



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Vyšetření polymorfismu genu *ApoE*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Tereza Novotná

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Vyšetření polymorfismu genu *ApoE* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne

.....

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce, Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D., za odborné vedení práce, cenné rady, ochotu a čas strávený dohledem nad mou prací v laboratoři. Děkuji také za možnost realizovat praktickou část v laboratoři na Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Poděkování také náleží laboratoři GENLABS s.r.o., která mi poskytla vzorky k zhotovení laboratorní práce pro praktickou část.

Vyšetření polymorfismu genu *ApoE*

Abstrakt

Alzheimerova choroba (ACH) patří mezi nejčastější příčinu demencí na světě. Je udáváno, že tvoří zhruba 65-75 % všech demencí (Preiss, Přikrylová Kučerová, 2006). Termín Alzheimerova demence taktéž jako presenilní forma ACH se užívá u pacientů ve věku do 65 let (Seidl, 2015). Po 65. roce života se užívá termín senilní demence Alzheimerova typu (SDAT) a do 45 let je onemocnění vzácné (Seidl, Obenberger, 2004). Kauzální léčba této choroby neexistuje, protože etiopatogeneze onemocnění není zcela objasněna (Seidl, 2015).

Cílem bakalářské práce bylo napsat odbornou rešerši na dané téma. Tomuto cíli je věnována teoretická část, ve které jsou shrnuty informace o neurodegenerativním onemocnění, demenci a Alzheimerově chorobě. Především jsou zde popsány příznaky, příčiny, fáze, léčba, diagnostika a genetické dispozice ACH. Důležitou součástí je i popsání polymerázové řetězové reakce (PCR) a reverzní hybridizaci na stripech.

V praktické části bylo hlavním cílem zvládnutí molekulárně biologických metod. Pro dosažení cílů a získání optimálních výsledků jsem zvolila dvě metody. Kromě optimalizace metody PCR ARMS byla využita i reverzní hybridizace na stripech. Načež zmiňovaná druhá metoda byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu ApoE StripAssay® od firmy ViennaLab. V této části práce jsou popsané veškeré postupy, pomocí kterých jsem výsledků dosáhla.

Molekulárně biologické metody jsem vykonávala v laboratoři na Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Klíčová slova

Alzheimerova choroba; SDAT; *ApoE*; PCR ARMS; precipitace; DNA

Examination of the polymorphism of the *ApoE* gene

Abstract

Alzheimer's disease (AD) belongs to the most frequent cause of dementia in the world. It is determined that it is about 65-75 % of all the dementias (Preiss, Příkryková Kučerová, 2006). The term Alzheimer Dementia, as well as Pre-senile Form (AD) is used with the patients at the age up to 65 years (Seidl, 2015). After the age of 65 years we use the term Senile Dementia of the Alzheimer Type. (SDAT). Up to the age of 45 this disease is rare (Seidl, Obenberger, 2004). Causal treatment of this disease does not exist, because etiopathogenesis of the disease is not entirely clarified (Seidl, 2015).

The aim of this bachelor's work was to write a professional search to the given topic. In this theoretical part there is summed up the information about neurodegenerative disease, about dementia and (AD). Most importantly there are described the symptoms, the causes, phase, treatment, diagnostics and genetic disposition of AD. The description of polymerase chain reaction (PCR) and reverse hybridization on strips is also an important part of this theoretical part.

In the practical part, the main goal was to master molecular biological methods. To achieve the goals and to get the best results, I chose two methods. In addition to optimizing the PCR ARMS method, reverse hybridization was used on strips. The above-mentioned second method was performed using the commercially available ApoE StripAssay® kit from ViennaLab. In this part of the paper are described all the procedures by which I achieved the results.

Molecular biological methods were performed in a laboratory at the Health and Social Faculty of the University of South Bohemia in České Budějovice.

Key words

Alzheimer's disease; SDAT; *ApoE*; PCR ARMS; precipitation; DNA

Obsah

1	Teoretická část.....	10
1.1	Neurodegenerativní onemocnění	10
1.1.1	Rozvoj a genetika onemocnění	10
1.1.2	Souhrn neurodegenerativních demencí.....	11
1.2	Demence.....	11
1.2.1	Rozdělení demence	12
1.3	Historie Alzheimerovy choroby.....	13
1.3.1	Auguste D	14
1.4	Alzheimerova choroba	15
1.4.1	Příznaky ACH.....	16
1.4.2	Fáze	16
1.4.3	Příčina	17
1.4.4	Diagnóza	18
1.4.5	Léčba.....	18
1.5	Apolipoproteiny	19
1.5.1	ApoE (Apolipoprotein E).....	20
1.5.1.1	Indikace k vyšetření na ApoE	21
1.5.1.2	Možné genotypy.....	22
1.6	Metody vyšetřování polymorfismů v genech	22
1.6.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	22
1.6.1.1	Složení reakce	22
1.6.1.2	Proces PCR.....	23
1.6.1.3	Varianty PCR	25
1.6.1.4	Využití.....	26
1.6.1.5	Problémy	27

1.6.1.6	Výhody PCR	27
1.6.2	Reverzní hybridizace na stripech	27
2	Cíl práce	28
3	Metodika	29
3.1	Charakteristika souboru	29
3.2	Postupy genetického vyšetření.....	29
3.2.1	Potřebné vybavení.....	29
3.2.2	Izolace DNA	29
3.2.2.1	Izolace z bukálního stěru.....	30
3.2.3	Precipitace DNA	31
3.2.4	Měření koncentrace DNA	32
3.2.5	Gelová elektroforéza.....	32
3.2.6	Metoda PCR ARMS	33
3.2.7	Reverzní hybridizace na stripech - pomocí komerčního kitu	36
3.2.7.1	Amplifikace DNA	36
3.2.7.2	Hybridizace (třepaná vodní lázeň)	37
3.2.7.3	Promývání (třepaná lázeň)	38
3.2.7.4	Barvení	38
3.2.7.5	Interpretace výsledků	39
4	Výsledky	40
4.1	Optimalizace metody PCR ARMS	40
4.1.1	První měření.....	41
4.1.2	Druhé měření	43
4.1.3	Třetí měření.....	44
4.1.4	Čtvrté měření	45
4.1.5	Páté měření	47
4.1.6	Šesté měření.....	48

4.2	Výsledky reverzní hybridizace	50
5	Diskuze	52
6	Závěr	53
7	Seznam literatury	54

Úvod

Alzheimerova choroba (ACH) je neurodegenerativní onemocnění mozku, které řadíme mezi nejčastější příčinu demencí na světě. Považuje se za multifaktoriální onemocnění, což znamená, že se na nemoci podílí genetické faktory, vliv toxických látek a virů. Zpočátku se jedná o plíživý a postupně progredující proces, při kterém dochází k poškození a zničení neuronů a synapsí. Z tohoto důvodu dochází k úbytku mozkové tkáně a hovoříme o mozkové atrofii. Následkem je zhoršení paměti, pozornosti a schopnosti se soustředit. Tato choroba postihuje mužské i ženské pohlaví stejně často.

Příčinou ACH je tvorba patologického proteinu beta-amyloidu. Tento degenerativní protein je známý tím, že u nemocných tvoří základ plaků. Beta-amyloid je vysoce neurotoxický a vyvolává kaskádu neurodegenerativních dějů. Následně dochází ke vzniku neurofibrilárních klubíček (zámotků) a vše končí zánikem neuronů. Tyto změny se projevují morfologicky i klinicky.

Dodnes nebyl nalezen žádný lék, který by zcela vyléčil ACH. Snahou všech zdravotníků je zlepšit kvalitu života nemocného a modulovat klinické příznaky onemocnění. Proto neexistuje léčba kauzální, ale symptomatická.

V rámci bakalářské práce jsou zahrnuty informace o ACH, především o genu *ApoE*. Apolipoprotein E (*ApoE*) je polymorfní protein, který má podstatnou roli při regulaci metabolismu lipidů. Je členěn do tří izoform (*ApoE2*, *ApoE3* a *ApoE4*). Přítomnost alely $\epsilon 4$ (v homozygotní formě) podstatně zvyšuje predispozici k idiopatické formě Alzheimerovy choroby s pozdním začátkem. Zatímco alela $\epsilon 2$ vykazuje protektivní charakter, to znamená, že snižuje riziko nemoci. Alela $\epsilon 3$ je považována v populaci za nejčastější a nepředstavuje žádné riziko.

V praktické části bakalářské práce jsou popsány laboratorní metody - izolace DNA z bukalního stěru, precipitace DNA, PCR, gelová elektroforéza, amplifikace DNA, hybridizace, promývání a barvení. Dílčím cílem byla optimalizace metody PCR ARMS a reverzní hybridizace na stripech pro detekci mutací v genu *ApoE*.

1 Teoretická část

1.1 *Neurodegenerativní onemocnění*

Neurodegenerativní onemocnění zahrnuje skupinu onemocnění, které směřují k vážnému postižení mozku a v určitých případech až ke smrti. Péče požaduje spolupráci s neurologií, biochemií, klinickou genetikou, molekulární biologií, logopedií, psychiatrií a také s psychologií (Nevšimalová, 2014). Toto onemocnění znamená velkou zátěž jak pro nemocné, tak pro jejich rodiny i společnost (Horáček, Motlová, 1999).

Při tomto onemocnění dochází k postupnému zanikání neuronů (nervových buněk). To je spojeno s vážnými psychickými a neurologickými příznaky, které se projevují během nemoci. Nemocná osoba má vážné problémy s koordinací (pohybem) nebo s duševními funkcemi (Horáček, Motlová, 1999).

Příčiny a patofyziologie jsou dodnes málo známé a možnosti léčení jsou nedostatečné. U většiny těchto onemocnění zůstává prognóza velmi špatná (Horáček, Motlová, 1999). Proto je velmi důležitá sociální péče, kde se nemocní zapojují do běžného života. Taktéž jsou velmi důležité i příslušné organizace (Nevšimalová, 2014).

1.1.1 *Rozvoj a genetika onemocnění*

Předpokládá se, že příčinou je genetická abnormalita, která vyvolává biochemickou poruchu. Jedná se buď o omezení produkce potřebné bílkoviny, nebo o modifikaci bílkovinné struktury, která je následně biologicky nepoužitelná. Porucha buňky vede k morfologickým odchylkám, a hlavně ke ztrátě funkcí. Z polohy a míry poškození následně vyplývají klinické příznaky (Horáček, Motlová, 1999).

Je prokázáno, že většina z těchto onemocnění je dědičná. Přičemž dědičnost nehraje u všech onemocnění stejně významnou roli. Například u Huntingtonovy choroby je dědičnost velmi významná, ale u Parkinsonovy nemoci je dědičnost uplatňována málo. Zjistilo se, že mutace zasáhne buď jeden gen, nebo změni větší (delší) úsek dané DNA. To vede k tomu, že jsou ovlivněny i sousední geny (Horáček, Motlová, 1999).

Například pro Alzheimerovu demenci je typické, že u jedné choroby mohou být mutace několika genů na různých chromozomech. U této demence jsou popisovány mutace na chromozomech 21, 19, 14 a 1 (Horáček, Motlová, 1999).

Familiární formou ACH onemocní pouze 10 % pacientů. Tento typ Alzheimerovy choroby je spojován s výskytem mutací v genech pro amyloidní prekurzorový protein, a to buď presenilin 1 (PSEN 1) nebo presenilin 2 (PSEN 2) (Horáček, Motlová, 1999).

Taktéž priony mohou způsobovat některé nemoci (Horáček, Motlová, 1999).

1.1.2 Souhrn neurodegenerativních demencí

- demence při Alzheimerově nemoci
- demence u Parkinsonovy nemoci
- demence s Lewyho tělísky
- demence u Huntingtonovy nemoci
- Creutzfeldtova-Jakobova nemoc (Hosák et al., 2015)

1.2 Demence

Demence je známá jako nezvratný pokles intelektu. Obvykle postihuje lidi vyššího věku, a proto patří k nejzávažnějším problémům v oboru gerontopsychiatrie (Seidl, Obenberger, 2004). Je podmíněná nezvratným poklesem kognitivních (poznávacích) funkcí (např. paměti, motivace, intelektu), funkčních schopností sociálních i pracovních (Fišar, 2001; Seidl, 2015). U demence jsou kognitivní deficity přítomny v bdělém stavu, tedy při neporušeném vědomí člověka (Preiss, Přikrylová Kučerová, 2006). Nesmíme však zapomenout, že bývají přidruženy taktéž i změny osobní a behaviorální. V důsledku tohoto omezení je narušena sociální a ekonomická aktivita člověka (Seidl, 2015).

Osobu s demencí provází poruchy chování (podrážděnost, deprese, emotivní labilita) a změny osobnosti. Nemocný se postupem času stává zcela závislý na svém okolí, není schopen samostatné existence a každodenních aktivit (Seidl, 2015). Typickými příznaky demence jsou zapomínání a poruchy orientace. Vážně paměť pro nové poznatky a později dochází k oploštění emocí (Seidl, Obenberger, 2004).

