



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Sekvenční analýza genu pro LDL receptor

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Denisa Mašková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Sekvenční analýza genu pro LDL receptor jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů 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 jejích 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 bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za odbornou pomoc jak s teoretickou, tak praktickou částí. Dále bych chtěla poděkovat Nemocnici České Budějovice, a.s. a Ing. Petře Duškové za poskytnutí a přípravu vzorků a primerů. A nakonec Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích za možnost realizace praktické části v laboratoři.

Sekvenční analýza genu pro LDL receptor

Abstrakt

Receptoru pro LDL (low density lipoprotein) je věnována v současné době pozornost. Byl objeven až v roce 1985 Goldsteinem a Brownem, kteří objevili jeho funkci a patogenezi familiární hypercholesterolemie. Receptor poskytuje buňce dostatek cholesterolu, který je nutný k syntéze membrán a slouží i jako prekurzor některých produktů buňky (např. žlučových kyselin a sterolů) (Aschermann et al., 2004). Mutace postihující gen pro LDL receptor (*LDLR*) značí poruchu funkce LDLR (Češka, 2005). Důsledkem poruchy je zvýšená koncentrace LDL-cholesterolu v plazmě a s tím související brzký rozvoj aterosklerózy a dalších poruch (Khan, 2014)

Tato bakalářská práce se zabývá analýzou genu *LDLR*. Gen se nachází na krátkých ramenech 19. chromozomu v oblasti 13.2, analyzován byl pouze exon 15. Identifikace mutací v genu *LDLR* byla provedena Sangerovým sekvenováním. Získané sekvence byly zpracovány v programu BioEdit a srovnány s mezinárodní databází NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Metodická část byla provedena na souboru 15 anonymizovaných vzorků DNA, u kterých byla nalezena jedna patogenní mutace (c.2253_2256dupGCTG) způsobující familiární hypercholesterolemii, jedna pravděpodobně benigní mutace (c.2225C>T), nejčastěji se vyskytovala benigní mutace (c.2232A>G) a byla nalezena i mutace v oblasti intronu. Pouze jeden vzorek byl bez mutace.

Klíčová slova

LDLR; familiární hypercholesterolemie; PCR; Sangerovo sekvenování; NCBI

Sequential analysis of the LDL receptor gene

Abstract

Attention is currently being paid to the LDL (low density lipoprotein) receptor. It was discovered in 1985 by Goldstein and Brown who discovered its function and pathogenesis of familial hypercholesterolemia. The receptor gives a cell enough cholesterol essential to membrane synthesis and attend as a precursor to some products of cells (for example bile acids and sterols) (Ashermann et al., 2004). The mutation that affect the LDL receptor (*LDLR*) gene indicate some disorder of LDLR functions (Češka, 2005). The result of the disorders are increased of plasma LDL cholesterol and the associated early development of atherosclerosis and other disorders (Khan, 2014).

This bachelor thesis deals with the analysis of the *LDLR* gene. The gene is located on the short arms of chromosome 19 in region 13.2, only exon 15 was analyzed. Identification of mutations in the *LDLR* gene was performed by Sanger sequencing. The sequences were processed in EditBio program and compared with the NCBI (National Center for Biotechnology Information).

The methodical part was performed on a set of 15 anonymized DNA samples in which one pathological mutation (c.2253_2256dupGCTG) was found causing familial hypercholesterolemia, one probably benign (c.2225C>T), the most frequent was benign mutation (c.2232A>G) and one mutation in the intron was also found. Only one sample was without mutation.

Key words

LDLR; familial hypercholesterolemia; PCR; Sanger sequencing; NCBI

Obsah

1	LDL receptor	9
1.1	Cholesterol	9
1.1.1	HDL	10
1.1.2	VLDL	10
1.1.3	LDL	11
1.2	LDL receptory	12
1.3	Dráha LDLR	12
1.4	Objevení LDLR	13
1.5	Genová rodina LDLR	14
1.5.1	LRP1	15
1.5.2	LRP2 (Megalin)	15
1.5.3	LR32 (LRP1B)	15
1.6	Hyperlipoproteinémie (HLP)	16
1.6.1	Primární hyperlipoproteinémie	16
1.6.2	Sekundární hyperlipoproteinémie	20
1.7	Ateroskleróza	20
1.7.1	Vznik ateromového plátu	21
1.7.2	Rizikové faktory aterosklerózy	22
1.8	Terapie hyperlipoproteinemií	23
1.8.1	Dietní a režimová opatření	23
1.8.2	Farmakoterapie	23
1.8.3	Metody extrakorporální eliminace lipoproteinů	23
2	PCR (Polymerase Chain Reaction)	25
2.1	Analýza PCR produktu	27
2.2	Druhy PCR	27

2.3	Výhody a omezení PCR.....	28
3	Sekvenování DNA	29
3.1	Maxam-Gilbertova metoda	29
3.2	Sangerova metoda.....	29
4	Cíle práce	31
5	Metodika	32
5.1	Potřebné vybavení.....	32
5.2	Izolace DNA z bukalního stěru.....	32
5.3	Precipitace DNA	34
5.4	Měření koncentrace vzorků DNA.....	34
5.5	Metoda PCR.....	35
5.6	Elektroforéza PCR produktů.....	36
5.7	Enzymatické čištění PCR produktů	37
5.8	Příprava vzorků na sekvenaci	38
5.9	Sekvenační PCR reakce	38
5.10	Přečištění sekvenčního produktu a sekvenování.....	39
6	Výsledky	41
6.1	Měření koncentrace vyizolovaných vzorků DNA	41
6.2	Optimalizace metody PCR.....	42
6.3	Měření koncentrace před sekvenací.....	42
6.4	Identifikace mutací	43
7	Diskuze.....	46
8	Závěr	47
9	Seznam literatury	48

Úvod

Gen pro LDL receptor nám vytváří v těle protein zvaný LDL receptor, který na sebe váže pomocí apolipoproteinu-B-100 LDL částice. Receptor najdeme na povrchu buněk (nejvíce se vyskytuje na hepatocytech), kde zachycuje LDL částice cirkulující v krevním řečišti a transportuje je dovnitř buňky prostřednictvím endocytózy. Částice jsou uvnitř buňky disociovány enzymy, a tak dochází k jejich degradaci na apolipoproteiny a k uvolňování na volné mastné kyseliny a cholesterol. Ten je buňkou buď okamžitě využit třeba k syntéze membrán, nebo uložen. Receptor je po zbavení se LDL částice opět využit na povrchu buňky k navázání jiné. Syntéza LDL receptoru je regulována hladinou intracelulárního cholesterolu.

Porucha v genu pro LDL receptor může pak způsobit poruchu syntézy receptorů, poruchu transportu receptoru na povrch buňky nebo třeba poruchu vazby částice na receptor. Důsledkem těchto defektů je nadměrná hladina lipidů a lipoproteinů v krvi. Tyto poruchy se nazývají hyperlipoproteinémie nebo dyslipoproteinémie, z nichž nejznámější je familiární hypercholesterolemie. Právě díky zvýšeným hladinám lipidových částic (hlavně LDL-cholesterolu) jsou pacienti ohroženi předčasnou aterosklerózou a s tím související ischemickou chorobou srdeční a infarktem myokardu.

1 LDL receptor

Gen pro low-density lipoprotein receptor (*LDLR*) nám vyrábí protein zvaný LDLR, který se váže na lipoproteiny o nízké hustotě (LDL). Tyto lipoproteiny jsou primárními nosiči cholesterolu v krvi (Defesche, 2004). Proto je LDLR důležitý pro udržení zpětné regulace homeostázy cholesterolu (Cooper, 2003).

Po zprostředkované endocytóze LDL receptoru odvozený low-density lipoprotein (LDL) cholesterol a jeho intracelulárně generované oxidované deriváty zprostředkovávají komplexní řadu mechanismů zpětné vazby, která chrání buňku před nadměrnou akumulací cholesterolu. Tento proces se nazývá dráha LDLR (Cooper, 2003). Základním funkcí LDLR je tedy poskytnout buňce určité množství cholesterolu, které je potřeba k syntéze membrán a je prekurzorem různých buněčných produktů (žlučových kyselin, steroidů). Největší počet receptorů, které můžeme prokázat na všech buňkách, se nachází v játrech, gonádách a nadledvinách (Češka, 2005).

Gen pro LDLR se nachází na 19. chromozomu a skládá se z 18 exonů (Südhof et al., 1985).

1.1 Cholesterol

Je to lipid, který se skládá ze čtyř benzenových jader a hydroxylové skupiny (Češka, 2005). Spolu s mastnými kyselinami, fosfolipidy, triglyceridy a v menším množství se vyskytujícími lipidy (např. steroidní hormony a vitamíny rozpustné v tucích) se nachází v krevní plazmě. Zvýšená koncentrace lipidů v plazmě, zjm. cholesterolu, je příčinou související s patogenezí aterosklerózy, proces zodpovědný za většinu kardiovaskulárních onemocnění (cerebrovaskulární, koronární a periferní cévní choroby) (Marshall et. al, 2008).

Můžeme ho najít i ve tkáních, kde se vyskytuje volný, nebo v plazmě převážně vázaný na mastné kyseliny s dlouhým řetězcem jako ester cholesterolu (Češka, 2005). V tkáních je syntetizovaný z acetyl-CoA a z těla je vylučován žlučí ve formě cholesterolu nebo žlučových solí. Je to prekurzor všech ostatních steroidů v těle, kortikoidů, pohlavních hormonů, žlučových kyselin a vitamínu D (Marshall et. al, 2008). Zásobní cholesterol (intracelulární) tvoří estery cholesterolu s kyselinou palmitolejovou a olejovou (Češka, 2005).

Do organismu je přijímán zvenčí a je vstřebáván z gastrointestinálního traktu nebo je syntetizován z acetyl-CoA. Tento sled více než dvaceti chemických reakcí umí

zrealizovat jakákoliv buňka organismu (kromě erytrocytů). Většina cholesterolu je ale stejně tvořena v játrech a v tenkém střevě (Češka, 2005).

Má amfifilní charakter (molekuly obsahují část hydrofilní i hydrofobní), tudíž tvoří základní strukturu membrán a vnější vrstvy plazmatických lipoproteinů. Volný cholesterol je transportován lipoproteiny do krevního řečiště, tam je v rovnováze s cholesterolem ostatních lipoproteinů a membrán. Ve většině tkání tvoří zásobu estery cholesterolu. Ty jsou souhrnně převáděny hydrofobním jádrem lipoproteinů. LDL je prostředník, díky kterému jsou cholesterol i s jeho estery zachycovány do tkání. Pomocí HDL (high density lipoprotein) je volný cholesterol odváděn ze tkání a přenesen do jater, kde bude přeměněn na žlučové kyseliny. Cholesterol je hlavní součástí žlučových kamenů (Murray, 1998).

1.1.1 HDL

High density lipoprotein je syntetizován primárně v játrech a v malé míře v buňkách tenkého střeva, jako prekurzor skládající se z fosfolipidu, cholesterolu, apolipoproteinu E (ApoE), apolipoproteinu C (ApoC) a apolipoproteinu A (ApoA) (Marshall et. al, 2008). HDL vzniklý v játrech obsahuje ApoC a ApoE a syntetizovaný ve střevě pouze ApoA. ApoC a E se syntetizují v játrech a jsou transportovány do HDL vzniklých ve střevech, až když střevní lipoproteiny doputují do plazmy (Murray, 1998).

HDL má dvě důležité funkce: je to zdroj apolipoproteinů pro chylomikrony a very low density lipoprotein (VLDL) a zprostředkovává zpětný transport cholesterolu. Přijme cholesterol ze stárnoucích buněk a ostatní lipoproteiny a transportuje vše do zbytků částic, které jsou převzaty játry. Cholesterol je vylučován játry ve žluči a to jak cholesterol volný, tak esterifikovaný a tam zmetabolizuje na žlučovou kyselinu (Marshall et. al, 2008).

1.1.2 VLDL

Vytváří se z triglyceridů syntetizovaných v játrech buď *de novo*, nebo reesterifikací z volných mastných kyselin. VLDL také obsahuje cholesterol, ApoB, ApoC a ApoE. VLDL je hlavním přepravcem endogenních triglyceridů a ty jsou pak z něj odstraněny působením enzymu LPL (lipoprotein lipase). Tak jako se VLDL částice zmenšují, tak fosfolipidy, volný cholesterol a apolipoproteiny jsou uvolňovány z povrchu VLDL a převzaty HDL. Tím se převede VLDL na hustší částice (IDL – intermediate density lipoprotein). Cholesterol transferovaný z HDL je esterifikován a vzniklý cholesteryl ester se vrátí do IDL výměnou za triglycerid (Marshall et al., 2008).

Více triglyceridů je odstraněno pomocí hepatické triglyceridové lipázy (nachází se na jaterních endoteliálních buňkách) a IDL je takto převeden do LDL (složeného hlavně z cholesteryl esterů, ApoB-100 a fosfolipidu). Některé IDL jsou převzaty játry prostřednictvím LDL receptorů (Murray, 1998). Tyto receptory jsou schopné vázat ApoB-100 a ApoE. Za normálních podmínek je v oběhu velmi málo IDL, protože jsou rychle odstraněny nebo převedeny na LDL (Marshall et al., 2008).

1.1.3 LDL

Většina LDL vzniká z VLDL a zbytek produkuje přímo játra (Murray, 1998). Pro vznik LDL částic je potřeba přítomnost ApoB-100, který slouží jako ligand s LDL receptorem (Češka, 2005). Může procházet spoji mezi kapilárními endoteliálními buňkami a připojit se tak k LDL receptorům na buněčné membráně, která rozpoznává ApoB-100. To je následováno internalizací a lysozomální degradací a spojené s uvolňováním volného cholesterolu (Marshall et. al, 2008).

