



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Optimalizace metody PCR pro vyšetření polymorfismu  
v genu PAI-1**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Daniela Spěváková

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

České Budějovice 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Optimalizace metody PCR pro vyšetření polymorfismu v genu PAI-1 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 3.5.2019

.....

*Podpis*

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. nejen za odborné vedení práce, ale i za cenné rady a čas věnovaný praktické části práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

# Optimalizace metody PCR pro vyšetření polymorfismu v genu PAI-1

## Abstrakt

Inhibitor aktivátoru plazminogenu-1 (PAI-1) je důležitým biomarkerem fibrinolýzy. Tento glykoprotein působí jako hlavní inhibitor aktivátorů plazminogenu a jeho vysoká hladina v plazmě je asociována s různými typy onemocnění, například kardiovaskulárními chorobami či maligními nádory. *PAI-1* gen je lokalizován na chromozomu 7 v oblasti 7q22.1. V promotoru genu byl v roce 1993 objeven polymorfismus 4G/5G. Alela 4G zvyšuje expresi genu *PAI-1* a to vede k vyšší plazmatické hladině tohoto inhibitoru. Právě proto se tento polymorfismus stal předmětem mnoha studií.

Hlavním cílem mé bakalářské práce byla optimalizace metody ARMS-PCR pro vyšetření polymorfismu 4G/5G v genu *PAI-1*. Dalšími cíli bylo sepsání odborné rešerše na dané téma a osvojení postupů používaných v genetické laboratoři (izolace DNA, měření koncentrace DNA, Real-time PCR).

V teoretické části popisují *PAI-1* gen a jeho produkt. Zabývám se především rolí tohoto inhibitoru v mechanismu fibrinolýzy a jeho vlivem na různá onemocnění. Dále jsem uvedla přehled metodických přístupů, používaných pro genetickou analýzu polymorfismu 4G/5G v genu *PAI-1*.

V rámci praktické části jsou uvedeny postupy optimalizace metody ARMS-PCR a vlastní výsledky udávající frekvenci genotypů vyšetřovaného souboru získané metodou Real-time PCR, kdy byl použit komerční kit. Optimalizace metody ARMS-PCR nebyla úspěšná.

## Klíčová slova

inhibitor aktivátoru plazminogenu-1; trombofilní mutace; fibrinolýza; PCR; kardiovaskulární onemocnění; polymorfismus; optimalizace

# **The PCR method optimization for analysis of the gene PAI-1 polymorphism**

## **Abstract**

The plasminogen activator inhibitor (PAI-1) is an important biomarker of fibrinolysis. This glycoprotein acts as a principal inhibitor of plasminogen activators and its high plasma level is associated with various types of diseases, such as cardiovascular diseases or malignant tumors. The PAI-1 gene is located on chromosome 7 in region 7q22.1. In 1993 4G/5G polymorphism was discovered in the gene promoter. The 4G allele increases PAI-1 gene expression which results in a higher plasma level of this inhibitor. That's why this polymorphism has become the subject of many studies.

The main aim of my bachelor thesis was to optimize the ARMS-PCR method for analysis of the gene PAI-1 4G/5G polymorphism. Other goals were to write a specialized research on this subject and to learn the techniques used in the genetic laboratory (DNA isolation, DNA concentration measurement, Real-time PCR).

In the theoretical part I describe the PAI-1 gene and its product. I deal mainly with the role of this inhibitor in the mechanism of fibrinolysis and its influence on various diseases. Furthermore, I showed an overview of methodological approaches used for genetic analysis of 4G/5G polymorphism in PAI-1 gene.

In the practical part there are presented procedures of optimization of the ARMS PCR method and the results of the genotypes of the examined group obtained by the Real-time PCR method, when a commercial kit was used. The optimization of the ARMS-PCR method was not successful.

## **Key words**

plasminogen activator inhibitor-1; thrombophilic mutation; fibrinolysis; PCR; cardiovascular diseases; polymorphism; optimization

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>10</b>
2.1	PAI-1 .....	10
2.1.1	Polymorfismus 4G/5G .....	11
2.1.2	Indikace k vyšetření .....	11
2.2	Plasminogen aktivátor systém a fibrinolýza .....	12
2.2.1	Složky PAS .....	13
2.2.2	Fibrinolýza .....	15
2.3	Trombofilie .....	16
2.3.1	Leidenská mutace .....	17
2.3.2	Mutace v genu pro protrombin G20210A.....	17
2.3.3	Polymorfismy genu pro methylenetetrahydrofolátreduktázu .....	18
2.3.4	Antitrombin.....	19
2.3.5	Protein C a S .....	20
2.4	PAI-1 a choroby .....	20
2.4.1	Obezita, inzulinová rezistence a kardiovaskulární onemocnění .....	20
2.4.2	Neplodnost .....	21
2.4.3	Rakovina .....	22
2.5	Laboratorní diagnostické metody detekce polymorfismu PAI-1 .....	23
2.5.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	23
2.5.2	Hybridizační metody.....	27
2.5.3	Sekvenování DNA .....	29
<b>3</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Praktická část .....</b>	<b>32</b>
4.1	Izolace DNA.....	32

4.1.1	Izolace DNA z bukálního stěru.....	32
4.1.2	Izolace DNA z plné krve .....	33
4.2	Měření koncentrace DNA .....	35
4.3	Vyšetření polymorfismu genu PAI-1 .....	36
4.3.1	Metoda Real-time PCR.....	36
4.3.2	Metoda ARMS-PCR.....	38
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>43</b>
5.1	Metoda Real-time PCR .....	43
5.2	Optimalizace metody ARMS-PCR .....	44
5.2.1	Optimalizační reakce č. 1.....	44
5.2.2	Optimalizační reakce č. 2.....	46
5.2.3	Optimalizační reakce č. 3.....	46
5.2.4	Optimalizační reakce č. 4.....	48
5.2.5	Optimalizační reakce č. 5.....	49
5.2.6	Optimalizační reakce č. 6.....	50
5.2.7	Optimalizační reakce č. 7.....	51
5.2.8	Optimalizační reakce č. 8.....	51
5.2.9	Optimalizační reakce č. 9.....	53
5.2.10	Optimalizační reakce č. 10.....	54
5.2.11	Optimalizační reakce č. 11.....	54
5.2.12	Optimalizační reakce č. 12.....	56
5.2.13	Optimalizační reakce č.13.....	58
5.2.14	Optimalizační reakce č. 14.....	59
5.2.15	Optimalizační reakce č. 15.....	60
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>67</b>

<b>9</b>	<b>Seznam obrázků a tabulek .....</b>	<b>77</b>
<b>10</b>	<b>Seznam zkratek .....</b>	<b>79</b>



# 1 Úvod

Inhibitor aktivátoru plazminogenu-1 (PAI-1) patří do skupiny inhibitorů sérinových proteáz a je důležitým biomarkerem v procesu fibrinolýzy. V promotoru genu *PAI-1*, který je lokalizován na chromozomu číslo 7, byl v roce 1993 poprvé detekován polymorfismus 4G/5G. Jedná se o delecii či inzerci jedné guaninové báze. Mutovaná alela 4G způsobuje zvýšení inhibitoru v plazmě o 25 % a tím zvyšuje riziko pro vznik trombózy. Je důležité mít na paměti, že tromboembolická nemoc není vyvolána pouze genetickou predispozicí, ale jedná se o kombinaci několika rizikových faktorů. Těmi může být těhotenství, obezita, hormonální léčba, věk a další.

Důvodem pro napsání bakalářské práce zabývající se genem *PAI-1* je především aktuálnost daného tématu. Kardiovaskulární onemocnění je nejčastější příčinou předčasného úmrtí v evropské populaci. Třebaže se v České republice jedná o klesající trend, prevalence mortality na kardiovaskulární onemocnění je u nás téměř třikrát vyšší než ve Francii, kde je tato prevalence nejnižší ze všech evropských států. Vyšetření trombofilních mutací by nemělo být opomíjeno před nasazením (dnes hojně a dlouhodobě užívané) hormonální antikoncepce, která je jedním z významných rizikových faktorů tromboembolického onemocnění. Popisována bývá také souvislost mezi PAI-1 a dalšími často se vyskytujícími chorobami jako je *diabetes mellitus*, rakovina a reprodukční problémy u žen. PAI-1 reprezentuje nadějný biologický marker, který má ambice stát se parametrem pro stanovení prognózy a monitorování léčby rakoviny a některých onemocněních spojovaných se stářím.

Jednotlivé genotypy *PAI-1* 4G/5G polymorfismu se určují na základě vyšetření patientské DNA pomocí genetických metod. Před zavedením metody do laboratoře je třeba metodu zoptimalizovat. Praktická část této práce obsahuje optimalizaci metody pro vyšetření polymorfismu v genu *PAI-1*. Cílem optimalizace je dosáhnout správných a zřetelných výsledků vyšetření, a to pomocí výběru a testování ideálních parametrů reakce – např. annealingová teplota, složení reakční směsi apod. Pro porovnání jsem provedla vyšetření polymorfismu v genu *PAI-1* také komerčním kitem GeneProof – PAI-1 Genotyping PCR (CE IVD), který pro stanovení genotypu využívá metodu Real-time PCR.

## 2 Teoretická část

V teoretické části se zabývám nejen popisem genu *PAI-1*, ale i samotným inhibitorem aktivátoru plazminogenu -1 a jeho biologickou funkcí v těle. V dalších kapitolách se věnuji i ostatním trombofilním mutacím a způsobům detekce polymorfismu 4G/5G v genu *PAI-1*.

### 2.1 *PAI-1*

Gen kódující inhibitor aktivátoru plasminogenu – 1, často nazýván také serpin E1 gen, nese informaci pro tvorbu stejnojmenného proteinu. Nachází se na dlouhém raménku (q) chromozomu 7–v oblasti 7q22.1. Velikost genu je přibližně 12 kb a skládá se z 8 intronů a 9 exonů. (Vaughan, 2005)

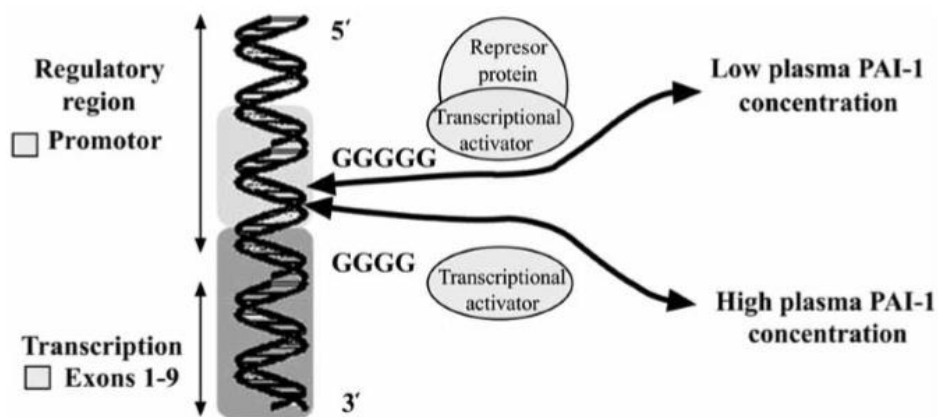
Produktem tohoto genu je jednořetězový glykoprotein, který se řadí mezi serinové proteázy. Tento protein s molekulární hmotností 48 kDa je složen z 379 aminokyselin. Jedná se o hlavní inhibitor aktivátorů plazminogenu – tPA (tkáňový aktivátor plazminogenu) a urokinázy – uPA. (Blasi a Carmeliet, 2002; Penka *et al.*, 2011)

PAI-1 protein je produkován buňkami endotelu, megakaryocyty, buňkami hladkého svalstva, fibroblasty, monocyty, tukovými buňkami, endometriem, peritoneem, jaterními buňkami, mezotelovými buňkami a srdečními myocyty. (Zorio *et al.*, 2008) Již vzniklý protein je uložen hlavně trombocytech. Odtud může být uvolňován do krevního řečiště nebo ukládán na subendoteliální matrix. V krvi se nachází v aktivní formě nebo častěji v neaktivní formě jako komplex s tPA či vitronectinem, který je schopen PAI-1 stabilizovat a případně aktivovat. (Cesari *et al.*, 2010) V plasmě je snadno detekovatelný, ale jeho hodnoty se mohou lišit na základě cirkadiálního rytmu. Ráno je koncentrace PAI-1 nejvyšší, zatímco odpoledne jeho hladina přirozeně klesá. (Vaughan, 2005)

Obecně se jedná o molekulu, která je dnes spojována s patogenezí a progresí rozličných trombotických vaskulárních příhod, ale i chorob metabolismu. Zvýšená hladina PAI-1 v plasmě je asociována s chorobami typickými pro protrombotické stavy jako je obezita, diabetes nebo hypertenze. Vůbec nejčastěji se o PAI-1 mluví jako o rizikovém faktoru pro aterosklerózu. (Grant, 2007; Cesari *et al.*, 2010)

### 2.1.1 Polymorfismus 4G/5G

V promotoru genu *PAI-1* se nachází polymorfismus 4G/5G, kdy se na pozici -675 bp vyskytuje jednonukleotidová delece guaninu. Mutovaná varianta tedy obsahuje pouze čtyři guaninové báze jdoucí za sebou v sekvenci místo pěti. 4G alela zvyšuje expresi genu *PAI-1*, což vede ke zvýšení hladiny PAI-1 v plazmě. (Penka *et al.*, 2011) Ve srovnání s homozygoty 5G/5G mají homozygoti 4G/4G zvýšenou koncentraci PAI-1 v plazmě o 25 %. (Eriksson *et al.*, 1995) Předpokládá se, že varianta 4G brání vazbě represoru, který u 5G inhibuje expresi genu – proto přepis genu může snáze probíhat, viz obr. 1. (Penka *et al.*, 2011)



Obrázek 1: PAI-1 4G/5G polymorfismus (Zorio *et al.*, 2008)

Tento polymorfismus byl poprvé detekován v roce 1993 Sallym J. Dawsonem *et al.*, kdy cílem jejich studie byl výzkum promotoru *PAI-1* genu. Studie naznačila, že tento polymorfismus má funkční význam v regulaci exprese *PAI-1* genu. Dále dali do souvislosti homozygoty 4G/4G s vyšší hladinou PAI-1 v plazmě a naznačili odlišnou reakci PAI-1 během akutní fáze. (Dawson *et al.*, 1993)

Kvasnička *et al.* stanovil prevalenci genotypů v souboru 1450 zdravých osob středního věku v regionu Praha a střední Čechy. Homozygotní varianta 4G/4G byla detekována u 30,69 % populace. Homozygoti 5G/5G tvořili menšinu – 18,97 %, zatímco heterozygoti 5G/4G většinu – 50,34 % ve sledované populaci. (Kvasnička *et al.*, 2012)

### 2.1.2 Indikace k vyšetření

Vyšetřování vrozených trombofilních dispozic je indikováno v případě přítomnosti minimálně dvou klinických kritérií. Některé zdroje toto vyšetření zpochybňují. (Matýšková *et al.*, 2009) Testování dědičných trombofilních polymorfismů totiž

nepřináší predikci další tromboembolie a také se zpochybňuje celková efektivita rutinního vyšetřování zejména z hlediska finančních nákladů. (Dalen, 2008)

Vyšetření je indikováno pouze v případech, kdy pacient (případný nositel mutace) bude z vyšetření profitovat – bude zajištěna lepší prevence v zátěžových situacích (př. těhotenství), při zvažování užívání hormonální antikoncepce či substituční hormonální léčby a zároveň u jedinců mladších 45 let (ve vyšším věku je profylaxe běžně podávána). Vyšetření vrozené trombofilie se tedy provádí u osob do 45 let věku v případech, kdy se jedná o idiopatickou trombózu, recidivující stavy, arteriální i žilní trombózu bez jiné choroby v anamnéze. (Matýšková *et al.*, 2009) Gravidní ženy se vyšetřují v případech s pozitivní osobní nebo rodinou anamnézou, nebo pokud se vyskytnou komplikace v graviditě – při těžkých formách preeklampsie, retardaci plodu anebo abrupci placenty. Vyšetření se také provádí u žen po 3 potratech v prvním trimestru těhotenství nebo po každé ztrátě plodu po prvním trimestru těhotenství. (Kvasnička, 2010)

Vyšetření se neprovádí u bezpříznakových rodinných příslušníků vyššího věku, u zdravých jedinců do 15 let (pouze v rizikových situacích). U trombóz vzniklých během nádorového onemocnění, autoimunitního onemocnění a ve vysokém věku se vyšetření ukazuje jako zbytečné. (Matýšková *et al.*, 2009)

Dle prof. Kvasničky má zásadní klinický význam pouze určení Leidenské mutace a mutace v genu pro protrombin. Vyšetření dalších trombofilních mutací jako je *PAI-1*, je indikováno ve vybraných případech pouze trombotickými centry nebo Ústavem hematologie a krevní transfuze v Praze. (Kvasnička, 2010)

## **2.2 Plasminogen aktivátor systém a fibrinolýza**

PAI-1 protein hraje důležitou roli v Plasminogen aktivátorovém systému (PAS), který kontroluje přeměnu inaktivního enzymu plasminogenu (PLG) na aktivní plasmin. Právě tento enzym je hlavním enzymem fibrinolýzy a způsobuje degradaci fibrinu na jeho produkty. (Halámková *et al.*, 2001; Fay *et al.*, 2007) Kromě fibrinolýzy je PAS důležitou součástí dalších fyziologických procesů jako je koagulace, zánět, hojení ran a výskyt malignity. (Cesari *et al.*, 2010)

Aktivace PLG probíhá třemi různými způsoby:

- Vnitřní aktivační systém – skládá se z faktoru XII, faktoru XI, prekallikreinu, kininogenu.
- Vnější aktivační systém – hlavními aktivátory jsou tPA a uPA.
- Exogenní aktivační systém – aktivátory jsou trombotické léky či některé bakteriální proteiny (streptokináza, stafylokináza) (Brummel-Ziedins *et al.*, 2009).

### **2.2.1 Složky PAS**

Správná přeměna PLG na plasmin je zajišťována díky souhře složek celého systému. Funkce jednotlivých složek je uvedena níže.

