



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

## Analýza polymorfismu *NRF 2* genu pomocí metody PCR

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Vendula Bufková

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

České Budějovice 2018

## **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 2.8.2018

.....

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. Veliké díky patří též rodičům za trpělivost a obětavost v průběhu celého studia.

## **Analýza polymorfismu NRF 2 genu pomocí metody PCR**

### **Abstrakt**

Bakalářská práce se zabývá genetickým testováním polymorfismu v *NRF2* genu. *NRF2* gen má několik polymorfismů ( rs1962142, rs2706110, rs6721961 a rs6706649). Nejvíce významný je polymorfismus NRF2 C617A, který byl analyzován v rámci praktické části této bakalářské práce. Tento polymorfismus se označuje také jako rs6721961 (C→A).

Cílem mé bakalářské práce bylo praktické zvládnutí metody PCR a vypracování rešerše týkající se dané problematiky.

V teoretické části této bakalářské práce se zaměřuji na popis *NRF2* genu, jeho funkci, strukturu a lokalizaci v genomu. Dále se věnuji metodě PCR jako takové, a principu PCR-CTPP (polymerase chain reaction with confronting two-pair primers) využívající dva páry primerů.

V rámci praktické části byly provedeny některé laboratorní metody – izolace DNA z bukalního stěru, izolace DNA z periferní krve, detekce polymorfismu C617A genu *NRF2* pomocí metody PCR-CTPP. Praktická část práce byla provedena v laboratoři GENLABS s.r.o. pod dozorem Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D.

**Klíčová slova:** NRF2 gen; polymorfismus

## **Analysis of the NRF2 gene polymorphism using PCR method**

### **Abstract**

The bachelor thesis deals with genetic testing of polymorphism in the NRF2 gene. NRF2 gene has several polymorphisms ( rs1962142, rs2706110, rs6721961 and rs6706649). The most significant is the polymorphism of NRF2 C617A, which was analyzed in the framework of the practical part of this bachelor's thesis. This polymorphism is also referred to as rs6721961 (C→A).

The aim of my bachelor thesis was the practical mastering of the methods of PCR and the development research on this issue.

In the theoretical part of this bachelor's thesis focuses on the description of the NRF2 gene, its function, structure and localization in the genome. Furthermore, I dedicate PCR method as such, and the principle of PCR-CTPP (polymerase chain reaction with confronting two-pair primer) using two pairs of primers.

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 *NRF2* gen by the means of PCR.

In the framework of the practical part were conducted some laboratory methods – isolation of DNA from bukalního smear, isolation of DNA from peripheral blood, detection of polymorphism C617A of the gene NRF2 by PCR-CTPP. The practical part of the work was carried out in the laboratory GENLABS s. r. o. under the supervision of Mgr. Dagmar Bystřické, Ph. d.

**Key words:** CVD-NRF2 gen; polymorphis

## Obsah

1 Úvod .....	8
2 Teoretická část .....	9
2.1 Popis genu .....	9
3.1 NRF2 gen a redoxní homeostáza .....	9
4.1 Funkce genu.....	10
5.1 Polymorfismy v genu NRF2 .....	11
6.1. Regulace NRF2 genu .....	12
7.1 NRF2 jako hlavní regulátor antioxidačních reakcí .....	14
8.1 Metody detekce .....	16
8.1.1 Amplifikační metody .....	16
8.1.2 PCR – polymerázová řetězová reakce .....	16
8.1.3 PCR ARMS .....	20
3 Cíle práce .....	24
4 Praktická část .....	25
4.1 Izolace DNA .....	25
4.1.1 Izolace z bukalního stěru.....	25
4.1.2 Izolace z periferní krve.....	27
4.2 Měření koncentrace DNA .....	29
4.3 Vlastní metody.....	32
4.3.1 PCR-CTPP .....	32
4.3.2 Příprava a provedení gelové elektroforézy .....	34
5 Výsledky.....	37
5.1 Metoda PCR-CTPP .....	38

<b>6 Diskuze.....</b>	<b>40</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>8 Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>44</b>
<b>Seznam zkratek .....</b>	<b>48</b>

## 1 Úvod

*NRF2* gen hraje důležitou úlohu v souvislosti se vznikem kardiovaskulárního onemocnění (KVO), kdy může vyvolat patogenezi tohoto onemocnění. Znalost patogeneze tohoto onemocnění může pacientovi snížit riziko vzniku KVO. Mezi nejčastější příčiny vzniku KVO patří zejména hypertenze a ateroskleróza. Při vzniku KVO se mohou uplatnit různé ovlivnitelné i neovlivnitelné rizikové faktory. Důležitá je i prevence jako zdravý životní styl.

Praktická část bakalářské práce byla provedena v genetické laboratoři a zabývá se vyšetřením polymorfismu C617A *NRF2* genu pomocí metody PCR-CTPP.



## 2 Teoretická část

### 2.1 Popis genu

*NRF2* gen je transkripční faktor odvozený od erytroidů. Jeho název je odvozen z angličtiny (nuclear factor E2-realated 2). Je známý také pod názvy Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2 nebo NFE2L2 (Kobayashi et al., 2004; Ogura et al., 2010).

Exprese *NRF2* genu se normálně udržuje v buňkách na bazální hladině, vazbou na jeho inhibitor (Keap1). Jeho základní funkcí je ochrana buněk a orgánů (například chrání plíce od hydroxytoluenu nebo před plicní fibrózou) před oxidativním stresem (Kobayashi et al., 2004; Ogura et al., 2010).

### 3.1 *NRF2* gen a redoxní homeostáza

Redoxní homeostáza je zásadní pro udržování základních buněčných funkcí a zajištění přežití buněk. Rakovinové buňky se vyznačují zvýšenou aerobní glykolýzou (nazývanou Warburgův efekt) a vysokými hladinami oxidativního stresu. Oxidativní stres způsobuje uvolnění reaktivního druhu kyslíku (ROS), který se hromadí v důsledku nerovnováhy.

*NRF2* gen může také regulovat metabolismus pomocí reaktivních druhů kyslíku (ROS) prostřednictvím přímých nebo nepřímých mechanismů. Nízké hladiny ROS jsou obecně škodlivé pro buňky. Vysoké hladiny ROS v rakovinových buňkách jsou důsledkem změn několika signalizačních drah, jež ovlivňují buněčný metabolismus a mohou představovat překážku pro tumorigenezi. Vzhledem k metabolickým a signalizačním odchylkám vykazují rakovinotvorné buňky zvýšené hladiny. Hladiny ROS jsou průběžně potlačovány zvýšenými antioxidačními obrannými mechanismy v rakovinových buňkách (Kobayashi et al., 2004; Ogura et al., 2010; Datla, 2007; Diehn, 2009).

ROS jsou obecně definovány jako chemické sloučeniny obsahující kyslík. Zahrnují superoxid ( $O_2 \cdot -$ ) a hydroxyl ( $HO \cdot$ ), volné radikály stejně jako peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). Tyto molekuly jsou 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  $H_2O_2$  a na výrobě ROS (prostřednictvím  $\beta$ -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 et al., 2010, Dhakshinamoorthy, 2001).

#### **4.1 Funkce genu**

Hlavní funkcí *NRF2* genu je aktivace transkripce dalších genů (GSH, guanin oxidoreduktáza, TXN), které jsou schopné bojovat proti škodlivým účinkům, jako jsou xenobiotika a oxidativní stres.

*NRF2* gen podporuje nejen přežití normálních buněk, ale také rakovinou tvorných buněk (Genecards, 2013).

#### ***NRF2* gen jako ochránce buňky**

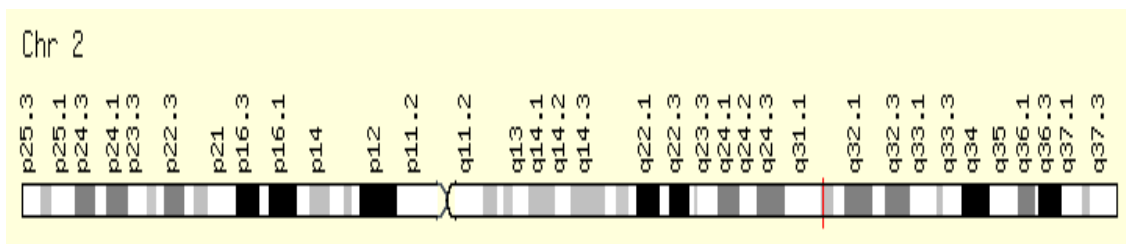
*NRF2* gen reguluje produkci antioxidantních a protizánětlivých proteinů chránících buňku proti oxidačnímu poškození. Transkripční faktor se pohybuje kolem buněčného jádra v buněčné cytoplazmě a v pohotovosti ho udržují proteiny Keap1 a Cullin3. Když dojde k zvýšeným hladinám oxidačního stresu, Keap1 aktivuje *NRF2* a ten se přesune do buněčného jádra, kde se připevní k DNA a aktivuje procesy vedoucí k vytvoření ochranného štítu, ve smyslu prevence vzniku rakoviny, kdy antioxidantní 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 rakovinou tvorné buňce, tak ji to chrání také, a to např. během podání chemoterapeutických léků. V lidském těle je ve zdravých buňkách *NRF2* gen nejvíce exprimován v ledvinách, ve svalech, plicích, srdci, játrech a mozku (Kobayashi et al., 2004; Ogura et al., 2010, Giordano, 2005).

