Zdravotně sociální fakulta
Faculty of Health and Social Sciences

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

Analýza polymorfismu NFR 2 genu pomocí metody PCR

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Vendula Bufková

Vedoucí práce: Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci 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 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 .....Vendula Bufková

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D., za odborné vedení práce, cenné rady a připomínky, které mi věnovala, a za možnost realizovat experimentální část v laboratoři GENLABS. Velké dík patří též rodičům za trpělivost a obětavost v průběhu celého studia.

Analýza polymorfismu NFR 2 genu pomocí metody PCR

Abstrakt

Cílem mé bakalářské práce bylo praktické zvládnutí metody PCR a vypracování rešerše týkající se dané problematiky. Pro NFR2 gen je specifické, že je hlavním regulátorem homeostázy.

V experimentální části bylo cílem praktické zvládnutí izolace DNA z bukálního stěru a periferní krve, příprava a provedení PCR reakce, detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy.

Praktická část práce byla provedena v laboratoři GENLABS s. r. o. pod dozorem paní Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. Předložená bakalářská práce v praktické části shrnuje poznatky o NFR2 genu, o jeho funkci, struktuře, evoluci a lokalizaci. Nakonec shrnuji analýzu polymorfismu NFR2 genu pomocí metody PCR-CTPP (polymerase chain reaction with confronting two-pair primers) využívající dva páry primerů. V závěru popisuji vlastní průběh měření.

Klíčová slova:CVD-NFR2 gen- hypertenze- polymorfismus

Analysis of the NFR2 gene polymorphism using PCR method

Abstract

This bachelor thesis elaborates on the NFR2 gen analysis by the means of PCR method. In this bachelor thesis I focus on the NFR2 gen, which is the main key to cardiovascular diseases, to which belongs for example hypertension. NFR2 gen is also the main regulator of homeostasis, which plays an important role in cell signalling.

The submitted bachelor thesis summarizes the knowledge of NFR2 gen, its function and structure, method, evolution and localisation and then I summarize the polymorphism analysis with the help of PCR method.

The aim of my bachelor thesis was practical mastering of PCR method and the elaboration of the research of given topic.

In the experimental part, the goal was to practically manage the isolation of DNA from the buccal swab and peripheral blood, the detection of PCR products with help of gel electrophoresis, the preparation and execution of PCR reaction and the examination itself of the NFR2 gen by the means of PCR.

The practical part of the thesis was carried out in the GENLABS s.r.o. laboratory under the supervision of Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D. The assessment of the patients was made by an analyser. In the end of the thesis I describe the process of the measurements.

Key words:

CVD-NFR2 gen; hypertension; polymorphis

Obsah

1 Úvod 8

2 Teoretická část 10

2.1 Molekulární biologie genu 10

2.1.1 Popis genu 10

2.1.2 Funkce NRF2 genu 15

2.1.3 NFR2 gen- poloha, délka 15

2.2 Genetika na molekulární úrovni 16

2.2.1 Genetický polymorfismus a metody jeho detekce 16

2.3 Analýza DNA 18

2.3.1 Raný rozvoj genetiky 18

2.3.2 Co je PCR a metody jeho detekce 19

2.3.3 Multiplex CPR 22

3 Cíl práce 24

4 Praktická část 25

4.1 Izolace DNA 25

4.1.1 Izolace z bukálního stěru 25

4.1.2 Periferní krev 26

4.2 Měření koncentrace DNA 28

4.3 Gelová elektroforéza 31

4.4 Vlastní metody 33

4.4.1 PCR – polymerázová řetězová reakce 33

4.4.2 NFR2 gen PCR 35

5 Výsledky 39

6 Diskuze 41

7 Závěr 42

8 Seznam použitých zdrojů 43

9 Seznam zkratek 47

1 Úvod

NFR2 je transkripční faktor, jehož název je odvozen z angličtiny (nuclear factor E2-realated 2). Jedná se o jaderný faktor odvozený od erytroidů. NFR2 gen je hlavním klíčem kardiovaskulárního onemocnění, které přináší mnoho rizikových faktorů. Mezi nejznámější typy kardiovaskulárního onemocnění patří např. hypertenze, srdeční hypertrofie, kardiomyopatie apod.

Mechanická úloha exprese NFR2 genu v regulaci krevního tlaku není dosud objasněna. Není jasné, zda je oxidační stres přispívajícím faktorem k hypertenzi nebo zda hypertenze vyvolává oxidační stres. Jeden z možných mechanismů je indukce genu hem oxygenasa, která může snížit krevní tlak (Chen et al.2003). Biliverdin může být přeměněn na silný antioxidační bilirubin a tím přispívá k účinkům HO-1 na udržení vaskulární homeostázy (Datla et al., 2007).

Srdeční hypertrofie je běžným patologickým rysem některých hlavních kardiovaskulárních onemocnění, včetně hypertenze. Navíc srdeční hypertrofie je silně spojena se zvýšeným rizikem srdečního selhání a náhlou srdeční smrtí (Giordano 2005).

Poškození myokardu vede k poruchám u diabetiků. NFR2 měl zabránit nástupu diabetes mellitus a udržet metabolismus glukózy. NFR2 hraje také důležitou roli v protinádorové léčbě, kde léky mohou vyvolat poškození srdečního svalu (Rajesh et al.2010).

NFR2 gen řídí obranné mechanismy proti vzniku kardiovaskulárních onemocnění. NFR2 gen je důležitý proti oxidativnímu stresu u kardiovaskulárního onemocnění. Regulace oxidativního stresu je důležitým faktorem. Mnoho signálních drah, může také regulovat metabolismus reaktivních druhů kyslíku (ROS) prostřednictvím přímých nebo nepřímých mechanismů. Nízké hladiny ROS jsou obecně škodlivé pro buňky. Stav rakovinných buněk se obvykle liší od stavu normálních buněk. Vzhledem k metabolickým a signalizačním odchylkám vykazují rakovinné buňky zvýšené hladiny ROS. Vysoké hladiny ROS mohou představovat překážku pro tumorigenezi. Nicméně, ROS může také podporovat tvorbu nádorů tím, že indukují DNA mutace (Kobayashi et al., 2004, Ogura a kol., 2010, Erkens,2015).

V rámci bakalářské práce jsou shrnuty informace o NFR2 genu. Součástí teoretické části je i popis postupu metody PCR a gelové elektroforézy.

Cílem experimentální části práce bylo zvládnutí laboratorních metod – izolace DNA z bukálního stěru, izolace DNA z periferní krve, PCR, detekce mutace genu NFR2 pomocí metody PCR.

2 Teoretická část

2.1 Molekulární biologie genu

2.1.1 Popis genu

Termín gen zavedl v roce 1909 dánský botanik Wilhelm Ludvig Johannsen, který použil termín „Gene“, aby jím označil základní jednotky dědičnosti. Byl poprvé použit, aby byly pojmenovány Mendelovy faktory dědičnosti a dříve používanému termínu pangen vycházející z Darwinovy teorie pangeneze. (Kuciel, 2016).

Po letech Wilhelm Johannsen využil pojem gen od zakladatele G. J. Mendela z roku 1866.

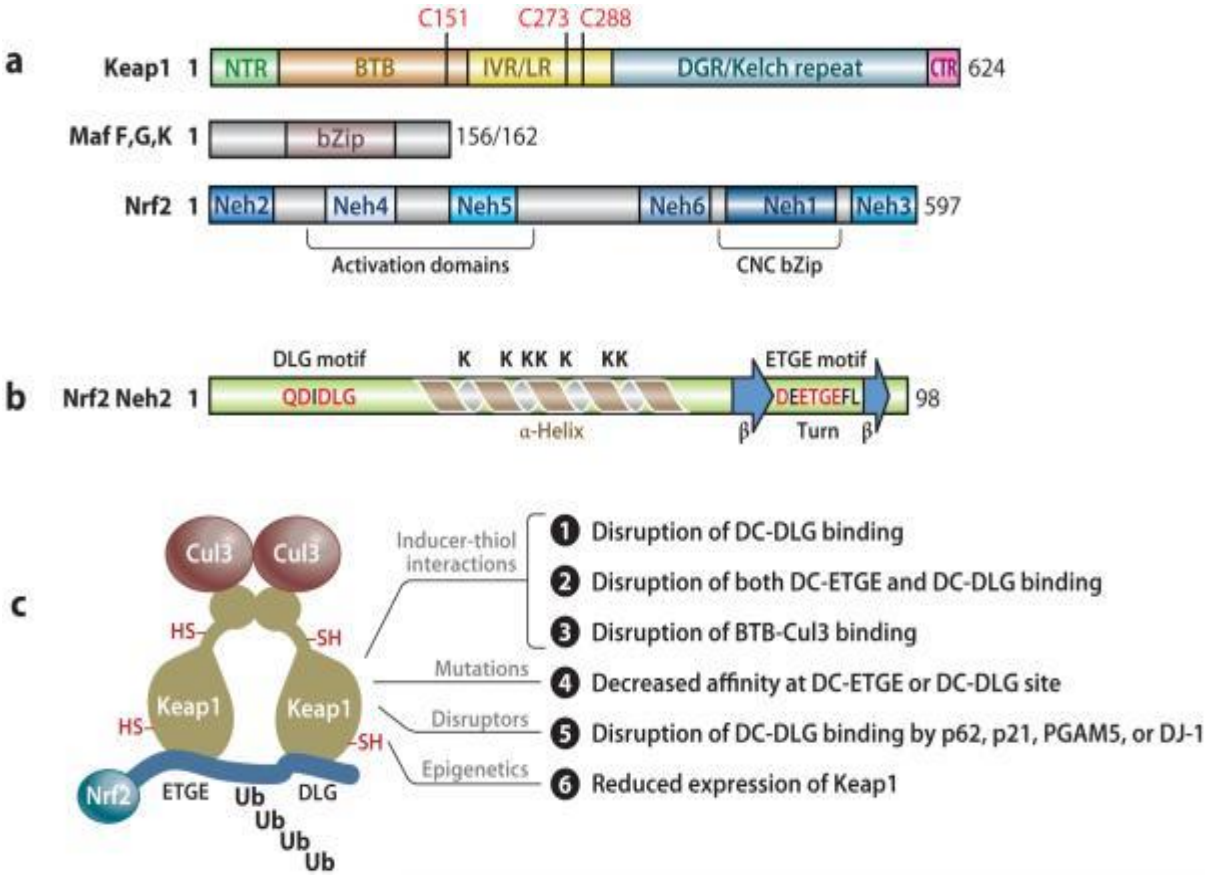
Slovo gen pochází z německého Gene a má základ z řeckého genos (rasa, potomci), genesis (zrození), geneá (generace, původ) a z geno (narodit se). (Kuciel, 2016)
Gen, je charakterizován jako základní jednotka genetické informace obsažena v buněčném jádře v chromosomech v podobě makromolekuly DNA (deoxyribonukleové kyseliny). (Kočárek et al., 2008)

