

Středoškolská odborná činnost

Vztah polymorfismů genů pro APOE a ACE  
k Alzheimerově chorobě

Markéta Doležalová

Brno 2015

# Středoškolská odborná činnost

Obor SOČ: 6. Zdravotnictví

## Vztah polymorfismů genů pro APOE a ACE k Alzheimerově chorobě

Autor: Markéta Doležalová

Škola: Gymnázium Brno-Řečkovice

Konzultant: Mgr. Lýdia Hlinecká

RNDr. Kateřina Cibulková

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně, použila jsem pouze podklady (literaturu, internetové stránky, atd.) citované v práci a uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování práce je v souladu se zákonem č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v plném znění.

## Poděkování

Děkuji vedoucí své práce, Mgr. Lýdii Hlinecké, za pomoc při vypracování SOČ a za velkou ochotu při vysvětlování detailů práce. Dále chci poděkovat RNDr. Kateřině Cibulkové za cenné připomínky a Jihomoravskému centru pro mezinárodní mobilitu za poskytnutou finanční podporu.



## **Anotace**

Tato práce se zabývá vlivem polymorfismů genů pro ApoE a I/D ACE na patogenezi Alzheimerovy choroby. Byla zjišťována frekvence výskytu rizikové alely ApoE4 u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Zároveň byl sledován typ inzerčně-delečního polymorfismu u genu pro ACE u těchto pacientů.

## **Klíčová slova**

Alzheimerova choroba, ApoE, I/D ACE

## **Annotation**

This essay deals with the influence of polymorphs of ApoE and I/D ACE genes on the pathogenesis of Alzheimer's disease. The study tested the frequency of occurrence of the risk allele ApoE4 among patients with Alzheimer's disease. It also traced the type of insertion-deletion polymorphism of the gene for ACE of these patients.

## **Keywords**

Alzheimer's disease, ApoE, I/D ACE

## Seznam použitých odborných zkratk

ACE – Angiotensin – konvertující enzym

AD – Alzheimerova choroba

ApoE – Apolipoprotein E

APP – amyloidový prekurzorový protein

bp – pár bází

HhaI – restriční endonukleáza pocházející z *Haemophilus haemolyticus*

MPs – paramagnetické částice

PCR – Polymerázová řetězová reakce

# Obsah

Úvod	8
Cíle práce	9
<b>1 Teoretická část</b>	<b>10</b>
1.1 Alzheimerova choroba (AD)	10
1.1.1 Historie AD	10
1.1.2 Stádia Alzheimerovy choroby	11
1.1.3 Stanovení diagnózy	11
1.1.4 Rizikové faktory	12
1.2 Vnitřní změny	12
1.2.1 Makroskopické změny mozku	12
1.2.2 Mikroskopické změny mozku	13
1.3 Kandidátní geny	14
1.3.1 Apolipoprotein E (ApoE)	15
1.3.2 Angiotensin – konvertující enzym (ACE)	16
<b>2 Praktická část</b>	<b>16</b>
2.1 Použité metody	16
2.1.1 Izolace DNA pomocí paramagnetických částic	16
2.1.2 PCR – polymerázová řetězová reakce	17
2.1.3 Restrikční analýza	18
2.1.4 Gelová elektroforéza	19
2.2 Provedení	20

2.2.1	ApoE - genotypizace . . . . .	20
2.2.2	ACE - genotypizace . . . . .	21
2.3	Výsledky . . . . .	21
2.3.1	ApoE . . . . .	21
2.3.2	I/D ACE . . . . .	27
<b>3</b>	<b>Závěr a diskuze</b>	<b>30</b>
3.1	ApoE . . . . .	30
3.2	ACE . . . . .	30
	<b>Použitá literatura</b>	<b>31</b>



## Úvod

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence v pozdním věku. Nemocný postupně ztrácí schopnost se o sebe postarat a je odkázán na své okolí. Péče o takového člověka je velmi psychicky náročná – pacient mnohdy prodělá změnu osobnosti, může být podezíravý a agresivní, začne se ztrácet ve známých prostorech, později přestává poznávat své blízké. Je potřeba se mu věnovat celý den.