LDL částice transportují až 70 % veškerého množství cholesterolu v plazmě. Částice jsou velmi rizikové z důvodu předčasné aterosklerózy (Češka, 2005).

Základní funkcí je transport cholesterolu, zejm. do jater a také do ostatních tkání. Při odštěpení LDL částic hrají úlohu receptory, na které se LDL vážou prostřednictvím ApoB-100. LDL receptor má ale větší afinitu k ApoE, proto může být nazýván ApoB-100, E receptor (Češka, 2005).

Asi 80 % LDL je odbouráno pomocí LDL receptoru. Nejprve proběhne endocytóza, kde se lipoproteinová částice oddělí od LDL receptoru a v lysozomu proběhne intracelulární digesce (= trávení). Uvolněný cholesterol buňka dále využívá (Češka, 2005). Makrofágy odvozené od cirkulujících monocytů mohou přijmout LDL prostřednictvím scavengerových receptorů. Tento proces se vyskytuje u normální koncentrace LDL, ale je zesílen, když koncentrace stoupá a při modifikaci LDL (např. oxidaci). Absorpce LDL makrofágy v arteriální stěně je důležitá v patogenezi aterosklerózy. Když se makrofágy přetížují, cholesteryl estery jsou změněny na „pěnové buňky“ (foam cells) – klasické komponenty aterosklerotických plátů. U lidských novorozenců je koncentrace LDL v plazmě o hodně nižší než u dospělých a absorpce buněčného cholesterolu je pravděpodobně plně zprostředkována a kontrolována receptory. Koncentrace se během dětství zvyšuje a po pubertě se dostává na hladinu typickou pro dospělého (Marshall et al., 2008).

1.2 LDL receptory

Buněčná absorpce cholesterolu z LDL nastává při interakci LDL s LDL receptorem. A jediný apoprotein přítomný v LDL částicích je ApoB-100, který je pro interakci s receptorem vyžadován (Fry, 2010).

LDLR je polypeptid skládající se z 839 aminokyselin, které pokrývají plazmatickou membránu. Extracelulární část je zodpovědná za vazbu ApoB-100 a Apo-E a intracelulární část za shlukování LDL receptorů (Fry, 2010).

Když se LDL naváže na receptor, tak vzniklé komplexy rychle internalizují – endocytují. Protonová pumpa závislá na ATP snižuje pH v endozomech, což má za následek disociaci LDL z receptoru (receptor je opět využit v plazmatické membráně). Lysozomální enzymy degradují apoproteiny a uvolňují volné mastné kyseliny a cholesterol (Fry, 2010).

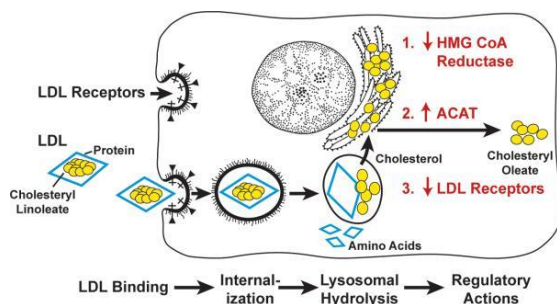
Hladina intracelulárního cholesterolu je regulována přes potlačování LDL receptoru a inhibici syntézy receptoru – obojí je indukované cholesterolem. Zvýšená hladina intracelulárního cholesterolu vedoucí k absorpci LDL má vliv ještě na aktivaci acyl-CoA cholesteryl acyl transferázy (ACAT), což umožňuje uskladnění přebytku cholesterolu uvnitř buněk. Ale efekt potlačení syntézy LDLR indukované cholesterolem snižuje rychlost s jakou jsou LDL a IDL odstraněny ze séra. To může vést k nadbytku cirkulující hladiny cholesterolu a cholesteryl esterů, když máme nadměrný příjem tuku a cholesterolu. Přebytek cholesterolu má tendenci se ukládat v kůži, šlachách a v tepnách, kde může vést k ateroskleróze (Fry, 2010).

Může ale dojít k různým poruchám LDLR, které rozdělujeme do čtyř základních tříd. Jako první můžeme řadit poruchu syntézy receptorů, dále poruchu transportu receptoru z endoplazmatického retikula na povrch buňky, poruchu vazby částic na LDLR a nakonec poruchu internalizace (Aschermann et al., 2004).

1.3 Dráha LDLR

Jediná buněčná organela, ve které může být LDL degradován je lysozom, jehož kyselé hydrolázy umí jednoduše vstřebávat všechny komponenty tohoto lipoproteinu. Lysozomální trávení probíhá pomocí chlorochinu, který zvyšuje pH lysozomů a inhibuje jejich enzymy. Vše bylo zjištěno díky studiím na nakultivovaných fibroblastech pacientů s genetickou deficiencí lysozomálních kyselých lipáz. Buňky pacientů vázaly a internalizovaly LDL, ale nedokázaly hydrolyzovat cholesterolové estery, přestože degradovali proteinovou složku (Goldstein a Brown, 2009).

Cholesterol vytvořený uvnitř lysozomu z LDL je odpovědný za potlačení aktivity HMG-CoA reductázy (3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzymu A reductázy). Tzn. cholesterol odvozený od LDL působí na několika úrovních: 1. potlačuje transkripci genu HMG-CoA reductázy prostřednictvím SREBP (sterol regulated element binding protein) a 2. urychluje degradaci tohoto enzymového proteinu (Goldstein a Brown, 2009).



Obrázek č. 1 - Dráha LDL receptoru. Převzato ze zdroje: (Goldstein a Brown, 2009)

Cholesterol odvozený od LDL také reguluje i ostatní procesy, které stabilizují cholesterol obsažený v buňkách. Aktivuje cholesterol esterifikující enzym Acetyl-CoA: ACAT, takže nadbytek cholesterolu může být uskladněn ve formě cholesterylesterových kapiček v cytoplasmě. Inhibicí SREBP dráhy LDL také potlačuje transkripci genu pro LDLR. Tento děj umožňuje buňkám upravit počet LDL receptorů, aby byl dostatek cholesterolu pro metabolické potřeby a nehromadil se nám. Prostřednictvím těchto regulačních mechanismů si buňky udržují převážně stálou hladinu neesterifikovaného cholesterolu v membránách navzdory kolísavé potřebě cholesterolu a exogennímu zásobování (Goldstein a Brown, 2009).

1.4 Objevení LDLR

Michael S. Brown a Joseph L Goldstein v letech 1972–1974 pracovali na University of Texas, Southwestern Medical Center in Dallas, kde se snažili přijít na příčinu familiární hypercholesterolemie (FH). Pacienti s touto nemocí mají několikanásobně zvýšenou koncentraci cholesterolu v krvi než zdraví jedinci (Goldstein a Brown, 2009).

Goldstein a Brown se rozhodli změřit aktivitu samotného enzymu, HMG-CoA reductázy, v extraktu nakultivovaných fibroblastů. Jinak se v této době běžně měřila syntéza cholesterolu z acetátu. Studie na krysích játrech ukázaly, že HMG-CoA reductáza katalyzuje omezení rychlosti produkce cholesterolu a její aktivita byla redukována, když krysy vstřebávaly cholesterol. Zavedli tedy mikroskopický test pro

HMG-CoA reductázu, aby zjistili množství materiálu dostupného z kultivovaných fibroblastů a okamžitě zaznamenali přítomnost zpětné regulace. Když normální lidské fibroblasty vyrostly v přítomnosti séra, aktivita HMG-CoA reductázy klesla. Tzn. že lipoproteiny z přidaného cholesterolu byly odstraněny z kultivačního média a aktivita HMG-CoA reductázy tak vzrostla padesátkrát za 24 hodin. Indukovaný enzym byl rapidně potlačen, když LDL přidali do média (Goldstein a Brown, 2009).

Mechanismus receptoru objevili při studiu buněk pacientů s homozygotní FH. Jejich buňky při pěstování v séru obsahujícího lipoproteiny měly aktivitu HMG-CoA reductázy padesátkrát až stokrát vyšší než normálně. Tato aktivita pacientům už moc nestoupala, když byly lipoproteiny odstraněny ze séra a ani nedošlo k jejímu potlačení při přidání LDL zpět. To znamená, že pacienti s homozygotní FH mají defekt v genu kódujícím HMG-CoA reductázu, která činí enzym odolný vůči zpětné regulaci LDL cholesterolu (Goldstein a Brown, 2009).

1.5 Genová rodina LDLR

Lidský LDLR byl první popsáný lipoproteinový receptor u obratlovců. A bylo objeveno mnoho membránových proteinů s vysokým stupněm strukturální podobnosti. Tyto proteinové formy jsou nazývány supergenová rodina LDLR a členové této rodiny se uvádí jako příbuzní LDLR nebo LR (lipoprotein receptor) (Cooper, 2003).

LR obsahují složené membránové proteiny, které se zapojují do receptorem zprostředkované endocytózy mnoha různých ligandů (Cooper, 2003).

Tabulka č. 1 - Nejvýznamnější členové rodiny LDLR

Zkratka	Název
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LRP1	Low density lipoprotein-related protein 1
LRP2 (Gp330)	Megalin
VLDLR	Very low density lipoprotein receptor
LR11 (známý i jako sorLA nebo SORL1)	Low density lipoprotein-related 11
ApoER2 (LRP8)	Apolipoprotein E receptor type 2
LRP3	Low density lipoprotein-related protein 3
LRP4	Low density lipoprotein-related protein 4
LRP5	Low density lipoprotein-related protein 5
LRP6	Low density lipoprotein-related protein 6

LR32 (LRP1B)	Low density lipoprotein-related 32
--------------	------------------------------------

1.5.1 LRP1

Je to jeden z největších známých členů genové rodiny LDLR a multiligandový receptor, který je zapojen do nezávislých procesů (Schneider, 2003). Například kontroluje systémový metabolismus lipidů spolu s LDLR v játrech (vázáni a/nebo metabolismus lipoproteinů, extracelulárních proteináz a proteinázových komplexů, glykosfingolipidů) (Xian, 2017).

V buňkách hladkého svalstva funguje jako signální koreceptor pro TGF β (transforming growth factor β – membránový receptor, který převádí signál dále směrem dovnitř buňky) a PDGF (platelet derived growth factor – růstový faktor z trombocytů) při zpětném transportu cholesterolu a udržování integrity cév (Schneider, 2003 a Xian, 2017).

LRP1 hraje roli multifunkčního transmembránového proteinu u aterosklerózy. Spolu s LDLR reguluje odstranění bílkovin bohatých na cholesterol cirkulujících v hepatocytech. Je to také klíčový regulátor intracelulárního cholesterolu naakumulovaného v makrofázích a v buňkách hladkého svalstva (Xian, 2017).

1.5.2 LRP2 (Megalin)

Mnoho proteinů, které se vážou na LRP1, patří také mezi ligandy LRP2, ale jejich projev je fyziologicky odlišný (Schneider, 2003).

Megalin je nezbytný pro vývoj předního mozku, a to po absorpci lipoproteinu obsahujícího Apo-B do embryonálního neuroepitelu. Další důležitou funkcí je zapojení do metabolismu určitých lipofilních vitamínů. Třeba vitamin B₁₂ je navázán na cubilin, který je naopak internalizován ileálními epitelálními buňkami přes LRP2. Naopak v ledvinách je vitamin B₁₂ (transkobalaminové komplexy) znovu zachycen z vazby (na megalinu) na buňkách proximálního tubulu. Navíc zprostředkovává reabsorpci vitamínu D₃ – vitamin D vázané proteinové komplexy – klíčový krok přeměny prekursoru v aktivní vitamin D₃ v ledvinách (Arora, 2017 a Schneider, 2003).

1.5.3 LR32 (LRP1B)

Tento receptor ukazuje nejvyšší homologii s LRP1. Výzkumy ukázaly, že je identický s produktem tumor supresorového genu, LRP1B (Schneider, 2003).

Snížená exprese LRP1B se podílí na několika primárních rakovinách (Ni, 2013). Bylo zjištěno, že je regulován v tkáních rakoviny tlustého střeva a zde inhibuje růst, migraci a metastázy buněk rakoviny tlustého střeva (Wang, 2017).

1.6 Hyperlipoproteinémie (HLP)

Jsou buď primární (geneticky podmíněné), nebo sekundární (průvodním znakem jiného základního onemocnění – hypotyreózy, nefrotického syndromu nebo diabetes mellitus) (Češka, 2005). Nebo je můžeme klasifikovat do 3 skupin: hypercholesterolémie, kombinovaná hyperlipidémie a hypertriacylglycerolémie (Kolář et al., 2003).

Jako synonymum se pro tato onemocnění používá i termín dyslipoproteinémie. Jsou charakterizována zvýšenou hladinou lipidů a lipoproteinů v plazmě (Češka, 2005). U nemocných ale nemusí být pouze zvýšení těchto hodnot, ale jde zde i o rovnováhu poměrů v celkovém lipidovém spektru (Aschermann et al., 2004).

HLP jsou skupinou metabolických onemocnění hromadného výskytu. Vznikají důsledkem sníženého katabolismu nebo zvýšené syntézy lipoproteinových částic, které přenášejí tuky v plazmě. HLP je v těle nemocného přítomná bez příznaků i několik let, jako riziko řady onemocnění – za nejzávažnější se považuje předčasná ateroskleróza a akutní hemoragická nekrotizující pankreatitida (Aschermann et al., 2004).