*NRF2* gen se podílí i na ochraně neuronu, chrání před neurodegenerativním onemocněním. Stárnutí je běžným rizikovým faktorem u neurodegenerativního onemocnění. Zvýšená hodnota bílkovin a lipidů a snížená antioxidantní ochrana jsou nejčastější příčiny neurodegenerativního onemocnění (Joshi, 2012).

## 5.1 Polymorfismy v genu *NRF2*

Polymorfismus je charakterizován tím, že se v populaci objeví pro určitý genotyp přinejmenším 2 genetické alely a zároveň musí frekvence jeho výskytu převyšovat v populaci 1 %. Pokud výskyt frekvence je menší než 1 %, jedná se o náhodný výskyt, tzv. mutaci nebo- li změna genetické informace. Aby se mohl polymorfismus projevit, musí se vyskytovat v tzv. kódujících oblastech- exonech.

U lidí je gen *NRF2* lokalizován na chromozomu 2 v oblasti 2q31.2 a skládá se ze 6 exonů (Genecards, 2013, obr. č. 3).



Obr. č. 3 lokalizace *NRF2* genu u člověka

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

Mezi nejvýznamnější polymorfismy v *NRF2* genu patří rs35652124 (A→G) a rs6721961 (C→A), které se nachází v promotorové oblasti genu. Tyto polymorfismy vedou ke snížení exprese genu (Marzec et al., 2007; Cho, 2015).

Výskyt polymorfismu rs35652124 je spojován s nefritidou při systémovém lupusu erythematos (SLE) v dětském věku a může být rizikovým faktorem pro rozvoj onemocnění dysfunkce ledvin u těchto pacientů (Kočárek, 2004; Hartikainen 2012).

## 6.1. Regulace *NRF2* genu

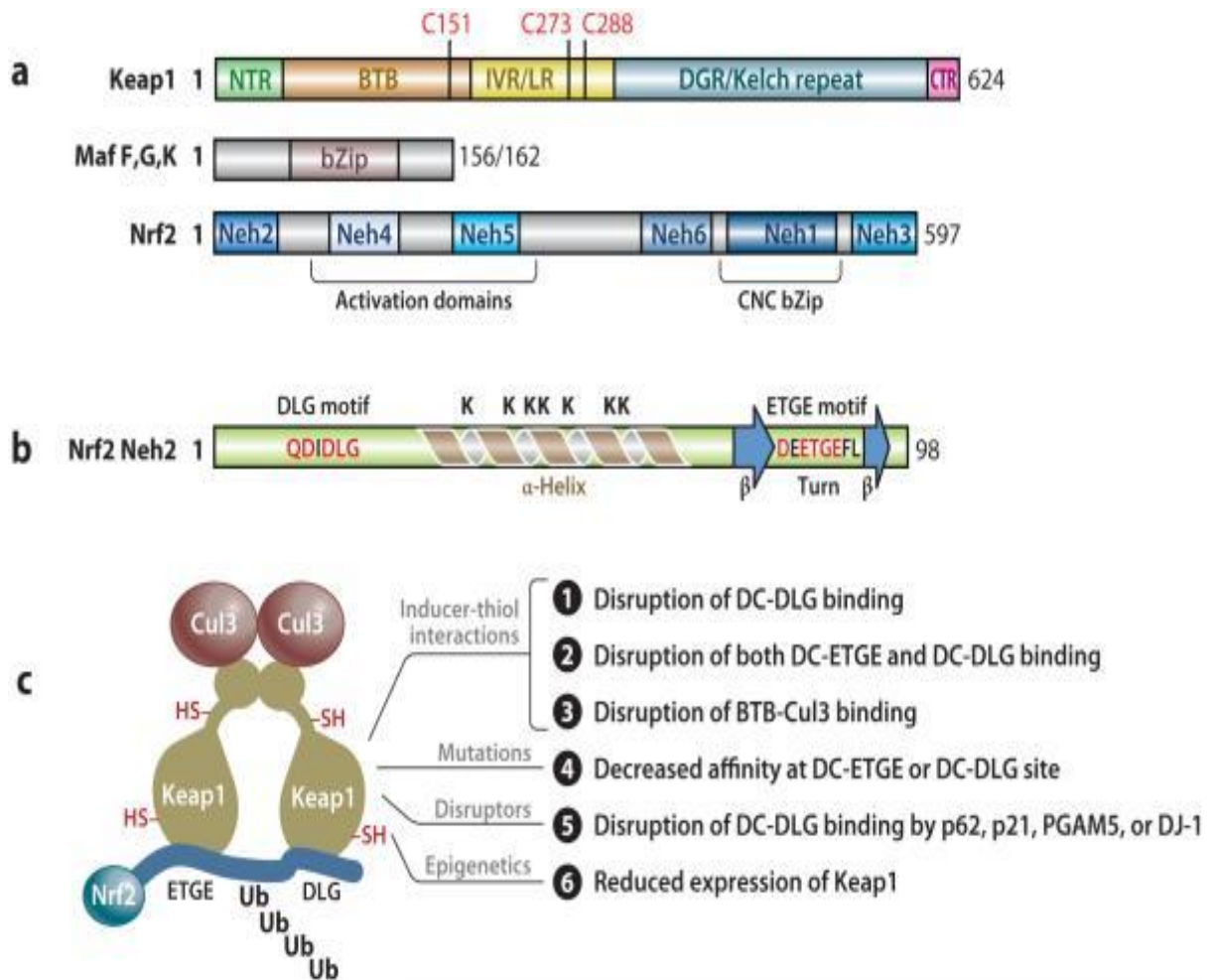
### *NRF2* – Keap1

*NRF2* gen je primárně regulován proteinem Keap1, což je substrátový adaptér obsahující vazebnou doménu Cul3. Keap1 má tři funkční domény zahrnující doménu bric-a-brac (BTB) vážící doménu Cul3, intervenční oblast (IVR) a doménu Kelch, také známou jako doménu dvojitého glycinu (DGR) (Zipper and Mulcahy, 2002; Lo a kol., 2006). Doména Kelch / DGR udržuje interakce mezi *NRF2* 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 et al., 2010, Kensle,2007). (obr. č. 1)

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 *NRF2* genu. Neh1 obsahuje CNC b zip, který umožňuje vázat DNA. Doména Neh6 obsahuje dvě vazebná místa DSGIS a DSAPGS (Rada et al., 2011; Chowdhry et al., 2013).

Domény Neh3, Neh4 a Neh5 interagují s aktivátory, aby umožnily aktivaci cílových genů *NRF2*. Doména Neh3 se váže na CHD6, jenž funguje jako transkripční aktivátor *NRF2* (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; Wang et al., 2013).

