



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Možnosti genetického testování mutací a polymorfismů
v souvislosti s kardiovaskulárním onemocněním**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

Autor: Lucie Čalounová

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

České Budějovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Možnosti genetického testování mutací a polymorfismů v souvislosti s kardiovaskulárním onemocněním jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské 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 3.5.2017

.....

Lucie Čalounová

Poděkování

Chtěla bych velice poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. za cenné rady a čas věnovaný při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou v současnosti velice aktuálním tématem a jsou nejčastějším důvodem úmrtí ve vyspělých zemích. Mezi hlavní příčiny vzniku KVO patří zejména ateroskleróza a trombóza, které mohou být geneticky podmíněné. Znalost genetických predispozic může pacientovi pomoci minimalizovat rizika KVO. Důležitá je ovšem i další prevence jako zdravý životní styl a omezení či úplné vyloučení rizikových faktorů jako např. kouření.

Cílem bakalářské práce bylo praktické zvládnutí techniky reverzní hybridizace na stripech pro detekci mutací a polymorfismů, které mají souvislost s kardiovaskulárním onemocněním a vypracování odborné rešerše na dané téma.

V teoretické části bakalářské práce popisují mutace a polymorfismy úzce související s kardiovaskulárním onemocněním, které lze detekovat pomocí kitu CVD Strip Assay v rámci jednoho experimentu. Dále se věnuji popisu alternativních analytických metod detekujících zmíněné vybrané mutace a polymorfismy.

V praktické části bakalářské práce zpracovávám vlastní výsledky získané v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. Jedná se o FV Leiden, FV R2 haplotyp, protrombin, FXIII, β -fibrinogen, PAI-1, HPA-1, MTHFR 677, MTHFR 1298, ACE, Apo B, Apo E. Mutace a polymorfismy jsem detekovala metodou reverzní hybridizace na stripech. K vyšetření jsem použila vzorky pacientů genetické laboratoře GENLABS s.r.o. České Budějovice.

Klíčová slova

kardiovaskulární onemocnění; mutace; polymorfismus; reverzní hybridizace na stripech

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) belong to the most current issues nowadays and they are the most frequent death reasons in the developed countries. Atherosclerosis and thrombosis, which might be genetically determined rank among the main causes of the inception. Knowledge of genetic predispositions might be helpful for patients to minimize the risk of CVD. Other prevention such as healthy lifestyle and restriction or better to say complete elimination of high risk factors, e.g. smoking is very important though.

The goal of this bachelor work is practical mastery of reverse hybridization on strips to detect the mutations and polymorphisms, which are related to cardiovascular diseases and prepare the research into this issue.

In the theoretical part, I apply with a description of mutations and polymorphisms closely related to cardiovascular diseases, which might be identified with the help of kit CVD Strip Assay within one experiment. Afterwards I pay attention to the description of alternative analytic methods recognizing above mentioned selective mutations and polymorphisms.

I deal with my own results obtained in the genetic laboratory GENLABS ltd. These are the FV Leiden, FV R2 haplotype, prothrombin, FXIII, β -fibrinogen, PAI-1, HPA-1, MTHFR 677, MTHFR 1298, ACE, Apo B, Apo E. I used the method of reverse hybridization on strips to identify the mutations and polymorphs. The patients' samples from the GENLABS laboratory were used to this research.

Key words

cardiovascular diseases; mutation; polymorphisms; reverse hybridization

Obsah

1	Úvod	9
2	Kardiovaskulární onemocnění	9
2.1	Ateroskleróza.....	9
2.1.1	Rizikové faktory pro vznik aterosklerózy.	10
2.2	Trombóza.....	10
2.3	Ischemická choroba srdeční (ICHS).....	10
2.4	Akutní formy ischemické srdeční choroby.....	11
2.4.1	Nestabilní angina pectoris (NAP).....	11
2.4.2	Akutní infarkt myokardu (IM).....	11
2.5	Familiární hypercholesterolémie (FH)	11
3	Mutace	12
3.1	Třídění mutací z kauzálního hlediska	12
3.2	Třídění mutací z molekulárního hlediska	12
4	Mutace a polymorfismy v souvislosti s KVO	14
4.1	Faktor V	14
4.2	Mutace FV Leiden	14
4.3	Mutace FV R2	14
4.4	Mutace genu pro protrombin	15
4.5	Faktor XIII.....	15
4.6	β - fibrinogen	16
4.7	Inhibitor aktivátoru plazmogenu-1 (PAI-1).....	16
4.8	Metilentetrahydrofolát reduktáza (MTHFR)	17
4.9	Polymorfismus MTHFR C677T	17
4.10	Polymorfismus MTHFR A1298C	18
4.11	Angiotenzin konvertující enzym (ACE).....	18
4.12	Antigeny krevních destiček (HPA – 1) Human Platelet Antigens	19

4.13	Apolipoprotein B	20
4.14	Apolipoprotein B-100.....	20
4.15	Apolipoprotein E	20
5	Metody detekce	22
5.1	Ampifikační metody	22
5.1.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	22
5.1.2	PCR-RFLP.....	23
5.1.3	Multiplex PCR.....	23
5.1.4	Alelově specifická PCR (AS-PCR).....	24
5.1.5	PCR-ARMS.....	24
5.2	Hybridizační metody	24
5.2.1	Hybridizace na pevných podkladech.....	24
5.2.2	Southern blotting	25
5.2.3	Reverzní hybridizace na stripech.....	25
5.2.4	Real time – PCR	26
6	Praktická část.....	27
6.1	Izolace DNA	27
6.1.1	Izolace z bukalního stěru	27
6.1.2	Izolace z plné krve.....	28
6.2	Měření koncentrace DNA.....	29
6.3	Příprava a provedení gelové elektroforézy.....	30
6.4	Reverzní hybridizace na stripu	31
6.5	Hybridizace.....	34
6.6	Odečítání výsledků	35
7	Výsledky	37
8	Diskuze.....	52
9	Závěr	54

10	Seznam použité literatury	55
11	Přílohy	66
12	Seznam zkratek.....	68

1 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) patří mezi nejčastější příčiny úmrtí v České republice. I přes významný pokles úmrtnosti na KVO v posledních letech, který je způsoben účinnou farmakologickou léčbou, nelze podceňovat rizika, která KVO přinášejí. Pokusy směřující ke genetické identifikaci rizikových faktorů KVO se staly nezbytnými a stejně důležitými jako prevence KVO a minimalizování rizik četných komplikací KVO. Trombóza, ischemická choroba srdeční atd. jsou spojovány s mutacemi genů pro FV, protrombin, MTHFR a dalších genů.

2 Kardiovaskulární onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění zahrnují všechna získaná a vrozená onemocnění srdce a cév jako např. aterosklerózu, ischemickou chorobu srdeční, onemocnění srdečních chlopní, kardiomyopatie, poruchy srdečního rytmu apod. Kardiovaskulární onemocnění dosáhla epidemických rozměrů po celém světě a jsou kritickým problémem mnoha států, protože jsou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích. (Parker, 2007; Mandovec, 2008)

2.1 Ateroskleróza

Název ateroskleróza vychází z řeckého označení pro kaši – *athera* a latinského slova *skleros* – tvrdý. Aterosklerotické změny byly pozorovány již na starověkých egyptských mumiích z 15. století před naším letopočtem. Jedním z prvních, kdo se o aterosklerotické změny zajímal a studoval je, byl renesanční umělec Leonardo da Vinci. (Brdička et al., 2015) *Ateroskleróza se nejčastěji definuje (podle Světové zdravotnické organizace, 1958) čistě popisně, jako měnlivé kombinované patologické změny v intimě a medii tepen, působené místním nahromaděním lipidů, sacharidů, krevních buněk, fibrózních tkání a vápníku.* (Kolář, 2009, s. 107)

Aterosklerotický proces neboli aterogeneze se často vyvíjí od mládí a po mnoho let může být asymptomatický. První morfologické změny začínají ve vazivové vrstvě intimy a označujeme je jako lipidní proužky, které mají bělavě žlutavou barvu. Postihují obzvláště aortu. S rostoucím věkem se část proužků přeměňuje na fibrózní pláty, některé mohou zcela vymizet. Fibrózní pláty jsou 2. stupněm aterogeneze a více či méně zužují průsvit tepny. Vazivová tkáň, která je prosycená cholesterolem, buňkami hladkého svalstva, lipoproteiny, makrofágy, odumírá a mění se v kašovitou hmotu (aterom) s ateromovými pláty. Aterom se vyskytuje jako vyvýšené ložisko v plátech, má velmi měkkou konzistenci a ve ztluštělé intimě jsou různě velké dutiny obsahující žlutavou kaši. Tento jev je pro aterosklerózu typický.

Kalcifikace ateromu a hyalinního vaziva je posledním výrazným stupněm aterogeneze, kdy se ve stěnách tepny objevují tvrdé destičky z vápenatých solí. Komplikace aterosklerózy, při nichž se objevují ischemické změny, jsou způsobeny zúžením nebo uzávěrem tepny ateromovým plátem, trombem nebo embolem. (Stříteský, 2001; Kolář, 2009)

2.1.1 Rizikové faktory pro vznik aterosklerózy.

Přestože přesná morfologie vzniku aterosklerózy není doposud objasněna, existují určité faktory, které její vznik a rozvoj urychlují. Mezi hlavní rizikové faktory řadíme:

1. Hyperlipoproteinémie
2. Vysoký krevní tlak
3. Kouření
4. Rodinná anamnéza – genetické predispozice
5. Onemocnění *Diabetes mellitus*
6. Obezita (Kolář, 2009)

2.2 Trombóza

Trombus neboli krevní sraženina se nejčastěji objevuje v místech s poruchou hladkého krevního průtoku a může částečně nebo úplně uzavřít tepnu nebo žílu. Tím dochází k turbulentnímu proudění krve nebo ke zpomalení toku krve. Tkáně zásobované zúženou nebo uzavřenou cévou trpí nedostatečným příjmem živin a kyslíku. (Parker, 2007)

Trombus se důsledkem zvýšené krevní srážlivosti nebo poškození žilní stěny tvoří nejčastěji v hlubokém žilním systému dolních končetin, ve kterých tok krve proudí pomaleji. Mezi rizikové faktory hluboké žilní trombózy patří: dědičné poruchy krevní srážlivosti (hlavně genetické mutace srážecích faktorů např. FV, FII), vyšší věk, obezita, nedostatek pohybu, kuřáctví, užívání hormonální antikoncepce atd. (Parker, 2007; Musil, 2009)

2.3 Ischemická choroba srdeční (ICHS)

Ischémie je zapříčiněna nedostatečným zásobením určité tkáně okysličenou krví a jednotlivé typy ischemické choroby srdeční se odlišují klinickým obrazem, etiologií, prognózou a léčbou. Rozeznáváme formu akutní (nestabilní) nebo chronickou (stabilizovanou). (Stříteský, 2001; Kolář, 2009)

2.4 Akutní formy ischemické srdeční choroby

2.4.1 Nestabilní angina pectoris (NAP)

NAP vystihuje ischemická bolest, nespecifický obraz EKG a hodnoty kardiomarkerů, které jsou v referenčních mezích. Jedná se o závažný stav, jelikož po celou dobu záchvatu je vysoké riziko vzniku infarktu myokardu nebo náhlé smrti. (Kolář, 2009)

2.4.2 Akutní infarkt myokardu (IM)

Jedná se o akutní ložiskovou ischemickou nekrózu myokardu z důvodu nedostatečného přísunu krve věncitou tepnou do příslušné oblasti. Z 95 % vzniká uzávěrem věncité tepny trombem, který nasedá na plát. Je tedy komplikací pokročilé aterosklerózy. (Kolář, 2009)

2.5 Familiární hypercholesterolémie (FH)

FH je autosomálně dominantně dědičné onemocnění, které je považováno především za onemocnění receptorů. Je charakterizována poruchou funkce genu LDL receptoru (lipoprotein o nízké hustotě), který se nachází na krátkém raménku 19. chromozomu. Nebo také defektem FDB (familiární defekt Apo B-100), který je zapříčiněn bodovou mutací genu APOB a následně záměnou aminokyseliny v molekule apolipoproteinu B-100. Rozlišujeme 2 formy FH: homozygotní a heterozygotní, která je podstatně častější. Z důvodu vrozeně zvýšené koncentrace LDL cholesterolu je FH nejvýznamnějším klinickým projevem, který vede k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. (Češka, 1994; Češka, 2015)

3 Mutace

Mutací označujeme proces, který způsobuje trvalé změny v DNA, avšak mezi mutace se nezahrnují změny vyvolané rekombinací. Mutace mohou mít negativní vliv na organismus a zapříčinit patologické stavy, nebo naopak pozitivní vliv na organismus, který umožňuje získat nové nebo vylepšené funkce. (Sršeň et al., 2005) Mutační změny mohou být velké, způsobené ztrátou, duplikací nebo strukturní přestavbou chromozomů. Další, např. bodové mutace, představují změny genomu na úrovni párů bází. Bodové mutace mohou být způsobeny záměnou jednoho nukleotidu za jiný či insercí nebo delecí jednoho nukleotidu ve specifickém místě genu. Mutace se vyskytují jak v kódující, tak v nekódující části DNA a jsou hlavním zdrojem veškeré genetické variability. (Sršeň et al. 2005; Snustad et al., 2009)

3.1 Třídění mutací z kauzálního hlediska

Z kauzálního hlediska se mutace rozdělují na:

1. spontánní mutace – vznikají bez zjevné vnější příčiny
2. indukované mutace – vznikají po působení fyzikálních, chemických nebo biologických látek s mutagenním účinkem. (Sršeň et al. 2005; Snustad et al., 2009)

Podle druhu buněk, které mutace postihuje, dělíme:

1. mutace gametické – vyskytují se pouze u buněk zárodečné linie, a proto se přenášejí na všechny buňky postiženého potomka
2. mutace somatické – vznikají se v somatických buňkách na různé úrovni postzygotického vývoje jedince a výsledný mutantní genotyp popř. fenotyp je přítomný pouze v buněčném klonu pocházejícím z mutované buňky (Sršeň et al. 2005; Snustad et al., 2009)

3.2 Třídění mutací z molekulárního hlediska

Genové mutace dělíme:

1. delece – jednoho nebo několika nukleotidů, nejčastěji se vyskytuje v nekódující části DNA
2. inserce – může být způsobena vsunutím jedné báze do tripletu nebo duplikací a nestabilním opakováním trinukleotidů
3. substituce jedné báze – patří mezi nejčastější a rozlišují se na základě toho, jak ovlivňují čtecí rámeček:

- a) mutace měnící smysl (missense mutations) – náhrada jedné báze za jinou, což způsobí záměnu jedné aminokyseliny v genovém produktu
- b) mutace neměňící smysl (silent mutations) – záměnou jedné báze za jinou není způsobena záměna aminokyseliny v genovém produktu
- c) nesmyslné mutace (nonsense mutations) – záměnou jedné báze mohou vznikat stop-kodóny nebo naopak stop-kodón nevzniká a je nahrazen aminokyselinou (Sršeň et al. 2005; Snustad et al., 2009)

Pokud je frekvence výskytu mutace vyšší než 1 %, používá se častěji označení polymorfismus. Pokud je procentuální výskyt náhodný, tedy nižší než 1 %, zůstává označení mutace. Lze se však setkat se zažitými názvy jako např. Leidenská mutace, které tomuto pravidlu nepodléhají. (Sršeň et al. 2005; Snustad et al., 2009)

4 Mutace a polymorfismy v souvislosti s KVO

4.1 Faktor V

Faktor V řadíme mezi plazmatické kofaktory tzn. látky, které urychlují enzymatické reakce. Nacházíme ho v plazmě a cca z 20 % v α granulách trombocytů. Ve spojení s Ca^{2+} a fosfolipidy FV zrychluje aktivaci dalších koagulačních faktorů. Je důležitou součástí koagulační kaskády, kdy s účastí Xa (aktivní forma faktoru X) aktivuje přeměnu protrombinu na trombin. Inhibitorem aktivovaného faktoru V je aktivovaný protein C (APC), jehož aktivace probíhá na povrchu cévních endotelií a je tvořen převážně v hepatocytech. (Penka et al., 2011)

4.2 Mutace FV Leiden

V roce 1993 popsal Dahlbäck et al. rezistenci aktivovaného proteinu C. Tato rezistence je nejčastěji způsobována Leidenskou mutací, která je pojmenována po nizozemském městu, kde byla objevena.

Mutace FV Leiden je způsobena bodovou missence mutací, která vede k substituci G→A v pozici 1691 nukleotidového řetězce exonu 10 genu pro FV. Následkem je záměna argininu za glutamin v aminokyselinovém řetězci na pozici 506. (Dahlbäck et al., 1993; Penka et al., 2011) Inaktivace faktoru FVa aktivovaným proteinem C je v důsledku mutace pomalejší, a proto je považována za nejvýznamnější genetický rizikový faktor, který pak ve spojení s ostatními rizikovými faktory, způsobuje zvýšené riziko hluboké žilní trombózy. (Van Cott et al., 2016) Některé studie připisují více než 95 % případů APC rezistence právě Leidenské mutaci. (Dahlbäck et al., 1993, Voorberg et al., 1994)

Leidenská mutace je přítomna v heterozygotní variantě v kavkazské populaci v rozmezí 3 – 15 %. (Penka et al., 2011) U jiných etnických skupin, jako je africká nebo asijská populace, se téměř nevyskytuje. (Hooper et al., 1996) Homozygotní varianta je spíše vzácná. Vyskytuje se přibližně v 1 případě z 5000. Riziko hluboké žilní trombózy se zvyšuje u heterozygotních jedinců 3 – 7x. U homozygotních jedinců až 80x. (Rosendaal et al., 1995) Riziko hluboké žilní trombózy je umocněno dalšími genetickými faktory a životním stylem a např. užíváním hormonální antikoncepce. (Bloemenkamp et al., 1995)

4.3 Mutace FV R2

Další, ale méně častá mutace faktoru V, která také ovlivňuje rezistenci aktivovaného proteinu C je mutace FV R2. Mutace FV R2 vzniká substitucí na pozici 4070, v které je adenin

nahrazen guaninem, což má za následek náhradu původního histidinu za arginin v poloze 1299 aminokyselinového řetězce. (Lunghi et al., 1996) V genu pro FV byly popsány kromě R2 i další, populačně specifické mutace, které mají vliv na APC rezistenci – faktor V Cambridge (Arg306Thr), faktor V Hong Kong (Arg306Gly). (Penka et al., 2011) Castoldi a Rosing (2004) uvedli, že haplotyp HR2 zvyšuje koncentraci FV v plazmě a tím zvyšuje riziko vzniku rezistence k APC.

