



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Validace metody PCR pro stanovení izotypových  
variant v genu *APOE***

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Klára Sýkorová

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

České Budějovice 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Validace metody PCR pro stanovení izotypových variant v genu *APOE*“ 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 jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské 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 2. 6. 2020

---

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady a čas, který mi věnovala. Také za možnost realizovat praktickou část mé bakalářské práce v genetické laboratoři GENLABS v Českých Budějovicích. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za podporu během celého studia.

# Validace metody PCR pro stanovení izotypových variant v genu *APOE*

## Abstrakt

Apolipoprotein E (APOE) byl objeven na počátku 70. let 20. století, jedná se o polypeptid s molekulovou hmotností 34 kDa, který je tvořený 299 aminokyselinami. Plní významnou úlohu v metabolismu cholesterolu a triacylglycerolů. Je důležitou součástí VLDL, HDL a chylomikronů. Gen *APOE* se nachází na dlouhém rameni chromozomu 19 v pozici 19q13.32. Skládá se ze tří intronů a čtyř exonů. Vyskytuje se ve třech alelách  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  a  $\epsilon 4$ , které kódují tři různé izoformy. Isoformy se mezi sebou liší ve dvou aminokyselinách (arginin a cystein) v pozici 112 a 158. Alela  $\epsilon 3$  je nejvíce zastoupená, vzácnější alely  $\epsilon 2$  a  $\epsilon 4$  jsou asociovány s různými typy onemocnění, například kardiovaskulárními chorobami, Alzheimerovou chorobou nebo hyperlipoproteinémií III. typu.

Cílem mé bakalářské práce bylo sepsání rešerže na dané téma pomocí informací získaných z dostupných odborných publikací, praktické zvládnutí základních metod molekulární biologie (mezi které patří izolace DNA, měření koncentrace DNA, příprava PCR reakce a gelová elektroforéza) a provedení validace metody PCR pro stanovení genu *APOE*.

Teoretická část obsahuje obecné informace o lipoproteinech, s nimi souvisejícím lipoproteinovým metabolismem a apolipoproteinech. Dále zahrnuje poznatky o samotném genu *APOE*, jeho produktu a vztahu APOE k vybraným onemocněním. A nakonec je uveden přehled laboratorních metod používaných pro genetickou analýzu izotypových variant v genu *APOE*.

Praktická část, kterou jsem vykonala v genetické laboratoři GENLABS s.r.o v Českých Budějovicích, zahrnuje analýzu genotypu *APOE* a validaci metody PCR, která proběhla úspěšně, a proto může být metoda zařazena do běžné laboratorní praxe.

## Klíčová slova

Gen *APOE*; Alzheimerova choroba; hyperlipoproteinémie III. typu; kardiovaskulární onemocnění; PCR; validace

# **Validation of the PCR method for the determination of isotype variants in the *APOE* gene**

## **Abstract**

Apolipoprotein E (APOE) was discovered in the early 1970s as a 34 kDa polypeptide of 299 amino acids. It plays an important role in the metabolism of cholesterol and triglycerides. It is an important component of VLDL, HDL and chylomicrons. The *APOE* gene is located on the long arm of chromosome 19 in region 19q13.32. It consists of three introns and four exons. It occurs in three alleles  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$ , which encode three different isoforms. The isoforms differ in two amino acids (arginine and cysteine) at positions 112 and 158. The  $\epsilon 3$  allele is the most common, the rarer alleles  $\epsilon 2$  and  $\epsilon 4$  are associated with various types of diseases, such as cardiovascular disease, Alzheimer's disease or type III hyperlipoproteinaemia.

The aim of my bachelor thesis was to write a research on the topic using information obtained from available professional publications, to master basic methods of molecular biology (which include DNA isolation, DNA concentration measurement, preparation of PCR reaction and gel electrophoresis) and to perform PCR method validation

The theoretical part contains general information about lipoproteins, associated with them lipoprotein metabolism and apolipoproteins. It also includes knowledge of the *APOE* gene, its product and the effect of APOE on various diseases. Finally, there is an overview of laboratory methods used for genetic analysis of isotype variants in the *APOE* gene.

The practical part, which I did in the genetic laboratory GENLABS s.r.o in České Budějovice, includes the analysis of the *APOE* genotype and the validation of the PCR method, which was successful. Therefore, the method can be included in the daily operation of the laboratory.

## **Keywords**

*APOE* gene; Alzheimer's disease; Type III hyperlipoproteinemia; cardiovascular disease; PCR; validation

## Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Teoretická část</b> .....	<b>9</b>
2.1 Lipoproteiny .....	9
2.1.1 Třídy lipoproteinů .....	10
2.1.2 Lipoproteinový metabolismus .....	11
2.2 Apolipoproteiny .....	14
2.3 Apolipoprotein E.....	16
2.3.1 Receptory APOE.....	18
2.4 Onemocnění spojená s APOE .....	18
2.4.1 Alzheimerova choroba .....	19
2.4.2 Hyperlipoproteinémie III. typu .....	20
2.4.3 Kardiovaskulární onemocnění .....	20
2.5 Laboratorní diagnostika genu <i>APOE</i> .....	21
2.5.1 PCR.....	21
2.5.2 Elektroforéza.....	24
2.5.3 PCR-RFLP .....	25
2.5.4 PCR SSP .....	25
2.5.5 AS-PCR .....	26
2.5.5.1 ARMS-PCR.....	26
2.5.6 Real-time PCR .....	26
2.5.7 Hybridizační metody.....	27
2.5.7.1 Reverzní hybridizace.....	28
2.5.7.2 Reverzní hybridizace na stripech .....	28
2.5.8 Sekvenování.....	28
2.6 Validace bioanalytických metod .....	29
2.6.1 Stanovení citlivosti .....	30
2.6.2 Stanovení specifičnosti .....	30
2.6.3 Další parametry .....	30
<b>3 Cíle práce</b> .....	<b>32</b>
<b>4 Praktická část</b> .....	<b>33</b>
4.1 Izolace DNA.....	33
4.1.1 Izolace DNA z bukalního stěru.....	33
4.1.2 Izolace DNA z plné krve .....	35
4.2 Měření koncentrace DNA .....	37

4.3	PCR reakce genu <i>APOE</i> .....	38
4.4	Gelová elektroforéza .....	40
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>44</b>
5.1	Validace metody PCR.....	44
5.1.1	Validační reakce č.1.....	44
5.1.2	Validační reakce č.2.....	45
5.1.3	Validační reakce č.3.....	47
5.1.4	Validační reakce č.4.....	48
5.1.5	Validační reakce č.5.....	48
5.2	Analýza rozdílných genotypů <i>APOE</i> metodou PCR ARMS .....	49
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Seznam obrázků a tabulek.....</b>	<b>61</b>
<b>10</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>63</b>

# 1 Úvod

Gen pro APOE je lokalizován na 19. chromozomu. Produktem tohoto genu je protein nazývaný apolipoprotein E (APOE), který byl objeven na počátku 70. let 20. století jako proteinová složka lipoproteinů bohatých na triacylglyceridy. V lidském organismu patří APOE k velmi důležitým proteinům, plní hlavní úlohu v metabolismu cholesterolu a triacylglycerolů. Transportuje cholesterol, tvoří podstatnou součást VLDL, HDL a chylomikronů, také slouží jako ligand pro vazbu na buněčné receptory, zejména v mozkové tkáni a játrech.

Gen *APOE* je polymorfní, vyskytuje se ve třech kodominantních alelách  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  a  $\epsilon 4$ , které kódují vznik tří izoform APOE2, APOE3 a APOE4. Tyto izoformy se vyskytují ve většině světových populací a liší se od sebe jednou nebo dvěma aminokyselinami (cystein a arginin) v pozicích 112 a 158. Nejvíce rozšířenou alelou v populaci je  $\epsilon 3$ .

V současné době nabízí mnoho genetických laboratoří diagnostiku genu *APOE*, jelikož hraje významnou roli při posouzení kardiálního rizika, při potvrzení diagnostiky hyperlipoproteinémie III. typu a při diagnostice Alzheimerovy choroby s klinickými příznaky. Právě alela  $\epsilon 4$  je největším genetickým rizikovým faktorem pro kardiovaskulární onemocnění a Alzheimerovu chorobu. Naopak alela  $\epsilon 2$  vykazuje před rozvojem těchto chorob spíše protektivní účinek, ale má nižší afinitu pro LDL receptor, což způsobuje zvýšenou hladinu triacylglycerolů v plazmě a je také asociována s hyperlipoproteinémií III. typu.

Laboratorní vyšetření se provádí testováním DNA vyšetřované osoby vhodnou genetickou metodou, kdy se charakterizuje kombinace různých alel genu *APOE*. Praktická část této bakalářské práce zahrnuje validaci metody PCR. Každou metodu, než je zařazena do běžného rutinního provozu v klinické laboratoři, je nutné řádně zvalidovat. Cílem validace je zjištění, zda použití dané metody je vhodné pro zamýšlený účel a lze pomocí ní získat spolehlivá data. Je velmi důležité, aby měření probíhala správně a neovlivnila tak výsledky, které pak mohou ovlivnit ve velké míře zdraví i kvalitu života pacienta.

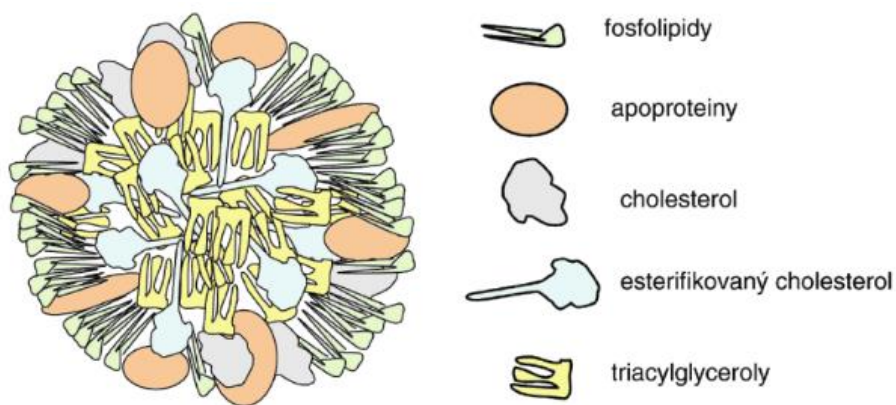


## 2 Teoretická část

### 2.1 Lipoproteiny

Lipoproteiny jsou makromolekulární komplexy, většinou sférického tvaru. Vznikají z lipidů – látek ve vodě nerozpustných, které jsou v plazmě – tedy ve vodném prostředí, transportovány pomocí vazby na bílkoviny (Racek, 1999). Kromě neesterifikovaného cholesterolu se jedná převážně o komplexní lipidy – lipidy obsahující nějakou cizorodou složku.

Lipoproteiny obsahují jádro a obal. Jádro částice je tvořeno esterifikovaným cholesterolem a triacylglycerolem, v nichž je rozpuštěno malé množství volného cholesterolu (Zima, 2013). Obal je tvořen polárními lipidy a bílkoviny. Mezi polární lipidy patří volný cholesterol a fosfolipidy. Bílkoviny se nazývají také apolipoproteiny. Nezajišťují pouze transport hydrofobních lipidů v plazmě, mají mnoho dalších funkcí. Jsou potřebné pro syntézu a sekreci specifických lipoproteinů, aktivují enzymy modifikující lipoproteiny, vážou se na specifické receptory na buňkách a odstraňují lipoproteiny z krevního oběhu (Racek, 1999).



Obrázek 1 - Struktura lipoproteinu. Zdroj: (Holeček, 2006)

Rozlišuje se pět hlavních tříd lipoproteinů podle jejich relativní hustoty. Pro každou třídu jsou charakteristické částice lišící se mírně hustotou, velikostí, složením proteinu a pohyblivostí během elektroforézy. Hustota lipoproteinu je určena množstvím lipidů na částici. HDL je nejmenší lipoprotein s největší hustotou, zatímco chylomikrony a VLDL jsou velké lipoproteinové částice s nejmenší hustotou (Kathiresan a Rader, 2010).

### 2.1.1 Třídy lipoproteinů

#### 1) Chylomikrony

Chylomikrony jsou největší lipoproteinové částice s nejmenší hustotou. Jejich hlavní proteinovou složkou je apoB-48, ale také obsahují APOA-I, APOA-II, APOA-IV a od lipoproteinů o vysoké hustotě přijímají ještě APOE a APOC. Chylomikrony vznikají ve střevě a jsou transportním prostředkem pro lipidy pocházející z potravy. Největší chylomikronové částice mají průměr 1200 nm, zatímco nejmenší mají průměr 75 nm. Jádro se skládá převážně z triacylglyceridů odvozených ze stravy.

#### 2) VLDL

Jedná se o lipoproteinové částice s velmi nízkou hustotou obsahující endogenně produkované lipidy. Hlavní proteinovou komponentou je apoB-100, ale také APOC-I, APOC-II, APOC-III, APOE a malé množství APOA. VLDL získávají podobně jako chylomikrony APOE a APOC z HDL v oběhu. Jádro je složeno převážně také z triacylglyceridů. Na rozdíl od chylomikronů jsou tyto triacylglyceridy endogenního původu.

#### 3) IDL

Lipoproteiny se střední hustotou jsou produkovány během přeměny VLDL na LDL. Jádro IDL obsahuje deriváty esterů cholesterolu a triacylglyceridy.

#### 4) LDL

Lipoproteiny o nízké hustotě prezentují hlavní typ lipoproteinů přenášejících cholesterol. Představují konečný produkt katabolismu VLDL. Jádro obsahuje hlavně estery cholesterolu, proteinovou složkou je APOB-100 (Marshall et al, 2014).

- Lipoprotein (a)

Lipoproteinová částice se řadí podle hustoty a struktury k lipoproteinům o nízké hustotě. Je pro ni navíc typický apolipoprotein(a), kovalentně vázaný k molekule APOB-100 jedním disulfidickým můstkem. Značná část molekuly apo(a) vykazuje vysoký stupeň homologie s plasminogenem. Zvýšená koncentrace lipoproteinu(a) se dědí autosomálně dominantně. Nejvyšší koncentrace se nachází u osob, jejichž apo(a) je tvořen izoformami s nejmenší molekulou. Patří k rizikovým faktorům aterosklerózy nezávisle na ostatních

vlivech, jako je koncentrace LDL a ostatních lipoproteinů, věk nebo pohlaví (Racek, 1999).

## 5) HDL

HDL jsou nejmenší lipoproteinové částice s největší hustotou. Obvykle se rozdělují do tří hlavních podtříd: nascentní, diskoidní a pre- $\beta_1$  HDL. Tyto tři podtřídy zahrnují převážně APOA-I a fosfolipid. Je to preferovaný substrát pro ATP vázající kazetový transportér A1 (ABCA1), který aktivně exportuje volný cholesterol z periferních buněk a makrofágů. Částice HDL<sub>3</sub> je tvořena podtřídou pre- $\beta_1$  HDL a vzniká získáním volného cholesterolu. HDL je rovněž substrátem pro lecitin cholesterol acyltransferázu (LCAT), která uvolňuje volný cholesterol, zvětšuje částice, umožňuje absorpci více volného cholesterolu a produkuje větší částice nazývané HDL<sub>2</sub>, jež jsou bohaté na cholesterol. HDL mohou zahrnovat kromě částice APOA-I ještě částici APOA-II. Částice se v lipoproteinu vyskytují společně nebo každá zvlášť (Marshall et al., 2014).

### **2.1.2 Lipoproteinový metabolismus**

Z lipidů získaných z potravy se v enterocyty resyntetizují triacylglyceroly a estery cholesterolu, zcela hydrofobní částice, ale i amfifilní fosfolipidy. Tyto látky se nahromadí v cisternách hladkého endoplazmatického retikula. Je třeba zajistit jejich transport v hydrofilním prostředí krevní plazmy. Z tohoto důvodu se molekuly lipidů spojují s molekulami bílkovin a vytvářejí větší transportní částice zvané chylomikrony. V nepatrné míře se zde vytvářejí i lipoproteiny o velmi nízké hustotě – VLDL. Syntéza lipoproteinových částic probíhá také v hepatocytech, kde se kromě již zmiňovaných VLDL vytvářejí lipoproteiny s vysokou hustotou – HDL (Ledvina et al., 2009).

V enterocyty z absorbovaných lipidů, hlavně triacylglycerolů a cholesterolu, vznikají velké částice – nascentní chylomikrony. Pro ně bývá charakteristický a integrální apolipoprotein APOB-48. Přenosem z HDL se na chylomikronech kolujících v krvi vyskytují povrchové APOC-I až C-III a APOE (Ledvina et al., 2009).

Po požití tučného jídla se chylomikrony exocytózou dostávají do střevní lymfy. Lymfa se přemění na zakalený chylus, který je přes ductus thoracicus spojen s krevním oběhem. Krevní plazma je zakalená, enzymovým odbouráváním chylomikronů se pozvolna vyčeřuje. Rychlost degradace chylomikronů i VLDL je vysoká, poločas rozpadu částice trvá zhruba 1 hodinu, následné absorbování požitých tuků ve střevě je pomalé.

Přibližně 6 hodin po konzumaci tuků je hladina v krvi stejná jako nalačno a plazma je opět čirá. Velký význam pro vyčerení plazmy má lipoproteinová lipáza lokalizovaná v membránách kapilárních endotelií (Ledvina et al., 2009).

