



**Univerzita Palackého V Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Laboratoř růstových regulátorů**

**Využití polymerázové řetězové reakce v reálném čase  
pro analýzu kandidátních genů pro aterosklerózu**

**Bakalářská práce**

Autorka:	<b>Adéla Špičánová</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2013

## **Bibliografická identifikace**

<u>Jméno a příjmení autora:</u>	Adéla Špičánová
<u>Název bakalářské práce:</u>	Využití polymerázové řetězové reakce v reálném čase pro analýzu kandidátních genů pro aterosklerózu
<u>Pracoviště:</u>	Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc
<u>Vedoucí bakalářské práce:</u>	Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.
<u>Rok obhajoby bakalářské práce:</u>	2013
<u>Souhrn:</u>	<p>Bakalářská práce se zabývá využitím polymerázové řetězové reakce jako detekční metody pro určení SNPs kandidátních genů pro aterosklerózu. V teoretické části se zaměřuje na rizikové faktory aterosklerózy a klasifikaci hlavních lipoproteinových tříd. Aterosklerotické změny jsou z velké části ovlivňovány rizikovými faktory, které se dělí na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné patří především genetická predispozice k danému onemocnění. K identifikaci genů a polymorfizmů svázaných s různými symptomy slouží mimo jiné i tzv. analýza kandidátních genů. K této analýze se využívají různé molekulárně biologické metody. Praktická část se zabývá ověřením metody pro určení polymorfismu na genu pro PON1 Gln192-Arg metodou PCR v reálném čase na reálných vzorcích pacientů.</p>
<u>Klíčová slova:</u>	ateroskleróza, rizikové faktory, lipoproteiny, kandidátní geny, SNP, paraoxonáza, izolace DNA, PCR v reálném čase
<u>Počet stran:</u>	45
<u>Počet příloh:</u>	0
<u>Jazyk:</u>	český

## **Bibliographical identification**

<u>Autor's first name and surname:</u>	Adéla Špičánová
<u>Title of theses:</u> the	Use of polymerase chain reaction in real time for analysis of candidate genes for atherosclerosis
<u>Department:</u>	Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc
<u>Supervisor:</u>	Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.
The year of presentation:	2013
<u>Summary:</u>	Bachelor thesis deals with the use of polymerase chain reaction as a detection method for determining SNPs of candidate genes for atherosclerosis. The theoretical part is focused on the risk factors of atherosclerosis and the classification of the major classes of lipoprotein. Atherosclerotic changes are largely influenced by the risk factors which are divided into manageable and beyond our control. Among the ones beyond our control include genetic predisposition to the disease. Among other methods the analysis of candidate genes can be used to identify the genes and polymorphism bound to a variety of symptoms. This analysis uses a variety of molecular biological methods. The practical part deals with the verification of the method for the determination of polymorphism in the gene for PON1 Gln192-Arg using real-time PCR on blood samples of patients.
<u>Keywords:</u>	atherosclerosis, risk factors, lipoproteins, candidate genes, SNPs, paraoxonase, DNA isolation, real time PCR
<u>Number of pages:</u>	45
<u>Number of appendices:</u>	0
<u>Language:</u>	Czech

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Dalibora Novotného, Ph.D. a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

V Olomouci dne:.....

.....

Adéla Špičánová

### Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Daliborovi Novotnému, Ph.D. za jeho odborné vedení, připomínky, cenné rady a pomoc při zpracovávání mé bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat paní Bc. Margitě Bartkové za pomoc a ochotu při realizaci měření. Také velké díky patří mé rodině a příteli za podporu a trpělivost při sepisování své práce.

## Obsah

Seznam použitých zkratek .....	9
Teoretická část .....	10
1 Úvod .....	11
1.1 Ateroskleróza .....	11
1.1.1 Etiopatogeneze aterosklerózy .....	12
1.1.2 Rizikové faktory .....	14
1.2 Lipidy .....	17
1.3 Lipoproteiny .....	18
1.3.1 Chylomikrony .....	18
1.3.2 Lipoproteiny o velmi nízké hustotě .....	18
1.3.3 Lipoproteiny o střední hustotě .....	19
1.3.4 Lipoproteiny o nízké hustotě .....	19
1.3.5 Lipoproteiny o vysoké hustotě .....	19
Obr. 3. Hlavní třídy lipoproteinů .....	21
1.4 Základní laboratorní vyšetření ve vztahu k rozvoji aterosklerózy .....	22
1.5 Kandidátní geny pro aterosklerózu .....	22
1.5.1 Molekulárně genetické studie .....	24
1.6 Paraoxonáza .....	24
1.6.1 Polymorfismy genů pro PON1 .....	25
1.6.2 Paraoxonáza ve vztahu s aterosklerózou .....	25
1.7 Metody molekulární biologie používané pro analýzu SNPs .....	27
1.7.1 Možnosti izolace genomové DNA .....	27
1.7.2 PCR v reálném čase .....	28
8 Cíle bakalářské práce .....	29
Experimentální část .....	30
2 Metodika .....	31
2.1 Použitá přístrojová technika, materiál, roztoky a chemikálie .....	31
2.2 Postup izolace deoxyribonukleové kyseliny (DNA) .....	32
2.3 Izolace genomové DNA – určení čistoty, výpočet koncentrace .....	33
2.4. Metoda PCR v reálném čase pro určení PON1 192 polymorfismu .....	34
3 Výsledky studie a diskuse .....	37
3.1 Izolace deoxyribonukleové kyseliny a následné určení čistoty a koncentrace .....	37

3.2	Metoda PCR v reálném čase pro určení PON 192 polymorfismu .....	38
4	Závěr .....	40
	Seznam použité literatury .....	42
	Seznam zdrojů použitých obrázků .....	45



## Seznam použitých zkratek

HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
TAG	triacylglyceroly
NO	oxid dusnatý
ICHS	ischemická choroba srdeční
SNP	jednonukleotidový polimorfismus
PON1	paraoxonáza 1
NaCl	chlorid sodný
HMG-CoA-reduktáza	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzym A-reduktáza
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
IDL	lipoproteiny o středně nízké hustotě
LCAT	lecitin-cholesterol: acyltransferáza
IM	infarkt myokardu
CAO	onemocnění koronárních tepen
KVO	kardiovaskulární onemocnění

## **Teoretická část**

# 1 Úvod

## 1.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je definovaná jako komplexní kombinace poruch lipidového transportu, metabolické nemoci a chronické zánětlivé reakce, při které vznikají proměnlivé změny v intimně a medii tepen. Je to dlouhodobý zánětlivý proces měnící strukturu stěny tepny, která je poškozená chemickými, biochemickými i fyzikálními vlivy. (M. Štejf a spol., 2007, A. Šafránková, M. Nejedlá, 2006).

Vznik aterosklerotických změn má mnoho příčin. Jedním z klíčových faktorů je průnik modifikovaných nízkodenzitních lipoproteinů (LDL) endotelem, což způsobuje jeho poškození a následně poranění cévní stěny. Dalším faktorem je invaze monocytů z krevního řečiště k poškozenému místu a jejich přeměna na makrofágy, které fagocytují lipidy. Následuje invaze a proliferace buněk hladkého svalstva, syntéza pojivové tkáně, zmnožení vaziva, komplikované kalcifikace až vznik trombů, které mohou způsobit nekrózu myokardu, který je danou tepnou zásobován. (Šafránková A., Nejedlá M., 2006).

Aterosklerotické změny jsou z velké části ovlivňovány rizikovými faktory. Dají se dělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi ovlivnitelné patří dyslipoproteinémie, diabetes mellitus, hypertenze, obezita, kouření a tělesná inaktivita. Neovlivnitelné faktory jsou věk, pohlaví a genetické faktory. (M. Štejf a spolupracovníci, 1995, M. Štejf a spolupracovníci, 2007).

Genetická predispozice k danému onemocnění zahrnuje řádově několik stovek genů působících v řadě patologických subsystémů. K identifikaci genetických komponent slouží například analýza tzv. kandidátních genů pro aterosklerózu. Cílem je nalézt geny, které by mohly přispět ke vzniku aterosklerózy nebo jsou zodpovědné za její rozvoj. (Zahálková J., Vaverková H., Novotný D., 1999, Hutýra M., Novotný D., Halenka M., Karásek D., Vaverková H., 2002)

### 1.1.1 Etiopatogeneze aterosklerózy

Příčiny a mechanismy vzniku aterosklerózy nejsou dosud zcela objasněné. Je jisté, že se na jejím vzniku podílí řada mechanismů. Tento proces, tzv. aterogeneze, může v zásadě zahrnovat změny dvojího typu: lipidní změny nebo změny v endotelu cévy. Poškozené endotelové buňky pak sníží tvorbu oxidu dusnatého (NO), jenž je důležitý vazodilatační faktor, který zabraňuje lipidovým molekulám průchod přes stěnu endotelu. Tyto změny na sebe bezprostředně navazují. Aterosklerotické změny se odehrávají už od dětských let a postupem času akcelerují (Šafránková A., Nejedlá M., 2006). Aterogeneze probíhá ve třech stádiích.

- Lipidový proužek. Přes poškozenou stěnu endotelu snadněji a ve velké míře pronikají částice LDL, které jsou modifikovány zejména oxidací (oxLDL), do intimy a medie cévy. Tyto molekuly přitahují z krve monocyty, které přes poškozenou stěnu endotelu snadno prostupují a uvnitř cévy se mění na makrofágy, které fagocytují lipidy. Ty jsou poté tukovými buňkami natolik „přeplněné“, že se mění v pěnové buňky a vytvářejí lipidové proužky. Toto první stádium aterogeneze nevykazuje žádné příznaky, může samo od sebe zmizet nebo se vyvine v další stádium. (Šafránková A., Nejedlá M., 2006).
- Fibrózní plát je tvořen buňkami hladkých svalů, lipoproteinů, vaziva a makrofágy. Prostupuje do lumenu cévy a zužuje jí. Toto stádium obvykle začíná až kolem 30. – 40. roku. Kolem 50. roku se často vyvine v tzv. aterosklerotický plát, jenž se vyznačuje přítomností ateromu, což je dutina ve ztluštělé intimě, ve které vzniká rozpadem pěnových buněk měkká hmota, do které se ukládá vápník. Pokud aterom praskne, nastává další stádium. (Šafránková A., Nejedlá M., 2006).