NFR2 gen je transkripční faktor odvozený od erytroidů. Je známý pod pojmy NRF2 nebo NFE2L2. NFR2 gen patří do skupiny transkripčních faktorů leucinového zipu, který reguluje expresi mnoha antioxidativních drah. NFR2 se udržuje na bazální hladině v buňkách vazbou na jeho inhibitor. NFR2 gen chrání mnoho buněk a orgánů, například chrání plíce od hydroxytoluenu, nebo před plicní fibrózou. NFR2 gen má zvýšenou citlivost na acetaminofen vyvolaný hepatocelulární nekrózou. NFR2 gen také přispívá k neuroochraně (Kobayashi et al., 2004, Ogura a kol., 2010).

NFR2 jako ochránce buňky

NFR2 gen, jenž reguluje produkci celé řady antioxidačních a protizánětlivých proteinů chránících buňku proti oxidačnímu poškození. NFR2 se pohybuje kolem buněčného jádra v buněčné cytoplazmě a v pohotovosti ho udržují proteiny Keap1 a Cullin3. Když dojde k vystavení buňky zvýšeným hladinám oxidačního stresu, Keap1 aktivuje NFR2 a ten se přesune do buněčného jádra, kde se připne k DNA a aktivuje procesy vedoucí k vytvoření ochranného štítu, ve smyslu prevence vzniku rakoviny, kdy antioxidační působení může ochránit DNA buňky před vlivem např. karcinogenních látek. Pokud dochází ke kontrole ve zdravé buňce, tak tento proces brání poškození DNA a vzniku případných mutací.. Pokud dochází ke kontrole v rakovinotvorné buňce, tak ji to chrání také a to např. během podání chemoterapeutických léků. V těle je ve zdravých buňkách NFR2 nejvíce přítomen v ledvinách, ve svalech, plicích, srdci, játrech a mozku (Kobayashi et al., 2004, Ogura a kol., 2010).

Obrázek č. 1: NFR2 obsahuje 7 funkčních domén (Neh1- Neh7)



Zdroj: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4680839/

NRF2- Keap1

NFR2 je primárně regulován proteinem Keap1, substrátový adaptér obsahující vazebnou doménu Cul3. Keap1 má tři funkční domény zahrnující doménu bric-a-brac (BTB), intervenční oblast (IVR) a doménu Kelch, také známou jako doménu dvojitého glycinu (DGR). BTB doména váže Cul3 a je vyžadována pro dimeraci Keap1 (Zipper and Mulcahy 2002; Lo a kol., 2006). Doména Kelch / DGR je kritická pro udržení interakce mezi NFR2 a Keap1 interakcí s Neh2 doménou (Itoh et al. 1999; McMahon et al. 2004). IVR spojuje domény BTB a Kelch / DGR a obsahuje několik cysteinových zbytků, které slouží k regulaci aktivity Keap1 (Kobayashi et al., 2004, Ogura a kol., 2010).

Neh2 je hlavní regulační doména obsahující 7 zbytků lysinu, které jsou zodpovědné za konjugaci ubiquitinu stejně jako další 2 domény označené jako ETGE a DLG, jež pomáhají regulovat stabilitu. Domény ETGE a DLG spolupracují s Keap1. Domény Neh1 a Neh6 rovněž regulují stabilitu NFR2. Neh1 obsahuje CNC-typ bZIP DNA-vazebný motiv, který umožňuje NFR2 vázat DNA a dimerizovat s jinými transkripčními faktory. Doména Neh6 obsahuje dvě vazebná místa (DSGIS a DSAPGS motivy) pro b-transducin repeat Protein (b-TrCP). B-TrCP působí jako substrát pro ubiqitin Skp1-Cul1-Rbx1 / Roc1 Ligázového komplexu (McMahon et al. 2004; Rada et al. 2011; Chowdhry et al. 2013). Domény Neh3, Neh4 a Neh5 interagují s aktivátory, aby umožnily transaktivaci cílových genů NFR2. Doména Neh3 se váže na CHD6, jenž funguje jako transkripční aktivátor NFR2 (Nioi et al. 2005). Domény Neh4 a Neh5 interagují s CH3 doménami CBP (protein CREB), aby se usnadnila transaktivace cílových genů Nrf2 (Katoh et al. 2001; Zhu and Fahl 2001).

NFR2 gen a redoxní homeostáza

Regulace redoxní homeostázy je zásadní pro udržení normálních buněčných funkcí a zajištění přežití buněk. Rakovinové buňky se vyznačují zvýšenou aerobní glykolýzou (nazývanou Warburgův efekt) a vysokými hladinami oxidativního stresu. Tento oxidační stres způsobují reaktivní druhy kyslíku (ROS), které se hromadí v důsledku nerovnováhy. Vysoké hladiny ROS v rakovinových buňkách jsou důsledkem změn v několika signalizačních cestách, jež ovlivňují buněčný metabolismus. Tyto úrovně ROS jsou potlačeny zvýšenými antioxidačními obrannými mechanismy v rakovinových buňkách (Kobayashi et al., 2004, Ogura a kol., 2010).