#### **2.2.1.1 Tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA)**

tPA se řadí mezi serinové proteázy, které vytváří endoteliální buňky. (Zorio *et al.*, 2008) Právě tento aktivátor (společně s uPA) je hlavním aktivátorem plasminogenu u savců. (Fay *et al.*, 2007) Do krve je tento aktivátor uvolňován jako jednořetězcový prekurzor, jehož přeměnu na aktivní dvouřezecovou formu zajišťuje plasmin a to štěpením peptidové vazby. (Zorio *et al.*, 2008)

#### **2.2.1.2 Urokináza (uPA)**

Tato serinová proteáza je především součástí proteolýzy. (Zorio *et al.*, 2008) uPA se váže na specifický buněčný receptor (u-PAR), čímž dochází k aktivaci signální transdukce, která vede ke stimulaci buněčné proliferace, modulace adheze a zvýšené buněčné migraci. Na rozdíl od tPA, který má zásadní význam pro fibrinolýzu, je tento aktivátor důležitý během degradace tkání při fyziologických a patologických procesech. (Duffy, 2004) Protein uPA se syntetizuje jako jednořetězcový polypeptid zvaný pro-urokináza (pro-uPA). (Zorio, *at al.*, 2008) Proenzym pro-uPA může být aktivován na uPA pomocí plazminu, ale i dalšími proteázami se specifitou podobnou trypsinu. Mezi plazminem (aktivovaným plasminogenem) a pro-uPA tedy dochází k mechanismu pozitivní zpětné reakce. Tato vzájemná proenzymová aktivace je důležitou součástí aktivačního systému PLG. (Behrendt *et al.*, 2003)

#### **2.2.1.3 Plasminogen (PLG)**

Lidský PLG je polypeptid o velikosti 810 aminokyselin. Zralá forma tohoto proteinu obsahuje pouze 791 aminokyselin, což je výsledkem odštěpení 19 aminokyselin během

sekrece. Syntéza plasminogenu primárně probíhá v játrech. Plasminogen se může tvořit i v dalších tkáních – například v nadledvinkách, ledvinách, mozku, srdci, děloze, thymu a ve varlatech, střevě či slezině. (Castelino a Ploplis, 2003)

#### **2.2.1.4 Fibrinogen**

Fibrinogen je glykoprotein, který se za normálních okolností nachází v plazmě, a to v koncentraci odpovídající přibližně 2,5 g/l. Jedná se o rozpustnou makromolekulu, která se díky působení proteolytického serinového enzymu trombinu přemění na fibrin a vytvoří tak sraženinu či nerozpustný gel. Fibrinogen je důležitý při hemostáze (hraje významnou roli při agregaci krevních destiček), hojení ran, zánětu, angiogenezi a dalších biologických funkcích. (Weisel, 2005)

#### **2.2.1.5 Inhibitor aktivátoru plazminogenu-2**

Inhibitor aktivátoru plazminogenu-2 (PAI-2) se skládá z 393 aminokyselin a původně byl izolován z lidské placenty. (Ye *et al.*, 1987) PAI-2 gen je lokalizován na chromosomu 18q21 a obsahuje 5 exonů. (Ye *et al.*, 1989) PAI-2 inhibuje dvouřetězcové formy tPA a uPA, ale je méně účinný při inhibici jednořetězcové tPA. Významné hodnoty PAI-2 se nacházejí v plasmě pouze v době těhotenství. (Cesarman-Maus a Hajjar, 2005)

#### **2.2.1.6 Inhibitor aktivátoru plazminogenu-3**

Tento inhibitor, inhibitor aktivátoru plasminogenu-3 (PAI-3), je identický s inhibitorem proteinu C. (Halámková *et al.*, 2011) Jedná se o glykoprotein, patřící mezi serpiny, který je závislý na heparinu. Je syntetizován v játrech a některých dalších orgánech. Také může být nalezen v semenných a folikulárních tekutinách. PAI-3 inhibuje uPA, tPA, aktivovaný protein C, trombin, kallikrein a specifický antigen prostaty. Ačkoliv hladiny PAI-3 v plasmě jsou vyšší než PAI-1, fibrinolytická aktivita v plasmě je nižší. (Zorio *et al.*, 2008)

#### **2.2.1.7 $\alpha_2$ -plasmin inhibitor ( $\alpha_2$ -PI)**

$\alpha_2$ -PI, jednořetězcový glykoprotein, cirkuluje v plazmě ve vysoké koncentraci – 0,9 nmol/l. Skládá se z 452 aminokyselin s dvěma disulfidickými můstky. Gen se nachází na chromozomu 18q21-22 a je složen z 10 exonů. Promotorová oblast genu řídí tkáňově specifickou expresi v játrech. (Holmes *et al.*, 1987) Tento inhibitor je také složkou  $\alpha$ -granulí krevních destiček. Plasmin, uvolněný do krve nebo v blízkosti trombu bohatého na destičky, je působením  $\alpha_2$ -PI okamžitě neutralizován. (Cesarman-Maus a Hajjar, 2005)

### 2.2.2 Fibrinolýza

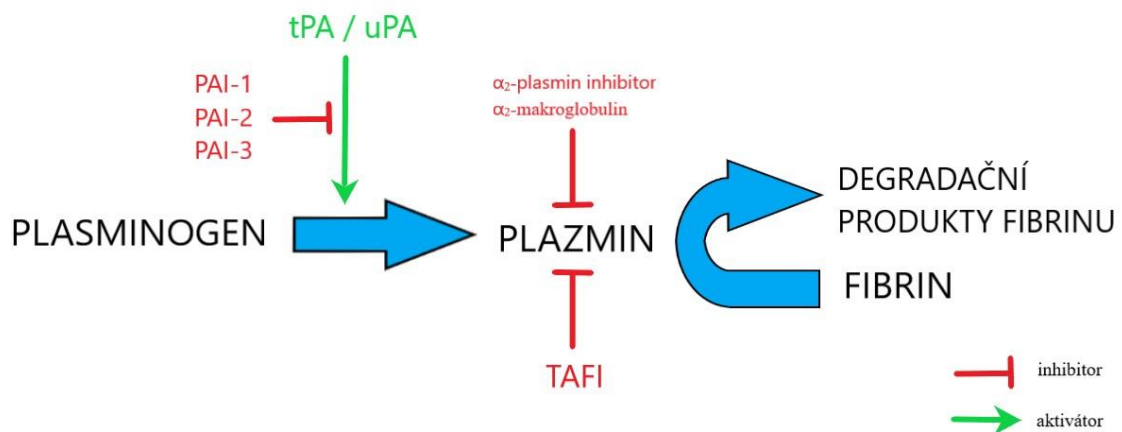
Fibrinolytický systém je důležitou součástí hemostázy. Jedná se o proces, při kterém dochází k degradaci fibrinu na jeho monomery. Reguluje tedy vznik fibrinových formací a jejich rozvolnění (pokud nejsou potřebné). (Čertík, 2003; Halámková *et al.*, 2011) Fibrinová síť je hlavní proteinovou složkou trombu. Fybrinolýza tak zabraňuje vytvoření příliš velkého trombu, který by mohl omezit průtok krve. (Cesarman-Maus a Hajjar, 2005) Hlavním enzymem fibrinolýzy je plazmin, jehož poločas rozpadu je cca 2 dny, ale může být i kratší vzhledem k aktivaci fibrinolytického systému. (Brummel-Ziedins *et al.*, 2009) Celý systém je regulován pomocí interakce aktivátorů a inhibitorů. (Čertík, 2003)

Plasminogen může být přeměněn na plazmin působením tPA, stejně tak jako působením uPA. (Cesarman-Maus a Hajjar, 2005) Tyto aktivátory štěpí specifickou peptidovou vazbu Arg-Val a tím dochází k aktivaci PLG. (Fay *et al.*, 2007) Vzniká tak plasmin, který je schopen štěpit tPA a uPA. Z těchto jednořetězcových aktivátorů plasminogenu tak vznikají dvouřetězcové polypeptidy, které jsou více aktivní. Fibrin reguluje vlastní rozklad vazbou PLG a tPA na svůj povrch, čímž lokalizuje a posiluje vznik plazminu. Afinita mezi tPA a PLG se výrazně zvyšuje v přítomnosti fibrinu, jinak je tPA pouze slabým aktivátorem plasminogenu. Katalytická účinnost aktivace PLG se tak s fibrinem zvyšuje minimálně o dva řády. (Cesarman-Maus a Hajjar, 2005)

Vzniklý plazmin štěpí fibrin, vytváří rozpustné degradační produkty a odhaluje tak karboxylové konce lysinu. Autonomní proteinové domény, zvané „kringles“, tPA (doména 2) a PLG (doména 1 a 4) obsahují místa vázající lysin. Tyto místa umožňují další vazbu na fibrin, což vede ke zvýšení tvorby plazminu a odstranění fibrinu. Vazba plazminu na fibrin může být blokována analogy lysinu – kyselinou aminokapronovou, kyselinou tranexamovou a trombinem aktivovaným inhibitorem fibrinolýzy (TAFI). (Cesarman-Maus a Hajjar, 2005)

TAFI je bazická karboxypeptidáza, která cirkuluje v plazmě jako proenzym a je aktivována trombinem proteolyticky. Tento inhibitor štěpí lysinové zbytky fibrinu. (Wang *et al.*, 1998) V důsledku toho inhibuje fibrinolýzu inhibicí vazby PLG na povrch částečně degradovaného fibrinu. Protože se TAFI aktivuje trombinem, představuje propojení mezi koagulací krve a fibrinolýzou. (Nesheim *et al.*, 1997)

Rozpouštění fibrinu je dále regulováno pomocí PAI-1 a inhibitory plazminu samotného – například  $\alpha_2$ -plasmin inhibitorem a  $\alpha_2$ -makroglobulinem. (Cesarman-Maus a Hajjar, 2005) PAI-1 inhibuje aktivaci plazminogenu vazbou na jeho aktivátory. Jedná se o neúčinnější inhibitor tPA i uPA. Tvorba komplexu uPA-PAI-1 urychluje odstraňování uPA jaterními nebo monocytoidními buňkami. Nadměrná exprese inhibitoru PAI-1 tak může ohrozit mechanismy odbourávání fibrinu a v samotném důsledku podporovat patologické ukládání fibrinu a trombotické příhody. (Zorio *et al.*, 2008)



Obrázek 2: Schéma fibrinolýzy (převzato a přepracováno dle Cesarman-Maus a Hajjar, 2005)

### 2.3 Trombofilie

Trombofilie je získaná či vrozená porucha homeostatického mechanismu, která je příčinou zvýšeného rizika vzniku trombóz. (Penka *et al.*, 2009) Jedná se o zvýšenou náchylnost ke tvorbě trombů (krevních sraženin) v žilách či arteriích. (Kvasnička, 2003a) Nejčastější a zároveň nejvýznamnějším projevem onemocnění je tromboembolismus, typický pro hlubokou žilní trombózou, jež může vést až k plicní embolii. (Kessler, 2006)

Ke klinické manifestaci trombózy je nezbytná přítomnost více rizikových faktorů současně, proto bývá v rodinách s vysokým výskytem tromboembolické nemoci (TEN) identifikováno několik vrozených i získaných faktorů. Mezi získané faktory patří věk nad 45 let, obezita, TEN v anamnéze, hormonální léčba, poranění, operace, těhotenství a šestinedělí, imobilizace, varixy a nádorová onemocnění. U trombóz tepen je rizikovým faktorem i kouření, hypertenze a poruchy lipidového metabolismu. (Penka *et al.*, 2009)

Mezi vrozené rizikové faktory asociované s trombofilii patří mutace FV Leiden, mutace protrombinového genu, polymorfismy genu *MTHFR*, mutace genu pro antitrombin,



mutace spojené s proteinem C a S a právě polymorfismus genu *PAI-1*, jemuž se věnuji v kapitole 2.1.1.

### **2.3.1 Leidenská mutace**

Mutace FV Leiden byla poprvé popsána v roce 1993 Dahlbäckem a kolektivem. Jedná se o vrozenou rezistenci faktoru V (FV) k aktivovanému proteinu C (APC-R) (Penka *et al.*, 2009) Gen pro hemokoagulační faktor V se nachází na chromozomu číslo 1 v oblasti 1q24.2. Příčinou rezistence je jednobodová mutace, kdy záměnou nukleotidu guaninu za adenin, dochází k substituci aminokyseliny argininu za glutamin v peptidickém řetězci. Protein C je potřebný pro degradaci nemutovaného faktoru V a VIII, proto tato mutace ovlivňuje hemokoagulaci – protein C ztrácí funkci přirozeného inhibitoru koagulační kaskády. (Widimský *et al.*, 2011)

Tato semidominantní dědičná mutace vznikla asi před 20-30 tisíci lety a je zodpovědná za 90-95 % případů APC-R. (Widimský *et al.*, 2011) Následně byly popsány další mutace zapříčiňující APC-R, například Cambridge a Hong Kong, ale jejich výskyt je minimální. Prevalence Leidenské mutace v Evropě a Severní Americe je 3–15 % u zdravé populace, u pacientů s trombofilií je to 20 – 60 %. Přítomnost mutace v heterozygotním stavu zvyšuje riziko TEN 5-10krát, u homozygotů se jedná až o 50-100krát zvýšené riziko. (Penka *et al.*, 2009) Ženy užívající hormonální antikoncepci mají zvýšené riziko až 35krát. K trombózám u heterozygotů dochází pouze v přítomnosti dalšího protrombotického rizika – např. imobilizace, těhotenství, obezita apod. Z literatury vyplývá, že Leidenská mutace se téměř nevyskytuje u africké a asijské populace. (Widimský *et al.*, 2011)

### **2.3.2 Mutace v genu pro protrombin G20210A**

Mutace v genu pro protrombin byla popsána koncem roku 1996. Vyskytuje se asi u 6,3 % nemocných s trombózou, u osob s rodinnou anamnézou dokonce v 18 % případů. Přítomnost této mutace zvyšuje riziko trombózy 2,8krát. (Penka *et al.*, 2009) Jedná se o jednobodovou mutaci v genu pro faktor II. Gen pro tento faktor se nachází na jedenáctém chromozomu v oblasti 11p11.2 a obsahuje 14 exonů. Na pozici 20210 dochází k záměně guaninu za adenin, což je příčinou zvýšení hladiny protrombinu v plazmě. (Penka *et al.*, 2011; Widimský *et al.*, 2011)

Tato autozomálně dominantně dědičná mutace se řadí mezi *gain-of-function* mutace (mutace zisku funkce). Důsledkem těchto mutací je zvýšená efektivita štěpení m-RNA, což vede k akumulaci m-RNA a její translaci do podoby koagulačního proteinu, čímž se zvyšuje produkce protrombinu. (Gehring *et al.*, 2001)

### **2.3.3 Polymorfismy genu pro methylenetetrahydrofolátreduktázu**

Methylenetetrahydrofolátreduktáza (MTHFR) je enzym poskytující metylové skupiny potřebné ke zpětné remetylaci homocysteinu na metionin – proto je velice důležitý v biochemickém cyklu homocysteinu. (Penka *et al.*, 2011) Remethylační dráha, která slouží k degradaci homocysteinu, se skládá ze dvou navzájem propojených cyklů – z methioninového a folátového cyklu. Druhým způsobem degradace homocysteinu je transsulfurace. (Erben, 2015)

Metylace DNA je epigenetický mechanismus regulující transkripci mnoha genů. Tento mechanismus zabraňuje vazbě transkripčního faktoru nebo naopak podněcuje vazbu proteinů vázající metylové skupiny, což způsobuje inhibici či zvýšenou expresi určitého genu. (dos Santos Nunes, *et al.*, 2017)

Homocystein je typický svou vysokou chemickou aktivitou, která může vygradovat až v toxicitu při jeho hromadění v krvi. Tato aminokyselina podporuje protrombotickou aktivitu ve stěně cév, což vede k ateroskleróze a trombóze. Na endoteliální buňky působí cytotoxicky, inhibuje buněčnou proliferaci a na endotelu inhibuje expresi trombomodulinu – tak snižuje aktivaci proteinu C. (Kvasnička *et al.*, 2003b)

V důsledku výskytu polymorfismů v genu pro *MTHFR* vzniká enzym, který se vyznačuje vyšší termolabilitou a sníženou aktivitou. Snížená aktivita enzymu má za důsledek nižší schopnost odbourávání homocysteinu na méně toxické metabolity a může způsobit zvýšení jeho koncentrace v krvi. Při hyperhomocysteinémii se také v plazmě objevuje zvýšená aktivita FV a FXII. (Kvasnička *et al.*, 2003b) Zvýšená hladina homocysteinu v plazmě může být způsobena i nedostatkem kyseliny listové – pokud není kyselina listová přítomna, přeměna homocysteinu na methionin nemůže řádně proběhnout. Tuto reakci ovlivňují další kofaktory enzymů pyridoxin a vitamín B12, bez kterých enzym postrádá funkčnost. Proto je pro správný metabolismus homocysteinu velmi důležitý jejich dostatek v potravě. (Erben, 2015)

Gen pro MTHFR se nachází na chromozomu 1 v pozici 1p36.3 (Goyette *et al.*, 1994) Dosud bylo v tomto genu objeveno 34 mutací a 9 polymorfismů. Nejvíce studované polymorfismy jsou MTHFR C677T a MTHFR A1298C. (Leclerc *et al.*, 2000)

### **Polymorfismus MTHFR C677T**

Nejvýznamnějším polymorfismem v genu pro MTHFR je polymorfismus C677T. Na pozici 677 se vyskytuje místo cytosinu thymin. Následně dochází k záměně alaninu na valin na pozici 222 (Ala<sup>222</sup>→Val). Homozygotní genotyp (TT) je jedním z důležitých determinantů ovlivňující hladinu homocysteinu v krevní plazmě, zvláště v případě nízké plazmatické hladiny folátů. Homozygotní varianta MTHFR 677TT se vyskytuje ve frekvenci až 30 % v Severní Americe, Evropě a v mnohých asijských populacích. V subsaharské Africe a u Afroameričanů se homozygoti 677TT téměř nevyskytují, jejich maximální výskyt je 1 % v populaci. (Schwahn a Rozen, 2001) Homozygotní forma 677TT zvyšuje hladinu homocysteinu o 20 % v porovnání s genotypem 677CC. (Bozok Çetintaş *et al.*, 2014)

### **Polymorfismus MTHFR A1298C**

Druhým nejběžnějším polymorfismem v genu pro MTHFR je záměna adeninu za cytosin v pozici 1298. Výsledkem je substituce kyseliny glutamové za alanin na pozici 429 v aminokyselinovém řetězci (Glu<sup>429</sup>→Ala). (Schwahn a Rozen, 2001) Tento polymorfismus také redukuje aktivitu enzymu MTHFR, ale v mnohem menší míře. (Van der Put *et al.*, 1998) U dvojité heterozygotních jedinců: MTHFR 677CT/1298AC se předpokládá vyšší riziko výskytu hyperhomocysteinémie a nižší plazmatická hladina folátů. (Schwahn a Rozen, 2001) Frekvence výskytu homozygotní mutace MTHFR 1298CC v bělošské populaci je 10-12 %. (Leclerc *et al.*, 2000)

### **2.3.4 Antitrombin**

Antitrombin je hlavním inhibitorem proteináz krevní koagulace, například trombinu či faktoru Xa. V roce 1965 Egeberg poprvé popsal nedostatek antitrombinu jako jednu z příčin trombofilie. (Egeberg, 1965) První mutace byla detekovaná v roce 1984, dnes je identifikováno již více než 200 mutací v genu pro antitrombin. Jedinci s dědičným nedostatkem antitrombinu mají riziko tromboembolie zvýšené 20 – 50krát. V obecně zdravé populaci se výskyt zděděné nedostatečnosti antitrombinu pohybuje od 0,02 až po 0,2 %. (Fischer *et al.*, 2013)

Nedostatek antitrombinu se dělí na typ 1 a 2. Typ 1 vykazuje sníženou aktivitu antitrombinu i hladiny antigenu. Typ 2 se vyznačuje normální plazmatickou hladinou antitrombinového antigenu a sníženou aktivitou antitrombinu. (Fischer *et al.*, 2013)

### **2.3.5 Protein C a S**

Nedostatek proteinu C a S zvyšuje riziko trombózy 8 – 10krát. (Penka *et al.*, 2009) Jedná se o K-dependentní faktory, které jsou důležitými přirozenými inhibitory krevního srážení. Jejich defekt se projevuje již v dětství nejčastěji jako žilní trombózy dolních končetin. V některých případech byly popsány trombózy horních končetin, trombózy povrchových žil či tepenné trombózy. (Brdička a Didden, 2018) U homozygotních jedinců může v ranném dětství nastat stav „purpura fulminans“, který má často fatální následky. (Penka *et al.*, 2009)

V případě mutace protein C se běžně v populaci vyskytují 2 mutantní jedinci na 1000 obyvatel. Prevalence defektu proteinu S není známa. (Penka *et al.*, 2009)