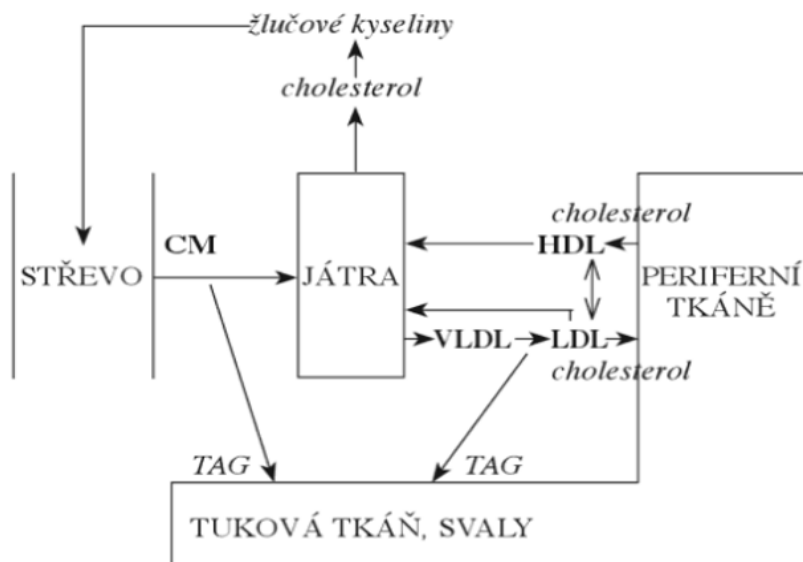
Lipoproteinová lipáza odštěpuje z triacylglycerolů v chylomikronu neesterifikované mastné kyseliny. Kromě toho navodí i odštěpování mastných kyselin z fosfolipidů. Neesterifikované mastné kyseliny se vazbou na albumin transportují krví ke tkáním. Degradační činností dochází k zmenšování, scvrkávání chylomikronů a vzniku chylomikronových zbytků. Tyto zbytky se oddělují od endotelu kapilár a vracejí se do krevního řečiště. Z jejich povrchu se uvolní APOC, jenž přejde na HDL, zbytek je rozpoznán receptory pro chylomikronové zbytky a degradován v játrech. Z toho vyplývá, že hlavním úkolem chylomikronů je dopravit mastné kyseliny z triacylglycerolů potravy do tkání a cholesterol získaný z potravy do jater (Ledvina et al., 2009).

V lidském organismu dochází k transportu lipidů a cholesterolu, které se vytvořily především v játrech. K transportu těchto látek se využívají další lipoproteinové komplexy: VLDL, IDL, LDL a HDL (Ledvina et al., 2009). Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou obsahují triglyceridy a estery cholesterolu. Velkou roli zde hraje mikrosomální triglyceridový transferový protein (MTP) a intracelulární lipidový transferový protein z endoplazmatického retikula. Triacylglyceridové jádro VLDL částice je metabolizováno ve svalové a tukové tkáni, prostřednictvím interakce s lipoproteinovou lipázou se uvolňují mastné kyseliny. Lipoproteinová lipáza pomáhá katalyzovat hydrolýzu triglyceridů na mastné kyseliny. Jakmile se triglyceridové jádro zmenší, vznikají lipoproteiny se střední hustotou (Lent-Schochet a Jialal, 2019).

IDL se zbavují APOC na svém povrchu a cholesterolu předáním na HDL, od nichž si převezmou esterifikovaný cholesterol. Určité množství IDL se vychytává v játrech, dochází ke štěpení, na němž se podílí jaterní lipáza (Lent-Schochet a Jialal, 2019).

Lipoproteiny s nízkou hustotou jsou definitivním výsledkem VLDL a IDL. LDL má schopnost transportovat cholesterol do tkání, někdy až v takové míře, která ohrožuje organismus na životě (Ledvina et al., 2009). Recykluje se v játrech, APOB-100 zprostředkovává endocytózu LDL vazbou APOB-100 receptoru nebo LDL receptoru na tkáň a jaterní buňky. LDL lze recyklovat v Golgiho aparátu jaterních buněk nebo se může vylučovat žlučí (Lent-Schochet a Jialal, 2019).

Lipoproteiny s vysokou hustotou vznikají v játrech a enterocytech, mají diskovitý tvar, obsahují fosfolipidovou dvouvrstvu a volný cholesterol. Nascentní HDL interagují s lecitin-cholesterolacyltransferázou, ta zodpovídá za esterifikaci cholesterolu a přenáší mastnou kyselinu z pozice 2 lecitinu na OH skupinu cholesterolu. Z esterů se v diskoidním HDL vytváří hydrofobní jádro, částice se zakulacuje a přeměňuje se na HDL<sub>3</sub>. Tato částice je zdrojem APOC a APOE pro chylomikrony a VLDL, dále předává estery cholesterolu do chylomikronů, VLDL a LDL výměnou za TAG a volný cholesterol. Pokud se zvýší množství TAG v částicích, způsobí to přechod HDL<sub>3</sub> na HDL<sub>2</sub>. HDL<sub>2</sub> se vychytává receptory v játrech nebo je část atakována heparinem uvolnitelnou jaterní lipázou, která odbourává TAG (Ledvina et al., 2009). HDL může vstoupit do oběhu a zachytit přebytečný cholesterol z tkání prostřednictvím ABCA1 nebo může získat cholesterol z buněk za pomoci uklízejícího receptoru B typu 1 (SR-B1) či pasivní difúzí. Přímou umožňuje transportovat cholesterol do jater interakcí s jaterním SR-B1, ale i nepřímo přenosem cholesterolu na VLDL či LDL, což usnadňuje cholesterylester transferový protein (CETP). Lecitin cholesterol acyltransferáza aktivována APOA-I na HDL umožňuje esterifikaci cholesterolu v HDL (Lent-Schochet a Jialal, 2019).



**Obrázek 2** - Metabolismus lipoproteinů zjednodušeně. Tuky z potravy jsou přenášeny chylomikrony (CM), TAG z CM přecházejí do periferních tkání, zbytky CM vychytávají játra, kde se syntetizují VLDL. TAG ve VLDL jsou uvolněny do tkání a VLDL se mění na LDL obsahující cholesterol. LDL jsou vychytávány v játrech nebo periferních tkáních. Cholesterol z tkání je přenášen HDL. Z cholesterolu se v játrech syntetizují žlučové kyseliny odcházející žlučí do střeva. Zdroj: (Vokurka, 2012)

## 2.2 *Apolipoproteiny*

Apolipoproteiny, zkráceně apoproteiny, jsou specializované bílkoviny amfipatického charakteru. Asociují se s polárními lipidy a společně tvoří obal lipoproteinové částice. Tím je umožněna rozpustnost lipidů ve vodném prostředí. Zprostředkovávají řadu nezbytných biochemických procesů asociovaných s lipoproteinovým metabolismem. Mezi apolipoproteiny se řadí několik skupin bílkovin, jež jsou označeny velkým písmenem (A až J) a římskou číslicí (Zima, 2013). V každé třídě lipoproteinů se nachází několik apolipoproteinů, které charakterizují daný lipoprotein. Některé apolipoproteiny si mohou vzájemně mezi sebou vyměňovat lipoproteinové částice (Žák a Macásek, 2011).

Apolipoproteiny jsou proteiny jako každé jiné. Jsou charakterizované svou primární strukturou, jež je určena expresí genetické informace. Geny, jim odpovídající DNA i sekvence aminokyselin jsou většinou známé. Jedná se o sekreční proteiny, to znamená, že mají ve své molekule signální peptidy o délce 18-27 aminokyselin (Musil, 1994).

Apolipoproteiny plní z obecného hlediska tyto funkce:

- Strukturální funkce – Umožňuje vytvoření lipoproteinových částic v místě syntézy, kterým je střevo nebo játra a zajišťuje stabilitu těchto částic ve vodném prostředí. Hydrolytickému štěpení a katabolismu APOB-100 brání asociace apolárního lipidu (ester cholesterolu či triacylglycerol) s APOB-100 uvnitř jaterní buňky. Přítomnost APOB-100 je nutná pro uspořádání VLDL a jeho sekreci do krevního oběhu.
- Funkce nezbytná pro transcelulární transport lipidů – Jako ligandy pro vazbu lipoproteinu na odpovídající buněčné receptory slouží specifické povrchové domény apolipoproteiny (APOB-100, APOE).
- Funkce apolipoproteinu založena na jejich působení jako kofaktorů některých enzymů lipoproteinové přeměny – Některé apolipoproteiny např. APOA-I a APOC-I působí jako aktivátory lecitincholesterol acyltransferázy (LCAT), jiné např. APOC-III působí jako inhibitory lipoproteinové lipázy (LPL) (Zima, 2013).

Rozdělení nejznámějších apolipoproteinů:

1) Apolipoprotein A

APOA-I se nachází v plazmě především jako součást HDL. Aktivuje enzym zvaný lecitin-cholesterol acyltransferáza, který je zodpovědný za esterifikaci plazmatického cholesterolu. Má uplatnění při vzniku a metabolickém dozrání HDL. Hraje velkou roli v reverzním transportu cholesterolu z tkání do jater (Sršeň a Sršňová, 2005). Syntetizuje se v játrech a střevě. Jedná se o protizánětlivou molekulu a antioxidant (Dominiczak, 2011). APOA-II je po APOA-I druhým hlavním proteinem HDL, vzniká v hepatocytech a enterocytech. Inhibuje LCAT a *in vitro* aktivuje hepatickou lipoproteinovou lipázu (Musil, 1994).

2) Apolipoprotein B

APOB tvoří až 90 % molekuly LDL. V chylomikronech a VLDL je hlavním apolipoproteinem (Sršeň a Sršňová, 2005). Je syntetizován v enterocytech, kde zajišťuje transport lipidů a v hepatocytech, kde zodpovídá za odsun triacylglycerolů. Vyskytuje se ve dvou formách: APOB-100 a APOB-48. Oba apolipoproteiny mají shodné epitopy, to lze dokázat pomocí monoklonálních protilátek. Zdá se, že jsou produktem jednoho společného genu (Musil, 1994). APOB-100 i APOB-48 jsou složkou částic bohatých na triacylglyceroly. APOB-100 je produkován v játrech, zatímco APOB-48 v tlustém střevě (Sršeň a Sršňová, 2005).

3) Apolipoprotein C

APOC se řadí mezi nejmenší známé apolipoproteiny. APOC-I je přítomný v lipoproteinech bohatých na triglyceridy, vytěsňuje APOE v lipidových emulzích a aktivuje LCAT (Dominiczak a Caslake, 2011). APOC-II vytváří VLDL a HDL. Silně aktivuje LPL, ta katalyzuje hydrolýzu triacylglycerolů v chylomikronech a VLDL (Sršeň a Sršňová, 2005). APOC-III inhibují společně s APOC-I aktivitu LPL. Dále mohou zabraňovat absorpci zbytkových částic inhibicí vazby APOE na receptory (Dominiczak a Caslake, 2011).

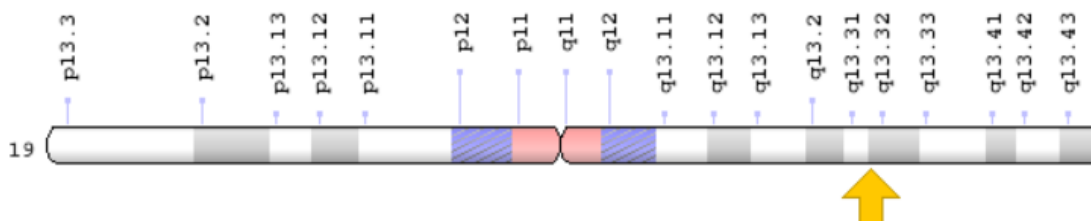
4) Apolipoprotein D

APOD je v plazmě spojován hlavně s HDL částicemi, ale je možné ho najít i v LDL a VLDL částicích. Účastní se esterifikace cholesterolu. V mozkové tkáni může ovlivnit

transport lipidů např. při regeneraci nervů (Žák a Macásek, 2011). Existuje také spojitost mezi zvýšenou hladinou APOD a lepší prognózou rakoviny prsu i prostaty. APOD je mimo jiné přenašečem bilirubinu v plazmě. Pokud je v nádorové tkáni exprimováno více APOD, nachází se zde i zvýšená hladina bilirubinu. Zvýšená hladina bilirubinu přináší protektivní efekt a lepší prognózu pro pacienty s již výše zmíněným karcinomem prstu nebo prostaty (Goessling a Zucker, 2000).

### 2.3 Apolipoprotein E

Gen pro APOE je známý také pod názvy Apo-E, Apolipoproteins E a APOE\_HUMAN. Gen *APOE* se nachází na dlouhém rameni (q) 19. chromozomu v pozici 13.32 (19q13.32). Je úzce spojen s *APOC-I a C-II* genovým komplexem. Skládá se ze čtyř exonů a tří intronů, celkově z 3 597 nukleotidů (Eichner, 2002). Gen *APOE* kóduje protein, který se nazývá apolipoprotein E (APOE gene, 2019). Jedná se o polypeptid s molekulovou hmotností 34 kDa, který je tvořený 299 aminokyselinami (Hatters et al., 2006). Slučuje se v těle s lipidy za vzniku lipoproteinů. Lipoproteiny jsou zodpovědné za obalování cholesterolu a dalších lipidů, ale i za jejich transport do krevního oběhu (APOE gene, 2019).



Obrázek 3 - Pozice genu *APOE* na chromozomu 19. Zdroj:(*APOE gene*, 2019)

*APOE* je polymorfní gen s několika izoformami, které se od sebe liší elektrickým nábojem a tím i pohybem během elektroforézy. Různé varianty *APOE* jsou výsledky různých alel tohoto genu. Byly označeny E1 až E7 podle klesajícího záporného náboje, E1 je nejvíce záporná a E7 nejméně záporná (Yamanouchi, 2001). Isoformy APOE2, APOE3 a APOE4 se běžně vyskytují ve většině světových populací (Corbo a Scacchi, 1999). Alela *APOE*  $\epsilon$ 3 je přítomna v 79 % populace, alela *APOE*  $\epsilon$ 4 se nachází u 13,3 % a alela *APOE*  $\epsilon$ 2 pouze u 7,3 % populace (Van Giau et al., 2015). Lidské buňky mají dvě kopie každého genu, proto existuje v populaci šest genotypů *APOE*: tři homozygotní (E2/E2, E3/E3, E4/E4) tři heterozygotní (E3/E2, E4/E2, E4/E3). Tři hlavní izoformy (APOE2, APOE3 a APOE4) se od sebe liší jednou nebo dvěma aminokyselinami



v pozicích 112 a 158. Tyto rozdíly mění strukturu i funkci APOE. APOE2 obsahuje cystein v pozici 112 a 158. U APOE3 se v pozici 112 vyskytuje cystein a v pozici 158 arginin a APOE4 má v obou pozicích arginin (Eichner, 2002). Frekvence nejvíce častých alel *APOE* v různých populacích po celém světě ukazují, že geografie, klima, izolace místními přizpůsobenými, genetický drift a pravděpodobný vývoj evoluční historie jsou zodpovědné za utváření spektra genetické variace *APOE* (Van Giau et al., 2015).

Apolipoprotein E patří k významným proteinům v organismu. Plní důležitou úlohu v metabolismu cholesterolu a triacylglycerolů. Je součástí proteinových komplexů VLDL, HDL a chylomikronů (Sršeň a Sršňová, 2005). Protein APOE přepravuje cholesterol a ostatní lipidy v plazmě a centrální nervové soustavě prostřednictvím vazby svých receptorů na buněčný povrch. Obsahuje dvě terminální domény N a C. N terminální doména je ta doména, která váže receptor. Zatímco terminální doména C představuje hlavní oblast vázající lipid (Zhao et al., 2018). APOE má rozmanité role v regulaci hladin lipidů a lipoproteinů v krvi. Podílí se na vylučování zbytků lipoproteinů, které jsou bohaté na triglyceridy, z oběhu do jater (Marais, 2019).

V lidském mozku se nachází až 25 % neesterifikovaného cholesterolu, ten je potřebný pro produkci, funkci a integritu myelinu. Homeostáza cholesterolu je významná pro normální funkce mozku, jelikož je nepostradatelnou složkou pro růst axonů, synaptickou tvorbu a remodelaci událostí, které jsou klíčové pro učení a paměť. Dysfunkce cholesterolu v centrální nervové soustavě může být spojována se stárnutím a vznikem některých neurodegenerativních onemocnění (Van Giau et al., 2015).

APOE je produkován hepatocyty, makrofágy a adipocyty v periferních tkáních. V centrálním nervovém systému je exprimován v astrocytech, mikroglíích, buňkách cévních stěn a chorooidním plexu. Nervovými buňkami je produkován pouze ve stresových situacích nebo při zranění. V plazmě je APOE primárně spojován s lipoproteinem o velmi nízké hustotě (VLDL), zatímco v CNS se nachází s částicí o vysoké hustotě (HDL). Hladiny plazmatického APOE se liší v závislosti na jeho genotypu, přičemž hladina APOE  $\epsilon 2/\epsilon 2$  je nejvyšší a APOE  $\epsilon 4/\epsilon 4$  nejnižší.