1.6.1 Primární hyperlipoproteinémie

Rozdělujeme je podle etiopatogeneze poruchy, které jsou založeny na rozpoznání genetických defektů (Češka, 2005).

1.6.1.1 Familiární hypercholesterolémie (FH)

Je to autozomálně dominantní onemocnění, popsané už v 1. polovině 20. století. Ale až později byla objasněna jeho příčina – porucha funkce LDL receptoru (mutace postihující gen pro LDL receptor) (Češka, 2005). Pacienti netvoří žádné receptory pro LDL, anebo je tvoří normálně, ale tyto receptory nejsou transportovány na povrch buňky a nemůžou se tak funkčně uplatnit. Dále mohou mít poruchu vazby receptoru pro LDL na lipoproteinovou částici, nebo je chyba v proniknutí komplexu receptor-lipoprotein do buňky (Aschermann et al., 2004).

FH se objevuje ve dvou formách: homozygotní a heterozygotní (vyskytuje se častěji) (Češka, 2005).

Důsledkem poruch LDLR je zvýšení koncentrace LDL-cholesterolu v plazmě. Charakteristickým rysem je izolované zvýšení cholesterolu v plazmě při normální nebo

hraničně zvýšené koncentraci triglyceridů (Khan, 2014). Plazmatický cholesterol u heterozygotů se průměrně udává 7–10 mmol/l (může být ale až 15 mmol/l i vyšší). Hodnota u homozygotů se pohybuje okolo 15–30 mmol/l. Postižení mohou mít také značnou hyperbetalipoproteinémií a současně i vyšší koncentraci ApoB (Češka, 2005).

Klinickými projevy u homozygotů jsou těžká postižení již v ranném věku. ICHS (ischemická choroba srdeční) se u nich projevuje už v dětství a velká část z nich umírá na infarkt myokardu do 20 let. Typickým projevem je tvorba šlachových a kožních xantomů už v dětském věku. Naproti tomu heterozygoti mohou být řadu let bez příznaků. Choroba se u nich projevuje až okolo 30 let, např. ve formě arcus senilis conrae (šedobílý prstenec lipidových depozit rohovky), xanthelasma palpebrarum (žluté výrůstky na očních víčkách) nebo šlachová xantomatóza (Aschermann et al., 2004 a Blažek et al., 2007).

Mezi nejzávažnější projevy FH patří předčasný výskyt ICHS ve věku 30 – 50 let. Ke vzniku aterosklerózy dochází nejen v koronárním řečišti, ale i na velkých tepnách u dolních končetin a na karotidách (Blažek et al., 2007).

Terapie (dieta a/nebo farmaka) postižených jedinců je obtížná a u spousty nemocných se nedaří dosáhnout cílových hodnot cholesterolu a LDL-cholesterolu (Češka, 2005).

1.6.1.2 Familiární defekt ApoB-100 (FDB)

Onemocnění je způsobeno bodovou mutací a záměnou jedné aminokyseliny v molekule ApoB-100 (glutamin za arginin) (Blažek et al., 2007). To vede k neschopnosti vázat částici LDL na receptor pro LDL. Důsledkem je pak nahromadění LDL v plazmě a s tím související zvýšená koncentrace celkového cholesterolu, hlavně LDL-cholesterolu (Češka, 2005).

Onemocnění je známo spíše v heterozygotní formě, která je charakteristická přítomností dvou populací LDL v plazmě – normální (váže se na receptor LDL) a defektní (má změněný ApoB-100). Koncentrace cholesterolu se u postižených pohybuje okolo 7–10 mmol/l. Homozygotů je známo zatím je několik a mají podstatně nižší koncentrace cholesterolu, LDL-cholesterolu i ApoB-100 ve srovnání s homozygoty s FH. Klinické projevy jsou zatím podobné jako při FH – xantomatóza a riziko předčasné ICHS (Aschermann et al., 2004).

1.6.1.3 Polygenní hypercholesterolémie

Vzniká kombinací genetických i zevních faktorů, což vede k mírné hypercholesterolémii do 8 mmol/l. Onemocnění má různé klinické projevy, ale hlavně je spojeno s četnějším výskytem ICHS (Češka, 2005).

1.6.1.4 Familiární kombinovaná hyperlipidémie (FKH)

Patří mezi nejčastěji geneticky podmíněnou poruchu metabolismu lipidů a lipoproteinů (Češka, 2005).

FKH je dědičná choroba, pro kterou je typická zvýšená koncentrace cholesterolu a/nebo triglyceridů. U různých rodinných příslušníků můžeme prokázat odlišné fenotypy (Aschermann et al., 2004).

Obvyklým laboratorním nálezem je zvýšená koncentrace LDL a VLDL cholesterolu v plazmě. Mezi typický projev patří velké zvýšení hladiny ApoB-100 (Češka, 2005).

Příčinou onemocnění je hlavně nadměrná syntéza ApoB-100 v játrech doprovázená zvýšenou produkcí VLDL. Výsledkem je vznik malých a velmi aterogenních částic LDL. FKH je velmi častou příčinou ICHS – zhruba 10 % postižených, kteří prodělají akutní infarkt myokardu ve věku do 60 let, trpí touto chorobou. Je častější příčinou ICHS než familiární hypercholesterolémie (Aschermann et al., 2004).

1.6.1.5 Familiární betalipoproteinémie (hyperlipoproteinémie typ III)

Je to vrozená porucha metabolismu lipoproteinů, pro kterou je charakteristická vysoká koncentrace cholesterolu a triglyceridů v plazmě. Pro betalipoproteinémii je typická přítomnost patologického lipoproteinu β -VLDL v plazmě. Postižení mají defekt genu pro ApoE, který je zodpovědný za clearance lipoproteinových částic bohatých na triglyceridy zprostředkovanou receptory (Češka, 2005).

ApoE je polymorfní protein a nejčastěji se vyskytuje ve variantě ApoE-3 (cca 70-85 %), pak také v podobě ApoE-4 (12-18 %). Obě tyto formy patří mezi ligandy pro jaterní lipoproteinové receptory. Dále existuje varianta apoE-2 (výskyt 2-12 %), která má menší afinitu k receptorům pro lipoproteinové částice v játrech (Aschermann et al., 2004).

Onemocnění může být zděděno dominantně i recesivně, a to v závislosti na genetické mutaci ApoE. S fenotypem ApoE hrají při projevu betalipoproteinémie roli

funkční vlastnosti ApoE a jak interaguje s lipolytickými enzymy (Aschermann et al., 2004).

Předčasná ateroskleróza je zde brána jako závažná komplikace, která postihuje hlavně periferní tepny, ale i koronární řečiště. Pacienti s tímto onemocněním mohou být postiženi všemi typy xantomatózy – nejčastější jsou tuberózní a tuberoeruptivní xantomy, které se projevují hlavně na kolenou, loktech a hýždích. Typickou formou xantomatózy u betalipoproteinémie je xantoma striatum palmare (žlutavé zbarvení dlaňových a meziprstních rýh) (Češka, 2005).

Často je provázena řadou dalších onemocnění, například mezi ně můžeme zařadit rizikové faktory ICHS (obezita, arteriální hypertenze, diabetes mellitus,...) (Češka, 2005).

1.6.1.6 Familiární hyperlipoproteinémie typ I

Projevuje se hyperchylomikronémií – sérum odebrané nalačno je vždy chylózní a po 24 hodinách stání v 4 °C se vytvoří na povrchu séra chylomikronová vrstva tvořící 20-50 % výšky sloupce (Aschermann et al., 2004).

Klinicky se u tohoto onemocnění projevují abdominální koliky a pankreatitida. Dalším projevem může být hematomegalie a splenomegalie. U poloviny postižených je projevem nemoci eruptivní kožní xantomatóza. Prvním příznakem může být porucha zraku z důvodu lipaemia retinalis (Češka, 2005).

1.6.1.7 Familiární hypertriglyceridémie

Vyskytuje se v populaci ve větším procentu (cca 0,2 – 0,3 %) a je autozomálně dominantně přenášena. Typická je hypertriglyceridémie, ale koncentrace cholesterolu je v normě (Aschermann et al., 2004).

Postižená rodina je ohrožena vyšší úmrtností na akutní infarkt myokardu než zdravá populace, stejně tak jako častějším výskytem aterosklerózy dolních končetin. Projevuje se i častá porucha glukózové tolerance a s tím související vznik diabetu II. typu (Češka, 2005).

1.6.1.8 Familiární hyperlipoproteinémie typ V

Onemocnění je celkem vzácné a je pro něj charakteristická hypercholesterolemie a hlavně výrazná hypertriglyceridémie (Aschermann et al., 2004).

Klinicky se projevuje eruptivními xantomatózami na hýždích, zádech, pažích a stehnech a opakujícími se záchvaty akutní pankreatitidy, které mohou způsobit až

chronické poškození slinivky břišní (její sekrece). Obézní pacienti trpí často na diabetes mellitus II. typu a u postižených s jaterní steatózou se můžeme setkat s hepatomegalií (Češka, 2005).

1.6.2 Sekundární hyperlipoproteinémie

Jsou důsledkem základního onemocnění, které souvisí s metabolismem lipidů a lipoproteinů. To může vést k izolovanému zvýšení cholesterolu, k izolované hypertriglyceridémii, nebo k současnému zvýšení cholesterolu a triglyceridů (Soška, 2001).

U sekundárních hyperlipoproteinémií se objevují stejné komplikace jako u primárních – ateroskleróza, akutní pankreatitida, xantelasma palpebrarum, šlachové nebo kožní xantomy, ... (Češka, 2005).

Příčiny sekundární hyperlipoproteinémie:

Hypercholesterolémie

- Akutní intermitentní porfyrie
- Mentální anorexie

Hypertriglyceridémie

- Diabetes mellitus
- Urémie
- Obezita
- Alkoholismus
- Systémový lupus erythematodes
- Lipodystrofie

Kombinované hyperlipidémie

- Hypotyreóza
- Nefrotický syndrom
- Akromegalie
- Léčba diuretiky nebo kortikoidy (Češka, 2005 a Soška, 2001)

1.7 Ateroskleróza

Pokud je koncentrace LDL v krevní plazmě vysoká a HDL nízká, pak stoupá riziko srdečních chorob. LDL je zapojen do utváření ateromových plátů, které ve stěnách středně velkých arterií tvoří zvětšující se tukové usazeniny. Pláty umí bránit průtoku krve až ho zcela zablokují. Formují se migrací makrofágů, které stáhly LDL do vnitřní vrstvy tepen. Makrofágy, které vypadají jako by obsahovaly pěnu (mají v sobě hodně

lipidových kapiček), se označují jako pěnové buňky. Nekontrolují totiž absorpci LDL, takže se snadno transformují v tyto buňky, pokud jsou koncentrace LDL dlouhodobě vysoké (Kuchel, 2009).

Jsou známé oblasti, kde se postižení objevuje častěji. Vyšší výskyt aterosklerózy bývá u břišní aorty než u hrudní a léze najdeme častěji při odstupu velkých arterií z aorty – v jejich ústí. Patologické zúžení tepen je běžnější například ve věnčitých tepnách, karotidách, tepnách spodiny mozku, v ledvinných a ve femorálních tepnách (Kolář et al., 2009).

1.7.1 *Vznik ateromového plátu*

Mezi základní morfologické projevy aterosklerózy řadíme:

1. stupeň: lipoidní proužky
2. stupeň: fibrózní pláty, ateromatózní pláty
3. stupeň: ateromatózní vředy, kalcifikace (Kolář et al., 2009).

Vývoj lipoidních proužků začíná už v dětství a dospívání. Vše začíná, když částice LDL opustí krevní řečiště a prostoupí do arteriální intimy, kde se při zvýšení hladiny LDL kumulují. A pak jsou modifikovány enzymy a oxidovány na prozánětlivé částice, které vyvolají přirozenou zánětlivou reakci v rámci intimy. Kapičky tuku se mohou hromadit v cytoplazmě buněk hladkého svalstva. Tyto první změny ve stěně arterií se nachází na větvích tepen, kde nastává adaptivní intimální ztluštění (Insull, 2009).

Zánět začne, když se zaktivují endoteliální buňky a začnou produkovat adhezivní molekuly. A buňky hladkého svalstva vylučují chemokiny, které si společně přitáhnou monocyty, lymfocyty, žírné buňky a neutrofile do arteriální stěny. Při vstupu se monocyty aktivují v makrofágy, přijmou lipidy jako malé inkluze a stanou se z nich pěnové buňky. Izolované pěnové buňky, více vrstev těchto buněk nebo izolované lipidové pooly nepovažujeme za aterosklerózu. Tyto změny jsou mikroskopické a mohou zmizet. Za začátek aterosklerózy se považuje, až když se akumulace lipidů projeví jako splynutí extracelulárních lipidových poolů (Insull, 2009).

Prvními patologickými projevy jsou lipoidní proužky, které mají bělavě žlutou barvu a postihují intimu větších cév, hlavně aortu. V mikroskopickém obrazu můžeme vidět, že jsou tvořeny převážně paměťovými buňkami. Proužky vznikají v dětství a časem některé mizí a některé se změny ve fibrózní pláty. Lipoidní proužky nezmenšují průsvit cévy, a tak se mikroskopicky neprojevují (Kolář et al., 2009).

Dalším projevem jsou fibrózní pláty, které se vyskytují v dospělosti okolo 30. a 40. roku života. Plát má bělavé zbarvení a zužuje průsvit tepny – je vyvýšen nad úroveň

endotelu. Je tvořen buňkami hladkého svalstva, zmnoženou vazivovou tkání, lipoproteiny a makrofágy. Fibrózní plát ve věnčitých tepnách může omezovat průtok postiženou tepnou, a vést tak k ischemii myokardu. Klinickým projevem je angina pectoris (Kolář et al., 2009).