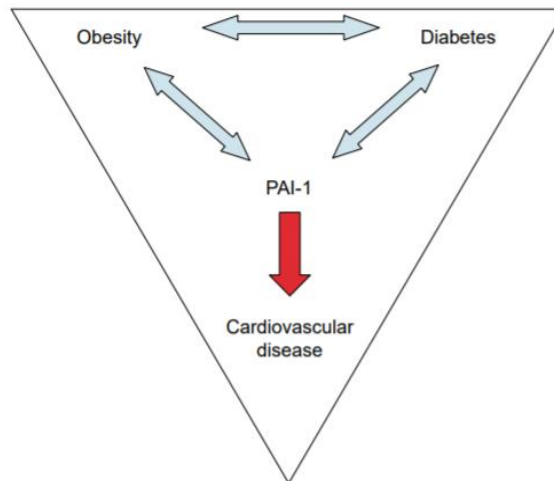
## **2.4 PAI-1 a choroby**

Jak již bylo zmíněno, alela 4G v případě polymorfismu 4G/5G *PAI-1* genu vede ke zvýšené hladině PAI-1 v plazmě. To může být příčinou či jedním z faktorů ovlivňujících vznik či průběh rozdílných chorob. V této kapitole se podrobněji zabýváme neplodností, rakovinou, obezitou, diabetem a kardiovaskulárním onemocněním. Ale vliv PAI-1 byl prokázán i u jiných onemocnění, např. u Alzheimerovy choroby (Fekih-Mrissa *et al.*, 2017) a metabolického syndromu. (Vague *et al.*, 2003)

### **2.4.1 Obezita, inzulinová rezistence a kardiovaskulární onemocnění**

PAI-1 hraje důležitou roli v případě výskytu kardiovaskulárních onemocnění, a to především prostřednictvím inhibice t-PA. (Gils a Declerck, 2004) První důkaz o spojitosti mezi sníženou kapacitou fibrinolýzy, zvýšenou plazmatickou hladinou PAI-1 a kardiovaskulárním onemocněním byl poskytnut díky studii zabývající se mladými lidmi po infarktu myokardu, a to již v roce 1987. (Hamsten *et al.*, 1987) Nicméně Juhan-Vague *et al.* poukázali na vliv inzulinové rezistence. Asociace mezi hladinou PAI-1 a rizikem koronárních příhod zmizela po úpravě výsledků na základě faktorů charakterizující inzulinovou rezistenci. (Juhan-Vague *et al.*, 1996) Ukázalo se, že metabolické determinanty mohou mít větší vliv než genetické determinanty. (Henry *et al.*, 1998) Rozsáhlé experimentální a klinické důkazní studie demonstrují, že PAI-1 spojuje obezitu,

inzulinovou rezistenci a kardiovaskulární onemocnění (viz obr. 3). Proto přímý antagonist PAI-1 reprezentuje terapeutickou možnost pro snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění spojených s obezitou a metabolickým syndromem, stejně tak jako léčbu obezity samotné. (Taeye *et al.*, 2005)



Obrázek 3: Souvislost PAI-1 s obezitou, diabetem a kardiovaskulárním onemocněním (Taeye *et al.*, 2005)

Výsledky některých studií týkajících se souvislosti *PAI-1* 4G/5G polymorfismu a kardiovaskulárních onemocnění nejsou jednoznačné. Avšak např. Akhter *et al.* zaznamenal vyšší prevalenci 4G alely u mladých pacientů po mrtvici v indické populaci. (Akhter *et al.*, 2017) Naproti tomu americká studie zaznamenala vyšší výskyt alely 4G u pacientek s infarktem myokardu, ale u pacientek s mrtvicí tato asociace prokázána nebyla. (Hindorff *et al.*, 2002) Některé studie došli k závěru, že relativní riziko vzniku infarktu myokardu je až dvojnásobné u osob, které mají 4G alelu. (Moatti *et al.*, 2000)

#### 2.4.2 Neplodnost

Normální těhotenství je asociováno se změnou hemostázy. Zvyšuje se koncentrace většiny srážecích faktorů, koncentrace přirozených antikoagulantů se naopak snižuje a klesá také fibrinolytická aktivita. Tyto změny pomáhají udržovat funkci placenty během těhotenství a také mají svou hemostatickou úlohu během porodu. Změna hemostázy během gravidity může vést ke zvýšené predispozici ke vzniku trombů a dalším cévním komplikacím. (Brenner, 2004)

Fibrinolytická aktivita plasmy je obecně během těhotenství snižena, zůstává nízká i před porodem a během porodu. Krátce po porodu se ale vrací do normálních hodnot. (Stirling *et al.*, 1984) Aktivita t-PA během těhotenství klesá. Příčinou je nejen postupné

zvýšení PAI-1 v plazmě, ale pravděpodobně i významné zvýšení hladiny PAI-2. (Brenner, 2004) Hladina PAI-1 je ve 35. týdnu těhotenství pětinasobně vyšší než v týdnu dvanáctém. Po poporodním období se hodnoty tohoto inhibitoru normalizují. (Bremme *et al.*, 1992)

Vrozená trombofilie je rizikovým faktorem reprodukčních onemocnění, a to včetně neplodnosti, opakovaných potratů a porodních komplikací. (Goodman *et al.*, 2006) *PAI-1* 4G/5G polymorfismus spolu s Leidenskou mutací přispívají k časné ztrátě plodu. Důvodem může být vliv PAI-1 na regulaci fibrinové sítě. Dále vliv na invazi trofoblastů do endometria, což je nezbytné pro správný vývoj placenty. Invaze trofoblastu vyžaduje aktivitu metaloproteinázy, která je regulována právě pomocí aktivátorů plasminogenu, jejichž hlavním inhibítorem je PAI-1. (Aflalo *et al.*, 2004; Goodman *et al.*, 2006) Hypofibrinolýza způsobená v důsledku přítomnosti 4G alely omezuje trofoblastickou invazi i v případě umělého oplodnění. (Gris *et al.*, 1997)

Několik studií se zabývalo trombofilními mutacemi v souvislosti s reprodukčními problémy. Goodman *et al.* zaznamenal významně vyšší frekvenci výskytu mutace *PAI-1* 4G/5G u žen s opakovanými potraty v porovnání s kontrolní populací. Studie se zabývala celkem 10 trombofilními mutacemi, přičemž nejvýznamnější nárůst heterozygotních genotypů byl u Leidenské mutace a *PAI-1* oproti kontrolní skupině. Významný rozdíl prevalence homozygotních mutovaných genotypů byl zaznamenán v případě výskytu Leidenské mutace, *PAI-1* 4G/5G a *MTHFR* C677T. (Goodman *et al.*, 2006) Vyšší prevalenci *PAI-1* 4G/4G genotypu u žen s opakovanými potraty a nezdařilým umělým oplodněním potvrdila i chicagská studie. (Salazar Garcia *et al.*, 2016)

### **2.4.3 Rakovina**

Schopnost rakovinných buněk napadnout extracelulární matrix, pronikat do lymfatických a krevních cév a vytvářet vzdálené metastázy závisí na interakci dvou hlavních systémů. Prvním systémem jsou matrixové metaloproteinázy. Druhým systémem je uPA, jeho receptor uPAR a PAI-1. Tyto složky hrají ústřední roli v procesech vedoucích ke vzniku metastáz. (Look *et al.*, 2002)

Výsledky experimentů ukázaly, že existuje souvislost mezi koncentrací uPA a vznikem metastáz. Protilátky a inhibitory proti uPA dokáží účinně redukovat počet metastáz nebo mohou být dokonce jejich prevencí. Také zabránění navázání uPA na uPAR vede ke

snížení vzniku metastáz. (Duffy, 2002) uPA ovlivňuje šíření rakoviny degradací extracelulárního matrixu a tím umožňuje invazi nádorových buněk a jejich metastazování. Navíc stimuluje angiogenezi, mitogenezi, adhezi buněk a jejich migraci. (Andreasen *et al.*, 1997)

Dalo by se předpokládat, že PAI-1 jako inhibitor uPA by měl působit proti invazi a metastazování maligních buněk. V některých modelových systémech vysoká exprese PAI-1 opravdu zredukovala tvorbu metastáz. (Alizadeh *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1997) Jiné studie ukázali, že PAI-1 spíše podporuje, než inhibuje invazivitu a vznik metastáz během nádorových onemocnění. Např. společná exprese PAI-1 a uPA se ukázala být nezbytnou pro optimální invazi plicního nádoru skrz umělou membránu. U myši vedl deficit PAI-1 ke snížené angiogenezi a k prevenci invaze rakovinných buněk. (Duffy, 2002)

Velká pozornost byla věnována také rakovině prsu v souvislosti nejen s PAI-1, ale i s uPA. Vysoké hladiny uPA a PAI-1 jsou asociovány s horší prognózou. (Look *et al.*, 2002) Castelló *et al.* potvrdil dopad *PAI-1* 4G/5G polymorfismu na závažnost nádoru u pacientek s rakovinou prsu. (Castelló *et al.*, 2006) Další studie podporuje asociaci tohoto polymorfismu se vzrůstajícím rizikem vzniku rakoviny, obzvláště v kavkazské populaci. Jedinci s 4G alelou mají větší předpoklad pro vznik karcinomu dělohy a tlustého střeva. (Wang *et al.*, 2013)

## **2.5 Laboratorní diagnostické metody detekce polymorfismu PAI-1**

K detekci polymorfismu v genu *PAI-1* se používají genetické metody, které jsou založené na polymerázové řetězové reakci (PCR). Jedná se například o Real-time PCR, hybridizaci, alelově specifickou PCR a sekvenování. Výsledky těchto reakcí jsou detekovány elektroforeticky nebo (v případě Real-time PCR) pomocí fluorescenčních metod.

### **2.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Objev metody PCR (z ang. *Polymerase chain reaction*) Karym B. Mullisem v 80. letech minulého staletí se považuje za jednu z nejdůležitějších událostí molekulární biologie. (Kaltenboeck a Wang, 2005) Doktor Mullis byl za objev metody PCR oceněn Nobelovou cenou v roce 1993. Tato metoda, díky které je možné amplifikovat (zmnožit) specifický úsek DNA, se dnes masivně využívá v diagnostice genetických chorob, ve forenzní

medicině a také například při analýze DNA izolované z archeologického materiálu. (Kočárek, 2007)

### **2.5.1.1 Princip a průběh PCR**

Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin. Podstatou metody je enzymatická syntéza nových řetězců určených úseků DNA ve směru 5'→3' prostřednictvím enzymu DNA – polymerázy. Zásadní je cyklické opakování této syntézy. K vymezení potřebného úseku nukleotidové sekvence slouží dva primery, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. Přítomnost DNA – polymerázy a nukleotidů pak zajišťuje průběh syntézy nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. (Šmarda *et al.*, 2005)

Nezbytnou součástí reakce je přítomnost termostabilní polymerázy, která se získává izolací z termofilních mikroorganismů. Příkladem je *Taq* DNA-polymeráza, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, odolávající vysokým teplotám při denaturaci DNA. (Šmarda *et al.*, 2005)

Amplifikační reakce probíhá v přístroji označovaném jako „cykler“, ve kterém můžeme předem naprogramovat požadovaný reakční profil. Jeho výhodou je rychlá změna teplot, která je nezbytná pro jednotlivé kroky amplifikace. (Kočárek, 2007)

Během reakce PCR dochází k cyklickému opakování tří kroků, které jsou závislé na odlišných teplotách; (Šmarda *et al.*, 2005)

1. Denaturace – působením zvýšené teploty (92-96 °C) dochází k denaturaci vyšetřované DNA.
2. *Annealing* (hybridizace) – primery se komplementárně vážou na cílové sekvence vyšetřované DNA a vymezují tak oblast genomu, která bude amplifikována. Tento krok probíhá při teplotě 40 – 65 °C.
3. Elongace (70 – 74 °C) - DNA polymeráza nasedá na 3' - OH konce navázaných primerů a připojuje k nim nové nukleotidy – dochází tak prodlužování (elongaci) nukleotidových řetězců ve směru 5'→ 3'. Potřebná doba elongace je přímo úměrná délce amplifikovaného úseku DNA. (Kočárek, 2007)



Ve většině případů se výše uvedené kroky opakují ve 30 cyklech, kdy se sekvence DNA namnoží do milionů kopií. Produkty PCR se kontrolují pomocí gelové elektroforézy. (Kuciel a Urban, 2016)

### **2.5.1.2 Optimalizace PCR metody**

Optimalizace metody PCR zahrnuje výběr a testování ideálních parametrů ovlivňujících průběh reakce. Mezi tyto parametry patří složení reakční směsi, nastavení PCR profilu tzn. teploty a časových intervalů jednotlivých kroků reakce. Každá laboratoř má specifické podmínky, proto se optimalizace provádí nejen při sestavování nové PCR, ale také při zavádění nové metody z odborné literatury. (Kuciel a Urban, 2016)

### **2.5.1.3 Elektroforéza**

Základní metodou používanou pro separaci PCR produktů je gelová elektroforéza. Tato metoda slouží nejen k oddělení fragmentů DNA, ale i k separaci RNA, proteinů a některých dalších biologicky významných látek. (Kuciel a Urban, 2016; Kočárek, 2007)

Principem elektroforézy je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Negativně nabitě fosfátové skupiny nukleových kyselin slouží jako hlavní nositelé náboje. Právě proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k anodě, která je opačně (kladně) nabitá. (Šmarda *et al.*, 2005) Kratší fragmenty se v gelu pohybují rychleji než delší fragmenty, protože jejich rychlost ovlivňuje menší tření. Elektroforéza tedy rozděluje fragmenty na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti. V genetice se využívá gelová elektroforéza. (Kočárek, 2007)

**Gelová elektroforéza** patří mezi klasické detekční laboratorní techniky. Polymerní organické látky vytvářejí gel a fungují jako takzvané „molekulární síto“ pro fragmenty nukleových kyselin. Dle předpokládané velikosti fragmentů a potřebám rozlišení je vybrána vhodnější sloučenina k přípravě gelu – agaróza či polyakrylamid. (Kočárek, 2007)

- Agaróza – tento polysacharid izolovaný z mořských řas se používá pro separaci delších fragmentů. Koncentrace agarózy by měla rovněž odpovídat velikosti fragmentů – gel s 2% obsahem agarózy se používá u kratších fragmentů, pro delší fragmenty (cca 1000 bp) je vhodnější 0,5-1% obsah agarózy.

- Polyakrylamid – gel z této sloučeniny je vhodný pro separaci velmi krátkých fragmentů, protože tvoří velmi husté molekulární síto, a tak je schopen oddělit fragmenty lišící se pouze o délku jediného páru bazí. (Kočárek, 2007)

#### **2.5.1.4 Real-time PCR**

Objev metody Real-time PCR je připisován Higuchi a kolektivu – účelem bylo zkonstruování systému detekujícího produkty PCR reakce během procesu samotné amplifikace. (Kaltenboeck a Wang, 2005) Tato varianta PCR umožňuje přímou kvantifikaci vznikajícího produktu amplifikace, což je důležité při detailním studiu genové exprese nebo diagnostiku některých patogenů. (Šmarda *et al.*, 2005)

Fluorescenční barvivo ethidium bromid interkaluje do dvouvláknových amplifikovaných produktů, což zvyšuje jeho fluorescenci. V reálném čase tak lze monitorovat proces PCR reakce prostřednictvím fluorescenčních signálů. Kvantitativní informaci o průběhu PCR reakce se zobrazují vynesemím do grafu, kdy na ose y je intenzita fluorescenčního signálu a na ose x číslo cyklu. Tradiční PCR přináší pouze kvalitativní informace – detekci přítomnosti či nepřítomnosti specifického produktu pomocí elektroforézy po proběhlé PCR reakci. (Kaltenboeck a Wang, 2005) Kromě interkalačních barviv (např. ethidium bromid), které se vážou na DNA se používají fluorescenčně značené sondy (vazba na střední část amplifikovaného produktu) či fluorescenčně značené primery. (Šmarda *et al.*, 2005)

#### **2.5.1.5 PCR-RFLP (Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism)**

Metoda PCR – RFLP se používá pro stanovení polymorfismů na základě délky restrikčních fragmentů DNA. Sekvenční rozdíly v DNA jsou detekovány až po specifickém působení restrikčních endonukleáz, kdy dochází ke vzniku fragmentů PCR produktu o různých délkách. (Kuciel a Urban, 2016; Šmarda *et al.*, 2005)

Enzymy, zvané restrikční endonukleázy, se získávají izolací z bakterií. Název takového enzymu je vždy odvozen z názvu bakterie, ze které byl izolován. V metodě PCR-RFLP se využívají pro jejich schopnost štěpit DNA na určitých specifických místech. Bakteriím slouží jako ochrana před viry. (Kuciel a Urban, 2016)

Během PCR reakce se pomocí specifických primerů nejprve amplifikuje vybraná sekvence DNA. Výsledné produkty PCR, které jsou charakterizovány stejnou délkou,

jsou detekovány pomocí elektroforézy. Následně jsou štěpeny vhodným restriktivním enzymem. (Šmarda *et al.*, 2005) Do reakční směsi pro restriktivní štěpení patří reakční pufr, restriktivní endonukleáza a destilovaná voda. Tato směs se promíchá s PCR produkty a inkubuje se dle doporučení výrobce. Vzorky jsou poté opět analyzovány elektroforézou. Při hodnocení velikosti jednotlivých fragmentů se používá tzv. hmotnostní marker, který obsahuje fragmenty o známé velikosti a je komerčně dostupný. (Kuciel a Urban, 2016)

#### **2.5.1.6 Alelově specifická PCR (AS-PCR)**

AS-PCR je metoda vhodná pro detekci bodových mutací. Provádí se ve dvou reakcích, kdy první reakce obsahuje primer komplementární k normální sekvenci a druhá reakce obsahuje primer specifický pro mutovanou sekvenci. K amplifikaci testované sekvence DNA dojde pouze v případě komplementarity s primerem. V případě homozygotní varianty dojde k amplifikaci DNA pouze v jedné reakci. (Šmarda *et al.*, 2005) Výhodami této metody jsou nízké náklady a rychlá detekce amplifikovaných produktů na elektroforetickém gelu. (Gaudet *et al.*, 2009)

Rozlišují se dva typy AS-PCR:

- ARMS-PCR (amplifikaci nedostupný mutační systém) je založen na chybějící elongaci v důsledku chybného párování bází na 3'-konci primeru, často je nazýván také jako „alelově specifická amplifikace“ či PCR-amplifikace specifických alel“.
- COP (kompetitivní připojení nukleotidu) spočívá v tom, že v případě odlišnosti primeru a vyšetřované sekvence brání elongaci chybné párování bází ve střední části sekvence primeru. (Šmarda *et al.*, 2005)

#### **2.5.2 Hybridizační metody**

Hybridizační metody umožňují identifikovat určité sekvence DNA (RNA) pomocí značených sond – uměle připravených úseků DNA. Sonda se na základě komplementarity bází spojuje s vyšetřovaným úsekem DNA (RNA). Při hybridizaci tedy dochází ke spojení vlákna vyšetřované nukleové kyseliny se sondou. (Kočárek, 2007)

Hybridizace probíhá v několika krocích. Nejprve je nutno denaturovat vyšetřovanou nukleovou kyselinu působením vysoké teploty. Dojde tak k oddělení řetězců vyšetřované DNA (RNA). Poté se teplota sníží – navodí se renaturační podmínky a genetický materiál na základě komplementarity vytvoří opět dvojřetězcové nukleové kyseliny. Vysoká

koncentrace sond umožňuje jejich rychlejší navázání ke komplementárním sekvencím vyšetřovaného úseku rychleji než původní řetězec. Hybridizace a přítomnost hledaného úseku se detekuje na základě vzniku hybridizačního signálu. (Kočárek, 2007)