APOE v mozku pochází primárně z *de novo* syntézy, protože hematoencefalická bariéra omezuje jeho transport do mozku i zpět. To má souvislost s transplantací jater, kdy se mění pouze izoforma APOE v plazmě příjemce na izoformu dárce, avšak izoforma APOE v mozkomíšním moku zůstává zachována (Zhao et al., 2018).

### 2.3.1 Receptory APOE

Apolipoprotein E je jeden z hlavních regulátorů hladin lipidů. Podílí se na tom, aby obsah lipidů v plazmě i tkáni byl v homeostáze. Toho je částečně dosaženo vazbou s vysokou afinitou APOE na lipoproteinové receptory, které se nachází na buněčném povrchu (Huang a Mahley, 2014). APOE umožňuje interakci lipoproteinů a lipidových komplexů s LDL receptorem, proteinem příbuzným k LDL receptoru (LRP), VLDL receptorem, APOE-2 receptorem a gp330.

Každá izoforma APOE je schopna odlišně reagovat s těmito receptory. LDLR a VLDLR se vážou buď na lipidované částice APOE, nebo na samotný APOE, který lipidové částice neobsahuje. Obě tyto formy APOE se vážou rovněž na proteoglykany heparansulfátu (HSPG) vyskytující se na povrchu buněk. Isoforma APOE2 má sníženou funkční katabolickou rychlost a vykazuje výrazně zhoršenou vazbu na LDL receptor, to přispívá ke zvýšeným hladinám triacylglycerolů a cholesterolu v plazmě. V porovnání APOE2 s APOE3 a APOE4 není jeho snížená afinita k LRP1 tolik závažná. I když APOE4 a APOE3 mají podobné vazebné aktivity pro LDL receptor, přítomnost APOE4 souvisí se zvýšenými hladinami celkového cholesterolu v plazmě a LDL cholesterolu. VLDL receptor s proteoglykany heparansulfáty rozeznávají všechny izoformy se stejnou afinitou (Yamanouchi, 2001; Zhao et al., 2018).

### 2.4 Onemocnění spojená s APOE

Porozumění strukturálním rozdílům jednotlivých izoform APOE umožňuje stanovit molekulární mechanismus zodpovědný za příslušnou patologii. Účinek APOE na regulaci plazmatických hladin lipidů a lipoproteinů byl rozsáhle studován. Existují důkazy popisující jeho spojitost s neurodegenerativními chorobami a dalšími chronickými onemocněními jako jsou např. Alzheimerova choroba, kardiovaskulární onemocnění, Parkinsonova choroba, vaskulární demence, *diabetes mellitus* 2. typu, roztroušená skleróza, cévní mozková příhoda či hyperlipoproteinémii III. typu (Van Giau et al., 2015).

V této kapitole se podrobněji zabývám Alzheimerovou chorobou, hyperlipoproteinémií III. typu a kardiovaskulárním onemocněním.

### 2.4.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba se řadí mezi nejčastěji se vyskytující formu demence, a dokonce je čtvrtou až pátou nejčastější příčinou smrti s 1% prevalencí v populaci (Zvěřová, 2017). Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění, při kterém dochází k degeneraci a destrukci neuronů, především cholinergního systému. AD se vyznačuje makroskopickými změnami, například zúžením mozkových závitů, dilatací mozkových komor, kortikální a subkortikální atrofií zejména amygdaly, hippocampu a temporálních laloků. Další charakteristické nálezy pro AD jsou extracelulární senilní plaky a intracelulární depozita neurofibrilárních buněk (Cibičková a Palička, 2005).

V senilních placích se vyskytuje beta-amyloid v agregované formě, který vzniká štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP) enzymem beta-sekretázou. Beta-amyloid se vyskytuje ve dvou izoformách:  $\alpha\beta 40$  a  $\alpha\beta 42$ . Právě izoforma  $\alpha\beta 42$  se agreguje rychleji a je asociována s familiární AD. Agregovaná forma  $\alpha\beta$  je neurotoxická. Vytváří kalciové kanálky, kterými vstupuje vápník do buňky, kde se nahromadí a buňka hyne, protože není schopna ho pufrovat. S největší pravděpodobností se na regulaci štěpení APP podílejí cholinergní mechanismy. Jejich snížená aktivace přítomná u AD podporuje narušené zpracování APP a vede ke vzniku výše zmíněných senilních plaků (Cibičková a Palička, 2005).

Centrální nervový systém obsahuje téměř čtvrtinu neesterifikovaného cholesterolu z jeho celkového množství v organismu. V mozku vzniká všechno cholesterol syntézou *in situ* a z periferních orgánů je vychytáván minimálně. Řada epidemiologických studií uvádí, že hypercholesterolemie se řadí mezi významné rizikové faktory pro vznik AD. Cholesterol kromě modulace syntézy beta-amyloidu, také kontroluje interakci mezi beta-amyloidem a membránou nervových buněk. Tato interakce je velmi důležitý krok pro iniciaci neurotoxické kaskády. Tvorba beta-amyloidu z APP je podpořena zvýšenými hladinami cholesterolu a stimulací beta-sekretázy, nízké hladiny cholesterolu a klesající aktivita beta-sekretázy tvorbu snižují. Přítomnost cholesterolu je také nutná k přeměně rozpustného beta-amyloidu na fibrilární nerozpustnou formu (Cibičková a Palička, 2005).

Vlivem apolipoproteinu E v mozku dochází k neuronální reparaci, růstu dendritů a synaptické plasticitě. Isoforma APOE4 ve srovnání s izoformou APOE3 je méně efektivní při reparaci neuronů. Byl popsán i protizánětlivý účinek APOE. Zdědění alely  $\epsilon 4$  genu pro APOE představuje významně zvýšené riziko vzniku AD v mladším věku.

Lidé s dvěma kopiemi této alely mají až 8krát vyšší riziko AD v mladším věku než lidé, kteří tuto alelu nemají (Cibičková a Palička, 2005).

#### **2.4.2 *Hyperlipoproteinémie III. typu***

Hyperlipoproteinémie (HLP) III. typu, známá také pod názvem dysbetalipoproteinémie, je vrozená porucha lipoproteinů, pro kterou je charakteristická vysoká hladina cholesterolu i triglyceridů v plazmě. Typickým nálezem HLP III. typu je přítomnost patologického lipoproteinu beta VLDL v plazmě (Brewer, 1983; Češka, 2005).

Klinickými projevy nemocných jsou všechny typy xantomatózy, nejvíce časté jsou tuberózní a tuberoeruptivní xantomy s predilekční lokalizací na kolenou, loktech a hýždích. S nižší četností se objevuje šlachová xantomatóza, zejména na Achillových šlachách. Mezi nejzávažnější projev HLP III. typu patří předčasná ateroskleróza, která postihuje většinou periferní tepny, ale může postihnout i koronární řečiště.

HPL III. typu mnohdy doprovází řada dalších onemocnění. Některé lze zařadit mezi rizikové faktory ischemické choroby srdeční (ICHS) například obezitu, arteriální hypertenzi, poruchu glycidové tolerance, manifestní DM, hyperurikémii či manifestní dnu (Aschermann et al., 2004).

Molekulární příčina HLP III. typu je spojována s výskytem APOE2, jež zvyšuje hladiny triglyceridů a cholesterolu. Dědičnost alel  $\epsilon 2/\epsilon 2$  je spjata s časnějším rozvojem těžší formy hypolipoproteinémie III. Avšak u většiny nosičů těchto alel se objevuje spíše hypolipidémie nebo hypocholesterolémie, a proto pro rozvoj HPL budou důležité i jiné faktory (Žák a Macásek, 2011; Van Giau, 2015).

Tato choroba se může dědit dominantně nebo recesivně, záleží na genetické mutaci apolipoproteinu E. Společně s fenotypem APOE hrají roli při manifestaci i funkční vlastnosti APOE a jeho interakce s lipolytickými enzymy (Češka, 2005).

#### **2.4.3 *Kardiovaskulární onemocnění***

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou v České republice nejčastější příčinou morbidit obyvatelstva a příčinou přibližně poloviny všech úmrtí. Onemocnění kardiovaskulárního systému je v nejvíce případech způsobeno aterosklerózou a jejími komplikacemi (ischemickou chorobou srdeční, cévní mozkovou příhodou či ischemickým onemocněním dolních končetin) (Hromadová, 2004).

Ateroskleróza je multifaktoriální onemocnění cévní stěny, které vzniká důsledkem interakce metabolických a strukturálních vlastností cévní stěny, krevních komponent a hemodynamických sil. Aterosklerózou se rozumí dlouhodobě probíhající zánětlivý proces postihující vnitřní stěnu tepny poškozenou chemickými, fyzikálními nebo biochemickými vlivy (Hromadová, 2004). Na rozvoji aterosklerózy se podílí řada rizikových faktorů, které podporují vlastní aterogenezi a často i trombogenezi. Oba zmíněné procesy mají uplatnění v patogenezi cévních onemocnění. Aterosklerózou dochází k postupnému zužování průsvitu cév a ke ztrátě nesmáčivého povrchu endotelové výstelky. Trombus na takovém povrchu pak vyvolá rychlý uzávěr cévy. Rizikové faktory se dělí na neovlivnitelné a ovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné patří věk, pohlaví, rodinná anamnéza nebo genetická informace a mezi ovlivnitelné faktory patří hypertenze, kouření, nadváha a většina laboratorních parametrů (Racek, 1999).

*APOE* je rizikovým genetickým faktorem. Prevalence fenotypů obsahujících alelu  $\epsilon 4$  byla výrazně vyšší u kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních onemocnění, jako je infarkt myokardu, hypertenze, ischemická choroba srdeční a cévní mozková příhoda (Zende, 2013). V porovnání s alelou  $\epsilon 3$  a  $\epsilon 2$ , přispívá  $\epsilon 4$  k dřívější a vyšší úmrtnosti, což logicky vede k nižšímu výskytu alely  $\epsilon 4$  u starších lidí (Haan a Mayeda, 2010). U pacientů, kteří mají homozygotní  $\epsilon 4$  alelu, byla pozorována vyšší hladina celkového cholesterolu, LDL cholesterolu, VLDL cholesterolu i triacylglyceridů a nižší hladina cholesterolu HDL v plazmě. Uvádí se, že alela  $\epsilon 2$  může mít ochranný účinek (Zende, 2013).

## **2.5 Laboratorní diagnostika genu *APOE***

Pro laboratorní diagnostiku genu *APOE* lze využít několik molekulárně – genetických metod. Některé z těchto metod jsou založené na polymerázové řetězové reakci. Nejčastěji používanými metodami jsou: PCR-RFLP, AS-PCR, PCR-SSP, Real time PCR, hybridizační metody a sekvenování.

### **2.5.1 PCR**

Polymerázová řetězová reakce, zkráceně PCR, (z anglického *Polymerase Chain Reaction*) je nyní jedna z nejznámějších a nejvyužívanějších molekulárně biologických metod. Používá se tehdy, je-li zapotřebí amplifikovat (zmnožit) specifické úseky DNA a k tomu využívá procesy denaturace, hybridizace a replikace (syntézy) DNA.

Tato technika se používá od roku 1985 a byla vyvinuta pracovníky kalifornské biotechnologické firmy Cetus Corporation pod vedením Karyho Mullise, jemuž byla za objev PCR udělena roku 1993 Nobelova cena (Kočárek, 2007).

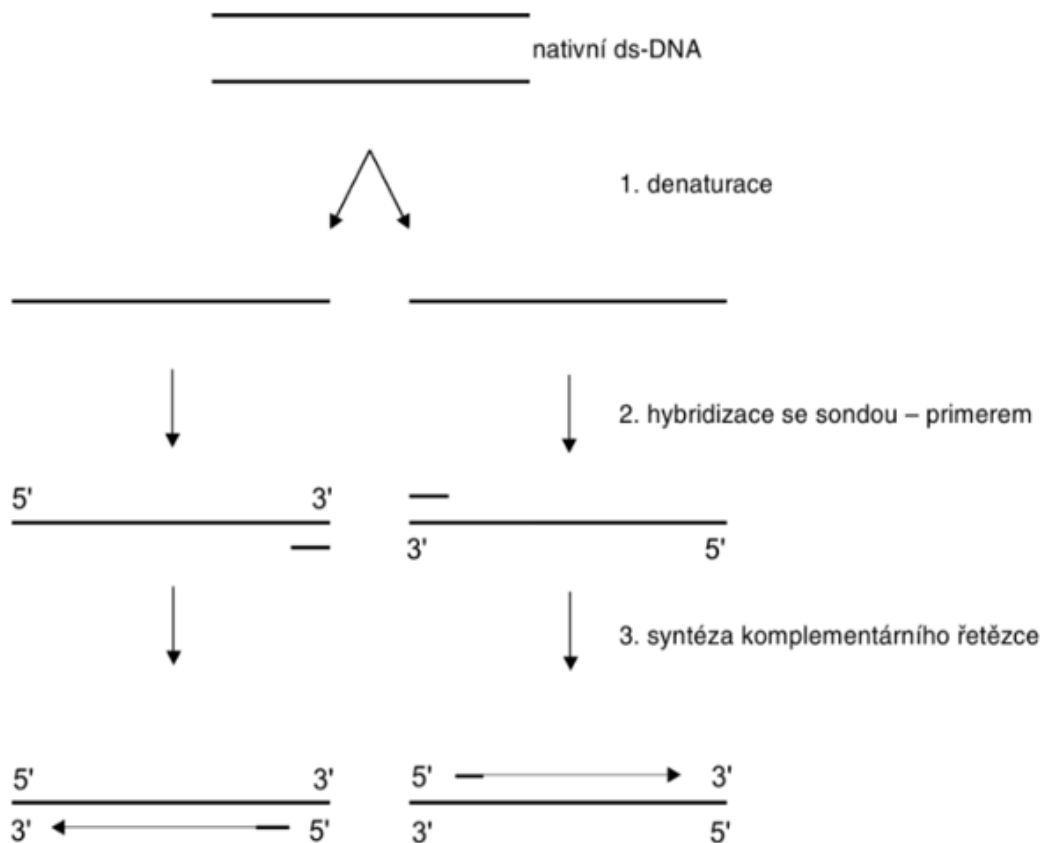
K amplifikaci určité části DNA jsou nezbytné dva krátké oligonukleotidové úseky (20-25 nukleotidů), které se nazývají primery a jsou komplementární k oběma koncovým oblastem amplifikované DNA. Cílové sekvence, s nimiž hybridizují primery, musí být dostatečně specifické jen pro tu oblast, která má být pomnožena. Dále je třeba k provedení PCR dostatečná zásoba deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP) a termostabilní DNA-polymeráza, izolovaná z bakterie *Thermophilus aquaticus*, která přirozeně žije ve vývěrech horkých minerálních pramenů, a proto zůstává odolná po zahřátí roztoku na teplotu kolem 100 °C (Kočárek, 2007).

V průměru se PCR skládá z 25-30 opakovaných cyklů. Každý cyklus tvoří tři reakce probíhající za určité teploty a času. Proces amplifikace se provádí v zařízení, které se nazývá termocykler (Passarge, 2019). Termocykler je schopný velmi rychle měnit teplotu v mikrozkušavkách. Hlavní částí termocyklu je termální blok, který se nachází pod víkem. Do bloku se vkládají reakční směsi s vzorky DNA v PCR mikrozkušavkách. Součástí termocyklu je displej, na němž se zobrazuje krok cyklu, aktuální cyklus, aktuální teplota či uplynulý čas (Kuciel a Urban, 2016).

PCR probíhá tak, že se inkubují vzorky při třech teplotách, které odpovídají třem následujícím krokům v amplifikačním cyklu: denaturaci, annealingu a elongaci.

- **Denaturace** – Vzorek s dvouvláknovou DNA se zahřeje na 90-95 °C. První denaturace trvá déle (okolo 8-9 minut), aby došlo k rozpojení všech dvojvláken DNA. Denaturace v ostatních cyklech trvá 15-30 sekund.
- **Annealing** – Dochází k hybridizaci komplementárních primerů (oligonukleotidů) na přesné místo templátové DNA. Tento krok probíhá při teplotě 60-65 °C po dobu 15-30 sekund.
- **Elongace** – Při zahřátí na 68-72 °C se pomocí *Taq* polymerázy prodlužují připojené primery po dobu 30-60 sekund (Kuciel a Urban, 2016). Polymeráza nasedá na 3' -OH konce navázaných primerů, připojuje k nim nové nukleotidy a tím prodlužuje řetězec ve směru 5' → 3'. Čím delší je amplifikovaný úsek, tím déle trvá elongace (Kočárek, 2007).

Během opakování výše uvedených fází se množství fragmentů namnoží v milionech kopií, což je vlastně cílem této reakce. Pokud není po doběhnutí reakce vzorek s PCR produktem vyndán z termocykleru, přístroj začne blok chladit na 4 °C, takže je možné reakci spustit i přes noc (Kuciel a Urban, 2016).



*Obrázek 4 - Průběh PCR reakce. Zdroj: (Bartůňková a Paulík, 2011)*

Výsledek amplifikace části DNA může být vizualizován pomocí elektroforézy na agarózovém gelu jako proužek přesně definované velikosti. Kromě standardní PCR existují i jiné modifikace vyvinuté pro různé molekulárně biologické účely (Passarge, 2019).

Polymerázová řetězová reakce je vhodná k namnožení úseků DNA i za podmínek, kdy do reakce vstupuje malé množství DNA. Je to plně automatizovaná metoda, která se vyznačuje velmi vysokou rychlostí a citlivostí (Passarge, 2019). Využívá se pro cílenou diagnostiku dědičných onemocnění u lidí, v prenatální diagnostice nebo při vyšetřování forenzních případů (Snustad et al., 2017).