Dalším vývojovým stádiem je ateromatózní plát, nazývaný také jako komplikovaná léze. Aterom se v plátu makroskopicky projevuje jako vyvýšenina. Na řezu můžeme pozorovat dutinu ve zhuštělé intimě, vyplněnou žlutavou kaší mastného vzhledu (podle toho název: „athera“ znamená řecky kaše). Mikroskopicky vidíme jen nekrotickou hmotu s velkým obsahem lipidů, zjm. krystalů cholesterolu. (Kolář et al., 2009).

V některých případech zaujímá aterom celý plát a od velmi malého průsvitu cévy je oddělen jen tenkou krycí vazivovou vrstvou. Tato krycí vrstva může snadno prasknout a na povrchu dojde k agregaci krevních destiček, z kterých se následně může vytvořit trombus a uzavřít tepnu. K náhlému uzavření tepny dochází nejčastěji právě vlivem agregace destiček, vznikem trombu nebo krvácením pod plát. Klinickým projevem je angina pectoris nebo infarkt myokardu (Kolář et al., 2009).

Posledním stádiem je kalcifikace ateromových hmot, kdy do ateromů vypadávají vápenaté soli (Kolář et al., 2009). Vápník se ukládá po celou dobu tvorby ateromového plátu – nejprve ve formě malých agregátů a později jako velké uzliny. Pláty mohou prasknout do lumen cévy a vystavit tak vápenaté uzliny, které se stávají místem pro vznik trombózy (Insull, 2009).

1.7.2 Rizikové faktory aterosklerózy

1.7.2.1 Neovlivnitelné rizikové faktory

Můžeme mezi ně zařadit věk, pohlaví a genetické faktory. Někteří řadí do této skupiny i rasu, to vyplývá hlavně ze studií v USA. Dále sem můžeme zařadit rodinnou anamnézu, pokud se v rodině vyskytl infarkt myokardu nebo náhlá smrt otce nebo prvostupňového mužského příbuzného ve věku do 55 let. A u matky a prvostupňových příbuzných ženského pohlaví do 65 let (Češka, 2011).

1.7.2.2 Ovlivnitelné rizikové faktory

Řadíme mezi ně dyslipidémie, kouření cigaret (zvyšuje výskyt ISCH i úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění), hypertenzi nad 140/90 mmHg, diabetes mellitus (hlavně 2. typu) je spojen s předčasnou aterosklerózou, obezita, psychosociální faktory nebo nízká fyzická aktivita (Češka, 2011).

1.8 Terapie hyperlipoproteinémií

Cílem je optimalizovat koncentraci LDL v krvi. Léčba je komplexní a zahrnuje dietní a režimová opatření. U pacientů, kde není tato léčba efektivní se přistupuje k farmakoterapii (Kolář et al., 2009).

1.8.1 Dietní a režimová opatření

Opatření musí být dodržována i v případě zavedení další léčby. Diety se u různých typů hyperlipoproteinémií liší. Máme ale obecné zásady dietní terapie (Kolář et al., 2009):

- Snížení nadměrné hmotnosti, pokud pacient trpí nadváhou a s tím spojený omezený příjem energie.
- Snížený příjem všech tuků ve stravě – snížení příjmu trans-nenasycených mastných kyselin, nenasycených mastných kyselin, cholesterolu.
- Zvýšit obsah vlákniny ve stravě.
- Konzumovat funkční potraviny obohacené o fytoosteroly.
- Zvýšení obvyklé fyzické aktivity (Janský et al., 2016).

Důležitou součástí při změně životního stylu je i absence kouření, protože se rizika při současném výskytu více rizikových faktorů násobí (Kolář et al., 2009).

1.8.2 Farmakoterapie

Používají se zejména statiny, které blokují nitrobuněčnou tvorbu cholesterolu, fibráty, pryskyřice nebo kyselina nikotinová (Blažek et al., 2007).

Statiny vyvolávají tzv. extralipidový efekt, který se účastní také inhibice některých mechanismů syntézy steroidů a jejich vedlejších produktů. Statiny inhibují HMG-CoA reductázy, což vede ke snížení LDL cholesterolu, triacylglycerolů a ke zvýšení HDL cholesterolu. Terapie také zvyšuje aktivitu NO syntázy. V myocytech statiny podporují produkci mimobuněčné matrix (zjm. kolagenu), a to vede ke stabilizaci sklerotického plátu (Stejskal, 1999).

Asi u 5 % pacientů jsou ale dietní opatření spolu s farmakoterapií neúčinná. U těchto nemocných se používají metody extrakorporální eliminace lipoproteinů (Blažek et al., 2007).

1.8.3 Metody extrakorporální eliminace lipoproteinů

Mezi základní předpoklady pro tyto metody patří přítomnost aterogenních lipidů (zjm. LDL cholesterolu) v plazmě a možnost odebrat jí tolik, že léčebně její množství

poklesne a současně nedojde k příliš rychlé obnově její hladiny. V současnosti známe několik technicky odlišných metod (Blažek et. al., 2007).

1.8.3.1 Plazmaferéza

Je to nespecifická a neselektivní metoda, při které dochází k léčebné výměně plazmy. Z plné krve se plazma odděluje centrifugací nebo filtrací a její objem se v oběhu doplní náhradním roztokem (krystaloidním nebo koloidním roztokem nebo plazmou zdravého dárce). Metoda je rychlá, ale dochází ke ztrátám ostatních látek v plazmě (Gordon et al., 1998).

U pacientů s FH se používá specifická LDL-aféze, kdy se odstraňuje LDL cholesterol pomocí kolon s ovčími protilátkami proti lidskému ApoB-100, na který se LDL cholesterol váže. Během jedné LDL-afézy můžeme snížit hladinu LDL cholesterolu až o 60–70 % výchozí hodnoty a také hladinu lipoproteinu Lp(a). Současně dochází ke zvýšení HDL cholesterolu až o 60 %. Dlouhodobá léčba má pozitivní efekt na cévní (hlavně koronární) systém, dochází ke zlepšení ischemie myokardu a stabilizaci až regresi procesu aterosklerózy. U homozygotních pacientů s FH se LDL-aféze považuje za život zachraňující výkon (Kroon et al., 1996).

1.8.3.2 Kaskádová filtrace

Plazma se oddělí filtrací z plné krve a pak se promývá přídatnými filtry. Póry filtrů odpovídají velikosti částic LDL cholesterolu (Blažek et al., 2007).

1.8.3.3 Termofiltrace

Plazma se oddělí separací a následně ohřeje na 40 °C, pak se filtruje přes další membránu. Díky teplotě se oddělí VLDL a LDL cholesterol (ale HDL ne). Po ochlazení se plazma vrátí do oběhu (Bláha et al., 1999).

1.8.3.4 HELP (heparin induced extracorporeal LDL precipitation)

Plazma se oddělí filtrací a vystaví se acetátovému pufru. Při pH 5,12 dojde k precipitaci nerozpustného komplexu heparin-LDL-cholesterol, který se vycytává pomocí polykarbonátového filtru v kyselém prostředí. Přebytečný heparin se váže na adsorber. Následně se pH plazmy upraví přidáním bikarbonátu, objem plazmy je upraven náhradním roztokem a plazma se vrátí zpět do oběhu (Bláha et al., 1999).

1.8.3.5 DALI (direct adsorption of lipids)

Patří mezi metody přímé selektivní LDL adsorpce, kdy se při hemoperfúzi z plné krve přímo eliminuje LDL cholesterol (Blažek et al., 2007).

2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerázová řetězová reakce byla objevena Kary Mullisem v 80. letech 20. století (Gibson a Muse, 2009).

Patří mezi nejvyužívanější molekulárněbiologické metody v současnosti (Kočárek, 2007). Poprvé umožnila specifickou detekci a produkci velkého množství DNA. Strategie založené na PCR vedly k rozsáhlému vědeckému úsilí jako je třeba projekt lidského genomu. Technika je v současnosti široce využívána klinickými lékaři a výzkumnými pracovníky k diagnostice onemocnění, klonování genů a sekvencí a k provádění kvantitativních a genomických studií rychlým a zároveň citlivým způsobem. Jednou z nejdůležitějších lékařských aplikací je detekce patogenů. Navíc se používá ve forenzní medicíně k identifikaci zločinců (Garibyan a Avashia, 2013).

Slouží k amplifikaci (zmnožení) specifických úseků DNA. Metoda využívá procesy jako jsou denaturace, hybridizace a syntéza (replikace) DNA (Kočárek, 2007). Principem metody je replikace nukleových kyselin a podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' umožněná díky DNA-polymeráze (Šmarda, 2005).

Abychom mohli zmnožit určitou část DNA, potřebujeme k tomu dva krátké úseky komplementární k oběma jejím koncovým oblastem. Krátké úseky nazýváme primery (většinou se skládají z 20–25 nukleotidů, proto je můžeme označovat i jako oligonukleotidy) (Kočárek, 2007). Dále potřebujeme k reakci termostabilní Taq-DNA-polymerázu („Taq“ je odvozeno od bakterie *Thermus aquaticus*, ze které byl tento enzym izolován), prekuzory DNA (deoxyribonukleotidtrifosfáty) a pufr na vytvoření slabě zásaditého prostředí (důležité pro polymerázu) (Sršeň a Sršňová, 2000).

Přístroj, ve kterém reakce probíhá nazýváme cycler (termocycler). Uvnitř má kovový blok s otvory, do kterých vkládáme mikrozkušavky se směsí vyšetřované DNA, primerů, DNA-polymerázy a dNTP (deoxyribonukleotidtrifosfátů). Přístroj nám mění teplotu reakční směsi podle toho, jak si ho sami naprogramujeme (Kočárek, 2007).

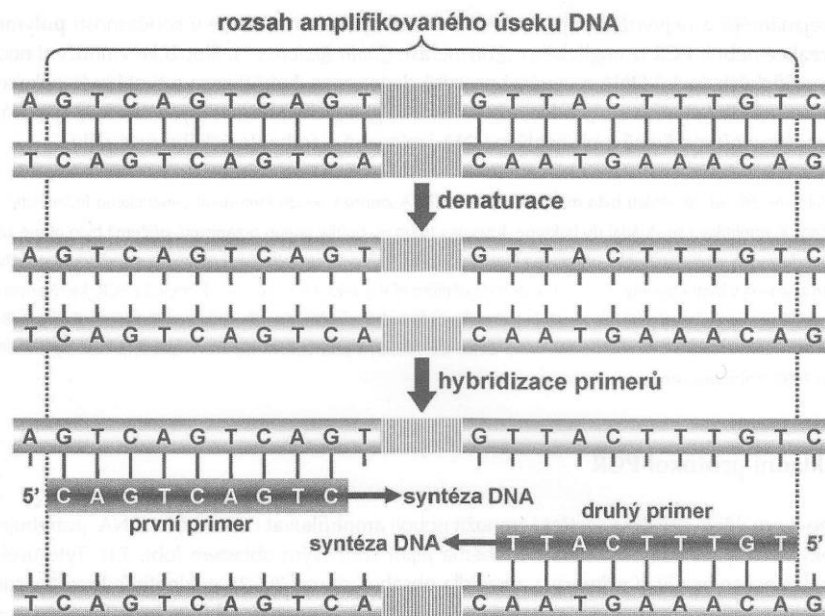
Princip DNA amplifikace je založen na třech krocích (Sršeň a Sršňová, 2000).

1. Denaturace, kdy dojde k oddělení dvou komplementárních řetězců daného úseku DNA, a to působením zvýšené teploty (zpravidla 92-96 °C) (Kočárek, 2007 a Sršeň a Sršňová, 2000).
2. Hybridizace (annealing) primerů, tzn. navázání dvou komplementárních primerů po jednom na 3'-konci obou dvou vláken vyšetřovaného úseku (Sršeň a Sršňová,

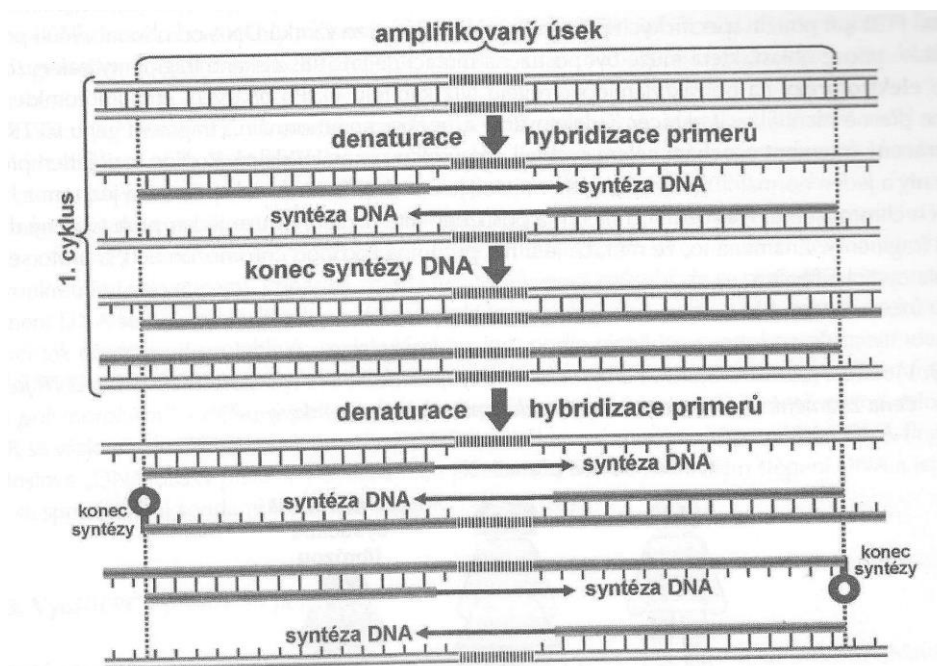
2000). Tato část probíhá při teplotě 40-65 °C. Místo, kam se primery navážou, nám vymezuje oblast genomu, která se v dalších cyklech PCR naamplifikuje (Kočárek, 2007).

