Polymeráza	1,05 µl
dATP	1,75 µl
DTP	1,75 µl
DTP	1,75 µl
dTTp	1,75 µl

Zdroj: Autor

Tab. 13- Použité množství DNA

No.	Vzozek	Koncentrace DNA	Objem
Vzorek. č 1	Pacient 1	34 ng/µl	2 µl
Vzorek. č 2	Pacient 3	18 ng/µl	2 µl
Vzorek. č 3	Kontrola	41 ng/µl	2 µl

Zdroj: Autor

Tab. 14 -Rekční směs pro 3 vzorky

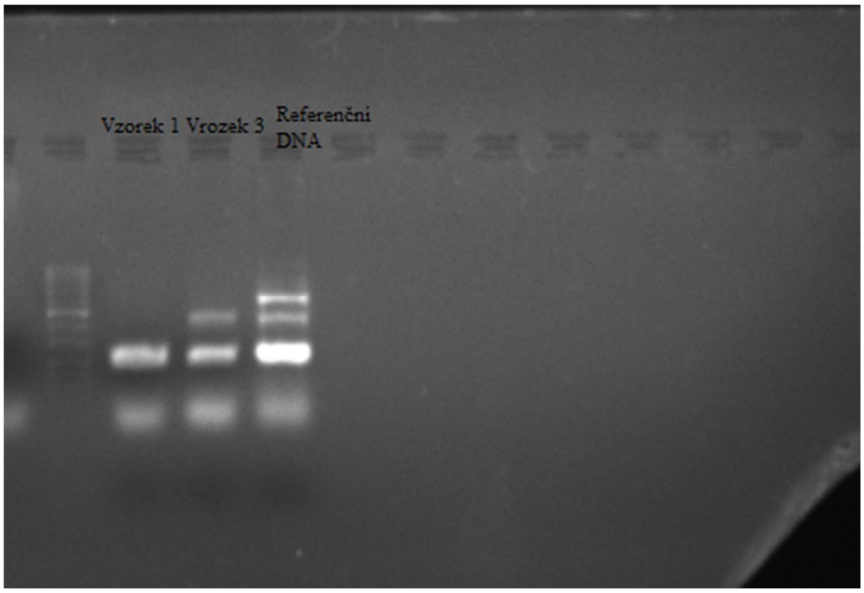
Reagencie	Objem
MasterMix	70 µl
PCR voda	56 µl
primer P1	1,75 µl
primer P2	1,75 µl
primer P3	1,75 µl
primer P4	1,75 µl

Zdroj: Autor

3.2.2.1 Výsledek

U reakční směsi č. 1 nebyly po provedení elektroforézy žádné produkty. U druhé reakční směsi, kde byl použit MasterMix produkty byly. Výsledek však nebyl optimální, u vzorku Pacient 1 a pacient 3 chyběly kontrolní produkty (Obr 6).

Pro další optimalizaci a následné vyšetření již nebyla využívána reakční směs, která obsahovala polymerázu. Polymeráza, kterou jsem použila, byla nejspíš nefunkční, nebo mohla být poškozena během manipulace. Proto další měření byla prováděna za použití MasterMixu.



Obr. 6 -Výsledky z optimalizace metody ARMS-PCR, druhé měření (zdroj: autor).

3.2.3 Vyšetření č. 3

V tabulce 15 je znázorněn poměr reagencií pro další měření. Zdvojnásobila jsem koncentraci primerů P1 a P2, aby byla výsledná koncentrace kontrolního produktu vyšší (Tab 15).

V tabulce 16 jsou použité koncentrace a množství DNA, které jsem navýšila (Tab 16). Také jsem upravila reakční protokol. Změnila jsem teplotu anealingu a čas extenze. Upravený reakční protokol je uveden v tabulce č. 17 (Tab 17).

Tab. 15 -Rekční směs pro 3 vzorky

Reagencie	Objem
MasterMix	70 µl
PCR voda	52,5 µl
primer P1	3,5 µl
primer P2	3,5 µl
primer P3	1,75 µl
primer P4	1,75 µl

Zdroj: Autor

Tab. 16 -Použité množství DNA

No.	Vzozek	Koncentrace DNA	Objem
Vzorek. č 1	PET 13	70 ng/µl	2 µl
Vzorek. č 2	PET 20	82 ng/µl	2 µl
Vzorek. č 3	PET 24	69 ng/µl	2 µl

Zdroj: Autor

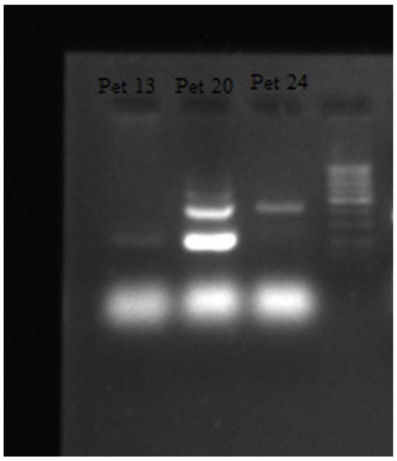
Tab. 17 -PCR reakční protokol pro gen COMT

	Teplota	**Čas**
1 Cyklus		
Počáteční denaturace	94 °C	4 min
30 Cyklů		
Denaturace	94 °C	30 s
Anealing	61,7 °C	30 s
Extenze	72 °C	30 s
1 Cyklus		
Terminální extenze	72 °C	5 min
Chlazení	4 °C	10 min

Zdroj: Autor

3.2.3.1 Výsledek

Po provedení elektroforézy bylo možné odečíst výsledky pouze u vzorku č. 2. U vzorku č. 1 a č. 2 nebyly na gelu kontrolní produkty. Navíc byly vzniklé produkty jen v malé koncentraci a špatně detekovatelné (Obr 7).