Hybridizační signál vzniká díky sondám, které jsou značeny radioaktivně či neradioaktivně. Oba způsoby mají stejný princip – do sekvence sondy jsou začleněny modifikované nukleotidy. U radioaktivního značení se jedná o nukleotidy obsahující radioaktivní izotop, např.  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  nebo  $^3\text{H}$ . Hybridizačním signálem je v tomto případě radioaktivní záření, které je možno detekovat např. autoradiograficky. Neradioaktivní značení sond používá modifikované nukleotidy, které nesou tzv. „reportéřskou molekulu“. Touto molekulou může být například biotin či digoxigenin, které se vážou na dUTP, jenž se začleňuje do řetězce DNA místo thymynu. Sonda je zde detekována pomocí protilátky specifické pro biotin či digoxigenin. Na protilátku je navázán enzym (alkalická fosfatáza, peroxidáza, luciferáza), který po přidání substrátu katalyzuje reakci, jejímž výsledkem je například změna barvy či rozpustnosti. Na protilátku může být místo enzymu navázáno fluorescenční barvivo, pak se signál detekuje na základě fluorescence. (Šmarda *et al.*, 2005)

### **2.5.2.1 Hybridizace na pevných podkladech**

Vzorek denaturované DNA či RNA se imobilizuje na pevný podklad – nitrocelulóзовý filtr či nylonovou membránu. Na základě způsobu přenosu nukleových kyselin se rozlišují tři typy hybridizace:

- hybridizace kolonií nebo plak – na membránu se přenáší nukleové kyseliny, které pochází přímo z bakteriálních kolonií nebo plak bakteriofágů kultivovaných na živných médiích
- tečková hybridizace – vzorek se na membránu aplikuje ve formě kapek
- reverzní hybridizace – značený vzorek DNA hybridizuje k neznačeným imobilizovaným sondám. (Šmarda *et al.*, 2005)

### **2.5.2.2 Southern blotting**

Tato metoda byla vyvinuta skotským biochemikem Edem M. Southernem v roce 1975. Metoda využívá kapilárního vztlínání tzv. přenosového pufru k přenosu molekul DNA z elektroforetického gelu na membránu. Zjednodušeně se jedná o „obtisknutí“ DNA

z gelu na membránu. Na membráně již může probíhat hybridizace, která na samotném gelu není z důvodu jeho křehkosti možná. (Kočárek, 2007)

Přenosový pufr vztlíná kapilární silou přes houbu, která je umístěna na dolní ploše gelu, do savého materiálu (buničité vaty) umístěného na horní ploše. Membrána je pro DNA nepropustná, proto se na ní zachytí, a to identicky s původním umístěním na gelu. Pufr má denaturační účinky, proto přenesená DNA je jednovláknová, a tak je možná hybridizace se sondou. (Kočárek, 2007)

### **2.5.2.3 Reverzní hybridizace na stripech**

Komerční stripy umožňují rychlé a jednoduché paralelní stanovení polymorfismů vybraných genů. Strip je tvořen z nitrocelulóзовé membrány, na které jsou navázány sondy vždy pro normální a mutovanou variantu vyšetřovaných genů. Nejprve je nutné provést multiplex PCR, při které během amplifikace vyšetřovaných úseků DNA dochází také k jejich označení biotinem. Poté následuje hybridizace na stripu. Výslednou reakci (přítomnost „proužků“) je možné odečítat vizuálně pouhým okem. Zviditelnění PCR produktů navázaných na stripu zajišťuje přidání chromogenního substrátu a alkalické fosfatázy konjugované se streptavidem. (Matýšková a Čech, 2009)

### **2.5.3 Sekvenování DNA**

V roce 1977 byl vyvinut postup ke stanovení pořadí nukleotidů v DNA a to Frederikem Sangerem, který za tuto metodu v roce 1980 obdržel Nobelu cenu. Metodu v roce 1985 vylepšil Leroy Hood použitím fluorescenčně značených nukleotidů místo původních radioaktivně značených. (Kočárek, 2007) Sangerova metoda, neboli dideoxy sekvenování, je založena na prodlužování krátkých primerů klasickou DNA polymerázou a jejich ukončování fluorescenčně značenými dideoxynukleotidy. (Kuciel a Urban, 2016)

Sekvenační směs obsahuje tyto komponenty:

- Jednořetězcová DNA – Sekvenuje se pouze jeden řetězec DNA, proto je DNA nejprve denaturovaná zvýšením teploty.
- Primer – Přítomnost pouze jednoho primeru zajišťuje sekvenování pouze jednoho řetězce DNA, protože se váže pouze na jeden řetězec z páru. Primer také určuje místo počátku sekvenace.
- DNA polymeráza

- Běžné deoxynukleotidy (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- Dideoxynuleotidy (ddNTP) – Jedná se o modifikované deoxynukleotidy, které v případě zařazení do prodlužujícího řetězce DNA, ukončí prodlužování řetězce. Důvodem je nepřítomnost OH skupiny na 3'uhlíku deoxyribózy díky které se nemůže vytvořit nová fosfodiesterová vazba. ddNTP jsou fluorescenčně značeny. (Kuciel a Urban, 2016)

Sekvenační směs se spolu se vzorkem DNA vkládá do cyklu. Po připojení primeru dochází k syntéze nových řetězců DNA pomocí DNA polymerázy. V případě zařazení ddNTP místo dNTP je prodlužování řetězce zastaveno – další nukleotid nemůže být připojen na samotný vodík, ale pouze na OH skupinu. Tak jsou syntetizovány stovky řetězců, které jsou různě dlouhé a vždy ukončeny ddNTP. Poté se využívá kapilární elektroforéza, která rozdělí směs na spektrum fragmentů, které se od sebe liší délkou pouze jednoho nukleotidu. Díky fluorescenčnímu barvivu na konci každého fragmentu je možné zjistit, jakým ddNTP byly jednotlivé fragmenty ukončeny a určit tak sekvenci analyzovaného řetězce DNA. Moderní sekvenační přístroje využívají kapilární elektroforézu a čtecí laserové zařízení, které zachycuje signál ze značeného ddNTP, a umožňují tak automatizované sekvenování probíhající pouze v jedné zkumavce. Výsledkem sekvenování je elektroforetogram. (Kočárek, 2007; Kuciel a Urban, 2016)

### **3 Cíle práce**

Cílem mé bakalářské práce bylo:

- Vypracování odborné rešerše na dané téma.
- Praktické zvládnutí základních laboratorních metod: izolace DNA, měření koncentrace DNA, příprava PCR reakce, gelová elektroforéza a provedení Real-time PCR.
- Optimalizace metody ARMS-PCR.
- Provedení analýzy výsledků výše uvedených metod a jejich vyhodnocení.

## 4 Praktická část

Praktickou část své bakalářské práce jsem provedla v genetické laboratoři GENLABS pod odborným dohledem vedoucí práce – Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D.

Součástí praktické části byla izolace DNA z periferní krve nebo bukalního stěru, následné stanovení koncentrace izolované DNA, vlastní analýza polymorfismu genu *PAI-1* metodami Real-time PCR a ARMS-PCR.

### 4.1 Izolace DNA

Izolace DNA pro běžné diagnostické účely v genetice se provádí z periferní krve či z bukalního stěru. Odběr krve probíhá na specializovaném pracovišti typu odběrového centra či laboratoře, kde je krev odebrána vyškoleným zdravotnickým personálem. Stěr z ústní dutiny si provádí pacient sám. U obou metod je třeba dodržet předepsané odběrové podmínky. V případě periferní krve se izoluje DNA z leukocytů, v případě izolace z bukalního stěru je DNA získána z epitelii přítomných v ústní dutině.

#### 4.1.1 Izolace DNA z bukalního stěru

Pro izolaci DNA z bukalního stěru jsem použila komerční kit GeneAll ExGene™ Clinic SV mini. Použité reagenty a jejich teploty skladování jsou uvedené v tab. 1.

Tabulka 1: Reagenty pro izolaci DNA z bukalního stěru

Reagenty	Podmínky skladování
PBS	Pokožová teplota
Proteináza K (PK)	-20 °C
BL pufr	Pokožová teplota
BW pufr	
TW pufr	
AE pufr	
Ethanol (100%)	



Nejprve jsem z mrazničky vyndala Proteinázu K (PK) a nechala jsem ji rozmrazit. Dále jsem zapnula a nastavila suchou lázeň na 56 °C. Na závěr přípravy izolace jsem pro každý vzorek připravila 1,5ml mikrozkušavku, kterou jsem čitelně a řádně popsala.

Do zkumavky obsahující bukalní stěr pacienta jsem napipetovala 400 µl PBS (Phosphate Buffered Saline), 40 µl PK a 400 µl BL pufru. Zkumavku jsem důkladně promíchala pomocí vortexu a inkubovala v suché lázni vyhřáté na 56 °C po dobu 10 minut. Po deseti minutách jsem zkumavku vyjmula ze suché lázně a krátce stočila v minicentrifuze, aby se odstranily kapky ze stěn a vnitřní strany zkumavky. Následně jsem do zkumavky napipetovala 400 µl 100% etanolu. Zkumavku jsem zvortexovala v pulzech, aby se směs promíchala, a opět krátce stočila na minicentrifuze. Poté jsem postupně ve dvou krocích přenesla všechnu směs na kolonku. Pomocí pipety jsem tedy nabrala maximálně 700 µl, napipetovala jsem tento objem na kolonku, kolonku jsem zavřela a centrifugovala při 8000 rpm po dobu 1 minuty. V druhém kroku jsem nabrala zbytek směsi, opět přenesla na kolonku a centrifugovala. Obsah sběrné zkumavky jsem vylila a na kolonku jsem napipetovala 600 µl BW pufru. Zkumavku jsem centrifugovala po dobu 1 minuty při 8000 rpm. Sběrnou zkumavku jsem opět vyprázdnila a na kolonku připipetovala 700 µl TW pufru a opět centrifugovala 1 minutu při 8000 rpm. Kolonku jsem vrátila zpět do sběrné zkumavky a centrifugovala při nejvyšších otáčkách, aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru. Následně jsem kolonku umístila do nové předem popsané 1,5ml mikrozkušavky s víčkem. Přidala jsem 50 µl AE pufru přímo na střed filtru kolonky. Poté jsem zkumavku nechala inkubovat při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Centrifugovala jsem zkumavku při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty. Pak jsem zopakovala poslední tři kroky – přidání AE pufru, inkubace, centrifugace. Nakonec jsem odstranila kolonku a zkumavku s izolátem uzavřela.

#### ***4.1.2 Izolace DNA z plné krve***

Pro izolaci DNA z plné krve jsem opět použila komerční kit GeneAll ExGene™ Clinic SV mini. Použité reagentie a jejich teploty skladování jsou uvedené v tabulce.

Tabulka 2: Reagencie pro izolaci DNA z plné krve

Reagencie	Podmínky skladování
Proteináza K (PK)	-20 °C
BL pufr	Pokožová teplota
BW pufr	
TW pufr	
AE pufr	
Ethanol (100%)	

Nejprve jsem zapnula a nastavila suchou lázeň na 56 °C a z mrazáku vyndala proteinázu. Pro každý vzorek jsem si připravila dvě 1,5ml mikrozkušavky, které jsem řádně a čitelně popsala. Do připravené zkumavky jsem napipetovala 40 µl proteinázy K a přidala 400 µl vzorku krve. Následně jsem do zkumavky napipetovala 400 µl BL pufru a pomocí vortexu jsem obsah zkumavky důkladně promíchala. Poté jsem zkumavku vložila do vyhřáté lázně (56 °C), kde jsem ji nechala inkubovat po dobu 10 minut. Po inkubaci jsem zkumavku krátce stočila na stolní minicentrifuze, aby došlo k odstranění případných kapek z vnitřní strany zkumavky. Poté jsem do zkumavky napipetovala 400 µl 100% ethanolu. Opět jsem použila stolní minicentrifugu pro zvortexování a krátké stočení. Směs ze zkumavky jsem opatrně přenesla na kolonku ve dvou krocích – do pipety jsem nabrala maximálně 700 µl směsi, tu jsem napipetovala na kolonku a centrifugovala jsem 1 minutu při 800 rpm. Po vyndání zkumavky z centrifugy jsem odstranila obsah sběrné zkumavky, vrátila do ní kolonku a napipetovala 600 µl BW pufru. Zkumavku jsem opět vložila do centrifugy a centrifugovala při 800 rpm po dobu 1 minuty. Sběrnou zkumavku jsem nahradila novou. Opět jsem napipetovala BW pufr a centrifugovala. Po vyjmutí z centrifugy jsem zkontrolovala, zda je supernatant průhledný. V případě, že supernatant průhledný nebyl, tak jsem opakovala centrifugaci. Odstranila jsem obsah sběrné zkumavky a v dalším kroku jsem napipetovala 700 µl TW pufru. Poté jsem vzorek opět centrifugovala při stejných podmínkách – 800 rpm po dobu 1 minuty. Vyjmula jsem zkumavku z centrifugy, odstranila jsem supernatant ze sběrné zkumavky a kolonku

vrátila zpět do sběrné zkumavky. Následně jsem vzorek centrifugovala 1 minutu při nejvyšších otáčkách pro odstranění zbytkového promývacího pufru. Po vyjmutí vzorku z centrifugy jsem kolonku vložila do nové již připravené 1,5ml mikrozkušavky. Přidala jsem 50  $\mu$ l AE pufru a inkubovala 5 minut v suché lázni. Po inkubaci jsem zkumavku vložila do centrifugy a centrifugovala 1 minutu při nejvyšších otáčkách. Poté jsem vyjmula kolonku ze zkumavky a přepipetovala její obsah zpátky na kolonku, kolonku jsem vrátila do zkumavky a znovu centrifugovala. Po vyjmutí vzorku z centrifugy jsem odstranila kolonku a zkumavku jsem uzavřela.

#### 4.2 Měření koncentrace DNA

Měření koncentrace izolované DNA jsem provedla pomocí Qubit™ Assay a přístroj Qubit 2.0 Fluorometer. Součástí tohoto kitu jsou 0,5ml PCR mikrozkušavky (Qubit™ assay tubes) skladované při pokojové teplotě a příslušné reagenty, které jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Reagenty pro měření koncentrace izolátu DNA

Reagenty	Podmínky skladování
Qubit™ dsDNA BR reagent (Component A)	Pokojová teplota
Qubit™ dsDNA BR buffer (Component B)	Pokojová teplota
Qubit™ dsDNA BR Standard #1 (Component C)	Lednice ( $\leq 4$ °C)
Qubit™ dsDNA BR Standard #2 (Component D)	Lednice ( $\leq 4$ °C)

Před vlastním měřením koncentrace jsem vytemperovala všechny reagenty na pokojovou teplotu. Připravila jsem si také mikrozkušavky (pro každý vzorek a oba standardy) a řádně je popsala.

Nejprve jsem si připravila pracovní roztok pro potřebný počet měření. Napipetovala jsem tedy pro každý vzorek 199  $\mu$ l Componentu B a 1  $\mu$ l Componentu A, kdy minimální počet vzorků je 3 (2 standardy a 1 vzorek). Mikrozkušavku s takto připraveným roztokem jsem zvortexovala (cca 15 s) a krátce centrifugovala na stolní minicentrifuze. Poté jsem pracovní roztok rozpipetovala do již připravených mikrozkušavek – vždy 198  $\mu$ l nebo 190  $\mu$ l roztoku, ke kterému jsem následně přidala 2  $\mu$ l izolátu DNA nebo 10  $\mu$ l příslušné standardy (výsledný objem pro měření byl vždy 200  $\mu$ l). Mikrozkušavky jsem krátce

zvortexovala a centrifugovala pomocí stolní minicentrifugy, nechala jsem je 2 minuty inkubovat při pokojové teplotě a následně provedla měření na fluorometru Qubit™ 2.0.

### 4.3 Vyšetření polymorfismu genu *PAI-1*

Pro vyšetření polymorfismu 4G/5G *PAI-1* genu jsem použila dva přístupy – Real-time PCR a ARMS-PCR. Pro metodu Real-time PCR jsem použila komerční kit CE IVD. Metodu ARMS-PCR jsme musela nejprve zoptimalizovat. Při optimalizaci jsem vycházela z prací Shaghaghi *et al* (2014), Falk *et al* (1995), Blasiak a Smolarz (2000), ve kterých byl postup pro stanovení polymorfismu 4G/5G v genu *PAI-1* již publikován.

#### 4.3.1 Metoda Real-time PCR

Pro vyšetření polymorfismu genu *PAI-1* metodou Real-time PCR jsem využila kit GeneProof – *PAI-1* Genotyping PCR (CE IVD). Tento kit využívá technologii „hot start“, která minimalizuje nespecifické reakce a zajišťuje tak maximální citlivost detekce. Kit obsahuje MasterMix, pozitivní kontroly pro wild type, heterozygota a mutovaného homozygota (tab. 4). Doporučená teplota skladování kitu je  $-20 \pm 5$  °C.

Analýzu genotypu 4G/5G polymorfismu v genu *PAI-1* pomocí této metody jsem provedla u 16 vzorků. Real-time PCR byla provedena pomocí přístroje Light Cycler 2.0 (Roche), který místo klasických PCR zkumavek používá skleněné kapiláry.

Tabulka 4 Seznam reagensií (*GeneProof – PAI-1 Genotyping PCR kit, CE IVD*)

Reagencie	
MasterMix	
Pozitivní kontrola	<i>PAI-1</i> wild type
Pozitivní kontrola	<i>PAI-1</i> mutant
Pozitivní kontrola	<i>PAI-1</i> heterozygot

### ***Color kompenzace*** (barevná kompenzace)

Před zavedením nové genetické analýzy metodou Real-time PCR musí být provedena *color kompenzace*. Pro fluorescenční separaci na kanálech 530 nm a 560 nm emisního spektra jsem použila dle doporučení výrobce Color Compensation Kit 530/560 od firmy GeneProof. Postupovala jsem přesně dle doporučení výrobce. Před zahájením přípravy reakcí pro *color kompenzaci* jsem všechny potřebné reagenty vyndala z mrazícího boxu, po jejich rozmrznutí je zvortexovala a stočila pomocí stolní minicentrifugy. Dále jsem pracovala v dekontaminovaném laminárním boxu. Do předem vychlazeného speciálního stojánku s adaptéry jsem si připravila skleněné kapiláry. Do první kapiláry jsem následně napipetovala 20 µl Blanku, do druhé 20 µl MasterMixu 530 a do třetí 20 µl Mastermixu 560. Všechny kapiláry jsem pečlivě uzavřela plastovou zátkou. Následně jsem kapiláry opatrně zcentrifugovala při nízkých otáčkách max. 1 tis. rpm po dobu cca 15 sekund. Po vyjmutí z centrifugy jsem kapiláry (již bez adaptérů) vložila do speciálního karuselu. Karusel jsem umístila do cykleru a spustila předem nastavení reakční profil doporučený výrobcem. Výsledek reakce jsem uložila v PC napojeném na cykler opět dle doporučení výrobce a hodnoty *color kompenzace* tak mohly sloužit pro každou další detekci polymorfismu *PAI-1*.

### **Real-time PCR**

Při přípravě reakce jsem postupovala přesně dle doporučení výrobce. Nejprve jsem vytemperovala reagenty na pokojovou teplotu a v dekontaminovaném laminárním boxu jsem si připravila skleněné kapiláry. Reagenty a izoláty DNA jsem zvortexovala a stočila na stolní minicentrifuze. V průběhu přípravy PCR reakcí jsem všechny reagenty uchovávala v chladícím stojánku. Nejprve jsem do kapilár napipetovala 18 µl MasterMixu. Poté jsem do každé kapiláry napipetovala 2 µl daného izolátu DNA. Do kapilár určených pro pozitivní kontrolu jsem místo izolátu napipetovala 2 µl pozitivní kontroly (wild type / heterozygot / mutant) a do negativní kontroly jsem přidala stejný objem vody. Výsledný objem každé reakční byl tedy 20 µl. Následně jsem kapiláry uzavřela víčkem a opatrně zcentrifugovala při max. 1000 rpm po dobu 10 s. Po vyjmutí z centrifugy jsem zjistila pohledem, zda došlo k přesunutí reakčního mixu z horní části kapiláry do její spodní zúžené části a tedy k jeho dokonalému stočení. Následně jsem kapiláry vložila do karuselu a do cykleru. V PC napojeném na Light cykler jsem nastavila

příslušný amplifikační program dle doporučení výrobce, který je uveden v tabulce číslo 5.