3. Elongace (prodlužování) nukleotidových řetězců působením DNA-polymerázy. Probíhá při teplotě 70-74 °C. DNA-polymeráza nasedá na 3'-OH-konce navázaných primerů a připojuje k nim nové nukleotidy a tím prodlužuje řetězec ve směru 5' → 3' (Kočárek, 2007).

Výše uvedené tři kroky se několikrát po sobě opakují a nově syntetizovaná vlákna DNA slouží jako materiál pro další syntézu v následujících cyklech (Sršeň a Sršňová, 2000).



Obrázek č. 2 - Navázání primerů. Převzato ze zdroje: (Kočárek, 2007)



Obrázek č. 3 - Základ PCR - 1. a 2. cyklus. Převzato ze zdroje: (Kočárek, 2007)

2.1 Analýza PCR produktu

Existují dvě hlavní metody vizualizace PCR produktů: zbarvení amplifikovaného produktu DNA chemickým barvivem, např. ethidiumbromid, který interkaluje mezi dvěma vlákny duplexu nebo značení PCR primerů nebo nukleotidů fluorescenčními barvivy (fluorofory) před PCR amplifikací (Garibyan a Avashia, 2013).

Nejrozšířenější metodou je použití elektroforézy na agarózovém gelu, která odděluje produkty DNA na základě velikosti a náboje (Stellwagen, 2009).

2.2 Druhy PCR

a) Multiplex PCR

Multiplexová reakce obsahuje primery pro několik odlišných cílových DNA, povoluje amplifikaci více a různě velikých částí DNA v jediné PCR reakci (Elrod a Stansfield, 2010).

b) Nested PCR

Skládá se ze dvou postupných amplifikačních reakcí. První se skládá ze setu primerů, které jsou cíleny na delší oblast DNA a druhá reakce obsahuje primery, které vedou k zesílení hledané oblasti DNA v rámci prvního amplikonu (Elrod a Stansfield, 2010).

c) Real-time PCR

Metoda se používá k určování množství DNA a jeho přepisu. Základem je klasická PCR, ke které se využívá speciální cycler, který umí zaznamenat množství DNA během každého cyklu. K identifikaci množství DNA se používá fluorescenční substrát, který se naváže na DNA. Fluorescence substrátu je zaznamenávána detektorem a je závislá na množství DNA (Šmarda, 2005).

d) Touchdown PCR

U prvních cyklů se používá vyšší teplota, která zabraňuje nespecifickým vazbám primerů s templátovou DNA a v následujících cyklech se teplota snižuje, aby se namnožily jen specifické produkty (Šmarda, 2005).

e) RT-PCR (Reverse-transcription PCR)

Patří mezi nejcitlivější metody pro detekci a kvantitaci mRNA. Používá se pro geny, které jsou exprimovány ve vyšším počtu ve snadno dostupných buňkách (Gibson a Muse, 2009).

f) AS-PCR (Allele-specific PCR)

Využívá se pro určení konkrétní alely nebo na vyhledávání mutací. Musíme mít ale k dispozici primer pro úsek, ve kterém se alela odlišuje od ostatních (Šmarda, 2005).

g) Inverzní PCR

Používá se k izolaci a rozpoznání neznámé sekvence (Green a Sambrook, 2012).

h) Asymetrická PCR

i) Hot-start PCR

2.3 *Výhody a omezení PCR*

Technika má mnoho výhod, hlavně krátké trvání celého procesu, což má význam třeba pro prenatální diagnostiku (výsledek je hotový 2. den po dodání vzorku) (Sršeň a Sršňová, 2000). Je vysoce citlivá s potenciálem produkovat miliony až miliardy kopií konkrétního produktu pro sekvenování, klonování a analýzu (Garibyan a Avashia, 2013). Dalšími plusy jsou potřeba malého množství DNA a použití staré a degradované DNA (Green a Sambrook, 2012).

Přestože je PCR cennou technikou, má svá omezení. Je velmi citlivá, takže každá forma kontaminace vzorku dokonce i stopovým množstvím DNA může vyvolat zavádějící výsledky. Aby mohly být navrženy primery, tak potřebujeme některé údaje dříve, než budeme sekvenovat. Proto může být PCR využita pouze k identifikaci přítomnosti nebo nepřítomnosti známého patogenu nebo genu. Další omezení se týkají primerů, které mohou nespecificky vázat sekvence podobné, ale ne zcela identické

s cílovou DNA. Kromě toho mohou být nesprávné nukleotidy začleněny do PCR sekvence DNA-polymerázou (Garibyan a Avashia, 2014).

3 Sekvenování DNA

Cílem je stanovení primární struktury neboli nukleotidů v molekulách DNA. Abychom odvodili informaci o uspořádání aminokyselin kódovaných proteinů, potřebujeme znát sekvenci DNA. Umožňuje také stanovovat charakter mutací. Sekvenování urychlilo rozvoj i dalších molekulárních metod, jako je PCR (její provedení je závislé na znalosti sekvencí) (Šmarda, 2005).

Používají se dvě odlišné metody, které jsou založené na jiném principu:

3.1 *Maxam-Gilbertova metoda*

Tato chemická metoda je založena na specifickém štěpení molekuly DNA chemickými činidly v místech bází určitého typu. Jako výchozí materiál se používá soubor identických fagmentů jednořetězcové nebo dvouřetězcové DNA, které jsou označené na jednom konci radioaktivním fosforem. Vlákna jsou rozdělena na čtyři vzorky, které se nechají vystavit chemickému působení (dimethylsulfát, hydroxid sodný, kyselina mravenčí a hydrazin). Každý se nechá reagovat s jiným činidlem, které rozštěpí fragment v místě specifické báze (Šmarda, 2005 a Maxam a Gilbert, 1977).

Nakonec se pomocí gelové elektroforézy vzorky každé ze čtyř reakcí seřadí podle délky (delší fagmenty jsou těžší a v gelu se pohybují pomaleji než fragmenty kratší) (Brown, 2007).

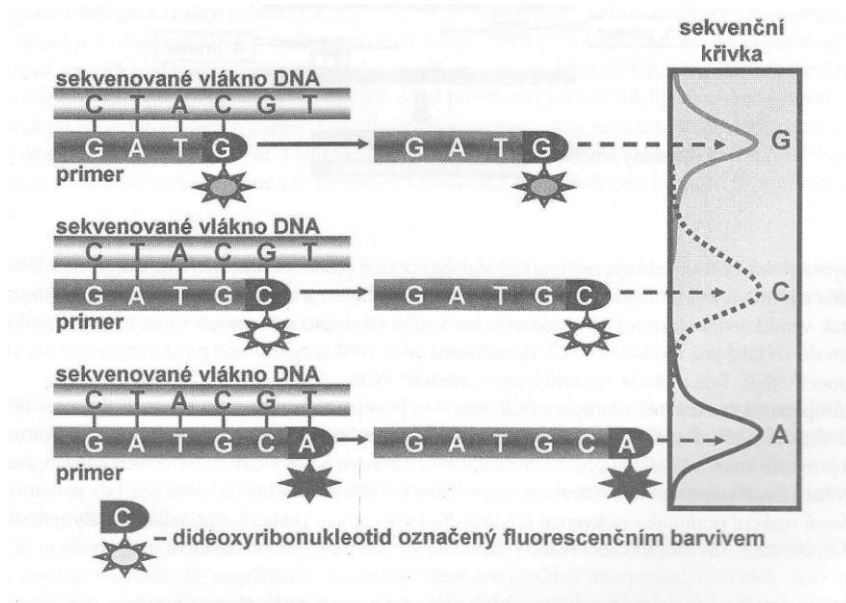
3.2 *Sangerova metoda*

Je založená na principu replikace DNA přerušené zařazením chemicky modifikovaného nukleotidu (dideoxyribonukleotidu). Metodu vyvinul Frederick Sanger v roce 1977, ale původní provedení metody bylo pracné, zdlouhavé a využívaly se k ní radioaktivně značené nukleotidy. Proto dalším krokem bylo zavedení používání fluorescenčně značených nukleotidů a ve stejné době byla objevena polymerázová řetězová reakce, na jejímž principu vznikla nová modifikace Sangerova sekvenování, která se dnes používá nejčastěji (Kočárek, 2007).

Používáme DNA jako matici pro syntézu komplementárních řetězců různé délky prostřednictvím DNA-polymerázy. Metodě se říká enzymová právě proto, protože využívá DNA-polymerázy, která má schopnost vytvářet přesné kopie DNA a schopnost specifické syntézy řetězce DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ od primeru s volnou $3'$ -OH skupinou. Syntéza řetězce se zahájí ve chvíli, kdy se napojí specifický primer a skončí

v místě, kde se do rostoucího řetězce vmísí místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog 2',3'-dideoxyribonukleosidtrifosfát (ddNTP), který nemá 3'-OH skupinu (Šmarda, 2005). Každý ddNTP je označen odlišným fluorescenčním barvivem (Kočárek, 2007).

Vzorek vyšetřované DNA s reakční směsí (DNA-polymeráza, dNTP, ddNTP a primer) umístíme do cycleru a postupně mu měníme teplotu jako při PCR, abychom dostali velký počet jednořetězcových fragmentů DNA o různé délce. Elektroforetickým rozdělením směsi získáme spektrum úseků, které se liší o délku jednoho nukleotidu. Podle výskytu fluorescenčního barviva na konci každého fragmentu pak zjistíme, kterým ddNTP byla syntéza ukončena a pořadí těchto ddNTP na koncích jednotlivých úseků udává sekvenci analyzovaného řetězce DNA (Kočárek, 2007).



Obrázek č. 4 - Princip sekvenční analýzy DNA. Převzato ze zdroje: (Kočárek, 2007)

4 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo:

1. Vypracovat odbornou rešerši na téma LDLR.
2. Optimalizace PCR metody a kontrola produktů PCR pomocí gelové elektroforézy.
3. Příprava vzorků pro sekvenování a samotné sekvenování.
4. Analýza dat a klasifikace nalezených mutací. Srovnání získaných sekvencí s NCBI (National Centre for Biotechnology Information) databází.

5 Metodika

Praktická část této práce byla provedena v laboratoři na Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích pod odborným vedením Ing. Tomáše Nixe, Ph.D.

Vzorky pro tuto práci byly vybrány od pacientů Nemocnice České Budějovice a.s., které pro tuto bakalářskou práci poskytla Ing. Petra Dušková. Vzorky byly anonymizovány. K připraveným vzorkům byly poskytnuty namíchané primery.

5.1 *Potřebné vybavení*

- Laminární box – laminární box, Telstar AV – 100
- Centrifuga Mini Spin eppendorf
- Vodní lázeň Julabo SW22
- Automatické mikropipety Autoclavable
- Vortex Mixer Labnet International, Inc.
- Stojánky na zkumavky
- Spektrofotometr Colibri
- Inkubátor Mini Dry Bath
- MJ MiniTM Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Digitální váhy
- Elektroforetický systém Bio-Rad (PowerPac^{MT} Basic Power Supply a Mini-Sub[®] Cell GT Systems)
- UV Transilluminator a detekční systém, Uvitec Cambridge, UVISAVE HD5
- Laboratorní sklo (odměrný válec, kuželová baňka)

5.2 *Izolace DNA z bukálního stěru*

Před každou PCR je nutné si vyizolovat DNA. Některé vzorky byly již vyizolovány a připraveny pro PCR, ale některé ne. DNA byla izolována z bukálního stěru.

Odběr se provádí výtěrovými tampony, na které se nanosou epitelové buňky z vnitřní strany tváře.

K izolaci DNA byl použit komerční kit QIAamp DNA Mini Kit od firmy QIAGEN. Využívá schopnosti DNA vázat se v přítomnosti chaotropních solí na silikátový povrch.

Reagencie

- Proteinase K
- Buffer AL

- Buffer AW1 (koncentrát)
- Buffer AW2 (koncentrát)
- Buffer AE
- 96% etanol

Spotřební materiál

- Mini spin collum – spin kolonka
- Mikrozukmavky
- Špičky
- Rukavice

Postup izolace DNA:

1. Nejprve byla zapnuta vodní lázeň na 56°C. Rozpustila se proteináza a přidal se etanol do promývacích roztoků Buffer AW1 a AW2.
2. Do označených 2 ml mikrozukmavek byly sterilně odstříhnuty tampóny se vzorkem.
3. Přidalo se 20 µl Proteinase K a 360 µl Buffer AL, zukmavky se vzorkem se protřepaly a na 15 vteřin stočily.
4. Vzorky byly inkubovány při teplotě 56 °C po dobu 10 minut. Pak byly krátce stočeny.
5. Sterilně se vyndaly tampóny (pomocí pinzety).
6. Pak bylo přidáno 180 µl 96% etanolu a vzorky byly dány do třepačky na 15 vteřin při rychlosti 2500 otáček/min. a krátce stočeny v centrifuze.
7. Celé vzorky byly přepipetovány do spin kolonek a stočeny v centrifuze po dobu 1 minuty při otáčkách 8000/min.
8. Kolonky byly vloženy do nových sběrných zukmavek (zukmavky s filtrátem byly vyhozeny).
9. Do kolonek bylo přidáno 500 µl promývacího pufru AW1.
10. Zukmavky byly stočeny na 1 min. v centrifuze při otáčkách 8000/min.
11. Do kolonek bylo přidáno 500 µl promývacího pufru AW2.
12. Zukmavky byly opět stočeny na 3 min. při otáčkách 14000/min.
13. Kolonky byly vloženy opět do nových sběrných zukmavek a filtráty byly vyhozeny.
14. Zukmavky byly stočeny 1 min. na nejvyšší počet otáček.
15. Kolonky byly vloženy do 1,5 ml zukmavek a zukmavky s filtráty vyhozeny.