Má však také několik nedostatků. Citlivost reakce je tak vysoká, že je třeba dát pozor, aby nedošlo k nežádoucí kontaminaci vyšetřované DNA (Passarge, 2019). Do amplifikovaných kopií DNA se v nízké, ale významné četnosti zanášejí chyby. *Taq*-polymeráza nemá korekční aktivitu, proto produkuje při replikaci chyby s vyšší četností. Jestliže se vyžaduje vysoká přesnost amplifikace, použije se teplotně stabilní polymeráza vykazující vyšší korekční aktivitu např. polymeráza z *Pyrococcus furiosus* nebo z *Thermococcus litoralis*. Další nevýhodou je to, že *Taq*-polymeráza amplifikuje neúčinně úseky DNA delší než několik tisíc nukleotidových párů. V případě, že se amplifikují dlouhé úseky, nahradí se *Taq*-polymeráza *Tfl*-polymerázou z *Thermus flavus* (Snustad et al., 2017).

### 2.5.2 Elektroforéza

Elektroforéza je nejpoužívanější separační technika určená k izolaci a analýze nejen DNA, ale také RNA, proteinů a dalších biochemicky významných látek. (Šmarda et al., 2005; Kočárek, 2007).

Různě dlouhé úseky DNA nebo RNA se oddělí pomocí molekulárního síta, tvořeného vláknou polymerní sloučeniny. Molekuly musí být však umístěny v elektrickém poli. Částice nukleových kyselin mají kvůli přítomnosti aniontových fosfátových skupin celkově negativní náboj, a proto se pohybují k opačně nabitě anodě, která má kladný náboj. Při průchodu molekulárním sítem se vlivem tření kratší fragmenty pohybují rychleji než delší fragmenty, jejichž přesun se opoždí (Kočárek, 2007).

**Gelová elektroforéza** je běžně používaná laboratorní technika. Provádí se na vhodném nosiči, kterým bývá gel. Elektroforetické gely je možné připravit z polyakrylamidu nebo agarózy. Obě tyto sloučeniny vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost je ovlivněna složením roztoku a koncentrací polymeru. Agarózové gely se používají pro separaci nukleových kyselin o velikosti od 100 bp do 50 kb a polyakrylamidové gely se používají pro separaci molekul o velikosti 10 bp až 1000 bp (Šmarda et al., 2005). Pro vizualizaci fragmentů DNA se nejvíce využívá barvení agarózových gelů ethidium-bromidem, tímto způsobem se do vlákna DNA během elektroforézy vmezeří jeho fluorescenční molekuly, následuje jejich vizualizace dosažená osvětlením gelu UV světlem. (Kuciel a Urban, 2016).



### **2.5.3 PCR-RFLP**

*(Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism)*

Jedná se o standardní modifikaci PCR používanou pro typizaci cílové sekvence, v níž se nachází sekvenční polymorfismus. Výsledkem amplifikace jsou produkty PCR o stejné délce. Tyto produkty jsou detekovány pomocí elektroforézy, následně se využije vlastností restriční endonukleázy a jejím působením dochází ke specifickému štěpení PCR produktů. Poté se pomocí elektroforézy na agarózovém gelu znovu detekuje počet různě dlouhých fragmentů (Šmarda et al., 2005).

Reakční směs pro štěpení PCR produktu obsahuje pufr pro restriční endonukleázu, restriční endonukleázu a příslušný objem destilované vody. Tato směs se promíchá s PCR produkty (Kuciel a Urban, 2016).

Restriční endonukleázy rozeznávají a štěpí pro ně specifické sekvence. Jedná se o produkty různých mikroorganismů. Jejich biologickou funkcí je ochrana genetického materiálu bakterií před cizorodou DNA jiných druhů nebo před virovou DNA (Snustad et al., 2017). Krátká, zpravidla čtyř až osmi nukleotidová sekvence dvouřetězcových molekul DNA tvoří rozpoznávací místo většiny restričních enzymů. Hydrolyzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců dochází k rozštěpení molekuly DNA. Produktem štěpení jsou restriční fragmenty, což jsou úseky DNA o definované délce (Šmarda et al., 2005).

### **2.5.4 PCR SSP**

*(Sequence-specific primers PCR)*

PCR SSP umožňuje amplifikovat dvouvláknové DNA, i když je známá sekvence pouze pro jeden konec specifické oblasti. Kromě toho umožňuje amplifikaci genů, o jejichž sekvencích jsou dostupné jen částečné informace. Dále si používá při jednosměrném genomovém přechodu ze známé oblasti chromozomu do neznámé (Wu, 2012).

Chromozomální DNA je štěpena jedním nebo dvěma restričními enzymy a neznámý konec restriční chromozomální DNA je ligován k vhodnému oligomeru (generický oligomer) se známou sekvencí, který je dostatečně dlouhý na to, aby sloužil jako PCR primer (generický primer) nebo je neznámý konec ligován k vektoru. V takovém případě může být vektorová sekvence použita k návrhu primeru pro PCR reakci. Ligační reakční

směs je amplifikována primerem specifickým pro známý konec fragmentu a generickým primerem komplementárním s vektorem nebo generickým oligomerem. Přestože generický primer nasedá na neznámé konce fragmentů, výsledné produkty rostou pouze lineárně. Současné nasedání specifického primeru a generického primeru na specifický produkt vede k exponenciální amplifikaci specifického produktu (Shyamala a Ames, 1993).

### **2.5.5 AS-PCR**

Alelově specifická PCR se používá při diagnostice bodových mutací a malých delecí. Vyznačuje se využitím alelově specifických oligonukleotidů jako primerů. Speciálně připravený primer hybridizuje ve své 3' oblasti k standardní a mutované alele (Zima, 2013). AS-PCR se provádí ve dvou nebo více paralelních reakcích. Zatímco první primer je v první reakci komplementární ke standardní sekvenci a v další reakci k mutantní nebo polymorfní sekvenci, tak druhý primer je v obou reakcích stejný. K elongaci dojde pouze za předpokladu, že primer a cílová sekvence jsou zcela komplementární. U homozygotního stavu k amplifikaci dochází jen v jedné z reakcí (Šmarda et al., 2005).

#### **2.5.5.1 ARMS-PCR**

*(Amplification refractory mutation detection system)*

ARMS-PCR je nejčastěji využívaná varianta AS-PCR, jejíž podstatou je nezbytnost přesné komplementarity bazí na 3' konci primeru. Komplementarita je zásadní pro správnou amplifikaci. Při neshodě komplementarity, nedojde ke specifické amplifikaci (Zima, 2013).

### **2.5.6 Real-time PCR**

Tato metoda je založena na použití fluorescenčně značených sond a detekčního systému, který je schopen měřit intenzitu fluorescence, ta je úměrná množství produktu PCR reakce v reálném čase. Při použití známých koncentrací cílové DNA, lze sestavit kalibrační křivku, pomocí níž lze přesně kvantifikovat množství cílové DNA v biologickém vzorku (Bartůňková a Paulík, 2011).

Kvantifikaci amplikonů lze uskutečnit prostřednictvím sondy označené fluorescenčním barvivem. Sonda musí hybridizovat s vyšetřovanou DNA za stejných podmínek jako primery. Sonda se připojí k templátové DNA po proběhlé denaturaci. Termostabilní

DNA-polymeráza, která má za úkol připojovat k primerům další nukleotidy, narazí na sondu. Nyní enzym projeví exonukleázovou aktivitu, pokračuje v syntéze nového komplementárního vlákna a zároveň odbourává sondu a místo ní zařazuje nukleotidy z reakční směsi. Nukleotidy tvořící sondu se uvolňují do roztoku. Některé jsou označeny specifickým fluorescenčním barvivem, které začne fluoreskovat až po uvolnění do roztoku. Intenzita fluorescence reakční směsi vzrůstá, tento nárůst je přímo úměrný množství amplikonů, které při reakci vznikají (Šmarda et al., 2005).

Pro PCR v reálném čase se používají speciální termocyklery, které ozařují vzorek excitačním UV zářením indukujícím fluorescenci příslušného barviva. Speciální detektor změří po každém cyklu intenzitu fluorescence a poté převede výsledky do počítače. Koncentrace fluorescenčního barviva odpovídá množství vzniklého amplikonu a je zaznamenávána specializovaným programem průběžně neboli v reálném čase (Kočárek, 2007).

### **2.5.7 Hybridizační metody**

Hybridizační metody jsou založené na možnosti identifikace určitých sekvencí DNA nebo RNA na základě asociace s uměle vytvořenými komplementárními úseky nukleových kyselin. V medicíně a molekulární biologii mají velmi široké využití. Kromě diagnostiky mutací a chromozomálních odchylek slouží k mapování genomu, studiu genové exprese nebo vyšetření infekčních onemocnění, zejména virových (Kočárek, 2007).

Hybridizací se rozumí proces, při kterém se vytvářejí dvouřetězcové molekuly z jednořetězcové DNA nebo RNA za podmínky, že se jejich sekvence vyznačují úplnou nebo částečnou komplementaritou bází (Šmarda et al., 2005). První řetězec představuje cílovou neboli vyšetřovanou DNA, popřípadě RNA a druhým řetězcem je sonda. Sondy jsou označeny nejčastěji radioaktivně nebo fluorescenčně (Kočárek, 2007).

Hybridizace probíhá tak, že je třeba nejdříve vyšetřovanou nukleovou kyselinu denaturovat působením vysoké teploty. Jestliže sondu tvoří dvouřetězcová DNA (dsDNA), je nutné provést i denaturaci sondy. Řetězce cílové DNA i sondy se oddělí, následně se teplota sníží a dojde k ochlazení, čímž se navodí renaturační podmínky. K hybridizaci dochází tehdy, je-li sonda v dostatečně vysoké koncentraci a váže se ke komplementárním sekvencím vyšetřované DNA dříve než původní řetězec.

Na základě přítomnosti hledané sekvence ve vyšetřovaném vzorku vzniká hybridizační signál. Pokud signál chybí, příslušný úsek není přítomný (Kočárek, 2007).

#### **2.5.7.1 Reverzní hybridizace**

Hybridizační reakce nukleových kyselin mohou probíhat v roztoku, na pevných podkladech a v preparátech chromozomů, buněk či tkání (*in situ*). Reverzní hybridizace je typ hybridizace na pevných podkladech a patří mezi jednu z nejvíce využívaných variant hybridizačních technik v současné době. V tomto případě se denaturovaná nukleová kyselina přenáší na pevný podklad, kterým je obvykle nylonová membrána nebo nitrocelulózový filtr a značený vzorek DNA hybridizuje k neznačeným imobilizovaným sondám (Šmarda et al., 2005).

#### **2.5.7.2 Reverzní hybridizace na stripech**

Komerční stripky umožňují rychlé a jednoduché stanovení polymorfismů genů. K amplifikaci příslušných fragmentů DNA dochází prostřednictvím metody multiplex PCR, která obsahuje několik různých primerových párů. Během amplifikace dojde také k označení PCR produktů biotinem. Při hybridizační reakci dochází ke smíšení jednořetězcové molekuly PCR produktu označené biotinem s krátkými alelově specifickými oligonukleotidy – sondami, které jsou ukotveny na stripku. Jednotlivé sondy hybridizují s mutovanou i s nemutovanou DNA na základě jejich komplementarity. Pro vizualizaci hybridizovaných sond lze použít např. reakci streptavidin-biotin (Matýšková a Čech, 2009).

#### **2.5.8 Sekvenování**

Pod pojmem sekvenování neboli sekvencování se rozumí stanovení sekvence nukleotidů v molekulách nukleových kyselin. Znalosti o sekvenci DNA jsou rutinně využívány k odvození informace o aminokyselinové sekvenci kódovaných proteinů, o regulaci jejich tvorby a umožňují detailně stanovit charakter mutací (Šmarda et al., 2005).

Nyní nejvíce používaná metoda sekvenování DNA je modifikací PCR. Při analýze se používá jen jeden oligonukleotidový primer, jež je komplementární k počáteční oblasti sekvenovaného úseku DNA. Do reakční směsi se dále přidává DNA-polymeráza, deoxynukleosidtrifosfáty a dideoxynukleosidtrifosfáty. Dideoxynukleotidy

jsou syntetické nukleotidy značené fluorescenčním barvivem, které mají na 3' uhlíkovém atomu místo OH skupiny navázaný pouze vodík (Kočárek, 2007).

Vzorek DNA s reakční směsí se vloží do cykleru, ve kterém dochází ke změnám teploty jako při klasické PCR. Po připojení primeru se nasyntetizují nové řetězce DNA, do nichž se začleňují jednotlivé nukleotidy. Jestliže se místo dNTP zařadí ddNTP tvorba příslušného řetězce se zastaví, protože další nukleotid lze připojit pouze k OH skupině. Během procesu se vytvoří velký počet jednořetězcových fragmentů DNA o různé velikosti. Spektrum úseků lišících se o jeden nukleotid se získá elektroforetickým rozdělením směsi pomocí kapilární elektroforézy. Díky výskytu specifického fluorescenčního barviva na konci každého fragmentu je možné zjistit, kterým ddNTP byla syntéza ukončena. Sekvence analyzovaného řetězce DNA je tvořena pořadím ddNTP na koncích jednotlivých úseků (Kočárek, 2007).

## **2.6 Validace bioanalytických metod**

Validací bioanalytických metod se rozumí postup, při kterém se stanovuje, zda je vhodné použít daný analytický systém k získání spolehlivých dat. V klinických laboratořích se musí validovat nenormalizované metody, metody vyvinuté laboratoří a normalizované metody, které jsou v určitém směru rozšířené či modifikované (Křížek a Šíma, 2015). Validace metod je také jedním z požadavků norem ISO 17025 a ISO 15189. Pravidla pro provádění validací molekulárně genetických metod nejsou nyní ještě pevně stanovena, zatím byla vypracována jen určitá doporučení. V současné době je základním předpokladem pro všechny prováděné metody zavedený systém vnitřní kontroly kvality, jehož součástí je systematické používání kontrolních pozitivních i negativních vzorků. Pro metody, které využívají PCR, je nezbytné použít NTC (no template control) kvůli vyloučení případné kontaminace (do vzorku se nepřidává DNA). Validace metody by měla obsahovat všechny kroky, které byly použity během přípravných postupů (izolace DNA/RNA) a také validaci použitých přístrojů. Závěrem každé validace je validační protokol, ve kterém jsou uvedeny údaje o způsobu provedení a vyhodnocení metody. Aby byla validace platná, nesmí se používaný operační postup lišit od postupu použitého při validaci (Brdička et al., 2007).

Mimořádně silný dopad v praxi mají výsledky analytických měření. Mohou ovlivnit rozhodným a někdy i fatálním způsobem zdraví, kvalitu života a v některých případech samotný život pacienta. Realizovat měření o dostačující kvalitě je profesionální

povinností analytika. Validace je proces, kterým si laboratoře zajišťují kvalitu dat získaných při rutinním provozu a poskytuje také potřebná data pro odhad nejistoty měření. Používání řádně validovaných metod vyžaduje akreditace neboli formální potvrzení odborné způsobilosti laboratoře (Friedecký et al., 2011).

Mezi požadované validační parametry patří stanovení specifčnosti a citlivosti. To znamená, že se určí všechny varianty mutací nebo polymorfismů testovaného znaku, kterým může být gen či nukleotidová sekvence, stanovené touto metodou a testování negativní kontroly, tedy DNA nebo RNA, která neobsahuje prokazovaný znak pro vyloučení falešné pozitivivity. Pokud je dostupný certifikovaný referenční materiál, používá se k provádění stanovení specifčnosti a citlivosti. Není-li certifikovaný referenční materiál dostupný, je nezbytné mít k dispozici vlastní referenční materiál, jehož pozitivita či negativita byla potvrzena jinou nezávislou metodou. Vzorky z externí kontroly kvality, kde jsou již potvrzené výsledky, lze použít také jako referenční materiál (Brdička et al., 2007).

### **2.6.1 Stanovení citlivosti**

Citlivost metody vypovídá o pravděpodobnosti pozitivního výsledku testu, pokud je přítomna hledaná varianta testovaného znaku. Vyjadřuje se pomocí poměru mezi správnou pozitivitou (True Positivity TP) a součtem správné pozitivivity a falešné negativity (False Negativity FN) vzorcem  $TP/(TP+FN)$  (Brdička et al., 2007).

### **2.6.2 Stanovení specifčnosti**

Specifčnost je parametr, který udává pravděpodobnost negativního výsledku testu v případě nepřítomnosti hledané varianty testovaného znaku. Vyjadřuje se jako poměr mezi správnou negativitou (True Negativity TN) a součtem správné negativivity a falešné pozitivivity (False Positivity FP) vzorcem  $TN/(TN+FP)$  (Brdička et al., 2007).

### **2.6.3 Další parametry**

Mezi další validační parametry patří opakovatelnost, reprodukovatelnost a robustnost metody (Brdička et al., 2007).

### **Opakovatelnost**

Opakovatelnost je vlastnost metody, ne výsledku. Tímto validačním parametrem se prokazuje, že je metoda při opakovaných měřeních přesná (Brdička et al., 2007). Znázorňuje těsnost souhlasu mezi výsledky na sobě nezávislých měření stejného analytu vykonaných stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu (Barek et al., 2000).