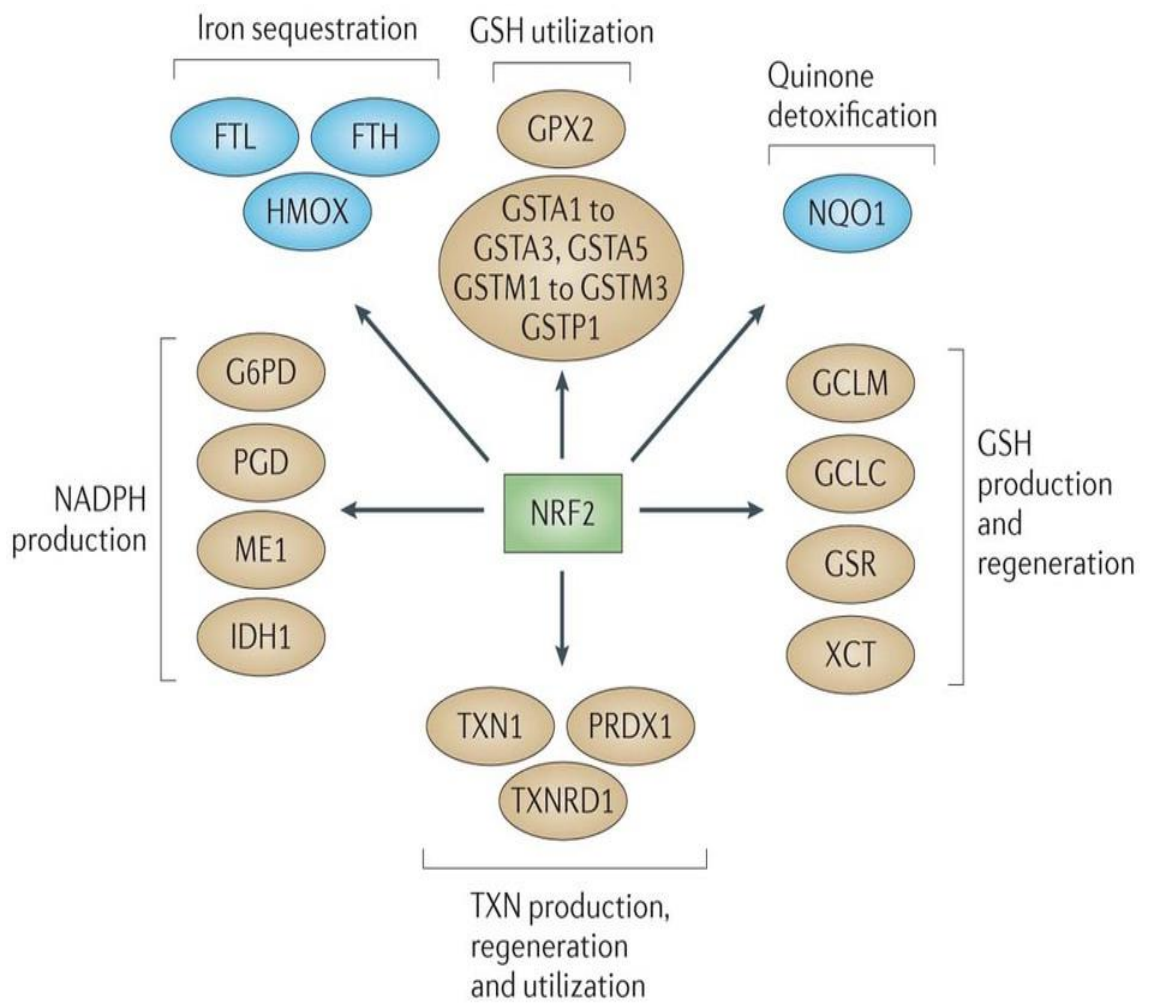


Obr.č.1 *NRF2* gen obsahující 7 funkčních domén: a) struktura *NRF2* genu: Keap1, Maf F, G, K b) sekundární struktura Neh2 c) model pro aktivaci NRF2

Zdroj: Manuscript, 2013

## 7.1 NRF2 jako hlavní regulátor antioxidačních reakcí

Faktor NRF2 je ovládán několika cílovými geny. Prvním cílovým genem je glutathion (GSH), který umožňuje regeneraci a řadí se k následujícím antioxidantům jako je: glutamát, cystein, ligáza a katalytické podjednotky GCLM, GCL, GCLC s cystinem / glutamátem, transportérem XCT a glutathion reduktáza (GSR). Druhým antioxidantem je 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) regulovaný TXN1, thioredoxinem reduktázou 1 (TXNRD1) a peroxiredoxinem 1 (PRDX1). Čtvrtý je NADPH, který je řízen glukózou-6-fosfát-dehydrogenázou (G6PD), fosfoglycerát dehydrogenasou (PHGDH), jablečného enzymu 1 (ME1) a isocitrátdehydrogenáza 1 (IDH1). Oba GSH a TXN využívají NADPH k regeneraci poté, co se snižuje reaktivní forma kyslíku (ROS). Tyto čtyři skupiny antioxidantu jsou stimulovány *NRF2* genem. Mezi další antioxidanty, které jsou ovládány *NRF2* genem zahrnují NAD (P) H: chinon oxidoreduktázy 1 (NQO1) a enzymy, regulační železa jako hemové oxygenázy (HMOX1), feritin těžkého řetězce (FTH) a ferritinu lehký řetězec (FTL) (obr.č.2) (Kobayashi et al., 2004; Ogura et al., 2010).



Nature Reviews | Drug Discovery

Obr č.2 NRF2 jako regulátor antioxidačních reakcí

Zdroj: [http://www.nature.com/nrd/journal/v12/n12/fig\\_tab/nrd4002\\_F2.html](http://www.nature.com/nrd/journal/v12/n12/fig_tab/nrd4002_F2.html)

## 8.1 Metody detekce

### 8.1.1 Amplifikační metody

Mezi základní amplifikační metody patří polymerázová řetězová reakce. Metoda PCR má mnoho modifikací např. AS-PCR (alelově specifická polymerázová řetězová reakce), PCR – ARMS (polymerázová řetězová reakce – amplifikační refrakční mutační systém), PCR – RFLP (polymerázová řetězová reakce – polymorfismus délky restričních fragmentů), a další (Zima, 2013).

### 8.1.2 PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR nebo-li polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) byla vyvinuta v letech 1983-1985 v Kalifornii K. B. Mullisem. PCR je vysoce účinná technika, kterou se amplifikují vybrané sekvence nukleových kyselin *in vitro* (Zima, 2013) a v dnešní době patří mezi základní metody molekulární biologie.

PCR se využívá k amplifikaci DNA, k detekci DNA o určité sekvenci ve vzorku (s pomocí využití primerů specifických k dané sekvenci), např. v molekulární diagnostice či ve forezní genetice a kvantifikaci DNA (Bártová, 2011).

Principem PCR je enzymatická amplifikace vybrané sekvence DNA v cyklické reakci, kdy se mění 3 teploty za použití termostabilní DNA polymerázy (Bártová, 2011). Daný úsek, který chceme amplifikovat, musí být ohraničen jak na začátku, tak na konci vybrané části genomu pomocí krátkých oligonukleotidových sekvencí tzv. primerů (Bártová, 2011). Tyto primery se vždy připojí ke komplementárním úsekům DNA a řídí syntézu nových vláken ve směru 5'→3' (Zima, 2013).

Výsledkem PCR mohou být až miliony kopií vzorového fragmentu DNA o délce až 10 tisíc nukleotidů (Bártová, 2011).

Celá tato reakce probíhá v termocykleru (obr.4), což je přístroj, který umožňuje během velice krátkého časového intervalu zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek °C (Zima, 2013).





**Obrázek č. 4:** Termocykler, převzato ze zdroje (Bártová, 2011)

#### **Složení PCR reakce:**

Každá reakční směs se skládá z templátové DNA (která je izolována ze vzorku), primerů (kdy každý je komplementární k jednomu řetězci), z nukleotidů (deoxyribonukleosidtrifosfáty), reakčního pufru a termostabilního enzymu DNA polymerázy (např. Taq polymeráza získaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* původně žijící v horkých pramenech (Bártová, 2011).

Základní kroky při optimalizaci provádění PCR je znalost sekvence DNA v amplifikovaném úseku, navržená sekvence primerů, komerční výroba primerů, výpočet optimální teploty pro nasedání primerů, navržení složení a profilu reakce, provedení reakce a kontrola PCR reakce pomocí elektroforézy (ELFO) na agarózovém gelu.

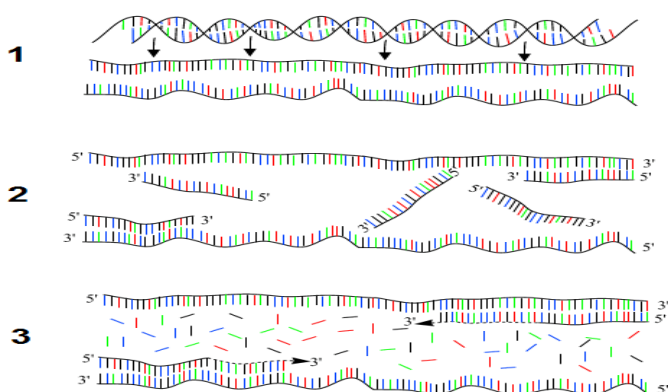
## Průběh PCR reakce:

Připravená reakční směs se vloží do termocykleru, ve kterém probíhají 3 teplotní fáze s odlišnými teplotami. Tento cyklus se několikrát opakuje, jedná se o denaturaci, annealing a extenzi.

1. Denaturace – dvouřetězcová (dvouvláknová) DNA se zahřívá vlivem vysoké teploty 94–98 °C po dobu 20–30 sekund. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků ve dvouřetězcové molekule DNA a k rozvolnění této šroubovice. Vznikají tak dvě jednořetězcové (jednovláknové) molekuly DNA, na které mohou v dalším kroku nasednout primery.

2. Nasednutí primenu (annealing) – nasedání primerů na specifická místa DNA je umožněno díky snížené teplotě na 50–65 °C (30–90 sekund). Na dvouvláknové úseky DNA/primer se váže DNA polymeráza.