Obr. 7 -Výsledky z optimalizace metody ARMS-PCR, třetí měření (zdroj: autor).

3.2.4 Vyšetření č. 4

Při tomto měření jsem požila stejné množství reagencií jako v předchozím. Použila jsem pro toto měření vzorky DNA, jejichž koncentrace a množství jsou uvedena v tabulce 18 (Tab 18).

Opět jsem pozměnila reakční protokol. Upravila jsem teplotu anealingu a navýšila počet cyklů. Pozměněný reakční protokol je uveden v tabulce 19 (Tab 19).

Tab. 18 -Použité množství DNA

No.	Vzozek	Koncentrace DNA	Objem
Vzorek. č 1	PET 1	54 ng/µl	2 µl
Vzorek. č 2	PET 16	55 ng/µl	2 µl
Vzorek. č 3	PET 18	59 ng/µl	2 µl

Zdroj: Autor

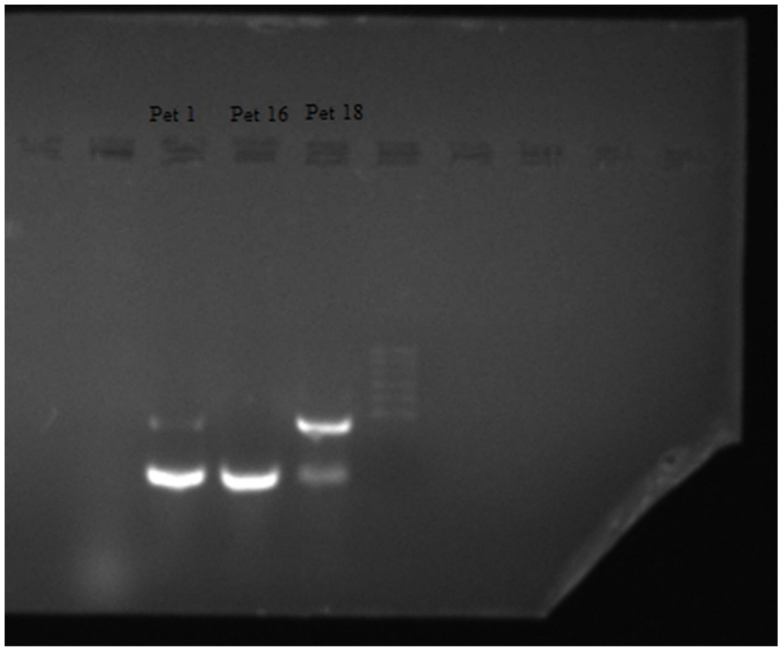
Tab. 19 -PCR reakční protokol pro gen COMT

	Teplota	**Čas**
1 Cyklus		
Počáteční denaturace	94 °C	4 min
35 Cyklů		
Denaturace	94 °C	30 s
Anealing	61 °C	30 s
Extenze	72 °C	30 s
1 Cyklus		
Terminální extenze	72 °C	5 min
Chlazení	4 °C	10 min

Zdroj: Autor

3.2.4.1 Výsledek

Na gelu chyběly kontrolní produkty. Nejvíce koncentrovaný byl nekratší fragment, delší fragment byl jen v malé koncentraci a špatně čitelné (Obr 8).



Obr. 8 -Výsledky z optimalizace metody ARMS-PCR, čtvrté měření (zdroj: autor).

3.2.5 Vyšetření č. 5

Na základě předchozích výsledků jsem udělala teplotní gradient, abych věděla, při jaké teplotě PCR reakce probíhá nejlépe. Teplotu anealingu jsem na temocykleru nastavila od 53°C do 63°C .

Poměr reagencí v reakční směsi jsem zachovala stejný jako v předchozích měření. DNA jsem použila izolovanou z krve. V tabulce 20 je znárodněna koncentrace a objem použité DNA. Zároveň je u každého vzorku poznamenaná teplota, při které probíhala PCR reakce (Tab 20).

Tab. 20 -Použité množství DNA

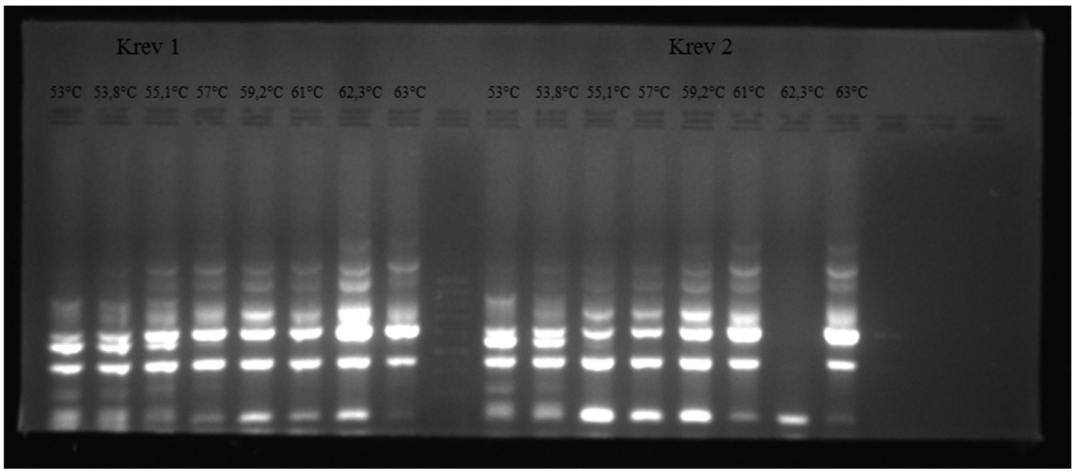
No.	Vzozek	Koncentrace DNA	Objem	Teplota
Vzorek. č 1	Krev 1	160 ng/µl	0,5 µl	53 °C
Vzorek. č 2	Krev 1	160 ng/µl	0,5 µl	53,8 °C
Vzorek. č 3	Krev 1	160 ng/µl	0,5 µl	55,1 °C
Vzorek. č 4	Krev 1	160 ng/µl	0,5 µl	57 °C
Vzorek. č 5	Krev 1	160 ng/µl	0,5 µl	59,2 °C
Vzorek. č 6	Krev 1	160 ng/µl	0,5 µl	61 °C
Vzorek. č 7	Krev 1	160 ng/µl	0,5 µl	62,3 °C
Vzorek. č 8	Krev 1	160 ng/µl	0,5 µl	63 °C
Vzorek. č 9	Krev 2	160 ng/µl	0,5 µl	53 °C
Vzorek. č 10	Krev 2	160 ng/µl	0,5 µl	53,8 °C
Vzorek. č 11	Krev 2	160 ng/µl	0,5 µl	55,1 °C
Vzorek. č 12	Krev 2	160 ng/µl	0,5 µl	57 °C
Vzorek. č 13	Krev 2	160 ng/µl	0,5 µl	59,2 °C
Vzorek. č 14	Krev 2	160 ng/µl	0,5 µl	61 °C
Vzorek. č 15	Krev 2	160 ng/µl	0,5 µl	62,3 °C
Vzorek. č 16	Krev 2	160 ng/µl	0,5 µl	63 °C