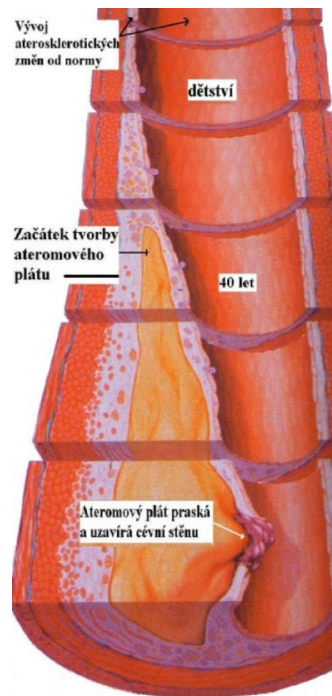
- Ateromový vřed. Vzniká z aterosklerotického plátu, který na svém povrchu praskl. Po takovém poškození proběhne fyziologická reakce a na poškozené místo nasedají trombocyty s následným vznikem trombu, čímž dochází k uzavření cévy. Prasklý plát se může spontánně nebo léčbou zahojit.-(Šafránková A., Nejedlá M., 2006).

Tabulka 1: Nejčastěji postižené tepny

Typ postižené tepny	Poruchy či nemoci, které poškozené tepny způsobují
Mozkové tepny	Poruchy paměti, zapomínání, závrať, poruchy spánku, sluchu
Koronární tepny	Ischemická choroba srdeční (ICHS)
Břišní aorta	Impotence
Renální tepny	Renovaskulární hypertenze až selhání ledvin
Tepny dolních končetin	Ischemická choroba dolních končetin

(Šafránková A., Nejedlá M. , 2006)

Obr. 1. Postupná aterogeneze v intimě cévy s přibývajícím věkem



Rostislav Večeřa, Základy Farmakologie, Hypolipidemika, 2013

## 1.1.2 Rizikové faktory

Charakteristiky, jenž provázejí zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění, se souhrnně nazývají rizikové faktory aterosklerózy. Významně ovlivňují celý průběh aterogeneze. Vliv nepříznivých faktorů závisí na jejich intenzitě, délce působení a kumulaci. Rizikové faktory lze dělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné.

### 1.1.2.1 Faktory neovlivnitelné

- Věk

Manifestace aterosklerózy se zvyšuje s věkem. U mužů je to kolem 45. roku a u žen kolem 55. roku, po menopauze. Kolem 70. roku se výskyt aterosklerotických změn vyrovnává, dokonce se u žen může zvýšit. (M. Štejfá a spolupracovníci, 1995, M. Štejfá a spolupracovníci, 2007)

- Pohlaví

U mužů se aterogeneze objevuje častěji a dříve než u žen. U žen se začíná proces rozvíjet až po menopauze v důsledku změny lipoproteinového profilu při postupném vyhasínání pohlavních hormonů. (M. Štejfá a spolupracovníci, 1995, M. Štejfá a spolupracovníci, 2007)

- Genetické faktory

Při předčasném výskytu kardiovaskulárních nemocí (tzn. u mužů pod 55 let a u žen pod 65 let) a u příbuzných prvního stupně (sourozenci, rodiče, děti), hrají roli pravděpodobně faktory genetické, např. geneticky kódovaná hladina krevního tlaku, cukrů a lipoproteinů, typ koronárního řečiště, atd. (M. Štejfá a spolupracovníci, 1995, M. Štejfá a spolupracovníci, 2007).

Genetické komponenty aterosklerózy mohou být identifikovány pomocí kandidátních genů, u kterých se předpokládá vztah ke sledované poruše. U aterosklerózy, stejně jako u dalších komplexních onemocnění, lze využít analýzu tzv. jednonukleotidových polymorfismů (single nukleotide polymorphisms, SNPs), u kterých dochází ke změně na úrovni jednoho nukleotidu. (D. Novotný, 2010)

Mezi významné kandidátní geny patří např. gen pro paraoxonázu (PON1), která se vyskytuje na vysokodenzitních lipoproteinových (HDL) částicích. Jeho antioxidační účinky napomáhají metabolizovat peroxidy lipidů, a tím brání jejich akumulaci v LDL částicích. (D. Novotný, 2010).

### 1.1.2.2 Faktory ovlivnitelné

- Dyslipoproteinémie, dyslipidémie

Dyslipidémie je skupina metabolických onemocnění, které se projevují změnou koncentrace lipoproteinů i krevních lipidů. Jedná se především o vysokodenzitní lipoproteiny (HDL), nízkodenzitní lipoproteiny (LDL), celkový cholesterol a triacylglyceroly (TAG). Za samostatné rizikové faktory lze považovat zejména zvýšenou koncentraci celkového cholesterolu a LDL cholesterolu a sníženou koncentraci HDL cholesterolu. Za fyziologickou koncentraci celkového cholesterolu v plazmě se považuje hladina pod 5 mmol/l, LDL cholesterolu pod 3 mmol/l a hladina HDL cholesterolu nad 1 mmol/l (Grundy SM, Cleeman JI, Baird CN, et al., 2004). Dyslipoproteinémie se dělí na primární a sekundární. Primární dyslipoproteinémie je způsobená genetickými vlivy. Sekundární je způsobená zevními vlivy, jako jsou obezita, alkoholismus, urémie, nefrotický syndrom, diabetes mellitus, biliární cirhóza, nebo dyslipidémie navozená některými léky (kortikoidy, diuretika, anabolické hormony). Ve většině případů jsou dyslipidémie smíšeného typu. (M. Štejfá a spolupracovníci, 1995, M. Štejfá a spolupracovníci, 2007)

- Kouření

Kouření patří mezi nejvýznamnější preventabilní příčiny lidských nemocí. Cigarety zvyšují hladinu katecholaminů, navozují tachykardii, zvyšují krevní tlak, vzniká koronární trombóza a celkově poškozují endotel cév. (M. Štejfá a spolupracovníci, 1995, M. Štejfá a spolupracovníci, 2007)

- Hypertenze

Riziko projevů kardiovaskulárních nemocí stoupá se vzrůstajícím systolickým i diastolickým krevním tlakem. Faktory pro vznik vysokého krevního tlaku závisí na

věku, pohlaví, rase a etnice, socioekonomické úrovni ale i na výživě, fyzické aktivitě, obezitě, spotřebě alkoholu a vysoké spotřebě chloridu sodného. (M. Štejfa a spolupracovníci, 1995, M. Štejfa a spolupracovníci, 2007)

- Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je závažné metabolické onemocnění, které se projevuje hyperglykemií, zvýšenou hypertenzí, poruchou metabolismu cukrů, tuků a bílkovin jako následek porušené sekrece inzulínu. Diabetes mellitus patří mezi velmi významné rizikové faktory. Toto onemocnění způsobuje celkově rychlejší rozvoj jednotlivých stádií aterosklerózy také i do malých arterií. (M. Štejfa a spolupracovníci, 1995, M. Štejfa a spolupracovníci, 2007).

- Obezita

V rozvinutých zemích se obezita stává nejčastější metabolickou nemocí, vyskytující se v jakémkoli věku u obou pohlaví. Obezita vede k různým chronickým nemocem jako je např. onemocnění žlučníku, rakovině dělohy, prsu aj., ale také ke kardiovaskulárním nemocem, což je spojeno s vyšší hypertenzí, cukrovkou a jinými rizikovými faktory. U mužů se tuk ukládá především v oblasti hrudníku a břicha, u žen naopak v oblasti stehů a hýždí. Proto je základem léčby a prevence kardiovaskulárních nemocí redukovat tělesnou hmotnost. Redukce hmotnosti proto často vede ke snížení celkového cholesterolu i LDL cholesterolu, TAG, glykémie, inzulínu a zvýšení HDL cholesterolu. (M. Štejfa a spolupracovníci, 1995, M. Štejfa a spolupracovníci, 2007)

- Tělesná inaktivita

Sedavý způsob života a celková tělesná inaktivita má nepříznivé podmínky na celkový zdravotní stav člověka. Je spojena s dalšími rizikovými faktory kardiovaskulárních onemocnění, jako je obezita, hypertenze, inzulínová rezistence, vyšší TAG, glykémie, krevní tlak. Zvýšenou tělesnou aktivitou dosáhneme opaku. (M. Štejfa a spolupracovníci, 1995, M. Štejfa a spolupracovníci, 2007)

- Psychosociální zátěž

Negativní emotivní reakce a stres působí vyplavení katecholaminů z dřevě nadledvin a kortizolu z kůry nadledvin. Jejich cílem je mobilizovat zdroje energie z tkání, jako jsou mastné kyseliny a glukóza. Pokud po takové mobilizaci



energetických zásob nenásleduje fyzický výkon a nespotřebují se, přetrvává jejich zvýšená hladina v krvi několik hodin a působí jako jeden z faktorů aterosogeneze. (A. Šafránková, M. Nejedlá, 2006.).

Jak již bylo zmíněno, proces aterosogeneze je multifaktoriální, a tím i částečně ovlivnitelný eliminací vnějších rizikových faktorů. (M. Štejfa a spolupracovníci, 1995, M. Štejfa a spolupracovníci, 2007).