Stanovení demence je důležité, protože některé typy demence jsou reverzibilní (Love, Webb, 2009). Pro zachycení a sledování demence je doporučován test MMSE (Mini Mental State Examination). Člověk, který má v MMSE testu pod 18 - 20 bodů je více či méně odkázán na podporu a pomoc jiné osoby (Zvoníková et al., 2010). Příčin demencí je mnoho, ale velmi často je způsobená chronickým poškozením mozku. To znamená, že může být způsobená chronickým alkoholismem nebo cévní nedostatečností

(Šípek, 2014). Hlavní příčinou této nemoci je i difuzní onemocnění mozkových hemisfér, především mozkové kůry a hipokampů. Vyskytují se smíšené formy demence, kde pozorujeme jak vaskulární složky, tak i neurodegenerativní onemocnění, např. Alzheimerovu chorobu (Seidl, 2015).

Průběh nemoci závisí na příčině a horší se změnou prostředí, traumatem či chirurgickým zákrokem (Seidl, Obenberger, 2004).

Demence může skončit i smrtí, která je způsobená buď nepřímo, např. úrazy, anebo přímo selháním základních životních funkcí např. v důsledku Alzheimerovy choroby (Fišar, 2001).

Existují určité stupně, které jsou společné všem demencím. První společný stupeň je introspekce (sebeopozorování neboli pozorování a zaznamenávání povahy vlastního vnímání, myšlení a citění) a ztráta sebejistoty. Druhý společný stupeň zahrnuje horší zvládání práce a běžné rutiny. Ale pacientův náhled je stále zachován. U třetího stupně ztrátu náhledu provázejí poruchy chování a odpadají zábrany. Čtvrtý stupeň zahrnuje nutnou dlouhodobou péči a pacienta nelze nechat bez dozoru. Poslední pátý společný stupeň se týká mutismu (narušení komunikační schopnosti), inkontinence a smrti na interkurentní (přidružené) onemocnění (Seidl, Obenberger, 2004).

V roce 2010 dle určitých odhadů žilo na světě okolo 35 milionů lidí s daným typem demence. Do roku 2050 by se mohl počet lidí s demencí zvýšit až na 113 milionů. Přímou v České republice žije desetitisíce osob, kteří trpí Alzheimerovým typem demence (Šípek, 2014).

1.2.1 Rozdělení demence

Demenci členíme na tři typy:

1. Alzheimerův typ - poruchy paměti, afázie, apraxie, akalkulie
2. Frontotemporální typ - poruchy chování, osobnosti, plynulosti řeči
3. Subkortikální typ - bradypsychismus (zpomalení psychických procesů a duševních reakcí), výbavnost slov (Seidl, 2015)

Subkortikální demence mohou souviset s depresí či s některými onemocněními bílé hmoty a s některými vaskulárními onemocněními. U nemocných se objevuje zapomnětlivost a afektivní změny. Osoby trpící demencí bývají častěji depresivní a apatičtí ke svému okolí (Love, Webb, 2009).

Také dělíme demence na primární a sekundární. Do primární demence patří: neurodegenerativní demence (atroficko-degenerativní demence, proteinopatie). A do sekundární demence patří: ischemicko-vaskulární demence a ostatní sekundární demence (Hosák et al., 2015).

1.3 Historie Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba byla poprvé popsána německým lékařem v roce 1907 (Pustina, 2014). Dnes je známo, že změny v mozkové kůře, které tento psychiatr a neuropatolog objevil, způsobují vážné mozkové onemocnění (Hadrava, 2010). V dřívější době byla tato nemoc považována za nemoc vzácnou (Pustina, 2014).

Alois Alzheimer se narodil 14. června 1864 v Marktbreitu v Bavorsku (Kučerová, 2006). Zemřel 19. prosince 1915 ve slezské Vratislavi na selhání srdce (Hadrava, 2010). Byl to syn notáře Eduarda A. a jeho manželky Terezie (Kučerová, 2006). Studoval medicínu na univerzitách v Berlíně a Würzburgu. Po ukončení studia ve Würzburgu v roce 1887 získal lékařský titul a vzápětí strávil pět měsíců prací v psychiatrické léčebně ve Frankfurtu nad Mohanem. Nejspíše na této léčebně vzrostl mladému lékaři zájem o psychiatrii a neuropatologii (Hadrava, 2010).

V azylovém zařízení se seznámil s neurologem (spolupracovníkem) Franzem Nisslem. S Franzem strávil přes dvanáct let svého profesionálního života a společně se pustili do experimentálního studia anatomie a poruch mozkové kůry. Studium taktéž zahrnovalo zkoumání reakcí mozkových buněk na různé podněty. Pracovali na studiích, které popisovaly patologii nervového systému člověka. Veškeré své hypotézy si ověřovali na pacientech ve frankfurtském sanatoriu (Hadrava, 2010).

Alois za svůj život nevydal soubornou knihu, která by se týkala jeho výzkumů, ale pracoval na rukopise pro učebnici (Hadrava, 2010) (obr. 1).



Obrázek č. 1: Alois Alzheimer. Převzato ze zdroje: (Riley, 2014)

1.3.1 Auguste D

V říjnu 1903 Alzheimer změnil pracoviště. Odešel do Mnichova za Emilem Kraepelinem, který ho pověřil vedením neuroanatomické laboratoře (Šťastný, 2007). Tato univerzitní psychiatrická klinika byla vyhlášeným pracovištěm, kde se scházeli významní lékaři německé psychiatrie (Hadrava, 2010). V té době byl již zkušený neuropatolog. Zkušenosti s novodobým barvením řezů nervové tkáně získal při spolupráci s Franzem Nisslem. Alzheimer po příchodu do Mnichova napsal habilitační práci. A posléze v Tübingenu 3. listopadu 1906 přednesl přednášku, která ho proslavila (Šťastný, 2007).

Na vědecké konferenci představil ostatním účastníkům případ psychicky narušené ženy (Hadrava, 2010). Identifikoval a popsal neurofibrilární spleti (klubka) a amyloidové plaky v mozkové tkáni, které postihlo ženu jménem Auguste D. (Kučerová, 2006). Žena byla pětapadesát let stará a onemocnění jí způsobilo ztrátu paměti a dezorientaci. Postupem času nebyla schopna se starat sama o sebe, taktéž veškerou pomoc ostatních lidí odmítala. Následně se objevily problémy se čtením a psaním (Hadrava, 2010). Trpěla agresivním chováním a měla sluchové halucinace a bludy (Šťastný, 2007). Příznaky se zhoršovaly, až do celkového omezení vyšších mentálních funkcí (Hadrava, 2010).

Auguste nakonec svému onemocnění podlehla a při posmrtném vyšetření mozku se prokázaly různé abnormality. Mozková kůra této ženy byla tenčí, než je obvyklé u zdravých lidí. Dále Alzheimer zjistil další dvě abnormality, jednak takzvaný senilní

plak, ale také přišel na pozměněnou strukturu buněk v mozkové kůře. Senilní plak, který byl dříve diagnostikován výhradně u starších osob, byl nalezen v mozku spolu s neurofibrilárními spleti (Hadrava, 2010).

Plaky si můžeme představit jako malé kruhové plošky, které připomínají zašlé měděné mince. Do nich se ukládá protein zvaný beta-amyloid. Plaky obklopují rozvětvené sítě zhoršujících mozkových buněk. U zdravých lidí jsou dendrity i axony rozloženy uspořádaně. Naopak tomu je u ACH, kde jsou vlákna různě zamotaná či zauzlená. U této nemoci jsou senilní plaky velmi podobné plakům, které se vyskytují u lidí, kteří trpí Downovým syndromem (Hamer, Copeland, 2003).

Pomocí nového barvení Alzheimer dokázal identifikovat nervové spleť, které nebyly dříve popsány. Díky tomuto poznatku Kraepelin pojmenoval onemocnění po Alzheimerově chorobě. To znamená, že tato abnormalita definovala nový druh onemocnění (Hadrava, 2010).

1.4 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (ACH) je neurodegenerativní onemocnění mozku, které řadíme mezi nejčastější příčinu demencí na světě (Preiss, Přikrylová Kučerová, 2006). Nemoc má autozomálně dominantní dědičnost. Je podložena čtyřmi geny na čtyřech chromozomech, které jsou následující: gen pro APP na chromozomu 21 (21q21), gen pro apolipoprotein-E na chromozomu 19 (19q13.2), gen pro presenilin 1 a presenilin 2 na chromozomu 14 (14q24.3) a 1(1q31-q42) (Šípek, 2010). Etiologie této nemoci není zcela známa. Považuje se za multifaktoriální (komplexní) onemocnění, což znamená, že se na nemoci podílí genetické formy, vliv toxických látek a virů (Seidl, 2008). Teorie toxická, která se zabývala vlivem hliníku, nebyla potvrzená (Tyrlíková, 1999). Tuto nemoc mohou způsobit mutace na APP, presenilin 1 a presenilin 2 ale jiná studie prokazuje, že alela genu *ApoE* byla přítomná u všech 67 nemocných. Tito nemocní byli vyšetřováni za života, nebo po smrti (Kučerová, 2006).

Zpočátku se jedná o plíživý a postupně progredující proces, při kterém dochází k poškození a zničení nervových buněk (neuronů) a spojení (synapsí). Z tohoto důvodu dochází k úbytku mozkové tkáně a hovoříme o mozkové atrofii. Následkem je zhoršení paměti, pozornosti a schopnosti se soustředit (Holmerová, 2002).

Je udáváno, že tvoří zhruba 65-75 % všech demencí (Preiss, Příkrylová Kučerová, 2006). Termín Alzheimerova demence taktéž jako presenilní forma ACH se užívá u pacientů ve věku do 65 let (Seidl, 2015). Po 65. roce života se užívá termín senilní demence Alzheimerova typu (SDAT) a do 45 let je onemocnění vzácné (Seidl, Obenberger, 2004).

ACH postihuje mužské i ženské pohlaví stejně často. Celkově můžou být více postiženy ženy, protože právě ony se dožívají vyššího věku (Šípek, 2010). U jednotlivých osob se značně mohou lišit genetické predispozice, množství a druh nejrůznějších faktorů, které ovlivňují průběh a rozvoj choroby (Fišar, 2001).

1.4.1 Příznaky ACH

Česká alzheimerovská společnost (ČALS) zveřejnila na svých stránkách deset příznaků, které by měly veřejnost varovat (informovat), jestli se jedná o Alzheimerovu chorobu.: (Česká alzheimerovská společnost, 2015)

1. Ztráta paměti, která ovlivňuje schopnost činit běžné pracovní úkoly
2. Potíže s vykonáváním běžných činností
3. Problémy s komunikací
4. Dezorientace v místě a v čase
5. Špatný racionální úsudek
6. Potíže s abstraktním myšlením
7. Problém s ukládáním věcí na nesprávné místo
8. Podléhání změnám nálady či změny chování
9. Změna osobnosti člověka
10. Chybění iniciativy (Česká alzheimerovská společnost, 2015)

1.4.2 Fáze

ACH prochází určitými fázemi a u každého pacienta onemocnění probíhá poněkud jinak (Holmerová, 2002).

Ve fázi první jsou přítomny poruchy paměti, které často nemají vliv na schopnost vykonávat současné povolání a vést normální život. Nemoc se nejprve projevuje poruchami krátkodobé paměti, kdy nemocný zapomíná události, které se staly před chvílí. Naopak události, které se staly v minulém čase, se vybavují celkem snadno. Z důvodu zapomínání se nemocní necítí ve společnosti jistě, a tak postupně redukuje veškeré vztahy s rodinou a známými. Pokud je postižena oblast mozku, ze které je

řízena řeč, vzniká porucha řeči. Postižený hledá obtížně slova či pojmy a nemůže se zcela vyjádřit. Taktéž je velmi častá porucha orientace. Nemocný se hůře orientuje v neznámém prostředí nebo v neočekávaných situacích (Holmerová, 2002).

V druhé fázi nemocný může vést ještě vcelku samostatný život, ale postupem času bude více potřebovat pomoc a podporu ostatních. Sebeobsluha a běžné denní činnosti mu budou způsobovat narůstající obtíže a postupně je nebude samostatně zvládat. Větší část pacientů přestává chodit nakupovat či nevycházejí příliš z domu. Nemocní se stáhnou do sebe a přestávají mít zájem o své koníčky a o další činnosti. V druhé fázi se taktéž objevují výrazné změny emotivity. Může se projevit deprese ale také strach a naopak i agresivita. Jak už bylo zmíněno, nemocný se hůře orientuje v prostoru a také ztrácí pojen o čase. Často neví, jaký je rok a plete si současnost s minulostí. Někdy se stává, že nepozná nejbližší rodinu nebo si je plete. Postupně ztrácí schopnost číst. Mohou se u něho vyskytnout bludy a halucinace (Holmerová, 2002).

V třetí fázi je pacient zcela nesoběstačný a potřebuje péči a dohled po celý den anebo podle možností a situace umístění do ošetrovatelského zařízení (Holmerová, 2002).

1.4.3 Příčina

Příčinou ACH je tvorba patologického proteinu beta-amyloidu (Seidl, 2015). To je látka, která je v mozku fyziologicky přítomná a je tvořena ze svého prekurzoru zvaného APP (amyloid precursor protein) (Kučerová, 2006). Tento degenerativní protein je známý tím, že u nemocných tvoří základ plaků (Fišar, 2001). Beta-amyloid se ukládá extracelulárně a je vysoce neurotoxický. Vyvolává kaskádu neurodegenerativních dějů a výsledkem tohoto procesu je degenerace intraneurálního proteinu TAU. Následně dochází ke vzniku neurofibrilárních klubíček (zámotků) a vše končí apoptózou (zánikem neuronů). Tyto změny se projevují morfologicky i klinicky. Morfologicky se projevují atrofií mozku a klinicky se projevují demencí (Seidl, 2015).