Vliv mutace FV R2 na vznik kardiovaskulárních onemocnění, konkrétně na vznik hluboké žilní trombózy je sporný. Některé studie uvádí mutaci FV R2 jako rizikový faktor (Gohil et al., 2009) jiné studie prezentují pouze aditivní efekt mutace FV R2 k mutaci FV Leiden. (Folsom et al, 2002)

4.4 Mutace genu pro protrombin

Protrombin (faktor II) je hlavní efektor koagulační kaskády, který je štěpen protrombinázou na aktivní formu α trombin. Ten má centrální roli v kontrole krevního srážení, protože podle potřeby působí prokoagulačně nebo antikoagulačně. (Penka et al., 2011)

Substituční bodovou mutaci v genu kódující protrombin, který se nachází na chromozomu 11p11.2 a skládá se ze 14 exonů, objevil Poort et al. v roce 1996. Na pozici 20210 dochází k náhradě guaninu za adenin (G20210A), což vede k mírnému zvýšení hladiny protrombinu. Zatím není znám způsob, jakým polymorfismus G20210A zvyšuje riziko trombózy, protože se nachází v 3' nekódující oblasti genu, ale je považován jako druhý nejčastější rizikový genetický faktor v souvislosti s žilní trombózou. (Penka et al., 2011)

Prevalence polymorfismu G20210A na jihu dosahuje hodnot okolo 3 %, kdežto na severu Evropy pouze 1,7 %. (Rosendaal et al., 1998)

4.5 Faktor XIII

Krevní koagulační faktor XIII (F XIII) neboli fibrin stabilizující faktor, patří mezi transglutamázy. Hraje klíčovou roli v procesu koagulace. Zpevňuje fibrin v závěrečné fázi srážení krve a zvyšuje odolnost proti fibrinolýze. (Penka et al., 2011) V roce 1963 Mezinárodní výbor pro faktory krevního srážení uznal fibrin stabilizující faktor jako koagulační faktor a nazval ho faktor XIII. (Muszbek et al., 1999) V posledních desetiletích došlo k rostoucímu zájmu o výzkum faktoru XIII. Podle názoru Muszbek et al. (1999) k tomu tak došlo vzhledem k objevům převážně ve dvou oblastech. Bylo zjištěno, že faktor XIII má důležitou roli v regulaci fibrinolýzy a mechanismus, kterým FXIII chrání fibrin, může mít

významné dopady na rezistenci vůči fibrinolytické terapii. Dále bylo prokázáno, že buněčná forma F XIII je přítomna v monocytech, různých typech makrofágů včetně tkáňových, ve většině orgánů a tkáních v těle. (Muszbek et al., 1999)

Polymorfismus označovaný jako Val34Leu je výsledkem substituční bodové mutace, kdy dojde k výměně guaninu za thymin v pozici 163 nukleotidového řetězce, což způsobuje nahrazení valinu leucinem v pozici 34 aminokyselinového řetězce. (Penka et al., 2011) Vzhledem k tomu, že polymorfismus se nachází pouze tři aminokyseliny před místem, kde je faktor štěpen trombinem, je možné, že tento polymorfismus ovlivňuje účinek trombinu na aktivaci F XIII. (Duval et al., 2016) V odborné literatuře byly publikovány rozsáhlé meta analýzy týkající se souvislosti polymorfismu faktoru XIIIa Val34Leu s rizikem infarktu myokardu. Shafey et al. (2007) zjistil, že existuje souvislost mezi výskytem alel F XIIIa 34Leu a mírným ochranným účinkem proti infarktu myokardu. Chen et al. (2014) publikovali skutečnost, že F XIIIa Val34Leu je ochranný faktor proti infarktu myokardu u bělošské populace. Tyto výsledky se shodují s meta analýzou Wang et al. (2014)

4.6 β -fibrinogen

Fibrinogen, označován jako faktor I, je dalším z faktorů koagulační kaskády. Strukturně se skládá ze tří párů polypeptidových řetězců A α , B β a γ , které jsou kódovány třemi různými geny lokalizovanými na chromozomu 4q23-32. (Chung et al., 1990; Penka et al., 2011) Trombin štěpí fibrinogen na nerozpustný fibrin a plazmin ho štěpí na fibrinogen degradační produkty. Fibrinogen se účastní na vazbě trombocytů mezi sebou i na vazbě k cévní stěně. (Penka et al., 2011)

Dřívější studie naznačují roli fibrinogenu jako rizikového faktoru pro ischemickou chorobu srdeční, infarkt myokardu, mrtvici, trombózu a ischemickou chorobu dolních končetin. (Fowkes et al., 1992; Ernst et al., 1993) Variabilita G/A lokusu – 455 promotorové oblasti β – fibrinogenu je spojena se zvýšenou hladinou fibrinogenu, která je považována za nezávislý rizikový faktor pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění. (De Maat et al., 1998)

4.7 *Inhibitor aktivátoru plazmogenu-1 (PAI-1)*

Glykoprotein PAI-1, který je produkován buňkami endotelu, megakaryocyty, hepatocyty, patří mezi nejdůležitější inhibitory fibrinolýzy. Fibrinolýza je proces, při kterém je protein fibrin štěpen plazminem a podílí se tedy na odstranění fibrinové zátky. Gen pro PAI-1 se nachází na chromozomu 7. (Penka et al., 2011)

Nejvíce studovaný polymorfismus, který ovlivňuje hladinu PAI-1, je označován 4G/5G. U tohoto polymorfismu v promotoru genu PAI-1 v pozici -675 bp dojde k delecí jednoho guaninu ze sekvence pěti za sebou řazených guaninů. (Penka et al., 2011) Polymorfismus 4G/5G a jeho vztah ke kardiovaskulárním onemocněním jako první popsal Dawson et al. v roce 1993. Polymorfismus spěje ke zvýšené expresi genu PAI-1 a doprovodným jevem může být zvýšení koncentrace proteinu PAI-1 v plazmě, který snižuje fibrinolytickou aktivitu. (Penka et al., 2011) Homozygoti 4G mají o 25 % zvýšenou koncentraci PAI-1 ve srovnání s homozygoty 5G. Genotyp 4G/5G představuje úroveň mezi nimi. (Eriksson et al., 1995) Právě zvýšená koncentrace PAI-1 v plazmě bývá spojována s možným rizikem tepenných trombóz, protože snižuje fibrinolytickou aktivitu. (Penka et al., 2011) Nicméně toto spojení s rizikem trombóz s jistotou potvrdit nemůžeme vzhledem k protichůdným experimentálním výsledkům různých skupin. Studie prováděné Erikssonem et al. (1995), Abboud et al. (2010) a Margaglione et al. (1998) podporují korelaci genotypu PAI-1 4G/4G s vývojem kardiovaskulárních onemocnění na rozdíl od studií Andersona et al. (1999) a Crainicha et al. (2003).

4.8 Metylentetrahydrofolát reduktáza (MTHFR)

MTHFR je enzym, který je velice důležitý v biochemickém cyklu homocysteinu. Poskytuje metylové skupiny potřebné ke zpětné remetylaci homocysteinu na metionin. (Penka et al., 2011) Homocystein byl poprvé popsán v roce 1932 de Vigneaudem jako toxická aminokyselina. Zvýšenou hladinu homocysteinu v krvi může způsobit i nedostatek kyseliny listové, pyridoxinu a vitamínu B12 v potravě. Bez kyseliny listové nemůže řádně proběhnout přeměna homocysteinu v methionin. Kofaktory enzymů, které tuto reakci ovlivňují, jsou vitamíny pyridoxin a B12. Bez těchto kofaktorů ztrácí enzym funkčnost. V případě homocysteinu to znamená, že nemetabolizovaný homocystein proniká do krve, kde se hromadí a působí patologicky na organismus. Hyperhomocysteinémie neboli zvýšená hladiny homocysteinu v krvi může vznikat i z genetických příčin a to variabilitou v genu pro MTHFR. (Erben, 2015) Gen pro MTHFR se nachází na krátkém raménku (p) chromozomu 1 v pozici 36.6. (Rodriguez-Guillén et al., 2009; Yang et al., 2014) V tomto genu bylo do dnešní doby objeveno 34 mutací a 9 polymorfismů, z nichž nejvíce studované jsou polymorfismy MTHFR C677T a MTHFR A1298C. (Leclerc et al., 2000)

4.9 Polymorfismus MTHFR C677T

Záměna cytosinu za thymin v pozici 677 v genu pro MTHFR vede k substituci alaninu za valin v pozici 222 ve struktuře proteinu. Tím dochází ke vzniku termolabilní varianty

MTHFR s defektem remetylace, což může vést k vyšší hladině homocysteinu. (Penka et al. 2011). Tento polymorfismus se nachází v exonu 4 genu pro MTHFR a je spojován se sníženou aktivitou tohoto enzymu, zvýšenou koncentrací homocysteinu v krvi a sníženou plazmatickou koncentrací kyseliny listové. (Frosst et al., 1995) Jedinci s genotypem 677TT mají přibližně o 20 % vyšší hladinu homocysteinu než jedinci s genotypem 677CC. (Bozok Çetintaş et al., 2014) Nositelé heterozygotní formy 677CT mají sníženou aktivitu enzymu přibližně o 35 % ve srovnání s homozygoty 677TT. (Cao et al., 2013; Rodriguez-Guillén et al., 2009; Van der Put et al., 1998)

4.10 Polymorfismus MTHFR A1298C

Druhý nejvýznamnější polymorfismus v genu pro MTHFR vzniká substitucí adeninu za cytosin v pozici 1298 nukleotidového řetězce. Ve výsledku dochází k záměně aminokyseliny glutamátu za alanin v pozici 429 aminokyselinového řetězce. Tento polymorfismus byl objeven v roce 1998. (Van der Put, 1998) Obdobně jako polymorfismus C677T i tento redukuje aktivitu enzymu MTHFR ovšem v mnohem menší míře. (Van der Put, 1998)

Oba polymorfismy samy o sobě nejsou považovány za trombofilní riziko, přestože zvýšená hladina homocysteinu takové riziko představuje. (Penka et al., 2011) Frekvence výskytu polymorfismů MTHFR v bělošské populaci v případě heterozygota C677T je 30 – 55 %, heterozygota A1298C 4 – 25 %, pro variantního homozygota 677TT 4 – 25 %, a pro homozygota 1298CC 10 – 12 %. (Leclerc et al., 2000)

4.11 Angiotenzin konvertující enzym (ACE)

ACE je komponentem systému renin-angiotenzin-aldosteron (RAS), který upravuje krevní tlak a má důležitou roli v patogenezi kardiovaskulárních onemocněních. RAS je jedním z hlavních regulačních systémů, které se podílí např. na údržbě homeostázy sodíku. (Vítovec et al., 2004) ACE je exprimován převážně na povrchu plicních cév. Svým působením hydrolyzuje angiotenzin I a převádí jej v angiotenzin II, který svými vazokonstrikčními účinky reguluje krevní tlak. Současně inaktivuje bradykinin, který je vazodilatační ligand. (Štejf, 2007; Jabor, 2008) Gen pro ACE1 je lokalizován na chromozomu 17q23. (Jabor, 2008)

Polymorfismus ACE je definován inzercí (I) nebo delecí (D) 287-bp Alu repetitivní sekvence. Výsledkem jsou 3 genotypy: DD, II a ID. Genotyp DD je spojen s dvakrát vyšší koncentrací ACE v plazmě a tkáních než genotyp II. (Rigat et al., 1990) Alely D inzerčně/deleční ACE

polymorfismu jsou významně spojeny se zvýšeným rizikem infarktu myokardu u kavkazské i asijské populace. (Chen et al., 2013)

4.12 Antigeny krevních destiček (HPA – 1) Human Platelet Antigens

Krevní destičky hrají klíčovou roli v patogenezi KVO z důvodů možné zvýšené adheze destiček k cévnímu povrchu, jejich aktivace a agregace. (Rauch et al., 2001, Ruggeri, 2002) Aktivace krevních destiček je spojena se změnou v konformaci komplexu glykoproteinu (GP) IIb/IIIa, čímž se stává funkčním receptorem pro fibrinogen, von Willebrandův faktor a další související adhezivní proteiny. (Phillips et al., 1991) Tento membránový komplex IIb/IIIa patří do skupiny integrinů a významně se podílí při agregaci a aktivaci krevních destiček a zároveň nese antigen krevních destiček, což je polymorfní, vazebné místo pro fibrinogen, von Willebrandův faktor, vitronektin a trombospondin. (Newman et al., 1989) Antigen krevních destiček nese na jejich povrchu integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GP IIb/IIIa) a je klinicky nejzajímavější. (Michelson, 2013)

Komplex GP IIb/IIIa nese 2 hlavní polymorfní místa HPA – 1 a HPA – 3. (Newman et al., 1989) Polymorfismus HPA – 1 je lokalizován na terminálním konci GP IIIa a je tvořen dvěma alelami. Alela HPA – 1a obsahuje leucin v pozici 33 β_2 podjednotky $\alpha\text{IIb}\beta_3$ integrinu GP IIIa. Alela HPA – 1b je charakterizována substitucí leucinu za prolin v pozici 33 β_2 podjednotky $\alpha\text{IIb}\beta_3$ integrinu GP IIIa. (Newman et al., 1989) Tato změna je důsledkem záměny cytosinu za thymin v pozici 1565 nukleotidového řetězce v exonu 2 GP IIIa genu. (Zimrin et al., 1990) Důležitý je strukturální vztah mezi receptory ligandů a aloantigeny krevních destiček, jelikož bylo empiricky prokázáno, že vazba některých aloprotilátek na GP IIb/IIIa může způsobit inhibici agregace. Tím by mohly polymorfismy v GP IIb/IIIa ovlivňovat aktivaci krevních destiček. (Kunicki et al., 1992) Weiss et al. (1996) popsali významně vyšší prevalenci HPA - 1b polymorfismu u pacientů s infarktem myokardu ve srovnání s kontrolními subjekty. To naznačuje důležitou úlohu polymorfismu HPA – 1b genu GP IIIa v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění. (Weiss et al., 1996) Nicméně se objevily nesrovnalosti s těmito výsledky u studie provedené v Severní Americe (Carter et al., 1996). Také výsledky studií Corral et al. (1997) neukázaly významné rozdíly ve výskytu polymorfismu HPA – 1b mezi pacienty s kardiovaskulárním onemocněním a kontrolních subjektů, proto také Corral et al. (1997) nepovažují polymorfismus HPA – 1b jako dědičný rizikový faktor pro infarkt myokardu. Jiné studie opět prokazují, že homozygotní polymorfismus HPA – 1b je pozitivně spojen s ICHS a infarktem myokardu. (Moshfegh et al., 1999, Abboud et al., 2010)

4.13 Apolipoprotein B

Tento lipoprotein existuje ve dvou variantách: apolipoprotein B-100 (Apo B-100) a apolipoprotein B-48 (Apo B-48). Apo B-100 vzniká v játrech a je strukturálním proteinem VLDL, IDL a LDL částic. Byl objeven v roce 1940. Apo B-48 je syntetizován ve střevech a tato varianta byla objevena v roce 1980. (Marshall, 2014, Žák et al., 2011) Zvýšené plazmatické koncentrace Apo B lipoproteinů zvyšují riziko pro rozvoj ateromu (mazová cysta). (Marshall, 2014) Obě formy Apo B jsou produkty genu ApoB, který je lokalizován na chromozomu 2p24.1. (Žák et al., 2011)

4.14 Apolipoprotein B-100

Apo B-100 je nezbytný pro sekreci VLDL částic. Obsahuje několik hydrofobních oblastí, které slouží jako domény k vazbě lipidů. Má také vazebnou doménu pro LDL receptor (aminokyseliny 3100 – 3400), který umožňuje specifické vychytávání LDL částic na LDL receptoru. (Marshall, 2014)

Jako první byl objeven polymorfismus Apo B-100 R3500Q. Polymorfismus vzniká záměnou argininu za glutamin v kodonu 3500 (R3500Q), která způsobí sníženou vazbu Apo B-100 na LDL-receptor. (Soria et al., 1989) Mutace v genu pro Apo B-100 způsobují onemocnění označované jako familiárně defektní apolipoprotein B, které je klinicky neodlišitelné od familiární hypercholesterolemie a také vyvolávají zvýšené hladiny cholesterolu v krevní plazmě. Spolu s mutací v genu pro LDL receptor mohou zapříčinit poruchu metabolismu lipidů. (Žák et al., 2011, Brdička, 2015)

4.15 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E je sérový glykoprotein, který se skládá z 299 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je ~ 34 kDa. Gen pro ApoE se skládá ze 4 exonů a 3 intronů. Jsou známy tři izoformy, které se liší aminokyselinami v polohách 112 a 158 aminokyselinového řetězce. Buď je přítomen cystein, nebo arginin. ApoE2 má v obou polohách cystein, ApoE3 má v poloze 112 cystein a v poloze 158 arginin a ApoE4 má v obou polohách arginin. Rozdílné aminokyseliny mají vliv na strukturu izoform ApoE a jejich schopnost vázat lipidy. (Weisgraber, 1994) Existuje tedy šest různých ApoE genotypů: tři homozygotní (E2/E2, E3/E3 a E4/E4) a tři heterozygotní genotypy (E2/E3, E2/E4 a E3/E4). (Davignon et al., 1988) Genotyp E3/E3 je považován za wild type a je nejčastější v běžné populaci. Zende et al. (2013) uvádí, že alela E3 je nejčetnější, následuje alela E2. Nejmenší četnost má alela E4. Toto zjištění je univerzální pro lidskou populaci. (Burman et al., 2009, Gerdes et al., 1992)

Apo E je multifunkční protein, který hraje klíčovou roli v metabolismu cholesterolu a triglyceridů. (Žák et al., 2011) Studie Wilson et al. (1994) zkoumaly přímý dopad ApoE na ischemickou chorobu srdeční a jeho vliv na hladinu cholesterolu v krvi. U jedinců s arteriosklerózou byla pozorována vyšší koncentrace celkového cholesterolu v krvi a vyšší střední hodnota LDL cholesterolu i VLDL cholesterolu než u kontrolní skupiny. Průměrná hodnota HDL cholesterolu byla nižší než u kontrolní skupiny. Dále byla pozorována vyšší hodnota triglyceridů v plazmě než u kontrol. (Wilson et al., 1994; Zende et al., 2013) Výskyt E4 fenotypů byl výrazně vyšší u kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních onemocnění jako infarkt myokardu, hypertenze, koronární srdeční onemocnění a mozková mrtvice. (Lehtinen et al., 1995) Přítomnost alely E2 může mít ochranný účinek. To potvrdily studie Mendes-Lana et al. v roce 2007.

5 Metody detekce

Diagnostika na základě analýzy DNA představuje velmi perspektivní způsob detekce přenašečství patologických alel, diagnostiky genetických predispozic určitých patologických stavů nebo odhalování patologií v prenatálním či bezpříznakovém období.