Zdroj: Autor

3.2.5.1 Výsledek

Po odečtení výsledků jsem vyhodnotila, že PCR reakce nejlépe proběhla při teplotě 61°C (Obr 9).

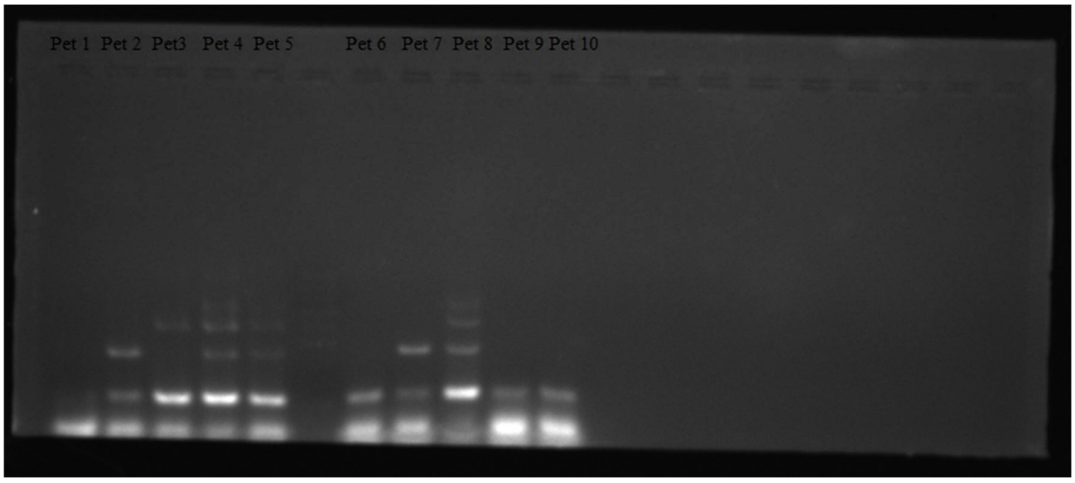
Je to stejná teplota jakou jsem měla nastavenou na termocykleru při předchozím měření. Nyní však byly produkty silně koncentrované a nechyběl ani kontrolní produkt. Z výsledků je tedy patrné, že je metoda ARMS-PCR vhodná spíše pro vyšetření polymorfismu genu *COMT* z DNA, která je izolovaná z krve.



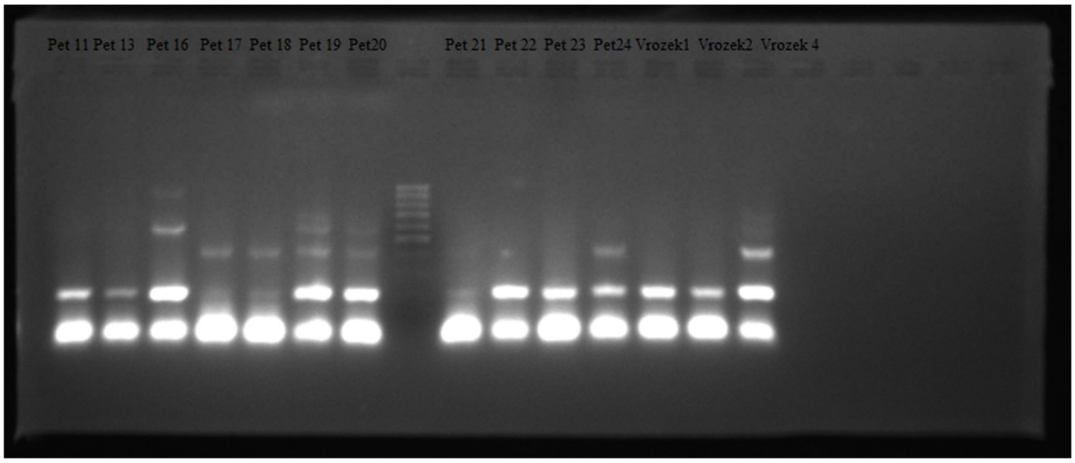
Obr. 9 -Výsledky z optimalizace metody ARMS-PCR, teplotní gradient (zdroj: autor).