Je stanovená hypotéza, že ke koagulaci fragmentů APP pomáhá přítomnost apolipoproteinu E4 (Fišar, 2001).

1.4.4 Diagnóza

K určení diagnózy je potřeba několik vyšetření. Ta odhalí jaká je příčina pozorovaných změn či zda jsou změny skutečně důsledkem ACH (Holmerová, 2002). Diagnostika se zejména opírá o metody neurologické, zobrazovací (CT, MRI, PET, SPECT), neuropsychologické, laboratorní, psychiatrické, histopatologické či genetické (Preiss, Příkrylová Kučerová, 2006). Zobrazovací metody jsou pro pacienta naprosto nebolestivé a bez jakéhokoli rizika, lze tím pozorovat průběh nemoci pomocí vytvořených snímků (Holmerová, 2002). Správnou diagnózu může stanovit mozková biopsie, ale většinou se neprovádí (Seidl, Obenberger, 2004). Jak už bylo zmíněno, onemocnění se dá stanovit i na základě psychiatrického a psychologického vyšetření, kde se využívá psychologických testů, jako je MMSE (Seidl, 2008).

Kromě metod se dá stanovit diagnóza i pomocí celé řady otázek. Pro správné vyšetření paměti klade vyšetřující následující otázky:

1. Jaké máte jméno a příjmení?
2. Jaký je rok?
3. Jaké je roční období?
4. Jaké je dnešní datum?
5. Co je dnes za den?
6. Kde se nyní vyskytujeme? (Holmerová, 2002)

Nadcházející otázky a úkoly se zaměřují na koncentraci a pozornost. Vyšetřující může po pacientovi požadovat, aby nakreslil kruh a dokreslil ciferník hodin a polohu ručiček v určité hodině. Vyšetřující osoba společně s pacientem pojmenují určitý počet předmětů a po krátkém časovém intervalu je žádáno, aby si vzpomněl, které to byly. Dalším z mnoha úkolů je napsat větu, která má podmět a přísudek. Jestliže vyšetřující v těchto testech (úkolech) vyhodnotí každý pátý úkon či odpověď za nesprávný, je nezbytné se otázkou demence zabývat (Holmerová, 2002).

1.4.5 Léčba

Kauzální léčba neexistuje, protože etiopatogeneze onemocnění není zcela objasněna. Snahou všech zdravotníků je zlepšit kvalitu života nemocného a modulovat klinické příznaky onemocnění. Léčba proto musí být symptomatická. Vedle farmakologie je taktéž nutná úprava životního stylu (Seidl, 2015).

Léky - inhibitory acetylcholinesterázy (donepezil, rivastigmin, galanthamin) mají pro nemocné mnoho předností. U většího množství pacientů mohou zlepšit paměť a další mozkové funkce. Taktéž příznivě působí na průvodní příznaky onemocnění a předpokládá se, že jsou schopny zpomalit či pozastavit průběh onemocnění. Pomocí další skupiny léků (tzv. nová či atypická neuroleptika) lze poruchy chování a osobnosti výrazně zmírnit a ovlivnit. Je příznivé, že tyto léky pacienti dobře snášejí (Holmerová, 2002). Například antioxidanty, estrogeny, inhibitory a nootropní léky slouží ke zlepšení kognitivních funkcí (Seidl, Obenberger, 2004). Nootropní látky zlepšují metabolismus mozkových buněk a zužitkují ATP v mozku (Kafka et al., 1993). Farmakologická léčba je symptomatická a opírá se například o antidepresiva, neuroleptika či o anxiolytika (Seidl, Obenberger, 2004).

Později přichází do úvahy zbavení způsobilosti nemocného (Kafka et al., 1993).

1.5 Apolipoproteiny

Za apolipoproteiny jsou popsány specializované bílkoviny amfipatického charakteru. Ty se spojují s lipidy, které jsou polární (PL a FC) a vytvářejí s nimi obal LP částice. Tímto umožňují lipidům se rozpouštět ve vodném prostředí (Zima, 2007).

Mezi apolipoproteiny se řadí mnoho skupin bílkovin, které jsou označovány velkým písmenem (A až J) a římskou číslicí. Číslice označuje pořadí, v jakém byl apolipoprotein detekován z chromatografické kolony (Zima, 2007).

Apolipoproteiny plní tři funkce a první z nich je funkce strukturální. Tato funkce umožňuje tvorbu LP částice a taktéž zaručuje její stabilitu ve vodném prostředí. Druhá funkce je potřebná pro transcelulární transport lipidů. A poslední třetí funkce apolipoproteinů je podstatná v jejich působení jako kofaktorů některých enzymů LP přeměny (Zima, 2007).

A-I a A-II jsou apolipoproteiny, které jsou strukturální součástí HDL. B-100 je apolipoprotein, který zaručuje stabilitu částic VLDL, IDL a LDL, taktéž je odpovědný za vazbu LDL na specifický receptor (Zima, 2007).

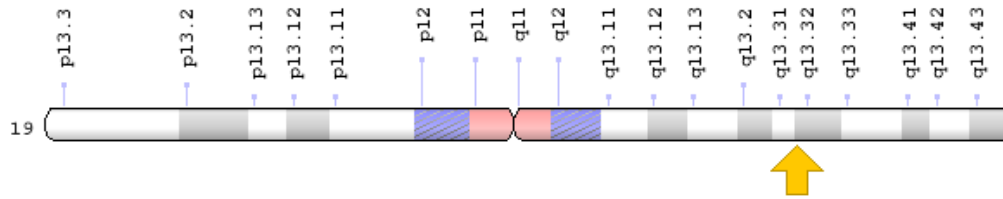
1.5.1 *ApoE (Apolipoprotein E)*

Apolipoprotein E (*ApoE*) je polymorfní protein, který má podstatnou roli při regulaci metabolismu lipidů. Je kódován třemi alelami, které jsou ve stejném lokusu (Marrzoq et al., 2011). Slouží jako ligand pro vazbu na buněčné receptory především v mozku a játrech (Zemánek, 2009). Apolipoprotein E je jeden z mnoha nejdůležitějších proteinů v organismu. Má podstatnou úlohu v metabolismu cholesterolu a TAG (triacylglyceroly). Taktéž je jedním ze základních proteinových komplementů VLDL, HDL a chylomikronů (Sršeň, Sršňová, 2005). Je obsažen v lipoproteinových částicích a jeho funkcí je, že umožňuje vazbu lipoproteinu na receptory LDL a lipoproteinů. Poruchy v tomto proteinu mohou způsobit, že se sníží jeho schopnost vázat se na receptory. To by vedlo k tomu, že se hladiny cholesterolu v krvi zvýší (Marrzoq et al., 2011).

Je známo, že mutace v genech jsou jedním z mnoha rizikových faktorů pro vznik demencí a jiných nemocí. Přibližně 1 % pacientů (nemocných) přímo dědí mutaci genu, která způsobuje Alzheimerovu chorobu v raném věku, známou taktéž jako familiární Alzheimerova choroba (FAD). Přičemž až jedna čtvrtina osob s ACH má silnou rodinnou anamnézu onemocnění. Gen *ApoE* častěji ovlivňuje riziko onemocnění ACH (Dacks, 2016).

ApoE, polypeptid obsahuje 229 aminokyselin a je členěn do tří izoform (*ApoE2*, *ApoE3* a *ApoE4*) podle rozdílů v aminokyselinách (Marrzoq et al., 2011). Byly identifikovány tři kodominantní alely genu pro *ApoE*, které jsou označeny jako $\epsilon 2$ (*ApoE2*), $\epsilon 3$ (*ApoE3*), $\epsilon 4$ (*ApoE4*) (Zemánek, 2009). Kodominantní alely jsou alely, které se u heterozygota projeví v celé míře a navzájem se neovlivňují (Šípek, 2014). Tyto alely kódují odpovídající izoformy proteinu, lišící se jedinou aminokyselinou na pozicích 112 a 158. Alela $\epsilon 3$ kóduje izoformu proteinu E3 obsahující v pozici 112 cystein a v pozici 158 arginin. Načež izoforma E2 obsahuje cystein v obou pozicích a izoforma E4 obsahuje v obou pozicích arginin (Zemánek, 2009). Gen kódující *ApoE* je obsažen na chromozomu 19 poblíž genů pro Apo CI a C-II. Alely (E2, E3, E4) představují *ApoE* polymorfismus a udávají šest genotypů, které jsou následující: E2/2, E2/3, E2/4, E3/3, E4/3 a E4/4 (Marrzoq et al., 2011).

Přesná cytogenetická lokalizace je na dlouhém rameni (q) chromozomu 19 v pozici 13.32 (19q13.32) (APOE gene, 2018) (obr. 2).



Obrázek č. 2: Poloha ApoE na chromozomu 19. Převzato ze zdroje: (APOE gene, 2018)

Jedna z podstatných funkcí *ApoE* v centrální nervové soustavě je umožňování obnovy neuronů, v tomto procesu jsou efektivnější izoformy E2 a E3 (Zemánek, 2009). V běžné populaci nejvíce převládají izoformy *ApoE3* a *ApoE2*. Izoforma *ApoE4* je především spojena s hyperlipoproteinemií (Marrzoq et al., 2011).

Přítomnost alely $\epsilon 4$ (v homozygotní formě) podstatně zvyšuje predispozici k idiopatické formě Alzheimerovy choroby s pozdním začátkem (sporadické Alzheimerovy choroby) (Zemánek, 2009). Podle výsledků různých studií bylo zjištěno, že přítomnost jedné alely *ApoE4* zvyšuje pravděpodobnost výskytu ACH až třikrát, přítomnost dvou alel (4/4) až patnáctkrát (Manukyan, Jirák, 2015). Zatímco alela $\epsilon 2$ vykazuje protektivní charakter, to znamená, že snižuje riziko nemoci. Alela $\epsilon 3$ je považována v populaci za nejčastější a nepředstavuje žádné riziko (Zemánek, 2009). Tato alela se pokládá ve vztahu k Alzheimerově chorobě za indiferentní (Manukyan, Jirák, 2015).

Fenotyp *ApoE-4* (2/4, 4/3, 4/4) zvyšuje hladiny celkového cholesterolu u člověka o 10 % (Zima, 2007).

1.5.1.1 Indikace k vyšetření na *ApoE*

- Alzheimerova choroba
- Předčasný aterosklerotický proces
- Hyperlipoproteinémie III (Zemánek, 2009)

1.5.1.2 Možné genotypy

Referenční hodnoty pro *ApoE*:

- E3/E3 - nemutovaný homozygot (wild type)
- E2/E2, E4/E4 - mutovaný homozygot
- E3/E2, E3/E4, E2/E4 - heterozygot (Zemánek, 2009)

1.6 Metody vyšetřování polymorfismů v genech

1.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla objevená v roce 1985 Kary B. Mullisem. Zavedení PCR znamenalo velký přínos pro molekulární biologii (Šmarda, 2005). Metoda je velmi jednoduchá, rychlá a citlivá (Sršeň, Sršňová, 2005).

Polymerázová řetězová reakce - PCR (Polymerase chain reaction) je metoda zmnožení úseku DNA založena na principu replikace nukleových kyselin (Sršeň, Sršňová, 2005). Replikace je základním molekulárním procesem všech životaschopných organismů (Šmarda, 2005).

Důležitou výhodou je, že umožňuje získat požadovanou a určitou sekvenci genové DNA, aniž by byla předtím klonována. Základem této metody je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců určitých úseků DNA. Tato DNA je dvouřetězcová a zmíněná syntéza probíhá ve směru 5' → 3' pomocí DNA - polymerázy. Zkoumaný úsek sekvence je ohraničen pomocí dvou primerů, které se hybridizují na protilehlé řetězce DNA. Umístí se tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. Následně po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů dochází k tomu, že syntéza nových vláken probíhá na obou řetězcích protisměrně. K syntéze DNA je zapotřebí využití termostabilní polymerázy. Termostabilní polymeráza (*Taq* DNA-polymeráza) odolává teplotám, při kterých DNA denaturuje. Díky tomu syntéza DNA probíhá opakovaně formou cyklů (Šmarda, 2005).

1.6.1.1 Složení reakce

Reakci tvoří:

- **Templátová DNA = vzorek DNA, který obsahuje zkoumaný úsek** - požadavky na templát nejsou nijak náročné. Důležité je, aby vzorek nebyl znečištěn (kontaminován) jinou DNA. Pokud by tak bylo, došlo by k namnožení kontaminované DNA a vše by směřovalo ke zkreslenému

výsledku vyšetření. Příliš velké množství DNA v reakční směsi inhibuje průběh reakce.