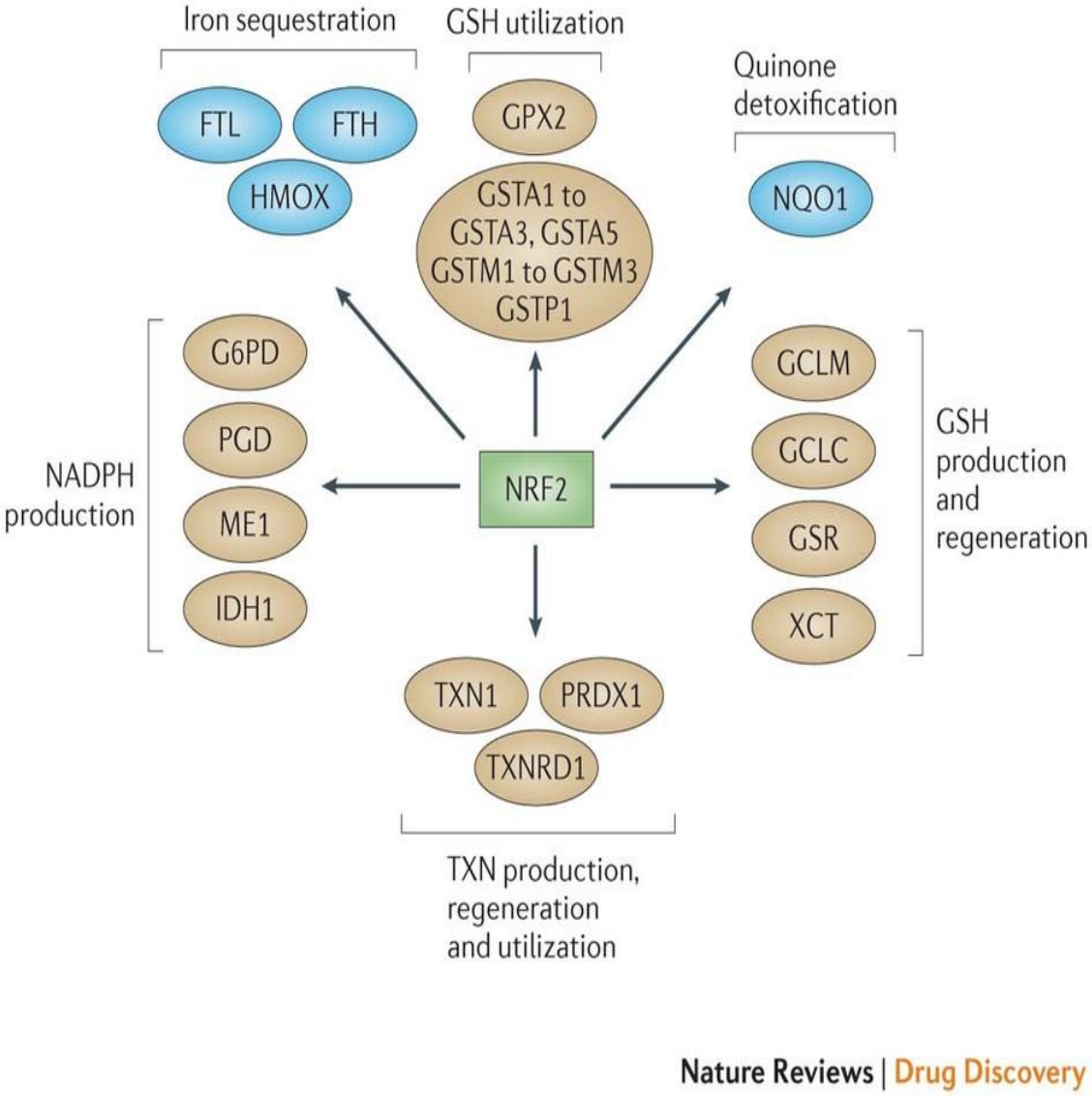
ROS jsou široce definovány jako chemikálie obsahující kyslík. Zahrnují superoxid (O2 • -) a hydroxyl (HO •) volné radikály stejně jako peroxid vodíku (H2O2). Tyto molekuly jsou hlavně odvozené z kyslíku, jenž se spotřebuje při různých metabolických reakcích. Zejména v mitochondriích, peroxizomech a endoplazmatickém retikulu (ER). Mitochondrie jsou hlavním zdrojem ROS. Peroxizomy se podílí na rozkladu H2O2 a na výrobě ROS (prostřednictvím β-oxidace mastných kyselin a aktivity flavin oxidasy). ER vytváří oxidační prostředí, které podporuje vytváření disulfidických vazeb a zvyšuje hladiny ROS oxidací bílkovin (Kobayashi et al., 2004, Ogura a kol., 2010).

NFR2 jako hlavní regulátor antioxidačních reakcí

Nukleární faktor erytroidn (NFR2) ovládá několik různých cest antioxidanty. Prvním z nich je glutathion (GSH), výroba a regenerace, která se řídí následujícími antioxidanty: glutamátu, cystein, ligáza a komplex modifikátoru podjednotky (GCLM), GCL a katalytické podjednotky (GCLC) s cystinem / glutamátem, transportérem XCT a glutathion reduktáza (GSR). Druhým je použití GSH, jenž je regulován na glutathion *S* -transferases (GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTA5, GSTM1, GSTM2, GSTM3 a GSTP1) a glutathion peroxidázy (2GPX2). Třetí je thioredoxin (TXN) výroba, regenerace a ultilization regulovaný TXN1, thioredoxin reduktáza 1 (TXNRD1) a peroxiredoxin 1 (PRDX1). Čtvrtý je NADPH výroby, který je řízen glukóza-6-fosfát-dehydrogenázy (G6PD), fosfoglycerát dehydrogenasu (PHGDH), jablečného enzymu 1 (ME1) a isocitrátdehydrogenáza 1 (IDH1). Oba GSH a TXN využít NADPH pro

regeneraci se poté, co snižuje reaktivní formy kyslíku (ROS). Tyto čtyři skupiny antioxidačních genů, jež jsou všechny stimulována Nrf2, mají oba komplementární a překrývající se funkce. Mezi další antioxidanty, které jsou ovládány Nrf2 zahrnují NAD (P) H: chinon oxidoreduktázy 1 (NQO1) a enzymy, regulační železa sekvestraci jako hemové oxygenázy (HMOX1), feritin těžkého řetězce (FTH) a ferritinu lehký řetězec (FTL). Je pozoruhodné, že několik NFR2 cílových genů nebyly zahrnuty v tomto obrázku, protože se netýkají antioxidačních funkcí (Kobayashi et al., 2004, Ogura a kol., 2010).

Obrázek č. 2:



Zdroj: http://www.nature.com/nrd/journal/v12/n12/fig_tab/nrd4002_F2.html

2.1.2 Funkce NRF2 genu

Hlavní funkcí NFR2 genu je aktivovat reakci buněčného antioxidantu vyvoláním transkripce široké řady genů, které jsou schopné bojovat proti škodlivým účinkům, jako jsou xenobiotika a oxidační stres.

NFR2 gen vážící se na antioxidační prvky v promotoru cílových genů je důležitý pro tento oxidační stres. Může být zapojen do transkripční aktivace genů beta – tzn. injekce globinového insulinu zprostředkovávající činnost na přecitlivění tohoto insulinu. NFR2 gen chrání mnoho buněk a orgánových systémů (http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NFE2L2#function).
NFR2 gen se podílí i na ochraně neuronu, chrání před neurodegenerativním onemocněním, diabetem, kardiovaskulárním onemocnění a plicní fibrózou. NFR2 podporuje nejen přežití normálních buněk, ale také rakovinotvorné buňky (http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NFE2L2).

2.1.3 NFR2 gen- poloha, délka

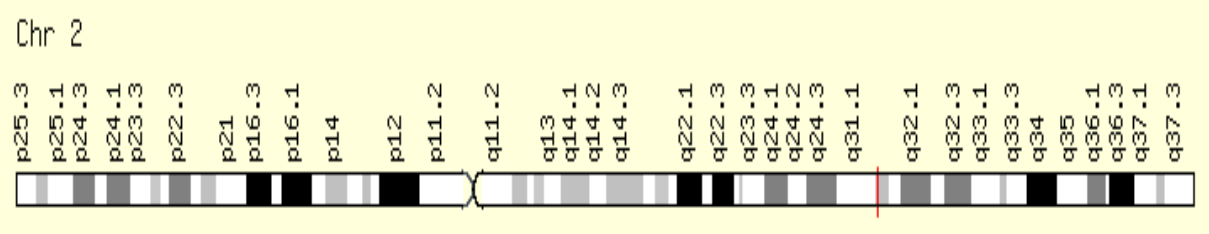
Velikost genů je různě dlouhá od několika párů bází (bp) až po miliony bp.

Pro NFR2 gen je typická poloha a délka následující:

Chromozom: 2

Začátek: 177,227,595 bp
Konec: 177,392,697 bp

Obrázek č. 3:



Zdroj: http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NFE2L2#localization

2.2 Genetika na molekulární úrovni

2.2.1 Genetický polymorfismus a metody jeho detekce

Genetický polymorfizmus je existence mnoha alel v jednom lokusu. DNA polymorfizmus se může vyskytovat i mimo kódující sekvence a je nezávislý na genu.

Genetický polymorfizmus může být indukován faktory nebo vznikat náhodnými procesy, tzv. genetický polymorfizmus označený jako genetická mutace (Kuciel, Kejnovský, 2016).

Polymorfizmus na úrovni proteinu

Polymorfizmus, kde mohou být pozorovány varianty proteinů lišící se i v jen jedné aminokyselině (Brown, 2007).

Polymorfizmus na úrovni DNA

DNA polymorfizmus je výsledkem odlišné nukleotidové sekvence, nebo variabilního počtu nukleotidových jednotek (Brown, 2007).

Alela je tedy důležitá součást polymorfizmu. Není to jen forma genu, proto nemusí být v kódující sekvenci genu. Alela vyjadřuje, že v daném místě je variabilita. Lokus je místo na chromozomu upřesňující polohu alely.

DNA polymorfizmů využívá k analýze genů a mohou být označeny jako DNA markery (Brown, 2007).

Třídy DNA polymorfizmů

Rozlišujeme 3 třídy polymorfizmů:

- jednonukleotidové polymorfizmy,
- mikrosatelity,
- minisatelity.

Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP)

Nejrozšířenější typ polymorfizmu. Nové SNP vznikají spontánní mutací, to znamená špatné zařazení nukleotidu. SNP se nachází mimo kódující sekvence genů (Brown, 2007).

Mikrosatelity

V populaci se může vyskytovat mnoho alel s rozdílnými délkami (Brown, 2007).

Minisatelity

Jsou podobné mikrosatelitům, pouze se liší délkou a počtem, ale výskyt je menší (Brown, 2007).

Typy DNA markerů

DNA markery jsou DNA polymorfizmy. DNA markery se dělí na přímé nebo nepřímé.

Přímý marker je součástí genu a je příčinnou mutací.

Nepřímý market je ten, který se nachází v blízkosti a je v genové vazbě.

Čím blíže je marker ke genu, tím dochází k přenosu alel obou lokusů.

Výhodou DNA markerů je, že lze určovat jejich alely bez ohledu na jejich věk.