5.1 Ampifikační metody

Amplifikační metody detekce jsou založeny na mnohonásobném zmnožení (amplifikace = zmnožení) a jako nejpoužívanější metodu můžeme označit polymerázovou řetězovou reakci (PCR), která se v dnešní době používá v řadě modifikací, v běžné laboratorní praxi. (Šmarda, 2005)

5.1.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

V letech 1983-1985 v Cetus Corporation (Kalifornie) vyvinuli Kary B. Mullis, Faloon a Saikon enzymovou, vysoce účinnou techniku, kterou se amplifikují vybrané sekvence nukleových kyselin a nazvali ji polymerázovou řetězovou reakcí PCR – Polymerase Chain Reaction. (Zima et al., 2002)

Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, kdy dvouvláknová DNA je nejdříve denaturována za vzniku dvou komplementárních templátových molekul DNA. Amplifikovaný úsek cílové sekvence DNA je ohraničený připojením dvou primerů, což jsou krátké oligonukleotidové sekvence, které hybridizují na obou stranách s templátovou DNA na základě komplementarity bází a řídí syntézu nových vláken. K syntéze DNA se používá termostabilní enzym – DNA polymeráza, která je izolována z termofilních mikroorganismů. Např. Taq DNA-polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus* odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje. Syntéza nových řetězců vždy probíhá od 5' konce ke 3' konci. Během PCR se pravidelně střídají tři kroky. Jako první probíhá denaturace dvouřetězových molekul DNA při 94 – 95 °C. Následuje připojení primerů k odděleným řetězcům DNA obvykle při nižší teplotě (50-55 °C). Nižší teplota vytváří podmínky pro hybridizaci primerů s komplementárními sekvencemi. Posledním krokem je syntéza nových řetězců DNA pomocí Taq DNA-polymerázy, teplota se pohybuje v rozmezí 70-74 °C. Ukončení celé reakce nastane ochlazením inkubační směsi na 0-4 °C. Vše probíhá v přístroji – termocykleru, který umožňuje automatické nastavení teploty v různých časových intervalech, a proto postupným opakováním tohoto procesu dojde k amplifikaci požadovaného úseku DNA. (Zima et al., 2002, Šmarda, 2005, Křemen et al., 1998)

Pomocí PCR lze zviditelnit přítomnost, resp. nepřítomnost analyzovaného úseku DNA v genomu testovaného jedince. Nejčastěji se amplifikovaný úsek DNA hodnotí vizualizací pomocí elektroforézy v agarózovém gelu, na který je nanesena DNA obarvená pomocí interkalační barvičky (ta může být v gelu nebo se přidává přímo k PCR produktu). Záporně nabitá DNA putuje v gelu směrem k anodě a amplifikovaný úsek DNA je možné sledovat jako konkrétní proužek pod UV světlem a jeho polohu porovnat vzhledem k hmotnostnímu molekulovému markeru, který obsahuje DNA o známé délce. Tímto způsobem je možné detekovat větší nebo i menší delece popř. amplifikace. (Sršeň et al., 2005)

Mezi výhody PCR patří nízká časová náročnost (většinou okolo 3 hodin), velká rozlišovací citlivost (v optimálních podmínkách lze od sebe odlišit úseky lišící se délkou o jediný pár bází) a potřeba malého množství DNA. (Sršeň et al., 2005)

5.1.2 PCR-RFLP

Polymerázová řetězová reakce – polymorfismus délky restrikčních fragmentů (PCR-RFLP) je modifikace standartní PCR, která využívá PCR amplifikaci pro získání cílové sekvence DNA, která je následně štěpena speciálními enzymy – restrikčními endonukleázami (tzv. reduktázy) na fragmenty. Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které specificky štěpí oba řetězce molekuly DNA v sekvenčně určených místech a tím vznikají charakteristické fragmenty stejné velikosti. (Kosinová, 2007, Zima et al. 2002)

Existuje mnoho bakteriálních restrikčních endonukleáz (asi 1500), které můžeme rozdělit podle polohy štěpného místa na reduktázy typu I (štěpné místo je značně vzdálené od rozpoznávací sekvence), reduktázy typu II (štěpné místo se nachází přímo v rozpoznávací sekvenci) a reduktázy typu III (štěpné místo je v definované vzdálenosti, což znamená, že je vzdálené několik nukleotidů od této sekvence). (Křemen et al. 1998, Zima et al. 2002)

Tato metoda je vhodná pro diagnostické využití, kdy můžeme hledat genetické změny v amplifikovaném úseku např. bodové mutace, delece, inserce apod. (Kosinová, 2007)

5.1.3 Multiplex PCR

Multiplex PCR je výkonná metoda využívající princip PCR k paralelnímu testování několika delecí a bodových mutací v rámci jedné reakce. Do reakční směsi je přidáno více primerových párů, které rozpoznávají několik rozlišných cílových sekvencí, čímž je umožněna detekce, jelikož lze analyzovat několik genů současně. Nejsložitější je příprava, kdy je nutné optimalizovat reakční podmínky (sekvence primerů, koncentrace primerů, optimální teploty

jednotlivých cyklů). Důležitými výhodami multiplex PCR jsou nižší cenové náklady, a proto se často využívá u vyhledávání změn v dlouhých úsecích DNA nebo pro amplifikaci vnitřních kontrol. (Zima et al. 2002, Šmarda, 2005)

5.1.4 Alelově specifická PCR (AS-PCR)

Používá se pro detekci bodových mutací a malých delecí v genomu. AS-PCR je uskutečňována formou dvou nebo více paralelních reakcí, kdy se používají tzv. alelově specifické oligonukleotidy jako primery, které jsou komplementární buď ke standardní sekvenci, nebo mutantní (polymorfní) sekvenci. Primer a cílová sekvence musí být zcela komplementární. Pouze tehdy dochází k anealingu a následné elongaci. Tato metoda byla poprvé popsána při detekci subtypů HLA genů Olerupem et al. v roce 1991. (Zima et al. 2002, Šmarda, 2005)

5.1.5 PCR-ARMS

Jedná se o variantu AS-PCR, která je jednoduchá, spolehlivá a přesně rozliší heterozygota od homozygota pro jednu nebo druhou alelu. (Ferrie, 1992) Tento systém je založen na přesné komplementaritě bází na 3' konci jednoho z primeru. Samotný test PCR ARMS se rozděluje do dvou reakcí. Jedna je specifická pro standardní DNA sekvenci a druhá pro mutovanou. Do tohoto testu je nutné zařadit také vnitřní PCR kontrolu z důvodu rozlišení specifického chybění amplifikace nebo nesprávného průběhu PCR reakce. (Zima et al., 2002)

5.2 Hybridizační metody

Principem hybridizačních technik je částečné nebo úplné spojení nukleotidových sekvencí DNA, molekul o známé sekvenci s testovanými molekulami DNA, které jsou značeny sondou, na základě komplementarity bází. Výsledkem je vznik hybridních dvouřetězcových molekul DNA. Hybridizace se provádí na pevných nosičích a využívá se při genové analýze a při průkazu mutací. Vlastní hybridizaci musí předcházet denaturace DNA, což znamená oddělení vláken dvouvláknové DNA na jednořetězcovou DNA. (Zima et al., 2002, Křemen et al. 1998) Výhodou hybridizačních metod je, že nevyžadují klonování, sekvenování apod. (Sršeň et al., 2005)

5.2.1 Hybridizace na pevných podkladech

Je to jedna z nejčastěji používaných hybridizačních technik a řadíme k nim dot, blot a slot hybridizace, Southernův přenos, northern blotting (hybridizace RNA) a hybridizaci *in situ*. Imobilizace denaturované DNA nebo RNA se provádí nejčastěji na nitrocelulóзовých nebo

nylonových membránách. Rozlišujeme 3 základní typy hybridizace na základě principu přenosu:

1. hybridizace kolonií nebo plaků – na membránu se přemísťují nukleové kyseliny uvolněné přímo z bakteriálních kolonií
2. tečkové hybridizace – vzorek je na membránu kapán
3. reverzní hybridizace – soubor neznačených sond je ukotven na podkladu a k němu se následně hybridizuje vzorek obsahující testovanou, značenou DNA

Nukleové kyseliny jsou na membráně pevně imobilizovány ve stavu jednořetězců přístupných k sondě. Aby nedošlo k nespecifickému navázání sondy, přidávají se další látky (heterologní DNA, tRNA, proteiny), které obsadí volná místa na membráně. Tento krok nazýváme prehybridizace. K vlastní hybridizaci dochází ponořením membrány do roztoku, který obsahuje jednořetězcovou sondu. Zde je důležité nastavení příslušné teploty, která ovlivňuje stabilitu hybridů. Po odmytí nenavázané sondy z membrány následuje detekce navázané sondy. (Zima et al., 2002, Šmarda, 2005)

5.2.2 Southern blotting

E. M. Southern publikoval v roce 1975 nový pracovní postup, jehož realizace spočívá ve smíchání vyšetřované DNA s roztokem obsahujícím restriční endonukleázy. Takto získané restriční fragmenty se separují na agarózovém gelu v průběhu elektroforézy na základě své molekulové hmotnosti, kdy delší fragmenty putují pomaleji a naopak kratší úseky rychleji. Pomocí denaturace, která se provádí umístěním gelu do zásaditého prostředí, se následně získá jednovláknová DNA. Základním rysem této metody je přenos fragmentů z gelu na nitrocelulóзовou nebo nylonovou hybridizační membránu v nezměněné podobě. Tímto krokem se znemožní jejich renaturace. Za použití sond, které mohou být radionuklidy nebo chemicky označené úseky DNA obsahující studovanou sekvenci, dojde k hybridizaci pouze těch molekul DNA, které jsou komplementární k sekvenci sondy. Promytím se odstraní nenahybridizované sondy z membrány a ta je pak exponována na rentgenový film. Sekvence DNA, která se sondou specificky hybridizovala, se opticky jeví jako černý proužek. (Snustad et al., 2009, Sršeň et al. 2005)

5.2.3 Reverzní hybridizace na stripech

Strip je tvořen nitrocelulóзовou membránou, která slouží jako nosič, a na ní jsou jako paralelní linky navázané sondy. Jednotlivé sondy prezentují běžnou (wild type) nebo mutovanou sekvenci DNA. Před samotnou reverzní hybridizací na stripech je nutné namnožit

požadovaný úsek DNA pomocí PCR, kdy je produkt značen biotinem. Výsledné zviditelnění PCR produktů navázaných na stripu dochází přidáním alkalické fosfatázy konjugované se streptavidem a chromogenního substrátu. Výsledky je možné odečítat pouhým okem. (Matýšková et al., 2009)

5.2.4 Real time – PCR

Real time – PCR se řadí mezi tzv. kinetické PCR kdy lze detekovat produkty PCR reakce bezprostředně po jejich vzniku. Je nutné mít speciální cykler, který umožňuje detekovat fluorescenci a zároveň způsobovat cyklické změny teplot. Princip spočívá v monitorování množství vznikajícího PCR produktu v průběhu PCR. Nejdříve cykler nezaznamenává žádný signál, protože je templát jednořetězový. Až při probíhající amplifikaci vzniká dvouřetězový produkt, který je prozařován UV světlem, emitujícím fluorescenční signál. Fluorescenci snímá CCD-kamera. (Zima et al., 2002, Šmarda, 2005)

6 Praktická část

Praktická část mé bakalářské práce byla vykonávána v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích pod vedením Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. Veškerá vyšetření jsem prováděla pod odborným dohledem. V praktické části se věnuji izolaci DNA, vlastní analýze sledovaných mutací a polymorfismů v genech pro faktor V, faktor XIII, protrombin, β -fibrinogen, PAI-1, MTHFR, HPA, ACE, ApoB a ApoE. Všechny mutace a polymorfismy byly vyšetřeny metodou reverzní hybridizace na stripech. Velkou výhodou této metody je paralelní detekce všech sledovaných mutací a polymorfismů v rámci jednoho experimentu.

K jednotlivým metodám jsem využila tyto přístroje: termostát, chlazená centrifuga, stolní minicentrifuga/vortex, chladnička pro laboratorní použití, mikrovlnná trouba, sada pipet, fluorometr, laminární box, teplotní cycler, elektroforetický systém, iluminátor na pozorování elektroforézy UV světlem, detekční systém na focení gelu a vodní lázeň.

V rámci praktické části bylo analyzováno 58 pacientů. 34 experimentů bylo prováděno s DNA izolovanou z bukálního stěru a 24 experimentů bylo provedeno s DNA izolovanou z periferní krve.

6.1 Izolace DNA

Před každou molekulárně biologickou metodou je nutná izolace DNA. Ta se nejčastěji provádí z bukálního stěru nebo periferní krve pacienta. Periferní krev odebírá školený pracovník. Bukální stěr provádí sám pacient na základě přesně daných pokynů, mezi které patří: nejméně 60 minut před odběrem nejíst, odběrovým tamponem řádně otírat sliznice obou tváří po dobu 1 minuty a maximálně do 48 hodin doručit vzorek do laboratoře.

6.1.1 Izolace z bukálního stěru

K izolaci jsem využila DNA Isohelix DNA Isolation kit: DDK-3/DDK-50 dle doporučení výrobce. Použité reagentie jsou vypsány v tabulce 1. (tab.1)

Tabulka 1: Reagentie DNA Isohelix DNA Isolation kit: DDK-3/DDK-50 a jejich skladování

Reagentie:	Skladování
Lysis buffer - LS	pokojevá teplota
Proteinase K – PK	-20 °C
Capture buffer - CT	pokojevá teplota
Re-hydration buffer - TE	pokojevá teplota

Před zahájením izolace DNA z bukálního stěru jsme si připravila pro každý vzorek tři 1,5 ml mikrozkušavky a řádně jsem je popsala. Suchou lázeň jsem nastavila na 60° C. Dále jsem nechala rozmrazit Proteinázu K (PK).

Do zkumavky s tamponem bukálního stěru jsem napipetovala 500 µl Lysis bufferu a přidala jsem 20 µl Proteinázy K. Zkumavku se směsí jsem krátce zvortexovala a zcentrifugovala a nechala inkubovat při 60° C v suché lázni po dobu 1 hodiny. Po ukončení inkubace jsem směs opět krátce zvortexovala a zcentrifugovala na stolní minicentrifuze. Následně jsem přepipetovala všechnu supernatant do připravené 1,5 ml mikrozkušavky. Ke směsí jsem přidala 500 µl Capture bufferu a vše krátce zvortexovala. Poté jsem zkumavku nechala centrifugovat při 13 tis. ot/min. po dobu 13 minut. Opatrně, abych nepoškodila peletu DNA, jsem odstranila supernatant. Na stolní minicentrifuze jsem zkumavky znovu zcentrifugovala a odebírala všechnu zbylý supernatant. K peletce DNA jsem přidala Re-hydration buffer v rozmezí od 30 – 150 µl podle potřebné koncentrace DNA. Vše jsem nechala inkubovat při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Po uplynutí 5 minut jsem směs naposledy zvortexovala a zcentrifugovala při 13 tis. ot/min. po dobu 15 minut. Přepipetovala jsem všechnu supernatant do nové 1,5 ml zkumavky, kterou jsem označila štítkem (jméno a příjmení pacienta, rodné číslo, LIČ vzorku, datum izolace a iniciály toho, kdo DNA izoloval). Izolovanou DNA jsem uložila do mrazicího boxu, kde se skladuje při -20° C.

6.1.2 *Izolace z plné krve*

K izolaci DNA z plné krve jsem použila Genomic DNA Mini Kit. Použité reagentie jsou vypsány v tabulce 2. (tab. 2)

Tabulka 2: Reagentie Genomic DNA Mini Kit a jejich skladování

Reagentie:	Skladování:
96% ethanol	4° C
GT Buffer	pokojová teplota
W1 Buffer	pokojová teplota
Wash Buffer	pokojová teplota
Elution Buffer	pokojová teplota
RBC Lysis Buffer	pokojová teplota

Před samotnou izolací DNA z periferní krve jsem si zkontrolovala, zdali je do Wash bufferu přidán ethanol dle návodu. Dále jsem vytemperovala termostat na 60° C a do něj dala předeřívát Elution buffer. Pro každý vzorek jsem si připravila dvě 1,5 ml mikrozkušavky a řádně je popsala.

Do zkumavky jsem napipetovala 300 μ l plné krve, přidala jsem 900 μ l RBC Lysis bufferu a roztoky jsem promíchala pouze převrácením v ruce. Promíchané roztoky jsem inkubovala na 10 minut při pokojové teplotě a následně jsem je zcentrifugovala při 3000 x g (rpm). Opatrně jsem odstranila supernatant a ve zkumavce jsem ponechala peletu. K peletce jsem přidala 100 μ l RBC Lysis bufferu a resuspendovala jsem jí. Následně jsem do zkumavky napipetovala 200 μ l GB bufferu, vše zvortexovala a zcentrifugovala. Zkumavku jsem dala inkubovat do termostatu na 15 min. Během inkubace jsem zkumavku každé 3 minuty párkrát převrátila. Po inkubaci musí být lyzát projasněný. K lyzátu jsem připipetovala 200 μ l 96% ethanolu a opět celou směs zvortexovala a zcentrifugovala. Obsah mikrozkušavky jsem přelila na kolonku (GD Column), kterou jsem vložila na čisté sběrné zkumavky (2 ml Collection Tube). Kolonku se sběrnou zkumavkou jsem centrifugovala při 14 -16 tis. x g po dobu 5 minut. Kolonku jsem následně přendala do nové čisté sběrné zkumavky. Přímo na kolonku jsem napipetovala 400 μ l W1 bufferu. Znovu jsem kolonku centrifugovala při 14 -16 tis. x g po dobu 30 sekund. Ze sběrné zkumavky jsem vylila supernatant a kolonku do ní vrátila. Přidala jsem 600 μ l Wash bufferu a provedla jsem centrifugaci při 14 -16 tis. x g po dobu 30 sekund. Opět jsem vylila supernatant a kolonku vrátila do sběrné zkumavky. Aby došlo k vysušení kolonky, dala jsem jí centrifugovat 14 -16 tis. x g po dobu 3 minut. Po ukončení centrifugace jsem zkontrolovala, jestli je kolonka suchá. Pokud se tak nestalo, opakovala jsem předešlou centrifugaci. Suchou kolonku jsem přendala do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, kterou jsem označila štítkem (jméno a příjmení pacienta, rodné číslo, LIČ vzorku, datum izolace a iniciály toho, kdo DNA izoloval). Doprostřed na filtr kolonky jsem přidala 50 μ l Elution buffer a nechala inkubovat při pokojové teplotě nejméně 3 minuty. Následně jsem kolonku s mikrozkušavkou zcentrifugovala při 14 -16 tis. x g po dobu 30 sekund. Izolovanou DNA jsem po měření koncentrace uložila do mrazicího boxu, kde se DNA skladuje při -20°C .

6.2 Měření koncentrace DNA

Měření koncentrace DNA jsem provedla pomocí QubitTM Assays na přístroji Qubit® 2.0 Fluorometer. Měření koncentrace DNA se skládá ze dvou částí. Prvním krokem je příprava pracovního roztoku QubitTM Working Solution a druhým krokem měření na fluorometru. Použité reagensie jsou vypsány v tabulce 3. (tab. 3)

Tabulka 3: Reagencie Qubit™ Assays a jejich skladování

Reagencie:	Skladování:
Qubit™ dsDNA BR reagent	pokožová teplota
Qubit™ dsDNA BR buffer	pokožová teplota
Qubit™ dsDNA BR Standard #1	při 4 °C
Qubit™ dsDNA BR Standard #2	při 4 °C

Před vlastním měřením jsme vytemperovala standardy na pokojovou teplotu a pro každý vzorek jsem si připravila předepsané mikrozkušavky Qubit™ assay tubes. Pro každý vzorek (popř. standardu) jsem napipetovala 199 µl Qubit™ dsDNA BR bufferu a 1 µl Qubit™ dsDNA BR reagentu do pracovní 1,5 ml plastové mikrozkušavky. Směs jsem zvortexovala po dobu 15 sekund a zcentrifugovala na stolní centrifuze. Pro měření standardu jsem napipetovala do připravených mikrozkušavek Qubit™ assay tubes 190 µl připraveného pracovního roztoku a do jedné 10 µl Qubit™ dsDNA BR Standard #1 a do druhé Qubit™ dsDNA BR Standard #2. Pro měření vzorku jsem do mikrozkušavky napipetovala 198 µl pracovního roztoku a 2 µl DNA. Mikrozkušavky jsem krátce zvortexovala a zcentrifugovala a po 2 minutové inkubaci jsem vzorky změřila. Hodnoty změřené koncentrace jsou uvedeny v tabulce 4, která je přiložena v příloze. (tab. 4)

6.3 Příprava a provedení gelové elektroforézy

Použité reagencie jsou vypsány v tabulce 5. (tab. 5)

Tabulka 5: Reagencie pro gelovou elektroforézu a jejich skladování

Reagencie:	Skladování:
Crystal 10x TBE Buffer - prášek	pokožová teplota
10x TBE – roztok připravený z Crystal 10x TBE Buffer	pokožová teplota
Pracovní roztok 1x TBE	pokožová teplota
Agarózové tablety	pokožová teplota
DNA Loading Buffer Blue	pokožová teplota
Midori Green Advanced DNA Stain a 100 bp DNA LADDER H3RTU	4 °C; pokojová teplota

10x TBE pufr byl připraven rozpuštěním prášku Crystal 10x TBE Buffer v deionizované vodě a doplněním touto vodou na celkový objem 1 litr.