- **Primery** - jsou specifické pro cílovou sekvenci a měly by být komplementární k danému úseku. Vysoký podíl jejich množství následně vede k nescifickému nasednutí primerů na DNA nebo se jednotlivé primery párují navzájem. Při nízkém podílu jejich množství dochází ke vzniku nedostatečného množství produktu. Výrobce je vyrábí v lyofilizované formě, kde na zkumavce je uvedeno jejich množství. Po přidání vody tak vznikne zásobní roztok.
- **Taq polymeráza** - termostabilní DNA polymeráza, která je izolována z bakterie *Thermus aquaticus*. Enzym si uchovává svou aktivitu i přes několikanásobné působení teploty, které je podobné k teplotě varu.
- **Směs deoxynukleosidtrifosfátů (dNTPs) = prekurzory DNA** - je směs deoxynukleotidů, které nesou všechny báze, to jsou dATP, dCTP, dGTP a dTTP. Představují základní stavební jednotky pro syntézu DNA.
- **Reakční pufr** - na vytvoření slabě zásaditého prostředí. Důležité pro aktivitu DNA polymerázy *Taq*.
- **Voda (H_2O)** - musí být sterilní a čistá. Voda je potřebná k doplnění reakce na požadované množství.
- **Mg²⁺ ionty**

Všechny složky jsou skladovány v chladicím zařízení při teplotě -20 °C (Sršeň, Sršňová, 2005; Green, Sambrook, 2012; Zorníková, 2012).

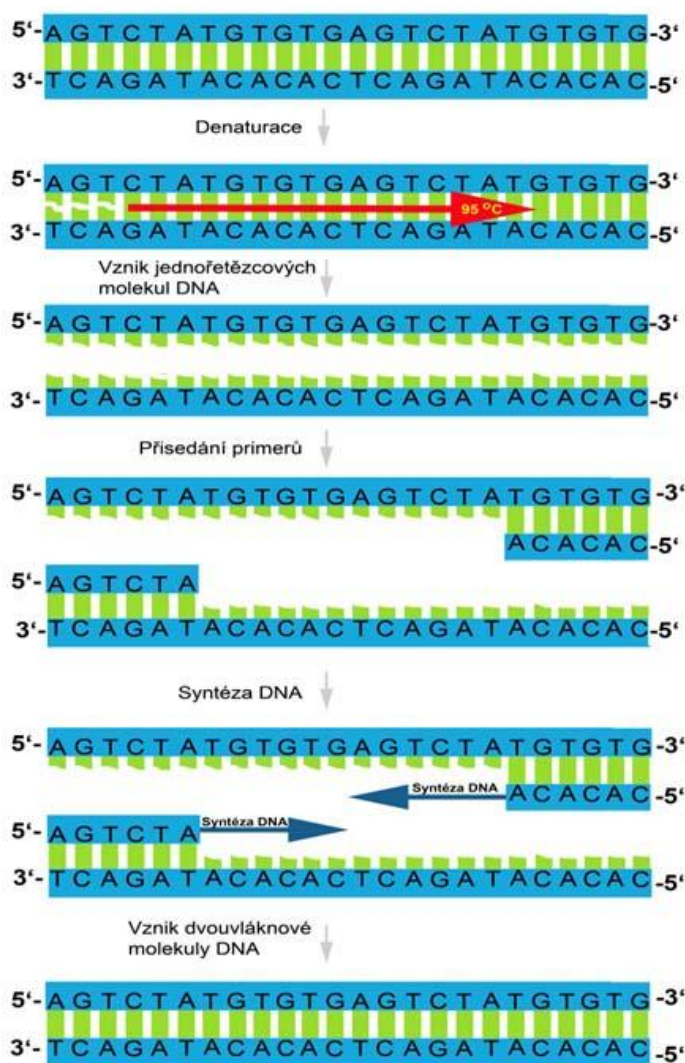
1.6.1.2 *Proces PCR*

PCR probíhá pomocí cyklických procesů, přičemž každý cyklus sestává z třech důležitých kroků: (Sršeň, Sršňová, 2005)

1. **Denaturace** - pomocí vysoké teploty (kolem 95 °C) dochází k rozpadu vodíkových můstků mezi vlákna DNA. To znamená, že dojde k oddělení obou komplementárních řetězců DNA a vznikají dvě jednovláknové molekuly DNA. V následujícím kroku pak na molekuly DNA mohou nasednout primery.
2. **Hybridizace (Annealing, nasedání)** - teplota, při níž hybridizace probíhá, je nastavená na 50 - 65 °C. Zde nastává dosednutí primerů s templátovou

DNA na komplementárních místech. Teplota hraje důležitou roli. Pokud by byla teplota příliš nízká, primery mohou nasednout i na sekvence, které jsou komplementární jen z části. Důsledkem by byl nespecifický produkt. Naopak při vyšší teplotě budou primery málo hybridizovat a výsledkem by bylo nedostatečné množství produktu. Primery jsou jednovláknové oligonukleotidy, které mají sekvenci komplementární k sekvencím na 3'-konci obou vláken.

3. **Elongace** - při zvýšení teploty až na 75 °C začíná *Taq*-polymeráza syntetizovat komplementární vlákno DNA. Syntéza DNA jde ve směru od 5' konce ke 3' konci (Sršeň, Sršňová, 2005; Green, Sambrook, 2012) (obr. 3).



Obrázek č. 3: Proces PCR. Převzato ze zdroje: (Green, Sambrook, 2012)

Tyto tři kroky se obvykle opakují po 30 cyklech. Již po prvním cyklu se počet řetězců ve směsi zdvojnásobí. V následujícím cyklu PCR mohou jako templát pro polymerázu sloužit i řetězce, které byly nově vytvořené. To znamená, že se nasyntezuje dvojnásobný počet produktu. Při opakování těchto cyklů bude počet vytvořených řetězců narůstat exponenciálně (Zorníková, 2012). PCR probíhá v zařízení nazývaném termocykler, který během několika sekund zvýší nebo sníží teplotu. Teplota se v přístroji mění automaticky v předem nastavených časových intervalech (Čítek, 2014). Tudíž se teploty od sebe můžou lišit o několik desítek stupňů Celsia. Výsledkem tedy je vznik nových kopií fragmentu DNA (Green, Sambrook, 2012).

1.6.1.3 Varianty PCR

1. **Hot-start PCR** - využívá se hot - start polymeráza, která zvýší specificitu reakce. Pro své spuštění (aktivizaci) vyžaduje teplotu blížíci se k 95 °C.
2. **Touchdown PCR (přistávací)** - V prvních cyklech se použije vyšší teplota, která se postupně v dalších cyklech snižuje. Vyšší teplota zabrání nespecifickým vazbám primerů s templátovou DNA. Následující nižší teplota namnoží jen určité (specifické) produkty.
3. **Nested PCR (Odstupňovaná PCR)** - taktéž PCR využívající vnějších a vnitřních primerů je velmi citlivá metoda. Pro průběh tedy použije dva páry primerů. Je schopna detekovat i jednu molekulu templátové DNA.
4. **Multiplex PCR** - v jedné reakci je použito víc než jeden pár primerů. Ty se pak vážou k úsekům templátové DNA.
5. **Real-time PCR (Kvantitativní Real-time)** - tato metoda je potřebná k určování množství DNA a k přepisu. Základ metody je klasické PCR s tím, že zde je navíc využit speciální cycler. Ten neustále zaznamenává množství DNA v průběhu každého cyklu. K zjištění množství DNA se využívá fluorescenční substrát, který se váže na přítomnou DNA. Hladina fluorescence substrátu je identifikovatelná detektorem a odráží množství DNA. Metoda se považuje za vysoce citlivou. Pokud se využijí specifické substráty, tak se jedná i o metodu vysoce specifickou.
6. **RT-PCR (Reverzní transkripční PCR)** - je nejcitlivější technikou pro detekci a kvantitaci mRNA. Tato PCR je optimální pro geny, které se exprimují ve vysokém počtu ve snadno dostupných buňkách.

7. **Alelově-specifická PCR (AS-PCR)** - lze jí použít pro určení konkrétní alely nebo pro vyhledávání mutace. Zásadou této PCR je, že musí být k dispozici primer pro úsek, ve kterém se daná alela liší od ostatních. Tato metoda byla popsána nezávisle pod jinými označeními. Využívá dva odlišné přístupy, kde první přístup je založen na chybějící elongaci. A to v důsledku chybného párování bází na 3'- konci primeru. Systém se jmenuje ARMS = amplifikaci nedostupný mutační systém nebo ASA = alelově specifická amplifikace. Ve druhém přístupu dochází k chybnému párování bází ve střední části sekvence primeru. Tato chyba zabraňuje hybridizaci primeru k určitému místu za předpokladu, že se nachází v templátové DNA.
8. **Inverzní PCR** - slouží pro izolaci a rozpoznání neznámé sekvence.
9. **Asymetrická PCR** (Šmarda, 2005; Green, Sambrook, 2012)

1.6.1.4 Využití

PCR se z pravidla využívají v klinické genetice, soudním lékařství, antropologii, archeologii, ve vývojové biologii či při určování příbuznosti (Sršeň, Sršňová, 2005).

Přesné využití:

1. Množení DNA při prenatální diagnostice
2. Identifikace pachatelů trestných činů
3. Určení paternity
4. Identifikace bakterií a virů
5. Specifikace dědičných chorob
6. Namnožení DNA u několika desítek tisíc let starých mamutů či mumii
7. Sledování vývoje rezistence patogenů na léky
8. Zpřesnění HLA-kompatibility u lidí podstupující transplantaci (Sršeň, Sršňová, 2005; Green, Sambrook, 2012)

1.6.1.5 Problémy

Nejčastěji se vyskytující obtíže s PCR:

1. Produkt v negativní kontrole - v důsledku kontaminace
2. Žádný či slabý produkt
3. Krátké nespecifické produkty
4. Dlouhé nespecifické produkty (Green, Sambrook, 2012)

1.6.1.6 Výhody PCR

Mezi výhody patří:

1. Krátké trvání celého procesu
2. Citlivost
3. Potřeba malého množství DNA
4. DNA může být stará a degradovaná (Sršeň, Sršňová, 2005)

1.6.2 Reverzní hybridizace na stripech

Tento test slouží pro identifikaci izoform E2, E3 a E4 apolipoproteinu E na bázi polymerázové řetězové reakce a reverzní hybridizace. Umožňuje přímé rozlišení mezi šesti možnými heterozygotními nebo homozygotními genotypy *ApoE*, které jsou následující: E2/2, E2/3, E2/4, E3/3, E3/4, E4/4 (ViennaLab, 2015).

2 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo:

1. Napsat odbornou rešerši pro seznámení s Alzheimerovou chorobou.
2. Seznámení se s genetickými faktory zvyšující riziko Alzheimerovy choroby.
3. Optimalizace metody PCR ARMS pro vyšetření polymorfismu genu *ApoE*, jednoho z faktorů zvyšující riziko vzniku Alzheimerovy choroby.
4. Vyšetření několika vzorků pacientů s Alzheimerovou chorobou či výskytem onemocnění v rodině.
5. Vyhodnocení získaných výsledků.

3 Metodika

3.1 Charakteristika souboru

Výzkumná část bakalářské práce byla vykonána na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakultě pod vedením Ing. Tomáše Nixe, Ph.D. Laboratoř se nachází na adrese J. Boreckého 1167/27, 370 11 České Budějovice. Výzkumné práce byly prováděny pod odborným dohledem.

3.2 Postupy genetického vyšetření

3.2.1 Potřebné vybavení

- Vortex Mixer, Labnet International, Inc.
- Centrifuga, Mini Spin eppendorf
- Minicentrifuga, PrismTMMini
- Analytické váhy
- UV/VIS Shimadzu BioSpec-nano
- Laminární box - digestoř, Telstar AV - 100
- Inkubátor, MINI Dry Bath
- Elektroforetický systém, MS major scienceSafe Blue MBE-150 PLUS
- Termocykler MJ MiniTM, Personal Thermal Cyclers
- Mikrovlnná trouba, Samsung
- UV Transilluminator a detekční systém, Uvitec Cambridge, UVISAVE HD5
- Laboratorní sklo (erlenmeyerova baňka)
- Automatické mikropipety, Autoclavable
- Stojánky na zkumavky
- Vodní lázeň, Julaba SW22

3.2.2 Izolace DNA

Pro každou PCR reakci či před každým molekulárně - genetickým vyšetřením, se musí provést izolace DNA. DNA je nejčastěji izolována z lymfocytů periferní krve nebo z bukalního stěru.

Bukální stěry u respondentů byly provedeny pomocí výtěrových tampónů, na které se naněsly epitelové buňky z vnitřní strany tváří.

Vzorky byly odebrány anonymním respondentům (rodině a blízkým přátelům), kteří souhlasili s odběrem a vyšetřením pro praktickou část bakalářské práce.

3.2.2.1 Izolace z bukálního stěru

K izolaci DNA z bukálního stěru byl použit Extract Now™ DNA Mini Kit (Rapid and Efficient Isolation of Genomic DNA) dle doporučení výrobce.