DNA markery dělíme na tři typy:

- Markery 1. typu jsou polymorfizmy v kódujících genech.
- Markery 2. typu jsou variabilní polymorfizmy nekódujících sekvencí.
- Markery 3. typu jsou jednonukleotidové polymorfizmy (SNP), jež se mohou vyskytovat v genech, ale většina se vyskytuje v nekódujících genech (Brown, 2007).

2.3 Analýza DNA

2.3.1 Raný rozvoj genetiky

V roce 1952 bylo přijato, že DNA představuje genetický kód. Do té doby se říkalo, že funkci genů mají proteiny.

Během roku 1953 byla objasněna struktura DNA, rozluštěn genetický kód a byly popsány procesy transkripce a translace (Brown, 2007, Peter, 2009).

2.3.2 Co je PCR a metody jeho detekce

Polymerázová řetězová reakce se liší tím, že u PCR se DNA smíchá se souborem reagencií a mikrozkumavka se vloží do termálního cykléru, což je zařízení, které umožní inkubování směsi (Zima, 2007). Základní kroky budou popsány později v praktické části mé bakalářské práce.

PCR ARMS nebo-li AS-PCR

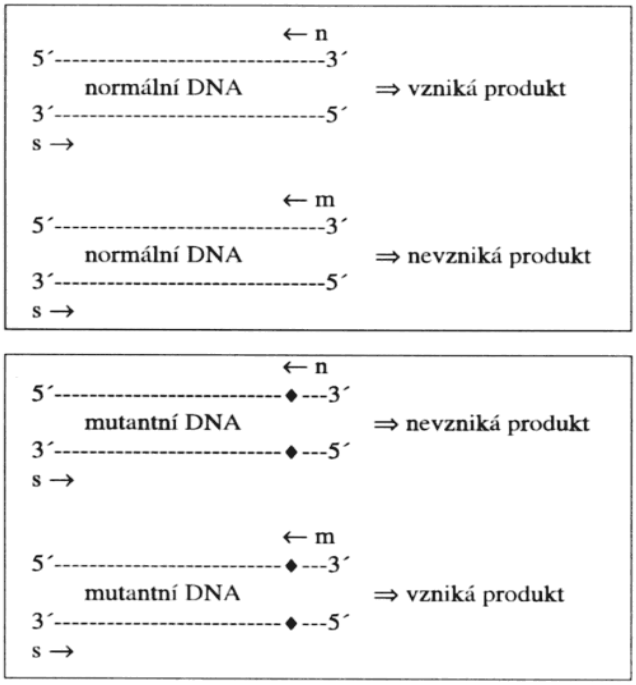
PCR ARMS je založena na principu komplementarity bází na 3'konci primeru.

Základem pro správnou amplifikaci je tato komplementarita. Pokud nedojde ke komplementaritě, nedojde ke specifické amplifikaci. Jedná se o variantu AS-PCR (alelově specifické PCR).

Do jednoduchého ARMS testu musí být zařazena vnitřní PCR kontrola, která odliší, zda jde o poruchu PCR reakce.

PCR ARMS se skládá ze dvou samostatných reakcí, z nichž jedna je specifická pro normální DNA sekvenci a druhá pro mutovanou sekvenci (obr. 1), (Zima, 2007).

Obrázek č. 4: Princip reakce ARMS a AS – PCR



Zdroj: Zima (2007)

Tabulka č. 1: Princip hodnocení PCR ARMS a AS – PCR podle typu produktu reakce

Genotyp	Oligonukleotidy	Produkt reakce
Homozygot normální	s +n	Ano
	s +m	Ne
Heterozygot	s +n	Ano
	s +m	Ano
Homozygot mutantní	s +n	Ne
	s +m	Ano

Zdroj:

Pokud se mluví o mutovaném homozygotu, dochází k vytvoření PCR produktu v amplifikační reakci obsahující společný primer.

Pokud se mluví o nemutovaném homozygotu, dochází k vytvoření PCR produktu pouze pro nemutovanou formu genu při dosažení společného primeru.

V situaci, kdy dojde ke vzniku produktu v obou amplifikačních reakcích, obsahujících společný a „nemutovaný“ primer i společný a „mutovaný“ primer, jedná se vždy o heterozygotu (tab. 1), (Zima, 2007). Tato metoda byla úspěšně aplikována např. k detekci mutací v oblasti genu pro cystickou fibrózu (Ferrie et al., 1992).

AS- PCR

AS – PCR nebo-li alelově specifickou PCR poprvé využil Olerup et al. (1991) na detekci subtypů HLA (human leukocyte antigens), což je hlavní histokompatibilní systém a jeho důležitou rolí je funkce v imunitním systému. (Penka et al., 2012). AS-PCR je velmi jednoduchá, spolehlivá a také rozliší heterozygotu ve svém lokusu od homozygotů pro jednu nebo druhou alelu. Tato metoda se používá pro detekci malých delecí a bodových mutací. AS-PCR se používá pro tři různě alelově specifické oligonukleotidy, které jsou vzaty na základě komplementarity s mutovanou, nemutovanou či variantní alelou, kdy jeden primer je vždy společný pro obě alely.

Nejčastěji používanou variantou AS-PCR je PCR ARMS (amplification refraktory mutacion detection systém), jenž byl popsán výše. (Zima, 2007).

ASO-PCR

Alelově specifické oligonukleotidy (ASO) jsou stanoveny k přímé detekci známých bodových mutací. ASO tvoří próby, k nimž se spojí testovaná DNA. Produkty PCR se rozčleňují na agarózovém gelu. Poté následuje denaturace a dvojité blotování gelu, který musí být vložen mezi dvě nylonové membrány. Dále musí být denaturační roztok sloužící k tomuto přenosu. DNA k membráně je zabezpečena pomocí UV záření. Po zabezpečení dochází k hybridizaci s ASO (normálními a mutantními) za použití přijatelného detekčního systému. Sekvence mezi sondou a analyzovanou DNA je bez nejmenší chyby komplementární (Zima, 2007). Výhradně krátké ASO detekují jednonukleotidové změny v sekvenci DNA (Nussbaum et al., 2007).

2.3.3 Multiplex CPR

Multiplexní reakce patří k nejrozšířenějším metodám PCR. Multiplex PCR umožňuje amplifikovat několik PCR produktů v jedné amplifikační reakci (Zima, 2007). Všechno pokračuje jedním elektroforetickým dělením v agaróze a zpravidla je určeno k detekci značením ethidiumbromidem (Zima, 2007) či jiným interkalačním barvivem (např. GelRed, MidoriGreen apod.).

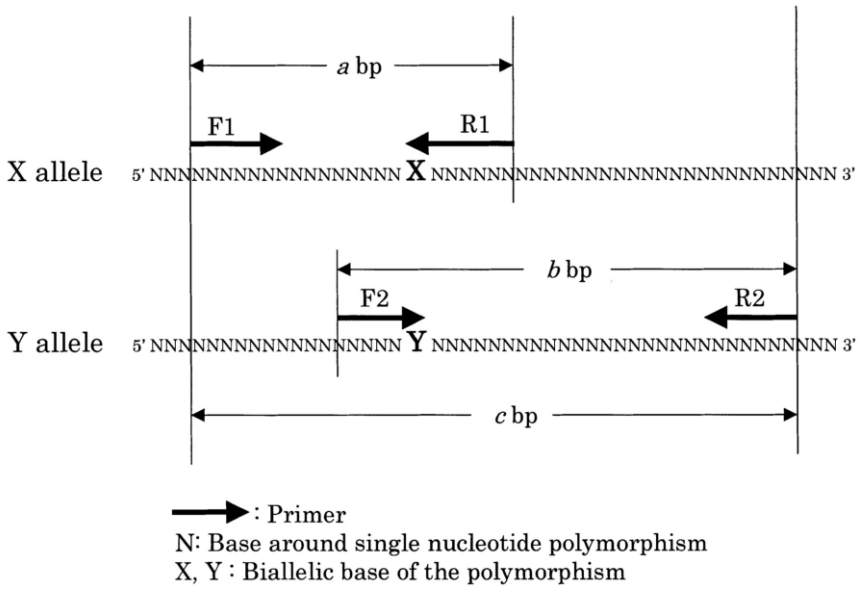
U multiplex PCR jsou jednotlivé primery navrženy stejně (dva párové primery) jako u klasické PCR. Klasická PCR reakce se vyznačuje tím, že musí mít dílčí primery stejnou či velmi podobnou teplotu annealingu. V elektroforéze jsou poté odlišitelné velikosti amplifikačních produktů z jednotlivých lokusů (Bartoš).

Metoda je velmi náročná ve fázi přípravy, kdy je důležité navrhnout primery, a poté sestavit jeho dvojice k již vytvořené struktuře (Bartoš). Ke každé reakci je důležité provést pozitivní i negativní kontrolu (Zima, 2007).