3.3 Vyšetření vzorků metodou ARMS-PCR

Po optimalizaci metody jsem vyšetřila pacientské vzorky (Obr 10). U některých vzorků chyběl kontrolní produkt, ale i tak bylo možné výsledky odečíst. V tabulce 21 jsou zaznamenané výsledky u jednotlivých vzorků (Tab 21).



Obr. 10a -Analýza vzorků metodou ARMS-PCR (zdroj: autor).



Obr 10b: Analýza vzorků metodou ARMS-PCR (zdroj: autor).

Tab. 21 -Výsledky vyšetřených vzorků

No.	Vzorek	Genotyp
1	Pacient 1	Met158/met158
2	Pacient 2	Met158/met158
3	Pacient 4	Val158/met158
4	PET 1	Met158/met158
5	PET 2	Val158/met158
6	PET 3	Met158/met158
7	PET 4	Val158/met158
8	PET 5	Val158/met158
9	PET 6	Met158/met158
10	PET 7	Val158/met158
11	PET 8	Val158/met158
12	PET 9	Met158/met158
13	PET 10	Met158/met158
14	PET 11	Met158/met158
15	PET 13	Met158/met158
16	PET 16	Met158/met158
17	PET 17	Val158/met158
18	PET 18	Val158/met158
19	PET 19	Val158/met158
20	PET 20	Val158/met158
21	PET 21	Val158/met158
22	PET 22	Met158/met158
23	PET 23	Met158/met158
24	PET 24	Val158/met158

Zdroj: Autor

3.4 Optimalizace metody PCR-RFLP

Při optimalizaci PCR-RFLP jsem vycházela z předchozího měření a nepoužívala jsem DNA polymerázu, která byla nejspíš poškozená během manipulace, neboť PCR reakce ve které byla použita neproběhla. Na místo DNA polymerázy jsem opět použila PPP MasterMix.

Při optimalizaci metody jsem z důvodů nedostatku DNA požívala místo vzorků DNA izolované z bukálních stěrů DNA, která byla izolována z krve. Její koncentrace je rovna 160 ng/µl. Z předchozí optimalizace ARMS-PCR známe genotyp vzorku, který je Val/Met.

3.4.1 Vyšetření č. 1

Při prvním měření jsem opět dodržela poměr reagencí, který vycházel z článku. Jedná se o postup, který je popsán v kapitole Vyšetření genu COMT metodou PCR-RFLP.

Nejprve jsem připravila reakční směs. V tabulce 22 je vypočítané množství reagencí pro vyšetření 3 vzorků (Tab 22). Reakční směs jsem rozpipetovala do mikrozkumavek a do každé jsem přidala 0,5 ng/µl DNA. Reakční protokol je uveden v tabulce 6 (Tab 6).

Po provedení PCR reakce jsem 5 µl PCR jsem nepipetovala na gel a provedla elektroforézu, abych si ověřila, že PCR reakce proběhla správě.

Zbylý produkt jsem enzymaticky štěpila v termocycleru nastaveném na 37 °C po dobu 2 hodin. Poté jsem provedla elektroforézu na 2% agarózovém gelu. Poměr reagencií využitých ke štěpení pro jeden vzorek je uveden v tabulce 23 (Tab 23).

Tab. 22 -Rekční směs pro 3 vzorky

Reagencie	Objem
MasterMix	43,75 µl
PCR voda	86,65 µl
primer P3	1,05 µl
primer P4	1,05 µl

Zdroj: Autor

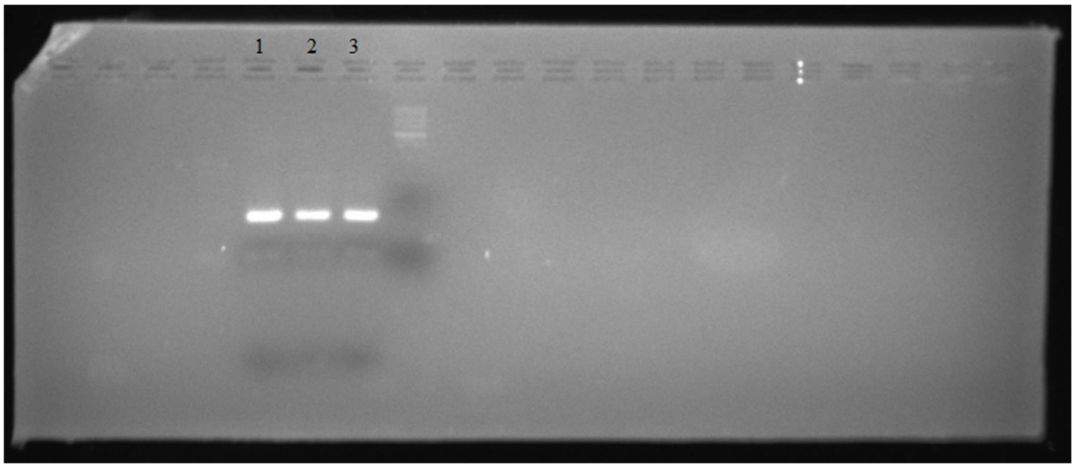
Tab. 23 -Enzymatické štěpení

Reagencie	Objem
PCR produkt	15 µl
PCR voda	27 µl
Buffer G	3 µl
Enzym	3 µl

Zdroj: Autor

3.4.1.1 Výsledek

Po provedení elektroforézy byly na gelu patrné produkty, které však neodpovídali danému genotypu (Obr 11). Nejspíše nedošlo k separaci produktů na gelu.



Obr. 11 -Optimalizace metody PCR-RFLP, obrázek gelu po enzymatickém štěpení (zdroj: autor).