## **1.2 Lipidy**

Lipidy jsou látky, jenž obsahují deriváty vyšších mastných kyselin, které se váží na alkoholy nebo glycerol. Jsou to nepolární látky charakteristické svou nerozpustností ve vodě a rozpustností v organických rozpouštědlech, např. etheru, chloroformu, benzenu atd. V organismu mají důležité a nezastupitelné biologické funkce, např. jsou hlavními funkčními a strukturálními složkami buněčných membrán, neutrální tuky jsou největší využitelnou zásobou energie, transportují vitamíny A, D, E a K v lipoproteinových částicích, lipidy mají izolační vlastnosti – podkožní tuk, ochrana vnitřních orgánů před mechanickým poškozením a ztrátami tepla a elektrická izolace ve formě myelinových obalů na neuronech nervových buněk. (F. Novák, 2002)

V klinické biochemii a laboratorní medicíně je vyšetřování krevních lipidů prakticky synonymem pro stanovení parametrů spojených s metabolismem lipoproteinů a rizikem aterosklerózy. (D. Novotný 2010).

### 1.3 Lipoproteiny

Jelikož jsou lipidy hydrofobní, nemohou se samy v krevním hydrofilním řečišti těla rozpouštět nebo transportovat. Pohybují se díky vazbě na bílkoviny neboli apolipoproteiny. Takto vzniklé molekuly se nazývají lipoproteiny. Jádro lipoproteinu je tvořeno neuspořádanými nepolárními TAG a estery cholesterolu. Na povrchu lipoproteinu se vyskytují proteiny tzv. apolipoproteiny. (P.Štern a kolektiv autorů, 2005)

Kromě transportu mají apolipoproteiny i jiné funkce, např. jsou potřebné pro syntézu a sekreci specifických lipoproteinů, aktivují enzymy modifikující lipoproteiny, vážou se na specifické receptory na povrchu buněk a tím zajišťují odstranění lipoproteinů z krevního oběhu. (P.Štern a kolektiv autorů, 2005)

Z lipoproteinů rozeznáváme pět tříd, které se liší hustotou a elektroforetickou pohyblivostí.

#### 1.3.1 Chylomikrony

Představují lipoproteiny o největší velikosti, s největším podílem lipidů a proto o nejnižší hustotě. Vznikají v buňkách střevního epitelu, jsou uvolněny do lymfy a posléze vnikají do krevního oběhu. Hlavním apolipoproteinem nezbytným pro syntézu chylomikronů je apolipoprotein B48 (apo B48). Dále obsahují také apolipoproteiny třídy A a v plazmě přijímají apo E a apo C. V krevním oběhu štěpí TAG chylomikronů lipoproteinová lipáza, která je součástí povrchové membrány kapilár. Poté, jakožto malé „zbytkové částice“, jsou chylomikrony odstraněny pomocí jater z oběhu. (J. Racek et al., 2006).

#### 1.3.2 Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL, very low density lipoproteins)

Jsou syntetizovány v játrech. Jádro je tvořeno převážně z TAG a na povrchu je fosfolipidová vrstva, do které jsou vnořeny apo B100. Kromě apo B obsahují i malé množství apo E. V plazmě tato forma VLDL přibírá ještě estery cholesterolu a apo C. Prostřednictvím lipoproteinové lipázy ztrácejí opět TAG, fosfolipidy, apo C a apo E jsou přeneseny na další typ lipoproteinů a z VLDL se stávají lipoproteiny o střední hustotě. (F. Novák, 2002, J. Racek et al., 2006)

### 1.3.3 Lipoproteiny o střední hustotě (IDL, intermediate density lipoproteins)

Obsahují značně větší podíl esterů cholesterolu, které se spolu s TAG nacházejí v jádře. Na povrchu mají do fosfolipidové vrstvy vnořeny apo B100 a apo E. IDL jsou vychytávány játry, pomocí jaterní lipázy jsou odstraněny TAG a zbytek apo E a poté jsou přeměněny na další typ lipoproteinů. (F. Novák, 2002, J. Racek et al., 2006)

### 1.3.4 Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL, low density lipoproteins)

Vznikají přeměnou z IDL v játrech a představují hlavní typ lipoproteinů, které přenášejí cholesterol. Jádro je převážně tvořeno estery cholesterolu, povrch pak fosfolipidy, volným cholesterolem a apo B100. Asi 75% LDL je z plazmy vychytáváno játry, zbytek ostatními tkáněmi. Apo B100 je rozpoznáván specifickými receptory na povrchu některých buněčných membrán. Tyto oblasti zprostředkovávají metabolizaci lipoproteinových částic. Tímto způsobem jsou ~~pohlcovány~~ internalizovány i LDL částice, což vede v konečném důsledku k ukládání cholesterolu v cytoplazmě buněk. Tím je inhibována aktivita 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzym A-reduktázy (HMG-CoA-reduktazy), důležitého enzymu pro endogenní syntézu cholesterolu a aktivována tvorba acyl-cholesterolacyltransferasy, která katalyzuje přeměnu volného cholesterolu na estery cholesterolu. (J. Racek et al., 2006)

### 1.3.5 Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL, high density lipoproteins)

HDL částice vznikají v játrech a v tenkém střevě. Jsou tvořeny fosfolipidy a apolipoproteiny AI, AII a E. Od ostatních lipoproteinů přijímají volný cholesterol, který je poté esterifikován a jeho estery jsou ukládány v jádře HDL. Částice nabývá sférického tvaru, nejmenší sférické HDL se značí HDL<sub>3</sub>, po nahromadění dalšího cholesterolu se mění na HDL<sub>2a</sub>. Po výměně cholesterolu za TAG z VLDL se pomocí jaterní lipázy mění HDL<sub>2a</sub> na HDL<sub>3</sub>. Přebytkový cholesterol se tak dostává z buněčných membrán do VLDL částic, pomocí cholesterol-ester transfer proteinu, a vrací se do jater vychytáváním IDL nebo LDL. Tento proces se nazývá reverzní transport cholesterolu. (J. Racek et al., 2006)

Tabulka 2: Přehled apolipoproteinů

<b>Apolipoprotein</b>	<b>Hlavní funkce</b>
AI	Strukturní protein HDL, ligand pro vazbu HDL, aktivátor lecitin-cholesterolacyltransferázy (LCAT), antiaterogenní
AII	Strukturní protein HDL, ligand pro vazbu HDL, aktivátor jaterní lipázy, inhibitor LCAT
AIV	Ligand pro vazbu HDL, aktivátor LCAT
Apo (a)	Snižuje fibrinolýzu, vysoce aterogenní
B48	Strukturní protein pro chylomikrony
B100	Strukturní protein pro VLDL, LDL, IDL, ligand pro LDL-receptor, aterogenní
CI	Aktivátor lipoproteinové lipázy a LCAT
CII	Aktivátor lipoproteinové lipázy a LCAT
CIII	Inhibitor lipoproteinové lipázy, modulátor vazby lipoproteinů bohatých na TAG a na protein podobný LDL-receptoru (LRP)
D	Regulace přenosu esterů cholesterolu
E	Ligand pro LDL-receptor a pro LRP,

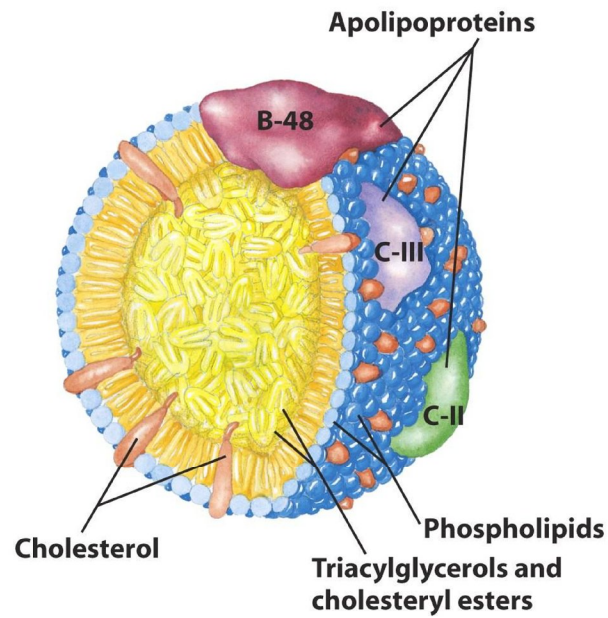
( P. Štern a kolektiv autorů, 2005)

Tabulka 3: Rozdělení a vlastnosti hlavních tříd lipoproteinů

<b>Typ lipoproteinů</b>	<b>Hustota (g/ml)</b>	<b>Elektroforetická pohyblivost</b>	<b>Zdroj</b>	<b>Hlavní apolipoprotein</b>
chylomikrony	Cca 0,980	Zůstávají na startu	Tenké střevo	B48
VLDL	Cca 1,006	Pre $\beta$	játra	B100
IDL	1,006- 1,019	-	Katabolismus VLDL	B100
LDL	1,019- 1,063	$\beta$	Katabolismus IDL	B100
HDL	1,063- 1,210	$\alpha$	Játra, tenké střevo	AI, AII

(J. Racek et al., 2006)

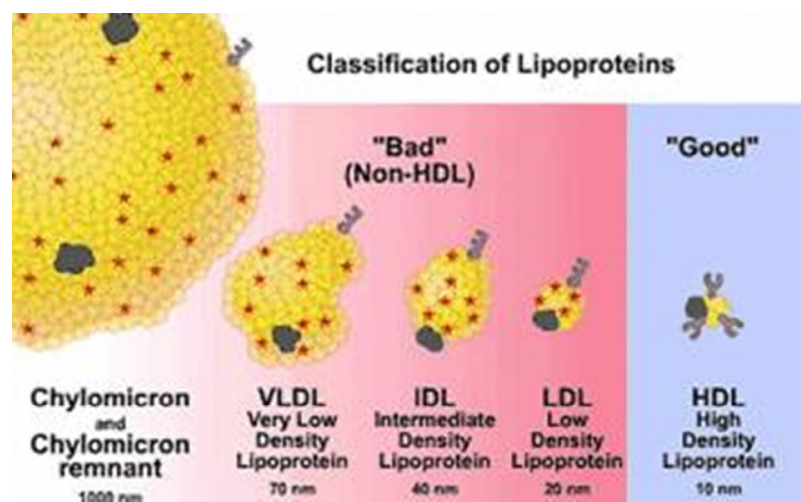
Obr. 2. Pohled na složení lipoproteinů



(Zdroj:

[http://www.lf3.cuni.cz/opencms/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/chemie/vyuka/studijni-materialy/CCBGCH21/pro-kruhy/pl\\_mtb\\_lipidy.pdf](http://www.lf3.cuni.cz/opencms/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/chemie/vyuka/studijni-materialy/CCBGCH21/pro-kruhy/pl_mtb_lipidy.pdf))

Obr. 3. Hlavní třídy lipoproteinů



(Zdroj: <http://blog.caloricious.com/2011/07/27/4-types-of-lipoproteins-present-in-the-body/>)

## **1.4 Základní laboratorní vyšetření ve vztahu k rozvoji aterosklerózy**

### **Stanovení lipidových a lipoproteinových parametrů v klinické biochemii**

Při detekci rozvoje aterosklerózy a s ní spojených klinických projevů u daného jedince (tj. v primární péči), popř. při sledování pacientů po prodělané kardiovaskulární, cerebrovaskulární či jiné příhodě (sekundární péče) hraje kvantitativní stanovení lipidových parametrů nezastupitelnou úlohu. Dyslipidémie je jedním z hlavních rizikových faktorů onemocnění a na rozdíl od neovlivnitelných faktorů, jako jsou např. věk, pohlaví, genová determinace onemocnění či pozitivní rodinná anamnéza, lze hladinu lipidových parametrů ovlivňovat změnou životního stylu, dietoterapeuticky či farmakoterapeuticky. Řada lipidových analytů figuruje v mezinárodních a národních odborných lékařských doporučeních jako tzv. terapeutický cíl, tzn., že smyslem terapie je snížit jejich hladinu pod určitou cílovou hodnotu (celkový a LDL cholesterol).

Obvyklé vyšetřovací algoritmy

Základní lipidový panel: celkový cholesterol, triacylglyceroly, HDL cholesterol

Rozšířený lipidový panel: celkový cholesterol, triacylglyceroly, HDL cholesterol, LDL cholesterol, apolipoprotein A I, apolipoprotein B, lipoprotein (a). (D. Novotný, 2010).

## **1.5 Kandidátní geny pro aterosklerózu**

Expres aterosklerózy závisí mj. na interakci vnějších a genetických faktorů. Bylo již zmíněno, že genetická predispozice k ateroskleróze zahrnuje celou řadu genů. Ve většině případů se jedná o tzv. minoritní geny (multigenní onemocnění), kde se sleduje zastoupení více variant většího počtu genů. V některých případech, např. při familiární hypercholesterolemii, lze určit spojitost onemocnění pouze s jedním majoritním genem (monogenní onemocnění). Cílem studií ve vztahu k ateroskleróze je najít geny, které by byly přímo zodpovědné za rozvoj aterosklerózy nebo by přispívaly jejímu vzniku, či naopak mají antiaterogenní účinky. (Zahálková J., Vaverková H.,

Novotný D., 1999, Hutýra M., Novotný D., Halenka M., Karásek D., Vaverková H., 2002)

Genové produkty zasahují do řady metabolických drah a procesů, jako jsou např.: metabolismus lipoproteinů, koagulace a trombolýza, regulace krevního tlaku, regulace buněčné adheze, regulace buněčné proliferace a smrti, regulace energetického metabolismu plazmy, imunologické faktory atd. V současnosti existuje několik stovek kandidátních genů, které kódují proteiny ve vztahu k ateroskleróze. Mohou to být například geny podmiňující apolipoproteiny, buněčné receptory, enzymy a transportní proteiny a geny spojené s regulací syntézy cholesterolu. (Hegele R.A., 1997, Hegele R.A., 1996, Galton D.J., 1997, Stavljenic-Rukavina A., 2003).

Tyto geny mohou podléhat různým mutacím či polymorfismům, které mají významný vliv na kardiovaskulární onemocnění (KVO), ischemickou chorobu srdeční (ICHS), onemocnění koronárních tepen (CAO), infarkt myokardu (IM), trombózu a hypertenzi. (Smitz G., Aslanidis Ch., Lackner K.J., 1998).

Tabulka 4: Příklady genů se vztahem k dyslipidémii či onemocněním asociovaným s aterosklerózou

Název genu	Symbol	Onemocnění
Apolipoprotein B	Apo B	Hypercholesterolemie, KVO
Apolipoprotein E	Apo E	Hypercholesterolemie, Alzheimerova choroba
Lipoproteinová lipáza	LPL	KVO, nízký HDL cholesterol, hypertriglyceridémie
Paraoxonáza 1	PON1	CAO, ICHS
Protrombin	F2	Trombóza, IM
Fibrinogen	FGB	IM

(Smitz G., Aslanidis Ch., Lackner K.J., 1998)

### 1.5.1 Molekulárně genetické studie

V současnosti probíhá vyhledávání genetických komponent díky novým molekulárním a analytickým technikám, jejichž úkolem je získat kompletní obraz onemocnění. Tento proces je obtížný z mnoha důvodů:

- Ateroskleróza produkuje komplexní klinické fenotypy, které často neodpovídají mendelovské dědičnosti.
- Ateroskleróza se manifestuje v širokém věkovém rozmezí.
- Efekt určitého genu na určitý subjekt nebo populaci je většinou malý.
- Jeden gen může mít několik různých efektů v různých metabolických drahách.
- Efekt jednoho genu může být ovlivněn interakcí s dalšími geny.

I přes takové překážky lze v určitých případech využít genetické informace pro klinickou potřebu. (Hegele R.A., 1997, Hegele R.A., 1996, Davignon J., Genest J., 1998).

### 1.6 Paraoxonáza (PON1)

Paraoxonáza (aryldialkylfosfatáza) je protein o délce 354 aminokyselin a molekulární hmotnosti 43 kDa. Vyskytuje se výhradně u savců. Její název je odvozen od schopnosti hydrolyzovat organofosfáty, zejména paraoxon, metabolit insekticidu parathionu. (Durrington P.N., Mackness B., Mackness M.I., 2001, Getz G.S., Reardon C.A., 2004).

PON1 se v séru nachází na HDL částicích, kde je schopna metabolizovat peroxidy lipidů, a tím bránit jejich hromadění v LDL. Na základě tohoto podkladu byla testována v řadě studií, které potvrdily, že purifikovaná PON1 má vysoké antioxidační účinky. (Mackness M.I., Arrol S., Abbott C.A., Durrington P.N., 1993, Arrol S., Mackness M.I., Durrington P.N., 1996). Její aktivita však bývá potlačena při vniku dysfunkčních HDL. Další hypotézy zastávají názor, že celá subfrakce, na které se vyskytuje PON1 spolu s Apo AI a Apo J, má celkově za úkol chránit buněčné



membrány před toxickými vlivy. Avšak kombinace všech tří složek zvyšuje účinek PON1 nepatrně. (Arrol S., Mackness M.I., Durrington P.N., 1996).

### **1.6.1 Polymorfismy genů pro PON1**

Jak již bylo zmíněno PON1 má schopnost snižovat peroxidy v lipidech a bránit indukci zánětlivé odpovědi v cévní stěně. (Laplaud P.M., Dantoine T., Chapman M.J., 1998). Avšak u mnoha nemocí, např. u pacientů s urémií, byl zjištěn signifikantní pokles aktivity sérové PON1. Cílem mnoha studií je zjistit, zda se na poklesu antioxidační funkce PON1 podílejí kromě snížené hladiny, dysfunkce HDL a vnějších faktorů, i genetické faktory. Gen pro PON1 se nachází na dlouhém raménku chromozomu 7, přesně je lokalizován mezi q21.3 a q22.1 spolu s příbuznými proteiny PON2 a PON3.59,61 U lidí byla zjištěna řada polymorfních míst genu pro PON1, mezi nejvýznamnější SNPs, které byly vyšetřovány v řadě studií, patří, PON1 192, PON1 55 a PON2 311, PON2 148 polymorfismy. V těchto studiích se sledují polymorfismy pro geny PON1 Gln192-Arg, PON1 Met55-Leu, PON2 Cys311-Ser a PON2 Ala148-Gly. Bývají určovány frekvence alel a genotypů u rizikových pacientů oproti zdravé populaci. (Dantoine T.F., Debord J., Charmes J.-P., Merle L., Marquet P., Lachatre G., Leroux-Robert C., 1998).

### **1.6.2 Paraoxonáza ve vztahu s aterosklerózou**

Přesný mechanismus působení PON1 a vztah mezi polymorfismem a PON1 nebyly doposud zcela objasněny.

Řada studií zkoumající vztah mezi PON1 polymorfismem a ICHS potvrzuje spojení mezi kodónem 192 PON1 polymorfismu k ICHS, jiné studie takové výsledky nenacházejí. Kodón 55 PON1 polymorfismu nebyl stanoven jako rizikový faktor pro ICHS. (Gardemann A., Philipp M., Hess K., Katz N., Tillmanns H., Haberbosch W., 2000, Sanghera D.K., Saha N., Kamboh M.I., 1998)

Výsledky studií Sanghera a kol. zaznamenali, že kodón 192 PON1 genu je signifikantním rizikovým faktorem k ICHS u kavkazské populace. (Sanghera D.K., Aston Ch.E., Saha N., Kamboh M.I., 1998). Jiní autoři tvrdí, že kodón 192 PON1

polymorfismu není spojen s ICHS přímo, ale je ve vazebné nerovnováze s funkční mutací spojenou s ICHS. Další studie provedená Durringtonem a spol. potvrdila podezření, že jedinci s alelou B podléhají více ICHS než jedinci s alelou A. (Durrington P.N., Mackness B., Mackness M.I., 2001).