PCR-CTPP

Metoda PCR-CTPP umožňuje genotypizaci SNPs bez restrikčního štěpení. Princip PCR-CTPP v použití dvou primerových párů. Schéma nasedání primerů je znázorněno na obr. 5. První primerový pár je navržen pro X alelu (primer 1F a 1R) a druhý primerový pár je navržen pro alelu Y (primer 2F a 2R). Velikost produktů DNA, které mají být specificky amplifikovány pro každou alelu, musí být dostatečně odlišné, tak, aby PCR produkty byly rozlišitelné na gelu po proběhnutí elektroforézy. V případě přítomnosti alely X (homozygotní XX genotyp) jsou pozorovány produkty o určité specifické délce, v případě přítomnosti druhé alely Y (homozygotní genotyp YY) dojde k amplifikaci PCR produktu o jiné délce. V případě přítomnosti obou alel (heterozygotní genotyp XY) jsou aplifikovány oba typy produktů, odpovídající alele X i Y protože DNA sekvence mezi primery 1 F a 2 R je také amplifikována.

Obrázek č. 5: Princip reakce PCR-CTPP



Zdroj: Hamajima, N et al., 2002.

Není pochyb o tom, že PCR-CTPP je časově úsporná a levná metoda. PCR-CTPP zahrnuje čtyři různé primery namísto dvou a nevyžaduje jako např. PCR RFLP restrikční štěpení PCR produktů. Proto, aby PCR-CTPP probíhala specificky vyžaduje použití primerů s podobnou teplotou tání.

3 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo:

- napsat odbornou rešerši na dané téma,
- praktické zvládnutí laboratorních metod- izolace DNA z bukálního stěru, izolace DNA z periferní krve, PCR a detekce polymorfismu NFR2 genu,
- vyhodnocení a diskuze.

4 Praktická část

Praktická část se skládá ze dvou částí. První část je věnována izolaci DNA z bukálního stěru a izolaci DNA z periferní krve, druhá část je věnována vlastní analýze polymorfismu NFR2 genu pomocí PCR.

Laboratorní část bakalářské práce byla vykonána v Českých Budějovicích v genetické laboratoři GENLABS pod vedením Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. Veškerá vyšetření byla prováděna pod odborným dohledem kvalifikovaného pracovníka.

4.1 Izolace DNA

Pro každou PCR reakci potřebující DNA je nutná její izolace, která se provádí z bukálního stěru nebo z periferní krve.

4.1.1 Izolace z bukálního stěru

K izolaci DNA z bukálního stěru byl použit DNA Isohelix DNA dle doporučení výrobce.

Reagencie:

- Lysis buffer- **LS**
- Proteinase K- **PK**
- Capture buffer- **CT**
- Re- hydration buffer- **TE**

Před zahájením izolace byly pro jeden vzorek připraveny 3 x 1,5 ml mikrozkumavky. Bylo potřeba nastavit suchou lázeň na 60 °C a PK vyndat z mrazáku a nechat roztát při pokojové teplotě.

Postup

Do zkumavky bylo napipetováno 500 µl LS s odběrovým tamponem bukálního stěru a 20 µl PK. Tento vzorek byl krátce zvortexován, zcentrifugován. Poté byl uložen k inkubaci při teplotě 60 °C do suché lázně po dobu jedné hodiny. Po inkubaci došlo opět ke krátkému zvortexování a zcentrifugování. Posléze do 1,5 ml mikrozkumavky bylo přepipetováno 400 µl vzorku. Opět proběhla krátká centrifugace a došlo k přepipetování supernatantu k odebraným 400 µl vzorku. K následnému vzorku bylo přidáno 500 µl CT, byl krátce zvortexován a zkumavka byla zcentrifugována při 13 tis. ot/min. po dobu 7 minut. Po cetrifugaci byl obezřetně odstraněn supernatant, kde nesmělo dojít k narušení pelety DNA. Po vyjmutí byla zkumavka opět krátkodobě zcentrifugována a byl vzat všechen zbylý supernatant. K peletě DNA bylo doplněno předehřátého 30-150 µl TE (v případě vyšší koncentrace DNA lze objem zmenšit až na objem 30 µl). Tento vzorek byl inkubován po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby došlo ke zvortexování a zcentrifugování zkumavky při 13 tis. ot/min. po dobu 2 minut. Poté následovalo odebrání supernatantu obsahujícího izolovanou DNA do nové 1,5 ml mikrozkumavky. Takto nachystaná DNA byla uschována do krabičky mrazicího boxu.

4.1.2 Periferní krev

K izolaci genomové DNA z plné krve byl využit Genomic DNA mini Kit dle doporučení výrobce

Reagencie

- 96% ethanol
- GT Buffer
- W1 Buffer
- Wash Buffer
- Elution Buffer
- RBC Lysis Buffer

Spotřební materiál

- GD Column
- 2 ml collection tube
- 1,5 ml mikrozkumavky
- Špičky a rukavice

Před zahájením izolace bylo nutné vytemperovat termostat na 60 °C. Pro jeden vzorek byla potřeba přichystat 2 x 1,5 ml mikrozkumavky. Jedna zkumavka pro finální eluci a druhá zkumavka pro lyzační reakci. Každá zkumavka byla samozřejmě opatřena laboratorním číslem vzorku.

Postup

Nejdříve do 1,5 ml označené zkumavky bylo napipetováno 300 µl plné krve. Dále bylo přidáno 900 µl RBC Lysis Buffer. Takto připravená směs byla promíchána převrácením v ruce, důležité bylo, abychom směs nevortexovali. Poté následovala inkubace 10 minut při pokojové teplotě. Posléze byl vzorek centrifugován při 3 tis. ot/min. po dobu 5 minut. Supernatant byl ze zkumavky obezřetně odstraněn a byla ponechána peleta. Po ponechání pelety, která byla nesuspendována, následovalo přidání 100 µl RBC Lysis Buffer. Poté bylo přidáno 200 µl GB Buffer. Zkumavka byla zvortexována a krátce stočena a inkubována 10 - 15 minut v termostatu při 60 °C. V průběhu inkubace bylo nutné zkumavku každé 3 minuty promíchat převrácením v ruce. Po skončení inkubace bylo do zkumavky přidáno 200 µl 96 % ethanolu, následoval vortex 10 s, krátká centrifugace (stočení zkumavky).

Následovalo přepipetování připraveného lyzátu na kolonku (GD Column), jež byla vsunuta do čisté sběrné zkumavky (2 ml Collection Tube). Tato kolonka s čistou zkumavkou byla zcentrifugována při 14 – 16 tis. otáčkách po dobu 5 minut. Po centrifugaci byla kolonka přemístěna do nové sběrné zkumavky a použitá sběrná zkumavka s tekutinou byla vyhozena. Na této kolonce s navázanou DNA bylo napipetováno 400 µl W1 Bufferu, opět proběhla centrifugace při 14 – 16 tis. otáčkách po dobu 30 s.

Z této sběrné zkumavky byla vylita tekutina, kolonka byla vrácena zpět do stejné sběrné zkumavky. Na kolonku bylo napipetováno 600 µl Wash Bufferu a proběhla centrifugace při 14 – 16 tis. otáčkách po dobu 30 s. Ze sběrné zkumavky byla naposledy vylita tekutina a kolonka vložena zpět do sběrné zkumavky a zcentrifugována při 14 – 16 tis. otáčkách po dobu 3 min. Bylo nutné zrevidovat, zda kolonka je suchá, pokud ne, bylo nutné opakovat předchozí centrifugaci, dokud kolonka nebyla zcela suchá.

Úplně suchá kolonka s navázanou DNA byla přenesena do připravené čisté 1,5 ml mikrozkumavky řádně označené štítkem (jméno a příjmení klienta, RČ, číslo vzorku, datum izolace, iniciály toho, kdo izolaci provedl). Rovnou na filtr kolonky bylo napipetováno 50 µl předehřátého Elution Buffer (vytemperováno na 60 °C). Po napipetování následovala inkubace nejméně 3 minuty při pokojové teplotě. Kolonka s označenou 1,5 ml mikrozkumavkou byla zcentrifugována při 14 – 16 tis. otáčkách po dobu 30 s. Následně izolovaná DNA byla umístěna do lednice pro pozdější použití (max. 24 hod) nebo do mrazicího boxu (- 20 °C), ve kterém je DNA archivována.

4.2 Měření koncentrace DNA

Měření koncentrace DNA testovaných vzorků bylo provedeno na přístroji Qubit® 2.0 Fluorometer. Konečné koncentrace u DNA izolované z periferní krve a u DNA z bukálního stěru se výrazně nelišily. Přestože koncentrace DNA získaná z bukálního stěru byla o něco vyšší než koncentrace DNA z periferní krve.

Tabulka č. 2: Hodnoty koncentrace DNA jsou uvedeny v tabulce níže a jsou vyjádřeny v ng/µl.