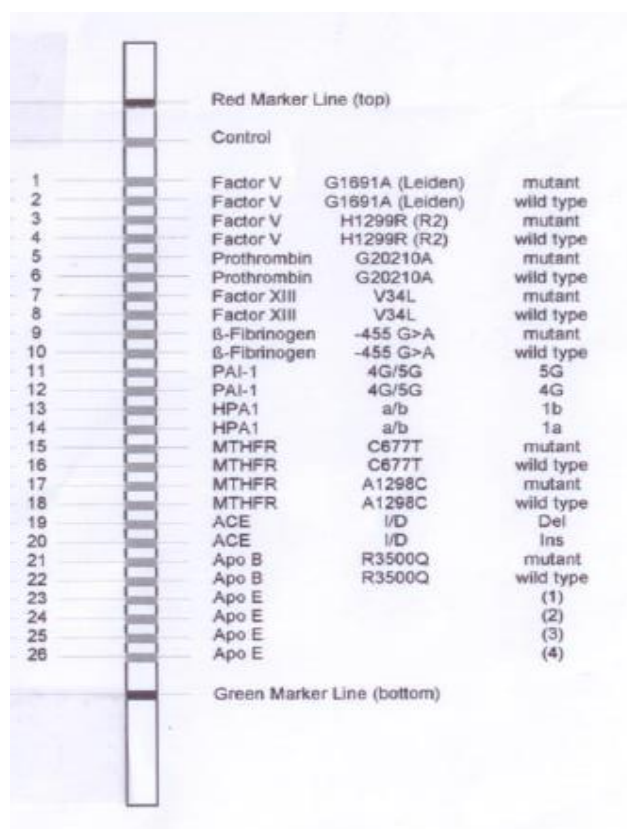
Příprava pracovního roztoku 1x TBE: Do skleněné lahve o objemu 0,5 l jsem pomocí odměrného válce nalila 50 ml 10x TBE pufru a přidala 450 ml destilované vody.

Příprava 4% gelu: Do plastové kádinky jsem vložila 4 agarózové tablety o hmotnosti 0,5 g a k nim jsem přidala 50 ml 1x TBE pufru. Tablety jsem nechala volně rozpustit a poté jsem směs zahřívala v mikrovlnné troubě na maximální ohřev až se agaróza úplně rozpustila a vznikl průhledný gelový roztok bez bublin. Do něj jsem přidala 20 µl Midori Green Advanced DNA Stain, roztok jsem promíchala a nechala krátce zchladnout. Po zchladnutí jsem roztok nalila do předem připravené elektroforetické podložky, vložila jsem hřebeny a popř. jsem špachtličkou odstranila zbylé bubliny. Gel jsem nechala ztuhnout ve tmě přibližně 10 – 15 minut. Ze ztuhlého gelu jsem odstranila hřebeny a gel vložila do elektroforetické vany, která obsahovala 1x TBE pufr. Zkontrolovala jsem, jestli je hladina TBE pufru minimálně 3 mm nad gelem, popř. jsem 1x TBE do vany dolila. Připravila jsem pro každý vzorek mimo markeru 1 µl vkládacího pufru (DNA Loading Buffer Blue) a ten jsem smíchala s 5 µl PCR produktu a vše jsem napipetovala do jamky. Do poslední nebo první jsem napipetovala 5 µl markeru (100 bp DNA LADDER H3RTU) pro určení velikosti PCR produktů. Po spuštění elektroforézy jsem mohla její průběh sledovat pomocí speciálního iluminátoru (Mupid™ LED Illuminator). Po skončení elektroforézy jsem gel přenesla na detekční systém (FastGene® GelPic LED Box), který mi umožnil vyfocení gelu na paměťovou kartu a tím pádem i další zpracování a vyhodnocení výsledků PCR pomocí počítače.

6.4 Reverzní hybridizace na stripu

Vyšetřované mutace a polymorfismy jsem detekovala pomocí certifikovaného kitu CVD Strip Assay dle protokolu dodaného výrobcem (ViennaLab) metodou reverzní hybridizace. Principem metody je získat, pomocí multiplex PCR s biotinem značenými primery, namnožené a označené cílové sekvence genů, které následně hybridizují ke specifickým oligonukleotidům imobilizovaným na prouzcích stripu. Specifická hybridizace je vizualizována pomocí streptavidin-alkalické fosfatázy a barevného substrátu obsahující chromogen (BCIP/NTB)

CVD Strip Assay umožňuje detekovat změny v genech pro FV Leiden, FV R2 haplotyp, protrombin, FXIII, β-fibrinogen, PAI-1, HPA-1, MTHFR 677, MTHFR 1298, ACE, Apo B, Apo E. (obr.1)



Obrázek 1: Šablona stripu k odečítání výsledků

Použité reagensie jsou vypsány v tabulce 6. (tab. 6)

Tabulka 6: Reagensie CVD Strip Assay (ViennaLab) a jejich skladování

Reagensie:	Skladování:
Taq DNA polymerase	-20 °C
Taq Dilution Buffer	4 °C
Amplification mix A (žluté víčko)	4 °C
Amplification mix B (zelené víčko)	4 °C
Hybridization Buffer	4 °C
Wash Solution A	4 °C
Wash Solution B	4 °C
DNAT	4 °C
Conjugate Solution	4 °C
Color Developer	4 °C

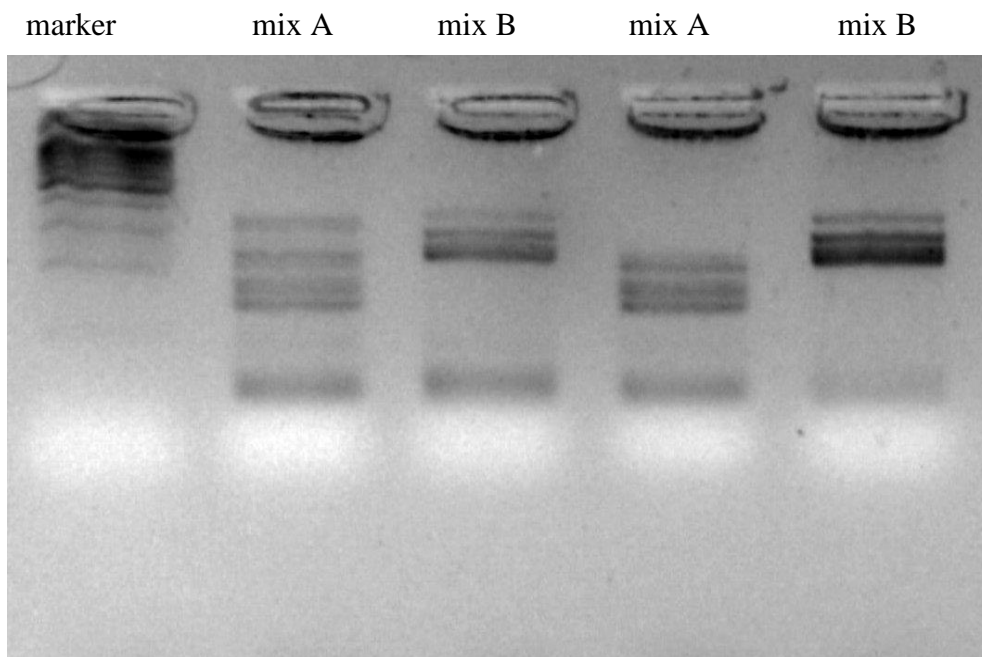
PCR amplifikace

Pro každý vzorek jsem si připravila 2 PCR zkumavky (0,2 ml) a řádně je popsala. Dále jsem naředila *Taq* polymerázu na potřebnou koncentraci 0,2 U/ μ l a to smícháním 0,4 μ l *Taq* polymerázy a 9,6 μ l Taq Dilution Bufferu pro jeden vzorek. V chladícím stojánku jsem do PCR zkumavky označené jako mix A napipetovala 15 μ l Amplification mix A (žluté víčko), 5 μ l naředěné *Taq* polymerázy a 5 μ l DNA. Do zkumavky mix B jsem napipetovala 15 μ l Amplification mix B (zelené víčko), 5 μ l naředěné *Taq* polymerázy a 5 μ l DNA. Obě zkumavky jsem zvortexovala, krátce zcentrifugovala a vložila do termocykleru, kde jsem spustila příslušný program. (tab. 7)

Tabulka 7: Průběh PCR programu

1 cyklus	čas	teplota
Počáteční denaturace	120 s	94 °C
35 cyklů		
Denaturace	15 s	94 °C
Anealing	30 s	58 °C
Extenze	30 s	72 °C
1 cyklus		
Terminální extenze	180 s	72 °C

Po ukončení PCR programu jsem provedla kontrolu PCR produktů elektroforézou na 4% agarózovém gelu. Do jamek jsem napipetovala 5 μ l PCR produktu mixu A, 5 μ l PCR produktu mixu B a 5 μ l hmotnostního markeru. Po vyfocení gelu jsem ověřila výsledek velikosti PCR produktů. V amplifikačním mixu A by měli vycházet produkty o velikosti – 134 bp, 156 bp, 173 bp, 202 bp, 223 bp, 254 bp, 297 bp a 324 bp a v amplifikačním mixu B – 225 bp, 248 bp, 283 bp, 346 bp (obr 2.).



Obrázek 2: PCR produkty amplifikačního mixu A a mixu B

6.5 Hybridizace

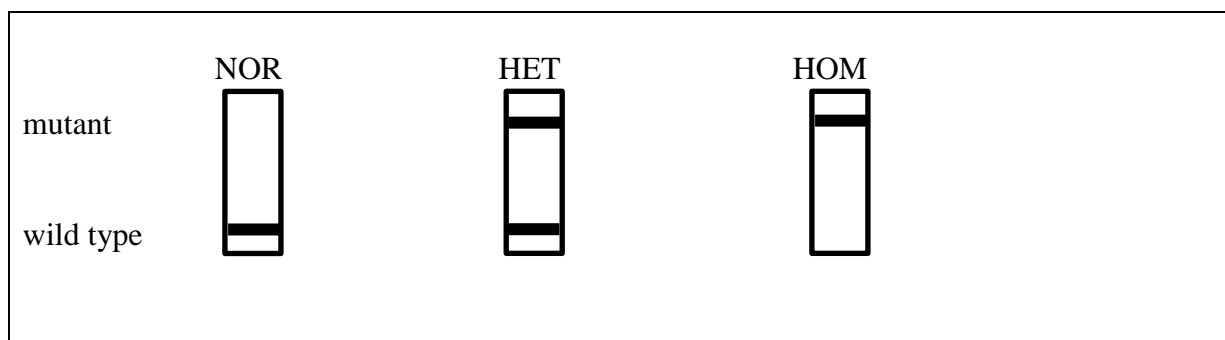
Nejprve jsem si nastavila vodní lázeň na 46° C a zkontrolovala jsem, jestli vodní hladina dosahuje minimálně do poloviny výšky hybridizačního korýtko. Hybridization Buffer a Wash Solution A jsem vložila do vodní lázně a předehřála je na 46° C. Testovací stripy, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B a Color Developer jsem nechala vytemperovat na pokojovou teplotu.

Do hybridizačního korýtko jsem napipetovala 10 µl DNAT, přímo do kapky DNAT přidala 10 µl amplifikačního mixu A a 10 µl amplifikačního mixu B. Roztok, který zůstal modrý, jsem nechala inkubovat při pokojové teplotě 5 minut. Následně jsem přidala 1 ml Hybridization Bufferu vytemperovaného na 46° C a jemně jsem zamíchala korýtkem, než zmizela modrá barva. Pinzetou jsem vyndala testovací strip a vložila jsem ho do hybridizačního korýtko. Korýtko jsem položila do vodní lázně a nechala inkubovat 30 min. při 46° C s třepáním cca 50 rpm. Po uplynutí inkubační doby jsem pipetou odsála roztok a nahradila jsem ho 1 ml Wash Solution A. Testovací proužek jsem v něm pouze na 10 sekund opláchla a pak jsem ho odsála pipetou. Znovu jsem do korýtko napipetovala 1 ml Wash Solution A a nechala korýtko inkubovat po dobu 15 min. při 46° C s třepáním cca 50 rpm. Tento krok jsem ještě jednou zopakovala. Po odsátí Wash Solution A jsem do korýtko přidala 1 ml Conjugate Solution a dala inkubovat na třepačku při pokojové teplotě. Po odsátí tekutiny jsem do korýtko napipetovala 1 ml Wash Solution B a po 10 sekundách jsem roztok zase odsála. Znovu jsem

do korýtky napipetovala 1 ml Wash Solution B při pokojové teplotě nechala inkubovat 5 min. na třepačce. Tento krok jsem ještě jednou zopakovala. Po odsátí Wash Solution B jsem do korýtky napipetovala 1 ml Color Developer a ve tmě, při pokojové teplotě na třepačce jsme korýtko dala inkubovat na 15 min. Při pozitivní reakci se proužky na stripu zbarví do fialové barvy. Před nalepením stripu na laboratorní protokol jsem ho opláchla destilovanou vodou a vysušila filtračním papírem.

6.6 Odečítání výsledků

Pro každý polymorfismus (s výjimkou Apo E) jsou na stripu 2 sondy, jedna odpovídá standardní a druhá mutované alele. Na základě pozitivní viditelné hybridizace na stripech jsem odečetla genotyp daného pacienta. (obr. 3; tab. 8)



Obrázek 3: Pozitivní vizualizace proužků na stripu

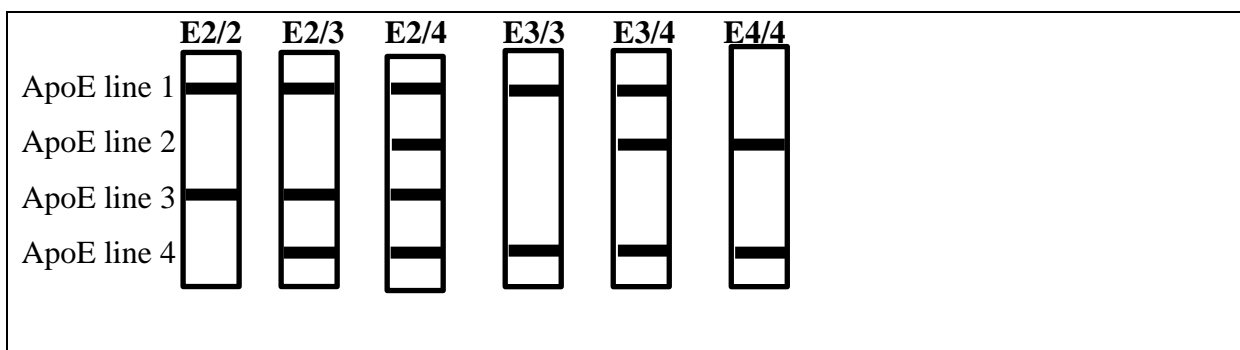
Tabulka 8: Určování genotypů u polymorfismů

	Wild type line	Mutant line	Genotyp
NOR	pozitivní	negativní	normální
HET	pozitivní	pozitivní	heterozygot
HOM	negativní	pozitivní	mutovaný homozygot

U polymorfismu Apo E jsou známy 3 izoformy, které se liší přítomností aminokyselin cysteinu nebo argininu v polohách 112 a 158 aminokyselinového řetězce. (tab. 9) Rozlišujeme tedy 6 různých genotypů: E2/E2; E3/E3; E4/E4; E2/E3; E2/E4; E3/E4. (obr. 4)

Tabulka 9: Rozdíly mezi izoformami Apo E

E2	112 – Cys; 158 – Cys	proužky – 1 a 3
E3	112 – Cys; 158 – Arg	proužky – 1 a 4
E4	112 – Arg; 158 – Arg	proužky – 2 a 4

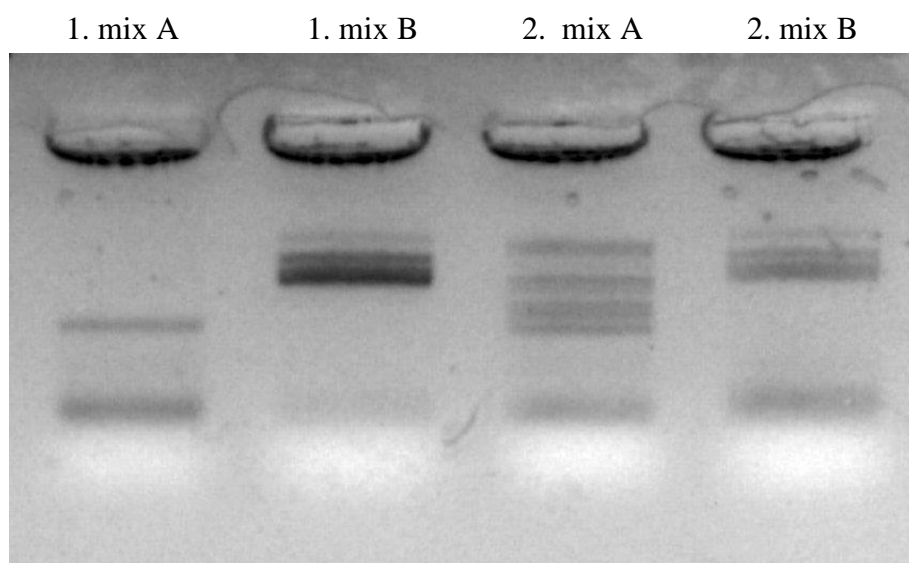


Obrázek 4: Určení genotypu u Apo E

7 Výsledky

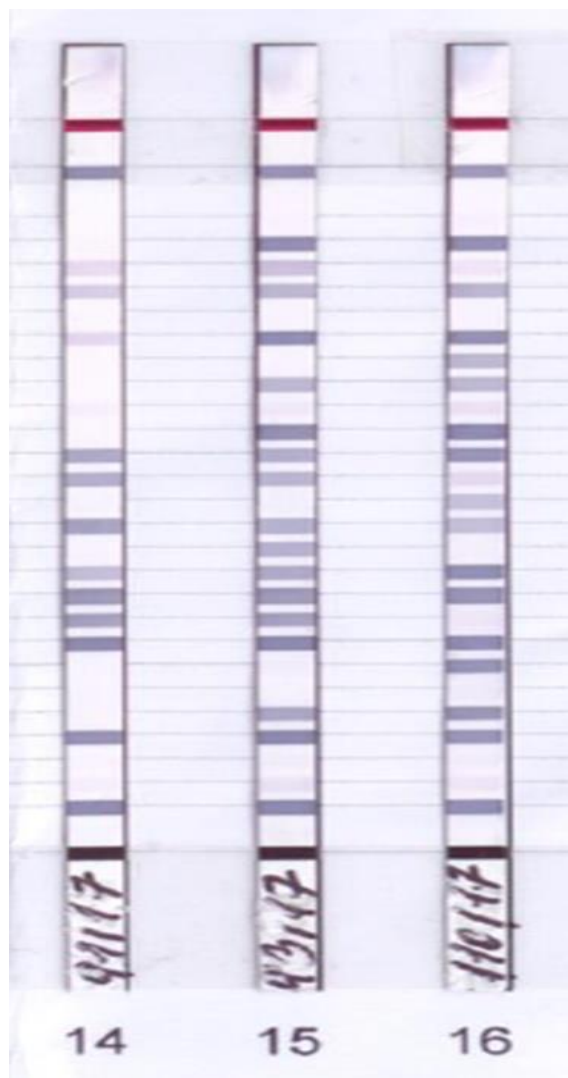
Gelová elektroforéza

Kontrola PCR produktů probíhala pomocí gelové elektroforézy. Na 4% agarózový gel bylo naneseno 5 μ l PCR produktu mixu A a 5 μ l PCR produktu mixu B. Příklad gelové elektroforézy pro dva různé experimenty je znázorněn na obrázku. (obr. 5) Po provedení multiplex PCR v případě mixu A mělo být detekováno na gelu 8 různých PCR produktů a v případě mixu B pak 4 různé amplifikační produkty.