Další studie se zabývají vztahem PON1 ke karotické ateroskleróze. Tento typ aterosklerózy způsobuje onemocnění koronárních tepen a mozkové příhody. Schmidt a spol. zjistili významné spojení mezi kodónem 55 PON1 polymorfismu a karotické aterosklerózy. Jejich výsledky ukazují na zvýšené riziko vzniku CAO a ateroembolického mozkového infarktu. (Schmidt H., Schmidt R., Niederkorn K., Gradert A., Schumacher M., Watzinger N., Hartung H.-P., Kostner G., 1998).

Všechny studie jsou ovšem závislé i na ostatních rizikových faktorech pro aterosklerózu, především věk, pohlaví, rasa, diabetes mellitus a kouření. (Ruiz J., Blanche H., James R.W., Garin M.-CB. Vaisse C., Charpentier G., Cohen N., Morabia A., Passa P., Froguel P., 1995, Senti M., Aubo C., Tomas M., 2000).

Obr. 4. Schéma paraoxonázy 1



(Zdroj:[http://www.weizmann.ac.il/Biological\\_Chemistry/scientist/Tawfik/pons.html](http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Tawfik/pons.html))

## 1.7 Metody molekulární biologie používané pro analýzu SNPs

Analýzou jednonukleotidových polymorfismů se v současnosti zabývá celá řada metod a technik. Tyto metody by měly být snadno proveditelné, reprodukovatelné a rychlé. Většina z nich je založena na PCR, za použití různých primerů či restričních enzymů. (Smitz G., Aslanidis Ch., Lackner K.J., 1998, Rolfs A., Schuller R., Finckh U., Weber-Rolfs I., 1992)

Prvním krokem je izolace DNA z plné lidské krve. Ke stanovení koncentrace a čistoty vyizolované DNA se používá elektroforéza, spektrofotometrická či fluorometrická metoda. Mezi metody používané ke zjištění specifické sekvence genomové DNA slouží hybridizační metody jako např. přenos nukleotidů na gel neboli Southernův přenos a amplifikační metody jako např. polymerázová řetězová reakce. V současnosti je ovšem velmi používanou metodou PCR v reálném čase, což je kombinace jak hybridizačních tak i amplifikačních metod. (Eduard Kočárek, 2007).

### 1.7.1 Možnosti izolace genomové DNA

Při izolaci nukleové kyseliny je třeba volit metodu v závislosti na požadované čistotě a množství finální nukleové kyseliny a na typu buněk, z nichž má být nukleová kyselina izolována (Raška, 2006). Také je třeba zohlednit časovou náročnost celého izolačního postupu a ekonomickou náročnost dané metody. V současnosti existuje celá řada izolačních souprav, které obsahují pufry, chemikálie, roztoky a kolonky s přesným postupem izolace, které jsou určeny pro danou metodu. Mezi nejpoužívanější metody patří metoda fenol-chloroformová, izolace DNA na vazbu silikátové kolonky, izolace pomocí magnetických částic.

Jednotlivé kroky izolace z plné krve z leukocytů se od sebe moc neliší. Je potřeba nejprve zlyzovat všechny buňky, poté odstranit nežádoucí proteiny a další kontaminující látky. Vše se odehrává chemicky (pomocí detergentů se rozruší membrány, hydrolýza pomocí proteolytických enzymů, denaturace a jiné) nebo fyzikálně (afinitou na silikátovou kolonku, centrifugací apod.).

### 1.7.2 PCR v reálném čase

V současnosti patří polymerázová řetězová reakce mezi nejvyužívanější molekulárně biologické metody. Slouží k amplifikaci specifických úseků DNA s využitím denaturace, hybridizace a replikace DNA. Reakce probíhá za použití specifických primerů, deoxyribonukleotidtrifosfátů a DNA-polymerázy, v uzavřeném přístroji zvaném cyklér. K namnožení dostatečného množství DNA je potřeba provést 15 až 40 cyklů. Tato klasická PCR má i své nevýhody, je zdlouhavá a především neumožňuje přesnou kvantifikaci. Proto dnes existuje spousta modifikací. Jednou z nich je PCR v reálném čase. (Eduard Kočárek, 2007).

PCR v reálném čase neboli homogenní či kinetická PCR vznikla v 90. letech 20. století. Je to proces, který používá fluorescenčně značené sondy k přesné kvantifikaci amplifikované DNA. Amplifikace a následná detekce produktu jsou spojeny do jednoho kroku a monitorovány v reálném čase, v integrovaném uzavřeném systému. Výstupem je amplifikační křivka zobrazující závislost signálu fluorescence na počtu cyklů. K identifikaci produktu slouží postamplifikační analýza, jejímž výsledkem je křivka tání, kde je zobrazena závislost fluorescence na teplotě, a vyhodnocení píků tání. (Klein D., 2002).

Kinetická PCR má oproti běžné PCR značné výhody. Je mnohem rychlejší, má nižší riziko kontaminace a vyšší kvantitativní rozsah. Uplatňuje se například v klinické mikrobiologii, onkologii, při genové terapii a při sledování kandidátních genů pro aterosklerózu. (Smitz G., Aslanidis Ch., Lackner K.J., 1998, Klein D., 2002).

## **8 Cíle bakalářské práce**

Cílem bakalářské práce je seznámit se s daným tématem a jeho problematikou. Na toto téma sepsat literární rešerši, která seznámí čtenáře se samotnou definicí aterosklerózy, rizikovými faktory, vybranými kandidátními geny a molekulárně biologickými metodami používanými při laboratorní diagnostice. Na základě těchto teoretických znalostí následuje experimentální část bakalářské práce. Hlavním úkolem je ověřit molekulárně genetickou metodu, založenou na PCR v reálném čase, s následnou analýzou tzv. křivek tání, a určit vybraný sledovaný polymorfismus pro PON1 Gln192-Arg u pěti patientských vzorků plné lidské krve.

## **Experimentální část**

## 2 Metodika

### 2.1 Použitá přístrojová technika, materiál, roztoky a chemikálie

#### Přístrojová technika

Centrifuga BR4i na mikrozkušavky (Jouan, Francie)

Laminární box MSC 12 (Jouan, Francie)

QIAamp DNA Blood Mini kit, Cat.No.51104, na 50 izolací, souprava pro izolaci genomové DNA

Spektrofotometr Helios UV

Termocyklér LightCycler 2,0 Instrument, příslušenství, software, (Roche)

Termolázeň (Major Science, USA)

Vortex

#### Roztoky a chemikálie

Izolace DNA:

QIAGEN Protease stock solution

AL pufr – přímo k použití

AW1 pufr – dodáván jako koncentrát

AW2 pufr – dodáván jako koncentrát

AE pufr – přímo k použití

96% etanol

Destilovaná voda

Komponenty pro PCR:

FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche ), souprava pro přípravu Hot start PCR reakční směsy

Směs primerů PON1 – 192F, PON1 – 192R (5  $\mu\text{mol/l}$ ), TIB Molbiol (Německo)

Sondy PON1 – 192A, PON1 – 192S (4  $\mu\text{mol/l}$ ), TIB Molbiol (Německo)

$\text{MgCl}_2$ , chlorid hořečnatý

DMSO, dimethylsulfoxid

PCR voda

### Ostatní materiál

1,5 ml eppendorfký

Měřicí křemenná kyveta

Pipety 10, 20, 200, 1000  $\mu\text{l}$

2 ml sbírací zkumavky s QIAamp centrifugační kolonkou

Skleněné kapiláry pro LightCycler

Sterilní pipetovací špičky s filtrem, 10, 20, 200, 1000  $\mu\text{l}$

## **2.2 Postup izolace deoxyribonukleové kyseliny (DNA)**

K izolaci byla použita komerční metoda za použití soupravy QIAamp DNA Blood Mini kit. Tento kit je určen k izolaci a purifikaci genomové DNA. Kit používá kolonky na bázi skleněných vláken. Postup byl prováděn dle pokynů výrobce. Vzorky plné lidské krve byly před použitím vytemperovány na teplotu místnosti.

Na dno 1,5 ml eppendorfký bylo pipetováno 20  $\mu\text{l}$  QIAGEN Protease, k tomu bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  vzorku a 200  $\mu\text{l}$  AL pufru. Vše bylo řádně zvortexováno asi 15 sekund na homogenní roztok. Poté byl roztok inkubován 10 minut při 56 °C. Po 10 minutách byl roztok stočen na mikrocentrifuze tlačítkem Impuls. Poté bylo ke vzorku přidáno 200  $\mu\text{l}$  96% etanolu a opět byl roztok řádně promíchán na vortexu po dobu 15 sekund. Poté byla směs pečlivě přenesena na QIAamp centrifugační kolonku ve 2 ml sbírací zkumavce, bylo uzavřeno víko a směs byla odstředěna na centrifuze při 8.000



rpm po dobu 1 minuty. Kolonka byla opatrně umístěna do čisté sbírací zkumavky a stará s filtrátem byla vyhozena. Po otevření kolonky bylo do směsi přidáno 500  $\mu$ l AW1 pufru, kolonka byla uzavřena a opět stočena při 8.000 rpm po dobu 1 minuty. Poté byla kolonka opatrně přemístěna do čisté sbírací zkumavky a stará s filtrátem byla vyhozena. Do směsi bylo přidáno 500  $\mu$ l AW2 pufru, kolonka byla uzavřena a opět stočena na centrifuze při maximálních otáčkách po dobu 3 minut. Poté byla kolonka umístěna do čisté 1,5 ml eppendorfky a stará sbírací zkumavka s filtrátem byla vyhozena. Nakonec bylo do směsi přidáno 50  $\mu$ l AE pufru a směs byla inkubována 1 minutu při teplotě místnosti. Poté byla směs stočena při 8.000 rpm po dobu 1 minuty. Vzorky DNA byly skladovány v 1,5 ml eppendorfkách v ledničce do doby analýzy.