Vzorek	Koncentrace DNA v ng/µl
42/17	>600
43/17	49,30
44/17	17,10
45/17	>600
49/17	42,30
50/17	36,70
51/17	43,30
56/17	10,50
57/17	29,60
58/17	34,70
60/17	23,90
63/17	18,70
64/17	42,90
65/17	28,00
66/17	17,60
67/17	33,90
68/17	34,60
69/17	33,80

70/17	11,30
72/17	15,50
73/17	54,00
74/17	>600
75/17	38,50
76/17	52,00
77/17	43,60
78/17	42,40
79/17	46,60
80/17	48,80
81/17	55,00
82/17	51,00
85/17	32,30
86/17	48,80
88/17	49,20
89/17	57,00
91/17	A 31,30 B 37,30
93/17	24,80
95/17	19,40
96/17	A 37,40 B 49,60
97/17	32,70

98/17	48,20
99/17	33,40
100/17	19,10
102/17	29,10
103/17	44,70

Zdroj: vlastní

4.3 Gelová elektroforéza

Reagencie

- Crystal 10 x TBE Buffer
- 10 x TBE
- Pracovní roztok 1 x TBE
- Agarózové tablety
- Mildori Green Advanced DNA Stain
- 100bp DNA LADDER H3RTU
- DNA Loading Buffer Blue

Postup

Nejprve bylo nutné si připravit pracovní roztok 1 x TBE. TBE pufr se obmění v elektroforetické vaně 1 x za 14 dní.

Určité množství agarózy bylo naváženo do plastové kádinky o objemu 100 ml (0,5 g/50 ml = 1 % gel, 1 g/50 ml = 2 % gel, atd.). Tablety byly roztaveny v TBE pufru. Následovalo zahřívání roztoku TBE pufru a agarózy v mikrovlnné troubě. Po pár zahříváních vznikl čirý gelový roztok bez bublin. Do tohoto roztoku bylo přidáno 12 µl barvičky Midori Green Advanced DNA Stain. Bylo nutné promíchat a nechat krátkodobě zchladnout. Než bylo zchlazeno, tak mezi tím byla přichystaná elektroforetická podložka, kde do gelu byly vsazeny hřebeny. Po ztvrdnutí gelu byly

hřebeny vyjmuty a gel byl umístěn do elektroforetické vany obsahující 1 x TBE pufr. Gel musel být zcela ponořen.

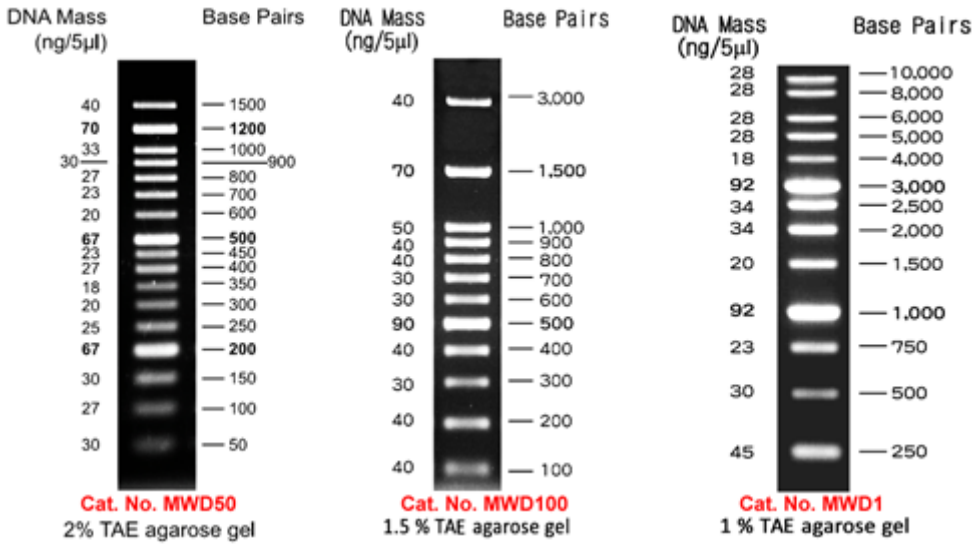
Po vybrání první či poslední jamky bylo napipetováno 5 µl markeru 100 bp DNA LADDER H3RTU (obr. 2). Do zbylých jamek bylo napipetováno pokaždé 10 µl každého PCR produktu.

Elektroforéza byla prováděna po dobu 10 - 15 minut při 100 - 135 V. Průběh celé elektroforézy bylo možno kontrolovat pomocí speciálního iluminátoru MupidTMLED Illuminator zásluhou použité barvy Midori Green Advance DNA Stai. Po přerušené elektroforéze byl gen zaznamenán pomocí detekčního systému FastGene® GelPic LED Box.

Princip elektroforézy

Princip gelové elektroforézy spočívá v tom, že pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli putuje směrem k anodě. Prostřednictvím gelové elektroforézy lze rozdělovat molekuly DNA na základě jejich velikosti a i odlišné pohyblivosti v gelu nezávisle na celkovém množství DNA v naneseném vzorku.

Obrázek č. 5: Ukázka použitého primeru na agarózovém gelu.



Zdroj: http://www.nippongenetics.eu

4.4 Vlastní metody

Pro všechny PCR reakce byl použit kit MyTaq Red DNA Polymerase dle doporučení výrobce.

Před zahájením PCR reakce byla provedena izolace DNA. DNA byla izolována z bukálního stěru nebo z periferní krve.

Když je vzorek přijat do laboratoře, musí být uchován v ledničce při teplotě cca 4 °C. Před zpracováním každého vzorku musí být řádně vyplněná žádanka a informovaný souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením. Po vyplnění je vždy žádanka zkontrolována a každému vzorku je přiřazeno identifikační číslo.

4.4.1 PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR je metoda molekulární biologie používaná k množení specifického úseku DNA in vitro. PCR umožňuje enzymatickou amplifikaci DNA in vitro syntézou vybrané sekvence. (Bártová, 2011).

DNA v opakující reakci, kdy se mění 3 teploty za použití termostabilní DNA polymerázy. Princip PCR je založen na využití DNA polymerázy na principu komplementarity pro opakované kopírování templátové molekuly DNA. Vysokou teplotou dojde k denaturaci dvouřetězcové DNA a získaná jednořetězcová DNA slouží jako templát. V dalším kroku je zapotřebí dvou primerů (krátké oligonukleotidy), jež se připojují ke komplementárním úsekům DNA. Tyto primery se vždy připojí ke komplementárním úsekům DNA a ovládají syntézu nových vláken ve směru 5´→3´. (Bártová, 2011)

Složení PCR reakce:

- Templátová DNA, která je izolována ze vzorku.
- Připravené primery, kdy každý je komplementární k jednomu řetězci.
- Směs nukleotidů dNTP (deoxyribonukleosidtrifosfáty).
- Termostabilní enzym DNA polymeráza (např. *Taq* polymeráza získaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech).

Průběh PCR reakce:

Každá reakční směs se vloží do termocykleru, ve kterém probíhají 3 teplotní fáze s odlišnými teplotami. Tento cyklus se několikrát opakuje. Do reakce se započítává i počáteční denaturace a závěrečná polymerační reakce.

Počáteční denaturace DNA při teplotě 94 °C po dobu 2 - 5 minut.

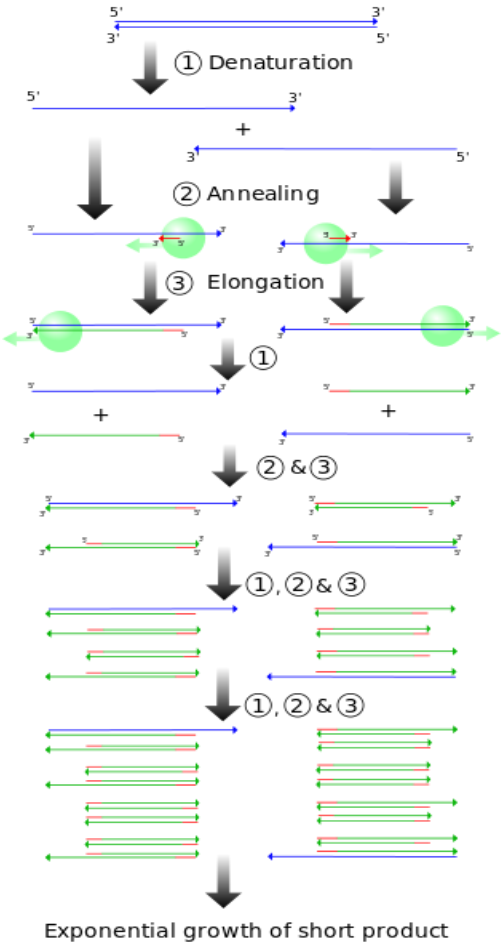
1. Denaturace – rozvolnění řetězců DNA vlivem vysoké teploty 94 - 98°C (20 – 45 s) za vzniku jednovláknových DNA molekul.

2. Annealing – nasedání primerů na specifická místa DNA díky snížené teplotě na 50 – 65 °C (30 – 90 s)

3. Extension – syntéza komplementární DNA, dochází k nasedání naprimery a připojování na volné nukleotidy k vláknu DNA ve směru od 5‘ konce k 3‘ konci. Obvykle se tyto kroky opakují ve 30 cyklech.