3.4.2 Vyšetření č. 2

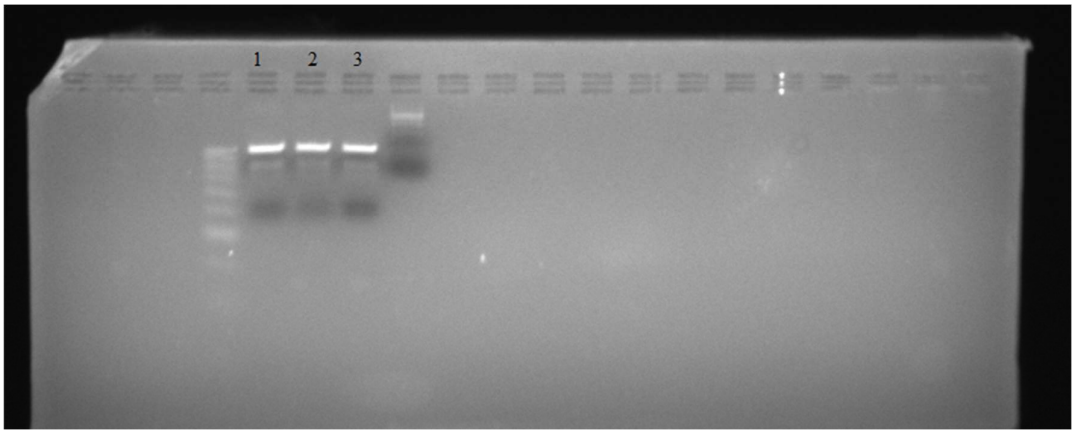
Při druhém měření jsem dodržela stejný postup i poměr reagencií jako při předchozím měření.

Prodloužila jsem jen dobu štěpení, vzorky jsem nechala v termocykleru přes noc (teplota 37 °C byla nastavena na 10 hodin). Pro provedení elektroforézy po štěpení jsem požila místo dvou procentního agarózového gelu gel 4%.

3.4.2.1 Výsledek

Po provedení elektroforézy byly na gelu produkty, které odpovídali genotypu Val/Mat (Obr 12). Stejný genotyp vyšel u použitých vzorků i při vyšetření metou ARMS-PCR.

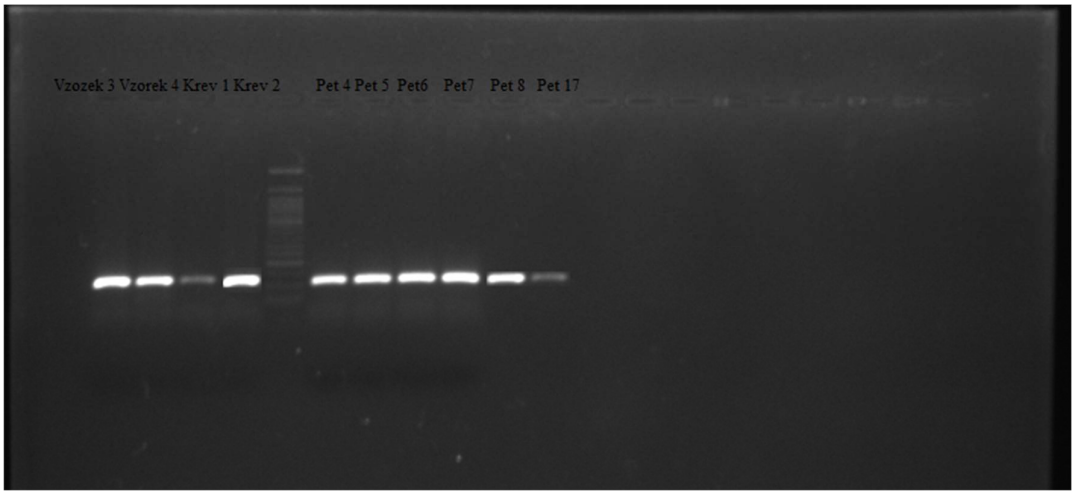
Na obrázku gelu nejsou produkty vidět příliš dobře, lépe zřetelné byly pod UV světlem.



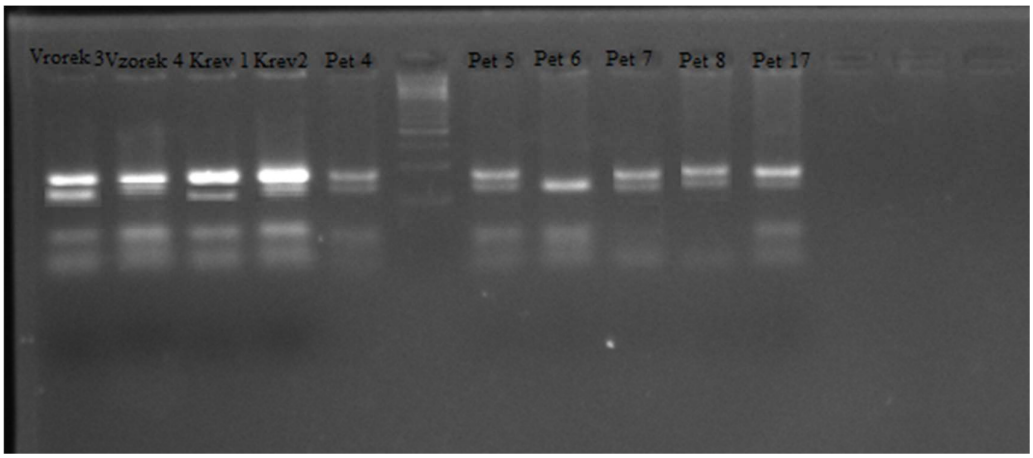
Obr. 12 -Optimalizace metody PCR-RFLP, genotyp Val/Met (zdroj: autor).