### **2.3 Izolace genomové DNA – určení čistoty, výpočet koncentrace**

Pro pět izolátů DNA byla pomocí spektrofotometru Helios UV změřena absorbance a následně vypočítána čistota a koncentrace vzorků. Postup přípravy vzorků pro měření absorbance na spektrofotometru byl prováděn dle pracovní instrukce OKB FNOL.

Ze vzorku bylo odpipetováno 20  $\mu$ l roztoku do 1,5 ml eppendorfky a přidáno 980  $\mu$ l destilované vody. Vše bylo řádně promícháno propipetováním. Do měřicí kyvety byl připraven blank – 1000  $\mu$ l destilované vody. Spektrofotometr byl vytemperován, byl zvolen soubor DNA2 a pomocí blanku byl přístroj vynulován. Poté do stejné kyvety byl napipetován vzorek a byla změřena jeho absorbance při 260 a 280 nm ( $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ). Vše bylo provedeno s pěti vzorky.

## 2.4. Metoda PCR v reálném čase pro určení PON1 192 polymorfismu

Celý postup přípravy vzorků pro měření pomocí PCR v reálném čase byl prováděn dle pokynů výrobce. Samotný protokol pro PCR metodu, který byl v práci ověřován, byl připraven pracovníky laboratoře molekulární biologie OKB FNOL.

Příprava Hot Start PCR reakčního mixu:

Hot Start reakční směs byla připravena pomocí soupravy FastStart DNA Master Hybridization Probes. Tento kit obsahoval Hot Start Taq polymerázu, reakční pufr a směs dNTP's (deoxyribonukleotidtrifosfátů), kde dUTP nahradil dTTP (dva enzymy označené 1a a 1b). Do enzymu 1a bylo připipetováno 60  $\mu$ l enzymu 1b. Směs byla promíchána propipetováním a připravena k použití.

Poté byla připravena reakční směs o objemu 20  $\mu$ l. Do skleněných kapilár bylo napipetováno 2  $\mu$ l vyizolované DNA nebo 2  $\mu$ l pozitivní či negativní kontroly, 3,2  $\mu$ l primeru PON1 – 192R a 3,2  $\mu$ l primeru PON1 – 192F, 1  $\mu$ l sonda PON 1 – 192A a 1  $\mu$ l sonda PON 1 – 192S, 1  $\mu$ l DMSO, 0,4  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 2  $\mu$ l Hot Start PCR reakční směsi a 6,2  $\mu$ l destilované vody. Okamžitě po napipetování byly kapilár uzavřeny, stočeny na mikrocentrifuze a vloženy do Light Cycleru.

Profil reakce začínal denurací při 95 °C 1 min, poté následovalo 50 cyklů: denaturace 95 °C 0 s, annealing 57 °C 10 s, extenze 72 °C 10 s při maximální změně teplotní rychlosti 20°C za 1 s. Fluorescence byla monitorována v době annealingu každých 10 s. Po amplifikaci byla reakční směs ochlazená na 42 °C po dobu 2 min bylo dosaženo maximální hybridizace sond k produktu. Poté se stoupající teplotou, na 80°C, docházelo k asociaci sond od řetězce DNA a k vytváření křivky tání. Po ukončení byl signál vynesena do grafu jako závislost negativní fluorescence (osa y) vůči teplotě (osa x). Výsledkem bylo zobrazení píků tání představujících teplotu tání, díky které bylo možné stanovit jednotlivé genotypy.

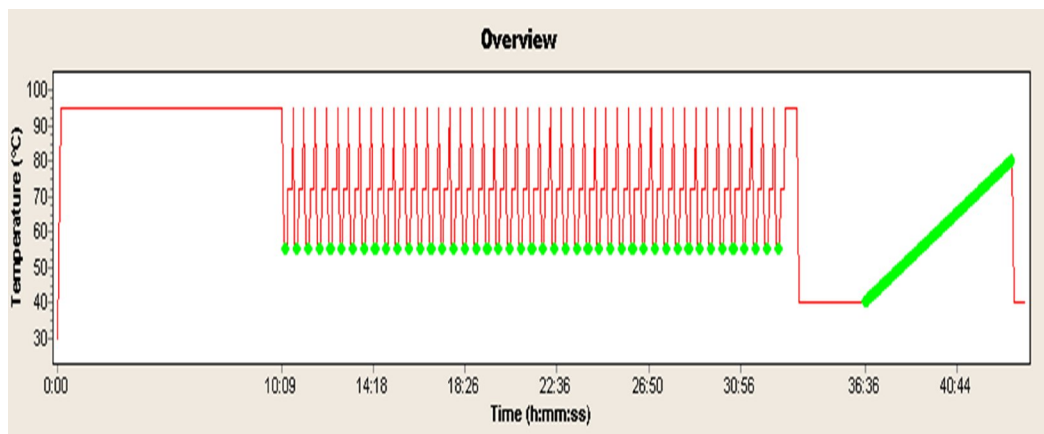
Tabulka 6: Přehled sekvencí použitých primerů a sond

Primery/Sondy	Sekvence
PON1 – 192F	5' - TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G - 3'
PON1 – 192R	5' - CCT TCT GCC ACC ACT CGA AC - 3'
PON1 – 192S	5' - CCC CTA CTT ACA ATC CTG GGA GAT--FL
PON1 – 192A	5' - LC Red705-ATT TGG GTT TAG CGT GGT CGT ATG TTG--PH

Tabulka 7: Teploty tání pro jednotlivé genotypy PON 1 – 192, kanál F3

Genotypy	Teploty tání Tm
PON 1 – 192 Homozygot Gln/Gln	58,5°C
(Gln – 192 Arg) Heterozygot Gln/Arg	58,5°C 52,5°C
Homozygot Arg/Arg	52,5°C

Graf 1: Profil reakce PCR v reálném čase



V tomto grafu je znázorněn celý profil reakce PCR v reálném čase v závislosti na čase (osa x) a teplotě (osa y). Celá reakce proběhla za 40 minut. Jedná se celkem o 50 cyklů, kde se střídají tyto kroky a dochází k amplifikaci:

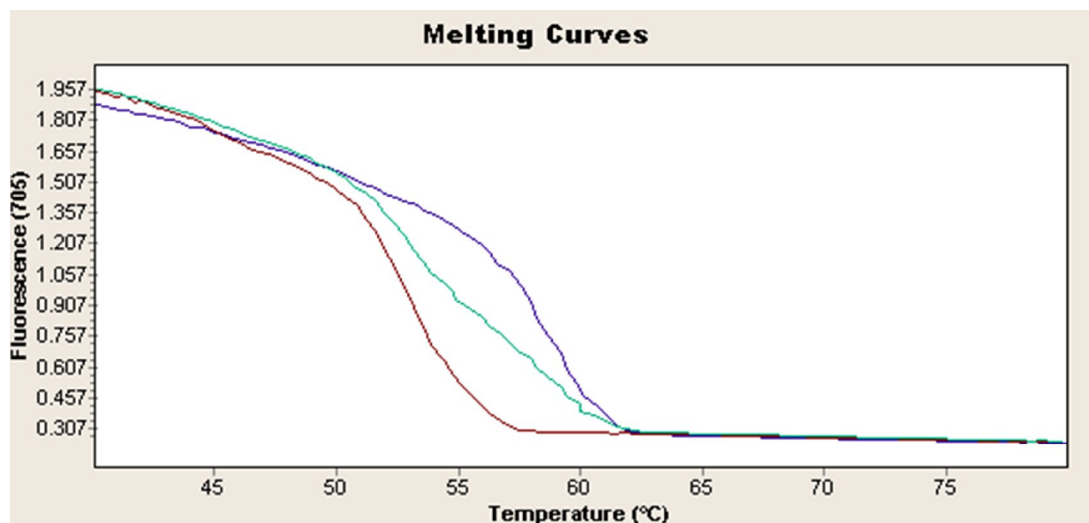
*Denaturace (95°C)*

*Annealing (57°C)*

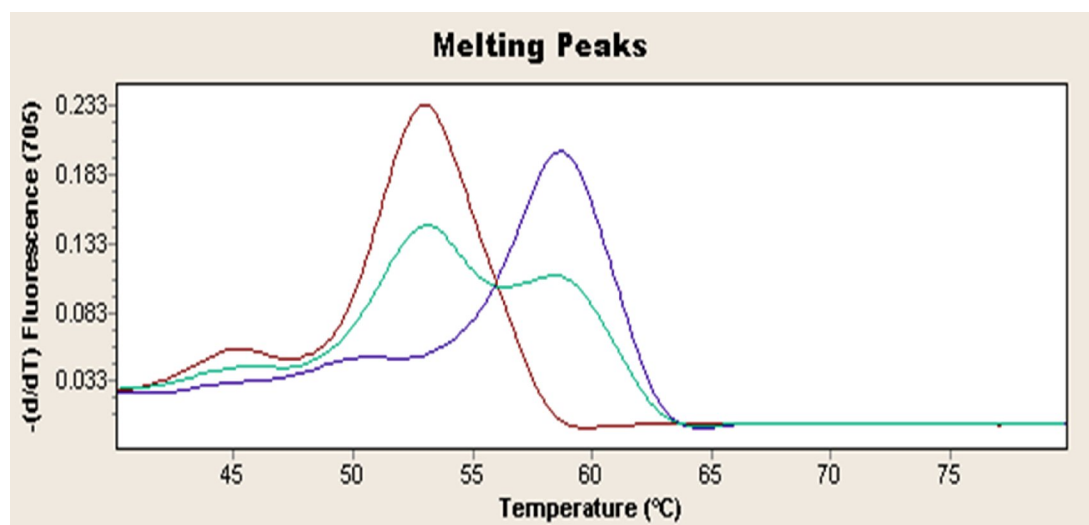
*Extenze (72°C)*

Následně dochází k ochlazení na 42°C a tím dosažení maximální hybridizace. Ke konci cyklu stoupala teplota na 80°C, tím docházelo k oddělování sond od řetězce a vzniku křivek tání.