Závěrečná polymerační reakce – dosyntetizování řetězců (72 °C, 5 min)

Obrázek č. 6: Ukázka průběhu PCR, 1 - denatuarace, 2 - annealing, 3 – extension



Zdroj: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz

4.4.2 NFR2 gen PCR

Reagencie:

- H_2O 33,3µl
- My Taq Red Reaction Buffer 10 µl
- My Taq Polymerasa 0,2 µl
- DMSO (Dimethylsulfoxid) 2,5 µl
- Primery F1+R1, F2+R2 0,5 µl 0,5 µl
- Celkem 48 µl
- DNA 2 µl

Postup

Celá PCR reakce byla z důvodů zabránění kontaminace prováděna v dekontaminovaném laminárním boxu. Do chladícího stojánku bylo připraveno 10 mikrozkumavek odpovídajících počtu vzorků. Dále jedna PCR mikrozkumavka pro negativní kontrolu, pro pozitivní kontrolu a jedna 1,5 ml mikrozkumavka pro přípravu společného master mixu. Zkumavky byly řádně popsány číslem vzorku. Do této 1,5 ml mikrozkumavky byly napipetovány jednotlivé reagencie. Poté byly rozpipetovány po 48 µl do jednotlivých PCR mikrozkumavek a do každé byly přidány 2 µl DNA izolátu testovaných vzorků (tab. 3).

Tabulka č. 3: Reakční PCR mix pro vyšetření NFR2 genu

	Pro 1 reakci	Pro 11 reakcí
H_2O	33,3µl	366,3 µl
My Taq Red Reaction Buffer	10 µl	110 µl
My Taq Polymerasa	0,2 µl	2,2 µl
DMSO	2,5 µl	27,5 µl
Primery F1+R1, F2+R2	0,5 µl + 0,5 µl	5,5 µl+5,5 µl
Celkem	48 µl	528 µl
DNA	2 µl	

Po napipetování všech těchto reagencií byly mikrozkumavky uzavřeny, zvortexovány a krátkodobě stočeny. Posléze byly umístěny do termocykleru a byl spuštěn příslušný program (tab. 4).

Tabulka č. 4: PCR reakční protokol pro vyšetření NFR2 genu

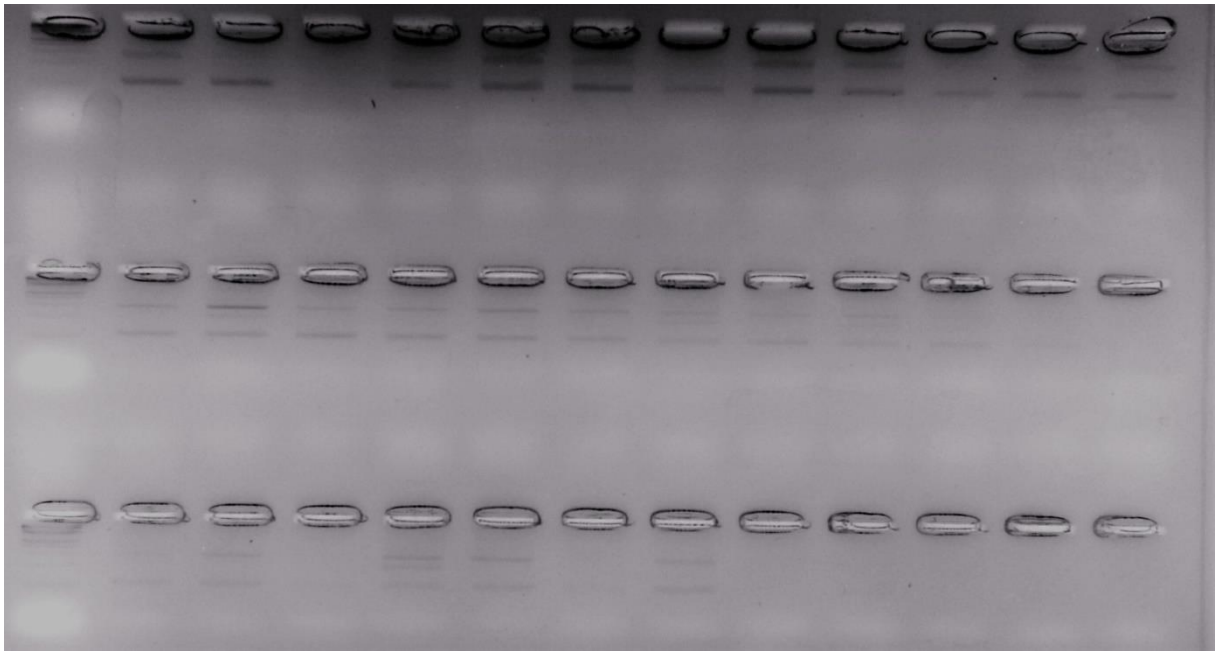
1 cyklus	Čas	Teplota
Počáteční denaturace	5 min	95 °C
35 cyklů		
Denaturace	30 s	95 °C
Anealing	30 s	55 °C
Extentze	30 s	72 °C
1 cyklus		
Terminální extenze	10 min	72 °C

Po dokončení amplifikační reakce bylo nutné udělat kontrolu PCR produktů na 2 % agarózovém gelu. Na gel bylo napipetováno 10 µl z každého vzorku, pozitivní i negativní kontroly, a 5 µl Ladderu. Poté byla zahájena elektroforéza na dobu 10 minut. Následně byl gel přemístěn na detekční systém a vyfocen. Výsledkem byl produkt o velikosti 282 + 205 + 113 nebo žádný produkt na základě toho, které variantní alely byly u analyzovaného jedince přítomny (tab. 5), (viz dále kapitola výsledky).

Tabulka č. 5: Tabulka s referenčními hodnotami pro analýzu polymorfismu NFR2 genu

PCR produkt	**Výsledný genotyp**
282+205+113 bp	Heterozygot NFR2 C617 CA
282+113 bp	Varianta NFR2 C617 AA
282+205 bp	Varianta NFR2 C617 CC

Obrázek č. 7: Ukázka výsledných genotypů získaných analýzou NFR2 genu pomocí metodyPCR



Zdroj: vlastní

Na obrázku vidíme polymorfismus NFR2 genu na gelové elektroforéze.
Pokud vznikne PCR produkt o velikosti 282 + 205 + 113 bp, jedná se o heterozygota. Pokud vznikne PCR produkt o velikosti 282 + 113 bp či 282 + 205, jedná se o nemutovaného homozygota či vypovídá o přítomnosti mutovaného homozygota.

Výsledky

Číslo vzorků	Výsledek PCR	Výsledný genotyp
1/58	282+113 bp	**Homozygot AA**
2/60	282+113 bp	**Homozygot AA**
4/63	282+113 bp	**Homozygot AA**
5/64	282+113 bp	**Homozygot AA**
6/65	282+113 bp	**Homozygot AA**
7/66	282+113 bp	**Homozygot AA**
8/67	282+113 bp	**Homozygot AA**
9/68	282+113 bp	**Homozygot AA**
10/69	282+113 bp	**Homozygot AA**
11/70	282+113 bp	**Homozygot AA**
12/72	282+113 bp	**Homozygot AA**
13/73	282+113 bp	**Homozygot AA**
14/74	282+205+113 bp	**Heterozygot CA**
15/75	282+113 bp	**Homozygot AA**
16/76	282+113 bp	**Homozygot AA**
17/77	282+113 bp	**Homozygot AA**
18/78	282+113 bp	**Homozygot AA**
19/79	282+205+113 bp	**Heterozygot CA**
20/80	282+113 bp	**Homozygot AA**

21/81	282+205+113 bp	**Heterozygot CA**
22/82	282+113 bp	**Homozygot AA**
23/83	282+113 bp	**Homozygot AA**
24/84	282+113 bp	**Homozygot AA**
25/85	282+113 bp	**Homozygot AA**
26/86	282+113 bp	**Homozygot AA**
27/87	282+113 bp	**Homozygot AA**
28/88	282+205+113 bp	**Heterozygot CA**
29/89	282+113 bp	**Homozygot AA**
31/91	282+113 bp	**Homozygot AA**
33/93	282+113 bp	**Homozygot AA**
37/97	282+113 bp	**Homozygot AA**
39/99	282+113 bp	**Homozygot AA**
40/100	282+113 bp	**Homozygot AA**
42/102	282+205+113 bp	**Heterozygot CA**
43/103	282+113 bp	**Homozygot AA**

Výsledkem PCR je produkt o velikosti 282 + 205 + 113 bp nebo žádný produkt, a to na základě toho, které variantní alely byly u jedince přítomny. U vzorku č. 14/74, 19/79, 21/81, 28/88, 42/102 vyšel heterozygot CA (cca 14%) a u ostatních homozygot AA (cca 86%)

5 Diskuze

NFR2 gen kóduje transkripční faktor, který je členem malé rodiny základního leucinového zipu (bzip) regulujícího expresi mnoha dalších genů. Jako transkripční faktor reguluje geny, jež ovlivňují antioxidační elementy v jejich promotorech a mnoho z těchto genů kódují proteiny zapojené v reakci na poškození a zánět, který zahrnuje tvorbu volných radikálů. Tento gen se vyskytuje v několika izoformách.

Proti oxidačnímu stresu působí také tzv. enzymy 2. fáze: NAD(P)H, guanin oxidoreduktáza, peroxidáza a hem oxygenáza.