3. Syntéza DNA (extenze) – syntéza komplementárního vlákna DNA, kdy teplota v této fázi závisí na použité DNA polymeráze. K PCR jsou využívány termostabilní polymerázy, například *Taq* polymeráza, která pochází z bakterie *Thermus aquaticus*, která má optimum aktivity při 75-80 °C. DNA polymeráza přidává k existujícímu úseku DNA nové nukleotidy ve směru 5' → 3' od navázaných primerů, a syntetizuje nové vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA (obr. 6) (Polymerázová řetězová reakce, 2001).



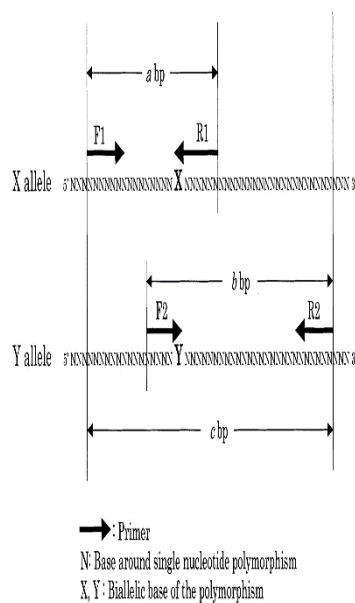
**Obrázek č. 6:** Průběh PCR reakce: 1 – denaturace, 2 – annealing, 3 – extenze.

Převzato ze zdroje: (Bártová, 2011)

### PCR-CTPP (polymerase chain reaction with confronting two-pair primers)

Metoda PCR-CTPP je vhodnou metodou pro genotypizaci jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) bez restričního štěpení.

Princip PCR-CTPP spočívá v nasedání dvou párů primerů. 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 amplifikovány oba typy produktů, odpovídající alele X i Y, protože DNA sekvence mezi primery 1F a 2R je také amplifikována (obr.8) (Hamajima et al., 1999).



**Obrázek č. 8:** Princip reakce PCR-CTPP, převzato ze zdroje: (Hamajima et al., 1999).

Výhodou PCR-CTPP je časová úsporná a levná metoda. PCR-CTPP zahrnuje čtyři různé primery namísto dvou, a nevyžaduje jako např. PCR RFLP restriční štěpení PCR produktů. Proto, aby PCR-CTPP probíhala specificky, vyžaduje použití primerů s podobnou teplotou tání (Hamajima et al., 1999).

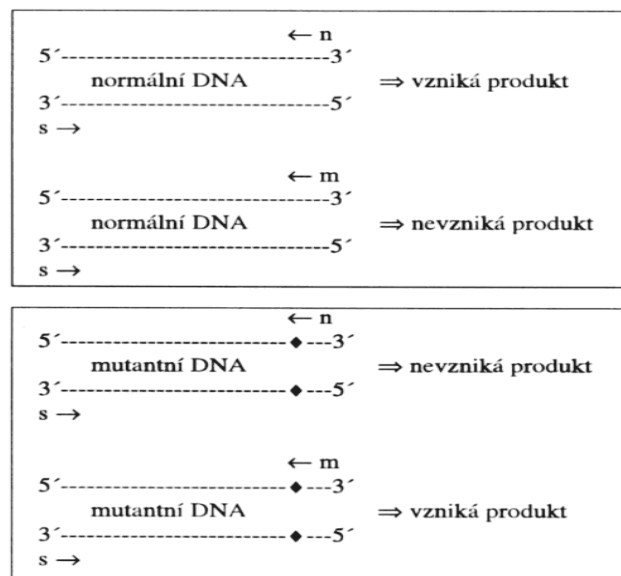
## Další příklady amplifikačních metod

### 8.1.3 PCR ARMS

PCR ARMS je založena na principu komplementarity bází použitých primerů nasedajících na 3' konec amplifovaného vlákna. Základem pro správnou amplifikaci je tato komplementarita. Pokud nedojde k nasednutí primeru na DNA, nedojde ke specifické amplifikaci. Jedná se o variantu AS-PCR (alelově specifické PCR).

Do jednoduchého ARMS testu musí být zařazena vnitřní PCR kontrola, která potvrdí to, že jsou dodrženy všechny podmínky pro správnou amplifikaci a dokáže odhalit poruchu PCR reakce.

PCR ARMS se skládá ze dvou samostatných PCR reakcí, z nichž jedna je specifická pro normální DNA sekvenci a druhá pro mutovanou sekvenci (obr. 7) (Zima, 2013).



**Obrázek č. 7:** Princip PCR ARMS reakce.

Převzato ze zdroje: (Zima, 2013).

Pokud se jedná o mutovaného homozygota, dochází k vytvoření PCR produktu v amplifikační reakci se společným primerem a primerem komplementárním k mutované alele daného genotypu.

Pokud se jedná o nemutovaného homozygota (wild type), dochází k vytvoření PCR produktu pouze při použití společného primeru a primeru pro nemutovanou formu genu.

V situaci, kdy dojde ke vzniku produktu v obou amplifikačních reakcích, se jedná o heterozygota (tab. 1) (Zima, 2013).

**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

s – společný, n – normální, m – mutantní primer

Převzato ze zdroje: (Zima, 2013)

### **AS – PCR**

AS – PCR neboli alelově specifickou PCR poprvé využil Olerup et al. (1991) pro detekci subtypů HLA (human leukocyte antigens). Tato metoda se používá pro detekci malých delecí a bodových mutací (Zima, 2013).

## **Multiplex PCR**

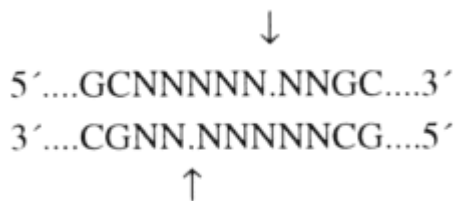
Multiplexní reakce patří k výkonným metodám PCR. Multiplex PCR umožňuje amplifikovat několik PCR produktů v jedné amplifikační reakci (Zima, 2013). PCR produkty jsou následně detekovány na agarózovém gelu a detekovány po značení ethidiumbromidem (Zima, 2013) či jiným interkalačním barvivem (např. GelRed, MidoriGreen apod.).

Pro multiplex PCR se používá několik primerových párů, které jsou specifické pro různé sekvence DNA. U Multiplex PCR musí být teplota optimalizovaná pro všechny použité primery (Hayden et al., 2008). Metoda je využívána k testování bodových mutací a delecí (Zima, 2013).

Metoda je velmi náročná ve fázi přípravy a optimalizaci, kdy je důležité navrhnout dostatečně specifické primerové páry s podobnou anealingovou teplotou (Bartoš, 2016).

## **PCR-RFLP**

PCR – RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism, polymerázová řetězová reakce – polymorfismus délky restrikčních fragmentů) je metodou využívající PCR amplifikace pro vybrané oblasti genomové DNA, které jsou následně specificky štěpeny pomocí restrikčních enzymů tzv. restrikčních endonukleáz. Těchto endonukleáz je známo velké množství (asi 1500). Liší schopností přesně rozpoznat různě dlouhé sekvence nukleotidů a specificky je rozštěpit na libovolně dlouhé fragmenty. Endonukleázy často rozpoznávají tzv. palindromické sekvence. Jedná se o sekvence, které mají stejné pořadí nukleotidů na komplementárních vláknech DNA ve směru od 5' konce (obr. 10), (Kosinová, 2007; Zima, 2013). V případě restrikčního štěpení dochází ke štěpení nukleotidů, které neleží naproti sobě. Poté vznikají nestejně dlouhé konce rozštěpené dvoušroubovice nazývané tzv. kohezivní neboli lepivé konce. Pokud dochází ke štěpení protilehlých nukleotidů, pak vznikají stejně dlouhé neboli tupé konce (Kosinová, 2007; Zima, 2013).

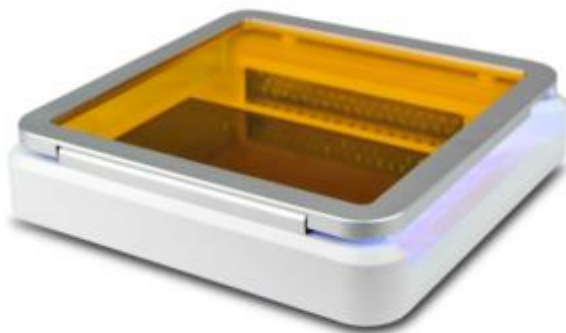


Obr. č. 10: Příklad sekvence se stejným pořadím nukleotidů, zdroj: <http://stary.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa3.htm>

### Gelová elektroforéza

Elektroforéza je soubor separačních metod, které využívají k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli. Na principu rozdílných elektroforetických mobilit se při ní dělí nabitě molekuly (ionty). Při separaci látek v kapiláře se zde vedle elektroforetického principu (pohyb nabitých molekul v elektrickém poli) uplatňuje též elektroosmotický tok, což je spontánní tok kapaliny v kapiláře v důsledku náboje (obvykle záporného) na vnitřní stěně kapiláry.