Obr. 5. Ukázka křivek tání pro kanál F3 (PON – 192)



Obr. 6. Ukázka píků tání s teplotami tání produktů pro kanál F3 (PON 1 – 192, rozlišení Gln a Arg)



Na Obr. 5. a 6. je znázorněna reálná analýza patientských vzorků na kodónu PON 192, které slouží pouze jako praktická ukázka: homozygot Arg/Arg:  $T_m = 52,5^{\circ}\text{C}$ , heterozygot Arg/Gln:  $T_m = 52,5^{\circ}\text{C}$  a  $58,5^{\circ}\text{C}$  a homozygot Gln/Gln:  $T_m = 58,5^{\circ}\text{C}$ .

### 3 Výsledky studie a diskuse

Získaným výsledkem je ověření použitých metod na vybraném polymorfismu pro gen PON1 Gln192-Arg. A následné určení genotypů jednotlivých patientských vzorků pomocí tzv. píků tání.

#### 3.1 Izolace deoxyribonukleové kyseliny a následné určení čistoty a koncentrace

Nejprve byla provedena ruční izolace genomové DNA z plné lidské krve, pomocí soupravy QIAamp DNA Blood Mini kit. Poté byla provedena kontrola izolátu pomocí spektrofotometru. Při 260 nm absorbují světlo nejvíce nukleové kyseliny a při 280 nm absorbují nejvíce proteiny. Tato procedura byla prováděna ihned po izolaci DNA z periferní krve. Z naměřených hodnot byla vypočítána čistota a koncentrace izolované DNA, která se počítá ze změřené absorbance při 260 nm. K určení těchto hodnot byly použity následující vzorce. Naměřené hodnoty byly sepsány do tabulky 5.

Výpočet čistoty: Index  $A_{260}/A_{280}$

Výpočet koncentrace:  $[(A_{260} * 50) / 20] * 1000$  v ng/ $\mu$ l

Tabulka 5

Vzorek č.	$A_{260}$	$A_{280}$	Čistota	Koncentrace $A_{260}$ (ng/ $\mu$ l)
1	0,077	0,050	1,54	192,5
2	0,028	0,018	1,55	70
3	0,026	0,018	1,44	65
4	0,064	0,043	1,48	160
5	0,021	0,015	1,4	52,5

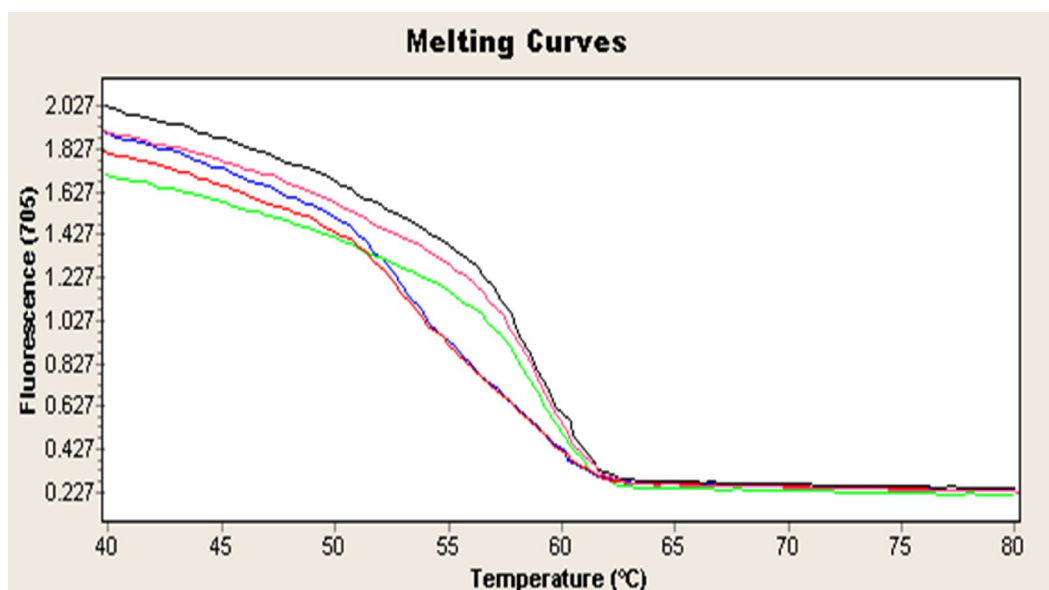
Ve všech výsledcích je hodnota indexu vzorku pod 1,8, což svědčí o kontaminaci bílkovinami. Pokud by byla hodnota indexu pod 1,4 pokus by bylo nutné zopakovat.

Jelikož izolace byla prováděna ručně, výsledky byly pravděpodobně zatíženy mou subjektivní chybou, například nedostatečně homogenizovaný vzorek pacienta, nepřesné pipetování během celého postupu izolace a spoustu dalších chyb. Izolaci lze také provádět pomocí automatického přístroje QIACube, kde celý proces se odehrává ve sterilním uzavřeném prostředí. Je pravděpodobné, že pokud by izolace byla prováděna za takových podmínek, výsledky by byly přesnější. Ovšem tyto hodnoty jsou přípustné a lze s nimi pokračovat v dalším kroku experimentu.

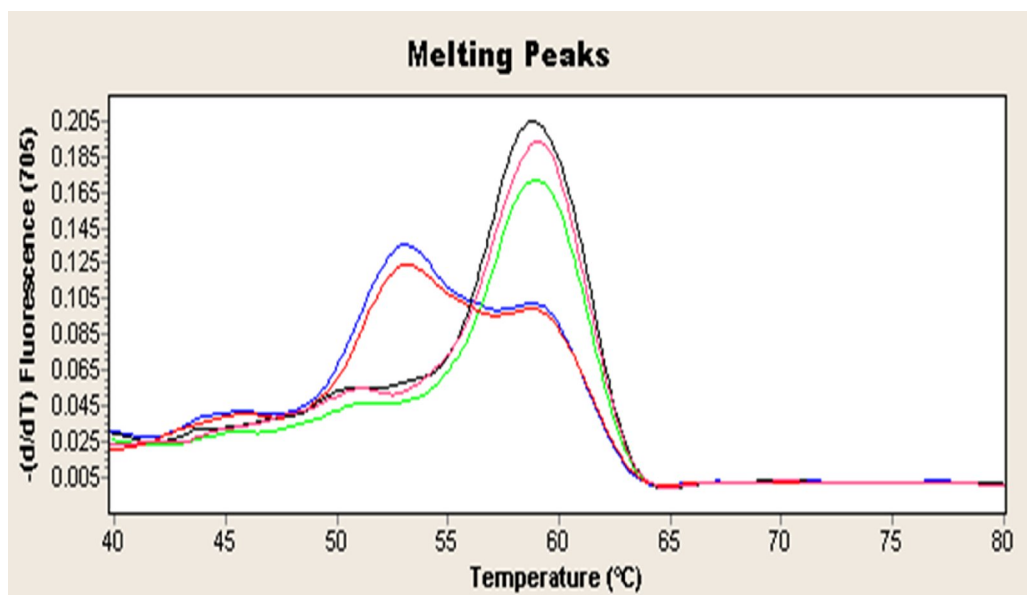
### 3.2 Metoda PCR v reálném čase pro určení PON 192 polymorfismu

Po ověření čistoty a koncentrace vyizolované DNA následovala PCR v reálném čase, díky které jsme schopni určit výskyt studovaného polymorfismu PON 192. Výsledky lze vyhodnotit pomocí píků tání zobrazené na Obr. 8.

Obr. 7. Křivky tání od pěti pacientů pro kanál F3 (PON 192)



Obr. 8. Píky tání od pěti pacientů s teplotami tání produktů pro kanál F3 (PON 192)



Z Obr. 8 můžeme určit jednotlivé genotypy u konkrétních pacientů. U pacientů, (které jsou zobrazeny modrou a červenou barvou) vyšly píky tání ve dvou teplotách ( 52,5<sup>0</sup>C a 58,5<sup>0</sup>C). Díky těmto teplotám můžeme určit, že se jedná o heterozygoty. Poslední tři pacienti (zobrazeny černou, růžovou a zelenou) jsou homozygoti Gln/Gln, kteří se vyznačují píky tání o teplotě 58,5<sup>0</sup>C. Jelikož nebyl prokázán výskyt alely pro arginin, jedná se tedy o zdravého homozygota.

## 4 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo seznámit se s daným tématem a jeho problematikou. Tato práce se zabývá PCR v reálném čase jako detekční metod pro ověření SNPs kandidátních genů pro aterosklerózu. PCR v reálném čase byla ověřena na polymorfismu pro gen PON1 Gln192-Arg. Bakalářská práce je rozdělena na část teoretickou a praktickou.

Aterosklerotické změny v intimě cévy vznikají z mnoha příčin. Mezi nejdůležitější příčiny patří poškození endotelu, průchod oxidovaných LDL částic skrz cévní stěnu až do intimy cév. Přes poškozenou stěnu následně procházejí monocyty, buňky hladké svaloviny, vápník apod, které cévu zužují a poškozují ji. Na aterogenezi se podílejí i tzv. rizikové faktory. Dělí se na ovlivnitelné, mezi něž mj. patří dyslipidémie, tělesná inaktivita a kouření, a neovlivnitelné, jako jsou věk, pohlaví a genetická predispozice. K identifikaci genetických komponent se mj. využívá tzv. analýza kandidátních genů pro aterosklerózu. Cílem je nalézt genetické změny, které by mohly přispět k jejímu rozvoji. V laboratorní diagnostice pro stanovení rizika aterosklerózy se také využívá identifikace krevních lipoproteinů. Lipoproteinové částice se skládají z lipidové složky (volný a esterifikovaný cholesterol a triacylglyceroly) a z proteinové složky neboli apolipoproteinů, a dalších komponent, jako jsou např. enzymy. Existuje pět hlavních tříd lipoproteinů, chylomikrony, VLDL, IDL, LDL a HDL částice. V biochemické a medicínské diagnostice se nejčastěji sledují a určují LDL a HDL cholesterol

Na povrchu HDL částice je lokalizován enzym paraoxonáza. U paraoxonázy byly mj. prokázány antioxidační účinky, díky kterým je schopna metabolizovat peroxidy lipidů a tím bránit jejich kumulaci v LDL. Aktivita PON1 je zčásti determinována geneticky. Avšak bylo zjištěno, že tato aktivita je redukována u pacientu trpící onemocněním spojeným s akcelerovanou aterogenezí. Na genu pro PON1 byly zjištěny nejméně dva polymorfismy na pozicích 192 a 55. Dle literatury v současnosti existuje řada studií zkoumajících vliv těchto polymorfismů na onemocnění spojená s aterosklerózou.