Reagencie

- Proteinase K
- Binding Buffer C
- Wash Buffer E
- AL Lysis Buffer
- Elution Buffer A

Spotřební materiál

- Mikrozkušavky (1,5 ml)
- Špičky
- Rukavice

Postup

1. Do 1,5 ml zkumavek byly nůžkami odštířeny konce výtěrových tampónů. Tampony byly odštířeny tak, aby bylo zajištěno uzavření zkumavek.
2. Do všech zkumavek bylo pipetou přidáno 400 μ l AL Lysis Buffer a 25 μ l Proteinase K.
3. Zkumavky byly intenzivně promíchány vortexováním po dobu 5 sekund a následně byly stočeny v centrifuze.
4. Předem byl nastaven termostat na 56 °C. Po dosažení určené teploty byly zkumavky inkubovány jen 15 minut.
5. Pro lepší výtěžnost DNA byly zkumavky opět zvortexovány a krátce stočeny.
6. Pomocí pinzety byly vyjmuty výtěrové tampony.
7. Následně bylo přidáno 200 μ l Binding Bufferu C (vazebného pufru C) a opět došlo k zvortexování.

8. Obsah zkumavek byl přelit do kolonek, které byly vloženy do ependorfeček. Kolonky byly stočeny v centrifuze při otáčkách 12 210 rpm (13 000 rpm) po dobu 2 minut.
9. Ependorfky byly vyhozeny a kolonky byly vloženy do nových. Pomocí pipety bylo do každé kolonky přidáno 700 µl Wash Buffer E (promývacího pufru E) a dalším krokem bylo stočení v centrifuze při otáčkách 12 210 rpm (13 000 rpm) po dobu 1 minuty.
10. Veškerý obsah, který byl v ependorfkách byl vylit a kolonky byly do nich vráceny. Do každé kolonky bylo přidáno 700 µl Wash Buffer E a zkumavky se stočily.
11. Obsah ependorfeček byl opět vylit. Zkumavky byly na prázdno stočeny v centrifuze při maximálním výkonu po dobu dvou minut.
12. Ependorfky byly vyhozeny a kolonky byly vloženy do označených zkumavek. Pomocí pipety bylo do kolonek přidáno 200 µl Elution Buffer A. Zkumavky se nechaly inkubovat při pokojové teplotě 5 minut.
13. Po inkubaci byly zkumavky stočeny v centrifuze při otáčkách 9 458 rpm (10 000 rpm) po dobu dvou minut.
14. Ze zkumavky byl napipetován Elution Buffer A, který byl znovu nalit do kolonek. Opět se zkumavky nechaly inkubovat při pokojové teplotě 5 minut a následně byly stočeny v centrifuze při otáčkách 9 458 rpm (10 000 rpm) po dobu dvou minut.

3.2.3 *Precipitace DNA*

Reagencie

- Octan sodný (3M)
- Etanol (99,8%)
- Etanol (75%)
- PCR voda

Postup

1. Do izolované DNA bylo pipetou přidáno 40 µl octanu sodného (3M) a 900 µl předchlazeného absolutního etanolu = absolutního líhu (99,8%). Zkumavky byly následně zvortexovány a krátce stočeny v centrifuze.

2. Pro zvýšení účinnosti byly zkumavky inkubovány nejméně hodinu v mrazáku při -20 °C.
3. Zkumavky byly stočeny v centrifuze při 12 210 rpm (13 000 rpm) po dobu 20 minut.
4. Po stočení byl odstraněn (vylit) supernatant a přidal se stejný objem 75% etanolu. Zkumavky byly opět centrifugovány při 12 210 rpm (13 000 rpm) po dobu 5 minut.
5. Opět byl odstraněn (vylit) supernatant a zbytek etanolu byl odpipetován pipetou.
6. Pro lepší odpaření etanolu byly zkumavky vloženy do předem vyhřátého inkubátoru. Inkubátor byl nastaven na 37 °C a zkumavky byly v něm ponechány 30 minut.
7. Do každé zkumavky bylo pipetou přidáno 15 µl destilované vody, tím byl rozpuštěn získaný sediment. Důkladně byly zkumavky zvortexovány a krátce stočeny v centrifuze.
8. Pomocí Nanodropu byla měřena koncentrace DNA.

3.2.4 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometrického přístroje zvaného Nanodrop. Nejprve byla zjištěna koncentrace blanku (PCR voda) a poté zkoumaných vzorků. Jednotlivé vzorky byly měřeny dvakrát, kde z každého bylo použito 1,5 µl DNA. Hodnoty naměřené na přístroji byly uváděny v jednotkách ng/µl.

3.2.5 Gelová elektroforéza

Reagencie

- 10 x TBE Buffer - roztok
- Top Vision Agarose - prášek
- Ethidium bromide aqueous solution 1% w/v
- 6x DNA Loading Buffer
- 100 bp - DNA Ladder Equalized

Postup

1. Před začátkem elektroforézy byl připraven pracovní roztok 1x TBE.
2. Navážené množství agarózy bylo vloženo do kuželové baňky o objemu 150 ml a následně bylo přidáno určité množství 1x TBE pufru.
3. Roztok TBE pufru a agarózy byl tepelně zahříván v mikrovlnné troubě. Ohřev trval tak dlouho, dokud nevznikl průhledný gelový roztok bez bublin.
4. Kuželová baňka s roztokem byla posléze zchlazena pod proudem tekoucí vody. Po krátkém zchlazení byl přidán Ethidium bromide (2,5 μ l), promícháno.
5. Gelový roztok byl nalit na elektroforetickou podložku, do které byly předem vloženy hřebeny. Podložka byla předem vyvážena pomocí vodováhy a hřebeny určovaly počet a hloubku jednotlivých jamek.
6. Přibližně po 30 minutách došlo k zatuhnutí gelu, bylo možné opatrně vyndat hřebeny.
7. Gel byl vložen do elektroforetické vany, ve které byl i TBE pufr. Do jednotlivých jamek byly aplikovány vzorky. Bylo důležité, aby gel byl zcela ponořen pod pufr.
8. Do zvolené jamky bylo napipetováno 10 μ l 100 bp DNA Ladder Equalized (žebřík). Díky tomu byly zjištěny velikosti produktů.
9. Elektroforéza byla nastavena na 70 V při 250 mA po dobu 30 minut. Průběh procesu bylo možné pozorovat pomocí speciálního illuminátoru.
10. Po třiceti minutách byl gel vždy přemístěn na transilluminátor na který byla připojena komora s kamerou, to nám umožnilo vyfocení gelu. Výsledné fotografie gelu byly přeneseny do počítače k vyhodnocení.

3.2.6 Metoda PCR ARMS

Metoda PCR ARMS byla použita pro vyšetření polymorfismů genu pro *ApoE*.

Reagencie

1. 10x ThermoPol® Reaction Buffer, BioLabs
2. dNTP Set 1 (pH 7) 100 mM, 4 x 250 μ l (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Carl Roth GmbH + Co.KG

3. Primery od výrobce Generi Biotech: Lot: 1471K4 ApoE_Cys 158, Lot: 1471K5 ApoE_Arg 158, Lot: 1471K6 ApoE_Arg 112, Lot: 1471K7 ApoE_Cys 112, Lot: 1471K8 ApoE_Common, Lot: 1471K9 ApoE_CONTROL_F, Lot: 1471L0 ApoE_CONTROL_R (tab. 1)
4. PCR voda
5. Taq DNA Polymerase, BioLabs
6. DNA

Tabulka č. 1: Sekvence primerů pro *ApoE* od výrobce Generi Biotech

Primery	Sekvence
ApoE_Cys 158	5'-ATGCCGATGACCTGCAGAATT-3'
ApoE_Arg 158	5'-ATGCCGATGACCTGCAGAATC-3'
ApoE_Arg 112	5'-CGCGGACATGGAGGACGTTC-3'
ApoE_Cys 112	5'-CGCGGACATGGAGGACGTTT-3'
ApoE_Common	5'-GTTCAGTGATTGTCGCTGGGCA-3'
ApoE_CONTROL_F	5'-CCCACCTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG-3'
ApoE_CONTROL_R	5'-GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG-3'

(Zende, 2013)

Mutačně specifické ARMS primery, kontrolní primery a běžné primery pro *ApoE* polymorfismus (tab. 2).

Tabulka č. 2: Délka PCR produktu (bp)

Mutation/ wild specific/ common/ control primer	Délka PCR produktu (bp)
Cys 158	588
Arg 158	588
Arg 112	451
Cys 112	451
Common	-
CONTROL FOR	360
CONTROL RES	

Postup

1. Do stojánku byly připraveny dvě zkumavky o objemu 0,5 ml, do kterých byly připraveny reakční směsi (mater mix A a mater mix B).
2. Do každé zkumavky bylo pomocí pipety napipetováno stejné množství 2,5 μ l pufru (10x ThermoPol® Reaction Buffer), 1 μ l každého nukleotidu (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,8 μ l primerů (AB, AB, AB, A, A či B, B) (tab. 3), 0,5 μ l polymerázy (Taq DNA Polymerase). Polymeráza se nesmí vortexovat a při přípravě jednotlivých master mixů musí být nepřetržitě v chladícím stojánku.
3. Do zkumavek o objemu 0,2 ml bylo napipetováno 8 μ l master mixu A a do jiných zkumavek stejné množství master mixu B. Následně byla přidána 50 ng DNA a reakční směs byla doplněna PCR vodou na 25 μ l.
4. Zkumavky byly popsány a následně krátce stočeny v centrifuze.
5. Byly vloženy do termocykleru, kde byl předem nastaven příslušný program (tab. 4).
6. Do zkumavek s produktem byly přidány 4 μ l 10x ThermoPol® Reaction Bufferu. Po promíchání produktů byl veškerý obsah napipetován a přenesen do jednotlivých jamek v agarózovém gelu. Agarózový gel byl zcela ponořen pod hladinou TBE pufru. Připravený agarózový gel byl 2% .
7. Následně byla spuštěna elektroforéza. Po půl hodině byl gel vyndán a zkontrolován pod UV světlem.

Tabulka č. 3: Jednotlivé primery pro master mix A a master mix B

Master mix A - primery	Master mix B - primery
A = Arg 158 (8 μ l)	B = Cys 158 (8 μ l)
A = Arg 112 (8 μ l)	B = Cys 112 (8 μ l)
AB = Common (8 μ l)	AB = Common (8 μ l)
AB = CONTROL F (8 μ l)	AB = CONTROL F (8 μ l)
AB = CONTROL R (8 μ l)	AB = CONTROL R (8 μ l)

Tabulka č. 4: Teplotní profil PCR ARMS pro *ApoE*

	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Počáteční denaturace	95 °C	4 min	1
2	Denaturace	94 °C	45 s	35
3	Annealing	66 °C	45 s	
4	Extenze	72 °C	45 s	
5	Konečná extenze	72 °C	5 min	1
6	Chlazení	4 °C	15 min	1

3.2.7 Reverzní hybridizace na stripech - pomocí komerčního kitu

Pro hybridizaci byl použit komerčně dodaný kit Apo E StripAssay® dle doporučení výrobce.

Postup této metody zahrnuje tři důležité kroky, kterými jsou: izolace DNA, amplifikace DNA a hybridizace amplifikačních produktů.

3.2.7.1 Amplifikace DNA

V průběhu celého postupu bylo důležité uchovat PCR reagensie a DNA templát zchlazený. Veškeré kroky před začátkem vyhřívání cykleru byly potřeba provádět na ledu (0 - 4 °C). Pokud nebyla DNA vyizolována izolačním protokolem ViennaLab, bylo doporučováno použít DNA, která má koncentraci 5-40 µg/ml.

Reagensie

- Taq DNA Polymerase
- Taq Dilution Buffer
- Amplification Mix
- vyizolovaná DNA

Postup

1. Naředila jsem si pracovní koncentraci (0,2 U/µl) Taq DNA Polymerase v Taq Dilution Buffer. Pro pět vzorků jsem smíchala 24 µl Taq Dilution Buffer + 1 µl Taq DNA Polymerase.
2. Pro každý vzorek jsem si připravila jednu PCR zkušavku. Zkušavky jsem následně umístila na led.

3. Pro jednotlivý vzorek jsem na ledu připravila výsledný PCR reakční mix, který je následující: 15 μ l Amplification Mix, 5 μ l naředěné Taq DNA Polymerase, 5 μ l vyizolované DNA.
4. Pevně uzavřené reakční zkumavky jsem vložila do předehřátého termocykleru a spustila daný program.
5. Program termocykleru: pre-PCR: 94 °C - 2 min
PCR: 94 °C - 15 s; 58 °C - 30 s; 72 °C - 30 s (35 cyklů)
konečná syntéza: 72 °C - 3 min

3.2.7.2 Hybridizace (třepaná vodní lázeň)

Reagencie

- DNAT
- PCR produkt
- Hybridization Buffer
- testovací proužky

Postup

1. Nejprve jsem si nastavila vodní hladinu přibližně do poloviny výšky promývacího korýtka. Vodní lázeň jsem si vyhřála přesně na 45 °C (\pm 0,5 °C) a danou teplotu zkontrolovala pomocí kalibrovaného teploměru.
2. Hybridization Buffer a Wash Solution A jsem si vytemperovala na 45 °C a testovací proužky, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B a Color Developer jsem nechala vytemperovat na pokojovou teplotu.
3. Připravila jsem si promývací korýtka a jednotlivé proužky byly vyjmuty pomocí čisté pinzety.
4. Do spodní části korýtka jsem vždy napipetovala 10 μ l DNAT (jeden sloupec pro každý vzorek).
5. Přidala jsem 10 μ l PCR produktu pokaždé přímo do kapky DNAT.
6. Vzniklý produkt jsem promíchala pipetou (zůstane modrý).
7. Nechala jsem to stát 5 minut při pokojové teplotě.