### **Reprodukovatelnost**

Parametr metody, který vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky měření stejného analytu ve vzorcích stejného materiálu, jestliže jsou jednotlivá měření prováděna za různých podmínek (experimentátor, přístroj, místo, podmínky a čas), ale stejnou metodou. Např. různí pracovníci získají výsledky toutéž metodou, na téže položce, v různých laboratořích a s použitím různého laboratorního vybavení (Barek et al., 2000)

### **Robustnost**

Robustnost analytického postupu je míra jeho schopnosti chovat se netečně vůči malým a zároveň promyšleným změnám parametrů metody. Při běžném používání udává spolehlivost metody (Barek et al., 2000).

### 3 Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce bylo:

- Vypracování odborné rešerže na dané téma pomocí dostupných odborných publikací.
- Praktické zvládnutí základních metod molekulární biologie (izolace DNA z bukalního stěru a periferní krve, měření koncentrace DNA, příprava PCR reakce a gelová elektroforéza).
- Validace metody PCR pro stanovení izotopových variant v genu *APOE*.



## 4 Praktická část

Praktickou část ke své bakalářské práci jsem absolvovala v genetické laboratoři GENLABS, s.r.o. v Českých Budějovicích pod odborným dohledem vedoucí práce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D.

Náplní praktického provedení mé bakalářské práce byla validace metody PCR ARMS a analýza genotypu *APOE* touto metodou. Nezbytnou součástí byla především izolace DNA z bukalního stěru i z periferní krve, po které následovalo stanovení koncentrace vyizolované DNA. Dále jsem se věnovala přípravě a provedení PCR reakce a detekci PCR produktů pomocí gelové elektroforézy.

### 4.1 *Izolace DNA*

Základním prvkem pro molekulárně biologická a genetická vyšetření je izolace DNA. Před vyšetřením v genetické laboratoři je důležité, aby každý pacient podepsal informovaný souhlas, jímž se zavazuje k provedení odběru materiálu a vlastního vyšetření vzorku. Mezi vhodný biologický materiál patří nesražená periferní krev nebo bukalní stěr. Ze získané nesražené periferní krve se izoluje DNA z leukocytů. V případě bukalního stěru se DNA izoluje z epitelí, které jsou přítomny v dutině ústní. Výsledky genetického testování z obou dvou materiálů by měly být totožné. Periferní krev odebírá vyškolený zdravotnický personál na specializovaném zdravotnickém pracovišti, naproti tomu stěr ústní sliznice si provádí pacient sám podle přesného návodu, který obdrží společně s odběrovou soupravou, jež je určena pro stěr ústní sliznice.

#### 4.1.1 *Izolace DNA z bukalního stěru*

Izolaci DNA z bukalního stěru jsem provedla pomocí komerčního kitu GeneAll ExGene<sup>TM</sup> Clinic SV mini. Množství reagentů a jejich teploty skladování jsou uvedeny v tabulce 1. Přístroje a spotřební materiál, který jsem při izolaci z bukalního stěru použila, zahrnuje tabulka 2.

*Tabulka 1 - Reagencie pro izolaci DNA z bukálního stěru, jejich objemy a teplota skladování*

Reagencie	Objem (μl)	Teplota skladování
PBS	400	Pokožová teplota
Proteináza K	40	-20 °C
BL pufr	400	Pokožová teplota
100% etanol	400	
BW pufr	600	
TW pufr	700	
AE pufr	50	

*Tabulka 2 - Použité přístroje a spotřební materiál při izolaci z bukálního stěru*

Přístroje	Spotřební materiál
Termostat	1,5 ml zkumavky
Centrifuga	2 ml sběrné zkumavky, kolonky
Mini centrifuga	Špičky
Sada automatických pipet	Rukavice

Nejprve jsem vyhledala v mrazícím boxu Proteinázu K (PK), kterou jsem připravila na pracovní stůl k ostatním reagentům, kde jsem ji nechala rozmrazit. Zapnula jsem termostat a nastavila ho na teplotu 56 °C. Před samotným zahájením izolace jsem připravila ještě pro každý vzorek 1,5 ml mikrozkušavku, kterou jsem pečlivě popsal.

Do zkumavky s bukálním stěrem pacienta jsem napipetovala 400 μl PBS pufru, 40 μl proteinázy K a 400 μl BL pufru. Obsah zkumavky jsem důkladně promíchala pomocí vortexu a nechala jej inkubovat v již výše zmíněném připraveném termostatu při teplotě 56 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci jsem zkumavku krátce stočila, aby došlo k odstranění kapek z vnitřní strany víčka zkumavky. Dále jsem do zkumavky napipetovala 400 μl 100% etanolu. Zkušavku jsem zvortexovala v pulzech a opět ji krátce stočila. Ve dvou krocích jsem přenesla všechnu směs na kolonku. V prvním kroku jsem mohla na kolonku přenést maximálně 700 μl směsi, poté jsem kolonku

centrifugovala po dobu 1 minuty při 8000 rpm. Ve druhém kroku jsem na kolonku přenesla zbytek směsi a tuto směs jsem také centrifugovala za stejných podmínek. Původní sběrnou zkumavku jsem nahradila novou sběrnou zkumavkou a přidala jsem na kolonku 600  $\mu$ l BW pufru. Po minutové centrifugaci při 8000 rpm jsem nahradila sběrnou zkumavku za novou sběrnou zkumavku. Na kolonku jsem přidala 700  $\mu$ l TW pufru, zkumavku jsem centrifugovala opět za stejných podmínek. Ze sběrné zkumavky jsem odstranila supernatant a kolonku jsem vrátila zpět do sběrné zkumavky. Tuto zkumavku jsem centrifugovala při nejvyšších otáčkách 1 minutu, aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru. Následně jsem umístila kolonku do nové předem popsané mikrozukumavky, do které jsem přidala 50  $\mu$ l AE pufru přímo na střed filtru kolonky. Směs jsem nechala inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci jsem směs vložila do centrifugy a nechala ji centrifugovat při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty. Předchozí tři kroky jsem zopakovala (přidání AE pufru na kolonku, inkubaci a centrifugaci), odstranila jsem kolonku a zkumavku s výsledným izolátem jsem uzavřela. Po tomto celém procesu jsem provedla měření koncentrace izolátu pomocí fluorometru.

#### 4.1.2 *Izolace DNA z plné krve*

Izolaci DNA z plné krve jsem provedla také pomocí komerčního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini. V tabulce 3 je uvedeno množství použitých reagensií a jejich teploty skladování. Použité přístroje a spotřební materiál jsou uvedeny v tabulce 4.

*Tabulka 3 - Reagencie pro izolaci DNA z plné krve, jejich objemy a teplota skladování*

Reagencie	Objem ( $\mu$ l)	Teplota skladování
Proteináza K	20	-20 °C
BL pufr	200	Pokojová teplota
100% etanol	200	
BW pufr	600	
TW pufr	700	
AE pufr	50	

*Tabulka 4 - Použité přístroje a spotřební materiál při izolaci z plné krve*

<b>Přístroje</b>	<b>Spotřební materiál</b>
Termostat	1,5 ml zkumavky
Centrifuga	2 ml sběrné zkumavky, kolonky
Mini centrifuga	Špičky
Sada automatických pipet	Rukavice

Nejdříve jsem si vyndala z mrazícího boxu proteinázu K (PK) a nechala ji rozmraznout při pokojové teplotě. Termostat jsem zapnula a nastavila na teplotu 56 °C. Pro každý vzorek jsem si připravila dvě 1,5 ml mikrozkušavky, které jsem pečlivě popsala.

Do předem připravené a popsané mikrozkušavky jsem napipetovala 20 µl proteinázy K, 200 µl vzorku plné krve a 200 µl BL pufru. Zkušavku jsem důkladně promíchala pomocí vortexu a vložila ji do vyhřátého termostatu na 56 °C, kde jsem ji nechala inkubovat 10 minut. Po uplynutí 10 minut jsem zkušavku vyjmula z termostatu a krátce stočila, aby se odstranily kapky z vnitřní strany víčka zkušavky. Poté jsem do zkušavky přidala 200 µl 100% etanolu. Pomocí stolní centrifugy jsem směs v pulzech zvortexovala a krátce stočila. Dále jsem směs přenesla na kolonku a provedla jsem centrifugaci po dobu 1 minuty při 8000 rpm. Po vyndání zkušavky z centrifugy jsem odstranila obsah sběrné zkušavky, vrátila do ní kolonku a napipetovala do ní 600 µl BW pufru. Poté jsem zkušavku centrifugovala při 8000 rpm také 1 minutu. Tento krok jsem opakovala, dokud nebyl supernatant průhledný. Sběrnou zkušavku jsem vyměnila za novou sběrnou zkušavku. Poté jsem pipetou přidala 700 µl TW pufru, směs jsem opět dala centrifugovat za samých podmínek. Odstranila jsem supernatant ze sběrné zkušavky a vrátila do ní kolonku zpět. Znovu jsem zkušavku vložila do centrifugy a to na 1 minutu při nejvyšších otáčkách, aby se odstranil zbytkový promývací pufr. Kolonku jsem umístila do nové popsané 1,5 ml zkušavky s víčkem, přidala jsem 50 µl AE pufru přímo na střed filtru kolonky a směs jsem nechala inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci jsem zkušavku se směsí vložila do centrifugy a centrifugovala ji při nejvyšších otáčkách 1 minutu. Pak jsem vyndala kolonku ze zkušavky, obsah zkušavky jsem přepipetovala zpět na kolonku, kterou jsem vrátila do zkušavky. Zkušavku jsem vložila do centrifugy a znovu jsem ji centrifugovala při nejvyšších otáčkách 1 minutu. Nakonec jsem odstranila kolonku a zkušavku

jsem uzavřela. Koncentraci získané nukleové kyseliny jsem následně změřila pomocí fluorometru.

#### 4.2 Měření koncentrace DNA

Po získání izolované DNA jsem následně musela zjistit, jaká je její koncentrace. Měření koncentrace nukleových kyselin jsem provedla pomocí Qubit™ dsDNA BR Assay Kit a přístroje Qubit® 2.0 Fluorometer. Součástí soupravy byly také 0,5 ml mikrozkušavky Qubit™ assay tubes skladované při pokojové teplotě a příslušné reagenty, které jsou uvedeny v tabulce 5. Použité přístroje a spotřební materiál se nachází v tabulce 6.

Tabulka 5 - Reagenty pro měření koncentrace izolátu DNA a jejich teplota skladování

Reagenty	Teplota skladování
Qubit™ dsDNA BR reagent (Component A)	Pokojová teplota
Qubit™ dsDNA BR buffer (Component B)	Pokojová teplota
Qubit™ dsDNA BR Standard #1 (Component C)	Lednice při teplotě $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$
Qubit™ dsDNA BR Standard #2 (Component D)	Lednice při teplotě $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tabulka 6 - Použité přístroje a spotřební materiál při měření koncentrace izolátu DNA

Přístroje	Spotřební materiál
Qubit® 2.0 Fluorometer	1,5 ml zkumavky
Centrifuga	0,5 ml mikrozkušavky Qubit™ assay tubes
Sada automatických pipet	Špičky
	Rukavice

Před vlastním měřením jsem nechala vytemperovat všechny pufrы na pokojovou teplotu. Jelikož kalibrační křivka byla již vytvořena, nebylo nutné provádět kalibraci.

Připravila jsem si 0,5 ml zkumavku určenou pro měření fluometrem a označila jsem ji číslem vzorku. Zároveň jsem si připravila 1,5 ml zkumavku pro přípravu pracovního roztoku, který byl připraven pro měření více vzorků. Pracovní roztok jsem připravila napipetováním 199  $\mu\text{l}$  Qubit™ dsDNA BR buffer a 1  $\mu\text{l}$  Qubit™ dsDNA BR reagent do pracovní 1,5 ml plastové zkumavky. Celkový objem pracovního roztoku činil 200  $\mu\text{l}$ .

Roztok jsem zvortexovala po dobu asi 15 sekund a krátce jsem jej stočila na stolní centrifuze. Do připravené 0,5 ml mikrozkušavky jsem odpipetovala 198 µl pracovního roztoku a 2 µl DNA izolátu. Následně jsem mikrozkušavku krátce zvortexovala a stočila pomocí stolní minicentrifugy. Nakonec jsem ji nechala inkubovat při pokojové teplotě dvě minuty.

Zapnula jsem přístroj Qubit® 2.0 Fluorometer a nastavila měření dsDNA. Mikrozkušavku jsem vložila do přístroje a nechala tak proběhnout samotné měření. Takto jsem získala výslednou koncentraci DNA v izolátu.

### 4.3 PCR reakce genu APOE

Pro laboratorní diagnostiku genu *APOE* je vhodná metoda PCR ARMS, pro jejíž přípravu jsem využila kit 2x PCR BIO Taq Mix Red od firmy PCR Biosystems. Tento kit je navržený pro rychlou, vysoce specifickou a citlivou PCR. Kromě kitu jsem ještě použila DMSO (dimethylsulfoxid), který se do PCR reakce přidává pro její větší výtěžnost. Seznam použitých reagensií pro přípravu reakčního mixu A i B a jejich množství pro jednu reakci obsahují tabulky 7 a 8. Použité přístroje a spotřební materiál jsou shrnuté v tabulce 9. V tabulce 10 jsou uvedeny sekvence použitých primerů, které byly převzaty z článku Zende et al. (2013).

*Tabulka 7 - Reagencie pro přípravu master mixu A na 1 reakci*

Reagencie - mix A	Množství (µl)
Injekční voda (H <sub>2</sub> O)	7,25
2x PCR BIO Taq Mix Red	12,5
DMSO	1,25
Primer Arg 112 (20 pmol)	0,4
Primer Arg 158 (20 pmol)	0,8
Common Primer (20 pmol)	0,8

Tabulka 8 - Reagencie pro přípravu master mixu B na 1 reakci

Reagencie - mix B	Množství (μl)
Injekční voda (H <sub>2</sub> O)	7,25
2x PCRBIO Taq Mix Red	12,5
DMSO	1,25
Primer Cys 112 (20 pmol)	0,4
Primer Cys 158 (20 pmol)	0,8
Common Primer (20 pmol)	0,8

Tabulka 9 - Použité přístroje a spotřební materiál

Přístroje	Spotřební materiál
Termocykler	1,5 ml mikrozkuhavky
Laminární box	0,2 ml mikrozkuhavky
Mini centrifuga	Špičky
Sada automatických pipet	Rukavice

Tabulka 10 - Sekvence použitých primerů. Zdroj: (Zende, 2013)

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Délka PCR produktu (bp)
Cys 158	ATGCCGATGACCTGCAGAATT	588
Arg 158	ATGCCGATGACCTGCAGAATC	588
Cys 112	CGCGGACATGGAGGACGTTC	451
Arg 112	CGCGGACATGGAGGACGTTT	451
COMMON	G TTCAGTGATTGTCGCTGGGCA	

PCR reakci jsem připravila ve vysvíceném laminárním boxu UV světlem, aby se zabránilo případné kontaminaci použitých reagensů. Následně jsem nechala rozmrazit při pokojové teplotě reagenty, které byly nezbytné pro přípravu master mixu.

Mezitím jsem si v laminárním boxu přichystala do chladícího stojánku vždy dvě 0,2 ml mikrozkušavky s rovným víčkem pro každý vzorek a dvě mikrozkušavky pro negativní kontrolu. Dále jsem připravila dvě 1,5 ml mikrozkušavky určené pro dva různé master mixy (A a B). Všechny zkušavky jsem čitelně a řádně označila.

Po rozmrazení jsem všechny reagenty zvortexovala a zcentrifugovala. Podle množství vzorků a kontrol jsem si předem přepočítala objem reagentů uvedených v tabulce 7 a 8, který jsem později napipetovala do dvou 1,5 ml zkušavek. Ovšem velký pozor jsem si musela dát při pipetování primerů. Zatímco mix A obsahoval primer Arg 112 (20 pmol), Arg 158 (20 pmol) a Common primer (20 pmol), mix B obsahoval primer Cys 112 (20 pmol), Cys 158 (20 pmol) a Common primer (20 pmol).

Po napipetování správného objemu reagentů do 1,5 ml zkušavek jsem tyto zkušavky následně zvortexovala a zcentrifugovala. Poté jsem master mix rozpipetovala do řádně popsaných 0,2 ml mikrozkušavek po 23  $\mu$ l. Připipetovala jsem do nich 2  $\mu$ l DNA každého analyzovaného vzorku, výjimkou byla negativní kontrola, do které jsem místo 2  $\mu$ l DNA napipetovala stejné množství vody. Všechny vzorky jsem zvortexovala, stočila na minicentrifuze a vložila do thermocyklieru. Reakční profil PCR reakce určený pro analýzu genu *APOE* je uveden v tabulce 11. Po ukončení programu v thermocyklieru přišla na řadu elektroforetická separace PCR produktů na 4% agarózovém gelu.

*Tabulka 11 - Reakční profil PCR reakce*

		Teplota	Čas
Počáteční denaturace		95 °C	2 min
35 cyklů	Denaturace	95 °C	15 s
	Anealing	62 °C	15 s
	Extenze	72 °C	45 s
	Terminální extenze	72 °C	5 min

#### **4.4 Gelová elektroforéza**

Zda amplifikační reakce skutečně proběhla, bylo zjištěno kontrolou PCR produktů pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu. Seznam reagentů a jejich teplota



skladování se nachází v tabulce 12. Přístroje, spotřební materiál a ostatní pomůcky, které jsem potřebovala při přípravě gelové elektroforézy, jsou uvedeny v tabulce 13.