Genotyp 5G/5G je detekován v kanálu FAM (530), genotyp 4G/4G v kanálu HEX (560), heterozygotní genotyp je detekován v obou kanálech.

Tabulka 5: Reakční profil metody Real-time PCR

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	10 min	1
Denaturace	95 °C	10 s	40
Annealing	64 °C	20 s	
Extenze	72 °C	20 s	

#### 4.3.2 Metoda ARMS-PCR

Reakční profil a sekvence primerů pro optimalizaci ARMS-PCR jsem převzala z práce Shaghghi *et al.* (2014). Primery uvedené v tabulce č. 6, byly syntetizovány společností ELISABETH PHARMACON s.r.o. Reakční profil PCR reakce, ze kterého jsem vycházela, je uveden v tabulce číslo 7. Pro optimalizaci metody jsem použila vzorky, které byly již dříve v genetické laboratoři GENLABS vyšetřeny metodou reverzní hybridizace na stripu nebo metodou Real-time PCR.

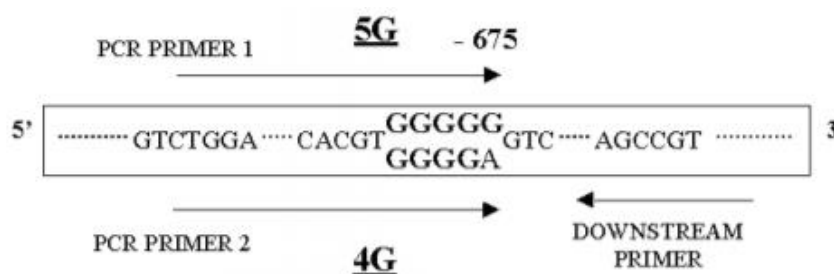
Tabulka 6: Sekvence primerů pro ARMS-PCR

Primer	Sekvence
Upstream control primer	5'-AAGCTTTTACCATGGTAACCCCTGGT-3'
Downstream primer	5'-TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCTAG-3'
4G primer	5'-AGAGTCTGGACACGTGGGGA-3'
5G primer	5'-AGAGTCTGGACACGTGGGGG-3'

Tabulka 7: Reakční profil ARMS-PCR

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	20 s	30
Annealing	55 °C	10 s	
Extenze	72 °C	20 s	
Terminální extenze	72 °C	3 min	1

Během PCR reakce by mělo dojít k amplifikaci specifických fragmentů DNA odpovídajících konkrétnímu úseku genu *PAI-1* a zahrnujících polymorfismus 4G/5G. Schéma nasedání primerů k příslušné sekvenci *PAI-1* genu je znázorněno na obr. 4. Vzniklé fragmenty mají rozdílnou délku, díky které bychom je měli umět navzájem rozeznat dle příslušné publikace na 2% agarózovém gelu. Délka kontrolního fragmentu odpovídá 257 bp, 4G alela má velikost 138 bp a 5G alela 139 bp.



Obrázek 4: Schéma primerů pro detekci *PAI-1* 4G/5G polymorfismu

#### 4.3.2.1 Výpočet teploty nasedání primerů

Teplota annealingu neboli teplota nasedání primerů musí být optimální pro oba použité primery. Teplota závisí na délce primerů a počtu GC párů. Při nižší teplotě annealingu by mohlo docházet k nespecifickému nasedání primerů k templátové DNA. Při příliš vysoké teplotě by naopak primery nenedaly vůbec.

Pro určení teploty annealingu jednotlivých primerů jsem použila tabulku na webových stránkách LABGuide. Optimální anealingové teploty pro jednotlivé primery jsem uvedla v tabulce 8.

*Tabulka 8: Teploty annealingu pro jednotlivé primery*

<b>Primer</b>	<b>Teplota annealingu</b>
Upstream control primer	73 °C
Downstream primer	75 °C
4G primer	61 °C
5G primer	63 °C

#### **4.3.2.2 Naředění primerů**

Před samotnou optimalizací bylo třeba naředit komerčně dodané primery. K jednotlivým roztokům primerů jsem dle doporučení výrobce přidala takové množství vody, aby výsledná koncentrace odpovídala 100  $\mu\text{M}$  (viz tab. 9). Zkumavky jsem zvortexovala a stočila na stolní minicentrifuze. Poté jsem si připravila zkumavky, které jsem řádně a čitelně popsala názvem primeru a datem ředění, pro pracovní roztoky primerů. Do těchto zkumavek jsem napipetovala 80  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  a 20  $\mu\text{l}$  daného primeru. Tyto zkumavky jsem také zvortexovala a stočila. Získala jsem tak pracovní roztoky primerů o výsledné koncentraci 20  $\mu\text{M}$ , se kterými jsem dále pracovala.

*Tabulka 9: Ředění primerů pro ARMS-PCR*

<b>Primer</b>	<b>Množství přidané vody</b>
Upstream control primer	260 $\mu\text{l}$
Downstream primer	244 $\mu\text{l}$
4G primer	244 $\mu\text{l}$
5G primer	228 $\mu\text{l}$



### 4.3.2.3 Příprava a průběh reakce

Během optimalizace se jednotlivé optimalizační reakce lišily – např. množstvím primerů, annealingovou teplotou, přidáním DMSO apod. V následujícím odstavci uvádím obecný popis práce pro provedení metody ARMS-PCR. Jednotlivé optimalizační kroky jsou uvedeny ve výsledcích.

Nejprve jsem nechala rozmraznout vzorky, primery a PCR MasterMix. Následně jsem všechny komponenty reakce zvortexovala a stočila. Ve vysvíceném boxu jsem si připravila mikrozkušavky pro příslušné vzorky a jejich reakce – pro každý vzorek jsem si připravila tři zkumavky (pro 4G primer, 5G primer a negativní kontrolu). V boxu jsem do každé mikrozkušavky napipetovala reagentie dle tabulky č. 10 v pořadí v tabulce uvedeném. Do mikrozkušavek s negativní kontrolou jsem napipetovala namísto DNA 2  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Poté jsem mikrozkušavky zvortexovala a stočila na stolní minicentrifuze. Vně boxu jsem do jednotlivých mikrozkušavek napipetovala 2  $\mu\text{l}$  příslušných izolátů DNA. Připravené reakční směsi jsem opět zvortexovala a krátce stočila. Celkový objem reakční směsi tedy byl 25  $\mu\text{l}$ .

Tabulka 10: Reagentie a jejich objem pro ARMS-PCR

Reagentie	Množství
$\text{H}_2\text{O}$ – injekční voda	9,0 $\mu\text{l}$
PCRBIO Taq Mix Red	12,5 $\mu\text{l}$
Upstream control primer (20 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
Downstream control primer (20 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
Primer 4G (20 $\mu\text{M}$ ) / Primer 5G (20 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{l}$

Takto připravené reakční směsi jsem vložila do cykleru, kde jsem nastavila průběh reakce dle reakčního profilu reakce uvedeného v tabulce č. 7.

### 4.3.2.4 Příprava a provedení elektroforézy

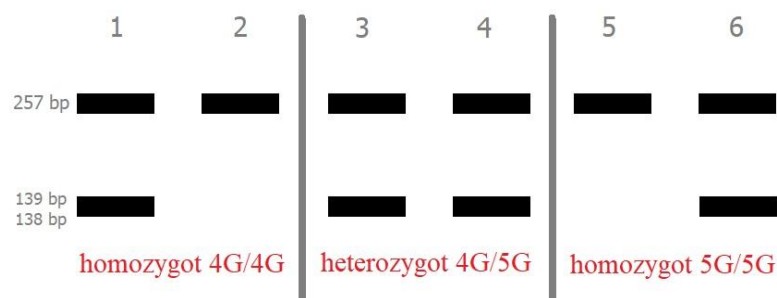
Produkty metody ARMS-PCR jsem kontrolovala pomocí elektroforézy na 4% agarózovém gelu.

Nejprve jsem si připravila samotný gel. Rozpustila jsem příslušný počet agarózových tablet v plastové kádince se 1x TBE pufrem. Pro 4% gel jsem použila 4 tablety obsahující 0,5g agarózy a 50 ml 1x TBE pufru. Po úplném rozpuštění tablet jsem kádinku vložila do mikrovlnné trouby, kde jsem směs ohřála tak, aby gel nevytekl a agaróza se úplně rozpustila. Poté jsem do gelu přidala 15  $\mu$ l barvičky Midori Green Advanced DNA Stain, směs jsem promíchala a nechala krátce zchladnout. Následně jsem směs nalila do elektroforetické podložky a nechala tuhnout ve tmě po dobu cca 15 minut.

Ztuhlý gel jsem vložila do elektroforetické vany se 1x TBE pufrem tak, aby hladina pufru byla minimálně 3 mm nad gelem. Do první jamky jsem napipetovala 5  $\mu$ l hmotnostního markeru 100 bp DNA LADDER H3RTU. Do dalších jamek jsem pipetovala vždy 12  $\mu$ l PCR produktu a spustila elektroforézu na 10-30 min (dle potřeby). Pořadí PCR produktů na gelu jsem si pečlivě zapsala.

Po proběhnutí elektroforézy jsem gel opatrně přenesla na detekční systém, vyfotila ho a uložila snímek na paměťovou kartu, kterou jsem následně vložila do počítače. Snímek gelu jsem na počítači upravila, uložila a vyhodnotila výsledky.

Na obr. 5 je uvedeno schématické znázornění elektroforetické analýzy zobrazující optimální výsledky. Produkt pozitivní kontroly o velikosti 257 bp je amplifikován v každé reakci. Na pozici 1, 3 a 5 jsou výsledné PCR produkty amplifikované s primerem 4G a na pozici 2, 4 a 6 jsou pak PCR produkty amplifikované s primerem 5G.



Obrázek 5: Elektroforetický gel

## 5 Výsledky

Tato kapitola obsahuje výsledky vyšetření polymorfismu 4G/5G v *PAI-1* genu metodou Real-time PCR. Dále popisuje provedení a výsledky všech optimalizačních reakcí, které jsem provedla v rámci optimalizace

### 5.1 Metoda Real-time PCR

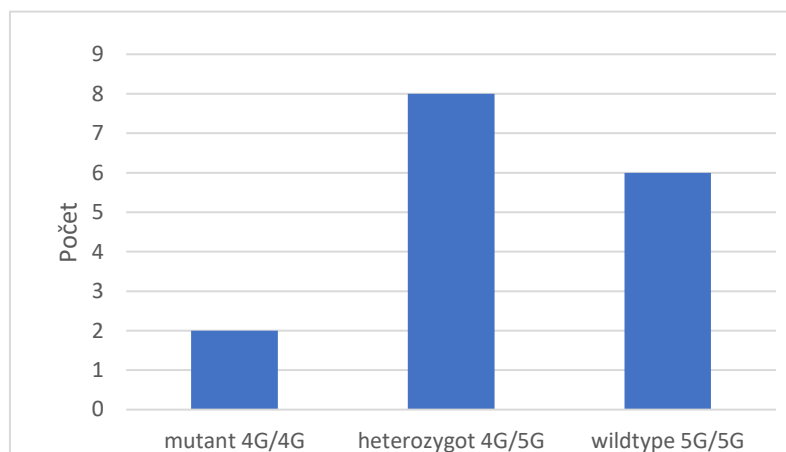
Metodu Real-time PCR bylo vyšetřeno celkem 16 vzorků. Tyto vzorky byly již dříve vyšetřeny na Leidenskou mutaci, pro kterou jsou heterozygotní. Výsledky včetně koncentrací jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tab. 11. Do tabulky jsem zapsala i výsledky kontrolních pozitivních vzorků a jedné negativní kontroly. Zastoupení jednotlivých genotypů polymorfismu genu *PAI-1* ukazuje tab. 12 a graf na obr. 6.

Tabulka 11: Výsledky (metoda Real-time PCR)

Číslo vzorku	Koncentrace izolátu (ng/μl)	Genotyp
1	31,2	5G/5G
2	22,6	4G/5G
3	23,6	4G/5G
4	20,0	4G/4G
5	44,4	4G/4G
6	1,6	5G/5G
7	17,2	4G/5G
8	4,1	5G/5G
9	6,9	4G/5G
10	69,0	5G/5G
11	1,7	4G/5G
12	228,0	5G/5G
13	940,0	4G/5G
14	402,0	5G/5G
15	21,0	4G/5G
16	9,6	4G/5G
Kontrola wild type	-	5G/5G
Kontrola heterozygot	-	4G/5G
Kontrola mutant	-	4G/4G
Kontrola negativní	-	negativní

Tabulka 12 Zastoupení genotypů (metoda Real-time PCR)

genotyp	počet	zastoupení
mutant 4G/4G	2	13 %
heterozygot 4G/5G	8	50 %
wildtype 5G/5G	6	38 %



Obrázek 6: Graf zastoupení genotypů (metoda Real-time PCR)

## 5.2 Optimalizace metody ARMS-PCR

Celkem jsem provedla 15 optimalizačních reakcí (viz kapitoly 5.2.1 – 5.2.15). Pro každou optimalizační reakci uvádím složení reakční směsi, koncentraci DNA použitých vzorků a reakční profil reakce. Fotografie proběhlé elektroforézy uvádím pouze v případě bezproblémového odečtení výsledků. Z vlastního gelu jsem výsledné produkty odečetla pokaždé, ale některé fotografie nebyly tak kvalitní.

### 5.2.1 Optimalizační reakce č. 1

Během první optimalizační reakce jsem provedla vyšetření vzorků všech tří genotypů – homozygota 4G/4G, heterozygota 4G/5G a homozygota 5G/5G. Pro každý vzorek jsem připravila dvě reakce v oddělených zkumavkách. Jedna reakce obsahovala primer 4G, druhá reakce obsahovala primer 5G. Do reakční směsi jsem přidala také DMSO (dimethylsulfoxid). Funkcí DMSO je zvýšení výtěžku PCR reakce.

Složení reakční směsi jsem uvedla v tab. 13. V tabulce je uvedený objem reagentů pro jednu reakci. Reakční profil převzat z práce Shaghghi *et al* (2014), ze které jsem vycházela, viz tab. 7. Koncentrace DNA použitých vzorků jsem uvedla v tab. 14.

Tabulka 13: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č.1)

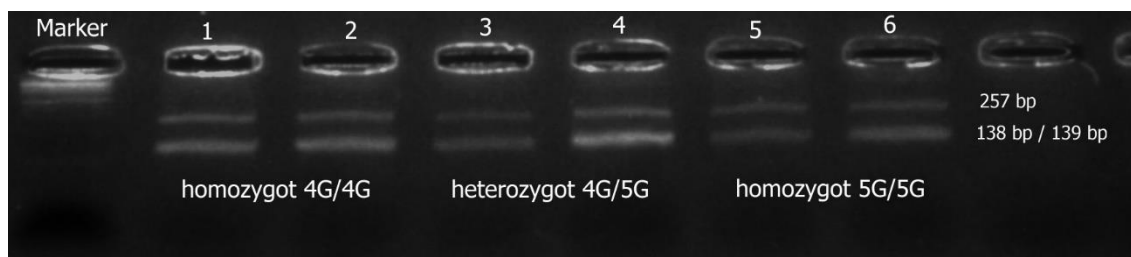
Reagencie	Množství
PCRBIO Taq Mix Red	12,5 µl
Primer upstream(20µM)	0,5 µl
Primer downstream (20µM)	0,5 µl
Primer 4G (20µM)/ primer 5G (20µM)	0,5 µl
DMSO (100%)	1,25 µl
H <sub>2</sub> O – injekční voda	7,75 µl
Izolát DNA	2,0 µl

Tabulka 14: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 1)

LIČ	Genotyp	Koncentrace (ng/µl)
5/19	4G/4G	59,7
8/18	4G/5G	39,5
230/17	5G/5G	89,3

### 5.2.1.1 Výsledek optimalizační reakce č. 1

Pozitivní kontrola o velikosti 257 bp vyšla v každé reakci. Z elektroforetického gelu (obr. 7) je dále patrná amplifikace PCR produktu o velikosti 138 nebo 139 bp ve všech zkumavkách, tj. všechny vzorky se jevily jako heterozygot 4G/5G –. V jamkách č. 1, 3 a 5 jsou reakce s primerem pro 4G alelu. V jamkách 2, 4 a 6 jsou reakce s primerem pro 5G alelu.



Obrázek 7: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 1)

### 5.2.2 Optimalizační reakce č. 2

Při druhé optimalizační reakci jsem použila všechny čtyři primery uvedené v tab. 6 v jedné reakci. Předpokládala jsem kompetici primerů. Použila jsem vzorky s genotypem 4G/5G a 5G/5G, jejichž koncentrace jsem zapsala do tab. 16. Složení reakční směsi pro jednu reakci jsem uvedla v tab. 15. Reakční profil opět vycházel z článku Shaghghi *et al.* (2014), viz tab. 7.

Tabulka 15: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č.2)

Reagencie	Množství
PCRBIO Taq Mix Red	12,5 µl
Primer upstream (20µM)	0,5 µl
Primer downstream (20µM)	0,5 µl
Primer 4G (20µM)	0,5 µl
Primer 5G (20µM)	0,5 µl
DMSO	2,5 µl
H <sub>2</sub> O – injekční voda	6,0 µl
Izolát DNA	2,0 µl

Tabulka 16: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 2)

LIČ	Genotyp	Koncentrace (ng/µl)
239/17	4G/5G	71,2
227/17	5G/5G	17,3

#### 5.2.2.1 Výsledek optimalizační reakce č. 2

Po provedení elektroforézy jsem odečetla výsledky. Kontrolní produkty chyběly. U obou reakcí se amplifikoval jeden produkt, ale nešla určit jeho velikost – zda se jedná o 138 bp nebo o 139 bp. Nebylo možné rozeznat ani předpokládané dva pruhy u heterozygota.

### 5.2.3 Optimalizační reakce č. 3

Při přípravě optimalizační reakce č. 3 jsem postupovala obdobně jako při optimalizační reakci č. 1, ale do reakcí jsem napipetovala větší objem DMSO. Připravila jsem si dvě

reakce pro každý vzorek, jednu reakci pro 4G primer, druhou reakci pro 5G primer. Složení reakční směsi pro jednu reakci je popsáno v tab. 17. Pro tuto optimalizaci jsem použila vzorky s genotypem 4G/4G a 5G/5G, jejichž koncentrace DNA jsou uvedené v tab. 18. Reakční protokol odpovídal článku (tab. 7).

Tabulka 17: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 3)

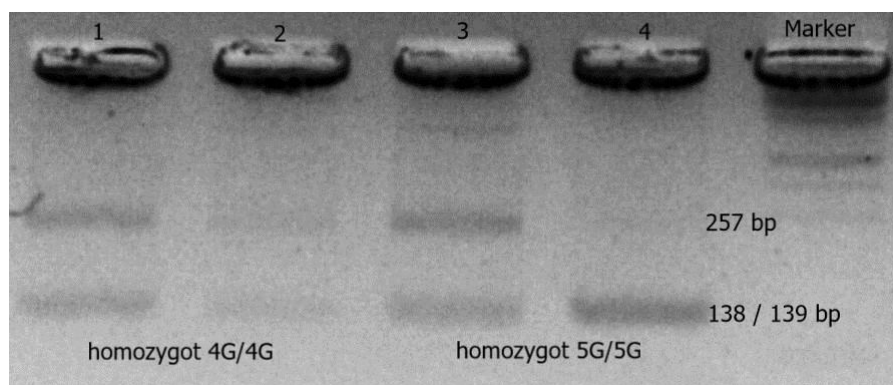
Reagencie	Množství
PCRBIO Taq Mix Red	12,5 µl
Primer upstream (20µM)	0,5 µl
Primer downstream (20µM)	0,5 µl
Primer 4G (20µM) / primer 5G (20µM)	0,5 µl
DMSO	2,0 µl
H <sub>2</sub> O – injekční voda	7,0 µl
Izolát DNA	2,0 µl

Tabulka 18: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 3)

LIČ	Genotyp	Koncentrace (ng/µl)
31/16	4G/4G	38,6
230/17	5G/5G	89,3

### 5.2.3.1 Výsledek optimalizační reakce č. 3

Z fotografie gelu na obr. 8 lze odečíst produkty ve všech reakcích – oba vzorky vyšly jako heterozygoti 4G/5G. U vzorku s genotypem 5G/5G chyběl kontrolní produkt.