3.5 Vyšetření vzorků metodou PCR-RFLP

Po té co jsem optimalizovala metodu PCR-RFLP, provedla jsem analýzu několika vzorků pro porovnání s výsledky, které vychází z metody ARMS-PCR (Obr 13; Obr 14). V tabulce 24 jsou zaznamenané genotypy po odečtení. Výsledky se shodují s předchozím vyšetřením (Tab 24).



Obr. 13 -Fotografie gelu před štěpením (zdroj: autor).



Obr. 14 -Fotografie gelu po enzymatickém štěpení (zdroj: autor).

Tab. 24 -Výsledky vyšetřených vzorků

No.	Vzorek	Genotyp
1	Pacient 3	Val158/met158
2	Pacient 4	Val158/met158
3	Krev 1	Val158/met158
4	Krev 2	Val158/met158
5	PET 4	Val158/met158
6	PET 5	Val158/met158
7	PET 6	Met158/met158
8	PET 7	Val158/met158
9	PET 8	Val158/met158
10	PET 17	Val158/met158

Zdroj: Autor

4 Diskuze

V praktické části bakalářské práce jsem vyšetřovala genový polymorfizmus Val/Met v genu *COMT* u několika pacientů, u kterých se objevila schizofrenie v rodině.

Pro detekci polymorfizmu jsem použila dvě na sobě nezávislé metody. První metoda, kterou jsem použila, byla ARMS-PCR.

Optimalizace metody byla zdlouhavá. Zkoušela jsem měnit poměry reagencií a časy v reakčním protokolu. Při používání DNA izolované z bukálních stěrů nebylo možné metodu optimalizovat. Vždy ve vzorku kontrolní produkt chyběl. Výsledek vyšel správně až po použití DNA, která byla izolována z krve. Došla jsem tedy k závěru, že pro použití metody ARMS-PCR je zapotřebí kvalitnější DNA. Za tohoto předpokladu se jedná o metodu, která je rychlá, levná a výsledky se dají snadno odečítat.

Jako druhou metodu jsem k vyšetření použila metodu PCR-RLP. Optimalizace této metody byla rychlejší. Nároky na kvalitu DNA nejsou takové, jako u předchozí metody. Metoda PCR-RFLP je však náročnější z časového hlediska, neboť je po provedení PCR zapotřebí produkt ještě štěpit restrikčním enzymem. Odečítání výsledků je složitější. Produkty jsou blízko u sebe a je obtížnější je detekovat.

Po porovnání těchto dvou metod bych řekla, že pro použití je vhodnější metoda ARMS-PCR. Sice jsou kladeny větší nároky na kvalitu DNA. Výtěr z bukálních stěrů lze provést snadněji než odběr krve, kdy je zapotřebí navíc specializovaného odběrového místa. Výtěr z bukálních stěrů je pro pacienta pohodlnější a může si jej provést i sám z pohodlí svého domova. Ale na druhou stranu vyšetření je rychlé, vše probíhá v jedné PCR reakci. Výsledky jsou spolehlivé a snadno odečitatelné.

I při porovnání z finančního hlediska vychází o něco lépe metoda ARMS PCR, kde není zapotřebí restrikční enzym a pro detekci elektroforézou stačí jeden agarózový gel. U metody PCR-RFLP jsou zapotřebí gely dva, ten druhý musí být navíc čtyřprocentní. Spotřeba agarózového prášku může být tedy i třínásobná. Jedná se ale o malý rozdíl, který při rozhodování nemusí hrát zásadní roli.

K vyšetření jsem měla k dispozici 21 vzorků DNA od pacientů, u kterých se vyskytla schizofrenie v rodině. U deseti z nich jsem detekovala polymorfizmus Met/Met a u zbylých jedenácti pak polymorfizmus Val/Met. Pacienta s genotypem Val/Val jsem mezi dodanými vzorky neměla žádného. Odpovídá to skutečnosti, že se tento polymorfizmus v populaci vyskytuje v nemenším zastoupení.

Jedná se ale pouze o skupinu vybraných jedinců, u kterých se predispozice předpokládala. Výsledek tedy nelze vztahovat k celkové populaci.

Také není známá anamnéza vyšetřovaných pacientů. Víme jen, že se u nich v rodině schizofrenie vyskytuje. Už však nevíme, jestli se u pacientů samotných objevují nějaké příznaky. Z výsledků nelze vyvodit závěr vztahu polymorfizmu Val/Met v genu *COMT* ke vzniku schizofrenie.

5 Závěr

V teoretické části bakalářské práce jsem popisovala onemocnění schizofrenie. Kromě průběhu nemoci a jejích příznaků jsem se seznámila i s faktory souvisejícími s vrozeným rizikem pro toto onemocnění.

V mé práci jsem se věnovala především spojitosti schizofrenie s polymorfismem Val/Met v genu *COMT*. Tento gen ovlivňuje aktivitu enzymu katechol-o-methyltransferázy, který reguluje hladinu neurotransmiterů v nefrontální oblasti mozku.

Gen *COMT* se může vyskytnout ve třech různých genotypech. Nejčastěji se vyskytuje genotyp Val/Met, kdy je aktivita enzymu optimální.

Méně často se v populaci objevuje genotyp Met/Met, který se vyznačuje nízkou aktivitou enzymu COMT. Tím dochází ke hromadění neurotransmiterů a tím dochází ke zvýšené agresi jedince.

Genotyp Val/Val se vyskytuje nejméně často. Tito jedinci mají naopak aktivitu enzymu COMT vysokou. Nedostatek dopaminu pak může vést ke vzniku psychózy. Tito jedinci jsou také náchylnější ke vniku závislosti na omamných látkách.