16. Bylo přidáno 200 μ l Buffer AE a zkumavky byly inkubovány 5 min. při pokojové teplotě.
17. Kolonky byly stočeny na 2 min. při otáčkách 8000/min.
18. Roztoky DNA byly přepipetovány opět na kolonky, 5 minut inkubovány při pokojové teplotě a stočeny na 2 minuty při otáčkách 8000/min.
19. Kolonky byly vyjmuty ze zkumavek a vyhozeny.

5.3 *Precipitace DNA*

Reagencie

- 3M octan sodný
- Etanol 99,8% a 75%
- PCR voda

Spotřební materiál

- Špičky
- Rukavice

Postup

1. Do vyizolovaných vzorků DNA byla napipetována 1/10 finálního objemu roztoku 3M octanu sodného.
2. Pak bylo přidáno 2,5 objemu předchlazeného absolutního etanolu, vše se promíchalo.
3. Vzorky byly inkubovány nejméně hodinu v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, následně zcentrifugovány při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 min. při 13000 otáčkách/min.
4. Byl odstraněn supernatant a přidán zhruba stejný objem 75% etanolu. Vše bylo zcentrifugováno při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 min. při otáčkách 13 000/min.
5. Opět byl odstraněn supernatant a zbytky etanolu se odpařily. Aby se etanol lépe odpařil, zkumavky byly vloženy do předem vyhřátého inkubátoru na 30 min. při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
6. Do zkumavek bylo přidáno 15 μ l PCR vody, aby se sediment rozpustil.

5.4 *Měření koncentrace vzorků DNA*

Abychom mohli dál pokračovat, musela se zjistit koncentrace jak poskytnutých již vyizolovaných vzorků DNA, tak námi čerstvě vyizolovaných. Pro PCR reakci se museli vzorky naředit na zhruba 70 ng/ μ l.

Koncentrace byla změřena pomocí mikroobjemového spektrometru Colibri (Příloha č. 1). Tento přístroj se používá pro měření nejmenších objemů DNA, RNA, bílkovin, atd. Výsledné koncentrace jsou udávány v ng/μl.

Na detektor se nejprve odpipetoval 1 μl blanku (tzn. 1 μl PCR vody), jehož koncentrace je nulová a pak se zjišťovala koncentrace požadovaných vzorků - po 1 μl. Před samotným měřením byl každý vzorek na pár vteřin zvortexován a stočen.

5.5 *Metoda PCR*

Tato metoda se využívá k namnožení určitého úseku DNA. K tomu jsou potřeba dva primery – R (reverse) a F (forward). Ohraničují nám exon, který chceme amplifikovat.

Reagencie

- DNA
- Mastermix Combi PPP (firma Top-Bio)
- Primery (F a R)
- PCR voda

Spotřební materiál

- Špičky
- Mikrozkušavky (0,2 ml)
- Rukavice

Tabulka č. 2 - Sekvence poskytnutých primerů

Primery	Sekvence
LDLR 2253_2256dupGCTG F	5'-GACATCCACCGTCAGGCTAA-3'
LDLR 2253_2256dupGCTG R	5'-AGGGAGGGCCCAGTCTTTAC-3'

Postup

1. Vždy do jedné 0,2 ml zkumavky bylo smícháno zhruba 70 ng DNA, 7,5 μl Mastermixu Combi PPP, 1,5 μl primeru F a 1,5 μl primeru R.
2. Každá zkumavka byla doplněna PCR vodou do celkového objemu 15 μl.
3. Připravené zkumavky byly vloženy do předem nastaveného cycleru.

Tabulka č. 3 - Teplotní profil PCR

	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1.	Počáteční denaturace	95 °C	10 min	1
2.	Denaturace	95 °C	30 s	35
3.	Annealing	60 °C	30 s	
4.	Extenze	72 °C	1 min	
5.	Konečná extenze	72 °C	10 min	1
6.	Chlazení	12 °C	12 hod	1

5.6 Elektroforéza PCR produktů

- Pomocí PCR se může zjistit (ne)přítomnost amplifikovaného úseku a jeho délku. Nejčastěji se hodnotí vizualizací na základě elektroforézy v agarózovém (nebo polyakrylamidovém) gelu a barvením DNA ethidiumbromidem za použití UV transluminátoru (Sršeň a Sršňová, 2000). Byl použit UV Transilluminator a detekční systém, Uvitec Cambridge, UVISAVE HD5 (Příloha č. 3).

Reagencie

- Rotiphorese 10x TBE-Puffer (firma ROTH)
- Destilovaná voda
- Agarose ITM (firma Amresco)
- Ethidium bromide aqueous solution 1 % w/v (firma Serva)
- 100 bp DNA-ladder, equalised (firma ROTH)

Spotřební materiál

- Špičky
- Rukavice

Postup

1. Nejprve byla připravena elektroforetická vana, do které se nalil v poměru 9:1 10x TBE pufr a destilovaná voda.

2. Do odměrného válce bylo odlito 100 ml 10x TBE pufru a na váze zváženo 1,5 g agarózy, obojí se smíchalo ve skleněné kuželové baňce.
3. Baňka byla vložena na cca 1 minutu do mikrovlnné trouby na nejvyšší výkon, dokud nevznikl čirý gelový roztok. Ohřev byl přerušován, aby se obsah mohl promíchat.
4. Baňka byla zchlazena pod proudem studené tekoucí vody a pak byl přidán ethidium bromid – 4 μ l. Vše bylo důkladně promícháno.
5. Rostok byl vylit na elektroforetickou podložku a vložen hřeben.
6. Gel ztuhl po zhruba 15 min., hřeben tak mohl být vyndán a gel byl opatrně přenesen do připravené elektroforetické vany.
7. Do první jamky bylo aplikováno 5 μ l 100 bp DNA-ladder. Do ostatních jamek byly odpipetovány vzorky, vždy po 5 μ l.
8. Elektroforéza byla nastavena na 80 V po dobu 30 min.
9. Výsledky byly zviditelněny pomocí UV transiluminátoru a pomocí kamery převedeny do počítače.

5.7 Enzymatické čištění PCR produktů

Abychom mohli vzorky připravit na sekvenování, musíme je nejprve enzymaticky očistit od přebytečných primerů a deoxynukleotidů.

Metoda byla provedena pomocí komerčního setu EXOSAP od firmy New England Biolabs, která se skládá z dvou enzymů: exonukleázy I (ta degraduje primery, které jsou v PCR produktu navíc) a Shrimp alkalickou fosfatázu (defosforyluje zbytkové deoxynukleotidy).

Reagencie

- PCR produkty
- EXOSAP: Exonuclease I (Exo I) a Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP) (firma NEB)
- PCR voda

Spotřební materiál

- Špičky
- Rukavice
- Zkumavky (0,2 ml a 1,5 ml)

Postup

1. Do 0,2 ml zkumavky bylo napipetováno 5 μ l PCR produktu, 0,5 μ l Exo I a 1 μ l rSAP.
2. Zkumavky byly vloženy do předem nastaveného cycleru.

Tabulka č. 4 - Program EXO na přečištění produktů

	Teplota	Čas
Inkubace	37 °C	15 min
Inaktivace obou enzymů	80 °C	15 min

5.8 Příprava vzorků na sekvenaci

Většina vzorků byla poslána na sekvenaci do firmy GenSeq s.r.o. a tomu předcházela i příprava vzorků. Nejprve musela být změřena koncentrace přečištěných vzorků, protože koncentrace přečištěného PCR produktu se musela pohybovat v rozmezí 20–80 ng/ μ l DNA.

Reagencie

- Přečištěný PCR produkt
- PCR voda
- Primery (o koncentraci 5 pmol/ μ l)

Spotřební materiál

- Zkumavky 1,5 ml
- Špičky
- Rukavice

Postup

1. Vzorky byly naředěny zhruba na 50 ng/ μ l s PCR vodou.
2. Vždy do dvou 1,5 ml zkumavek bylo napipetováno 5 μ l naředěného templátu DNA a do jedné 5 μ l primeru R a do druhé 5 μ l primeru F.
3. Zkumavky se označily čárovými kódy.

5.9 Sekvenační PCR reakce

Dva vzorky byly osekvenovány v Thomayerově nemocnici na Oddělení lékařské genetiky pod vedením Ing. Tomáše Nixe, Ph.D.

Předchozí příprava vzorků probíhala stejně, jen byla vynechána kapitola 5.8 Příprava vzorků na sekvenaci.

Reagencie

- Přečištěná a naředěná DNA

- Primery
- PCR voda
- Big Dye Terminátor 3.1 SEQ
- Dilution buffer ABI

Spotřební materiál

- Zkumavky
- Špičky
- Rukavice

Postup

1. Vždy do dvou zkumavek bylo napipetováno 5 μ l DNA, 2 μ l Dilution buffer ABI, 0,5 μ l Big Dye Terminátor, pak do jedné ze zkumavek 1 μ l primeru R a do druhé 1 μ l primeru F a nakonec do obou 1,5 μ l PCR vody.
2. Zkumavky byly vloženy do předem nastaveného cycleru.

Tabulka č. 5 - Program sekvenační PCR reakce

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1.	96 °C	1 min	1
2.	96 °C	10 s	25
3.	50 °C	10 s	
4.	60 °C	4 min	
5.	12 °C	24 hod	1

5.10 *Přečištění sekvenčního produktu a sekvenování*

Před samotnou sekvenční analýzou musely být vzorky purifikovány, abychom odstranili nežádoucí přebytky reakce. Celý objem byl přečištěn přes kolonku.

Sekvenace byla provedena na analyzátoru ABI 3130, který pracuje na principu kapilární elektroforézy. Metoda je se používá k fragmentační analýze (rozděluje PCR produkty podle velikosti) a k sekvenování (kdy dojde k Sangerově sekvenaci amplifikovaných úseků).

Dnes je většina moderních přístrojů zavedena na principu kapilární elektroforézy, která po skončení syntézy DNA umožní řazení fragmentů DNA podle velikosti. Detektor zaznamenává a odlišuje jednotlivá fluorescenční barviva (jsou jimi značené koncové dideoxynukleotidy). Automaticky tak odečítá sekvence zkoumané DNA (Kočárek, 2007).

Reagencie

- PCR produkt
- FA (formamid)

Spotřební materiál

- Kolonka s tekutinou
- Sběrná kolonka navíc
- Špičky
- Rukavice

Postup

1. U kolonky se otočilo víčko o polovinu otáčky a ulomilo se dno. Kolonka se dala stočit na 2800 otáček/min na 2 min.
2. Tekutina byla zlikvidována a dala se nová sběrná kolonka, do které byl napipetován celý sekvenační produkt.
3. Vše bylo stočeno na 2 800 otáček/min pro dobu 2 min.
4. Do zkumavek bylo napipetováno 10 μ l sekvenačního produktu a 5 μ l formamidu.
5. Zkumavky byly vloženy do sekvenátoru.

6 Výsledky

Ve své práci jsem se věnovala genu pro LDLR. Gen se nachází na krátkých ramenech 19. chromozomu, analyzován byl pouze exon 15.

Mým cílem bylo osekvenovat 15 anonymizovaných vzorků a pomocí přečtení těchto sekvencí v programu BioEdit a srovnání s databází NCBI (National Centre for Biotechnology Information) zjistit, jestli budou ve vzorcích nějaké změny v genotypu.

6.1 Měření koncentrace vyizolovaných vzorků DNA

Koncentrace byla na nanodropu u každého vzorku změřena dvakrát, aby se zabránilo vzniku chyby. Oba výsledky by se neměli výrazně lišit.

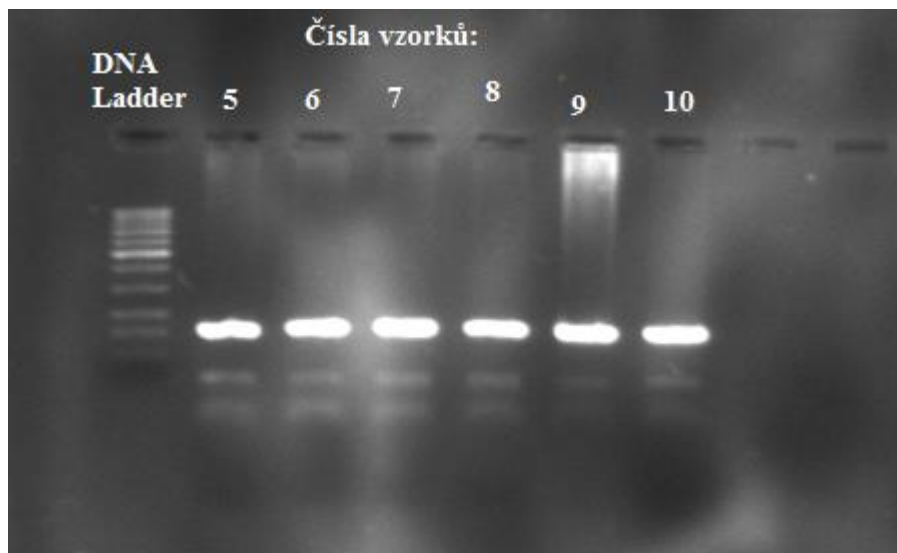
Tabulka č. 6 - Koncentrace vyizolovaných vzorků DNA

Číslo vzorku	Koncentrace (ng/μl)	
	1. měření	2. měření
Blank	0	0
1	137,90	138,54
2	554,80	554,98
3	586,85	588,20
4	870,00	868,90
5	892,01	892,57
6	23,76	23,05
7	27,36	28,10
8	166,27	164,83
9	68,03	68,90
10	999,81	997,99
11	126,61	127,00
12	48,11	49,21
13	765,08	763,74
14	68,75	65,80
15	343,31	345,00

Po zjištění koncentrací byly vzorky naředěny na koncentraci cca 70 ng/μl, abychom s nimi mohli dále pracovat.