Obrázek 5: Kontrola PCR produktů získaných pomocí certifikovaného kitu CVD Strip Assay. U prvního mixu (1. mix A) vyšel pouze produkt o velikosti 134 bp. U druhého amplifikačního mixu A (2. mix A) vyšli všechny požadované produkty o velikosti – 134 bp, 156 bp, 173 bp, 202 bp, 223 bp, 254 bp, 297 bp a 324 bp. U obou mixů B (1. mix B i 2. mix B) také vyšli požadované produkty o velikosti 225 bp, 248 bp, 283 bp a 346 bp.

Po provedení reverzní hybridizace na stripech neproběhla hybridizace u 1. experimentu (strip 14) pro několik genů. Naopak u 2. Experimentu (strip 15) můžeme na stripu odečíst všechny výsledky. (obr. 6)



Obrázek 6: Porovnání reverzní hybridizace na stripu č. 14, kde nebyly amplifikovány některé PCR produkty a stripu č. 15, kde amplifikace proběhla správně.

Na stripu č. 14 nebyly detekovány geny pro FV Leiden, FXIII, β -fibrinogen a Apo B.

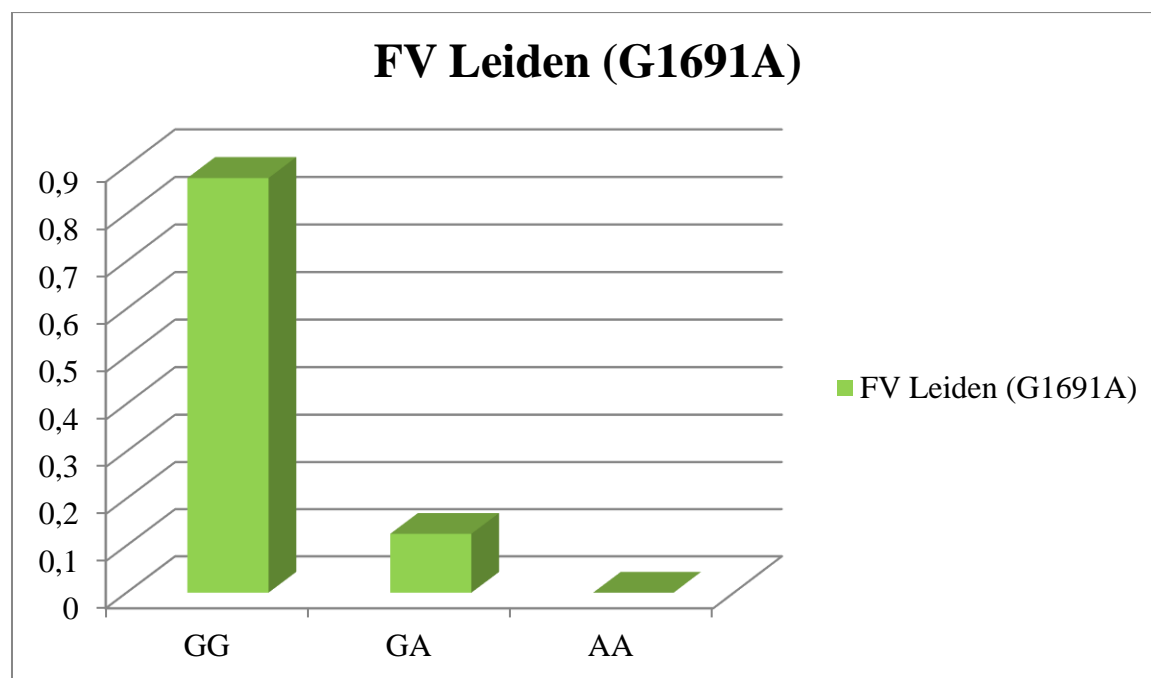
Faktor V Leiden (G1691A)

Leidenská mutace je způsobená substitucí na pozici 1691 (G → A), kde alela G je standardní a alela A mutantní. Počet osob s daným genotypem je uveden v tabulce. (tab.10) U 2 experimentů nešlo odečíst výsledek. Mutovaný homozygot nebyl v souboru detekován.

Tabulka 10: Počet osob s jednotlivými genotypy FV Leiden

FV Leiden (G1691A)			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
GG	GA	AA	
49	7	0	56

V grafu 1 jsou uvedeny hodnoty genotypové frekvence pro FV Leiden. (obr. 7) Výpočtem zjištěná hodnota genotypové frekvence pro wild type (GG) je 0,875 a pro heterozygotní variantu (GA) 0,125. Procentuální zastoupení heterozygotní varianty v souboru pacientů GENLABS s.r.o. činí 12,5 %, což odpovídá publikovaným výsledkům Penky (2011) o výskytu Leidenské mutace v heterozygotní variantě v kavkazské populaci.



Obrázek 7: Graf genotypové frekvence FV Leiden

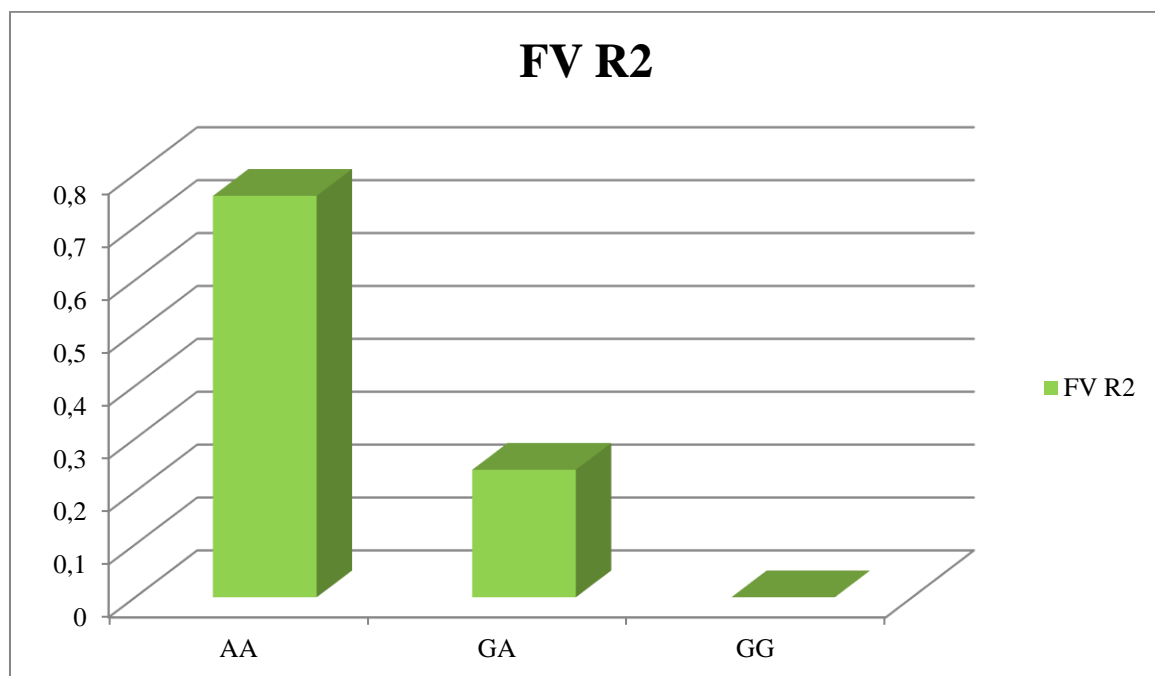
Faktor V R2

Další mutací ve faktoru V je mutace FV R2, která je způsobena substitucí adeninu za guanin v pozici 4070. Tabulka 11 zobrazuje počet osob s daným genotypem, kde genotyp AA je wild type, GA je heterozygotní varianta a GG mutovaná. (tab. 11) U 4 experimentů nebylo možné odečíst výsledek. Homozygotní varianta mutace nebyla detekována.

Tabulka 11: Počet osob s jednotlivými genotypy FV R2

FV R2 (H1299R)			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
AA	GA	GG	
41	13	0	54

V grafu 2 jsou uvedeny vypočítané genotypové frekvence FV R2. (obr. 8) Pro wild type (AA) je to hodnota 0,759 a pro heterozygotní variantu (GA) 0,241. Procentuální zastoupení heterozygotní varianty GA je 24,1 %. V hodnoceném souboru je výskyt heterozygotní varianty FV R2 vyšší než v případě FV Leiden.



Obrázek 8: Graf genotypové frekvence FV R2

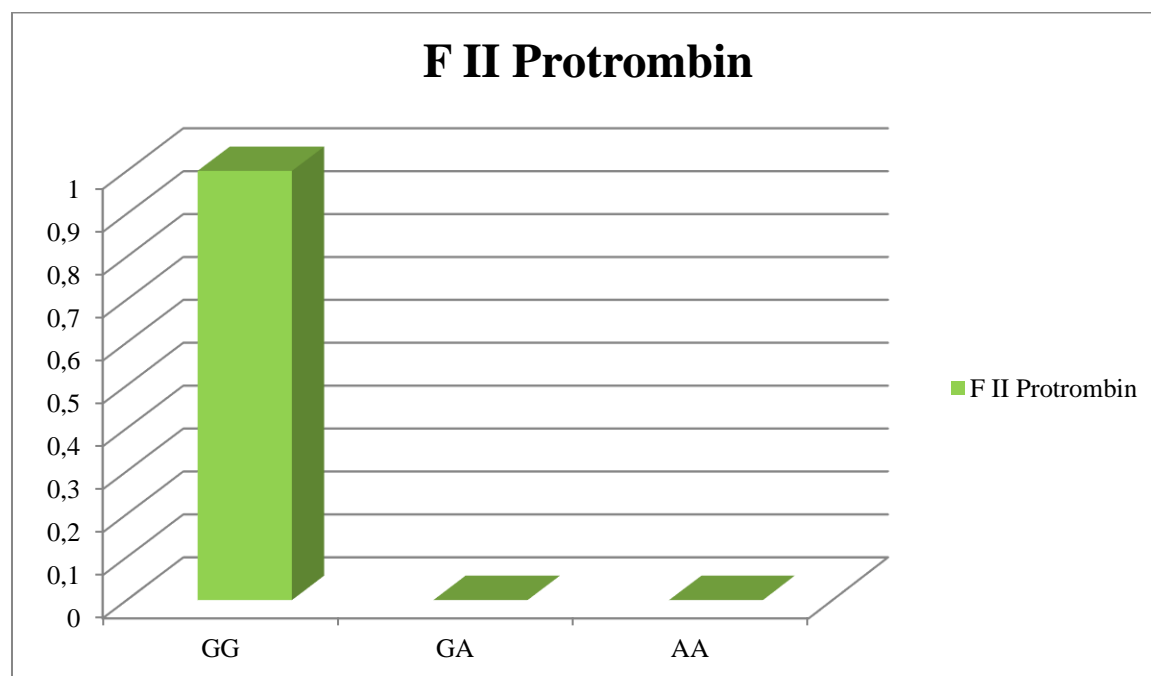
Protrombin

Substituční bodová mutace v genu pro protrombin vzniká náhradou guaninu za adenin v pozici 20210. Tabulka 12 zaznamenává počet osob s daným genotypem. Genotyp GG je považován za wild type. (tab. 12) Heterozygotní a homozygotní varianta genotypu nebyla v souboru detekována.

Tabulka 12: Počet osob s jednotlivými genotypy FII Protrombin

FII Protrombin (G20210A)			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
GG	GA	AA	
57	0	0	57

V grafu 3 je vypočítána hodnota genotypové frekvence FII protrombin, která je pro hodnocený soubor, rovna 1. (obr. 9) V hodnoceném souboru nebyla detekována mutantní alela v žádné variantě. Dle Penky (2011) se jedná o druhý nejčastější genetický faktor, který je spojen s žilní trombózou. Pro potvrzení tohoto tvrzení by bylo zapotřebí rozšíření studovaného souboru pacientů.



Obrázek 9: Graf genotypové frekvence FII Protrombin

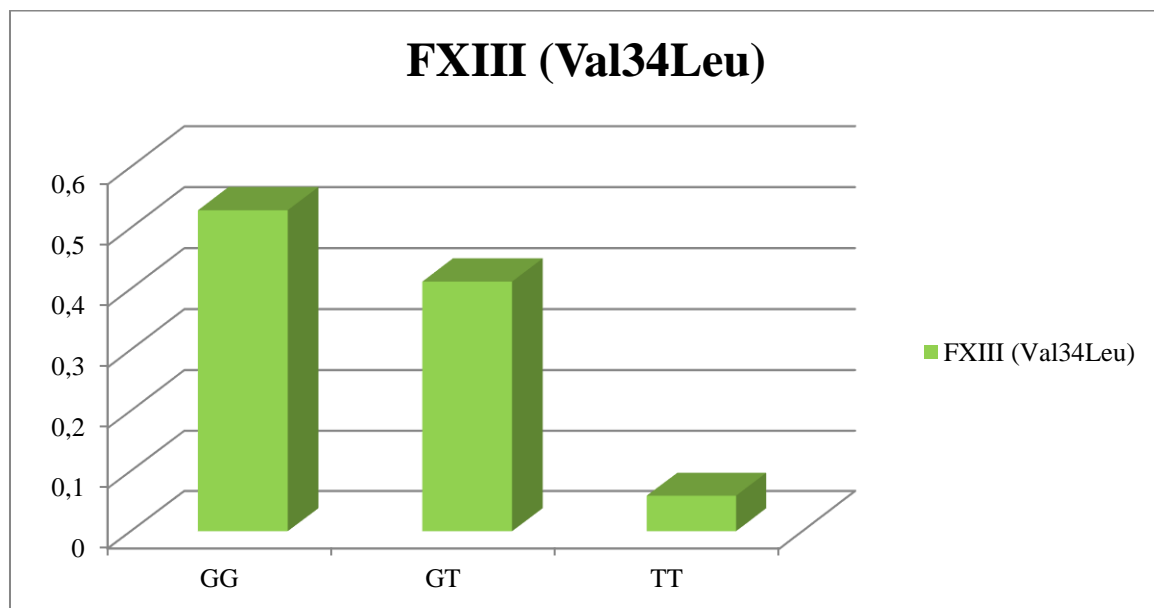
FXIII

Záměna aminokyseliny valinu za leucin v genu pro FXIII je způsobená substitucí (G→T) na 163. pozici v polynukleotidovém řetězci. Tabulka 13 obsahuje počet osob s daným genotypem FXIII Val34Leu. (tab. 13) Alela G je považována za wild type, jelikož odpovídá původní aminokyselině valinu a alela T představuje substitucí vyměněný leucin. Tento polymorfismus nebylo možné detekovat u sedmi experimentů, což je nejvíce ze všech testovaných mutací.

Tabulka 13: Počet osob s jednotlivými genotypy FXIII

FXIII (Val34Leu)			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
GG	GT	TT	
27	21	3	51

Graf obsahuje vypočítané hodnoty genotypové frekvence, které jsou pro wild type (GG) 0,529, pro heterozygotní variantu 0,412 a mutantní variantu 0,059. (obr. 10) Výskyt aminokyseliny leucinu má za následek mírný protektivní účinek proti IM. (Shafey, 2007; Chen, 2014) V souboru testovaných pacientů mělo genotyp GT, tedy aminokyseliny valin/leucin 41 % pacientů a wild type genotyp GG 53 % pacientů. Nejméně častý byl výskyt genotypu TT, který se v souboru objevil u 6 % pacientů



Obrázek 10: Graf genotypové frekvence FXIII

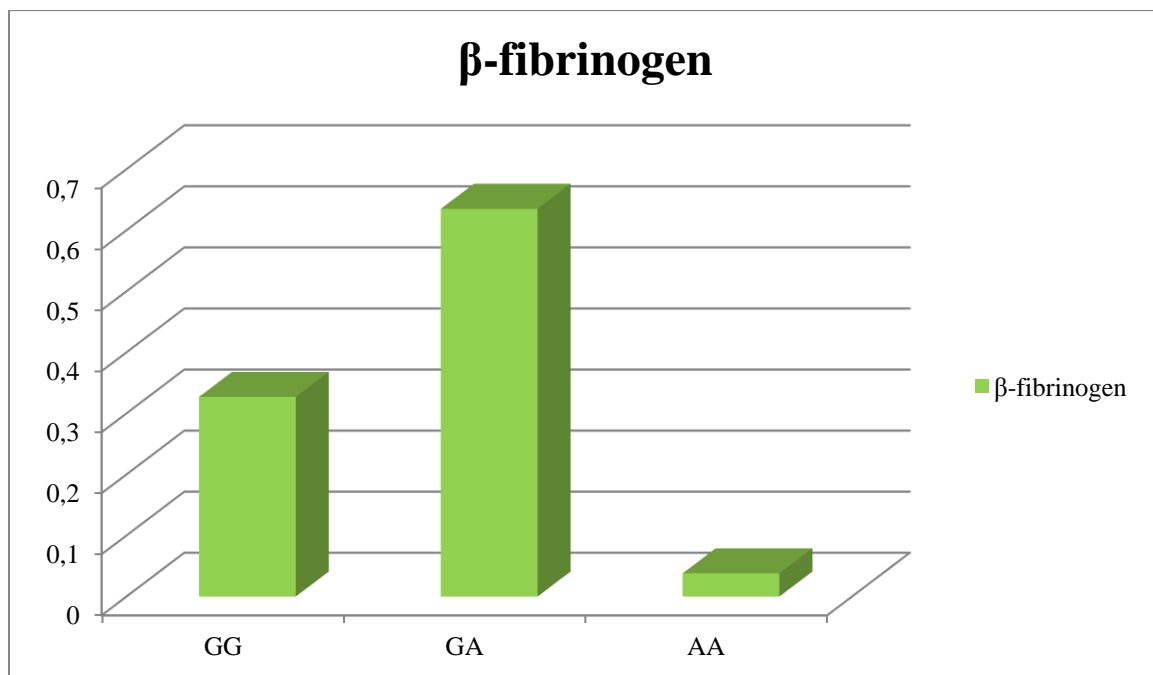
β-fibrinogen

Polymorfismus v promotoru genu pro β-fibrinogen je způsoben substitucí (G→A) v pozici -455. Tabulka zaznamenává počet osob s jednotlivými genotypy β-fibrinogenu, přičemž genotyp GG je wild type a genotyp AA je považován za mutantní. (tab. 14) U 6 experimentů nebylo možné polymorfismus detekovat.