Jako cíl praktické části práce jsem si zvolila optimalizaci metody PCR-RFLP pro vyšetření tohoto polymorfismu spojeného se schizofrenií a analýzu několika vzorků jedinců s výskytem schizofrenie v rodině.

Optimalizace metody byla úspěšná a mohla jsem tak vyšetřit dodané vzorky. Vedle metody PCR-RFLP jsem provedla i optimalizaci metody ARMS-PCR, abych si ověřila správnost výsledků. Genotypy jednotlivých pacientů získané oběma metodami se shodovaly.

Každá metoda má své výhody i nevýhody. Obě metody jsou spolehlivé a rychlé. Metoda ARMS-PCR má větší požadavky na kvalitu DNA. Samotná reakce je ale rychlá a k vyšetření stačí jedna PCR reakce.

Metoda PCR-RFLP nemá takové nároky na kvalitu DNA, za to je ale náročnější z časového a finančního hlediska. Odečítání výsledků může být někdy obtížnější, neboť se produkty liší pouze v desítkách bází (na rozdíl od metody ARMS-PCR, kde se produkty liší ve stovkách bazí).

K vyšetření jsem měla k dispozici 21 vzorků jedinců, u kterých se v rodině schizofrenie vyskytuje. Z těchto vzorků bylo 11 s genotypem Val/Met a zbylých deset s genotypem Met/Met. Genotyp Val/Val mezi vzorky nebyl ani jeden.

Na základě seznámení se s faktory souvisejícími s vrozeným rizikem pro schizofrenii a po provedení analýzy vzorků se zdá, že polymorfismus Val/Met v genu *COMT* může mít se vznikem schizofrenie souvislost. Neznám ale podrobnější anamnézu vyšetřovaných pacientů, abych mohla vyvodit přesnější závěry.

6 Seznam použitých zdrojů

1. BANKOVSKÁ MOTLOVÁ, Lucie a Filip ŠPANIEL. *Schizofrenie: jak předejít relapsu, aneb, Terapie pro 21. století*. 3., přepracované a doplněné vydání. Praha: Mladá fronta, 2017. Aeskulap. ISBN 9788020442871.
2. COMT gene: catechol-O-methyltransferase, 2007. In: *Genetic Home Reference*[online]. Lister Hill National Center for Biomedical Communications: U.S. National Library of Medicine [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/COMT
3. COMPTON, Michael T., 2006. Highlights of the 13th Association of European Psychiatrists (AEP) Symposium by the Section on Epidemiology and Social Psychiatry. Medscape Psychiatry [online]. 2006, 11(2), 4 [cit. 2018-02-22]. Dostupné z: https://www.medscape.com/viewarticle/543415_3
4. ČEŠKOVÁ, Eva a Hana KUČEROVÁ, SVOBODA, Mojmír, ed. Psychopatologie a psychiatrie: pro psychology a speciální pedagogy. Praha: Portál, 2006. ISBN 8073671549.
5. EDITOŘI CYRIL HÖSCHL, Jan LIBIGER a Jaromír ŠVESTKA, 2004. *Psychiatrie*. 2., dopl. a opr. vyd. Praha: Tigis. ISBN 8090013074.
6. Genový polymorfismus, ©2018. In: *VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK* [online]. Praha: Maxdorf [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/genovy-polymorfismus
7. HÖSCHL, Cyril, Jan LIBIGER a Jaromír ŠVESTKA, ed. *Psychiatrie*. Praha: Tigis, 2002. ISBN 8090013015.
8. HOTH, Karin F, Robert H PAUL a Leanne M WILLIAMS, 2006. Association between the COMT Val/Met polymorphism, early life stress, and personality among healthy adults. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. **2**(2), 7.
9. HOWES, Oliver D. a Shitij KAPUR, 2009. The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III—The Final Common Pathway. *Schizophr Bull. 2009* [online]. **3**(35), 549–562 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1093/schbul/sbp006. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2669582/
10. LAJIN, Bassam a Amal ALACHKAR, 2011. Detection of catechol o methyltransferase (COMT) Val58Met Polymophism by a New Optimalized

PCR-RFLP Method. *American Journal of Biomedical Sciences*. 6. ISSN 1937-9080.

11. MALÁ, Eva a Pavel PAVLOVSKÝ. Psychiatrie: [učebnice pro zdravotní sestry a další pomáhající profese]. Praha: Portál, 2002. ISBN 8071787000.
12. MANDAL, Ananya, 2017. Dopamine Functions. *News Medical* [online]. [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: https://www.news-medical.net/health/Dopamine-Functions.aspx
13. MATSUZAKA, Camila T., Denise CHRISTOFOLINI a Vanessa K. OTA, 2017. Catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphisms modulate working memory in individuals with schizophrenia and healthy controls. *Revista Brasileira de Psiquiatria*[online]. **4**(39) [cit. 2018-03-29]. DOI: dx.doi.org/10.1590/1516-4446-2016-1987. ISSN 1809-452X. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-44462017005004101&script=sci_arttext
14. MAZURA, Ivan. Speciální metody molekulární biologie. Praha: Karolinum, 1999. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 802460258x.
15. NOVOTNÝ, Jiří, 2014. Izolace DNA pomocí gravitačních kolonek. In: *Labguide*[online]. Praha [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: http://labguide. cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin/izolace-dna-pomoci-gravitacnich-kolonek/
16. NOVOTNÝ, Jiří, 2014. Izolace DNA pomocí chelexu. In: *Labguide*[online]. Praha [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: http://labguide. cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin/izolace-dna-pomoci-chelexu/
17. MOHR, Pavel, 2012. Schizofrenie: Diagnostika a současné terapeutické možnosti. *Medicína pro praxi* [online]. (9), 342-346 [cit. 2017-10-29]. Dostupné z: https://www. medicinapropraxi. cz/pdfs/med/2012/09/07. pdf
18. OREL, Miroslav, 2012. Psychopatologie. Praha: Grada. Psyché (Grada). ISBN 9788024737379.
19. PRAŠKO, Ján. Léčíme se s psychózou: co byste měli vědět o schizofrenii a jiných psychózách: příručka pro nemocné a jejich rodiny. Praha: Medical Tribune Group, c2005. ISBN 80-239-5482-2.
20. PRITCHARD, D. J. a Bruce R. KORF. *Základy lékařské genetiky*. Praha: Galén, c2007. ISBN 9788072624492.