8. Po uplynulé době jsem přidala do každého sloupce korýtko 1 ml Hybridization Buffer (předem vyhřátý na 45 °C). Následně jsem korýtkem jemně zamíchala (modrá barva zmizí).
9. Připravený proužek jsem vložila do určitého sloupce korýtko s označením a čárkami nahoru. Proužek byl úplně ponořen.
10. Inkubace probíhala po dobu 30-ti minut při 45 °C na třepané platformě vodní lázně.
11. Po uplynutí dané doby (inkubace) jsem odsála hybridizační roztok. Bylo velmi důležité nenechat proužek během celé procedury oschnout a okamžitě pokračovat.

3.2.7.3 Promývání (třepaná lázeň)

Reagencie

- Wash Solution A

Postup

1. Přidala jsem 1 ml Wash Solution A (předem vyhřátý na 45 °C) a krátce opláchla. Odsála jsem tekutinu.
2. Opět jsem přidala 1 ml Wash Solution A (45 °C).
3. Nechala jsem inkubovat 15 minut při 45°C v třepané lázni. Odsála jsem tekutinu.
4. Opět jsem přidala 1 ml Wash Solution A (45 °C).
5. Nechala jsem inkubovat 15 minut při 45 °C v třepané lázni. Odsála jsem tekutinu.

3.2.7.4 Barvení

Reagencie

- Conjugate Solution
- Wash Solution B
- Color Developer
- Destilovaná voda

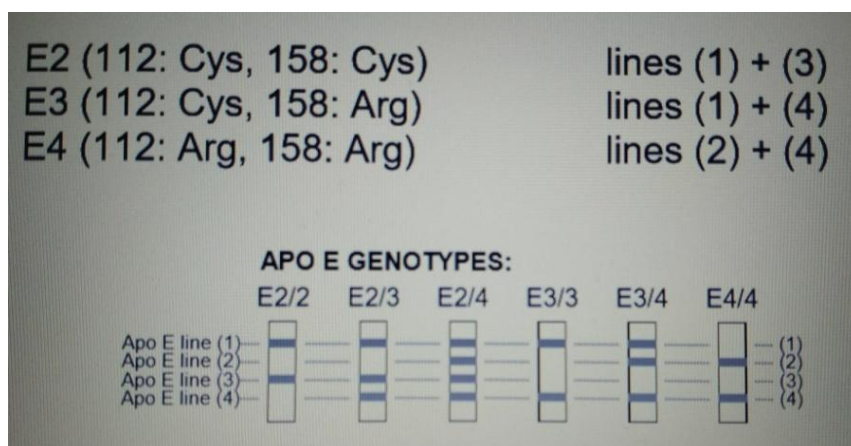
Postup

1. Přidala jsem 1 ml Conjugate Solution.
2. Inkubovala jsem 15 minut při pokojové teplotě na třepačce. Odsála jsem tekutinu.
3. Přidala jsem 1 ml Wash Solution B a krátce opláchla. Odsála jsem tekutinu.
4. Opět jsem přidala 1 ml Wash Solution B.
5. Nechala jsem inkubovat 5 minut při pokojové teplotě na třepačce. Odsála jsem tekutinu.
6. Opět jsem přidala 1 ml Wash Solution B.
7. Nechala jsem inkubovat 5 minut při pokojové teplotě na třepačce. Odsála jsem tekutinu.
8. Přidala jsem 1 ml Color Developer.
9. Nechala jsem inkubovat 15 minut při pokojové teplotě ve tmě na třepačce. Při reakci, která byla pozitivní, se vytvořily purpurové proužky.
10. Proužky jsem několikrát opláchla destilovanou vodou.
11. Následně jsem je nechala uschnout ve tmě na filtračním papíru. Bylo důležité nevystavovat proužky intenzivnímu světelnému záření.

3.2.7.5 Interpretace výsledků

Genotyp vzorku se stanoví pomocí přiloženého listu Collector™. Pro tři izoformy ApoE (E2, E3 a E4) jsou získány následující vzory barvení (obr. 4).

Intenzita barvení pozitivních čar na proužku se může lišit. To nemá žádný význam pro výsledek.



Obrázek č. 4: Šest možných homozygotních a heterozygotních genotypů ApoE. Převzato ze zdroje: (ViennaLab, 2015)

4 Výsledky

Koncentrace DNA byly naměřené na Zemědělské fakultě v Českých Budějovicích na přístroji UV/VIS Shimadzu BioSpec-nano. V tabulce č. 5 jsou uvedeny hodnoty koncentrace vzorků DNA, kterou jsem vyizolovala. V tabulce č. 6 jsou uvedeny koncentrace vzorků, které mi poskytla laboratoř GENLABS s.r.o.

Získané výsledky jsou zcela anonymní a nebudou v práci sdělovány.

Tabulka č. 5: Výsledné koncentrace DNA z bukálních stěrů

Vzorky	Koncentrace DNA [ng/μl]		
	1. měření	2. měření	3. měření
1	76,65	45,91	68,75
2	21,20	23,97	-
3	40,59	35,48	-
4	6,68	7,47	-
5	28,41	25,58	-
6	691,65	84,41	95,89

Tabulka č. 6: Vzorky a jejich koncentrace poskytnuté laboratoří GENLABS s.r.o.

Vzorky	Koncentrace DNA [ng/μl]
203/17	114
155/17	69,5
227/17	46,6
234/17	71,5
170/17	12,3

4.1 Optimalizace metody PCR ARMS

Metodou PCR ARMS jsem vyšetřovala polymorfismus *ApoE*. Pro danou metodu jsem použila přečištěnou DNA. PCR byla provedena v celkovém objemu 25 μl reakční směsi.

4.1.1 První měření

Při prvním měření jsem se držela dle pokynů doporučeného článku. Daný postup a poměr reagensů byly popsány v článku s přesným názvem: Apolipoprotein E gene polymorphism and its effect on plasma lipids in arteriosclerosis.

Pro optimalizaci této metody jsem použila vzorky, které jsem vyizolovala. Jednalo se o vzorky z bukálních stěrů odebraným anonymním osobám, kteří souhlasili s odběrem.

Podstatné pro provedení metody bylo potřeba si připravit reakční směsi = master mixy (tab. 7). Master mix A a master mix B jsem pomocí pipety rozpipetovala do mini zkumavek a taktéž jsem do jednotlivých mini zkumavek přidala určité množství DNA a PCR vody (tab. 8). Po smíchání všech reagensů vznikly reakční PCR mixy pro gen *ApoE* (tab. 9).

Tabulka č. 7: Master mix A pro 1 vzorek a master mix B také pro 1 vzorek

Reagencie	Master mix A	Reagencie	Master mix B
pufr	2,5 µl	pufr	2,5 µl
dATP	1 µl	dATP	1 µl
dCTP	1 µl	dCTP	1 µl
dGTP	1 µl	dGTP	1 µl
dTTP	1 µl	dTTP	1 µl
primery: AB	0,8 µl	primery: AB	0,8 µl
AB	0,8 µl	AB	0,8 µl
AB	0,8 µl	AB	0,8 µl
A	0,8 µl	B	0,8 µl
A	0,8 µl	B	0,8 µl
polymeráza	0,5 µl	polymeráza	0,5 µl

Tabulka č. 8: Použité množství DNA a PCR vody pro master mix A a master mix B

	Master mix A		Master mix B	
	DNA	PCR voda	DNA	PCR voda
vz. č. 1	0,79 µl (63 ng/µl)	16,21 µl	0,79 µl (63 ng/µl)	16,21 µl
vz. č. 2	2,27 µl (22 ng/µl)	14,73 µl	2,27 µl (22 ng/ µl)	14,73 µl

vz. č. 3	1,35 µl (37 ng/µl)	15,65 µl	1,35 µl (37 ng/µl)	15,65 µl
vz. č. 4	7,6 µl (6,5 ng/µl)	9,4 µl	7,6 µl (6,5 ng/µl)	9,4 µl
vz. č. 5	2,3 µl (21 ng/µl)	14,7 µl	2,3 µl (21 ng/µl)	14,7 µl
vz. č. 6	0,5 µl (89 ng/µl)	16,5 µl	0,5 µl (89 ng/µl)	16,5 µl
vz. č. 7	2 µl (100 ng/µl)	15 µl	2 µl (100 ng/µl)	15 µl
vz. č. 8	- µl	17 µl	- µl	17 µl

Tabulka č. 9: Reakční PCR mixy pro gen *ApoE* při prvním měření

	Master mix A		
vz. č. 1	8 µl MM	16 µl vody	0,79 µl DNA
vz. č. 2	8 µl	14,73 µl	2,27 µl
vz. č. 3	8 µl	15,65 µl	1,35 µl
vz. č. 4	8 µl	9,4 µl	7,6 µl
vz. č. 5	8 µl	14,7 µl	2,3 µl
vz. č. 6	8 µl	16,5 µl	0,5 µl
vz. č. 7	8 µl	15 µl	2 µl
vz. č. 8	8 µl	17 µl	- µl
	Master mix B		
vz. č. 1	8 µl MM	16 µl vody	0,79 µl DNA
vz. č. 2	8 µl	14,73 µl	2,27 µl
vz. č. 3	8 µl	15,65 µl	1,35 µl
vz. č. 4	8 µl	9,4 µl	7,6 µl
vz. č. 5	8 µl	14,7 µl	2,3 µl
vz. č. 6	8 µl	16,5 µl	0,5 µl
vz. č. 7	8 µl	15 µl	2 µl
vz. č. 8	8 µl	17 µl	- µl

Výsledky - první měření

Po provedení gelové elektroforézy jsem na gelu pod UV světlem neměla žádné produkty. Výsledky z prvního měření nebyly úspěšné. Bylo potřeba metodu PCR ARMS dále optimalizovat.

4.1.2 Druhé měření

Při druhém měření jsem použila PPP Master mix (firma Top-Bio), primery, PCR vodu, vyizolovanou DNA. Dále jsem na místo vyizolované DNA použila pro jeden vzorek komerčně dodávanou referenční mužskou DNA (Human Reference DNA Male, Agilent), abych vyloučila chybu v izolaci DNA. Pro toto měření byl připraven master mix A a master mix B, každý master mix byl připraven na tři vzorky (tab. 10). Master mixy jsem rozpipetovala do zkumavek a přidala příslušné množství DNA a PCR vody (tab. 11).

Tabulka č. 10: Master mix A pro 3 vzorky a master mix B také pro 3 vzorky

Reagencie	Master mix A	Reagencie	Master mix B
PPP MM	43,75 μ l	PPP MM	43,75 μ l
AB	2,8 μ l	AB	2,8 μ l
AB	2,8 μ l	AB	2,8 μ l
AB	2,8 μ l	AB	2,8 μ l
A	2,8 μ l	B	2,8 μ l
A	2,8 μ l	B	2,8 μ l

Tabulka č. 11: Reakční PCR mixy pro 6 vzorků při druhém měření

	Master mix A		
vz. č. 1	16,5 μ l MM	5,5 μ l PCR vody	3 μ l DNA (22 ng/ μ l)
vz. č. 2	16,5 μ l MM	5,5 μ l PCR vody	3 μ l DNA (21 ng/ μ l)
vz. č. 3	16,5 μ l MM	5,5 μ l PCR vody	3 μ l referenční DNA (100 ng/ μ l)
	Master mix B		
vz. č. 1	16,5 μ l MM	5,5 μ l PCR vody	3 μ l DNA (22 ng/ μ l)
vz. č. 2	16,5 μ l MM	5,5 μ l PCR vody	3 μ l DNA (21 ng/ μ l)
vz. č. 3	16,5 μ l MM	5,5 μ l PCR vody	3 μ l referenční DNA (100 ng/ μ l)

Výsledky - druhé měření

V druhém měření jsem použila PPP Master mix. Výsledky taktéž nebyly úspěšné, metodu PCR ARMS jsem nadále optimalizovala.

4.1.3 Třetí měření

Provedení třetího měření bylo podobné druhému měření. Na základě druhého měření jsem se rozhodla vynechat kontrolu, primery pro kontrolní produkt (F a R) jsem nahradila stejným množstvím PCR vody. Ostatní reagentie byly stejné jako při druhém měření. Každý master mix byl připraven na tři vzorky (tab. 12). Taktéž jako v předcházejícím měření jsem master mixy rozpipetovala do mini zkumavek a přidala dané množství DNA a PCR vody (tab. 13).

Tabulka č. 12: Změna v reagentiích pro master mix A a master mix B

Reagentie	Master mix A	Reagentie	Master mix B
PPP MM	43,75 µl	PPP MM	43,75 µl
PCR voda	2,8 µl	PCR voda	2,8 µl
PCR voda	2,8 µl	PCR voda	2,8 µl
AB	2,8 µl	AB	2,8 µl
A	2,8 µl	B	2,8 µl
A	2,8 µl	B	2,8 µl

Tabulka č. 13: Reakční PCR mixy pro 6 vzorků při třetím měření

	Master mix A		
vz. č. 1	16,5 µl MM	7,71 µl PCR vody	0,79 µl DNA (63 ng/µl)
vz. č. 2	16,5 µl MM	8 µl PCR vody	0,56 µl DNA (89 ng/µl)
vz. č. 3	16,5 µl MM	5,5 µl PCR vody	3 µl referenční DNA (100 ng/µl)
	Master mix B		
vz. č. 1	16,5 µl MM	7,71 µl PCR vody	0,79 µl DNA (63 ng/µl)
vz. č. 2	16,5 µl MM	8 µl PCR vody	0,56 µl DNA (89 ng/µl)
vz. č. 3	16,5 µl MM	5,5 µl PCR vody	3 µl referenční DNA (100 ng/µl)

Výsledky - třetí měření

Výsledky z třetího měření nebyly optimální. Metodu jsem nadále optimalizovala.