Z literatury je známo, že polymorfismy genu NFR2 měly vliv na afinitu. V tomto genu bylo objeveno mnoho polymorfismů. Mezi nejvýznamnější polymorfismy v NFR2 genu patří rs35652124 (A→G) a rs6721961 (C→A), které jsou umístěny v promotorové oblasti tohoto genu. Bylo zjištěno, že oba polymorfismy vedou ke snížení exprese tohoto genu (Barančík et al., 2016).

NFR2 se může podílet na regulaci genové exprese. Marzec et al. uvádí, že exprese NFR2 genu byla značně vysoká v případě polymorfismu v rs6721961 C ve srovnání s promotorem obsahující rs35652124 G a rs6721961 A varianty. Předpokládalo se, že tyto polymorfismy mají funkční význam a že rs6721961 ovlivňuje bazální expresi genu NFR2 a jeho funkci. Proto různé transkripční hladiny NFR2 genu mohou ovlivňovat krevní tlak a chránit buňky proti oxidačnímu stresu. U mužů bylo značně vysoké v rs35652124 cholinesteráza (AG+GG). HDL cholesterol byl podstatně nižší v rs35652124 (AG + GG).

Závěrem lze říci, že při hodnocení jednotlivých vzorků jsem předpokládala zvýšený počet homozygotů s variantní alelou AA na základě poznatků z odborné literatury, což ve většině případů vyšlo. Pouze 5 vzorků s variantní alelou CA bylo heterozygotních.

6 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo sepsání rešerše na téma Analýza polymorfismu NFR2 genu pomocí metody PCR v rámci teoretické části.

V teoretické části jsem se zabývala problematikou NFR2 genu.

V experimentální části bylo mým úkolem praktické zvládnutí izolace DNA z periferní krve a bukálního stěru, příprava PCR reakce, elektroforetická separace a detekce PCR produktů na agarózovém gelu.

7 Seznam použitých zdrojů

1) BARTOŠ, Milan. Metodiky stanovení genových polymorfismů. In: Základy farmakogenomiky [online]. Brno: Farmaceutická fakulta VFU [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: http://farmakogenomika.cz/index.php?kapitola=9&podkapm=94
2) Bártová Eva. PCR (polymerázová řetězová reakce). Molekulární biologie. [online].2011[cit.2016-01-01]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz
3) BROWN. T.A, Klonování genů a analýza DNA, Univerzita Palackého, 2008. ISBN: 9788024417196
4) Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. Nature Rev. Cancer 11, 85–95 (2011).
5) DATLA SR, DUSTING GJ, MORI TA, TAYLOR CJ, CROFT KD, JIANG F: Induction of heme oxygenase -1 in vivo suppresses NADPH oxidase derived oxidative stress. Hypertension 50: 636-642, 2007.
6) Dhakshinamoothy S, Jaiswal AK. Functional characterization and role of INrf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. Onco- gene, 2001; 20: 3906–3917.
7) Diehn, M.et al.Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells.Nature 458, 780–783 (2009).
8) ERKENS R, KRAMER CM, LÜCKSTÄDT W, PANKNIN C, KRAUSE L, WEIDENBACH M, DIRZKA J, KRENZ T, MERGIA E, SUVORAVA T, KELM M, CORTESE –KROTT MM: Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function. Free Radic Biol Med 89:906-917, 2015
9) Erkens R., Left ventricular diastolic dysfunction in NFR2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved
10) FERRIE, R . M ., M . J . SCHWARZ, N . H . ROBERTSON, S . VAUDIN, M . SUPER, G . MALONE a S.LITTLE. Development, multiplexing, and application 68 of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene.Am. J . Hum. Genet. 1992, 51(2), 251-262.
11) FISCHOVÁ, Hana. Základy genetiky., Vyd.1, ZČU Plzeň: 2011. ISBN: 978-80-7043-973-9
12) GIORDANO FJ: Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. J Clin Invest 115: 500-508, 2005.

13) GOETZ P. a kol: Vybrané kapitoly z lékařské biologie II. Skriptum UK 2.LF, Praha: Karolinum, 2002
14) http://genetika.wz.cz/
15) http://web.mit.edu/esgbio/www/dogma/dogmadir.html
16) http://www.mendelu.cz/af/genetika/gen/gen_schema.htm
17) Chen et al.: Role of heme oxygenase-1 in the regulation of blood pressure and cardiac function. Exp Biol Med (Maywood) 228:447-453,2013
18) Chowdhry S, Zhang Y, McMahon M, Sutherland C, Cuadrado A, Hayes JD. 2013. Nrf2 is controlled by two distinct b-TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. Oncogene32:1–17.
19) Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino terminal Neh2 domein. Genes Dev, 1999; 13: 76–86.
20) Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M. 2001. Two domains of Nrf2 c ooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. Genes Cells 6:857-868
21) KEJNOVSKÝ, Eduard. Tajemství genů: od vzniku života po genom člověka, Vyd.1, Praha: Academia, 2015. ISBN: 978-80-200-2478-7
22) Kensle TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007; 47: 89–116.
23) Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2.Mol Cell Biol 24: 7130–7139.
24) KOČÁREK E., Genetika, Vyd.1., Scientia,2004. ISBN: 978-80-86960-36-4
25) KUCIEL J. et al: Principy genetiky., Vyd.1, Brno 2016, ISBN: 978-80-7509-385-1
26) MACHOLÁN M., Základy fylogenetické analýzy, Vyd.1. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN: 978-80-210-6363-1
27) MACHOLÁN, Miloš. Základy fylogenetické analýzy,Vyd.1, Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN: 978-80-210-6363-1
28) McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 2004.Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. J Biol Chem 279:31556–31567.
29) NEČAS O. et al., Biologie. Vyd.2, Praha: Avicenum 2000, ISBN- 08-017-89

30) Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. 2005. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. Mol Cell Biol 25:10895–10906.

31) Nippon genetics [online]. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: http://www.nippongenetics.eu/products/dnarna-electrophoresis/dna-laddermolecular-weight-marker/

32) NUSSBAUM, Robert L , Roderic R . MCINNES, Huntington F . WILLARD, Margaret W . THOMPSON a Ada HAMOSH. Thompson 7th ed. /. Philadelphia:Saunders/Elsevier, c2007. ISBN 978-141-6030-805.

33) Ogura T, Tong KI, Mio K, Maruyama Y, Kurokawa H, Sato C, Yamamoto M. 2010. Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains.Proc Natl Acad Sci 107:2842–2847.

34) PETER D., MICHAEL J., Genetika, Vyd.1. Brno, 2014. ISBN: 978-80-210-4852-2

35) Polymerázová řetězová reakce. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce#cite_ref-Kary_Mullis_Nobel_Lecture_4-0

36) POSPÍŠILOVÁ, Š ., B . TICHÝ a J . MAYER. Sekvenování lidského genomu – technologie nové generace aneb budeme rutinnû sekvenovat lidské genomy? Časopis lékařů českých. 2009, 148(7), 296-302.

37) Rada P, Rojo AI, Chowdhry S, McMahon M, Hayes JD, Cuadrado A. 2011. SCF/b-TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. Mol Cell Biol 31:1121–1133.

38) Rajesh et al. ,Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction,oxidative stress,fibrosis,and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy.J Am Coll Cardiol 56:2115-2125,2010

39) RAJESH et al., Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy.J Am Coll Cardiol 56:2115-2125,2010.

40) SEIDL, Zdeněk. Neurologie pro nelékařské zdravotnické obory. 1 . vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2733-2.

41) SNUSTAD D. et al. : Genetika, Masarykova univerzita, Brno 2009, ISBN: 978-80-210-4852-2

42) SRŠEŇ, Štefan a Klára SRŠŇOVÁ. Základy klinické genetiky a jej molekulárna podstata. 4 ., přepr. a rozš. vyd. Martin: Osveta, 2005. ISBN 80-806-3185-9.

43) ŠPINAR, Jindřich a Jiří VÍTOVEC. Diagnostika a léčba chronického srdečního selhání.Interní medicína pro praxi. 2001, 2 , 55-60.
44) THOMPSON and THOMPSON: Klinická genetika, Vyd.6, Triton 2014, ISBN: 80-72254-475-6
45) VOKURKA, Martin a Jan HUGO. Velký lékařský slovník. 4. aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2004. ISBN 80-7345-037-2.
46) VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody. Brno: Neptun, 2010, ISBN 978-80-86850-04-7.
47) VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5
48) Wang H, Liu K, Geng M, Gao P, Wu X, Hai Y, Li Y, Li Y, Luo L,Hayes JD, et al. 2013. RXR a inhibits the NRF2–ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. Cancer Res 73:3097–3108.
49) Zdroj http://www.medsci.org/v13p0325.htm
50) Zdroj: http://stary.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa.htm
51) Zhu M, Fahl WE. 2001. Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element. Biochem Biophys Res Commun 289:212–219.
52) ZIMA, Tomáš. Laboratorní diagnostika. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7492-062-2.

Seznam zkratek

PCR	Polymerázová řetězová reakce
TK	krevní tlak
CDV	kardiovaskulární onemocnění
SNP	Single Nucleotide Polymorphism