*Tabulka 12 - Reagencie a jejich teplota skladování*

Reagencie	Teplota skladování
Deionizovaná a destilovaná voda	Pokožová teplota
Agarózové tablety obsahující 0,5 g agarózy	Pokožová teplota
1× TBE pufr	Pokožová teplota
EliDNA <sup>TH</sup> PS GREEN	Lednice ( $\leq 4$ °C), ve tmě
Marker 100 bp DNA Ladder H3RTU	Pokožová teplota

*Tabulka 13 - Seznam přístrojů, spotřebního materiálu a pomůcek*

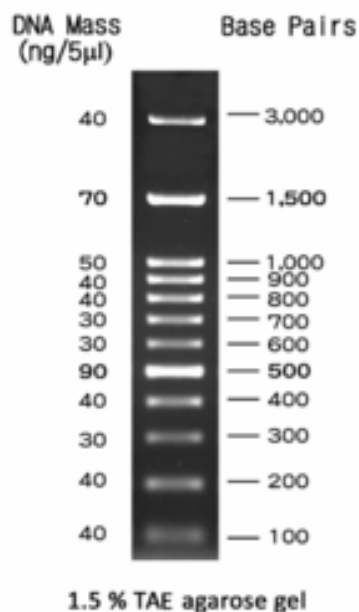
Přístroje	Spotřební materiál a pomůcky
Mikrovlnná trouba	Plastová kádinka
Sada automatických pipet	Špičky
Gel-dokumentační systém (Mupid LED Iluminátor)	Rukavice
Elektroforetický systém	Špachtlička
	Elektroforetická deska a hřebeny

Jako první jsem si připravila gel. Příslušný počet agarózových tablet jsem vložila do plastové kádinky, k tabletám jsem přidala 1× TBE pufr a nechala je rozpustit. Pro přípravu 4% agarózového gelu byly potřeba 4 tabletky obsahující 0,5 g agarózy a 50 ml 1× TBE pufru. Následně jsem kádinku umístila do mikrovlnné trouby, kde jsem směs zahřívala přibližně 3 minuty. Během ohřevu jsem kontrolovala kádinku, aby gel nevytekl a zároveň se agaróza zcela rozvařila. Do hotového gelu jsem připipetovala 15  $\mu$ l barvičky EliDNA<sup>TH</sup> PS GREEN a směs jsem promíchala. Připravila jsem si elektroforetickou formu, do které jsem umístila hřebeny, nalila do ní tekutý gel a pomocí špachtličky jsem odstranila vzduchové bubliny. Na 15 minut jsem gel dala do ledničky, aby lépe ztuhnul.

Ze ztuhlého gelu jsem opatrně vyndala hřebeny a samotný gel jsem vložila do elektroforetické vany obsahující 1x TBE pufr, stejný pufr, který byl použit pro přípravu gelu. Ověřila jsem si, zda je gel v elektroforetické vaně dostatečně ponořený. Pokud by byl gel málo ponořený, musela bych dolít ještě 1× TBE pufr. Do první jamky gelu jsem napipetovala 5 µl markeru 100 bp DNA Ladder H3RTU (obrázek 5), abych mohla bez problémů odečíst délku produktů amplifikace. Do dalších jamek jsem napipetovala 15 µl PCR produktu, po napipetování všech vzorků a kontrol jsem spustila elektroforézu na 135 V po dobu přibližně 15 minut.

Po ukončení elektroforézy jsem gel přenesla na dokumentační systém, kde došlo k jeho vyfocení. Obrázek jsem uložila na paměťovou kartu, kterou jsem poté vložila do počítače. Na počítači jsem mohla fotografii gelu upravit a analyzovat získané výsledky.

Výsledkem amplifikační reakce mohly být pouze PCR produkty o velikosti 451 a/nebo 588 bp. V tabulce 14 jsou uvedeny všechny možné kombinace PCR produktů a odpovídající genotypy *APOE* genu.



**Obrázek 5** - 100 bp DNA Ladder H3RTU (Molecular Weight Marker). Marker se používá pro kontrolu velikosti PCR fragmentů na agarózovém gelu. Zdroj: (100 bp DNA Ladder (Molecular Weight Marker), 2020).

*Tabulka 14 - Tabulka pro vyhodnocení genotypu APOE*

APOE	E3/E2	E4/E2	E4/E4	E3/E3	E2/E2	E4/E3
Mix A	451 bp	451 bp	451 bp	451 bp	-	451 bp
Mix A	-	588 bp	588 bp	-	-	588 bp
Mix B	451 bp	451 bp	-	-	451 bp	-
Mix B	588 bp	588 bp	-	588 bp-	588 bp	588 bp

## 5 Výsledky

Tato kapitola obsahuje výsledky všech validačních reakcí, které jsem provedla v rámci validace metody PCR ARMS. Dále popisuje analýzu genotypu *APOE*.

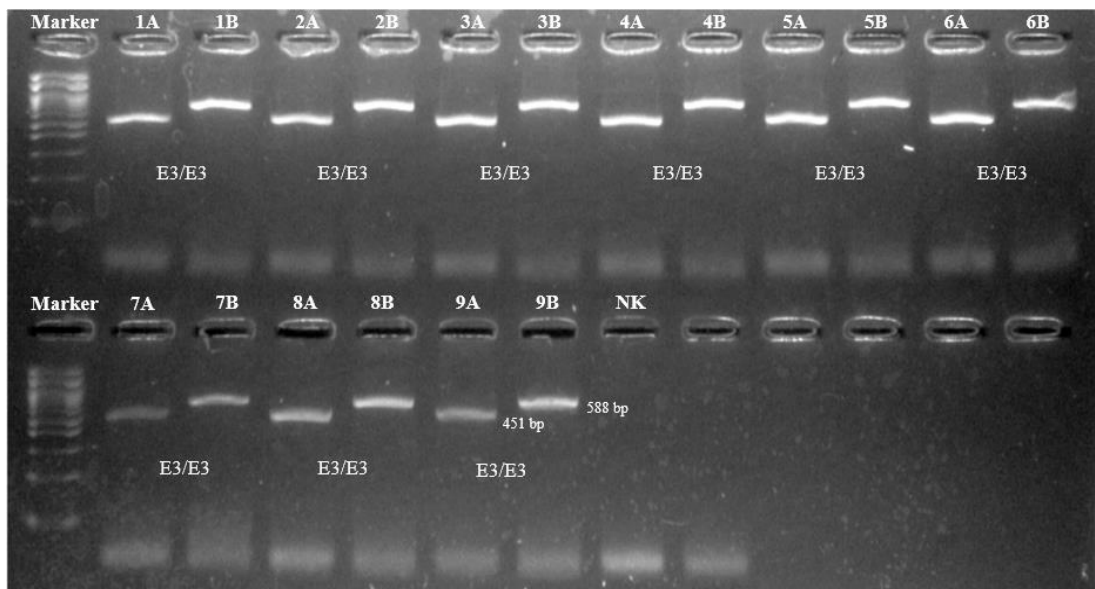
### 5.1 Validace metody PCR

Validace se konala ve třech dnech a prováděly ji dvě osoby nezávisle na sobě. Celkem bylo provedeno pět validačních reakcí. Byly testovány následující parametry: parametr opakovatelnosti, reprodukovatelnosti a robustnosti.

#### 5.1.1 Validační reakce č.1

Datum: 13. 11. 2019

Během první validační reakce bylo provedeno pracovníkem laboratoře celkem devět reakcí obsahujících DNA stejného vzorku a 10. vzorkem byla negativní kontrola, do níž se místo DNA přidala voda. Původní koncentrace použitého vzorku DNA byla 206 ng/μl, ta byla ředěním upravena na 50 ng/μl. Vstupní množství DNA do reakce pak bylo 100 ng/μl.



**Obrázek 6** - Fotografie elektroforetického gelu (validační reakce č. 1). Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). Další jamky obsahují PCR produkty o velikosti 451 bp a 588 bp odpovídající genotypu *APOE* E3/E3. V poslední jamce je napipetována negativní kontrola reakce.

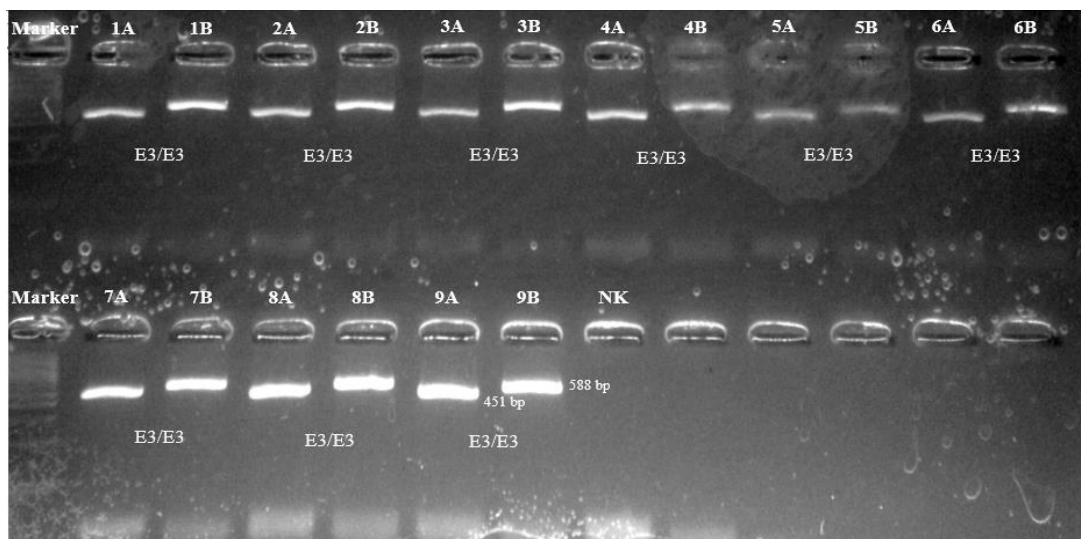
Tabulka 15 - Výsledky validační reakce č.1

Číslo vzorku	Biologický materiál	Koncentrace izolátu (ng/μl)	Genotyp
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
Negativní kontrola	-	-	-

### 5.1.2 Validační reakce č.2

Datum: 13. 11. 2019

Tuto reakci jsem provedla osobně já. Na obrázku 7 lze vidět, že jsem připravila devět reakcí a negativní kontrolu. Pro 2. validační reakci byl použit stejný vzorek o koncentraci 206 ng/μl jako pro 1. validační reakci, opět byl naředěn na koncentraci 50 ng/μl. Vstupní množství DNA do reakce odpovídalo 100 ng/μl.



**Obrázek 7** - Fotografie elektroforetického gelu (validační reakce č. 2). Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). Další jamky obsahují PCR produkty o velikosti 451 bp a 588 bp odpovídající genotypu APOE E3/E3. V poslední jamce označené NK je napipetována negativní kontrola reakce.

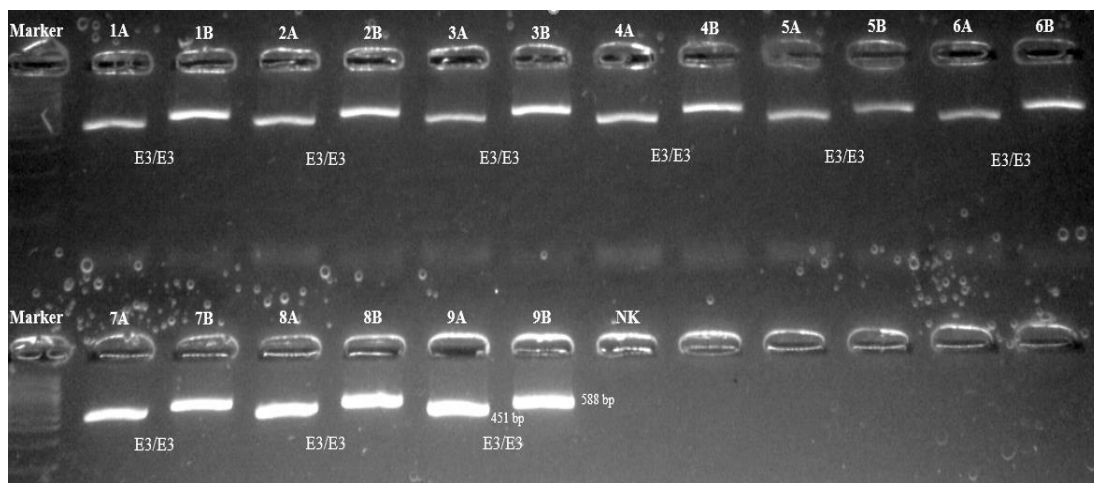
**Tabulka 16** - Výsledky validační reakce č.2

Číslo vzorku	Biologický materiál	Koncentrace izolátu (ng/μl)	Genotyp
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
Negativní kontrola	-	-	-

### 5.1.3 *Validační reakce č.3*

Datum: 15. 11. 2019

Vše jsem připravila stejným způsobem jako při předchozích validačních reakcích. Pro tuto validační reakci byl použit stejný vzorek DNA (původní koncentrace 206 ng/μl), naředěný na koncentraci 50 ng/μl, jako v obou předchozích validačních reakcích. Vstupní koncentrace DNA do reakce byla opět 100 ng/μl.



**Obrázek 8** - Fotografie elektroforetického gelu (validační reakce č. 3). Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). Další jamky obsahují PCR produkty o velikosti 451 bp a 588 bp, což odpovídá genotypu APOE E3/E3. V poslední jamce je napipetována negativní kontrola reakce.

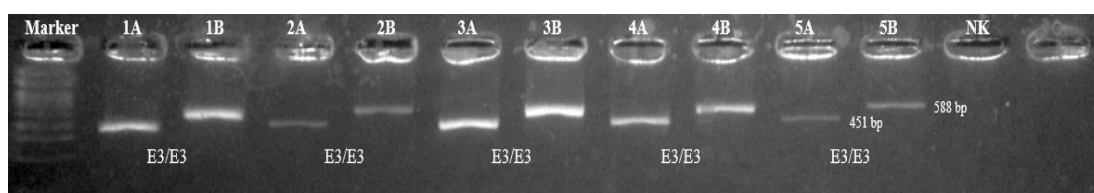
**Tabulka 17** - Výsledky validační reakce č.3

Číslo vzorku	Biologický materiál	Koncentrace izolátu (ng/μl)	Genotyp
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
Negativní kontrola	-	-	-

#### 5.1.4 Validační reakce č.4

Datum: 15. 11. 2019

Předposlední validační reakce zahrnovala přípravu pěti reakcí obsahujících rozdílné vstupní množství DNA a negativní kontrolu. Pro 4. validační reakci byl použit opět stejný vzorek DNA o koncentraci 206 ng/μl, získaný izolací z periferní krve, jako v předchozích validačních reakcích. V tomto případě je vstupní množství DNA pro jednotlivé reakce uvedeno v tabulce 18.



**Obrázek 9** - Fotografie elektroforetického gelu (validační reakce č. 4). Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). Další jamky obsahují PCR produkty s rozdílnými koncentracemi vstupního množství DNA uvedenými v tabulce 18. Produkty mají velikost 451 bp a 588 bp a odpovídají genotypu APOE E3/E3. Poslední jamka NK představuje negativní kontrolu reakce.

**Tabulka 18** - Výsledky validační reakce č.4

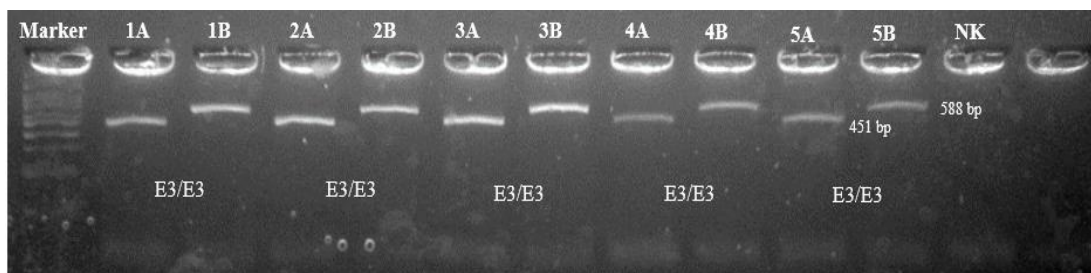
Číslo vzorku	Biologický materiál	Koncentrace izolátu (ng/μl)	Genotyp
166/19	Periferní krev	100	E3/E3
166/19	Periferní krev	50	E3/E3
166/19	Periferní krev	28,5	E3/E3
166/19	Periferní krev	14	E3/E3
166/19	Periferní krev	7	E3/E3
Negativní kontrola	-	-	-

#### 5.1.5 Validační reakce č.5

Datum: 27. 11. 2019

V páté validační reakci jsem použila DNA izolovanou z bukálního stěru, abych se přesvědčila, že metoda chodí správně s různými primárními vzorky (matricích). Původní koncentrace, kterou jsem získala izolací DNA z bukálního stěru, byla 185 ng/μl. Vstupní množství DNA použité pro jednotlivé reakce uvádí tabulka 19.