Praktická část se zabývá metodami, které lze využít k určení polymorfismu pro gen PON1 Gln192-Arg. Tyto metody jsou založené zejména na separaci, amplifikaci a



detekci DNA. K separaci nukleových kyselin slouží izolační metody. Tato práce se zabývá izolací genomové DNA z plné lidské krve pomocí kitu. Literatura uvádí, že tato metoda je velmi účinná a výtěžky jsou dobré. Dle postupu, který uvádějí výrobci je tato metoda také snadno proveditelná. Ke kontrole čistoty a koncentrace izolátu slouží spektrofotometrická metoda, díky níž se změří absorbance izolované DNA při vlnových délkách 260 a 280 nm. Z naměřených výsledků byla vypočítána čistota a koncentrace. Tyto výtěžky nebyly tak přesné jak uvádí literatura, ale byly přípustné a mohlo se s těmito hodnotami pokračovat v dalším kroku měření. Dalším a zároveň posledním krokem bylo měření hledaného polymorfismu pro gen PON1 Gln192-Arg pomocí PCR v reálném čase. Dle tzv. píků tání je snadné určit jednotlivé genotypy a vyhodnotit tak rychle a účinně požadované výsledky. Z pěti krevních vzorků dva byly stanoveny jako heterozygoti a tři byly „zdraví“ Gln/Gln homozygoti pro polymorfismus na genu PON1 Gln192-Arg. Homozygot Arg/Arg se mezi sledovanými patientskými vzorky nevyskytoval.

PCR v reálném čase je velmi výhodnou metodou používanou pro molekulární výzkum i klinickodiagnostickou rutinní praxi. Tato metoda je účinnější, rychlejší a s nižším rizikem kontaminace než je u klasické PCR. Největší výhodou této metody je amplifikace a detekce spojené v jednom kroku v jednom přístroji. Po celkem krátké době můžeme pomocí píků tání určit výsledky. Kdyby se použila klasická PCR, nejprve by byly vzorky pouze amplifikovány a následně by se musela použít další metoda, pravděpodobně štěpení PCR produktů specifickými restričními enzymy s následnou gelovou elektroforézou pro detekci určovaného SNP PON1 192 u výsledných vzorků.

## Seznam použité literatury

1. Bubnová, Eva. a kol. Lékařská chemie, biochemie a molekulární biologie, Praktická cvičení a semináře, Praha, 2005
2. Ledvina, Miroslav. a kol. Biochemie pro studující medicíny, I. Díl, Praha, 2009
3. Kotyza, Jaromír. a kol. Úvod do klinické biochemie a enzymologie pro studující lékařství, teorie a praktikum, Praha, 2007
4. Nečas, Emanuel. a spol. Patologická fyziologie orgánových systémů, část I, Praha, 2009
5. Novák, František. Úvod do klinické biochemie, Praha, 2002
6. Pacovský, Vladimír. – Staňková, Marta. Vnitřní lékařství pro 3. ročník středních zdravotnických škol, I. Díl, 1996
7. Racek, Jaroslav. et al. Klinická biochemie, Druhé přepracované vydání, Praha, 2006
8. Raška, M. – Základní postupy práce s nukleovými kyselinami, 2006  
[http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/II.workshop/II.%20workshop\\_Milan%20Raška.doc](http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/II.workshop/II.%20workshop_Milan%20Raška.doc)
9. Stříteský, Jan. – Halberstadt, Petr. Patologie pro 2. ročník středních zdravotnických škol, II. Díl, 1995
10. Šafránková, A. - Nejedlá, M. Interní ošetřovatelství I. 1.vyd., Praha: Grada Publishing, 2006, 284 s. ISBN 80-247-1148-6
11. Štern, Petr. a kol. autorů, Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, Praha, 2007
12. Štejf, M. a spol. Kardiologie, Praha, 1995
13. Štejf, M. a spol. Kardiologie, Praha, 2007
14. Vokurka, M. a spol. Patofyziologie pro nelékařské směry, Praha, Karolínium, 2008, ISBN 978-80-246-1561-5
15. Grundy SM, Cleenam JI, Bairey CN, et al. Implication of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Circulation* 2004;110:227–39.
16. Hegele R.A.: The genetic basis of atherosclerosis. *Int. J. Clin.Lab. Res.* 27, 1997, 2-13.

17. Hegele R.A.: The pathogenesis of atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta* 246, 1996, 21-38.
18. Galton D.J.: Genetic determinants of atherosclerosis-related dyslipidemias and their clinical implications. *Clin. Chim. Acta* 257, 1997, 181-197.
19. Stavljenic-Rukavina A.: Genetics of cardiovascular disease. *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 13, 2003, 1-5.
20. Smitz G., Aslanidis Ch., Lackner K.J.: Recent advances in molecular genetics of cardiovascular disorders. *Path. Oncol. Res.* 4, 1998, 153-161.
21. Davignon J., Genest J.: Genetics of lipoprotein disorders. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 27, 1998, 521-549.
22. Durrington P.N., Mackness B., Mackness M.I.: Paraoxonase and atherosclerosis. *Art. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 2001, 473-480.
23. Gardemann A., Philipp M., Hess K., Katz N., Tillmanns H., Haberbosch W.: The paraoxonase Leu-Met54 a Gln-Arg191 gene polymorphisms are not associated with the risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 152, 2000, 421-431.
24. Getz G.S., Reardon C.A.: Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 2004, 261-267.
25. Hutýra M., Novotný D., Halenka M., Karásek D., Vaverková H.: Vztah hladiny cirkulujících oxidovaných LDL stanovených ELISA metodou k hodnotě tloušťky komplexu intima-media karotických tepen (IMT) a vybraných klinických a humorálních rizikových faktorů aterosklerózy. *Klin. Biochem. Metab.* 10, 2002, 195-199.
26. Arrol S., Mackness M.I., Durrington P.N.: High-density lipoprotein associated enzymes and the prevention of low-density lipoprotein oxidation. *Eur. J. Lab. Med.* 4, 1996, 33-38.
27. Laplaud P.M., Dantoine T., Chapman M.J.: Paraoxonase as a risk marker for cardiovascular disease: facts and hypotheses. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36, 1998, 431-41.

28. Dantoine T.F., Debord J., Charmes J.-P., Merle L., Marquet P., Lachatre G., Leroux-Robert C.: Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 1998, 2082-2088.
29. Sanghera D.K., Aston Ch.E., Saha N., Kamboh M.I.: DNA polymorphism in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1998, 36-44.
30. Sanghera D.K., Saha N., Kamboh M.I.: The codon 55 polymorphism in the paraoxonase I gene is not associated with the risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese. *Atherosclerosis* 136, 1998, 217-223.
31. Ruiz J., Blanche H., James R.W., Garin M.-CB. Vaisse C., Charpentier G., Cohen N., Morabia A., Passa P., Froguel P.: Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 246, 1995, 869-872.
32. Senti M., Aubo C., Tomas M.: Differential effects of smoking on myocardial infarction risk according to the Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase gene. *Metabolism* 49, 2000, 557-559.
33. Schmidt H., Schmidt R., Niederkorn K., Gradert A., Schumacher M., Watzinger N., Hartung H.-P., Kostner G.: Paraoxonase PON1 polymorphism Leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis. Results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Stroke* 29, 1998, 2043-4048.
34. Rolfs A., Schuller R., Finckh U., Weber-Rolfs I.: PCR: clinical diagnostics and research. Springer, 1992.
35. Klein D.: Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8, 2002, 257-260.
36. Mackness M.I., Arrol S., Abbott C.A., Durrington P.N.: Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 104, 1993, 129-135.
37. Zahálková J., Vaverková H., Novotný D.: Ovlivnění vybraných lipidových ukazatelů eliminačními metodami u jedinců v pravidelném dialyzačním léčení. *Klin. Biochem. Metab.* 7, 1999, 180-184.
38. Novotný D.: Kandidátská disertační práce, UP Olomouc, 2005

39. Novotný D.: Stanovení lipidových a lipoproteinových parametrů- současný stav.  
FONS, ISSN 1211-7137, 3, 2011, 25-29.

### **Seznam zdrojů použitých obrázků**

1. Hlavní třídy lipoproteinů:  
<http://blog.caloricious.com/2011/07/27/4-types-of-lipoproteins-present-in-the-body/>
2. Pohled na složení lipoproteinu:  
[http://www.lf3.cuni.cz/opencms/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/chemie/vyuka/studijni-materialy/CCBGCH21/prokruhy/pl\\_mtb\\_lipidy.pdf](http://www.lf3.cuni.cz/opencms/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/chemie/vyuka/studijni-materialy/CCBGCH21/prokruhy/pl_mtb_lipidy.pdf)
3. Postupná aterogeneze v intimně cévy s přibývajícím věkem:  
Rostislav Večeřa, *Základy Farmakologie, Hypolipidemika*, 2013
4. Schéma paraoxonázy 1:  
[http://www.weizmann.ac.il/Biological\\_Chemistry/scientist/Tawfik/pons.html](http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Tawfik/pons.html)