Přestože pokud se nemoc odhalí včas, dá se zmírnit její průběh, často zůstává dlouhou dobu nepovšimnuta a pokládá se za obvyklou součást stárnutí. K lékařům se dostávají až pacienti v pozdních stádiích, kterým je velmi obtížné pomoci. Na Alzheimerovu chorobu neexistuje žádný lék.

V mozku nemocného dochází k mnoha změnám, z nichž nejvýraznější je ztenčování mozkové kůry a tvorba neurofibrilárních klubek a senilních plaků tvořených Amyloid beta proteinem. Dochází také k úbytku acetylcholinu, který se v mozku stará o přenos vzruchů.

Jedná se o velmi aktuální problém, především ve vyspělých zemích, neboť populace stárne. I díky pokrokům na poli léčby nemocí se dnes lidé dožívají vyššího věku, což s sebou nese i vyšší počet nemocných s Alzheimerovou chorobou. V České republice trpí touto chorobou každý druhý člověk starší 90 let a každý pátý starší 80 let. Nemoc se ale může projevit i u lidí ve středním věku.

## **Cíle práce**

Tato práce, vypracovaná formou asociační studie, si klade za cíl odhalit případný vztah mezi polymorfismy genů pro Apolipoprotein E a pro Angiotensin-konvertující enzym a vznikem Alzheimerovy choroby u pacienta.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Alzheimerova choroba (AD)

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění. Jedná se o nejčastější příčinu demence ve vysokém věku – ve věku nad 85 let trpí touto nemocí přibližně jeden člověk z osmi. Pro Alzheimerovu nemoc je typické poškození krátkodobé, v pozdějších stádiích i dlouhodobé paměti a následná naprostá závislost na pečovateli. Výrazně se mění vzhled a struktura mozku.

### 1.1.1 Historie AD

Pokud považujeme za počátek výzkumu Alzheimerovy nemoci objev senilních plak v mozkové kůře, začal tento výzkum roku 1892. Tehdy senilní plaky popsali Blocq a Marinesco. Roku 1907 je podrobněji popsal Oskar Fischer.

Častěji se ale jako počátek výzkumu uvádí rok 1906, kdy měl Alois Alzheimer přednášku „O svérázném onemocnění mozkové kůry“ na 37. schůzi jihoněmeckých psychiatrů v Tübingenu. Zde referoval o své pacientce Auguste Deter, která trpěla těžkou demencí. Jeho práce byla uveřejněna roku 1907.

Sám Alzheimer tento případ posuzoval pouze jako atypickou formu běžné senilní demence. Jeho spolupracovníci Bonfiglio a Perusini ale na základě nižšího věku, ve kterém pacienti se stejnou diagnózou onemocněli, dospěli k názoru, že se jedná o samostatnou nemoc. Alzheimerova nemoc byla poprvé pojmenována v učebnici z roku 1910 od Kraepelina.

Při zkoumání podobných případů byly používány dva pojmy – presenilní Alzheimerova nemoc a senilní demence Alzheimerova typu. Roku 1928 poukázal Grünthal ve své publikaci na to, že mezi těmito nemocemi nejsou téměř žádné histologické rozdíly. To bylo v průběhu let potvrzeno dalšími studiemi. Na základě práce Roberta Katzmana se tyto pojmy roku 1976 sloučily. (Jiráková et Koukolík, 1998, URL 6)

### 1.1.2 Stádia Alzheimerovy choroby

Nemoc bývá dělena podle mnoha parametrů, jednou z nejpřesnějších stupnic je Reisbergova škála celkové deteriorace. Podle ní nemocný prochází několika stádii Alzheimerovy choroby:

1. Žádné poškození kognitivních funkcí – bez obtíží
2. Počínající postižení kognitivních funkcí – pacient vnímá poruchy paměti, zapomíná názvy věcí a jmen, zapomínání na místa uložení běžných předmětů
3. Lehké postižení kognitivních funkcí – špatná paměť na jména, pokles výkonu v práci, obtíže při hledání slov.
4. Středně těžké postižení kognitivních funkcí – Zúžuje se povědomí o současném dění, objevují se poruchy počítání z hlavy a poruchy v péči o sebe sama. Pacient může být dezorientovaný i v místech, kudy běžně prochází, nemusí se orientovat v čase či poznávat známé osoby. Často dochází k popírání špatného stavu.
5. Pokročilé postižení kognitivních funkcí – Pacient si nevybavuje důležité životní údaje – svou adresu či jména vnoučat. Obvykle je dezorientovaný v čase.
6. Těžké postižení kognitivních funkcí – naprostá závislost na svém okolí. Člověk si nepamatuje téměř nic ze svého života, potíže mu dělá odečítání a přičítání do deseti, má narušený spánkový rytmus. Je potřeba pomoc při pohybu. Objevují se změny osobnosti – nemocný je neschopný se k čemukoliv rozhodnout, může být agresivní vůči neznámým věcem nebo mít nutkavé projevy. Mohou mít také bludy.
7. Pacient je neschopný řeči, je inkontinentní a neschopný chůze. Je nutné mu pomáhat s jídlem. (Šimková K., 2010)

### 1.1.3 Stanovení diagnózy

Diagnóza se provádí vyloučením možností ukazujících na jinou chorobu. Pacient absoluuje testy kognitivních funkcí, vyhodnocují se změny jeho paměti a chování v průběhu několika měsíců až let. Provádí se vyšetření moči a krve, EKG a EEG. Pomocí výpočetní tomografie mozku (CT) se zjišťuje zmenšení objemu mozku. Naprostou jistotu má lékař až po posmrtném vyšetření mozkové tkáně. (URL 7, Abrahams, P. 2005)

#### 1.1.4 Rizikové faktory

Rozvoj Alzheimerovy nemoci způsobuje vždy kombinace několika faktorů.

Riziko onemocnění stoupá s věkem. Nemoc se dělí na dva typy podle stáří, ve kterém se dostaví klinické příznaky.

- **Raná (presenilní, familiární) forma** – propuká před 60. rokem. Způsobují ji vady na 1. a 14. chromozomu nebo mutace genu pro amyloidový prekurzorový protein (APP) na 21. chromozomu, díky kterému vzniká Abeta protein. Choroba mívá rychlejší postup.
- **Forma s pozdním začátkem** – propuká po 60. roce. Jedná se o častější typ AD. Je způsobena mutací mitochondriální DNA a výskytem alely ApoE4.

V některých rodinách se AD vyskytuje ve velkém počtu. To může svědčit o dědičnosti nemoci nebo o vlivu prostředí, případně o kombinaci obojího.

Nemocí jsou více ohroženy ženy, oproti mužům onemocní 3x častěji.

Důležitá je také strava – příjem ovoce, zeleniny, ryb a antioxidantů snižuje riziko Alzheimerovy nemoci, naproti tomu vysoká konzumace nasycených tuků riziko zvyšuje.

Při prevenci se může uplatňovat také vyšší vzdělání, fyzická aktivita a kulturní život.

Spekuluje se také o vlivu manuální práce, zdravého životního stylu a úrazech hlavy. (Koukolík et Jiráček, 1998, Janda P. 2013)

## 1.2 Vnitřní změny

### 1.2.1 Makroskopické změny mozku

Člověku trpícímu Alzheimerovou chorobou se rozšiřují mozkové komory, ztenčuje se mozková kůra (především ve frontální oblasti) a zmenšuje se objem a hmotnost mozku. Tyto změny jsou patrné i při normálním průběhu stárnutí, u AD jsou však mnohem nápadnější. (Koukolík et Jiráček, 1998)