Tabulka 14: Počet osob s jednotlivými genotypy β-fibrinogen

β-Fibrinogen (-455 G>A)			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
GG	GA	AA	
17	33	2	52

Graf znázorňuje genotypové frekvence β-fibrinogenu, jejichž hodnoty byly vypočítány pro wild type (GG) 0,327, heterozygotní variantu 0,635 a mutantní variantu 0,038. (obr. 11) Alela A je spojena se zvýšenou hladinou fibrinogenu v plazmě, a proto je považována za rizikový faktor pro rozvoj KVO. Ve studovaném souboru pacientů byla nejvíce zastoupena heterozygotní varianta, která tvořila 63 % z celkového počtu souboru. Homozygotní varianty GG a AA představují 33 % a 4 % ze studovaného souboru. Heterozygotní variantu polymorfismu β-fibrinogenu -455 G>A můžeme zařadit mezi nejvíce se vyskytující rizikové faktory pro kardiovaskulární onemocnění ve studovaném souboru.



Obrázek 11: Graf genotypové frekvence β-fibrinogen

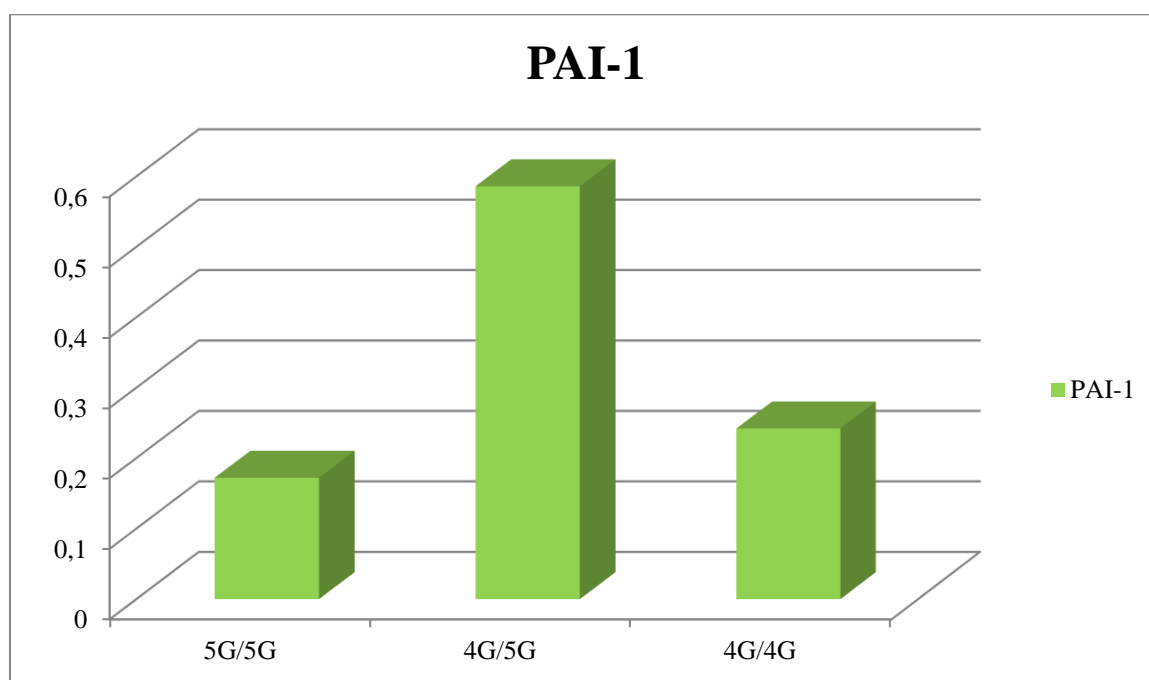
Inhibitor aktivátoru plazmogenu-1 (PAI-1)

Polymorfismus 4G/5G se týká promotoru genu PAI-1, kde je v pozici -675 bp delece guaninu označována jako alela 4G, oproti standardní alele 5G, která je tvořena sekvencí pěti za sebou jdoucích guaninů. Tabulka udává počet osob s jednotlivými genotypy PAI-1. (tab. 15)

Tabulka 15: Počet osob s jednotlivými genotypy PAI-1

PAI-1 (4G/5G)			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
5G/5G	5G/4G	4G/4G	
10	34	14	58

V grafu jsou uvedeny hodnoty genotypové frekvence pro polymorfismus PAI-1 4G/5G. (obr. 12) Pro wild type genotyp (5G/5G) je genotypová frekvence 0,172, pro heterozygotní variantu hodnota 0,586 a pro mutovanou variantu 0,242. Ve studovaném souboru byla nejčetnější heterozygotní varianta (4G/5G), která tvořila 59 % souboru. Nejmenší četnost měl wild type genotyp (5G/5G), který představoval 17 % souboru. Mutovaná varianta tvořila 24 % studovaného souboru. Homozygotní varianta 4G/4G způsobuje o 25 % zvýšenou koncentraci PAI-1 v plazmě, oproti homozygotní variantě 5G/5G, a proto je spojena s možným rizikem vzniku KVO. Heterozygotní varianta genotypu 4G/5G představuje úroveň mezi nimi.



Obrázek 12: Graf genotypové frekvence PAI-1

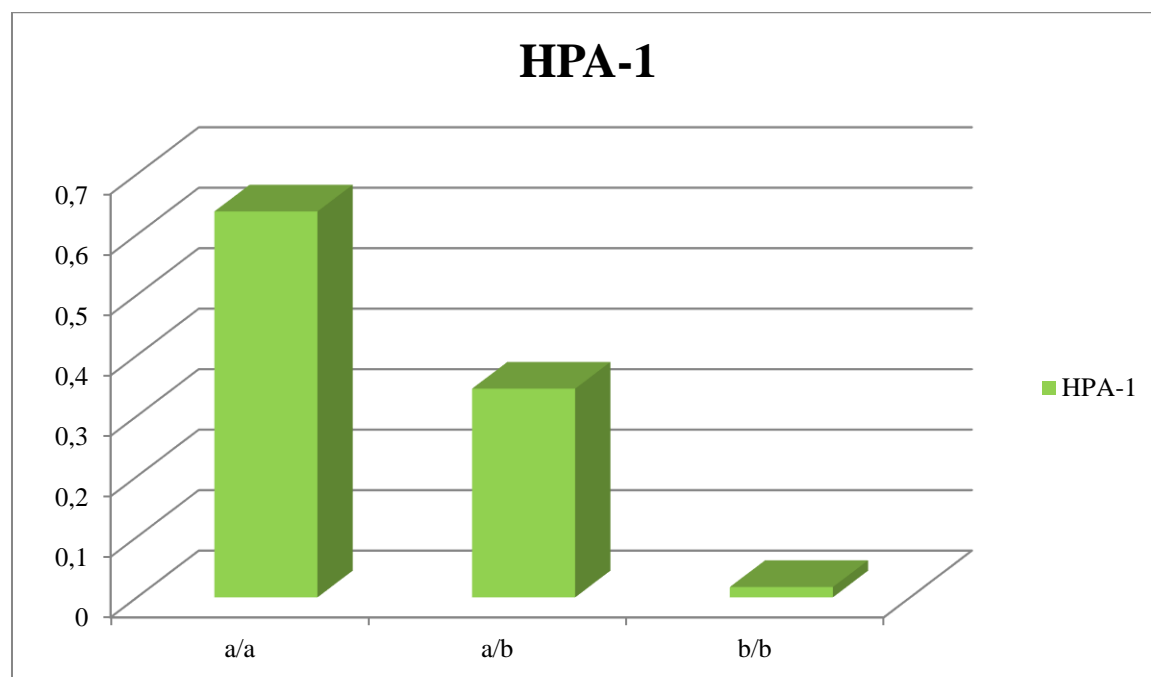
Antigeny krevních destiček (HPA-1)

Polymorfismus HPA-1 je tvořen dvěma alelami. Alela HPA-1a obsahuje v pozici 33 β 2 podjednotky aIIb3 integrinu GP IIIa leucin, kdežto alela HPA-1b je v této pozici charakterizována substitucí leucinu za prolin. Tabulka obsahuje počet osob s daným genotypem. (tab. 16)

Tabulka 16: Počet osob s jednotlivými genotypy HPA-1

HPA-1 (a/b)			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
a/a	a/b	b/b	
37	20	1	58

Graf znázorňuje hodnoty genotypových frekvencí polymorfismu HPA-1, které jsou pro wild type (a/a) 0,638, pro heterozygotní variantu (a/b) 0,345 a pro mutovanou variantu 0,017. (obr. 13) Nejčastější v studovaném souboru je wild type, který zastupuje 64 % souboru. Oproti tomu mutovaná varianta je zastoupena pouze 2 %. Heterozygotní varianta je tvořena 34 %.



Obrázek 13: Graf genotypové frekvence HPA-1

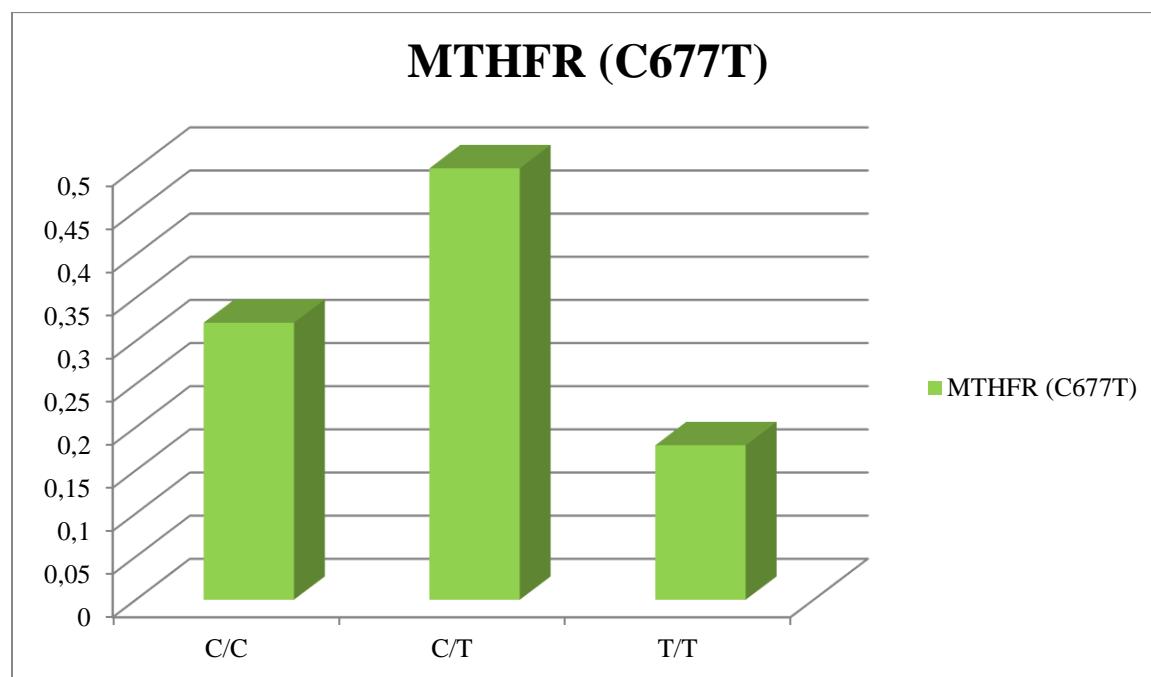
MTHFR (C677T)

Polymorfismus MTHFR C677T je charakterizován výměnou cytosinu za thymin v pozici 677 v genu pro MTHFR. Tím dochází k substituci alaninu za valin, vzniká termolabilní varianta MTHFR s defektem remetylce a může docházet ke zvýšení koncentrace homocysteinu. Alela C je považována za wild type, kdežto alela T za mutovanou. V tabulce jsou znázorněny počty osob s jednotlivými genotypy MTHFR C677T. (tab. 17) U 2 experimentů nebylo možné odečíst výsledek.

Tabulka 17: Počet osob s jednotlivými genotypy MTHFR C677T

MTHFR (C677T)			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
CC	CT	TT	
18	28	10	56

V grafu jsou vypočítány hodnoty genotypové frekvence. (obr. 14) Pro wild type (C/C) je to hodnota 0,321, pro heterozygotní variantu (C/T) 0,500 a mutovanou variantu (T/T) 0,179. V bělošské populaci je uváděna frekvence výskytu heterozygotní varianty (C/T) v rozmezí 30 – 55 %. Výskyt mutované varianty je v rozmezí 4 – 25 %. Ve studovaném souboru tvoří heterozygotní varianta genotypu 50 % a variantní genotyp 18 %. Popsaná frekvence výskytu tedy koreluje s našimi výsledky.



Obrázek 14: Graf genotypové frekvence MTHFR C677T

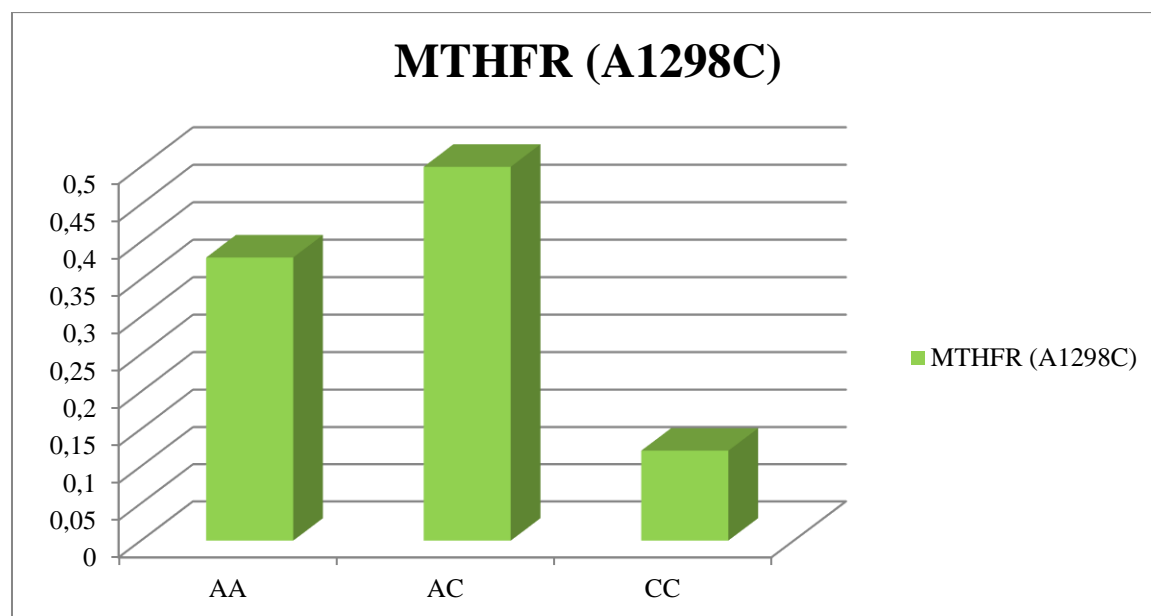
MTHFR (A1298C)

Další polymorfismus v genu pro MTHFR vzniká substitucí adeninu za cytosin v pozici 1298 nukleotidového řetězce, čímž dochází k záměně glutamátu za alanin. Tento polymorfismus, stejně jako polymorfismus MTHFR C677T, redukuje aktivitu enzymu MTHFR. Tabulka obsahuje počet osob s daným genotypem. (tab.18)

Tabulka 18: Počet osob s jednotlivými genotypy MTHFR A1298C

MTHFR (A1298C)			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
AA	AC	CC	
22	29	7	58

V grafu jsou zaznamenány hodnoty genotypových frekvencí MTHFR (A1298C). (obr. 15) Pro wild type genotyp (A/A) je to hodnota 0,379, pro heterozygotní variantu (A/C) 0,500 a pro mutovanou variantu 0,121. V bělošské populaci je uváděna frekvence výskytu heterozygotní varianty (A/C) v rozmezí 4 – 25 %. Výskyt mutované varianty je v rozmezí 10 – 12 %. Ve studovaném souboru jsme detekovali 50 % pacientů s heterozygotní variantou genotypu, což je 1x více než jaká je uváděná frekvence výskytu v bělošské populaci. Pro potvrzení či vyvrácení uváděné frekvence výskytu by bylo zapotřebí rozšířit studovaný soubor. Variantní genotyp jsme detekovali u 12 % pacientů souboru.



Obrázek 15: Graf genotypové frekvence MTHFR A1298C

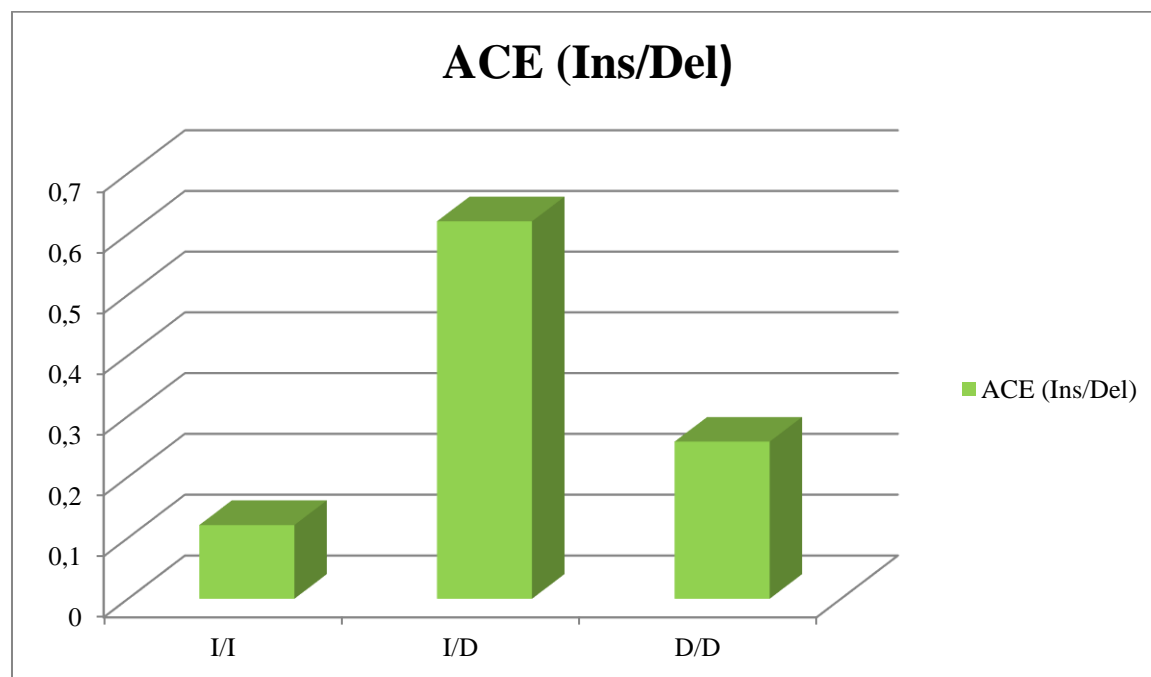
Angiotenzin konvertující enzym (ACE)

Polymorfismus ACE I/D je charakterizován inzercí (I) nebo delecí (D) 287-bp Alu repetitivní sekvence. V tabulce jsou uvedeny počty osob s jednotlivými genotypy. (tab. 19) Alela D inzerčně/delečního ACE polymorfismu je spojena s vyšší koncentrací ACE v plazmě a tím je zvýšeno riziko infarktu myokardu.