21. RABOCH, Jiří a Petr ZVOLSKÝ, c2001. *Psychiatrie*. Praha: Galén. ISBN 8072621408.
22. RUIZ-SANZ, Jose´ Ignacio, Igor AURREKOETXEA, Ainhoa RUIZ DEL AGUA a, 2007. Detection of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism by a simple one-step tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR. *Molecular and Cellular Probes*. DepaUniversity of the Basque Country, Spain, (21), 6.
23. ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 8021038411.
24. STEPHENSON, Frank H., 2016. Recombinant DNA. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology* [online]. (3), 321–373 [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128022115000102
25. TUNBRIDGE, Elizabeth M, Paul J. HARRISON, Clare E. MACKAY a Sarah M. FARRELL, 2013. 2. Catechol-O-methyltransferase (COMT) influences the connectivity of the prefrontal cortex at rest. *Neuroimage* [online]. (68), 49-54 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2012.11.059. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3566589/
26. UHROVÁ, T., 2011. Schizofrenie. *Zdraví Euro* [online]. Univerzita Karlova [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/schizofrenie-457924
27. VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 8020006001. ZIMA, Tomáš, c2007. *Laboratorní diagnostika*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 9788072623723.
28. WILLIAMS, HJ, MJ OWEN a MC O'DONOVAN, 2007. Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia. *Schizophr Bull* [online]. **3**(33), 635-41 [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17412710
29. ZIMA, Tomáš, c2007. *Laboratorní diagnostika*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 9788072623723.
30. ZVOLSKÝ, Petr. Speciální psychiatrie. Dotisk. Praha: Karolinum, 1997. ISBN 8071842036.

Seznam obrázků a tabulek

Seznam Obrázků

Obr. 1 -chemická struktura dopaminu. 18
Obr. 2 -chemická struktura noradrenalinu (vlevo) a adrenalinu (vpravo). 20
Obr. 3 -chemická struktura acetylcholinu....21
Obr. 4 -amplifikace genu comt a přisedání komplementárních primerů k odpovídajícímu polymorfismu 32
Obr. 5 -schématická ilustrace amplifikace genu a jeho štěpení enzymem hi1ii v místě sekvence catg....34
Obr. 6 -výsledky z optimalizace metody arms-pcr, druhé měření. 43
Obr. 7 -výsledky z optimalizace metody arms-pcr, třetí měření. 45
Obr. 8 -výsledky z optimalizace metody arms-pcr, čtvrté měření. 47
Obr. 9 -výsledky z optimalizace metody arms-pcr, teplotní gradient. 49
Obr. 10 -analýza vzorků metodou arms-pcr. 50
Obr. 11 -optimalizace metody pcr-rflp, obrázek gelu po enzymatickém štěpení 53
Obr. 12 -optimalizace metody pcr-rflp, genotyp val/met. 54
Obr. 13 -fotografie gelu před štěpením. 55
Obr. 14 -fotografie gelu po enzymatickém štěpení. 55

Seznam tabulek

Tab. 1 -příprava agarózového gelu 31
Tab. 2 -sekvence primerů....32
Tab. 3 -pcr reakční protokol pro gen comt....33
Tab. 4 -velikosti frangmentů genotypů genu comt....34
Tab. 5 -sekvence primerů....35
Tab. 6 -pcr reakční protokol pro gen comt....36
Tab. 7 -velikosti frangmentů genotypů genu comt....37
Tab. 8 -koncentrace vzorků dna 38
Tab. 9 -koncentrace dna izolovaná z bukálních stěrů....40
Tab. 10 -rekční směs pro 4 vzorky 41
Tab. 11 -použité množství dna 41
Tab. 12- rekční směs pro 3 vzorky 42

Tab. 13- použité množství dna 42
Tab. 14 -rekční směs pro 3 vzorky 43
Tab. 15 -rekční směs pro 3 vzorky 44
Tab. 16 -použité množství dna 44
Tab. 17 -pcr reakční protokol pro gen comt.....45
Tab. 18 -použité množství dna 46
Tab. 19 -pcr reakční protokol pro gen comt.....46
Tab. 20 -použité množství dna 48
Tab. 21 -výsledky vyšetřených vzorků 51
Tab. 22 -rekční směs pro 3 vzorky 52
Tab. 23 -enzymatické štěpení.....53
Tab. 24 -výsledky vyšetřených vzorků 56

Seznam použitých zkratek

Tzv.	Takzvaně
Obr.	Obrázek
Tab.	Tabulka
Např.	Například
COMT	Katechol o methyltransferáza
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCR – RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů
ARMS – PCR	Amplifikační refrakční mutační systém
CNS	Centrální nervová soustava
fT_4	Volný thyroxin
TSH	Thyreotropní stimulační hormon
EKG	Elektrokardiogram
EEG	Elektroencefalografie
CT	Výpočetní tomografie
Rtg	Rentgen
Val	Valin
Met	Methionin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
Bp	Pár bází
C	Cytosin
A	Adenin
T	Thymin
G	Guanin
AS – PCR	Alelově specifická polymerázová řetězová reakce