6.2 Optimalizace metody PCR

Cílem optimalizace PCR reakce bylo najít vhodný teplotní profil pro vyšetřovaný exon. Byl použit doporučený protokol z Oddělení lékařské genetiky v Thomayerově nemocnici (Tab. č. 3). Reakce byla provedena v celkovém objemu 15 μ l a nejprve jen na prvních dvou vzorcích. Po skončení reakce byla přítomnost produktu ověřena gelovou elektroforézou (Příloha č. 2).



Obrázek č. 5 - Ověření amplifikace vzorků gelovou elektroforézou.

Po provedení elektroforézy se hned na gelu pod UV světlem objevily produkty. Výsledky první amplifikace byly úspěšné, a tak jsem mohla pokračovat v dalším postupu.

6.3 Měření koncentrace před sekvenací

Před posláním enzymaticky přečištěných PCR produktů na sekvenaci musela být opět zjištěna jejich koncentrace, aby mohly být naředěny PCR vodou na požadovanou koncentraci 20–80 ng/ μ l.

Tabulka č. 7 - Koncentrace vzorků pro sekvenaci

Číslo vzorku	Koncentrace (ng/ μ l)
Blank	0
1.	593,82
2.	459,71
3.	548,42
4.	428,95

5.	493,04
6.	603,69
7.	320,73
8.	466,00
9.	573,61
10.	539,75
11.	458,71
12.	395,20
13.	527,50
14.	447,66
15:	492,50

6.4 Identifikace mutací

Sekvence od firmy GenSeq s.r.o. a z Thomayerovy nemocnice byly získány Sangerovou metodou a byly hodnoceny ve volně přístupném programu BioEdit.

V programu jsem si otevřela dvě sekvence (vždy od jednoho vzorku – forward i reverse). Nejprve jsem si oba chromatogramy prohlédla a zhodnotila jejich kvalitu a délku. Pak jsem se už mohla zaměřit, zda tam na první pohled nebude nějaká mutace. Pomocí programu jsem si mohla zjistit velikost sekvencí, zastoupení nukleotidů (Příloha č. 4) nebo třeba počet a umístění aminokyselin v dané sekvenci (Příloha č. 5). Dále jsem mohla vytvářet aligmenty, tzn. zjistit homologii jednotlivých bází. Nejprve jsem si otočila reversní sekvenci a následně ji zkopírovala k forwardové. Zadala jsem v programu vytvořit aligment a upravila ho („ustříhla“ dlouhé konce) a zjišťovala jsem shodu sekvencí jednoho vzorku.

Každou sekvenci jsem jednotlivě zkopírovala a srovnala s databází NCBI. 100% shoda znamenala, že vzorek je beze změn v daném úseku genu. Při neshodě jsem dál v databázi hledala, zda změna něco znamená.

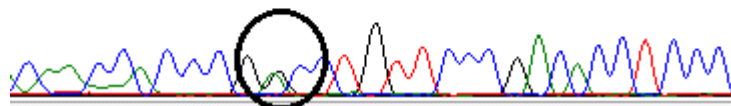
Jelikož byl použit jen jeden pár primerů, všechny vzorky byly osekvenovány na stejném lokusu 13.2. Sekvence byly dlouhé zhruba 140 pb.

Z celkového počtu patnácti vzorků byl jen jeden bez jakékoliv mutace (vzorek č. 15).

Ale u dvanácti vzorků (kromě č. 2, 7 a 15) byla nalezena ta samá mutace NM_000527.4(LDLR):c2232A>G (p. Arg774=). Mutace je klasifikována jako benigní.

Můžeme ji nazvat i jako synonymní (tichou) mutaci, při které nedochází ke změně kódované aminokyseliny (argininu) a kodon zůstává stejný. Mutace je germinální, tedy vrozená a ve vzorcích se vyskytuje v heterozygotním stavu.

.CAA CCA CCC GACCT GTT CCC GACACCT CCC



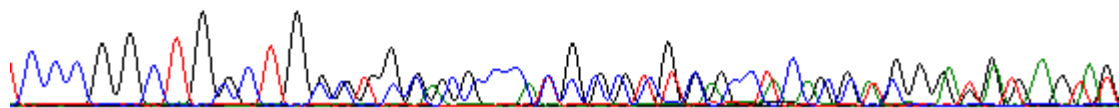
Obrázek č. 6 - Mutace NM_000527.4(LDLR):c.2232A>G (p. Arg774=).

U vzorku č. 10 byla nalezena jak výše uvedená mutace, tak ještě mutace v oblasti intronu (T>A). Mutace není v databázi popsána a při tvorbě mRNA jsou intronové části vystřiženy a nepřekládají se do proteinu. Mutace je tedy bezvýznamná.

Ve vzorku č. 7 byla nalezena mutace NM_000527.4(LDLR):c.2225C>T (p.Thr742Ile), která je uváděna jako pravděpodobně benigní (konfliktní interpretace patogenity/nejistý význam). Mutace mění jednu bázi, tzn. že pacient má odlišnou aminokyselinovou sekvenci, ale délka sekvence je zachována. Mutace je germinální, v heterozygotním stavu.

U vzorku č. 2 byla nalezena mutace NM_000527.4(LDLR):c.2253_2256dupGCTG (p.Pro753Alafs). Je to patogenní duplikace, která narušuje translační čtecí rámeček, protože počet duplikovaných nukleotidů není násobkem tří. Je to dědičná autosomálně dominantní mutace způsobující familiární hypercholesterolémii. Je v heterozygotním stavu a způsobuje ztrátu funkce proteinu v důsledku jeho prodloužení.

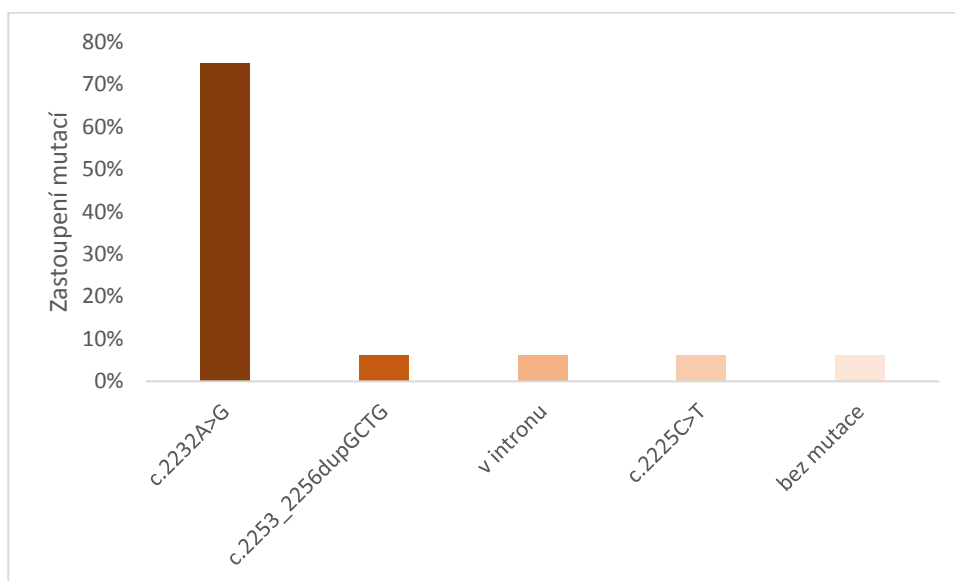
50 60 70 80 90
' C C C G G C T G G C T G G C T G G G C C C G C C T G G G C T C G G T G G G T G T A G A G '



Obrázek č. 7 - Mutace NM_000527.4(LDLR):c.2253_2256dupGCTG (p.Pro753Alafs).

Tabulka č. 8 - Celkový přehled výsledků získaných sekvenováním.

Číslo vzorku	Číslo mutace	Exon/intron	Kodón	Nukleotidová záměna	Typ	AMK záměna
1	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
2	rs1555808111	exon	CCT>GCTGCT	c.2253_2256dupGCTG	heterozygot	Pro753Alafs
3	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
4	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
5	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
6	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
7	rs767546791	exon	ACC>ATC	c.2225C>T	heterozygot	Thr742Ile
8	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
9	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
10	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
	nepopsána	intron	CCA>CCT	A>T	-	-
11	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
12	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
13	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
14	rs5927	exon	CGA>CGG	c.2232A>G	heterozygot	Arg774Arg
15	-	-	-	-	-	-



Graf č. 1 -Procentuální přehled zastoupení mutací

7 Diskuze

Pro tuto bakalářskou práci bylo poskytnuto 15 vzorků DNA spolu s předem navrženými a připravenými primery ke zkoumání lokusu 19p13.2 na genu pro LDLR. Pro vyšetření těchto vzorků jsem navrhla metodu PCR a Sangerovo sekvenování. Výsledné sekvence jsem porovnávala s mezinárodní databází NCBI.

U dvanácti vzorků jsem našla mutaci NM_000527.4(LDLR):c.2232A>G (p.Arg774=), která je ale pro pacienty nevýznamná a nijak se u nich fenotypově neprojevuje. Nedochozí totiž ke změně kódované aminokyseliny ani k záměně kodonu.

U jednoho vzorku jsem současně s touto mutací našla ještě další v databázi nepopsanou v oblasti intronu. Ta ale také nemá velký význam, protože při tvorbě genového produktu (proteinu) jsou introny nekódující sekvencí – jsou tzv. vystříženy. Bohužel jejich funkce zatím ještě není stále zcela objasněna, přitom u člověka tvoří většinu genomu.

Dále jsem našla mutaci NM_000527.4(LDLR):c.2225C>T (p.Thr742Ile), která je uvedena jako pravděpodobně benigní, se zatím nejistým významem. V databázi LOVD (Leiden Open Variation Database), na kterou odkazuje NCBI je uvedeno, že by neměla pravděpodobně narušovat funkci proteinu.

Poslední nalezenou mutací byla duplikace NM_000527.4(LDLR):c.2253_2256dupGCTG (p.Pro753Alafs). Jako jediná z nalezených mutací je patogenní a způsobuje u pacienta familiární hypercholesterolémii, což je dědičné autosomálně dominantní onemocnění. Pacient bude mít zvýšenou hladinu LDL-cholesterolu v séru a můžou se u něj projevit i další známky nemoci, které podporuje cholesterol ukládající se v kůži, šlachách a koronárních tepnách. U pacienta se zduplikovaly 4 nukleotidy (není násobkem tří), proto došlo k narušení tripletu při translaci sekvence a tím došlo ke ztrátě funkce proteinu.

Všechny nalezené mutace jsou v heterozygorním stavu a jsou geminální, tzn. vrozené.

8 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo napsat odbornou rešerši o genu pro LDL receptor a shrnout informace o hyperlipidemiích a nalézt mutace přítomné ve vyšetřovaných vzorcích.

V teoretické části jsem se zabývala genem pro LDL receptor a receptorem samotným a způsobem jakým přenáší LDL částice do nitra buněk. Popsala jsem některé zástupce členů genové rodiny. Dále jsem se věnovala dyslipidemiím, jejich hlavnímu příznaku ateroskleróze a léčbě. Nakonec jsem se snažila přiblížit princip polymerázové řetězové reakce (PCR) a Sangerova sekvenování, jelikož byly tyto metody použity v praktické části práce.

V metodické části byla mým úkolem izolace některých vzorků DNA, příprava a provedení PCR, detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy, příprava vzorků na sekvenování a osekvenování dvou vzorků. Nakonec jsem zpracovala získané sekvence v programu BioEdit a porovnávala je s mezinárodní databází NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Z celkového počtu patnácti vzorků byla u dvanácti z nich (vzorky č. 1,3,4,5,6,8,9,10,11,12,13,14) nalezena benigní mutace, u vzorku č. 2 patologická duplikace způsobující familiární hypercholesterolemii, vzorek č. 7 obsahoval mutaci se zatím nejistým významem a vzorek č. 10 měl ještě mutaci v intronu. Všechny uvedené mutace jsou germinální v heterozygotním stavu. Pouze u vzorku č. 15 nebyla nalezena žádná mutace.