Tabulka 19: Počet osob s jednotlivými genotypy ACE (Ins/Del)

ACE (Ins/Del)			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
I/I	I/D	D/D	
7	36	15	58

Graf obsahuje genotypové frekvence ACE (I/D), jejichž hodnoty pro wild type (I/I) jsou 0,121, pro heterozygotní variantu (I/D) 0,621 a pro mutovanou variantu (D/D) 0,258. (obr. 16) Genotyp D/D způsobuje dvakrát vyšší koncentraci ACE v plazmě než je tomu u genotypu I/I. Ve studovaném souboru se nejčastěji vyskytuje genotyp I/D, který tvoří 62 % souboru. Mutovaná varianta D/D tvoří 26 % souboru pacientů a wild type I/I se vyskytuje pouze u 12 % souboru pacientů.



Obrázek 16: Graf genotypové frekvence ACE (Ins/Del)

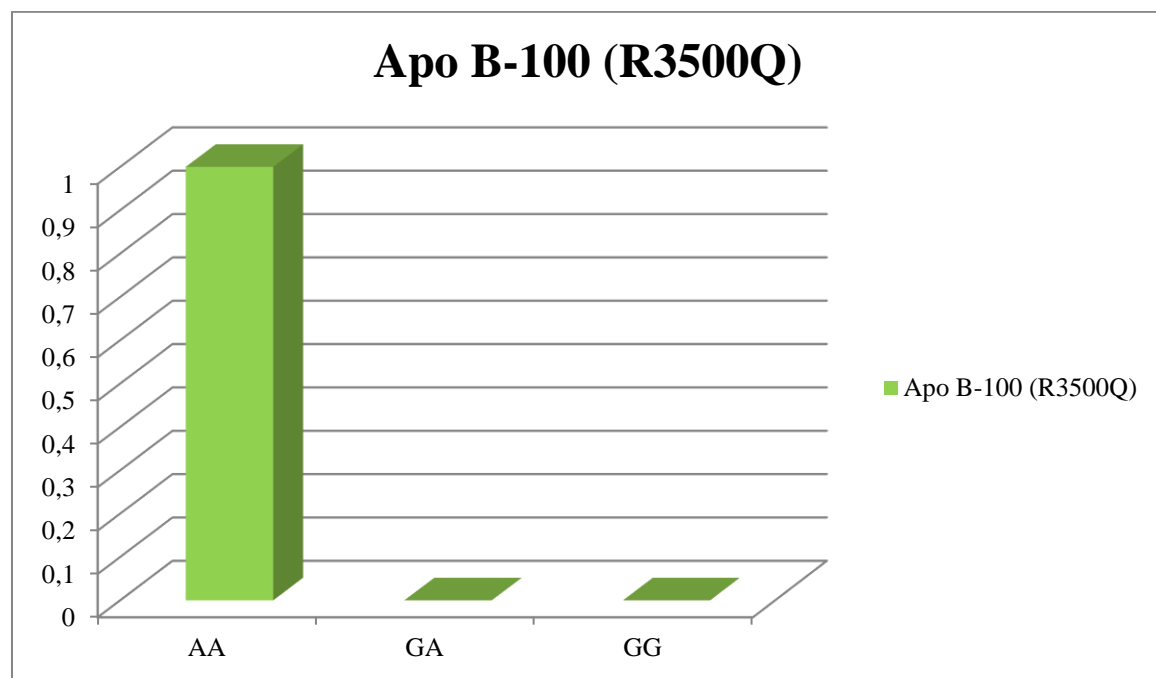
Apolipoprotein B-100 (R3500Q)

Polymorfismus Apo B-100 vzniká substitucí argininu za glutamin v kodonu 3500, čímž dochází ke snížení vaznosti Apo B-100 na LDL receptor. Tabulka ukazuje počet osob s jednotlivými genotypy Apo B-100, kde alela A je wild type a alela G mutovaná. (tab. 20)

Tabulka 20: Počet osob s jednotlivými genotypy Apo B-100 (R3500Q)

Apo B-100 (R3500Q)			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
AA	GA	GG	
54	0	0	54

Graf zobrazuje výpočet genotypových frekvencí Apo B-100 (R3500Q). (obr. 17) V studovaném souboru byl detekován pouze wild type genotyp (A/A), a proto je hodnota genotypové frekvence 1.



Obrázek 17: Graf genotypové frekvence Apo B-100 (R3500Q)

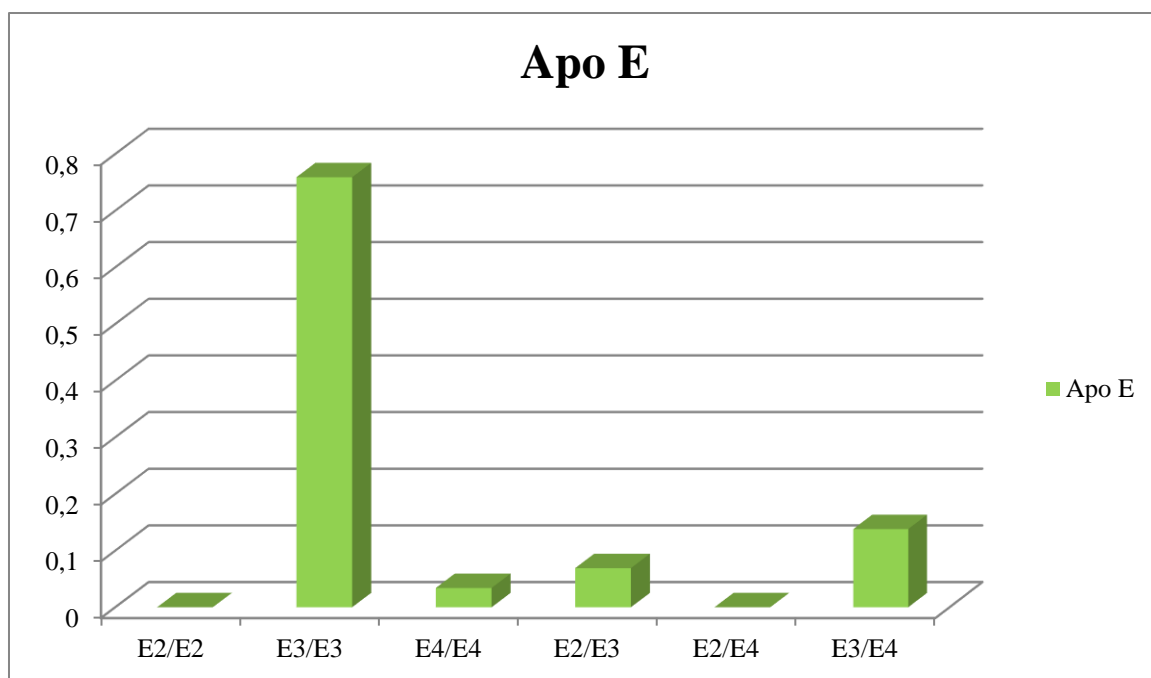
Apolipoprotein E

U Apo E jsou známy 3 izoformy, které se liší přítomností aminokyseliny cysteinu nebo argininu v polohách 112 a 158. Isoforma Apo E2 má aminokyselinu cystein v obou polohách, izoforma E3 má v poloze 112 cystein a v poloze 158 arginin a izoforma E4 má přítomný arginin v obou polohách. Proto můžeme detekovat 6 různých genotypů: E2/E2; E3/E3; E4/E4; E2/E3; E2,E4; E3/E4. (tab. 21)

Tabulka 21: Počet osob s jednotlivými genotypy Apo E

Apo E			
Počet osob s daným genotypem			Celkem
E2/E2	E2/E3	E2/E4	
0	4	0	
E3/E3	E3/E4	E4/E4	
44	8	2	58

Graf obsahuje vypočítané genotypové frekvence Apo E. (obr. 18) Za wild type je považován genotyp E3/E3 a jeho hodnota genotypové frekvence je 0,759. Ostatní hodnoty genotypových frekvencí jsou pro E4/E4 0,034, E2/E3 0,069 a E3/E4 0,138. Nejčetnější v běžné populaci je alela E3, kterou v četnosti následuje alela E2. Nejméně četná je alela E4. V testovaném souboru se nejvíce vyskytoval genotyp E3/E3 - 76 %. To odpovídá tvrzení, že alela E3 je v běžné populaci nejčetnější. Druhým nejčetnějším genotypem je E3/E4 - 14 %. Následují genotypy E3/E2 - 7 % a E4/E4 - 3 %. Genotypy E4/E2 a E2/E2 v testovaném souboru nebyly zjištěny.



Obrázek 18: Graf genotypové frekvence Apo E

8 Diskuze

Genetický screening nejčastějších genů, které působí predispozičně pro trombofilii (faktor V a protrombin), se stává nezbytným v klinické praxi. Ovšem rozšířenější genetický panel umožňující detekci širšího spektra mutací nebo polymorfismů, které mají určitý vliv na rozvoj KVO, je lepší variantou, jak předejít či oddálit vznik KVO. Dále je zde uveden výběr nejčastějších mutací, které souvisejí s KVO, ale příliš často se nevyšetřují.

Mutace F XIII má jistý protektivní účinek před IM. Polymorfismus Val34Leu snižuje stabilitu krevní sraženiny modifikací struktury zesítěného fibrinu, což způsobuje spontánní krvácení a právě toto může být považováno za protektivní před trombofilními stavy. (Mahfouz et al., 2008) Heterozygotní variantu genotypu s protektivní alelou T mělo ve studovaném souboru 41 % pacientů. Můžeme tedy usuzovat, že se jedná o poměrně častý genotyp, který působí protektivně proti KVO.

β -fibrinogen je další protein, který má vliv na trombotické příhody, kde nejběžnější mutace (-455 G>A) je spojena se zvýšeným rizikem žilní tromboembolie. (Shammaa et al., 2008a) Mutovaná či heterozygotní varianta genotypu β -fibrinogenu je spojována se zvýšenou hladinou fibrinogenu, což je považováno za rizikový faktor pro rozvoj KVO. (Behague, 1996; De Maat et al., 1998) V testovaném souboru byla heterozygotní varianta genotypu nejčastější (63 %), a proto by tento polymorfismus neměl být opomíjen při zjišťování predispozic ke KVO.

Další polymorfismus PAI – 1 (4G/5G) také přispívá k výskytu trombotických příhod a to zvýšením hladiny PAI – 1, což má za následek nadměrné hromadění fibrinu. (Shamma et al., 2008b) Údaje z testovaného souboru ukázaly, že mutovaná alela 4G se vyskytuje velmi často. Heterozygotní varianta genotypu (4G/5G) byla detekována u 59 % pacientů a mutovaná varianta (4G/4G) u 24 % pacientů. Z toho lze usuzovat, že se jedná o druhý nejfrekventovanější rizikový faktor pro KVO.

Další důležitý polymorfismus detekovaný pomocí CVD Strip Assay je inzerčně/deleční ACE polymorfismus, jehož mutovaná alela D má vliv na zvýšení koncentrace ACE v plazmě a tím je spojena se zvýšením rizikem IM. (Chen, 2013) Aktivita ACE se liší v závislosti na genotypu, přičemž genotyp D/D je spojen s nejvyšší aktivitou a genotyp I/I s nejnižší. (Sabbagh et al., 2007b) Sabbagh et al. (2007b) tvrdí, že genotyp D/D zvyšuje riziko žilní trombózy přibližně 11x. V testovaném souboru byl mutovaný genotyp zjištěn u 26 % pacientů

a heterozygotní genotyp u 62 % pacientů. Obě varianty byly čtenější než wild type (12 %). Jedná se o nejčastější rizikový faktor v studovaném souboru.

Apo E je protein, který plní důležitou úlohu při metabolismu cholesterolu a triglyceridů. (Žák et al., 2011) Přítomnost určité izoformy Apo E (E2, E3 nebo E4) může buď působit protektivně proti KVO (izoforma E2) nebo naopak zvýšit riziko KVO (izoforma E4) (Lehtinen et al., 1995; Mendes-Lana et al., 2007) V testovaném souboru byl nejčastější wild type genotyp E3/E3 (76 %). Překvapením bylo, že druhým nejčastějším genotypem byl E3/E4 (14 %), i přes tvrzení Gerdes et al. (1992) a Burman et al. (2009), že druhá nejčastější alela je E2. Genotyp E3/E2 byl u 7 % pacientů a genotyp E2/E2 nebyl vůbec detekován. Přičemž genotyp E4/E4 byl zjištěn u 3 % pacientů. Ovšem výsledky četnosti alel mohou být zkreslené nízkým počtem testovaných pacientů.

Zavedení rozšířeného panelu kardiovaskulárních onemocnění do rutinních, molekulárně-diagnostických testů může být přínosné pro detekci pacientů s genetickou predispozicí pro KVO.

Kvalita DNA nebyla u všech případů zcela optimální a tím mohla být ztížena následná amplifikace v průběhu multiplex PCR, jelikož PCR produkt nevyšel dle očekávání. U 19 % vzorů nedošlo k nahybridizování DNA u určitých polymorfismů zřejmě z důvodu nekompletní amplifikace všech požadovaných PCR produktů a tudíž bylo nemožné odečíst výsledek. Nejčastěji se jednalo o F XIII, β -fibrinogen a Apo B. I přes tyto komplikace ale považuji metodu (pomocí certifikovaného kitu CVD Strip Assay) reverzní hybridizace na stripech za velmi výhodnou, jelikož umožňuje paralelní detekci všech 12 mutací či polymorfismů najednou. Úspora času je nedocenitelná, když uvážíme, že by bylo nutné pro každou detekovanou mutaci provést vlastní PCR reakci. Kromě času je výhodou i finanční úspora a nenáročnost metody na technické vybavení laboratoře.

9 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo sepsání odborné rešerše na téma možnosti genetického testování mutací a polymorfismů v souvislosti s kardiovaskulárním onemocněním. Praktická část byla zaměřena na osvojení vybraných molekulárně – genetických metod potřebných k detekci těchto mutací.

V teoretické části jsem se zabývala problematikou kardiovaskulárních onemocnění a jejich genetických predispozic, tedy popsání mutací a polymorfismů, které s KVO souvisí. Dále jsem se zaměřila na zpracování vybraných molekulárních metod, které jsou vhodné pro detekci těchto mutací.

V praktické části bylo cílem osvojení metody reverzní hybridizace na stripech, izolace DNA, příprava elektroforetické separace pro kontrolu PCR produktů. Nakonec jsem zhodnotila výsledky reverzní hybridizace na stripech.

10 Seznam použité literatury

- 1) ABOUD, N., L. GHAZOUANI, S. SAIDI, S. BEN-HADJ-KHALIFA, F. ADDAD, W. Y. ALMAWI a T. MAHJOUB, 2010. Association of PAI-1 4G/5G and -844G/A Gene Polymorphisms and Changes in PAI-1/Tissue Plasminogen Activator Levels in Myocardial Infarction: A Case–Control Study. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* [online]. **14**(1), 23-27 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1089/gtmb.2009.0039.
- 2) ANDERSON, J. L., J. B. MUHLESTEIN, J. HABASHI, J. F. CARLQUIST, T. L. BAIR, S. P. ELMER a B. P. DAVIS, 1999. Lack of association of a common polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene with coronary artery disease and myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. **34**(6), 1778-1783 [cit. 2016-12-30]. ISSN 07351097.
- 3) BLOEMENKAMP, K. W. M., F. M. HELMERHORST, F. R. ROSENDAAL, J. P. VANDENBROUCKE a H. R. BÜLLER, 1995. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *The Lancet* [online]. **346**(8990), 1593-1596 [cit. 2017-01-01]. ISSN 01406736.
- 4) BOZOK ÇETINTAŞ, V. a C. GÜNDÜZ, 2014. Association between polymorphism of MTHFR c.677CT and risk of cardiovascular disease in Turkish population: a meta-analysis for 2.780 cases and 3.022 controls. *Molecular Biology Reports* [online]. **41**(1), 397-409 [cit. 2016-12-26]. ISSN 03014851.
- 5) BRDIČKA, R. a W. DIDDEN, 2015. *Genetika v klinické praxi*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-106-3.
- 6) BURMAN, D., A. MENTE, R. A. HEGELE, S. ISLAM, S. YUSUF a S. S. ANAND, 2009. Relationship of the ApoE polymorphism to plasma lipid traits among South Asians, Chinese, and Europeans living in Canada. *Atherosclerosis* [online]. **203**(1), 192-200 [cit. 2016-12-31]. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.007. ISSN 00219150.

- 7) CAO, Y., J. XU, Z. ZHANG, et al., 2013. Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: A meta-analysis. *Gene* [online]. **514**(2), 105-111 [cit. 2017-04-03]. ISSN 03781119.
- 8) CARTER, A. M., N. OSSEI-GERNING a P. J. GRANT, 1996. Platelet glycoprotein IIIa PIA polymorphism in young men with myocardial infarction. *The Lancet* [online]. **348**(9025), 485-486 [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)64592-8. ISSN 01406736.
- 9) CASTOLDI, E. a J. ROSING, 2004. Factor V Leiden: a disorder of factor V anticoagulant function. *Current Opinion in Hematology* [online]. **11**(3), 176-181 [cit. 2017-04-25]. ISSN 1531-7048.
- 10) CORRAL, J., R. GONZÁLEZ-CONEJERO, J. RIVERA, J. A. INIESTA, M. L. LOZANO a V. VICENTE, 1997. HPA-1 genotype in arterial thrombosis--role of HPA-1b polymorphism in platelet function. *Blood Coagul Fibrinolysis* [online]. **8**(5), 284-90 [cit. 2017-03-10]. ISSN 1473-5733.
- 11) CRAINICH, P., N. S. JENNY, Z. TANG, A. M. ARNOLD, L. H. KULLER, T. MANOLIO, A. R. SHARRETT a R. P. TRACY, 2003. Lack of association of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism with cardiovascular disease in the elderly. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. **1**(8), 1799-1804 [cit. 2016-12-30]. ISSN 15387933.
- 12) ČEŠKA, R., 1994. *Cholesterol a ateroskleróza: Léčba hyperlipidémií*. Praha: Alberta. ISBN 8085792044.
- 13) ČEŠKA, R., 2015. *Familiární hypercholesterolemie*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-843-6.
- 14) DAHLBACK, B., M. CARLSSON a P. J. SVENSSON, 1993. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein

- C. Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **90**(3), 1004-1008 [cit. 2017-01-01]. ISSN 00278424.
- 15) DAVIGNON, J., R. E. GREGG a C. F. SING, 1988. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **8**(1), 1-21 [cit. 2016-12-29]. DOI: 10.1161/01.ATV.8.1.1. ISSN 10795642.
- 16) DAWSON, S., A. HAMSTEN, B. WIMAN, A. HENNEY a S. HUMPHRIES, 1991. Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **11**(1), 183-190 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1161/01.ATV.11.1.183. ISSN 10795642.
- 17) DE MAAT, M. P. M., J. J. P. KASTELEIN, J. W. JUKEMA, A. H. ZWINDERMAN, H. JANSEN, B. GROENEMEIER, A. V. G. BRUSCHKE a C. KLUFT, 1998. -455G/A Polymorphism of the α -Fibrinogen Gene is Associated With the Progression of Coronary Atherosclerosis in Symptomatic Men: Proposed Role for an Acute-Phase Reaction Pattern of Fibrinogen. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **18**(2), 265-271 [cit. 2016-12-28]. ISSN 10795642.
- 18) DUVAL, C., M. ALI, W. W. CHAUDHRY, V. C. RIDGER, R. A. S. ARIËNS a H. PHILIPPOU, 2016. Factor XIII A-Subunit V34L Variant Affects Thrombus Cross-Linking in a Murine Model of Thrombosis Significance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **36**(2), 308-316 [cit. 2016-12-30]. ISSN 1079-5642.
- 19) ERBEN, K., 2015. *Homocystein, civilizační choroby a biochemické zdraví*. Praha: Bondy. ISBN 978-809-0586-673.
- 20) ERIKSSON, P., B. KALLIN, F. M. VAN 'T HOOFT, P. BÅVENHOLM a A. HAMSTEN, 1995. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *PNAS* [online]. **92**(6), 1851–1855 [cit. 2016-12-30]. ISSN 1091-6490.