## 1.2.2 Mikroskopické změny mozku

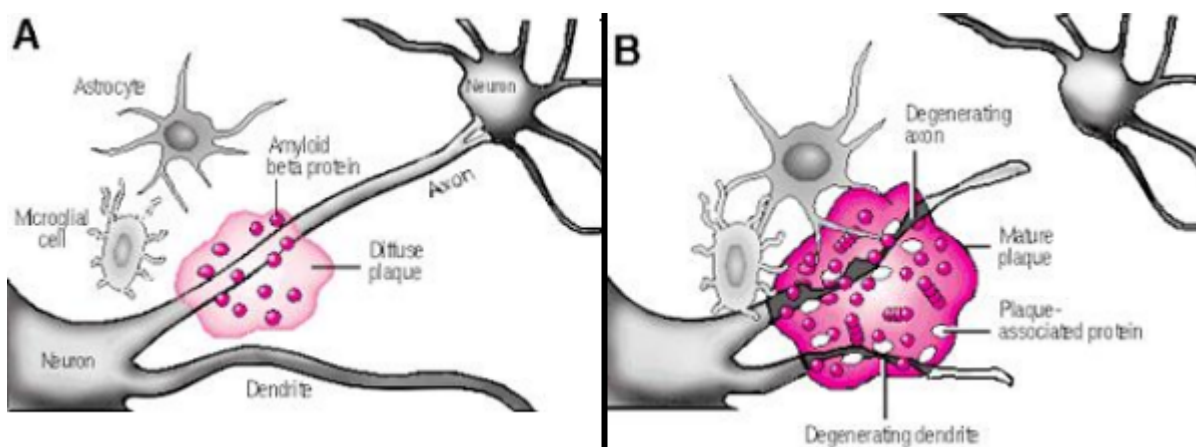
### 1.2.2.1 Senilní plaky

Senilní (neuritické) plaky jsou nepravidelně okrouhlé heterogenní útvary velké asi 10-200  $\mu\text{m}$ . Obsahují amyloid beta protein (viz strana 14). Několika druhy barvení je možné je rozdělit do několika typů plaků podle obsahu amyloidu a obsahu a druhu poškození neuritů – neuronálních výběžků. Samotné neurity se dělí na dva druhy: dystrofické neurity a neurity s párovými spirálními vlákny.

Dystrofické neurity lze nalézt jak u osob trpících Alzheimerovou chorobou, tak u zdravých jedinců. Vznikají v průběhu klinicky normálního stárnutí. Naopak neurity s párovými spirálními vlákny jsou typické pro Alzheimerovu chorobu, výjimečně je lze najít i u jiných neurodegenerativních nemocí.

Senilní plaky vznikají postupně v čichovém kortexu, prepiriformní kůře, amygdale a hipokampu, následně v neokortexu. V menším počtu se objevují i během klinicky normálního stárnutí, u Alzheimerovy choroby je plaků výrazně více. (Koukolík et Jiráček, 1998)

*„V oblasti plaku vzniká sterilní zánět a v rámci akutní reakční fáze se uvolňují cytokiny a volné kyslíkové radikály, které způsobují další neurodegenerativní změny – mohou například peroxidovat lipidy buněčné membrány neuronů a tím způsobit zánik neuronů.“*  
(URL 13)



Vznik plaku, URL 14, upraveno

### 1.2.2.2 Neurofibrilární klubka (*tangles*)

Neurofibrilární (neuronální) klubka byla poprvé popsána Aloisem Alzheimerem jako charakteristický jev u Alzheimerovy choroby a dalších neurodegenerativních onemocněních. Říká se jim také Náhrobní kameny neuronů. Důležitou součástí neuronálních klubek je tau protein. Ten se podílí na stabilitě a uspořádání mikrotubulů, tyto proteiny hrají významnou úlohu v axonovém transportu. Tau protein je u AD nadměrně fosforylován. (Bartoš A., Řípková D., 2010)

*„Hyperfosforylací tau proteinu se přestává udržovat mikrotubulární síť, což vede k narušení axonálního transportu. Současně hyperfosforylované formy tau proteinu tvoří intraneuronální vláknité inkluze – neurofibrilární klubka, jeden z hlavních rysů nemoci.“*  
(Bartoš Aleš, Řípková Daniela, Pokroky v diagnostice Alzheimerovy nemoci)