4.1.4 Čtvrté měření

Postup přípravy master mixů a množství (objem) reagensů pro jeden vzorek u čtvrtého měření bylo stejné jako u prvního měření. Při čtvrtém měření jsem změnila reagenty, změna se týkala především pufru a polymerázy. Puffer, který jsem v tomto měření použila, nesl název: Thermo Scientific 10X Dream Taq Buffer (includes 20 mM $MgCl_2$). Změněná polymeráza nesla název: Thermo Scientific Dream Taq DNA Polymerase.

Při tomto měření nebyla použita vyizolovaná DNA ale byla použita jen mužská a ženská referenční DNA. Každý master mix byl připraven na čtyři vzorky (tab. 14). Master mixy jsem následně rozpipetovala do zkumavek a přidala příslušné množství referenční DNA a PCR vody (tab. 15).

Pro neúspěch v předchozích měřeních jsem změnila teplotní profil v termocykleru. Změna se týkala teploty v annealingu a času v extenzi. Provedené změny jsou tučně zvýrazněné (tab. 16).

Tabulka č. 14: Master mix A pro 4 vzorky a master mix B také pro 4 vzorky

Reagencie	Master mix A	Reagencie	Master mix B
pufr	11,25 μ l	pufr	11,25 μ l
dATP	4,5 μ l	dATP	4,5 μ l
dCTP	4,5 μ l	dCTP	4,5 μ l
dGTP	4,5 μ l	dGTP	4,5 μ l
dTTP	4,5 μ l	dTTP	4,5 μ l
primery: AB	3,6 μ l	primery: AB	3,6 μ l
AB	3,6 μ l	AB	3,6 μ l
AB	3,6 μ l	AB	3,6 μ l
A	3,6 μ l	B	3,6 μ l
A	3,6 μ l	B	3,6 μ l
polymeráza	2,25 μ l	polymeráza	2,25 μ l

Tabulka č. 15: Reakční PCR mixy pro 8 vzorků při čtvrtém měření

Master mix A			
vz. č. 1	9 µl MM	14 µl PCR vody	2 µl DNA (žena) (100 ng/µl)
vz. č. 2	9 µl MM	15 µl PCR vody	1 µl DNA (žena) (100 ng/µl)
vz. č. 3	9 µl MM	14 µl PCR vody	2 µl DNA (muž) (100 ng/µl)
vz. č. 4	9 µl MM	15 µl PCR vody	1 µl DNA (muž) (100 ng/µl)
Master mix B			
vz. č. 1	9 µl MM	14 µl PCR vody	2 µl DNA (žena) (100 ng/µl)
vz. č. 2	9 µl MM	15 µl PCR vody	1 µl DNA (žena) (100 ng/µl)
vz. č. 3	9 µl MM	14 µl PCR vody	2 µl DNA (muž) (100 ng/µl)
vz. č. 4	9 µl MM	15 µl PCR vody	1 µl DNA (muž) (100 ng/µl)

Tabulka č. 16: Změna v teplotním gradientu

	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Počáteční denaturace	95 °C	4 min	1
2	Denaturace	94 °C	45 s	35
3	Annealing	60 °C	45 s	
4	Extenze	72 °C	1 min	
5	Konečná extenze	72 °C	5 min	1
6	Chlazení	4 °C	15 min	1

Výsledky - čtvrté měření

Výsledky čtvrtého měření i po provedených změnách nebyly optimální. Metodu jsem nadále optimalizovala.

4.1.5 Páté měření

Při pátém měření jsem opět použila PPP Master mix, primery, PCR vodu, vyzolovanou DNA z krve. Zde se změna týkala především primerů. Použila jsem jen primer Arg 112, Arg 158 a Common primer. Z reagensí byl připraven jen jeden master mix, který byl připraven na šestnáct vzorků (tab. 17). Po přípravě jsem master mix rozpipetovala do zkumavek a přidala příslušné množství DNA a PCR vody (tab. 18).

Změna se také týkala v nastavení teploty v termocykleru. Nastavila jsem teplotní gradient annealingu na 50 °C/66 °C (tab. 19).

Tabulka č. 17: Master mix pro 16 vzorků

Reagencie	Master mix
PPP MM	206 µl
Arg 112	1,65 µl
Arg 158	3,3 µl
Common	16,5 µl

Tabulka č. 18: Reakční PCR mix pro 16 vzorků při pátém měření

	Master mix		
vz. č. 1	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 2	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 3	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 4	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 5	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 6	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 7	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 8	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 9	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 10	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)

vz. č. 11	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 12	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 13	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 14	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 15	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)
vz. č. 16	14,2 µl MM	10,5 µl PCR vody	0,5 µl DNA (160 ng/µl)

Tabulka č. 19: Změna v teplotním gradientu

	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Počáteční denaturace	95 °C	4 min	1
2	Denaturace	94 °C	45 s	35
3	Annealing	50 °C/66 °C	45 s	
4	Extenze	72 °C	1 min	
5	Konečná extenze	72 °C	5 min	1
6	Chlazení	4 °C	15 min	1

Výsledky - páté měření

Jediný přívětivý výsledek byl u vzorku, který náležel šesté jamce v termocykleru. Tato jamka v teplotním gradientu byla nastavená na 53,4 °C. Výsledný pruh byl mírně „rozmazaný“, metodu jsem nadále optimalizovala.

4.1.6 Šesté měření

Postup přípravy master mixů a složení reagensů bylo takové, že jsem vynechala kontrolní primery (Control F, Control R). Použila jsem PPP Master mix, PCR vodu, vyizolovanou DNA a příslušné primery. Každý master mix byl připraven na čtyři vzorky (tab. 20). Oba master mixy jsem rozpipetovala do zkumavek a přidala určité množství DNA a PCR vody (tab. 21).

Změna se opět týkala termocykleru. Po předchozí úpravě teplotního gradientu se nejlépe osvědčila teplota 53,4 °C. Proto jsem se rozhodla tuto teplotu nastavit v příslušném měření (tab. 22).

Tabulka č. 20: Změna v reagenciích pro master mix A a master mix B

Reagencie	Master mix A	Reagencie	Master mix B
PPP MM	56,25 µl	PPP MM	56,25 µl
AB	3,6 µl	AB	3,6 µl
A	3,6 µl	B	3,6 µl
A	3,6 µl	B	3,6 µl

Tabulka č. 21: Reakční PCR mixy pro 8 vzorků při šestém měření

	Master mix A		
vz. č. 1	14,9 µl MM	9,31 µl PCR vody	0,79 µl DNA (63 ng/µl)
vz. č. 2	14,9 µl MM	8,75 µl PCR vody	1,35 µl DNA (37 ng/µl)
vz. č. 3	14,9 µl MM	4,6 µl PCR vody	5,5 µl DNA (6,5 ng/µl)
vz. č. 4	14,9 µl MM	9,54 µl PCR vody	0,56 µl DNA (89 ng/µl)
	Master mix B		
vz. č. 1	14,9 µl MM	9,31 µl PCR vody	0,79 µl DNA (63 ng/µl)
vz. č. 2	14,9 µl MM	8,75 µl PCR vody	1,35 µl DNA (37 ng/µl)
vz. č. 3	14,9 µl MM	4,6 µl PCR vody	5,5 µl DNA (6,5 ng/µl)
vz. č. 4	14,9 µl MM	9,54 µl PCR vody	0,56 µl DNA (89 ng/µl)

Tabulka č. 22: Změna v teplotním gradientu

	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Počáteční denaturace	95 °C	4 min	1
2	Denaturace	94 °C	45 s	35
3	Annealing	53,4 °C	45 s	
4	Extenze	72 °C	1 min	
5	Konečná extenze	72 °C	5 min	1
6	Chlazení	4 °C	15 min	1

Výsledky - šesté měření

I po změně teploty v annealingu všech jamek na 53,4 °C výsledek nebyl optimální. Výsledné pruhy byly „rozmazané“ a navíc se na gelu objevovaly kratší nespecifické produkty. Pro úplné dosažení cíle by bylo potřeba zabývat se optimalizací delší dobu. Z časového důvodu jsem již po dohodě s vedoucím práce nemohla optimalizaci zcela dokončit. Pro splnění čtvrtého cíle (vyšetření několika vzorků a určení genotypu) jsem zvolila komerčně dodávaný kit na principu PCR a následné detekci pomocí reverzní hybridizace na stripech.

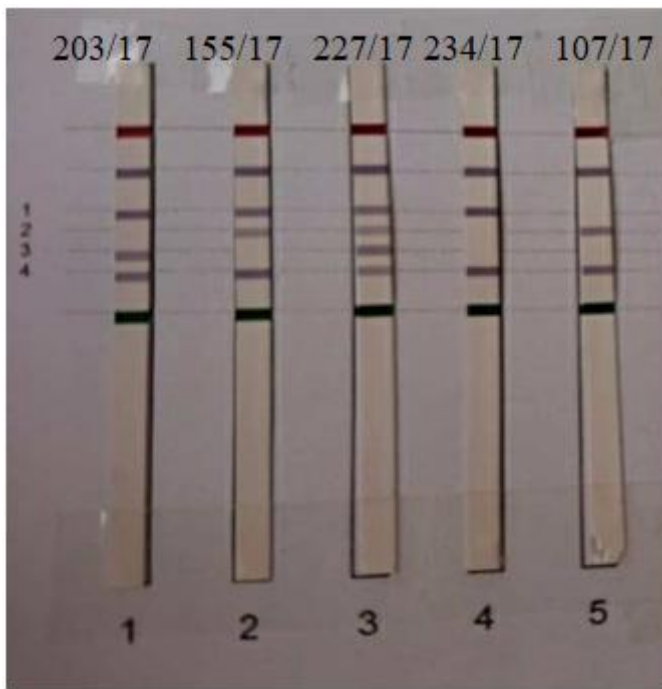
4.2 Výsledky reverzní hybridizace

Před samotnou reverzní hybridizací jsem provedla kontrolu produktů PCR na 3% agarózovém gelu. Pro kontrolu jsem použila vzorky (203/17, 155/17, 227/17, 234/17, 107/17), které mi poskytla laboratoř GENLABS s.r.o. (obr. 5).

Vyhodnocení pěti vzorků metodou reverzní hybridizace jsou následující: vzorek 203/17 = E2/E3 (heterozygot), vzorek 155/17 = E3/E4 (heterozygot), vzorek 227/17 = E2/E4 (heterozygot), vzorek 234/17 = E3/E3 (nemutovaný homozygot = wild type), vzorek 107/17 = E4/E4 (mutovaný homozygot) (obr. 6).



Obrázek č. 5: Kontrola produktů PCR



Obrázek č. 6: Výsledky pěti vzorků pomocí reverzní hybridizace na stripech

5 Diskuze

V praktické části bakalářské práce jsem vyšetřovala polymorfismus genu *ApoE*. Pro toto vyšetření jsem zvolila dvě na sobě nezávislé metody.

První metoda byla založená na PRC ARMS, kde bylo vyšetřeno několik vzorků. Jednalo se o vzorky z bukálních stěrů odebraným anonymním osobám, kteří souhlasili s odběrem. Výtěr z vnitřní strany úst je neinvazivní metoda, která je velmi jednoduchá a pro pacienta přívětivá. Jednalo se o osoby blízké a rodinu, kteří si výtěr provedli v pohodlí svého domova. Jelikož metoda PCR ARMS nebyla optimalizovaná, zvolila se druhá metoda, která byla založená na reverzní hybridizaci na stripech. Pro tuto metodu byl použit certifikovaný CVD StripAssay® Kit od firmy ViennaLab, který obsahoval určitý počet testovacích proužků. Vyizolovaná DNA, která byla pro toto měření použita, mi byla poskytnutá laboratoří GENLABS s.r.o.

Zajímavé je srovnání těchto dvou metod z finanční a časové stránky. Metoda PCR ARMS byla z časové stránky náročnější než zmiňovaná druhá metoda. Optimalizace metody byla zdlouhavá, i po několika měření nebyla úspěšně optimalizována. Změny v této metodě se především týkaly reagensů a jejich poměrů či úpravy teplotního profilu v termocykleru.

Co se týká finanční stránky, jedná se o velmi levnou metodu. Reagencie, které byly použity v metodě PCR ARMS nebyly finančně náročné a taktéž se daly použít pro více měření.

Opakem tomu bylo u reverzní hybridizace, kde se použil komerčně dodávaný kit, který obsahoval přesný počet testovacích proužků. Tato metoda byla z časové stránky přívětivá a rychlá. Na úkor přesnosti byla metoda velmi drahá.