- 21) ERNST, E. a K. L. RESCH, 1993. Fibrinogen as a Cardiovascular Risk Factor: A Meta-Analysis and Review of the Literature. *Annals of Internal Medicine* [online]. **118**(12), 956-963 [cit. 2016-12-28]. ISSN 00034819.
- 22) FOLSOM, A. R., M. CUSHMAN, M. Y. TSAI, et al., 2002. A prospective study of venous thromboembolism in relation to factor V Leiden and related factors. *Blood* [online]. **99**(8), 2720-2725 [cit. 2017-04-25]. ISSN 00064971.
- 23) FOWKES, F. G. R., F. B. SMITH, P. T. DONNAN, J. M. CONNOR, J. WOOD a G. D. O. LOWE, 1992. Fibrinogen genotype and risk of peripheral atherosclerosis. *The Lancet* [online]. **339**(8795), 693-696 [cit. 2016-12-28]. DOI: 10.1016/0140-6736(92)90596-U. ISSN 01406736.
- 24) FROSST, P., H. J. BLOM, R. MILOS, et al., 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* [online]. **10**(1), 111-113 [cit. 2016-12-27]. ISSN 10614036.
- 25) GERDES, L. U., I. Ch. KLAUSEN, I. SIHM, O. FAERGEMAN a G. P. VOGLER, 1992. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genetic Epidemiology* [online]. **9**(3), 155-167 [cit. 2016-12-31]. ISSN 07410395.
- 26) GOHIL, R., G. PECK a P. SHARMA, 2009. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving ~120,000 cases and 180,000 controls. *Thrombosis and Haemostasis* [online]. **102**(2), 360-370 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1160/TH09-01-0013. ISSN 03406245.
- 27) HOOPER, W. C., A. DILLEY, M. J. A. RIBEIRO, et al., 1996. A racial difference in the prevalence of the Arg506-Gln mutation. *Thrombosis Research* [online]. **81**(5), 577-581 [cit. 2017-01-01]. ISSN 00493848.
- 28) CHEN, F., Q. QIAO, P. XU, B. FAN a Z. CHEN, 2014. Effect of Factor XIII-A Val34Leu Polymorphism on Myocardial Infarction Risk: A Meta-Analysis. *Clinical*

- and Applied Thrombosis/Hemostasis* [online]. **20**(8), 783-792 [cit. 2017-04-22]. ISSN 10760296.
- 29) CHEN, Y., S. DONG, M. HE, T. QI a W. ZHU, 2013. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and risk of myocardial infarction in an updated meta-analysis based on 34993 participants. *Gene* [online]. **522**(2), 196-205 [cit. 2017-01-03]. ISSN 03781119.
- 30) HUNG, D. W., J. E. HARRIS a E. W. DAVIE, 1990. Nucleotide Sequences of the Three Genes Coding for Human Fibrinogen. *Nucleotide Sequences of the Three Genes Coding for Human Fibrinogen* [online]. Boston, MA: Springer US, s. 39-48 [cit. 2017-04-22]. ISBN 978-1-4615-3806-6.
- 31) JABOR, A., 2008. *Vnitřní prostředí*. Praha: Grada. ISBN 978-802-4712-215.
- 32) KOLÁŘ, J., 2009. *Kardiologie pro sestry intenzivní péče*. 4., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-604-5.
- 33) KOSINOVÁ, E., 2007. *Expresí strukturálních proteinů živočišných virů v eukaryotních systémech*. Brno. Disertační práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Miroslav Němec, CSc.
- 34) KŘEMEN, J., P. POHLREICH a J. STRÍBRNÁ. 1998. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Praha: Karolinum. ISBN 80-718-4504-3.
- 35) KUNICKI, T. J. a P. J. NEWMAN, 1992. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood* [online]. **80**(6), 1386-1404 [cit. 2017-03-10]. ISSN 1528-0020.
- 36) LECLERC, D., S. SIBANI a R. ROZEN, 2000. *Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/polymorphisms*. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. ISBN 1-58707-217-8.

- 37) LEHTINEN, S., T. LEHTIMÄKI, T. SISTO, et al., 1995. Apolipoprotein E polymorphism, serum lipids, myocardial infarction and severity of angiographically verified coronary artery disease in men and women. *Atherosclerosis* [online]. **114**(1), 83-91 [cit. 2016-12-29]. ISSN 00219150.
- 38) LUNGHI, B., L. IACOVIELLO, D. GEMMATI, et al., 1996. Detection of new polymorphic markers in the factor V gene: association with factor V levels in plasma. *Thromb Haemost.* [online]. **75**(1), 45-48 [cit. 2017-04-25]. ISSN 1538-7836.
- 39) MAHFOUZ, R. A. R., A. S. SABBAGH, D. M. R. SHAMMAA, Z. K. OTROCK, G. S. ZAATARI a A.T. TAHER, 2008. Factor XIII gene V34L mutation in the Lebanese population: Another unique feature in this community? *Molecular Biology Reports* [online]. **35**(3), 375-378 [cit. 2017-04-27]. ISSN 03014851.
- 40) MANDOVEC, A., 2008. *Kardiovaskulární choroby u žen*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2807-0.
- 41) MARGAGLIONE, M., G. CAPPUCCI, D. COLAIZZO, N. GIULIANI, G. VECCHIONE, E. GRANDONE, O. PENNELLI a G. DI MINNO, 1998. The PAI-1 Gene Locus 4G/5G Polymorphism Is Associated With a Family History of Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **18**(2), 152-156 [cit. 2016-12-30]. ISSN 10795642.
- 42) MARSHALL, William J., ed., 2014. *Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. ISBN 978-0-7020-5140-1.
- 43) MATÝŠKOVÁ, M. a Z. ČECH. 2009. Warfarin a farmakogenetika. *Klin. Biochem. Metab.* 17(38): 215-219.
- 44) MENDES-LANA, A., G.G. PENA, S.N. FREITAS, A.A. LIMA, R.L.C. NICOLATO, R.M. NASCIMENTO-NETO, G.L.L. MACHADO-COELHO a R.N. FREITAS, 2007. Apolipoprotein E polymorphism in Brazilian dyslipidemic individuals: Ouro Preto study. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. **40**(1), 49-56 [cit. 2016-12-29]. ISSN 16784510.

- 45) MICHELSON, A. D., ed., 2013. *Platelets*. 3rd ed. London: Elsevier. ISBN 978-012-3878-373.
- 46) MOSHFEGH, K., W. A. WUILLEMIN, M. REDONDO, B. LÄMMLE, J. H. BEER, S. LIECHTI-GALLATI a B. J. MEYER, 1999. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *The Lancet* [online]. **353**(9150), 351-354 [cit. 2017-03-10]. ISSN 01406736.
- 47) MUSIL, Dalibor, 2009. Hluboká žilní trombóza - minimum pro praktické lékaře. *Medicína pro praxi*. **6**(5), 231-234. ISSN 1803-5310.
- 48) MUSZBEK, L., V. C. YEE a Z. HEVESSY, 1999. Blood Coagulation Factor XIII. *Thrombosis Research* [online]. **94**(5), 271-305 [cit. 2016-12-30]. ISSN 00493848.
- 49) NEWMAN, P. J., R. S. DERBES a R. H. ASTER, 1989. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **83**(5), 1778-1781 [cit. 2017-03-10]. ISSN 0021-9738.
- 50) PARKER, S., 2007. *Lidské tělo*. Praha: Euromedia Group - Knižní klub. ISBN 978-80-242-2211-0.
- 51) PENKA, M. a E. SLAVÍČKOVÁ, 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.
- 52) PHILLIPS, D. R., I. F. CHARO a R. M. SCARBOROUGH, 1991. GPIIb-IIIa: The responsive integrin. *Cell* [online]. **65**(3), 359-362 [cit. 2017-03-10]. ISSN 00928674.
- 53) POORT, S. R., F. R. ROSENDAAL, P. H. REITSMA a R. M. BERTINA, 1996. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is

associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* [online]. **88**(10), 3698-3703 [cit. 2017-01-02]. ISSN 1528-0020.

- 54) RAUCH, U., J. I. OSENDE, V. FUSTER, J. J. BADIMON, Z. FAYAD a J. H. CHESEBRO, 2001. Thrombus Formation on Atherosclerotic Plaques: Pathogenesis and Clinical Consequences. *Annals of Internal Medicine* [online]. **134**(3), 224-238 [cit. 2017-03-09]. ISSN 00034819.
- 55) RIGAT, B., C. HUBERT, F. ALHENC-GELAS, F. CAMBIEN, P. CORVOL a F. SOUBRIER, 1990. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **86**(4), 1343-1346 [cit. 2017-01-02]. ISSN 00219738.
- 56) RODRÍGUEZ-GUILLÉN, M. R., L. TORRES-SÁNCHEZ, J. CHEN, et al., 2009. Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion. *Salud Pública de México* [online]. **51**(1), - [cit. 2017-04-03]. ISSN 00363634.
- 57) ROSENDAAL, F. R., C. J. M. DOGGEN, A. ZIVELIN, et al., 1998. Geographic Distribution of the 20210 G to A Prothrombin Variant. *Thrombosis and Haemostasis* [online]. **79**(4), 706-708 [cit. 2017-01-02]. ISSN 1538-7836.
- 58) ROSENDAAL, F. R., T. KOSTER, J. P. VANDENBROUCKE a P. H. REITSMA, 1995. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* [online]. **85**(6), 1504-1508 [cit. 2017-01-01]. ISSN 1528-0020.
- 59) RUGGERI, Z. M., 2002. Platelets in atherothrombosis. *Nature Medicine* [online]. **8**(11), 1227-1234 [cit. 2017-03-09]. ISSN 10788956.
- 60) SABBAGH, A. S., Z. K. OTROCK, Z. R. MAHFOUD, G. S. ZAATARI a R. A. R. MAHFOUZ, 2007. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and allele frequencies in the lebanese population: prevalence and review of the

- literature. *Molecular Biology Reports* [online]. **34**(1), 47-52 [cit. 2017-04-27]. ISSN 03014851.
- 61) SHAFEY, M., J. L. ANDERSON, D. SCARVELIS, S. P. DOUCETTE, F. GAGNON a P. S. WELLS, 2007. Factor XIII Val34Leu variant and the risk of myocardial infarction. A meta-analysis. *Thrombosis and Haemostasis* [online]. **97**(4), - [cit. 2016-12-31]. ISSN 03406245.
- 62) SHAMMAA, D. M. R., A. S. SABBAGH, A. T. TAHER, G.S. ZAATARI a R. A. R. MAHFOUZ, 2008. Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G alleles frequency distribution in the Lebanese population. *Molecular Biology Reports* [online]. **35**(3), 453-457 [cit. 2017-04-27]. ISSN 03014851.
- 63) SHAMMAA, D. M. R., A. S. SABBAGH, A. T. TAHER, G. S. ZAATARI a R. A. R. MAHFOUZ, 2008. Frequency distribution of the G/A alleles of the β -fibrinogen gene in the Lebanese population. *Molecular Biology Reports* [online]. **35**(3), 307-311 [cit. 2017-04-27]. ISSN 03014851.
- 64) SNUSTAD, D. P. a M. J. SIMMONS. 2009. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2.
- 65) SORIA, L. F., E. H. LUDWIG, H. R. CLARKE, G. L. VEGA, S. M. GRUNDY a B. J. MCCARTHY, 1989. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *PNAS* [online]. **86**(2), 587-591 [cit. 2017-04-23]. ISSN 1091-6490.
- 66) SRŠEŇ, Š. a K. SRŠŇOVÁ. 2005. *Základy klinické genetiky a jej molekulárna podstata*. 4., přeprac. a rozš. vyd. Martin: Osveta. ISBN 9788080631857.
- 67) STRŽÍTESKÝ, J., 2001. *Patologie: [učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium]*. Olomouc: Epava. ISBN 80-862-9706-3.
- 68) ŠMARDA, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 8021038411.

- 69) ŠTEJFA, M., 2007. *Kardiologie*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1385-4.
- 70) VAN COTT, E. M., B. KHOR a J. L. ZEHNDER, 2016. Factor V Leiden. *American Journal of Hematology* [online]. **91**(1), 46-49 [cit. 2016-12-23]. ISSN 03618609.
- 71) VAN DER PUT, N. M. J., F. GABREËLS, E. M. B. STEVENS, J. A. M. SMEITINK, F. J. M. TRIJBELS, T. K. A. B. ESKES, L. P. VAN DEN HEUVEL a H. J. BLOM, 1998. A Second Common Mutation in the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? *The American Journal of Human Genetics* [online]. **62**(5), 1044-1051 [cit. 2016-12-27]. ISSN 00029297.
- 72) VÍTOVEC, J. a J. ŠPINAR. 2004. *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění*. Vyd. 2., přeprac. a dopl. Praha: Grada. ISBN 80-247-0866-3.
- 73) VOORBERG, J., J. ROELSE, K. MERTENS, J.A. VAN MOURIK, R. KOOPMAN, H. BÜLLER, F. BERENDS a J.W. TEN CATE, 1994. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *The Lancet* [online]. **343**(8912), 1535-1536 [cit. 2017-01-01]. ISSN 01406736.
- 74) WANG, G., Z. ZOU, X. JI, Q. NI a Z. MA, 2014. Factor XIII-A Val34Leu polymorphism might be associated with myocardial infarction risk: an updated meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* [online]. **7**(12), 5547-5552 [cit. 2016-12-31]. ISSN 19405901.
- 75) WEISGRABER, K. H., 1994. Apolipoprotein E: Structure-Function Relationships. *Advances in Protein Chemistry* [online]. 45. **45**, 249-302 [cit. 2017-01-03]. ISSN 0065-3233.
- 76) WEISS, E. J., P. F. BRAY, M. TAYBACK, et al., 1996. A Polymorphism of a Platelet Glycoprotein Receptor as an Inherited Risk Factor for Coronary Thrombosis. *New England Journal of Medicine* [online]. **334**(17), 1090-1094 [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.1056/NEJM199604253341703. ISSN 00284793.

- 77) WILSON, P. W. F., R. H. MYERS, M. G. LARSON, J. M. ORDOVAS, P. A. WOLF a E. J. SCHAEFER, 1994. Apolipoprotein E Alleles, Dyslipidemia, and Coronary Heart Disease. *JAMA* [online]. **272**(21), 1666-71 [cit. 2017-04-03]. ISSN 00987484.
- 78) YANG, B., S. FAN, X. ZHI, et al., 2014. Associations of MTHFR Gene Polymorphisms with Hypertension and Hypertension in Pregnancy: A Meta-Analysis from 114 Studies with 15411 Cases and 21970 Controls. *PLoS ONE* [online]. **9**(2), 87497 [cit. 2017-04-03]. ISSN 19326203.
- 79) ZENDE, P. D., M. P. BANKAR, P. S. KAMBLE a A. A. MOMIN, 2013. Apolipoprotein E Gene Polymorphism And Its Effect On Plasma Lipids In Arteriosclerosis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* [online]. **7**(10), 2149–2152 [cit. 2016-12-29]. ISSN 2249782x.
- 80) ZIMA, T., P. POHLREICH a J. STRÍBRNÁ. 2002. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén. ISBN 9788074920622.
- 81) ZIMRIN, A. B., S. GIDWITZ, S. LORD, E. SCHWARTZ, S. J. BENNETT, G. C. WHITE, 2ND a M. PONCZ, 1990. The genomic organization of platelet glycoprotein IIIa. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **265**(15), 8590-8595 [cit. 2017-03-10]. ISSN 1083-351X.
- 82) ŽÁK, A. a J. MACÁŠEK. 2011. *Ateroskleróza: nové pohledy*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3052-3.

11 Přílohy

Tabulka 4: Koncentrace DNA pacientů studovaného souboru

číslo vzorku	koncentrace ng/μl
1	70,2
2	50,8
3	22,2
4	11
5	42,6
6	21,2
7	34,6
8	20,6
9	34
10	44
11	23,6
12	94,4
13	71,2
14	16,6
15	60,4
16	38,6
17	8,52
18	23,9
19	>600
20	>600
21	>600
22	49,9
23	>600
24	49,2
25	>600
26	49,3
27	18,7
28	42,9
29	28
30	17,6
31	33,9
32	46,6
33	48,8
34	17,6
35	19,7
36	32,3
37	48,8

číslo vzorku	koncentrace ng/μl
38	19,4
39	32,7
40	33,4
41	13,1
42	54
43	15,5
44	38,5
45	52
46	43,6
47	34,3
48	44,7
49	17,6
50	80,2
51	29,1
52	19,4
53	19,7
54	33,8
55	15,5
56	29,1
57	13,1
58	45,8

12 Seznam zkratek

ACE	angiotenzin konvertující enzym
APC	aktivovaný protein C
Apo B-100	apolipoprotein B-100
Apo B-48	apolipoprotein B-48
Apo E	apolipoprotein E
AS-PCR	alelově specifická polymerázová řetězová reakce
CT	capture buffer
EKG	elektrokardiogram
FDB	familiární defekt Apo B-100
FH	familiární hypercholesterolémie
FV	faktor V
FXIII	faktor XIII
GP	glykoprotein
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HPA-1	antigeny krevních destiček
IDL	lipoproteiny o střední hustotě
ICHS	ischemická choroba srdeční
IM	infarkt myokardu
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LIČ	laboratorní identifikační číslo
LS	lysis buffer
MTHFR	metylentetrahydrofolát reduktáza
NAP	nestabilní angina pectoris
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazmogenu – 1
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR-RFLP	polymerázová řetězová reakce – polymorfismus délky restrikčních fragmentů

PK	proteinase K
RAS	system renin-angiotenzin-aldosteron
TE	re-hydration buffer
VLDL	lipoproteiny o velmi nizke hustote