Obrázek 8: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 3),

#### 5.2.4 Optimalizační reakce č. 4

Připravila jsem tři oddělené reakce, kdy v jedné reakci byl 4G primer, v druhé 5G primer a ve třetí kontrolní primer upstream. Primer downstream byl součástí každé reakce. DMSO jsem nepoužila. Opět jsem použila vzorky s genotypem mutant (4G/4G) a wild type (5G/5G) – viz tab. 20. Poměr reagensií je uveden v tab. 19. Reakční protokol reakce jsem nezměnila (tab. 7).

Tabulka 19: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 4)

Reagencie	Množství
PCRBIO Taq Mix Red	12,5 µl
Primer upstream (20µM) / Primer 4G (20µM)/ Primer 5G (20µM)	0,5 µl
Primer downstream (20µM)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O – injekční voda	9,5 µl
Izolát DNA	2,0 µl

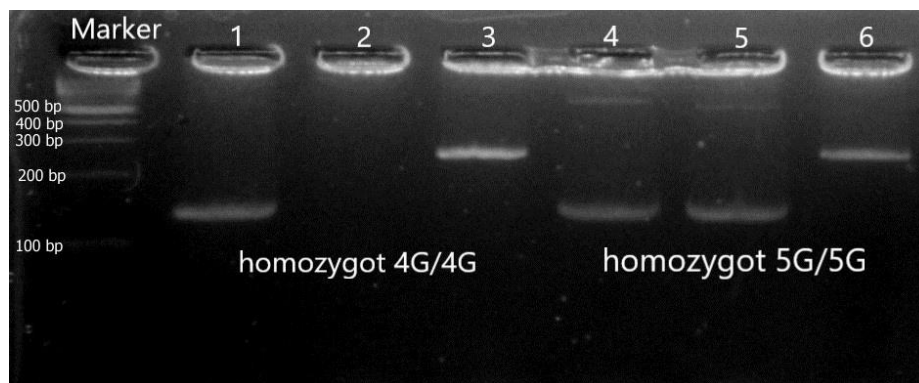
Tabulka 20: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 4)

LIČ	Genotyp	Koncentrace (ng/µl)
225/17	4G/4G	201,0
230/17	5G/5G	89,3

##### 5.2.4.1 Výsledek optimalizační reakce č. 4

Po provedení elektroforézy jsem odečetla výsledky z gelu (obr. 9). Kontrolní produkt (jamka č. 3 a 6) se amplifikoval pro oba vzorky. Vzorek s genotypem 4G/4G vyšel správně, ale vzorek s genotypem 5G/5G se na gelu jevil jako heterozygot 4G/5G. Na gelu je v jamkách 1 a 4 reakce s 4G primerem. V jamkách 2 a 5 je reakce s 5G primerem.





Obrázek 9: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 4)

### 5.2.5 Optimalizační reakce č. 5

Pro další optimalizační reakci jsem zkusila použít Taq polymerázu a PCR pufr místo komerčního MasterMixu. Reakční směs, jejíž složení uvádím v tab. 21, měla celkový objem 50  $\mu$ l. Pro každý genotyp (4G/4G, 4G/5G, 5G/5G) jsem připravila vždy jednu reakci s primerem 4G a jednu s primerem 5G. Koncentrace DNA použitých vzorků jsou uvedené v tab. 22. Kontrolní primer upstream jsem nepoužila.

Tabulka 21: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 5)

Reagencie	Množství
5x MyTaq (Red) Reaction Buffer	10,0 $\mu$ l
MyTaq DNA Polymeráza	0,2 $\mu$ l
Primer 4G (20 $\mu$ M) / Primer 5G (20 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
Primer downstream (20 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O – injekční voda	35,8 $\mu$ l
Izolát DNA	2,0 $\mu$ l

Tabulka 22: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 5)

LIČ	Genotyp	Koncentrace (ng/ $\mu$ l)
225/17	4G/4G	201,0
48/16	4G/5G	23,9
26/16	5G/5G	16,6

### 5.2.5.1 Výsledek optimalizační reakce č. 5

Po provedení elektroforézy byly na gelu produkty o velikosti 138 bp (139 bp) u všech reakcí, avšak neodpovídaly danému genotypu – kromě heterozygota. Všechny vzorky se tedy nesprávně jevily jako heterozygoti.

### 5.2.6 Optimalizační reakce č. 6

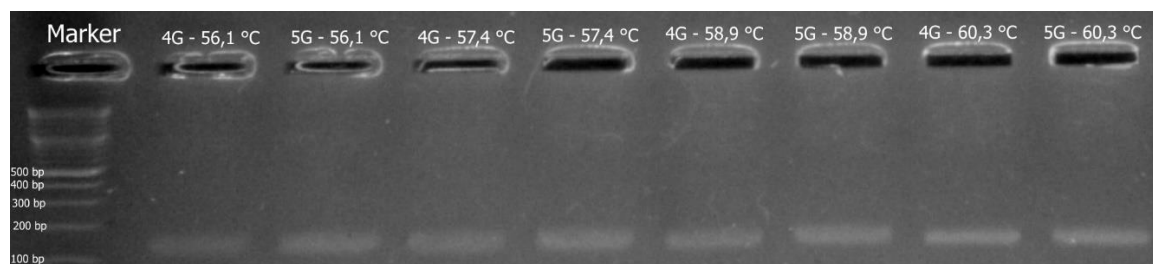
Použila jsem teplotní gradient, abych zjistila optimální annealingovou teplotu pro primer 4G. Použila jsem vzorek s genotypem 5G/5G – LIČ 227/17 (koncentrace izolátu je uvedena v tab. 16). Složení reakční směsi jsem uvedla v tab. 23. Kontrolní primer upstream jsem opět nepoužila. Pro každou teplotu jsem připravila reakci s 4G primerem a s 5G primerem. Celkem jsem testovala 4 annealingové teploty – 56,1 °C; 57,4 °C; 58,9 °C; 60,3 °C.

Tabulka 23: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 6)

Reagencie	Množství
PCRBIO Taq Mix Red	12,5 µl
Primer 4G (20µM)/ Primer 5G (20µM)	0,5 µl
Primer downstream (20µM)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O – injekční voda	9,5 µl
Izolát DNA	2,0 µl

#### 5.2.6.1 Výsledek optimalizační reakce č. 6

Jak lze vidět na obr. 10, došlo k amplifikaci všech produktů s oběma primery. Z intenzity pruhů lze odečíst, že vyšší teplota annealingu je výhodnější a zajišťuje větší výtěžnost reakce.



Obrázek 10: Fotografie elektroforetického gelu – teplotní gradient

### 5.2.7 Optimalizační reakce č. 7

Složení reakční směsi bylo identické s optimalizací č.6 (tab. 23). Pro každý vzorek jsem připravila dvě reakce, jednu s 4G primerem a druhou s 5G primerem. Kontrolní primer upstream jsem nepoužila. Koncentrace použitých vzorků je znázorněna v tab. 24. Na základě výsledku teplotního gradientu jsem upravila reakční profil reakce – annealingovou teplotu jsem zvýšila na 65 °C (tab. 25).

Tabulka 24: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 7)

LIČ	Genotyp	Koncentrace (ng/μl)
48/16	4G/4G	23,3
227/17	5G/5G	17,3

Tabulka 25: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 7)

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	20 s	30
Annealing	65 °C	10 s	
Extenze	72 °C	20 s	
Terminální extenze	72 °C	3 min	1

#### 5.2.7.1 Výsledek optimalizační reakce č. 7

Na elektroforetickém gelu jsem odečetla výsledky. Vzorek s genotypem 4G/4G vyšel dobře. U homozygota 5G/5G se na gelu objevil slabý pruh i pro alelu 4G.

### 5.2.8 Optimalizační reakce č. 8

Postupovala jsem stejně jako při předchozí optimalizační reakci č. 7, ale annealingovou teplotu jsem zvýšila na 67 °C (tab. 27). Složení reakční směsi tedy odpovídá tab. 23. Opět jsem pro testování optimálních parametrů reakce použila vzorky s genotypy 4G/4G a 5G/5G, jejichž koncentraci DNA jsem zapsala do tab. 26.

Tabulka 26: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 8)

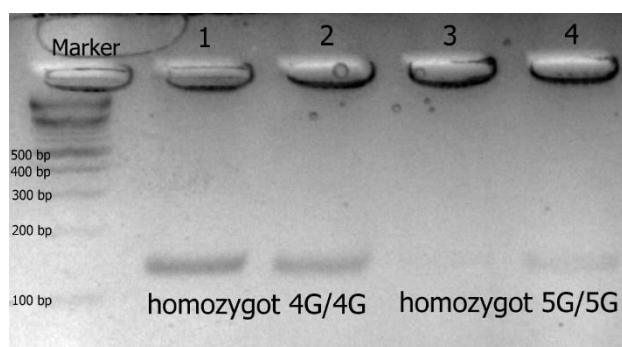
LIČ	Genotyp	Koncentrace (ng/μl)
237/17	4G/4G	236,0
227/17	5G/5G	17,3

Tabulka 27: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 8)

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	20 s	30
Annealing	67 °C	10 s	
Extenze	72 °C	20 s	
Terminální extenze	72 °C	3 min	1

#### 5.2.8.1 Výsledek optimalizační reakce č. 8

Třebaže z fotografie na obr. 11 lze výsledek této reakce odečíst hůře než z gelu pod UV světlem, je patrné, že se metodu opět nepodařilo zoptimalizovat. Vzorek s genotypem 4G/4G se na gelu jeví jako heterozygot 4G/5G. Vzorek s genotypem 5G/5G vyšel správně.



Obrázek 11: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 8)

### 5.2.9 Optimalizační reakce č. 9

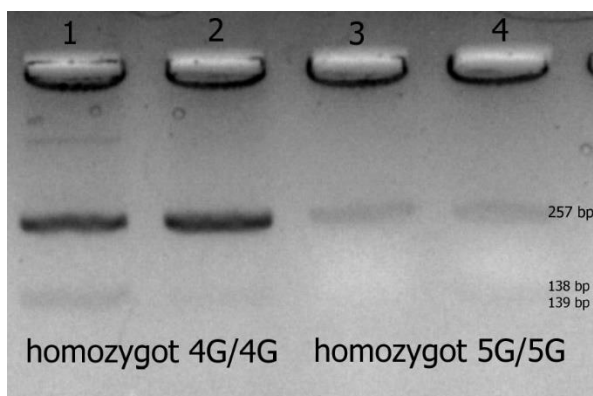
Při této optimalizační reakci jsem použila stejné vzorky jako při optimalizační reakci č. 8 (tab. 26). Opět jsem připravila dvě reakce pro každý vzorek – jednu s primerem 4G, druhou s primerem 5G. Do reakční směsi jsem napipeptovala i kontrolní primer upstream. Složení reakční směsi je blíže popsáno v tab. 28. Reakční profil reakce se shodoval s optimalizační reakcí číslo 7 – viz tab. 25.

Tabulka 28: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 9)

Reagencie	Množství
PCRBIO Taq Mix Red	12,5 $\mu$ l
Primer 4G (20 $\mu$ M) / Primer 5G (20 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
Primer downstream (20 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
Primer upstream (20 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O – injekční voda	9,0 $\mu$ l
Izolát DNA	2,0 $\mu$ l

#### 5.2.9.1 Výsledek optimalizační reakce č. 9

Z fotografie na obr. 12 je patrné, že kontrolní produkty vyšly pro všechny reakce. K amplifikaci dalšího produktu došlo pouze u vzorku s genotypem 4G/4G, a to v reakci s primerem 4G. U vzorku s genotypem 5G/5G nedošlo kromě kontrolního produktu k žádné amplifikaci.



Obrázek 12: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 9)

### 5.2.10 Optimalizační reakce č. 10

Při přípravě této optimalizační reakce jsem změnila objem primeru 4G a primeru 5G (viz tab. 30). Opět jsem použila vzorky s genotypem 4G/4G a 5G/5G – koncentrace DNA je uvedena v tab. 29. Reakční profil reakce se shodoval s optimalizační reakcí č. 8 (tab. 27), tzn. annealingová byla teplota 67 °C.

Tabulka 29: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 10)

LIČ	Genotyp	Koncentrace (ng/μl)
237/17	4G/4G	236,0
176/17	5G/5G	89,8

Tabulka 30: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 10)

Reagencie	Množství
PCRBIO Taq Mix Red	12,5 μl
Primer 4G (20μM) / Primer 5G(20μM)	0,2 μl
Primer downstream (20μM)	0,5 μl
Primer upstream (20μM)	0,5 μl
H <sub>2</sub> O – injekční voda	9,3 μl
Izolát DNA	2,0 μl

#### 5.2.10.1 Výsledek optimalizační reakce č. 10

Po provedení elektroforézy jsem vyhodnotila výsledky. Na elektroforetickém gelu šlo odečíst homozygota 4G/4G jako heterozygota, třebaže pruh pro 5G byl slabý. Druhý vzorek, homozygot 5G/5G, na gelu vyšel dobře. Kontrolní produkt vyšel pro všechny reakce.

### 5.2.11 Optimalizační reakce č. 11

Během přípravy další optimalizační reakce jsem snížila objem i kontrolního primeru upstream (tab. 31). Také jsem pozměnila reakční protokol reakce, který je uveden v tab. 31. Použila jsem stejné vzorky jako u předchozí optimalizační reakce (tab. 29). Pro každý vzorek jsem připravila dvě reakce, jednu s primerem 4G a jednu s primerem 5G.

Tabulka 31: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 11)

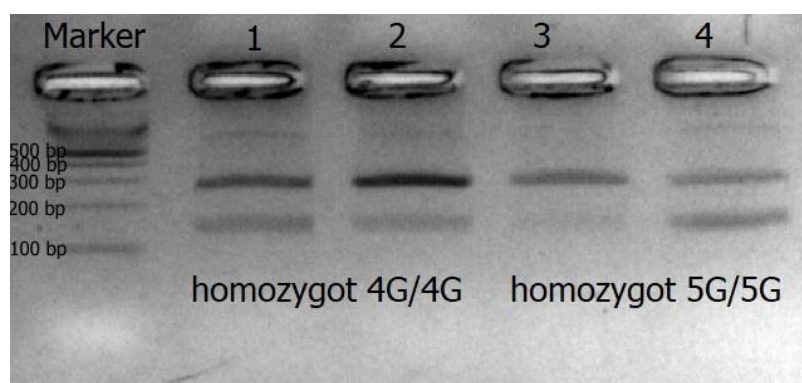
<b>Reagencie</b>	<b>Množství</b>
PCRBIO Taq Mix Red	12,5 $\mu$ l
Primer 4G (20 $\mu$ M) / Primer 5G (20 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ l
Primer downstream (20 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
Primer upstream (20 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O – injekční voda	9,6 $\mu$ l
Izolát DNA	2,0 $\mu$ l

Tabulka 32: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 11)

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	20 s	10
Annealing	67 °C	10 s	
Extenze	72 °C	20 s	
Denaturace	95 °C	20 s	20
Annealing	60 °C	10 s	
Extenze	72 °C	20 s	
Terminální extenze	72 °C	3 min	1

#### 5.2.11.1 Výsledek optimalizační reakce č. 11

Fotografie elektroforetického gelu na obr. 13 ukazuje, že kontrolní i 4G/5G produkt vyšel u všech reakcí. Třebaže produkt reakce s primerem 4G u vzorku s genotypem 5G/5G (jamka č. 3) vyšel pouze slabě, oba vzorky se na gelu jeví jako heterozygoti.



Obrázek 13: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 11)

#### 5.2.12 Optimalizační reakce č. 12

Při další optimalizaci jsem opět upravila reakční profil reakce – viz tab. 35. Také jsem do reakční směsi dala méně primeru downstream (0,3 µl). Složení reakční směsi této reakce



je uvedeno v tab. 34. Pro každý vzorek, jejichž koncentrace je v tab. 33, jsem připravila opět dvě reakce – jednu s primerem 4G a jednu s primerem 5G.

Tabulka 33: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 12)

LIČ	Genotyp	Koncentrace (ng/μl)
237/17	4G/4G	236,0
159/17	5G/5G	72,8

Tabulka 34: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 12)

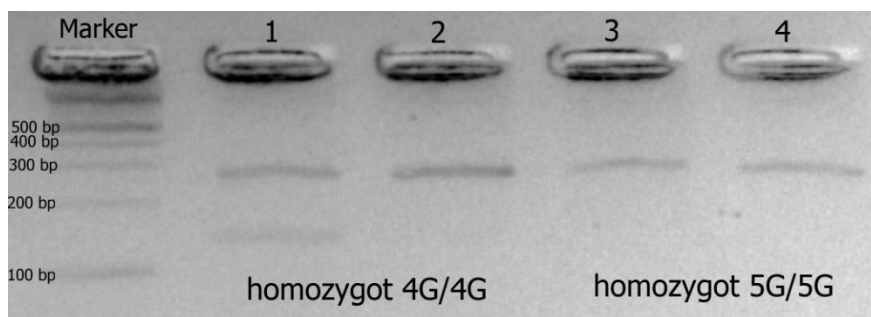
Reagencie	Množství
PCRBIO Taq Mix Red	12,5 μl
Primer 4G (20μM)/ Primer 5G (20μM)	0,2 μl
Primer downstream (20μM)	0,3 μl
Primer upstream (20μM)	0,2 μl
H <sub>2</sub> O – injekční voda	9,8 μl
Izolát DNA	2,0 μl

Tabulka 35: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 12)

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	20 s	15
Annealing	68 °C	15 s	
Denaturace	95 °C	20 s	20
Annealing	60 °C	10 s	
Extenze	72 °C	20 s	
Terminální extenze	72 °C	3 min	1

### 5.2.12.1 Výsledek optimalizační reakce č. 12

Jak je patrné z fotografie (obr. 14), kontrolní produkty vyšly pro všechny reakce. Primer 4G se navázal správně, tzn. pouze v reakci vzorku s genotypem 4G/4G (jamka č. 1). V přítomnosti primeru 5G PCR produkt nevznikl.



Obrázek 14: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 12)

### 5.2.13 Optimalizační reakce č.13

Pro další optimalizační reakci jsem použila stejné vzorky jako u předchozí optimalizace (tab. 33). Připravila jsem si i stejnou reakční směs (tab. 34). Pro každý vzorek jsem namíchala dvě reakce – jednu s primerem 4G, jednu s primerem 5G. Změnila jsem reakční profil reakce – viz tabulka č. 36. Pro primer 4G a primer 5G jsem nastavila odlišné annealingové teploty.

Tabulka 36: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 13)

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	20 s	10
Annealing	67 °C (5G primer); 68 °C (4G primer)	10 s	
Extenze	72 °C	20 s	
Denaturace	95 °C	20 s	20
Annealing	60 °C	10 s	
Extenze	72 °C	20 s	
Terminální extenze	72 °C	3 min	1

#### 5.2.13.1 Výsledek optimalizační reakce č. 13

Kontrolní pruhy vyšly pro všechny reakce. Dále se amplifikoval pouze produkt 4G alely u vzorku s genotypem 4G/4G. U druhého vzorku se očekávaný PCR produkt, neamplifikoval.