Stručně shrnuto metoda PCR ARMS byla levnou záležitostí, ačkoliv výsledky nebyly dobře interpretovatelné. Naopak reverzní hybridizace byla dražší, ale výsledky byly přesné.

6 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo napsat odbornou rešerši na dané téma a shrnout informace o Alzheimerově chorobě.

V teoretické části bakalářské práce jsem se zabývala neurodegenerativním onemocněním, demencí a Alzheimerovou chorobou. Především jsem se zaměřila na příznaky, fáze, příčiny, léčbu, diagnostiku a genetické dispozice ACH. Shrnula jsem informace o genu *ApoE*, který u ACH hraje významnou roly. Taktéž jsem se zaměřila na polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a reverzní hybridizaci na stripech, které jsem v práci blíže popsala.

V praktické části jsem prokazovala zvládnutí molekulárně biologických metod. Mým úkolem bylo provedení izolace DNA z bukalního stěru, precipitace DNA, příprava a provedení polymerázové řetězové reakce, detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy, amplifikace DNA, hybridizace, promývání a barvení.

K vyšetření *ApoE* byly zvoleny dvě metody. Jako první metoda byla zvolena PCR ARMS, kterou se mi nepovedlo optimalizovat. Druhou metodou byla reverzní hybridizace na stripech. K analýze *ApoE* genu pro reverzní hybridizaci byl zvolen komerčně dodávaný kit StripAssay® od firmy ViennaLab. Bylo vyšetřeno pět vzorků, kde tři z nich byly heterozygoti (E2/E3, E3/E4, E2/E4), jeden nemutovaný homozygot = wild type (E3/E3) a jeden mutovaný homozygot (E4/E4).

Dovoluji si uvést, že cíle této bakalářské práce byly splněny.

7 Seznam literatury

1. APOE gene, 2018. *Genetics Home Reference* [online]. [cit. 2018-03-10]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/APOE#location>
2. ČESKÁ ALZHEIMEROVSKÁ SPOLEČNOST, O.P.S., 2015. : *Jedná se o Alzheimerovu chorobu? Deset příznaků, které by Vás měly varovat* [online]. [cit. 2017-10-29]. Dostupné z: <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/priznaky/>
3. ČÍTEK, J., 2014. *Vybrané návody k laboratorním cvičením z molekulární biologie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-443-8.
4. DACKS, P., 2016. *Cognitive Vitality: What APOE Means for Your Health* [online]. [cit. 2017-11-22]. Dostupné z: <https://www.alzdiscovery.org/cognitive-vitality/blog/what-apoe-means-for-your-health>
5. FIŠAR, Z., 2001. *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. Praha: Grada. Psyché (Grada). ISBN 80-247-0061-1.
6. ŠÍPEK, A., 2014. *Genetika - Biologie: Alely* [online]. [cit. 2018-03-10]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/alely>
7. GREEN, Michael R. a Joseph. SAMBROOK, c2012. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 19-361-1342-2.
8. HADRAVA, L., 2010. *Alois Alzheimer – dal jméno nemoci, kterou doposud nikdo nedokáže vyléčit* [online]. [cit. 2017-10-28]. Dostupné z: <http://www.ceskatelevize.cz/ct24/svet/1296738-alois-alzheimer-dal-jmeno-nemoci-kterou-doposud-nikdo-nedokaze-vylecit>
9. HAMER, D., COPELAND P., 2003. *Geny a osobnost: biologické základy psychiky člověka*. Praha: Portál. ISBN 80-717-8779-5.
10. HOLMEROVÁ, I., 2002. *Jde o Alzheimerovu chorobu?: Tipy a informace pro příbuzné a další zájemce*. Česká alzheimerovská společnost. Praha. ISBN 80-86541-06-1.
11. HOSÁK, L. et al., 2015. *Psychiatrie a pedopsychiatrie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2998-8.

12. HORÁČEK, J., MOTLOVÁ, L., 1999. Neurodegenerativní onemocnění: Od molekulární genetiky k léčbě. *Vesmír* [online]. **78**, **307**(6), 307-309 [cit. 2018-03-10]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-6/neurodegenerativni-onemocneni.html>
13. KAFKA, J. et al., 1993. *Psychiatria: Učeb. pre lek. fak.* Martin: Osveta. ISBN 80-217-0514-0.
14. KUČEROVÁ, H., 2006. *Demence v kazuistikách.* Praha: Grada. Psyché (Grada). ISBN 80-247-1491-4.
15. LOVE, Russell J. a Wanda G. WEBB, 2009. *Mozek a řeč: neurologie nejen pro logopedy.* Praha: Portál. ISBN 978-80-7367-464-9.
16. MANUKYAN, A., JIRÁK, R., 2015. VZTAHY MEZI NĚKTERÝMI GENETICKÝMI POLYMORFISMY A KLINICKÝMI RYSY U ALZHEIMEROVY CHOROBY. *Česká a Slovenská psychiatrie* [online]. Praha: Galén, **111**(5), 236-240 [cit. 2018-03-10]. ISSN 1212-0383. Dostupné z: <http://www.cspsychiatr.cz/detail.php?stat=1037>
17. MARRZOQ, Lamia F.Abu., Fadel A. SHARIF, Abdalla A. ABED, 2011. Relationship between ApoE gene polymorphism and coronary heart disease in Gaza Strip. *Journal of Cardiovascular Disease Research* [online]. **2**(1), 29-35 [cit. 2018-03-11]. DOI: 10.4103/0975-3583.78584. ISSN 09753583. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3120269/>
18. NEVŠÍMALOVÁ, S., 2014. *Postgraduální medicína: Vzácná onemocnění mozku: vybrané neurodegenerativní a neurometabolické poruchy* [online]. [cit. 2017-11-22]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/vzacna-onemocneni-mozku-vybrane-neurodegenerativni-a-neurometabolicke-poruchy-473578>
19. PREISS, M., PŘIKRYLOVÁ KUČEROVÁ, H., 2006. *Neuropsychologie v neurologii.* Praha: Grada. Psyché (Grada). ISBN 80-247-0843-4.
20. PUSTINA, J., 2014. *O psychologii: Seznamte se, Alzheimerova choroba* [online]. [cit. 2017-10-28]. Dostupné z: <http://www.opsychologii.cz/clanek/9-seznamte-se-alzheimerova-choroba/>
21. RILEY, M., 2014. *BERNARD BECKER MEDICAL LIBRARY: The art of Alois Alzheimer and Gaetano Perusini* [online]. [cit. 2018-03-11]. Dostupné z: <https://becker.wustl.edu/about/news/art-alois-alzheimer>

22. SEIDL, Z., OBENBERGER, J., 2004. *Neurologie pro studium i praxi*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0623-7.
23. SEIDL, Z., 2008. *Neurologie pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2733-2.
24. SEIDL, Z., 2015. *Neurologie pro studium i praxi*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-5247-1.
25. SRŠEŇ, Š., SRŠŇOVÁ, K., 2005. *Základy klinické genetiky a jej molekulárna podstata*. 4. Martin: Osveta. ISBN 80-8063-185-9.
26. ŠÍPEK, A., 2010. *Gate2Biotech: Nový objev v genetice Alzheimerovy choroby* [online]. [cit. 2017-11-22]. ISSN 1802-2685. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/novy-objev-v-genetice-alzheimerovy-choroby/>
27. ŠÍPEK, A., 2014. *Gate2Biotech: Genetické varianty zvyšující riziko Alzheimerovy choroby* [online]. [cit. 2017-11-22]. ISSN 1802-2685. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/geneticke-varianty-zvysujici-riziko-alzheimerovy-choroby/>
28. ŠMARDA, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
29. ŠŤASTNÝ, F., 2007. Alois Alzheimer: příběh jedné nemoci: Stinné stránky dlouhověkosti. *Vesmír* [online]. **86**, **251**(4), 251-253 [cit. 2018-03-11]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2007/cislo-4/alois-alzheimer-pribeh-jedne-nemoci.html>
30. TYRLÍKOVÁ, I., 1999. *Neurologie pro sestry*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-701-3287-6.
31. VIENNALAB, 2015. *Apo E StripAssay*® [online]. [cit. 2018-03-11]. Dostupné z: http://www.viennalab.com/products/genetic_predispositions/apo-e_stripassay
32. ZEMÁNEK, M., 2009. *Imalab: ApoE polymorfismus (E2, E3, E4)* [online]. [cit. 2017-11-22]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/187-apoe-polymorfismus-e2-e3-e4.aspx>
33. ZENDE, P. D., 2013. Apolipoprotein E Gene Polymorphism And Its Effect On Plasma Lipids In Arteriosclerosis. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. **7**(10), 2149-2152. DOI: 10.7860/JCDR/2013/6195.3455. ISSN 2249782X.

34. ZIMA, T., 2007. *Laboratorní diagnostika. 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-372-3.
35. ZORNÍKOVÁ, G., 2012. *ChemPoint: Využití polymerázové řetězové reakce (PCR) pro detekci probiotických mikroorganismů* [online]. Brno [cit. 2017-11-22]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-polymerazove-retezove-reakce-pcr-pro-detekci-probiotickych-mikroorganismu>
36. ZVONÍKOVÁ, A. et al., 2010. *Základy posuzování invalidity.* Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3535-1.

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Alois Alzheimer	14
Obrázek č. 2: Poloha ApoE na chromozomu 19	21
Obrázek č. 3: Proces PCR	24
Obrázek č. 4: Šest možných homozygotních a heterozygotních genotypů ApoE.....	39
Obrázek č. 5: Kontrola produktů PCR	50
Obrázek č. 6: Výsledky pěti vzorků pomocí reverzní hybridizace na stripech.....	51
Tabulka č. 1: Sekvence primerů pro <i>ApoE</i> od výrobce Generi Biotech	34
Tabulka č. 2: Délka PCR produktu (bp).....	34
Tabulka č. 3: Jednotlivé primery pro master mix A a master mix B	35
Tabulka č. 4: Teplotní profil PCR ARMS pro <i>ApoE</i>	36
Tabulka č. 5: Výsledné koncentrace DNA z bukalních stěrů	40
Tabulka č. 6: Vzorky a jejich koncentrace poskytnuté laboratoří GENLABS s.r.o.	40
Tabulka č. 7: Master mix A pro 1 vzorek a master mix B také pro 1 vzorek	41
Tabulka č. 8: Použité množství DNA a PCR vody pro master mix A a master mix B. 41	
Tabulka č. 9: Reakční PCR mixy pro gen <i>ApoE</i> při prvním měření.....	42
Tabulka č. 10: Master mix A pro 3 vzorky a master mix B také pro 3 vzorky.....	43
Tabulka č. 11: Reakční PCR mixy pro 6 vzorků při druhém měření.....	43
Tabulka č. 12: Změna v reagentiích pro master mix A a master mix B.....	44
Tabulka č. 13: Reakční PCR mixy pro 6 vzorků při třetím měření	44
Tabulka č. 14: Master mix A pro 4 vzorky a master mix B také pro 4 vzorky	45
Tabulka č. 15: Reakční PCR mixy pro 8 vzorků při čtvrtém měření.....	46
Tabulka č. 16: Změna v teplotním gradientu	46
Tabulka č. 17: Master mix pro 16 vzorků	47
Tabulka č. 18: Reakční PCR mix pro 16 vzorků při pátém měření	47
Tabulka č. 19: Změna v teplotním gradientu	48
Tabulka č. 20: Změna v reagentiích pro master mix A a master mix B.....	49
Tabulka č. 21: Reakční PCR mixy pro 8 vzorků při šestém měření	49
Tabulka č. 22: Změna v teplotním gradientu	49

Seznam zkratek

ACH	Alzheimerova choroba
<i>ApoE</i>	Apolipoprotein E
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PSEN	Presenilin
MMSE	Mini Mental State Exam
DNA	deoxyribonukleová kyselina
APP	Amyloid precursor protein
SDAT	Senilní demence Alzheimerova typu
ČALS	Česká alzheimerovská společnost
CT	computed tomography (počítačová tomografie)
MRI	magnetic resonance imaging (magnetická rezonance)
PET	pozitronová emisní tomografie
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie
ATP	adenosintrifosfát
VLDL	very low-density lipoprotein (velmi nízkodenzitní lipoprotein)
HDL	high density lipoprotein (vysokodenzitní lipoprotein)
LDL	low density lipoprotein (nízkodenzitní lipoprotein)
IDL	intermediate density lipoprotein (lipoprotein o střední hustotě)
TAG	triacylglyceroly
FAD	familiární Alzheimerova choroba
E2, E3, E4	izoformy
q	dlouhé rameno chromozomu
dNTPs	směs deoxynukleosidtrifosfátů
H_2O	voda
RT-PCR	reverse transcription-PCR (reverzní transkripční PCR)
AS-PCR	allele-specific PCR (alelově-specifická PCR)
ASA	alelově specifická amplifikace
mRNA	messenger RNA
COP	kompletní připojení oligonukleotidu
HLA	Human leucocyte antigen (hlavní histokompatibilní komplex)
UV	ultrafialové záření

VIS	viditelné záření
CNS	centrální nervová soustava
ARMS	amplification-refractory mutation system (amplifikační refrakční mutační systém)
°C	stupeň Celsia
tzv.	takzvaně
např.	například
obr.	obrázek
tab.	tabulka