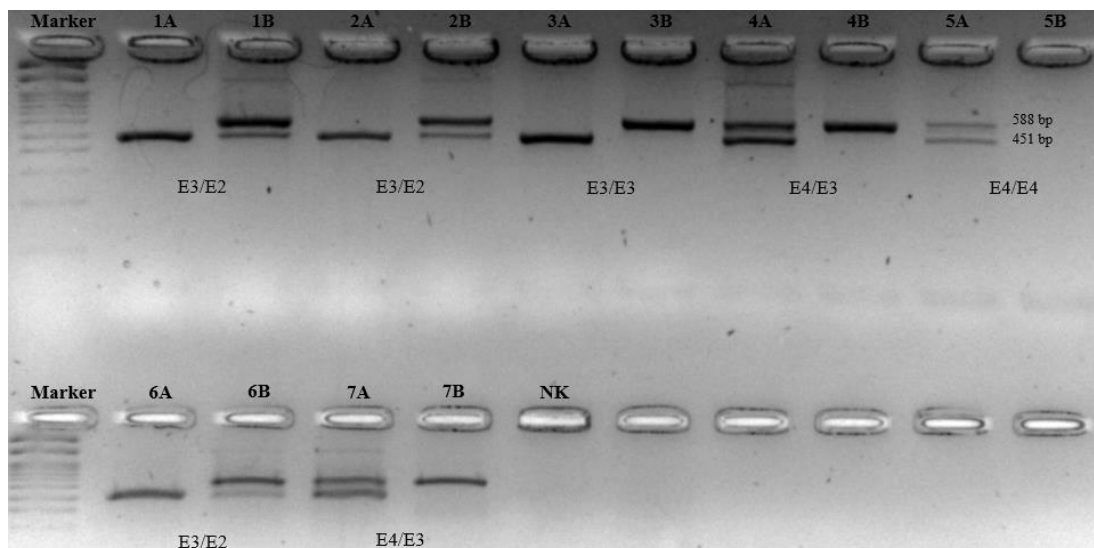
**Obrázek 10** - Fotografie elektroforetického gelu (validační reakce č. 5). Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). V dalších deseti jamkách jsou napipetovány PCR produkty se snižujícím se množstvím vstupní DNA do reakce o velikosti 451 bp a 588 bp, což odpovídá genotypu APOE E3/E3. Poslední jamka NK obsahuje negativní kontrolu reakce.

**Tabulka 19** - Výsledky validační reakce č.5

Číslo vzorku	Biologický materiál	Koncentrace izolátu (ng/μl)	Genotyp
169/19	Bukální stěr	100	E3/E3
169/19	Bukální stěr	100	E3/E3
169/19	Bukální stěr	100	E3/E3
169/19	Bukální stěr	50	E3/E3
169/19	Bukální stěr	25	E3/E3
Negativní kontrola	-	-	-

## 5.2 Analýza rozdílných genotypů APOE metodou PCR ARMS

Jak vidíme v tabulce 20, při této reakci byly použity vzorky se známými genotypy genu APOE E3/E2, E3/E3, E4/E3 a E4/E4. Tyto vzorky pocházely buď z periferní krve, nebo bukálního stěru různých pacientů. Reakční mix obsahující primery Arginin 112 a Cystein 112 umožní amplifikaci PCR produktům o velikosti 451 bp. V případě reakčního mixu obsahujícího primery Arginin 158 a Cystein 158 jsou výsledkem amplifikace produkty o velikosti 588 bp. Genotypy vyšetřených vzorků jsou uvedeny přímo na fotografii gelu, na obrázku 11 a odečteny pomocí tabulky 14.



**Obrázek 11** - Produkty PCR reakce na elektroforetickém gelu. Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). Další jamky obsahují PCR produkty o velikosti 451 bp a/nebo 588 bp odpovídající jednotlivým uvedeným genotypům. Poslední jamka NK představuje negativní kontrolu.

**Tabulka 20** - Výsledky analýzy rozdílných genotypů APOE

Číslo vzorku	Biologický materiál	Koncentrace izolátu (ng/μl)	Genotyp
1 (131/19 A)	Periferní krev	42,4	E3/E2
2 (131/19 B)	Bukální stěr	11,2	E3/E2
3 (33/19)	Bukální stěr	101	E3/E3
4 (45/19)	Periferní krev	70,4	E4/E3
5 (170/17)	Bukální stěr	12,3	E4/E4
6 (202/17)	Bukální stěr	58	E3/E2
7 (129/17)	Bukální stěr	115	E4/E3
Negativní kontrola	-	-	-

## 6 Diskuze

Nejběžněji se vyskytující izoformou genu *APOE* v populaci je APOE3, následuje APOE4 a nakonec APOE2. Procentuální zastoupení jednotlivých izoform se však v jednotlivých populacích liší. Dle Abondio *et al.* se vyskytuje izoforma APOE3 s nejvyšší frekvencí u kanadských Hutteritů 94 %, mexických Mayů 90 %, v Evropě u baskických a sardinských populací 88 % a Chanů 80 %. Isoforma APOE4 vykazuje nejvyšší frekvenci výskytu v domorodých populacích ve střední Africe, kde se jedná o 29-40 % populace, dále v Oceánii 26-49 % a v Mexiku 27 %. Napříč Evropou lze pozorovat zřetelný zeměpisný gradient pro zastoupení izoformy APOE4, které činí ve Španělsku, Portugalsku, Itálii a Řecku 5-10 %, ve Francii, Belgii a Německu až 16 % a jeho maximální výskyt je popisován na Skandinávském poloostrově, kde se jedná o 31 %. Z této studie také vyplývá, že APOE3 se v Evropě vyskytuje hojněji spíše v oblastech nižší zeměpisné šířky a že má vyšší strukturální stabilitu a funkční flexibilitu, která může být spojována s odolností vůči oxidačnímu stresu, absorpcí mikronutrientů, zvýšenou opravou poškozených neuronů či vazbou kovů (Abondio *et al.*, 2019). V dostupné literatuře se uvádí, že izoforma APOE4 je vývojově nejstarší, vznik izoformy APOE3 se datuje před 220 000 lety, a z ní se později vyvinula izoforma APOE2 (Eisenberg *et al.*, 2010).

V dnešní době se genotypizace apolipoproteinu E objevuje stále častěji na seznamu běžně poskytovaných vyšetření genetickými laboratořemi. Klinický význam tohoto vyšetření je zatím ve stádiu výzkumu. *APOE* hraje podstatnou roli při posouzení kardiovaskulárního rizika, při potvrzení diagnostiky hyperlipoproteinémie III. typu nebo při diagnostice Alzheimerovy choroby s klinickými příznaky. Mezi vyšetřované izoformy genu *APOE* patří právě izoforma APOE2, APOE3 a APOE4. Jednotlivé izoformy se od sebe odlišují dvěma aminokyselinami v pozicích 112 a 158 a kódují je tři kodominantní alely  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  a  $\epsilon 4$ . Přítomnost určité alely může působit na některá onemocnění buď protektivně, nebo naopak může zvyšovat riziko spojené s daným onemocněním. Pokud je určitá alela přítomna, neznamená to, že u jedince dané onemocnění propukne. V teoretické části práce je popsána spojitost alely  $\epsilon 4$  s Alzheimerovou chorobou a kardiovaskulárními onemocněními a také vliv alely  $\epsilon 2$  k hyperlipoproteinémii III. typu. V některých studiích je zmíněn možný vztah alel *APOE* i k dalším chorobám, jako je Parkinsonova choroba, vaskulární demence, *diabetes mellitus* či roztroušená skleróza. Tato problematika není zatím dostatečně prozkoumána

a názory některých studií se dokonce rozcházejí. Například Parkinsonova choroba má podobné klinické a neuropatologické vlastnosti jako AD. Je prokázáno, že izoformy APOE mohou ovlivnit degenerativní procesy změnou lipidového metabolismu. Některé studie neprokázaly žádnou asociaci mezi alelou  $\epsilon 4$  a Parkinsonovou chorobou, jiné studie se zaměřily na alelu  $\epsilon 4$  jako na rizikový faktor související s věkem, ve kterém propukne onemocnění a dojde ke snížení kognitivních funkcí. Další studie naznačila, že alela  $\epsilon 2$  by mohla být spojená s vyšším rizikem PD, zatímco jiná studie tvrdí úplný opak (Van Giau et al., 2015).

Alela  $\epsilon 4$  je asociována především s Alzheimerovou chorobou. Zdědění této alely představuje významně zvýšené riziko vzniku AD v mladším věku, lidé s dvěma kopiemi této alely mají až 8krát vyšší riziko AD v mladším věku než lidé, kteří tuto alelu nemají. U pacientů s mírnými kognitivními poruchami a genotypem  $\epsilon 4/\epsilon 4$  dochází k většímu poškození paměti, snížení schopnosti vykonávat běžné denní činnosti a výraznější atrofii hippocampu. U lidí bez APOE4, ale s pozitivní rodinnou anamnézou nebylo prokázáno zvýšené riziko k AD, což ukazuje na vztah rodinné anamnézy pouze při přítomnosti APOE4. Alela  $\epsilon 2$  má naopak protektivní vliv na rozvoj AD a stejně tak kombinace alel  $\epsilon 2$  a  $\epsilon 3$ . (Cibičková a Palička, 2005).

Alela  $\epsilon 4$  je také rizikovým faktorem pro kardiovaskulární onemocnění. V heterozygotních genotypech  $\epsilon 2/\epsilon 3$  a  $\epsilon 2/\epsilon 4$  je alela  $\epsilon 2$  považována za protektivní. Pro aterosklerózu, jednu z příčin kardiovaskulárního onemocnění, je rizikovým faktorem genotyp  $\epsilon 3/\epsilon 4$ . Byly prokázány vyšší plazmatické koncentrace APOE u nositelů alely  $\epsilon 2$  oproti jedincům s genotypem  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . U nositelů alel  $\epsilon 4$  a  $\epsilon 3/\epsilon 3$  nebyl prokázán rozdíl v plazmatických koncentracích APOE. Kombinace alel  $\epsilon 2/\epsilon 3$  má vyšší hladiny celkového cholesterolu a LDL cholesterolu a nižší hladiny HDL cholesterolu v porovnání s alelami  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (Machal et al., 2012). U alel  $\epsilon 4$  je prokázána výrazně nižší hladina hs-CRP než u alel  $\epsilon 3$  a  $\epsilon 2$ . Vztah mezi APOE a hs-CRP není zatím vědcům zcela jasný. CRP je sérový protein akutní fáze zánětu produkovaný játry, využívá se jako celkový marker při zánětu a uvádí se, že se může podílet i na rozvoji, progresy a destabilizaci aterosklerotické léze. U pacientů s kardiovaskulárním onemocněním jsou nalezeny zvýšené hladiny plazmatického CRP. Uvádí se, že apolipoprotein E, který je vázaný v HDL, má spojitost s rekurencí kardiovaskulárních příhod. APOE ve VLDL a LDL částicích je spjat s výrazně nižším rizikem ICHS (Pleva et al., 2017).

Kombinace alel  $\epsilon 2/\epsilon 2$  je rozhodující při vývoji onemocnění zvaného hyperlipoproteinémie III. typu. Je to vůbec první onemocnění spjaté s polymorfismem *APOE*. Onemocnění se rozvíjí za přítomnosti určitých podmínek například hyperinzulinémie, nadměrného kalorického příjmu nebo u mužského pohlaví (Machal et al., 2012). Ve srovnání s *APOE3* vykazuje *APOE2* jen 2% afinitu k LDL receptorům, což je příčinou nižší clearance *APOE2*, vyšší plazmatické koncentraci *APOE* a snížení triglyceridů (Pleva et al., 2017).

Cholesterol je látka steroidní povahy, která je v lidském organismu nezbytná pro tvorbu hormonů a vitamínu D. Pomáhá lidskému tělu zpracovávat tuky. Vyšší hladiny cholesterolu mají osoby s alelou  $\epsilon 4$ . Příliš vysoké koncentrace v krvi způsobují v těle řadu zdravotních rizik a je třeba nastolit dietu. Doporučený denní příjem cholesterolu ve stravě činí maximálně 300 mg cholesterolu a při zvýšených hladinách cholesterolu maximálně 200 mg denně. Součástí diety je zařadit do stravy kvalitní rostlinné tuky a oleje obsahující velký podíl omega 3 a 6 nenasycených mastných kyselin, které mají vliv na snižování hladiny LDL cholesterolu v krvi. Do stravy je třeba začlenit dostatečný příjem ovoce, zeleniny a potravin bohatých na vlákninu, snížit příjem soli, preference drůbeže a ryb nebo dostatečný pitný režim (Otová a Mihalová. 2012).

Hlavním cílem této bakalářské práce byla validace metody PCR ARMS, která je vhodná pro laboratorní diagnostiku genu *APOE*. Jedná se o tzv. in house metodu. To znamená, že si laboratoř nekupuje komerční diagnostické kity, ale navrhne si svou metodu a příslušný protokol pro danou analýzu. Pokud se laboratoř rozhodne pro in house metodu, musí provádět rozsáhlé validace. Velkým pozitivem jsou nižší náklady na samotné vyšetření, ve srovnání s použitím komerčních diagnostik, ovšem někdy za cenu vysokých nepřímých nákladů.

Použití metody PCR ARMS je vhodné pro menší genetické laboratoře. Je finančně i časově dostupnější v porovnání s jinými molekulárně genetickými přístupy. Například metoda real-time PCR vyžaduje oproti PCR ARMS drahé reagenty a přístrojové vybavení. Z tohoto důvodu jsou náklady pro malé laboratoře nebo populační screeningové programy neúměrně vysoké. Studie You et al. (2015) porovnává na souboru 708 pacientů dvě různé metody genotypizace *APOE*, kterými jsou PCR ARMS a PCR RFLP. Přesnost obou metod se posuzovala na základě Paersonova (chí-kvadrát) testu, kdy bylo zjištěno, že přesnost metody PCR ARMS je 94 % a přesnost metody PCR RFLP

je jen 82 %. Kromě toho má metoda PCR ARMS oproti PCR RFLP zřetelné výhody, pokud jde o náklady na reagentie a přístrojové vybavení laboratoře, časovou náročnost a jednoduchost experimentálního zpracování (You et al., 2015).

Validace metody byla provedena ve třech dnech, celkem bylo připraveno pět validačních reakcí. Na validaci se podílely dvě osoby nezávisle na sobě. Během validačních reakcí se testovaly parametry opakovatelnosti, reprodukovatelnosti a robustnosti. Opakovatelnost znázorňuje výsledky získané stejnou metodou, stejným pracovníkem, na stejném přístroji i ve stejném prostoru a za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Reprodukovatelnost se liší od opakovatelnosti tím, že výsledky jsou získány druhým pracovníkem, ale stejnou metodou i při použití stejného materiálu. Testování robustnosti se provádí proto, aby se zjistilo, zda je metoda přesná i při malých odchylkách, kterými byla v této práci změna koncentrace DNA vzorku. Výsledky testů se shodovaly i při velmi nízkých koncentracích DNA (až 7 ng/μl).

Podle mého názoru je takto provedená validace dostačující. Při testování všech tří validačních parametrů byla získána spolehlivá data. Bylo také prokázáno, že je metoda vhodná pro laboratorní diagnostiku izolátu DNA pocházejícího z periferní krve i bukalního stěru. Dalším úkolem praktické části byla analýza genotypu *APOE*, díky ní lze vidět, že metoda PCR ARMS detekuje kromě alely  $\epsilon 3$  spolehlivě také alely  $\epsilon 2$  a  $\epsilon 4$ .

## 7 Závěr

Jedním z cílů této bakalářské práce na téma Validace PCR metody po stanovení izotopových variant v genu *APOE* bylo sepsání odborné rešerže na dané téma pomocí dostupných literárních zdrojů a odborných publikací. V teoretické části jsem nejprve shrnula základní informace o lipoproteinech, lipoproteinovém metabolismu a apolipoproteinech. Dále jsem se zabývala problematikou samotného genu *APOE*, jeho produktu a asociací s různými onemocněními. Nakonec jsem uvedla několik různých molekulárně – genetických přístupů, které lze využít pro laboratorní diagnostiku genu *APOE*.

Součástí praktické části bylo seznámení se s laboratorními postupy a přístroji v genetické laboratoři. Osvojila jsem si základní metody molekulární biologie, mezi které patří izolace DNA z bučálního stěru i periferní krve, měření koncentrace získané DNA, příprava PCR reakce, provedení gelové elektroforézy a analýza získaných výsledků.

Hlavním cílem praktické části byla validace metody PCR ARMS pro stanovení jednotlivých izotypů genu *APOE*, která proběhla úspěšně, a proto může být tato metoda v genetické laboratoři používána pro rutinní vyšetření. Výstupem každé validace by měl být validační protokol, který dokumentuje provedení a vyhodnocení celého validačního procesu.

## 8 Seznam literatury

ABONDIO, P., SAZZINI, M., GARAGNANI, P., BOATTINI, A., MONTI, D., FRANCESCHI, C., LUISELLI, D., GIULIANI, C., 2019. The Genetic Variability of APOE in Different Human Populations and Its Implications for Longevity. *Genes* [online]. 10(3) [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.3390/genes10030222. ISSN 2073-4425.

ASCHERMANN, M., WIDIMSKÝ, P., VESELKA, J., LINHART, A., KRUPIČKA, J., 2004. *Kardiologie*. Praha: Galén. 1540 s. ISBN 80-7262-290-0.