Velikosti PCR produktů jsou kontrolovány pomocí gelové elektroforézy (obr. 9). Tyto fragmenty mají různou pohyblivost v agarózovém gelu (větší fragmenty se pohybují pomaleji, menší rychleji). Tento pohyb fragmentů zajišťuje působení stejnosměrného elektrického pole. DNA je nabitá záporně, proto se pohybuje vždy ke kladnému konci (anodě).



Obr. Č. 9: Příklad přístroje pro gelovou elektroforézu

Zdroj: <https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/11/DUT-48.pdf>

### **3 Cíle práce**

- Vypracování odborné rešerše na dané téma.
- Praktické zvládnutí některých laboratorních metod – izolace DNA z bukálního stěru, izolace DNA z periferní krve, optimalizace metody PCR CTPP, detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy.
- Zpracování výsledků a jejich analýza.



## 4 Praktická část

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.

Praktická část je rozdělena do dvou částí. První část je věnována izolaci DNA z bukalního stěru a izolaci DNA z periferní krve, druhá část je věnována vlastní detekci polymorfismu *NRF2* genu pomocí metody PCR.

### 4.1 Izolace DNA

Před každou PCR reakcí byla provedena izolace DNA. DNA byla izolována z periferní krve nebo z bukalního stěru. Periferní krev byla odebrána kvalifikovaným pracovníkem, v akreditované odběrové laboratoři, na rozdíl od vzorku z bukalního stěru, který si provádí každý pacient sám dle přesných instrukcí. Poté, co vzorek přijme laboratoř, musí být uchován v ledničce při teplotě cca 4°C. Součástí každého přijatého vzorku musí být vyplněný informovaný souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením a vyplněná laboratorní žádanka, obsahující informace o pacientovi a o požadovaném genetickém vyšetření. Po přijetí do laboratoře je každému vzorku přiřazeno laboratorní identifikační číslo.

#### 4.1.1 Izolace z bukalního stěru

K izolaci DNA z bukalního stěru byl použit komerční kit DNA Isohelix DNA Isolation kit DDK-50 dle doporučení výrobce.

#### Použité reagensy:

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

Před zahájením izolace byly pro každý vzorek připraveny 3 označené 1,5 ml zkumavky. Bylo potřeba nastavit suchou lázeň na 60 °C a PK vyndat z mrazícího boxu a nechat ji roztát při pokojové teplotě. Potřebné množství TE pufru je předehřáto v suché lázni na 60 °C.

### **Postup**

Do zkumavky s tamponem použitým pro bukální stěr bylo napipetováno 500 µl LS a 20 µl PK. Tento vzorek byl krátce zvortexován a zcentrifugován. Poté byl inkubován při teplotě 60 °C v suché lázni po dobu jedné hodiny. Po inkubaci došlo opět ke krátkému zvortexování a zcentrifugování. Následně byl do nové 1,5 ml zkumavky přepipetován celý objem (cca 400 µl) tohoto vzorku. Opět proběhla krátká centrifugace a došlo k přepipetování zbytku supernatantu k již odebraným 400 µl vzorku. Ke vzorku bylo přidáno 500 µl CT, zkumavka byla krátce zvortexována a centrifugována při 13 tis. ot/min. po dobu 7 minut. Po centrifugaci byl opatrně odstraněn supernatant, kdy nesmělo dojít k narušení pelety obsahující DNA. Zkumavka s peletou byla opět krátce zcentrifugována a byl odstraněn všechny zbylý supernatant. K peletě DNA bylo přidáno 30-150 µl předehřátého TE (v případě potřeby 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 zkumavky. Izolovaná DNA byla uložena před dalším použitím v mrazicím boxu.

#### **4.1.2 Izolace z periferní krve**

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

##### **Použité reagensie:**

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

##### **Spotřební materiál:**

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

Pro jeden vzorek bylo nutné přichystat 2 x 1,5 ml zkumavky. První zkumavka pro lyzační reakci a druhá zkumavka pro finální eluci. Každá zkumavka byla řádně označena laboratorním číslem vzorku.

##### **Postup**

Nejdříve bylo do 1,5 ml označené zkumavky napipetováno 300  $\mu$ l plné krve. Dále bylo přidáno 900  $\mu$ l RBC Lysis Buffer. Takto připravená směs byla promíchána několikerým převrácením v ruce. Důležité bylo, abychom směs nevortexovali. Poté následovala inkubace 10 minut při pokojové teplotě. Vzorek byl centrifugován při 3 tis. ot/min. po dobu 5 minut. Supernatant byl ze zkumavky opatrně odstraněn, přičemž byla ponechána peleta. K peletě bylo napipetováno 100  $\mu$ l RBC Lysis Buffer, ve které byla následně resuspendována. Dále bylo přidáno 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l 96 % ethanolu, následoval vortex 10 s a krátká centrifugace zkumavky.

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

Ze sběrné zkumavky byla vylita tekutina a kolonka byla vrácena zpět do stejné sběrné zkumavky. Na kolonku bylo napipetováno 600  $\mu$ l Wash Bufferu a proběhla centrifugace při 14–16 tis. otáčkách po dobu 30 s. Ze sběrné zkumavky byla opět vylita tekutina a kolonka byla vložena zpět do stejné sběrné zkumavky a zcentrifugována při 14–16 tis. otáčkách po dobu 3 min. Po centrifugaci bylo nutné zkontrolovat, zda kolonka je zcela suchá, pokud ne, bylo nutné opakovat předchozí centrifugaci. Před elučním krokem musela být kolonka viditelně suchá.

Úplně suchá kolonka s navázanou DNA byla přenesena do připravené čisté 1,5 ml mikrozukavky řádně označené štítkem se jménem a příjmením klienta, RČ, číslem vzorku, datumem izolace, iniciály toho, kdo izolaci provedl totéž je i u bukálního stěru. Rovnou na filtr kolonky bylo napipetováno 50  $\mu$ l předehřátého Elution Buffer (vytemperováno na 60 °C). Po napipetování následovala inkubace nejméně 3 minuty při pokojové teplotě. Kolonka s označenou 1,5 ml mikrozukavkou byla zcentrifugována při 14–16 tis. otáčkách po dobu 30 s. Izolovaná DNA byla umístěna do lednice pro pozdější použití (max. 24 hod) nebo do mrazicího boxu (- 20 °C), ve kterém je DNA dlouhodobě skladována.

## 4.2 Měření koncentrace DNA

Měření koncentrace DNA testovaných vzorků bylo provedeno na přístroji Qubit® 2.0 Fluorometer. Naměřené hodnoty byly uváděny v jednotkách ng/μl. Naměřené hodnoty koncentrace DNA pro některé vzorky uvádím v tab. č. 3.

### Použité reagensie:

- Qubit dsDNA BR reagent (Component A)
- Qubit dsDNA BR buffer (Component B)
- Qubit dsDNA BR Standard1 (Component C)
- Qubit dsDNA BR Standard2 (Component D)

### Postup

Před vlastním měřením byly vytemperovány všechny pufrы a standarty na pokojovou teplotu. Pro každý vzorek a každou standartu byla připravena jedna předpsaná 0,5 ml mikrozkušavka (tzn. vždy dvě pro standarty I a II, další pro příslušný počet vzorků). Zkušavky byly řádně popsány (označení standardů a vzorků pomocí LIČ).

Postup měření byl složen ze dvou částí: z přípravy pracovního roztoku pro měření a z vlastního měření koncentrace NK.

## 1. Příprava pracovního roztoku ( Qubit Working Solution)

### Postup

Pro každý vzorek i standardu bylo napipetováno vždy 199  $\mu$ l Qubit ds DNA BR buffer a 1  $\mu$ l Qubit ds DNA BR reagent (200 krát koncentrát v DMSO) do pracovní 1,5 ml plastové mikrozkušavky viz. tabulka č. 4

Počet vzorku	1	2	3	1	4	5	6	7	8	9	10	11
BR buffer	199	398	597	199	796	995	1194	1393	1592	1791	1990	2189
BR reagent	1	2	3	1	4	5	6	7	8	9	10	11
Cel.obj.prac.Ø	200	400	600	200	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000	2200

**Tabulka č. 4:** Tabulka s referenčními hodnotami pro měření koncentrace

Směs byla krátce zvortexována (5 s) a krátce zcentrifugována. Dále byl připraven příslušný počet 0,5 ml mikrozkušavek (Qubit assay tubes), které byly řádně popsány. Pracovní roztok byl rozpipetován do označených 0,5 ml mikrozkušavek takto: pro každou standardu bylo napipetováno do příslušné popsané mikrozkušavky 190  $\mu$ l pracovního roztoku a přidáno 10  $\mu$ l příslušné standardy (St I a St II), pro každý vzorek bylo napipetováno 198  $\mu$ l pracovního roztoku, a pro měření přidány 2  $\mu$ l vorku (DNA izolátu). Mikrozkušavky byly krátce zvortexovány (2-3 s) a stočeny. Vzorky byly inkubovány před měřením 2 min. při RT.