9 Seznam literatury

1. ARORA, Kaveri, Jeffrey M. SEQUEIRA a Edward V. QUADROS. Maternofetal transport of vitamin B 12: role of TCbIR/ CD320 and megalin. *The FASEB Journal* [online]. 2017, **31**(7), 3098-3106 [cit. 2018-11-22]. DOI: 10.1096/fj.201700025R. ISSN 0892-6638. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.201700025R>
2. ASCHERMANN, Michael. *Kardiologie*. Praha: Galén, 2004. ISBN 80-7262-290-0.
3. BLÁHA, Milan, Jaroslav MALÝ, J. KMONÍČEK, Ladislav JEBAVÝ, Jan KREJSEK, Pavel MĚŘIČKA, Stanislav FILIP a Pavel ŽÁK. Terapeutická hemaferéza: Therapeutic hemapheresis. *Hematológia a transfuziológia*. 1999, **9**(3), 18-26. ISSN 1335-2075.
4. BLAŽEK, Martin a kol. *Změny parametrů metabolismu a hemostázy u familiární hypercholesterolemie v léčbě LDL - aferézou*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2007. ISBN 978-80-87009-16-1.
5. BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2007. ISBN 978-802-4417-.
6. COOPER, David N. *Nature encyclopedia of the human genome*. New York: Nature Pub. Group, 2003. ISBN 0-333-80386-8.
7. ČEŠKA, Richard. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. Praha: Triton, 2005. ISBN 80-7254-738-0.
8. ČEŠKA, prof. MUDr. Richard, MUDr. Martina PRUSÍKOVÁ a MUDr. Michaela ŠNEJDRLOVÁ. Predikce a prevence aterosklerózy a personalizovaná léčba dyslipidemií. *Kardiologická revue*. Centrum preventivní kardiologie, III. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha, 2011, **13**(2), 81-86.
9. DEFESCHE, Joep. Low-Density Lipoprotein Receptor-Its Structure, Function, and Mutations. *Seminars in Vascular Medicine* [online]. 2004, **4**(01), 5-11 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1055/s-2004-822993. ISSN 1528-9648.
10. ELROD, Susan L. a William D. STANSFIELD. *Schaum's outlines: genetics*. 5th ed. New York: Mcgraw-Hill, c2010. ISBN 978-0-07-162503-6.
11. FRY, Mitchell. *Essential biochemistry for medicine*. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-0-470-74327-0.
12. GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2013, **133**(3), 1-4 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1038/jid.2013.1. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>
13. GIBSON, Greg a Spencer V. MUSE. *A primer of genome science*. 3rd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, c2009. ISBN 978-0-87893-236-8.
14. GOLDSTEIN, Joseph L. a Michael S. BROWN. The LDL Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2009, **29**(4), 431-438 [cit. 2018-10-09]. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.179564. ISSN 1079-5642. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.108.179564>
15. GORDON, Bruce R., Sheryl F. KELSEY, Peter C. DAU, et al. Long-Term Effects of Low-Density Lipoprotein Apheresis Using an Automated Dextran Sulfate Cellulose Adsorption System
This study was supported by a grant from the Kaneka America Corporation, New York, New York. *The American*

- Journal of Cardiology* [online]. 1998, **81**(4), 407-411 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1016/S0002-9149(97)00947-8. ISSN 00029149. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002914997009478>
16. GREEN, Michael R., Joseph SAMBROOK a Joseph SAMBROOK. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2012. ISBN isbn19-361-1342-2.
 17. HANSSON, Göran K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine* [online]. 2005, **352**(16), 1685-1695 [cit. 2018-11-26]. DOI: 10.1056/NEJMra043430. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra043430>
 18. INSULL, William. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *The American Journal of Medicine* [online]. 2009, **122**(1), S3-S14 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/j.amjmed.2008.10.013. ISSN 00029343. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934308010176>
 19. JANSKÝ, Petr, Hana ROSLOVÁ a Michal VRABLÍK. 2016 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *Cor et Vasa* [online]. 2017, **59**(4), e389-e415 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1016/j.crvasa.2017.03.007. ISSN 00108650. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010865017300371>
 20. KHAN, Samia Perwaiz. Single step PCR for the identification of low density lipoprotein receptor (LDL-R) gene mutations. *Pakistan Journal of Medical Sciences* [online]. 2014, **30**(4) [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.12669/pjms.304.4711. ISSN 1681-715X. Dostupné z: <http://pjms.com.pk/index.php/pjms/article/view/4711>
 21. KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 978-80-7013-450-4.
 22. KOLÁŘ, Jiří. *Kardiologie pro sestry intenzivní péče*. 4., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2009. ISBN 978-80-7262-604-5.
 23. KROON, Abraham A., Wim R.M. AENGEVAEREN, Tjeerd VAN DER WERF, Gerard J.H. UIJEN, Johan H.C. REIBER, Albert V.G. BRUSCHKE a Anton F.H. STALENHOF. LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS). *Circulation* [online]. 1996, **93**(10), 1826-1835 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1161/01.CIR.93.10.1826. ISSN 0009-7322. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.93.10.1826>
 24. KUCHEL, Philip W. *Schaum's outlines: biochemistry*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, c2009. Schaum's outline series. ISBN 9780071472272.
 25. LIN, Jing-Ping, Yevgeniya A MIRONOVA, Peter SHRAGER a Roman J GIGER. LRP1 regulates peroxisome biogenesis and cholesterol homeostasis in oligodendrocytes and is required for proper CNS myelin development and repair. *ELife* [online]. 2017, **6**, 30 [cit. 2018-11-05]. DOI: 10.7554/eLife.30498. ISSN 2050-084X. Dostupné z: <https://elifesciences.org/articles/30498>
 26. MARSHALL, William J, S. K BANGERT a Marta LAPSLEY. *Clinical chemistry*. 6th ed. Edinburgh: Mosby Elsevier, c2008. ISBN 9780723434559.
 27. MAXAM, AM. a W. GILBERT. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [online]. 1977, 1977, **74**(2), 560-564 [cit. 2019-03-31].

28. MULLIS, Kary B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* [online]. 1990, **262**(4), 56-65 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1038/scientificamerican0490-56. ISSN 0036-8733. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/scientificamerican0490-56>
29. MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. Praha: H & H, 1998. Lange medical book. ISBN 80-85787-38-5.
30. NI, Shaobin, Jianran HU, Yongshun DUAN, Shuliang SHI, Ruo LI, Hongjin WU, Youpeng QU a Yu LI. Down expression of LRP1B promotes cell migration via RhoA/Cdc42 pathway and actin cytoskeleton remodeling in renal cell cancer. *Cancer Science* [online]. 2013, **104**(7), 817-825 [cit. 2018-11-22]. DOI: 10.1111/cas.12157. ISSN 13479032. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/cas.12157>
31. ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*. 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2000. ISBN 80-9025624-4.
32. SCHNEIDER, Wolfgang Johann. Low-density Lipoprotein Receptor (LDLR) Family: Genetics and Evolution. COOPER, David N. *Nature encyclopedia of the human genome*. New York: Nature Pub. Group, 2003, 752 - 756. ISBN 0-333-80386-8.
33. SOŠKA, Vladimír. *Poruchy metabolismu lipidů: diagnostika a léčba*. Praha: Grada, 2001. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-0234-7.
34. SRŠEŇ, Štefan a Klára SRŠŇOVÁ. *Základy klinické genetiky a její molekulární podstata*. 3., preprac. a rozš. vyd. Martin: Osveta, 2000. ISBN 80-8063-021-6.
35. STEJSKAL, David. *Ateroskleróza: etiopatogeneze, diagnostika a léčba*. Praha: Bristol-Myers Squibb, 1999.
36. STELLWAGEN, Nancy C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2009, **30**(S1), S188-S195 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1002/elps.200900052. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200900052>
37. SUDHOF, T., J. GOLDSTEIN, M. BROWN a D. RUSSELL. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* [online]. 1985, **228**(4701), 815-822 [cit. 2018-10-12]. DOI: 10.1126/science.2988123. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2988123>
38. ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
39. WANG, Zhiqiang, Peng SUN, Chun GAO, et al. Down-regulation of LRP1B in colon cancer promoted the growth and migration of cancer cells. *Experimental Cell Research* [online]. 2017, **357**(1), 1-8 [cit. 2018-11-22]. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.04.010. ISSN 00144827. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482717302173>
40. XIAN, Xunde, Yinyuan DING, Marco DIECKMANN, et al. LRP1 integrates murine macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responses in atherosclerosis. *ELife* [online]. 2017, **6** [cit. 2018-11-22]. DOI:

10.7554/eLife.29292. ISSN 2050-084X. Dostupné z:
<https://elifesciences.org/articles/29292>

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek č. 1 - Dráha LDL receptoru.....	13
Obrázek č. 2 - Navázání primerů.....	26
Obrázek č. 3 - Základ PCR - 1. a 2. cyklus.....	27
Obrázek č. 4 - Princip sekvenční analýzy DNA.....	30
Obrázek č. 5 - Ověření amplifikace vzorků gelovou elektroforézou.....	42
Obrázek č. 6 - Mutace NM_000527.4(LDLR):c.2232A>G (p. Arg774=).....	44
Obrázek č. 7 - Mutace NM_000527.4(LDLR):c.2253_2256dupGCTG (p.Pro753Alafs)	44
Tabulka č. 1 - Nejvýznamnější členové rodiny LDLR.....	14
Tabulka č. 2 - Sekvence poskytnutých primerů.....	35
Tabulka č. 3 - Teplotní profil PCR.....	36
Tabulka č. 4 - Program EXO na přečištění produktů.....	38
Tabulka č. 5 - Program sekvenační PCR reakce.....	39
Tabulka č. 6 - Koncentrace vyizolovaných vzorků DNA.....	41
Tabulka č. 7 - Koncentrace vzorků před sekvenací.....	42
Tabulka č. 8 - Celkový přehled výsledků získaných sekvenováním.....	45
Graf č. 1 -Procentuální přehled zastoupení mutací.....	45

Seznam zkratek

LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
NCBI	National Center for Biotechnology Information
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FH	Familiární hypercholesterolémie
Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A
HDL	High density lipoprotein
ApoA	Apolipoprotein A
ApoB (ApoB-100)	Apolipoprotein B
ApoC	Apolipoprotein C
ApoE	Apolipoprotein E
VLDL	Very low density lipoprotein
IDL	Intermediate density lipoprotein
ACAT	Acetylkoenzym A cholesteryl transferáza
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A
SREBP	Sterol regulated element binding protein
LRP1	Low density lipoprotein-related protein 1
LRP2	Low density lipoprotein-related protein 2
VLDLR	Very low density lipoprotein receptor
LR11	Low density lipoprotein-related 11
ApoER2	Apolipoprotein E receptor type 2
LRP3	Low density lipoprotein-related protein 3
LRP4	Low density lipoprotein-related protein 4
LRP5	Low density lipoprotein-related protein 5
LRP6	Low density lipoprotein-related protein 6
LRP32	Low density lipoprotein-related 32
TGF β	Transforming growth factor β
PDGF	Plateled derived growth factor
HLP	Hyperlipoproteinémie
ISCH	Ischemická choroba srdeční
FKH	Familiární kombinovaná hyperlipidémie
HELP	Heparin induced extracorporeal LDL precipitation

DALI	Direct adsorption of lipids
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce)
RT-PCR	Reverse-transcription PCR
AS-PCR	Allele-specific PCR
dNTP	Deoxyribonukleotidtrifosfát
ddNTP	2',3'-dideoxyribonukleotidtrifosfát

Přílohy

Příloha č. 1



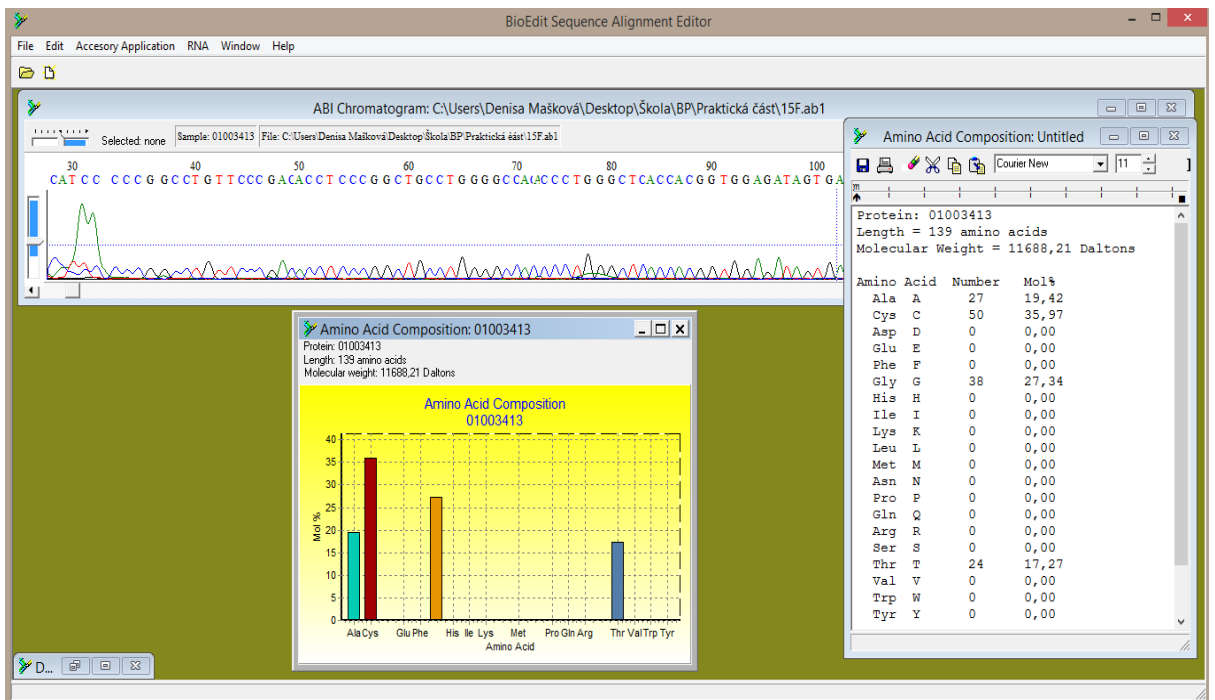
Příloha č. 2



Příloha č. 3



Příloha č. 4



Příloha č. 5