BAREK, J., JÁNOŠ, P., KORUNA, I., MELOUN, M., PLZÁK, Z., SKÁCEL, F., SUCHÁNEK, M., TICHÝ, J., VILÍMEC, J., VLÁČIL, F., ZIMA, T., 2000. Metrologická terminologie v chemii. *Chemické Listy*, 94(7), 439-444.

BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada. 172 s. ISBN 978-80-247-3533-7.

BRDIČKA, R., VRANÁ, M., OTÁHALOVÁ, E., ŠTAMBERGOVÁ, A., ČAMAJOVÁ, E., 2007. *Analytická validace metod molekulární genetiky určených pro analýzu lidského genomu*. Praha: Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku. 58-62. Dostupné z [http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/107/KBM0701\\_SLG\\_58.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/107/KBM0701_SLG_58.pdf)

BREWER, H. B., 1983. Type III Hyperlipoproteinemia: Diagnosis, Molecular Defects, Pathology, and Treatment. *Annals of Internal Medicine* [online]. 98 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.7326/0003-4819-98-5-623. ISSN 0003-4819.

CIBIČKOVÁ, L., PALIČKA, V., 2005. Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E. *Klinická biochemie a metabolismus*. 13(34), 127-130.

CORBO, R. M., SCACCHI, R., 1999. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE \* 4 a 'thrifty' allele? *Annals of Human Genetics* [online]. 63(4), 301-310 [cit. 2020-01-18]. DOI: 10.1046/j.1469-1809.1999.6340301.x. ISSN 00034800.

ČEŠKA, R., 2005. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. Praha: Triton. 328 s. ISBN 80-7254-738-0.

DOMINICZAK, M. H., CASLAKE, M. J., 2011. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Annals of Clinical Biochemistry* [online]. 48(6), 498-515 [cit. 2019-12-30]. DOI: 10.1258/acb.2011.011111. ISSN 0004-5632.



EICHNER, J. E., 2002. Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Disease: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology* [online]. 155(6), 487-495 [cit. 2019-11-11]. DOI: 10.1093/aje/155.6.487. ISSN 00029262.

EISENBERG, D., CHRISTOPHER, T. A., KUZAWA, W., HAYES, M. G., 2010. Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: Climate, local adaptations, and evolutionary history. *American Journal of Physical Anthropology* [online]. 143(1), 100-111 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1002/ajpa.21298. ISSN 00029483.

FRIEDECKÝ, B., ŠPRONGL, L., KRATOCHVÍLA, J., PLZÁK, Z., 2011. Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus*. 19(1), 36-44. ISSN: 1210-7921. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-1/dop-validace.pdf>.

GOESSLING, W., ZUCKER, S. D., 2000. Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [online]. 279(2), G356-G365 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1152/ajpgi.2000.279.2.G356. ISSN 0193-1857.

HAAN, M. N., MAYEDA, E. R., 2010. Apolipoprotein E Genotype and Cardiovascular Diseases in the Elderly. *Current Cardiovascular Risk Reports* [online]. 4(5), 361-368 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1007/s12170-010-0118-4. ISSN 1932-9520.

HATTERS, D. M., PETERS-LIBEU, C. A., WEISGRABER, K. H., 2006. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 31(8), 445-454 [cit. 2019-11-11]. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.06.008. ISSN 09680004.

HOLEČEK, M., 2006. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada. 286 s. ISBN 80-247-1562-7.

HROMADOVÁ, D., c2004. *Kardiovaskulární onemocnění: (primární a sekundární prevence)*. Brno: Neptun. 190 s. ISBN 80-902896-8-1.

HUANG, Y., MAHLEY, R. W., 2014. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiology of Disease* [online]. 72, 3-12 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1016/j.nbd.2014.08.025. ISSN 09699961.

KATHIRESAN, S., RADER, D. J., 2010. Lipoprotein Disorders. *Essentials of Genomic and Personalized Medicine* [online]. Elsevier, 2010 [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374934-5.00023-4. ISBN 9780123749345.

KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.

KŘÍŽEK, M., ŠÍMA, J., 2015. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. 214 s. ISBN 978-80-7394-486-5.

KUCIEL, J., URBAN, T., 2016. *Principy genetiky*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. 200 s. ISBN 9788075093851.

LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J., 2009. *Biochemie pro studující medicíny*. 2. vydání. Praha: Karolinum. 584 s. ISBN 978-80-246-1414-4.

LENT-SCHOCHET, D., JIALAL, I., 2019. *Biochemistry, Lipoprotein Metabolism* [online]. In: StatPearls Publishing [cit. 2020-03-31]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553193/>

MACHAL, J., VASKU, A., HLINOMAZ, O., LINHARTOVA, P., GROCH, L., VITOVEC, J., 2012. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both number of diseased vessels and extent of coronary artery disease in Czech patients with CAD. *Biomedical Papers* [online]. 156(2), 151-158 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.5507/bp.2012.051. ISSN 12138118. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2012.051.html>

MARAIS, A. D., 2019. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* [online]. 51(2), 165-176 [cit. 2019-11-24]. DOI: 10.1016/j.pathol.2018.11.002. ISSN 00313025.

MARSHALL, W. J., LAPSLEY, M., DAY, A. P., AYLING, R. M., 2014. *Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects*. Third edition. New York: Churchill Livingstone/Elsevier. ISBN 9780702054785.

- MATÝŠKOVÁ, M., ČECH, Z., 2009. *Warfarin a farmakogenetika: Klin. Biochem. Metab.* 17 (38), 215–219. ISSN 1210-7921.
- MUSIL, J., 1994. *Molekulové základy klinické biochemie*. Praha: Grada. 377 s. ISBN 80-7169-056-2.
- PASSARGE, E., 2019. *Barevný atlas genetiky*. Překlad 5. vydání. Praha: Grada Publishing. 472 s. ISBN 978-80-247-3099-8.
- PLEVA, L., KUŠNIEROVÁ, P., PLEVOVÁ, P., HILSCHEROVÁ, Š., KARPÍŠEK, M., ZAPLETALOVÁ, J., FALDYNOVÁ, L., KOVÁŘOVÁ, P., KUKLA, P., 2017. The APOE ε2 allele is associated with increased plasma apolipoprotein E levels in patients with coronary artery disease. *Cor et Vasa* [online]. 59(3), 235-239 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1016/j.crvasa.2016.11.011. ISSN 00108650.
- OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R., 2012. *Základy biologie a genetiky člověka*. Praha: Karolinum. 227 s. ISBN 978-80-246-2109-8.
- RACEK, J., 1999. *Klinická biochemie*. Praha: Karolinum. 317 s. ISBN 80-7184-971-5.
- SHYAMALA, V., AMES, G., 1993. Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction (SSP-PCR) and Genome Walking. WHITE, B. A. *PCR Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1385/0-89603-244-2:339. ISBN 0-89603-244-2.
- SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M. J., RELICHOVÁ, J., *et al.*, 2017. *Genetika*. Druhé, aktualizované vydání. Brno: Masarykova univerzita. 864 s. ISBN 978-80-210-8613-5.
- SRŠEŇ, Š., SRŠŇOVÁ, K., 2005. *Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata*. Štvrté, prepracované a rozšírené vydanie. Martin: Osveta. 446 s. ISBN 80-8063-185-9.
- ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- VAN GIAU, V., BAGYINSZKY, E., AN, S. S., KIM, S., 2015. Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* [online]. [cit. 2019-11-24]. DOI: 10.2147/NDT.S84266. ISSN 1178-2021.

VOKURKA, M., 2012. *Patofyziologie pro nelékařské směry*. 3. upravené vydání. Praha: Karolinum. 306 s. ISBN 978-80-246-2032-9.

WU, R., 2012. *Recombinant DNA Methodology II*. San Diego: Academic Press. ISBN 9780323137744.

YOU, H., CHEN, J., ZHOU, J., et al., 2015. Amplification refractory mutation system polymerase chain reaction versus optimized polymerase chain reaction restriction-fragment length polymorphism for apolipoprotein E genotyping of majorly depressed patients. *Molecular Medicine Reports* [online]. 2015, 12(5), 6829-6834 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.3892/mmr.2015.4251. ISSN 1791-2997.

ZENDE, P. D., 2013. Apolipoprotein E Gene Polymorphism And Its Effect On Plasma Lipids In Arteriosclerosis. *Journal of clinical and diagnostic research* [online]. [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.7860/JCDR/2013/6195.3455. ISSN 2249782X.

ZHAO, N., LIU, CH. CH., QIAO, W., BU, G., 2018. Apolipoprotein E, Receptors, and Modulation of Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry* [online]. 83(4), 347-357 [cit. 2019-11-11]. DOI: 10.1016/j.biopsych.2017.03.003. ISSN 00063223.

ZIMA, T., 2013. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. 1146 s. ISBN 978-80-7492-062-2.

ZVĚŘOVÁ, M., 2017. *Alzheimerova demence*. Praha: Grada Publishing. Praha: Grada. 144 s. ISBN 978-80-271-0561-8.

ŽÁK, A., MACÁŠEK, J., 2011. *Ateroskleróza: nové pohledy*. Praha: Grada. 200 s. ISBN 978-80-247-3052-3.

*APOE gene, 2019* [online]. Genetics Home Reference. [cit. 2019-11-11]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/APOE>

100 bp DNA Ladder (Molecular Weight Marker), 2020. In: Nippon Genetics Europe [online]. [cit. 2020-05-14]. Dostupné z: <https://www.nippongenetics.eu/en/product/100-bp-dna-ladder/>

## 9 Seznam obrázků a tabulek

### Seznam obrázků

- Obrázek 1** - Struktura lipoproteinu. Zdroj: (Holeček, 2006)..... 9
- Obrázek 2** - Metabolismus lipoproteinů zjednodušeně. Tuky z potravy jsou přenášeny chylomikrony (CM), TAG z CM přecházejí do periferních tkání, zbytky CM vychytávají játra, kde se syntetizují VLDL. TAG ve VLDL jsou uvolněny do tkání a VLDL se mění na LDL obsahující cholesterol. LDL jsou vychytávány v játrech nebo periferních tkáních. Cholesterol z tkání je přenášen HDL. Z cholesterolu se v játrech syntetizují žlučové kyseliny odcházející žlučí do střeva. Zdroj: (Vokurka, 2012)..... 13
- Obrázek 3** - Pozice genu *APOE* na chromozomu 19. Zdroj:(*APOE* gene, 2019)..... 16
- Obrázek 4** - Průběh PCR reakce. Zdroj: (Bartůňková a Paulík, 2011)..... 23
- Obrázek 5** - 100 bp DNA Ladder H3RTU (Molecular Weight Marker). Marker se používá pro kontrolu velikosti PCR fragmentů na agarózovém gelu. Zdroj: (100 bp DNA Ladder (Molecular Weight Marker), 2020). ..... 42
- Obrázek 6** - Fotografie elektroforetického gelu (validační reakce č. 1). Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). Další jamky obsahují PCR produkty o velikosti 451 bp a 588 bp odpovídající genotypu *APOE* E3/E3. V poslední jamce je napipetována negativní kontrola reakce..... 44
- Obrázek 7** - Fotografie elektroforetického gelu (validační reakce č. 2). Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). Další jamky obsahují PCR produkty o velikosti 451 bp a 588 bp odpovídající genotypu *APOE* E3/E3. V poslední jamce označené NK je napipetována negativní kontrola reakce. .... 46
- Obrázek 8** - Fotografie elektroforetického gelu (validační reakce č. 3). Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). Další jamky obsahují PCR produkty o velikosti 451 bp a 588 bp, což odpovídá genotypu *APOE* E3/E3. V poslední jamce je napipetována negativní kontrola reakce..... 47
- Obrázek 9** - Fotografie elektroforetického gelu (validační reakce č. 4). Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). Další jamky obsahují PCR produkty s rozdílnými koncentracemi vstupního množství DNA uvedenými v tabulce 18. Produkty mají velikost 451 bp a 588 bp a odpovídají genotypu *APOE* E3/E3. Poslední jamka NK představuje negativní kontrolu reakce. .... 48
- Obrázek 10** - Fotografie elektroforetického gelu (validační reakce č. 5). Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). V dalších deseti jamkách jsou napipetovány PCR produkty se snižujícím se množstvím vstupní DNA do reakce o velikosti 451 bp a 588 bp, což odpovídá genotypu *APOE* E3/E3. Poslední jamka NK obsahuje negativní kontrolu reakce. .... 49
- Obrázek 11** - Produkty PCR reakce na elektroforetickém gelu. Kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). Další jamky obsahují PCR produkty o velikosti 451 bp a/nebo 588

bp odpovídající jednotlivým uvedeným genotypům. Poslední jamka NK představuje negativní kontrolu. .... 50

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1</b> - Reagencie pro izolaci DNA z bukálního stěru, jejich objemy a teplota skladování .....	34
<b>Tabulka 2</b> - Použité přístroje a spotřební materiál při izolaci z bukálního stěru .....	34
<b>Tabulka 3</b> - Reagencie pro izolaci DNA z plné krve, jejich objemy a teplota skladování .....	35
<b>Tabulka 4</b> - Použité přístroje a spotřební materiál při izolaci z plné krve.....	36
<b>Tabulka 5</b> - Reagencie pro měření koncentrace izolátu DNA a jejich teplota skladování .....	37
<b>Tabulka 6</b> - Použité přístroje a spotřební materiál při měření koncentrace izolátu DNA .....	37
<b>Tabulka 7</b> - Reagencie pro přípravu master mixu A na 1 reakci.....	38
<b>Tabulka 8</b> - Reagencie pro přípravu master mixu B na 1 reakci .....	39
<b>Tabulka 9</b> - Použité přístroje a spotřební materiál.....	39
<b>Tabulka 10</b> - Sekvence použitých primerů. Zdroj: (Zende, 2013) .....	39
<b>Tabulka 11</b> - Reakční profil PCR reakce.....	40
<b>Tabulka 12</b> - Reagencie a jejich teplota skladování .....	41
<b>Tabulka 13</b> - Seznam přístrojů, spotřebního materiálu a pomůcek .....	41
<b>Tabulka 14</b> - Tabulka pro vyhodnocení genotypu <i>APOE</i> .....	43
<b>Tabulka 15</b> - Výsledky validační reakce č.1 .....	45
<b>Tabulka 16</b> - Výsledky validační reakce č.2 .....	46
<b>Tabulka 17</b> - Výsledky validační reakce č.3 .....	47
<b>Tabulka 18</b> - Výsledky validační reakce č.4 .....	48
<b>Tabulka 19</b> - Výsledky validační reakce č.5 .....	49
<b>Tabulka 20</b> - Výsledky analýzy rozdílných genotypů <i>APOE</i> .....	50

## 10 Seznam zkratek

ABCA1	ATP-binding cassette transporter (ATP vázající kazetový transportér)
AD	Alzheimer's disease (Alzheimerova choroba)
APOA	apolipoprotein A
APOC	apolipoprotein C
APOD	apolipoprotein D
APOE	apolipoprotein E
APP	amyloid precursor protein (amyloidový prekurzorový protein)
ARMS-PCR	amplification refractory mutation system (amplifikaci nedostupný mutační systém PCR)
AS-PCR	allele specific PCR (alelově specifická PCR)
ATP	adenosine triphosphate (adenosintrifosfát)
bp	base pair (pár bází)
CETP	cholesterol ester transfer protein (cholesterylester transferový protein)
CM	chylomikrony
CNS	centrální nervová soustava
CRP	C-reaktivní protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleositrifosfát
ddNTP	dideoxynukleosidtrifosfát
DM	Diabetes mellitus
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
dsDNA	double stranded DNA (dvouvláknová DNA)

FN	false negativity (falešná negativita)
FP	false positivity (falešná pozitivita)
HDL	high density lipoproteins (lipoproteiny s vysokou hustotou)
HLP	hyperlipoproteinémie
hsCRP	vysoce senzitivní PCR
HSPG	heparan sulfate proteoglykans (proteoglykany heparan sulfátu)
IDL	intermediate density lipoproteins (lipoproteiny o střední hustotě)
ICHS	ischemická choroba srdeční
kDa	kilodalton
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LCAT	lecithin-cholesterol acyltransferase (lecitin cholesterol acyltransferáza)
LDL	low density lipoproteins (lipoproteiny s nízkou hustotou)
LDLR	LDL receptor
LPL	lipoproteinová lipáza
LRP1	protein 1 příbuzný LDL receptoru
MTP	mikrosomal triglycerid tranfer protein (mikrozomální triglyceridový transferový protein)
nm	nanometr
NTC	no template control
OH skupina	hydroxylová skupina
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PCR-SSP	sequence specific primer PCR (PCR se sekvenčně specifickými primery)
PD	Parkinson's disease (Parkinsonova choroba)



RFLP	restriction fragment length polymorphism (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)
RNA	ribonukleová kyselina
SR-B1	scavenger receptor class B type 1 – uklízející receptor B typ 1
TAG	triacylglycerol
Taq	polymeráza (enzym získaný izolací termolabilní bakterie <i>Thermus aquaticus</i> )
Tfl	polymeráza (enzym získaný izolací termostabilní bakterie <i>Thermus flavus</i> )
TN	true negativity (správná negativita)
TP	true positivity (správná pozitivita)
UV	ultraviolet (ultrafialové záření)
VLDL	very low density lipoprotein (lipoproteiny o velmi nízké hustotě)
VLDLR	VLDL receptor