## 2. Měření na fluorometru Qubit 2.0

### Postup

Přístroj má dotykový displej a zapne se zapojením přístroje do zásuvky. Po zapnutí se rozsvítí dotykový displej. Na obrazovce bylo stisknuto políčko DNA. Dále bylo stisknuto dsDNA Broad Range Assay. Přístroj se zeptal, zda byla použita kalibrace z minulého měření nebo zda-li je nutné provést novou kalibraci. Pro novou kalibraci bylo nutné stisknout políčko Yes pro vytvoření nové kalibrační křivky. Pro použití minulé kalibrační křivky bylo stisknuto políčko No a kalibrační křivka nebyla vytvořena. Následně bylo zahájeno měření připravených vzorků.

Nová kalibrace:

Do přístroje byla vložena zkumavka se St.I, zavřeno víčko přístroje a stisknuto políčko Read Standard I. Poté byl vyjmut St I a vložen St II. Stejný postup byl použit pro St II a bylo stisknuto políčko Read Standard II. V případě úspěšné kalibrace byl vložen další vzorek a stisknuto políčko Read. Na displeji se objevila naměřená koncentrace. Pro přepočítání naměřené koncentrace bylo stisknuto Calculate Stock Cone a bylo vybráno použité množství DNA izolátu. Naměřená koncentrace byla zaznamenána do sešitu. Pro měření dalšího vzorku bylo stisknuto políčko Read Next Sample.

Použití kalibrace z minulého měření

Do přístroje byl vložen první vzorek, bylo uzavřeno víčko a stisknuto Read. Pro přepočítání naměřené koncentrace bylo stisknuto Calculate Stock Conc, přičemž bylo vybráno měřené množství DNA izolátu. Naměřená koncentrace byla zapsána do sešitu. Pro měření dalšího vzorku bylo stisknuto Read Next Sample. Postup byl opakován pro všechny vzorky. Po skončení měření byl přístroj vypnut odpojením ze zásuvky.

## 4.3 Vlastní metody

### 4.3.1 PCR-CTPP

Pro analýzu polymorfismu genu byla použita metoda PCR-CTPP využívající dva páry primerů.

#### Reagencie:

- H<sub>2</sub>O
- My Taq Red Reaction Buffer
- My Taq Polymerasa
- DMSO (Dimethylsulfoxid)
- Primery F1+R1, F2+R2
- DNA

#### Postup

Celá příprava PCR reakce byla z důvodů zabránění kontaminace prováděna v dekontaminovaném laminárním boxu. Do chladícího stojánku bylo připraveno několik PCR zkumavek odpovídajících počtu vzorků a dvě další pro pozitivní a negativní kontrolu. Dále jedna 1,5 ml zkumavka pro přípravu společného master mixu. Všechny PCR zkumavky byly řádně popsány číslem vzorku. Do 1,5 ml zkumavky byl připraven master mix obsahující jednotlivé reagenty pro všechny vzorky. Ten byl rozpipetován po 48 µl do jednotlivých PCR zkumavek, do kterých byly následně přidány 2 µl DNA izolátu testovaných vzorků (tab. 5).



**Tabulka č. 5:** Složení PCR reakce

	Pro 1 reakci	Pro 11 reakcí
H <sub>2</sub> O	34,3 μl	377,3 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	0,5 μl	5,5 μl
Primery F2+R2	0,5 μl	5,5 μl
Celkem	48 μl	528 μl
DNA	2 μl	

Po napipetování všech těchto reagensů byly mikrozkušavky uzavřeny, zvortexovány a krátce stočeny. Následně byly vloženy do termocykleru a byl spuštěn příslušný program (tab. 6).

**Tabulka č. 6:** PCR reakční protokol pro vyšetření *NRF2* genu

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

Po ukončení amplifikační reakce bylo nutné provést kontrolu PCR produktů.

#### **4.3.2 Příprava a provedení gelové elektroforézy**

##### **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

10x TBE pufr byl připraven rozpuštěním prášku Crystal 10x TBE Buffer v deionizované vodě a doplněním touto vodou na celkový objem 1000 ml.

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

### **Příprava pracovního roztoku 1x TBE:**

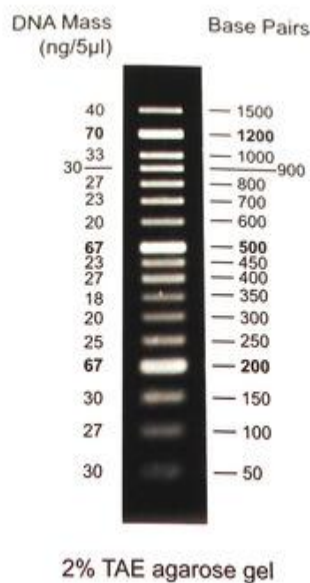
Do skleněné lahve (o objemu 0,5 l) jsem pomocí odměrného válce nalila 50 ml 10x TBE pufru a přidala 450 ml destilované vody, promíchala a pracovní roztok skladovala při RT.

### **Postup:**

Konkrétní počet agarózových tablet o hmotnosti 0,5 g byl vložen do plastové kádinky obsahující 50 ml 1x TBE pufru (pro 1% gel 1 tableta a 50 ml pufru, pro 2% gel 2 tablety a 50 ml pufru atd.). Po rozpuštění tablet v TBE pufru následovalo zahřívání roztoku v mikrovlnné troubě. Po několika zahřátích vznikl čirý gelový roztok bez bublin. Do roztoku bylo přidáno 15  $\mu$ l barvičky Midori Green Advanced DNA Stain. Gelový roztok s barvičkou bylo nutné promíchat a nechat krátkodobě zchladnout. Mezi tím byla připravena elektroforetická podložka s hřebeny, do které byl chladnoucí gelový roztok nalit. Po ztuhnutí gelu byly hřebeny vyjmuty a gel byl umístěn do elektroforetické vany obsahující 1 x TBE pufr. Pro správný průběh elektroforézy musel být gel zcela ponořen v pufru.

Do první či poslední jamky v řadě bylo napipetováno 5  $\mu$ l markeru 100 bp DNA LADDER H3RTU (obr. 11). Do zbylých jamek bylo napipetováno pokaždé 10  $\mu$ l každého PCR produktu.

Elektroforéza byla prováděna po dobu 10–15 minut při 135 V. Průběh celé elektroforézy bylo možno průběžně kontrolovat pomocí speciálního iluminátoru Mupid<sup>TM</sup>LED Illuminator díky použité barvičce Midori Green Advance DNA Stain. Po provedení elektroforézy byl gel přenesen na dokumentační systém FastGene® GelPic LED Box a vyfocen. Fotografie gelu byla uložena na paměťovou kartu a následně také v počítači, kde je možné fotografie gelů upravit.



**Obrázek č. 11:** Primer pro kontrolu velikostí PCR fragmentů na agarózovém gelu, převzato ze zdroje: <https://www.nippongenetics.eu/en/product/1-kb-dna-ladder/>

**Tabulka č. 7:** Tabulka s referenčními hodnotami pro analýzu polymorfismu *NRF2* genu.

PCR produkt	Výsledný genotyp
282+205+113 bp	Heterozygot
282+205 bp	Mutovaný homozygot
282+113 bp	Nemutovaný homozygot (wild type)

Výsledky analýzy genotypu *NRF2* C617A (metodou PCR-CTPP) jsou uvedeny v tab. 8

## 5 Výsledky

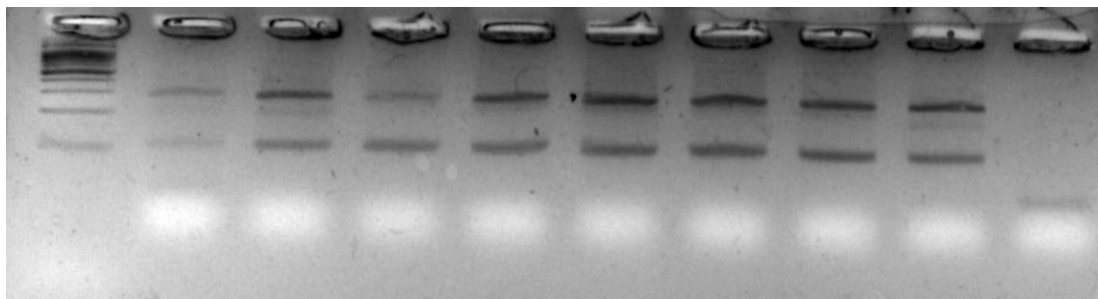
Výsledné koncentrace DNA byly změřeny na přístroji Fluorometr Qubit® 2.0.