#### 5.2.14 Optimalizační reakce č. 14

Další optimalizační reakce se lišila pouze navýšením počtu cyklů reakce – viz tabulka č. 38. Při přípravě reakční směsi jsem postupovala stejně jako u předchozí optimalizační reakce – viz tab. 34. Koncentrace použitých vzorků jsem uvedla v tab. 37.

Tabulka 37: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 14)

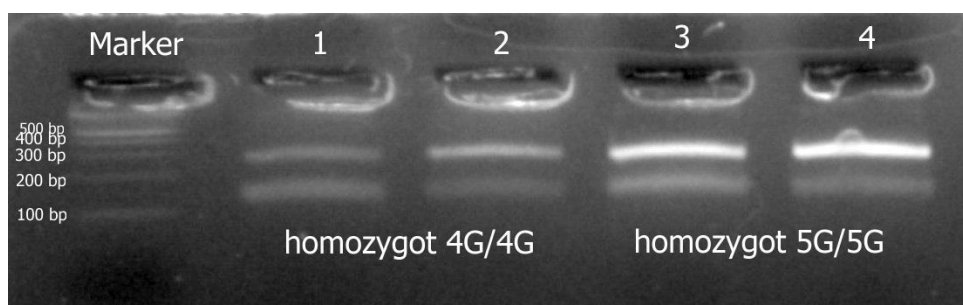
LIČ	Genotyp	Koncentrace (ng/μl)
95/17	4G/4G	19,6
159/17	5G/5G	72,8

Tabulka 38: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 14)

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	20 s	15
Annealing	67 °C (5G primer); 68 °C (4G primer)	10 s	
Extenze	72 °C	20 s	
Denaturace	95 °C	20 s	20
Annealing	60 °C	10 s	
Extenze	72 °C	20 s	
Terminální extenze	72 °C	3 min	1

#### 5.2.14.1 Výsledek optimalizační reakce č. 14

Pro detekci produktů reakce jsem provedla elektroforézu – obr. 15. Došlo k navázání všech primerů v každé reakci – tzn. na gelu je možné u obou vzorků odečíst genotyp 4G/5G.



Obrázek 15: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 14)

#### 5.2.15 Optimalizační reakce č. 15

Pro tuto optimalizační reakci jsem upravila objem kontrolního primeru upstream na 0,05 µl – viz tab. 40. Reakční profil reakce byl shodný s předchozí optimalizační reakcí (tab. 38). Reakci jsem připravila opět pro dva vzorky s genotypy wild type (5G/5G) a mutant

(4G/4G). Koncentrace DNA těchto vzorků je uvedena v tab. 39. Pro každý vzorek jsem připravila dvě reakce, jednu s primerem 4G a jednu s primerem 5G.

*Tabulka 39: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 15)*

<b>LIČ</b>	<b>Genotyp</b>	<b>koncentrace (ng/μl)</b>
87/17	4G/4G	10,9
151/17	5G/5G	39,3

*Tabulka 40: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 15)*

<b>Reagencie</b>	<b>Množství</b>
PCRBIO Taq Mix Red	12,50 μl
Primer 4G (20μM) / Primer 5G (20μM)	0,20 μl
Primer downstream (20μM)	0,30 μl
Primer upstream (20μM)	0,05 μl
H <sub>2</sub> O – injekční voda	10,05 μl
Izolát DNA	2,00μl

#### **5.2.15.1 Výsledek optimalizační reakce č. 15**

Po provedení elektroforézy jsem pod UV světlem z gelu odečetla výsledky. Na gelu byl pouze produkt u vzorku s genotypem 5G/5G pro reakci s primerem 5G. Kontrolní produkty se neamplifikovaly.

## 6 Diskuze

Polymorfismus 4G/5G v genu *PAI-1* se řadí mezi trombofilní mutace. Avšak vyšetření tohoto polymorfismu je indikováno jen ve vybraných případech, a to pouze trombotickými centry nebo Ústavem hematologie a krevní transfuze v Praze. Zásadní klinický význam dle Cohen *et al.* má pouze vyšetření mutace FV Leiden a mutace pro protrombin. (Cohen *et al.*, 2007) Taktéž je nutné si uvědomit, že samotná detekce mutace bez korelace s klinickým stavem, může být kontraproduktivní. Vědomí detekovaného „handicapu“ by mohlo být pro některé pacienty velkým stresem, přestože pozitivní nález mutace nemusí znamenat, že onemocní. Provádění vyšetření pouze pro samotné vyšetření není přínosné.

Role *PAI-1* polymorfismu, ale i inhibitoru samotného, byla studována i v souvislosti s dalšími chorobami, jako je Alzheimerova choroba, obezita, rakovina či neplodnost. Některé zdroje dokonce hovoří o *PAI-1* jako o možném faktoru pro hodnocení prognózy a vývoje onemocněních, které doprovázejí stáří. (Cesari *et al.*, 2010) Horší prognózu rakoviny prsu v souvislosti s 4G alelou *PAI-1* polymorfismu zaznamenalo hned několik studií. (Castelló *et al.*, 2006) Na druhou stranu některé studie naopak označují 4G alelou jako „ochranou“ proti vzniku rakoviny prsu. (Younesi *et al.*, 2016) Z toho vyplývá, že v tomto případě není postoj vědců ke vlivu polymorfismu *PAI-1* jednoznačný.

V praktické části této práce jsem se zabývala dvěma odlišnými metodami detekce polymorfismu 4G/5G v genu *PAI-1*. První metodou byla Real-time PCR. Provedla jsem vyšetření 16 vzorků pomocí komerčního kitu GeneProof - *PAI-1* Genotyping PCR (CE IVD). Tento komerční kit zajišťuje poměrně rychlou a snadnou detekci sledovaného polymorfismu. Vyšetřovaný soubor vzorků byl již dříve v laboratoři GENLABS s.r.o. vyšetřen na Leidenskou mutaci, pro kterou byly všechny vzorky pozitivní v heterozygotním stavu. V rámci vyšetřeného souboru vzorků jsem detekovala pouze dva 4G/4G genotypy, tj. 13% zastoupení v daném souboru. Heterozygotní genotyp (4G/5G) jsem detekovala u 8 vzorků, tj. přesně 50 % z vyšetřovaného souboru 16 jedinců s Leidenskou mutací. U zbytku souboru (38 %) jsem detekovala genotyp „wild type“, čili 5G/5G. Prevalence 4G/4G genotypu je ve vyšetřeném souboru nižší v porovnání se studií prof. Kvasničky *et al.*, kde byla prevalence tohoto genotypu u pozitivních jedinců pro Leidenskou mutaci stanovena na 31,78 % (ze souboru o 129 vzorcích). (Kvasnička *et al.*,

2012) Vzhledem k nízkému počtu vyšetřovaných vzorků není prevalence, ke které jsem došla, relevantní.

Druhou metodou detekce polymorfismu 4G/5G v genu *PAI-1* byla metoda ARMS-PCR. Hlavním cílem této práce byla právě optimalizace této metody, kterou jsem převzala z odborné publikace. Třebaže jsem provedla celkem 15 optimalizačních reakcí, metodu se mi zoptimalizovat nepodařilo.

Během optimalizace jsem měnila nejen složení a poměr komponentů reakční směsi, ale také jsem zkoušela upravit reakční profil reakce. Velkou pozornost jsem věnovala annealingové teplotě, ale taktéž jsem upravovala počet cyklů reakce.

Produktem 4G alely je fragment o délce 138 bp, produktem 5G alely je fragment delší pouze o jednu bázi, tj. 139 bp. Není možné dát oba primery do jedné reakce, protože na elektroforetickém gelu nelze rozlišit produkty s téměř identickou velikostí – viz optimalizační reakce č.2. Z tohoto důvodu jsem nemohla testovat kompetici primeru 4G a primeru 5G, jelikož jsem na 4% agarózovém gelu nebyla schopna odečíst výsledek.

Annealingová teplota dle zdrojového článku (Shaghghi *et al.*, 2014) byla poměrně nízká – 55 °C. Dle výpočtu teplot annealingu pro jednotlivé primery (tab. 7) je ideální teplota vyšší. Konkrétně: pro primer upstream 73 °C, pro primer downstream 75 °C, pro primer 4G 61 °C a pro primer 5G 63 °C. Nízká teplota annealingu má za následek nespecifické nasedání primerů, ke kterému došlo ve většině optimalizačních reakcí. Z tohoto důvodu jsem udělala teplotní gradient (optimalizační reakce č. 6). Zjistila jsem, že primery nasedají i při teplotě 60,3 °C. Přičemž primer 4G nasednout správně neměl, jelikož jsem teplotní gradient prováděla na vzorku s genotypem 5G/5G. Následující optimalizační reakce jsem prováděla s teplotou annealingu 65 °C až 68 °C. Pro primer 4G byla vhodná i teplota 68 °C, ale primer 5G při této teplotě annealingu již nenedl. Došla jsem k závěru, že reálná optimální teplota annealingu pro jednotlivé primery bude odlišná, ale vhodnou annealingovou teplotu pro primer 5G se mi určit nepodařilo.

Pro optimalizační reakce jsem používala vzorky DNA s různou koncentrací DNA (10,9 – 236 ng/μl). Vliv vyšší koncentrace DNA na výsledek reakce jsem nezaznamenala. Hoppe *et al.* ve své metodice pro vyšetření polymorfismu v *PAI-1* genu metodou ARMS-PCR uvádí, že používal vzorky o koncentraci DNA 100 ng/μl. (Hoppe *et al.*, 2003) Stejnou

hodnotu koncentrace uvádí i Zonouzi *et al.* (Zonouzi *et al.*, 2013). Mé vzorky měly průměrnou koncentraci pouze 65,55 ng/μl.

Ve zdrojovém článku nebyl uveden poměr reagensů, proto jsem během optimalizace upravovala i objem primerů v reakční směsi. Objem primeru 4G a primeru 5G jsem z počátečních 0,5 μl snížila na 0,2 μl. Stejně jsem postupovala i s kontrolním primerem upstream, u kterého jsem objem zkusila snížit i více (na 0,05 μl), ale poté na gelu chyběly kontrolní produkty (viz. optimalizační reakce č. 15). Objem společného primeru downstream jsem snížila na 0,3 μl.

Pro zvýšení výtěžku reakce jsem do reakční směsi přidala DMSO. Výsledek reakce ovšem DMSO neovlivnilo, proto jsem ho nepoužila ve všech reakcích. Na průběh reakce nemělo vliv ani použití Taq polymerázy a PCR pufru místo komerčního MasterMixu (optimalizační reakce č. 5).

Jiné odborné publikace, kde polymorfismus v genu *PAI-1* vyšetřovali taktéž metodou ARMS-PCR, se v metodice odlišují v porovnání s článkem, ze kterého jsem pro svou práci vycházela. Například Falk *et al.* (Falk *et al.*, 1995) použili delší primery a jiný reakční protokol. Blasiak a Smolarz (Blasiak a Smolarz, 2000) použili stejné primery jako Falk *et al.*, ale ještě jiný reakční protokol. Zásadní rozdíl mezi nimi byl v odlišné teplotě annealingu – 54 °C a 65 °C.

Z časových důvodů jsem dále v optimalizaci metody ARMS-PCR nepokračovala. V případě zdařilé optimalizace metody ARMS-PCR by mohlo být vyšetřeno více vzorků, díky nimž bych mohla stanovit relevantnější prevalenci sledovaného polymorfismu. Při případných dalších snahách o optimalizaci bych použila vzorky s vyšší koncentrací DNA. Dále bych mohla experimentovat s poměrem kontrolního primeru upstream k ostatním primerům. Užitečné informace by mohlo přinést i provedení teplotního gradientu pro primer 4G a primer 5G, a to zároveň s použitím kontrolního primeru.

Při studiu odborných publikací, z nichž jsem vycházela při pokusu o zavedení metody pro vyšetření polymorfismů 4G/5G v genu *PAI-1* do laboratorní praxe, jsem narazila na některé zásadní neshody ve smyslu detekce výsledných PCR produktů lišících se velikostně v 1 bázi na 2% agarózovém gelu, rozdílných použitých anealingových teplotách lišících se až o 10 °C apod. Uvedené studie neuvádí žádné technické problémy během analýzy daného polymorfismu a na základě toho jsem předpokládala, že



publikovaný postup je jednoduše přenosný do laboratorní praxe. Ovšem z výsledků mé vyčerpávající práce na optimalizaci metody ARMS-PCR vyplývá, že ne všechny publikace uvádějí přesné a validované laboratorní postupy. V případě zavádění tzv. „in house“ metody je pak v některých případech rozumnější spíše se spíše na vlastní zkušenosti s různými laboratorními metodami, navrhnout si vlastní primery i reakční protokoly a použít postupy co nejvíce odpovídající technickému i personálnímu vybavení laboratoře.

Závěrem mohu říct, že optimalizace může být velice zdlouhavý proces, a ne vždy úspěšný. Komerční metoda, jako je například GeneProof - PAI-1 Genotyping PCR kit (CE IVD), je v tomto ohledu výhodnější. Není třeba ji optimalizovat, a tak k úspěšnému provedení metody stačí důsledné dodržování postupu uvedeného výrobcem a dodržování správné laboratorní praxe z hlediska přesnosti práce, kontaminace apod. Na druhou stranu úspěšně zoptimalizovaná „in-house“ metoda je z hlediska nákladů příznivější.

## 7 Závěr

V teoretické části práce jsem sepsala rešerši obsahující základní informace o dané problematice. V praktické části jsem se věnovala metodám detekce polymorfismu v genu *PAI-1*.

Hlavní cíl mé bakalářské práce, optimalizace PCR metody pro vyšetření polymorfismu v genu *PAI-1*, se mi splnit nepodařilo. Ovšem díky zdlouhavému procesu optimalizace jsem si velice dobře osvojila metodiku. Taktéž jsem si osvojila další laboratorní postupy, které byly pro mou práci nezbytné – izolace DNA z bukalního stěru a z plné krve, měření koncentrace DNA, přípravu a provedení gelové elektroforézy a analýzu získaných výsledků.

Vyšetření polymorfismu jsem provedla také pomocí komerčního kitu GeneProof - PAI-1 Genotyping PCR (CE IVD). V případě použití tohoto certifikovaného kitu není nutná optimalizace metody, a proto je zavedení jeho rutinního používání do laboratoře snadnější. Genotyp 4G/4G jsem detekovala pouze u 2 vzorků z vyšetřovaného souboru, který byl specifický pozitivitou na Leidenskou mutaci v heterozygotním stavu. Zastoupení genotypu 4G/4G ve vyšetřovaném souboru bylo pouze 13 %, což je v porovnání s literaturou více než dvojnásobně nižší.

## 8 Seznam literatury

AFLALO, E.D., SOD-MORIAH, U.A., POTASHNIK, G., HAR-VARDI, I., 2004. Differences in the implantation rates of rat embryos developed in vivo and in vitro: possible role for plasminogen activators. *Fertil Steril.* 81(1), 780-785. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.10.014.

AKHTER, M.S., BISWAS, A., ABDULLAH, S.M., BEHARI, M., SAXENA, R., 2017. The Role of PAI-1 4G/5G Promoter Polymorphism and Its Levels in the Development of Ischemic Stroke in Young Indian Population. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 23(8), 1071-1076. doi: 10.1177/1076029617705728.

ALIZADEH, H., MA, D., BERMAN, M., BELLINGHAM, D., COMERFORD, S.A., GETHING, M.J., SAMBROOK, J.F., NEIDERKORN, J.Y., 1995. Tissue-type plasminogen activator-induced invasion and metastasis of murine melanomas. *Curr Eye Res.* 14(6), 449-58. ISSN: 0271-3683

ANDREASEN, P.A., KJOLLER, L., CHRISTENSEN, L., DUFFY, M.J., 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis. *Int J Cancer.* 72(1), 1–22. ISSN: 0020-7136

BEHRENDT, N., LIST, K., ANDREASEN, P. A., DANØ, K., 2003. The pro-urokinase plasminogen-activation system in the presence of serpin-type inhibitors and the urokinase receptor: rescue of activity through reciprocal pro-enzyme activation. *Biochemical Journal.* 371(2), 277–287. doi:10.1042/bj20021508.

BLASI, F., CARMELIET, P., 2002. UPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nature Reviews Molecular Cell.* 3(12), 932-43, doi: 10.1038/nrm977.

BLASIAK, J., SMOLARZ, B. 1999. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is not associated with breast cancer. *Acta Biochimica Polonica.* 47 (1), 191-199.

BOZOK ÇETINTAŞ, V. a C. GÜNDÜZ, 2014. Association between polymorphism of MTHFR c.677CT and risk of cardiovascular disease in Turkish population: a metaanalysis for 2.780 cases and 3.022 controls. *Molecular Biology Reports* [online]. 41(1), 397-409 [cit. 2016-12-26]. doi: 10.1007/s11033-013-2873-z. (citovat jako online zdroj <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6561/>)

BRDIČKA, R., DIDDEN, W., 2018. *Genetika v klinické praxi V*. Praha: Galén. 182 s. ISBN 978-807492-331-9.

BREMME, K., OSTLUND, E., ALMQVIST, I., 1992. Enhanced thrombin generation and fibrinolytic activity in the normal pregnancy and the puerperium. *Obstet Gynecol.* 80, 132-137.

BRENNER, B., 2004. Haemostatic changes in pregnancy. *Thrombosis Research.* 114(5-6), 409–414. doi:10.1016/j.thromres.2004.08.004.

BRUMMEL-ZIEDINS, K., ORFEO, T., SWORDS, J.N., *et al.*, 2009. Blood coagulation and fibrinolysis. *Clinical Hematology*, 12. 528–619.

CASTELLÓ, R., ESPAÑA, F., VÁZQUEZ, C., FUSTER, C., ALMENAR, S. M., AZNAR, J., ESTELLÉS, A., 2006. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in breast cancer patients and its association with tissue PAI-1 levels and tumor severity. *Thrombosis Research*, 117(5), 487–492. doi: 10.1016/j.thromres.2005.03.025.

CESARI, M., PAHOR, M., INCALZI, R.A., 2010. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther.* 28(5), 72-91, doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00171.x.

CESARMAN-MAUS, G., HAJJAR K.A., 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology.* (129), 307-321. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.

COHEN, A.T, AGNELLI, G., ANDERSON, F.A., ARCELUS, J.I., BERGGVIST, D., BRECHT, J.G. GREER, I.A., HEIT, J.A., HUTCHINSON, J.L., KAKKAR, A.K., MOTTIER, D., OGER, E., SAMAMA, M.M., SPANNAGL., M., 2007. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost.* 98(4), 756–764. doi: 10.1160/TH07-03-0212

ČERTÍK, B., 2003. *Akutní končetinová ischemie*. Praha: Grada. 148 s. ISBN 80-247-0624-5.

DALEN, J. E., 2008. Should Patients with Venous Thromboembolism Be Screened for Thrombophilia? *The American Journal of Medicine*. 121(6), 458–463. doi:10.1016/j.amjmed.2007.10.042.

DAWSON, S.J., WIMAN, B., HAMSTEN, A., GREEN, F., HUMPHRIES, S., HENNEY, A.M., 1993. The Two Allele Sequences of a Common Polymorphism in the Promoter of the Plasminogen Activator Inhibitor- 1 (PAI- 1) Gene Respond Differently to Interleukin- 1 in HepG2 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 268 (15), 10739-45.

DOS SANTOS NUNES, M.K., SILVA, A.S., DE QUEIROGA EVANGELISTA, I.W., FILHO, J.M., GOMES, C.N., ANDERSON, R., LUNA, R.C.P., DE CARVALHO COSTA, M.J., DE OLIVEIRA, N.F.P., PERSUHN, D.C., 2017. Hypermethylation in the promoter of the MTHFR gene is associated with diabetic complications and biochemical indicators, *Diabetology and Metabolic Syndrom*. 9(84), doi: 10.1186/s13098-017-0284-3.