**Tabulka č. 3:** Hodnoty koncentrace DNA ve vybraných vzorcích

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Koncentrace DNA[ng/μl]</b>
43/17	49,30
63/17	18,70
64/17	42,90
65/17	28,00
66/17	17,60
67/17	33,90
70/17	11,30
88/17	49,20
93/17	24,80
94/17	45,80

## 5.1 Metoda PCR-CTPP

Metodou PCR-CTPP bylo vyšetřeno 7 vzorků včetně pozitivní a negativní kontroly. Výsledky této metody jsou zobrazovány pomocí gelové elektroforézy (obr.12)



Marker      1      2      3      4      5      6      7      PK      NK

**Obr.12** Výsledné PCR produkty na 4 % agarózovém gelu

Pokud vznikne PCR produkt o velikosti 282 + 205 + 113 bp, jedná se o heterozygota CA. Pokud vznikne PCR produkt o velikosti 282 + 113 bp či 282 + 205, jedná se o nemutovaného homozygota (wild type CC) či vypovídá o přítomnosti mutovaného homozygota AA.

**Tab.7** Výsledek metody PCR-CTPP u 7 vzorků odečtený z gelu na Obr.12

Číslo vzorků	Výsledný genotyp
1	Heterozygot CA
2	Heterozygot CA
3	Nemutovaný homozygot (wild type) CC
4	Nemutovaný homozygot (wild type) CC
5	Nemutovaný homozygot (wild type) CC
6	Nemutovaný homozygot (wild type) CC
7	Nemutovaný homozygot (wild type) CC
PK	Heterozygot CA
NK	-

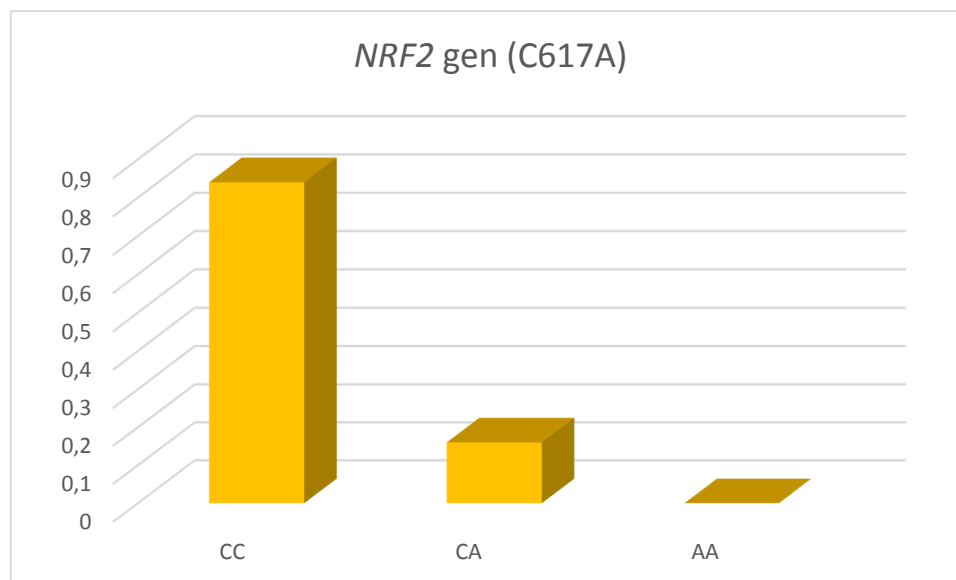
Celkem bylo vyšetřeno v laboratoři 119 vzorků. Tabulka 8 zobrazuje počet osob s daným genotypem, kde u 100 vzorků byl variantní genotyp CC (wild type). Mutovaný

homozygot AA nebyl v daném souboru detekován a u 19 vzorků vyšla heterozygotní varianta CA (tab.č.8)

Tabulka 8: Počet osob s jednotlivými genotypy *NRF2* genu

<b><i>NRF2</i> gen (C617A)</b>			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
CC	CA	AA	
100	19	0	119

V grafu 1 jsou uvedeny hodnoty genotypové frekvence pro *NRF2* gen (obr. 13) Výpočtem zjištěná hodnota genotypové frekvence pro wild type (CC) je 0,840 a pro heterozygotní variantu (CA) je 0,160. Procentuální zastoupení pro wild type je 84% a heterozygotní varianty CA je 16%.



Obrázek 13: Graf genotypové frekvence *NRF2* genu

## 6 Diskuze

Nukleární transkripční faktor NRF2 hraje důležitou roli v zabezpečení buněčné obrany a v udržování redoxní homeostázy. NRF2 je kritický komponent zapojený do indukce antioxidantních a jiných cytoprotektivních genů, které poskytují ochranu proti oxidativnímu stresu, který může být vyvolán v důsledku kardiovaskulárního onemocnění. Oxidativní stres je rizikovým faktorem KVO. Výsledky několika studií ukazují, že aktivace *NRF2* genu může hrát také důležitou roli v kardioprotekci a dysregulaci aktivity *NRF2* a je asociována s citlivostí k onemocnění (Barančík, 2016).

Oxidativní stres je běžný patogenní mechanismus, který se účastní při vzniku Alzheimerovy choroby (AD), Parkinsonovy choroby (PD) a dalších onemocnění spojených se stárnutím. Buněčné mechanismy snižující oxidativní stres zahrnují uvolňování, stabilizaci a nukleární translokaci transkripčního faktoru NRF2. Na základě aktivace exprese genů, jejichž produkty snižují oxidační stres a inaktivují toxické látky, NRF2 působí jako přepínač „on“ pro vnitřní antioxidantní odpověď. Některé studie vycházely z předpokladu, že *NRF2* gen bude aktivován u AD a PD na základě přítomnosti oxidativního poškození běžně popisovaného u těchto onemocnění. Pozorování naznačují, že NRF2 není do jádra translokován v hipokampálních neuronech v případě AD přesto že je zde evidentní oxidativní stres a je pozorován nadbytečný jaderný NRF2 v normálních stejně starých kontrolních buňkách. Naproti tomu u PD je NRF2 více exprimován ve zbývajících dopaminergních neuronech uvnitř substantia nigra (Ramsey, 2007).

*NRF2* gen se označuje jako „hlavní regulátor“ antioxidantní odpovědi modulující expresi stovky genů, zahrnujících nejen známé antioxidantní enzymy, ale také velký počet genů, které kontrolují zdánlivě nesouvisející procesy, jako jsou imunitní a zánětlivé reakce, remodelace tkání a fibróza, karcinogeneze a přítomnost metastáz a také kognitivní dysfunkce a návykové chování (Hybertson, 2011).

Vzhledem k důležité funkci transkripčního faktoru NRF2 jsou zkoumány také polymorfismy v genu *NRF2* ovlivňující jeho expresi a to zejména v souvislosti s kardiovaskulárními a také s nádorovými onemocněními. Celkem jsou v literatuře



popisovány čtyři různá polymorfní místa, přičemž nejvýznamnější je právě polymorfismus rs6721961 (C→A) označován také jako 617 CA.

V experimentálních podmínkách, bylo prokázáno, že NRF2 má vliv na aterosklerózu prostřednictvím účinků na plazmatické lipoproteiny a transport cholesterolu, které zastihují shodu v antioxidační ochraně (Barajas, 2011). Bylo zjištěno, že NRF2 rs6706649 (C>A) genotyp CC byl spojován s výrazně zvýšenou hladinou cholesterolu v séru ve srovnání s AC genotypem. Význam ostatních polymorfismů v *NRF2* genu na hodnoty cholesterolu v séru nebyly pozorovány. U dalšího NRF2 polymorfismu rs6706649 nebyla prokázána souvislost s kardiovaskulárními chorobami a dále bylo prokázáno, že není asociován ani s vazodilatační odpovědí (Marczak, 2012).

V mé práci jsem použila pro detekci polymorfismu rs6721961 (C→A) metodu PCR-CTPP. Výhodou této metody oproti ostatním jako např. PCR RFLP nebo PCR ARMS je její nižší časová náročnost a také nižší náklady. V principu tato metoda využívá specifické nasedání dvou primerových párů v rámci jedné PCR reakce.

Podstatnou výhodou PCR-CTPP je tedy její jednoduchost a možnost použití i pro detekci somatických mutací užitečných pro diagnostiku nádorových onemocnění. Tato metoda ušetří čas a náklady na genotypizaci známých SNP (Hamajima et al., 1999).

Výskyt alely A v případě polymorfismu rs6721961 je spojován se zvýšeným rizikem rakoviny prsu (Hartikainen, 2012). Přítomnost alely A je dále asociována s výskytem tromboembolie u žen (Bouligand, 2011), poškozením vazodilatace (Marczak, 2012), zvýšeným krevním tlakem (Shimoyama, 2014) a výskytem adenokarcinomu (Okano, 2013). Narušení exprese *NRF2* genu může vést ke zvýšené produkci ROS kvůli nedostatku transkripce jiných antioxidačních genů. To může nakonec vést ke kardiovaskulárním komplikacím, včetně infarktu myokardu. V publikovaných studiích je vzácný genotyp 617 AA spojován se zvýšeným výskytem cerebrovaskulárního onemocnění a překvapivě také se sníženou prevalencí hypertenze (Shimoyama, 2014).

Ve sledovaném souboru zahrnujícím 119 jedinců pocházející z české populace nebyl nalezen žádný homozygot 617AA a pouze 16% heterozygotních jedinců 617 CA. U testovaných jedinců neexistují záznamy o jejich zdravotním stavu, tedy ani o tom zda např. netrpí hypertenzí či jiným cerebrovaskulárním onemocněním. Pokud jde o zdravé

jedinice, je pochopitelné, že ve studovaném souboru nebyl nalezen ani jeden genotyp 617AA.

<b>NRF2 rs6721961</b>	<b>CC</b>	<b>CA</b>	<b>AA</b>
<b>Frekvence (n)</b>	0,706	0,273	0,021
<b>Ischemická choroba srdeční (%)</b>	9,5	9,9	5,9
<b>Cerebrovaskulární onemocnění + TIA (%)</b>	3,1	1,8	11,8
<b>Cerebrovaskulární onemocnění (%)</b>	1,6	1,8	11,8
<b>Hypertenze (%)</b>	42,3	48,8	12,2

Tab.č.9: Klinická charakteristika finské populace NRF2

Převzato ze zdroje: (Shimoyama,2014)

## **7 Závěr**

Cílem mé bakalářské práce bylo sepsání rešerše na téma Analýza polymorfismu *NRF2* genu pomocí metody PCR. Praktická část byla zaměřena na osvojení vybraných molekulárně – genetických metod.

V teoretické části jsem se zabývala definicemi a charakteristikou *NRF2* genu, jeho funkcí, lokalizací, klinickým významem. Poté jsem se zaměřila na popis některých molekulárních metod vhodných pro detekci testovaných mutací a polymorfismů.

V experimentální části bylo mým úkolem praktické zvládnutí izolace DNA z periferní krve, izolace DNA z bukalního stěru, příprava PCR reakce, elektroforetická separace a detekce PCR produktů na agarózovém gelu. Daný polymorfismus byl analyzován pomocí metody PCR-CTPP. Získané výsledky jsem zaznamenala a porovnála s výsledky uvedenými v recentní odborné literatuře.

## 8 Seznam použitých zdrojů

- Barajas, B. et al. (2011). NF-E2-related factor 2 promotes atherosclerosis by effects on plasma lipoproteins and cholesterol transport that overshadow antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 58-66
- Bouligand, J. et al. (2011). Effect of NFE2L2 genetic polymorphism on the association between oral estrogen therapy and the risk of venous thromboembolism in postmenopausal women. *Clin Pharmacol Ther*, 89(1), 60-64.
- Datla, S.R. et al. (2007). Induction of heme oxygenase -1 in vivo suppresses NADPH oxidase derived oxidative stress. *Hypertension*, 50(4), 636-642.
- Dhakshinamoorthy, S., Jaiswal, A.K. (2001). Functional characterization and role of INrf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Onco-gene*, 20(29), 3906–3917.
- Diehn, M. et al. (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, 458(7239), 780–783.
- Erkens, R. et al. (2015). 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.
- Giordano, F.J. (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*, 115(3), 500-508.
- Hayden, M.J. et al. (2008). Multiplex-Ready PCR: A New Method for Multiplexed SSR and SNP Genotyping. *BMC Genomics*, 9, 80.
- Hamajima, N. et al. (1999). Detection of gene-environment interaction by case-only studies. *Jpn. J. Clin. Oncol*, 29(10), 490-493.
- Hartikainen, J.M. et al. (2012). Genetic polymorphisms and protein expression of NRF2 and Sulfiredoxin predict survival outcomes in breast cancer. *Cancer Res*, 72(21), 5537-5546.
- Hybertson, B.M. et al. (2011). Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(4-6), 234–246.
- Chowdhry, S. et al. (2013). Nrf2 is controlled by two distinct  $\beta$ -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene*, 32(32), 3765-3781.
- Itoh, K. et al. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 13(1), 76–86.

- Joshi, G., Johnson, J.A. (2012). The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 7(3), 218–229.
- Katoh, Y. et al. (2001). Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells*, 6(10), 857-868.
- Kensle, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 89–116.
- Kobayashi, A. et al. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*, 24(16), 7130-7139.
- Kočárek, E. (2004). *Genetika*. 1. vyd. Mníšek pod Brdy: Scientia. ISBN:978-80-86960-36-4
- Marczak, E.D. et al. (2012). Polymorphisms in the transcription factor NRF2 and forearm vasodilator responses in humans. *Pharmacogenet Genomics*, 22(8), 620-628.
- McMahon, M. et al. (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(30), 31556–31567.
- Nioi, P. et al. (2005). The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 25(24), 10895–10906.
- Ogura, T. et al. (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 U S A*, 107(7), 2842–2847.
- Okano, Y. et al. (2013). SNP (-617C>A) in ARE-like loci of the NRF2 gene: a new biomarker for prognosis of lung adenocarcinoma in Japanese non-smoking women. *PLoS One*, 8(9), e73794.
- Rada, P. et al. (2011). SCF/β-TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol Cell Biol*, 31(6), 1121–1133.
- Ramsey, C.P. et al. (2007). Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66(1), 75–85.
- Shimoyama, Y. et al. (2014). Polymorphism of Nrf2, an antioxidative gene, is associated with blood pressure and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Int J Med Sci*, 11(7), 726-731.

Velayutham, M. et al. (2005). Cancer chemopreventive oltipraz generates superoxide anion radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435(1), 83-88.

Wang, H. et al. (2013). RXR $\alpha$  inhibits the Nrf2–ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of Nrf2. *Cancer Res*, 73(10), 3097–3108.

Zhu, M., Fahl, W.E. (2001). Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element. *Biochem Biophys Res Commun*, 289(1), 212–219.

Zima, T. (2013). *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-062-2.

## Internetové zdroje

- Bartoš, M. (2016). Metodiky stanovení genových polymorfismů. *Základy farmakogenomiky* [online]. Brno: Farmaceutická fakulta VFU. [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: <http://farmakogenomika.cz/index.php?kapitola=9&podkapm=94>
- Bártová, E. (2011). PCR (polymerázová řetězová reakce). *Molekulární biologie* [online]. Brno: Fakulta veterinární hygieny a ekologie. [cit. 2016-01-01]. Dostupné z: [http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz)
- GeneCards (2013). NFE2L2 Gene (Protein Coding). *GeneCards®: The Human Gene Database* [online]. Weizmann Institute of Science. [cit. 2018-03-03]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NFE2L2>
- LabGuide (2014). Polymerázová řetězová reakce. *PCR* [online]. [cit. 2018-03-02]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/pcr/>
- Labicom (2018). DUT-48 Blue Light Transilluminator. *Labicom* [online]. [cit. 2018-02-02]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/11/DUT-48.pdf>
- Nippon Genetics Europe (2016). 1 kb DNA ladder. *Nippon Genetics* [online]. Dueren: Nippon Genetics Europe GmbH [cit. 2016-02-28]. Dostupné z: <https://www.nippongenetics.eu/en/product/1-kb-dna-ladder/>
- Průša, R. et al. (1998). Multimediální učebnice DNA diagnostiky [online]. Praha: 2. lékařská fakulta UK. [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <http://stary.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa.htm>
- Wikipedia (2001). Polymerázová řetězová reakce. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation. [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](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)

## Seznam zkratek

AD	Alzheimerova choroba
BTB	doména bric a brac
CT	Capture buffer
DGR	doména dvojitého glycinu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELFO	elektroforéza bílkovin séru
ER	endoplazmatické retikulum
FTH	feritin těžkého řetězce
FTL	feritin lehkého řetězce
GPX	glutathion peroxidáza
GSH	glutathion
GSR	glutathion reduktáza
HMOX	hem oxygenáza
IVR	intervenční oblast
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LS	Lysis buffer
NAD(P)H	Quinone Dehydrogenase
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR-ARMS	amplification refractory mutacion detection systém
PCR-AS	alelově specifická polymerázová řetězová reakce
PCR-CTPP	polymerase chain reaction with confronting two-pair primers
PCR-RFLP	polymerázová řetězová reakce- polymorfismus délky restrikčních fragmentů
PD	Parkinsonova choroba
PK	Proteinase K
PRDX	peroxiredoxin
ROS	reaktivní druh kyslíku
SLE	systémový lupus erythematoses
SNP	single-nucleotide polymorphism



SNPs typ jednonukleotidových polymorfismů  
TE Re- hydration buffer  
TXN thioredoxin  
TXNRD thioredoxin reduktáza