DUFFY, M.J., 2002. Urokinase Plasminogen Activator and Its Inhibitor, PAI-1, as Prognostic Markers in Breast Cancer. From. *Clinical Chemistry*. 48 (8), 1194-1197. ISSN 0009-9147.

DUFFY, M.J., 2004. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des*. 10(1), 39–49. doi: 10.2174/1381612043453559.

EGEBERG O., 1965. Inherited Antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh*. 15 (13), 516–530. ISSN: 0340-6245.

ERBEN, K., 2015. Homocystein, civilizační choroby a biochemické zdraví. Praha: Bondy, 196 s. ISBN 978-809-0586-673.

ERIKSSON, P., KALLIN, B., VAN 'T HOOFT, M.V., BÅVENHOLM, P., HAMSTEN, A., 1995. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogenactivator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(6), 1851–1855. doi:10.1073/pnas.92.6.1851.

FALK, G., ALMQVIST, A., NORDENHEM, A., SVENSSON, H., WIMAN, B., 1995. Allele Specific PCR for detection of a Sequence Polymorphism in the Promoter Region

of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Gene. *Fibrinolysis*. 9(3), 170-174. doi: 10.1016/S0268-9499(95)80007-7.

FAY, W. P., GARG, N., SUNKAR, M., 2007. Vascular Functions of the Plasminogen Activation System. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 27(6), 1231-1237, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.140046.

FEKIH-MRISSA, N., MANSOUR, M., SAYEH, A., BEDOUI, I., MRAD, M., RIAHI, A., MRISSA, R., NSIRI, B., 2017. The Plasminogen Activator Inhibitor 1 4G/5G Polymorphism and the Risk of Alzheimer's Disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*. 20(10), 1-5. doi: 10.1177/1533317517705223.

FISCHER, R., SACHS, U. J., HEIDINGER, K. S., EISENBURGER, D., KEMKES-MATTHES, B., 2013. Prevalence of hereditary antithrombin mutations is higher than estimated in patients with thrombotic events. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 24(4), 444–448. doi:10.1097/mbc.0b013e32835cc143.

GAUDET, M., FARA, A.G., BERITOGNOLO, I., SABATTI, M. 2009. Allele-Specific PCR in SNP Genotyping. Single Nucleotide Polymorphisms. *Methods Mol Biol*. 578, 415–424. doi:10.1007/978-1-60327-411-1\_26.

GEHRING, N. H., FREDE, U., NEU-YILIK, G., HUNSDOERFER, P., VETTER, B., HENTZE, M.W., KULOZIK, A.E., 2001. Increased deficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat. Genet*. 28 (4), 389-392. doi: 10.1038/ng578.

GILS, A., DECLERCK, P., 2004. The structural basis for the pathophysiological relevance of PAI-1 in cardiovascular diseases and the development of potential PAI-1 inhibitors. *Thrombosis and Haemostasis*. 91(3), 425–437. doi:10.1160/th03-12-0764.

GOODMAN, C. S., COULAM, C. B., JEYENDRAN, R. S., ACOSTA, V. A., ROUSSEV, R., 2006. Which Thrombophilic Gene Mutations are Risk Factors for Recurrent Pregnancy Loss? *American Journal of Reproductive Immunology*, 56(4), 230–236. doi:10.1111/j.1600-0897.2006.00419.x

GOYETTE, P., SUMNER, J. S., MILOS, R., DUNCAN, A. M. V., ROSENBLATT, D. S., MATTHEWS, R. G., ROZEN, R., 1994. Human methylenetetrahydrofolate reductase:

isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics*, 7(2), 195–200. doi:10.1038/ng0694-195.

GRANT, P.J., 2007. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med*. 262(2), 157-172. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01824.x

GRIS, J.C., RIPART-NEVEU, S., MAUGARD, C., THAILAND, M.L., BRUN, S., COURTIEU, C., BIRON, C., HOFFET, M., HEDON, B., MARES, P., 1997. Respective evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. The Nimes Obstetricians and Haematologists (NOHA) Study. *Thromb Haemost.* 77 (6), 1096–1103. ISSN: 0340-6245.

HALÁMKOVÁ, J., KISS, I., PAVLOVSKÝ, T., ČECH, Z., TUČEK, Š., HANÁKOVÁ, L., MOULIS, M., PENKA, M., 2011. Plasminogen aktivátor systém a jeho klinický význam u pacientů s nádorovým onemocněním. *Klinická onkologie*. 24(6), 418-423. ISSN 1802-5307.

HAMSTEN, A., DE FAIRE, U., WALLDIUS, G., DAHLÉN, G., SZAMOSI, A., LANDOU, C., BLOMBACK, M., WIMAN, B., 1987. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *The Lancet*. 330(8549), 3-9. doi:10.1016/s0140-6736(87)93050-9.

HENRY, M., TREGOUET, D.A., ALESSI, M.C., AILLAUD, M.F., VISVIKIS, S., SIEST, G., TIRET, L., JUHAN-VAGUE, I., 1998. Metabolic determinants are much more important than genetic polymorphisms in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations: a family study with part of the Stanislas Cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18(1), 84-91. ISSN: 1079-5642.

HINDORFF, L. A., SCHWARTZ, S. M., SISCOVICK, D. S., PSATY, B. M., LONGSTRETH, W. T., REINER, A. P., 2002. The Association of PAI-1 Promoter 4G/5G Insertion/Deletion Polymorphism with Myocardial Infarction and Stroke in Young Women. *Journal of Cardiovascular Risk*. 9(2), 131–137. doi: 10.1177/174182670200900209.

HOLMES, W.E., NELLES, L., LIJNEN, H.R., 1987. Primary structure of human alpha2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). *Journal of Biological Chemistry*. 262, 1659–1664. ISSN: 0021-9258

HOPPE, B., HEYMANN, G.A., KOSCIELNY, J., HELLSTERN, P., KIESEWETTER, H., SALAMA, A., 2003. Screening for multiple hereditary hypercoagulability factors using the amplification refractory mutation system. *Thrombosis Research*. 111(1), 115-120. doi: 10.1016/j.thromres.2003.08.024

JUHAN-VAGUE, I., PYKE, S.D., ALESSI, M.C., JESPERSEN, J., HAVERKATE, F., THOMPSON, S.G., 1996. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *Circulation*. 94(9), 2057-63. ISSN: 1213-7537

JUHAN-VAGUE, I., ALESSI, M.C., MAVRI, A., MORANGE, P.E., 2003. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J Thromb Haemost*. 1(7), 1575–1579. ISSN: 1538-7933

KALTENBOECK, B., WANG, C., 2005. Advances in real-time PCR: Application to clinical laboratory diagnostic, *Advances in clinical chemistry*. 40, 219-259. doi: 10.1016/s0065-2423(05)40006-2.

KESSLER, P. 2006 Trombofilní stavy. *Interní Med*. 9, 374–379.

KOČÁREK, E., 2007. Molekulární biologie v medicíně. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. 218 s. ISBN 978-80-7013450-4.

KUCIEL, J., URBAN, T., 2016. Principy genetiky. Brno: Mendelova univerzita v Brně. 200 s. ISBN 978-80-7509-385-1.

KVASNIČKA, J., 2003a. Žilní a tepenná trombofilie. *Interv Akut Kardiol*. 2 (1), 23–29. ISSN: 1213-807X

KVASNIČKA, J., 2003b. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. Praha: Grada, 300 s. ISBN: 8071699934

KVASNIČKA, J., 2010. Dědičné trombofilie – doporučení k provádění genetických testů v klinické praxi. *Časopis lékařů českých*. 149(10), 468-471. ISSN: 0008-7335

KVASNIČKA, J., HÁJKOVÁ, J., BOBŘÍKOVÁ, P., KVASNIČKA, T., DUŠKOVÁ, D., POLETÍNOVÁ, Š., KIEFEROVÁ, V., 2012. Prevalence trombofilních mutací FV Leiden, protrombinu G20210A a PAI-1 4G/5G a jejich vzájemných kombinací v souboru



1450 zdravých osob středního věku v regionu Praha a střední Čechy (výsledky real-time PCR analýzy FRET). *Časopis lékařů českých*. 151 (2), ISSN: 0008-7335.

LECLERC, D., SIBANI, S., ROZEN, R., 2000. Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/polymorphisms. *Madame Curie Bioscience Database*. ISBN 1-58707-217-8.

LOOK, M.P., VAN PUTTEN, W., DUFFY, M.J., HARBECK, N., CHRISTENSEN, J., THOMSEN, CH., KATES, R., SPYRATOS, F., FERNO, M., EPPENBERGER-CASTORINI, S., SWEEP, F., ULM, K., PEYRAT, J.P., MARTIN, P.M., MAGDELENAT, H., BRUNNER, N., DUGGAN, C., LISBOA, B.W., BENDAHL, P.O., QUILLIEN, V., DAVER, A., RICOLLEAU, G., MEIJER-VAN GELDER, M.E., MANDERS, P., FIETS, W.E., BROET, P., BLANKENSTEIN, M.A., ROMAIN, S., DAXENBICHLER, G., WINDBICHLER, G., CUFER, T., BORSTNAR, S., KUENG, W., BEECH, L., KLIJN, J., O'HIGGINS, N., EPPENBERGER, U., JANICKE, F., SCHMITT, M., FOEKENS, J.A., 2002. Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 94(2), 116-128. doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/94.2.116>.

Ma, D., Gerard, R.D., Li, X.-Y., Alizadeh, H., Niederkorn, J.Y., 1997. Inhibition of metastasis of intraocular melanomas by adenovirus-mediated gene transfer of plasminogen activator inhibitor type-1 in an athymic mouse model. *Blood*, 90 (7), 2738-2746. ISSN: 0006-4971

MATÝŠKOVÁ, M., ČECH, Z., 2009. Warfarin a farmakogenetika. *Klin. Biochem. Metab.* 17 (38), 215-219. ISSN: 1210-7921

MATÝŠKOVÁ, M., ŠLECHTOVÁ, M., PENKA, M., 2009. Kdy vyšetřit trombofilní stav a jak interpretovat výsledky? *Interní medicína*. 11(8), 355-357. ISSN: 1212-7299

MOATTI, D., HAIDAR, B., FUMERON, F., GAUCI, L., 2000. A new T-287C polymorphism in the 5' regulatory region of the tissue factor pathway inhibitor gene. *Thromb Haemost.* 84 (2), 244-249. doi: 10.1055/s-0037-1614003

NESHEIM, M., WANG, W., BOFFA, M., NAGASHIMA, M., MORSER, J., BAJZAR, L., 1997. Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between

coagulation and fibrinolysis. *Thrombosis and Haemostasis*, 78(1), 386–391, doi: 10.1055/s-0038-1657557.

PENKA, M., BULIKOVÁ, A., 2009. *Neonkologická hematologie*. 2.vydání. Praha: Grada, 248 s. ISBN 978-80-247-2299-3.

PENKA, M., SLAVÍČKOVÁ E., a kolektiv, 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada. 488 s. ISBN 978-80-247-3459-0.

SALAZAR GARCIA, M.D., SUNG, N., MULLENIX, T.M., DAMBAEVA, S., BEAMAN, K., GILMAN-SACHS, A., KWAK-KIM, J., 2016. Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Polymorphism is Associated with Reproductive Failure: Metabolic, Hormonal, and Immune Profiles. *American Journal of Reproductive Immunology*. 76, 70-81. doi: 10.1111/aji.12516

SHAGHAGHI, Z., BONYADI, M., SOMI, M.H., KHOSHBATEN, M., 2014. Association of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Polymorphism with Inflammatory Bowel Disease in Iranian Azeri Turkish Patients. *The Saudi Journal of Gastroenterology*. 20(1), 54-58. doi: 10.4103/1319-3767.126322

SCHWAHN, B., ROZEN, R., 2001. Polymorphisms in the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene. *American Journal of Pharmacogenomics*. 1(3), 189–201. doi:10.2165/00129785-200101030-00004.

STIRLING, Y., WOOLF, L., NORTH, W.R., SEGATCHIAN, M.J., MEADE, T.W., 1984. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 52, 176-182.

ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita 188 s. ISBN 80-2103841-1.

TAEYE, B. D., SMITH, L. H., VAUGHAN, D. E., 2005. Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(2), 149–154. doi:10.1016/j.coph.2005.01.007.

VAN DER PUT, N.M.J., GABREELS, F., STEVENS, E.M.B., SMEITINK, J.A.M., TRIJBELS, F.J.M., ESKES, T.K.A.B., VAN DEN HEUVEL, L.P., BLOM, H.J., 1998. A second common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional

risk factor for neural-tube defects? *The American Journal of Human Genetics*. 62(5), 1044–1051. doi: 10.1086/301825.

VAUGHAN, D.E., 2005. PAI-1 and atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 3, 1879-1883. ISSN 1538-7836.

WANG, A.Y., POON, P., LAI, F.M., YU, L., CHOI, P.C., LUI, S.F., LI, P.K., 2001. Plasminogen activator inhibitor-gene polymorphism 4G/4G genotype and lupus nephritis in Chinese patients. *Kidney Int*. 59(4), 1520-1528. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.0590041520.x.

WANG, S., CAO, Q., WANG, X., LI, B., TANG, M., YUAN, W., FANG, J., QIAN, J., QIN, C., ZHANG, W., 2013. PAI-1 4G/5G Polymorphism Contributes to Cancer Susceptibility: Evidence from Meta-Analysis. *PLoS ONE* 8(2), e56797. doi:10.1371/journal.pone.0056797.

WANG, W., BOFFA, M., BAJZAR, L., WALKER, J., NESHEIM, M., 1998. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*. (273), 27176–27181. doi:10.1074/jbc.273.42.27176.

WEISEL, J. W., 2005. Fibrinogen and Fibrin. *Advances in Protein Chemistry*. 247–299. doi:10.1016/s0065-3233(05)70008-5.

Widimský, J., Malý, J. a kol., 2011. *Akutní plicní embolie a žilní trombóza*. Praha: Triton, 424 s. ISBN 978-80-7387-466-7.

YE, R.D., AHERNS, S.M., LE BEAU, M.M., LEBO, R.V., SADLER, J.E., 1989. Structure of the gene for human plasminogen activator inhibitor-2. The nearest mammalian homologue of chicken ovalbumin. *Journal of Biological Chemistry*. 264 (10), 5495–5502. ISSN: 0021-9258.

YE, R.D., WUN, T.C., SADLER, J.E., 1987. cDNA cloning and expression in *Escherichia coli* of a plasminogen activator inhibitor from human placenta. *Journal of Biological Chemistry*. 262 (8), 3718–3725. ISSN: 0021-9258.

YOUNESI, M., HOSSEINPOUR FEIZI, M., POULADI, N., 2016. Clinicopathological significance of plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism in breast cancer

patients from North West of Iran. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 24(3), 277-285. ISSN: 2228-5741.

ZONOUZI, A.P., CHAPARZADEH, N., GHORBIAN, S., SADAGHIANI, M.M., FARZADI, L., GHASEMZADEH, A., KAFSHDOOZ, T., SAKHINIA, M., SAKHINIA, E., 2013. The association between thrombophilic gene mutations and recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet*. doi: 10.1007/s10815-013-0071-5.

ZORIO, E., GILABERT-ESTELLES, J., ESPANA, F., RAMON, L., COSIN, R., ESTELLES, A., 2008. Fibrinolysis: The Key to New Pathogenetic Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*. 15(9), 923–929. doi:10.2174/092986708783955455.

## 9 Seznam obrázků a tabulek

### Seznam obrázků

Obrázek 1: PAI-1 4G/5G polymorfismus (Zorio et al., 2008).....	11
Obrázek 2: Schéma fibrinolýzy (převzato a přepracováno dle Cesarman-Maus a Hajjar, 2005) .....	16
Obrázek 3: Souvislost PAI-1 s obezitou, diabetem a kardiovaskulárním onemocněním (Taeve et al., 2005) .....	21
Obrázek 4: Schéma primerů pro detekci PAI-1 4G/5G polymorfismu .....	39
Obrázek 5: Elektroforetický gel.....	42
Obrázek 6: Graf zastoupení genotypů (metoda Real-time PCR).....	44
Obrázek 7: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 1) .....	45
Obrázek 8: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 3), .....	47
Obrázek 9: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 4) .....	49
Obrázek 10: Fotografie elektroforetického gelu – teplotní gradient.....	50
Obrázek 11: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 8) .....	52
Obrázek 12: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 9) .....	53
Obrázek 13: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 11) .....	56
Obrázek 14: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 12) .....	58
Obrázek 15: Fotografie elektroforetického gelu (optimalizační reakce č. 14) .....	60

### Seznam tabulek

Tabulka 1: Reagencie pro izolaci DNA z bukalního stěru .....	32
Tabulka 2: Reagencie pro izolaci DNA z plné krve .....	34
Tabulka 3: Reagencie pro měření koncentrace izolátu DNA .....	35
Tabulka 4 Seznam reagentů (GeneProof – PAI-1 Genotyping PCR kit, CE IVD) .....	36
Tabulka 5: Reakční profil metody Real-time PCR.....	38
Tabulka 6: Sekvence primerů pro ARMS-PCR.....	38
Tabulka 7: Reakční profil ARMS-PCR.....	39
Tabulka 8: Teploty annealingu pro jednotlivé primery .....	40
Tabulka 9: Ředění primerů pro ARMS-PCR.....	40
Tabulka 10: Reagencie a jejich objem pro ARMS-PCR .....	41
Tabulka 11: Výsledky (metoda Real-time PCR) .....	43
Tabulka 12 Zastoupení genotypů (metoda Real-time PCR).....	44
Tabulka 13: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č.1).....	45

Tabulka 14: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 1).....	45
Tabulka 15: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č.2).....	46
Tabulka 16: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 2).....	46
Tabulka 17: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 3).....	47
Tabulka 18: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 3).....	47
Tabulka 19: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 4).....	48
Tabulka 20: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 4).....	48
Tabulka 21: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 5).....	49
Tabulka 22: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 5).....	49
Tabulka 23: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 6).....	50
Tabulka 24: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 7).....	51
Tabulka 25: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 7) .....	51
Tabulka 26: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 8).....	52
Tabulka 27: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 8) .....	52
Tabulka 28: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 9).....	53
Tabulka 29: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 10).....	54
Tabulka 30: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 10).....	54
Tabulka 31: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 11).....	55
Tabulka 32: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 11) .....	56
Tabulka 33: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 12).....	57
Tabulka 34: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 12).....	57
Tabulka 35: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 12) .....	57
Tabulka 36: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 13) .....	59
Tabulka 37: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 14).....	59
Tabulka 38: Reakční profil reakce (optimalizační reakce č. 14) .....	60
Tabulka 39: Koncentrace DNA (optimalizační reakce č. 15).....	61
Tabulka 40: Složení reakční směsi (optimalizační reakce č. 15).....	61

## 10 Seznam zkratek

APC-R	rezistence faktoru V k aktivovanému proteinu C
ARMS-PCR	amplifikaci nedostupný mutační systém - PCR
AS-PCR	alela specifická polymerázová řetězová reakce
LIČ	laboratorní identifikační číslo
MTHFR	methylenetetrahydrofolátreduktáza
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu -1
PAI-2	inhibitor aktivátoru plazminogenu-2
PAI-3	inhibitor aktivátoru plazminogenu-3
PAS	plasminogen aktivátor systém
PCR	polymerázová řetězová reakce
PK	proteináza K
PLG	plasminogen
pro-uPA	pro-urokináza
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
TAFI	trombinem aktivovatelný inhibitor fibrinolýzy
TEN	tromboembolická nemoc
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
uPA	urokináza
u-PAR	specifických receptor pro uPA
$\alpha_2$ -PI	$\alpha_2$ -plasmin inhibitor