Když se klubka obarví solemi stříbra, vypadají v optickém mikroskopu jako chomáče hrubých vláken. Jejich počet značí pokročilost a závažnost Alzheimerovy choroby. (Koukolík et Jiráček, 1998)

Hlavní složkou amyloidových plaků a neurofibrilárních klubek je Amyloid beta protein. Vzniká amyloidogenním štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP). Množství amyloidu beta významně ovlivňuje hladina cholesterolu – vysoká hladina usnadňuje amyloidogenní štěpení APP. (Pešák L., 2013)

## 1.3 Kandidátní geny

Práce byla vypracována jako asociační studie. Tyto studie se využívají ke zjišťování genetické predispozice k multifaktoriálním onemocněním – tedy takovým, na jejichž vzniku se nepodílí jeden konkrétní gen, ale jsou zapříčiněny souhrou více genů. Jistou roli ve vzniku multifaktoriálního onemocnění hraje i prostředí, ve kterém se člověk pohybuje – např. zda vede kulturní život či sportuje.

Asociační studie se zaměřují na odhalování vztahu mezi určitým genotypem a onemocněním. Některé genotypy mohou zvyšovat či snižovat riziko vzniku onemocnění, jiné na něj nemají žádný vliv. Obvyklá varianta provedení asociační studie se nazývá case-control.

U ní se srovnává frekvence výskytu testovaných genotypů mezi skupinou zdravých jedinců a skupinou s danou chorobou. V případě, že se sledované genotypy obou skupin významně liší, je možné předpokládat, že mají nějaký vliv na rozvoj onemocnění. (URL 11)

Z předchozích studií vyplývá, že by se na onemocnění Alzheimerovou chorobou mohl podílet i gen pro Apolipoprotein E (ApoE) či inzerčně-deleční polymorfismus u genu pro Angiotensin – konvertující enzym (ACE).

### 1.3.1 Apolipoprotein E (ApoE)

Tento protein, tvořený 299 aminokyselinami, se podílí na stavbě a udržování stability buněčného skeletu neuronů, stará se o celistvost synapsí a aktivaci reparačních procesů, které jsou způsobené mechanickým poškozením či stárnutím. Má protizánětlivé účinky. Dále ApoE reguluje růst a diferenciaci buněk a funguje i jako imunomodulátor. Také tvoří v těle spolu s tuky molekuly zvané lipoproteiny. Ty jsou odpovědné za transport cholesterolu k tělním buňkám. ApoE je hlavní součástí lipoproteinů s velmi nízkou hustotou, které odstraňují přebytečný cholesterol z krve do jater, kde se zpracovává. Udržování standardní hladiny cholesterolu je důležité pro prevenci poruch ovlivňujících srdce a cévy. (URL 1, URL 2)

Gen pro ApoE se nalézá na 19. chromozomu. Existují tři izoformy tohoto proteinu – ApoE2, ApoE3 a ApoE4. Liší se ve 112. a 158. aminokyselině záměnou thyminu za cytosin - vzniká buď aminokyselina cystein, nebo arginin.

izoforma	112. aminokyselina	158. aminokyselina
ApoE2	cys	cys
ApoE3	cys	arg
ApoE4	arg	arg

Nejvíce je v populaci zastoupena izoforma ApoE3 (77-78 %), druhá nejčastější je ApoE4 (16-17 %). Nejméně je v populaci zastoupena izoforma ApoE2 (7-8 %).



Z dosavadních výzkumů vyplývá, že lidé s ApoE4 jsou více náchylní k onemocnění Alzheimerovou chorobou – heterozygoti mají až 3x větší riziko vzniku onemocnění, u homozygotů je toto riziko 15x větší, nemoc navíc propuká v mladším věku než u heterozygotů. Zvýšené riziko AD je způsobeno nadměrným množstvím cholesterolu v mozkové tkáni, neboť ApoE4 má sníženou schopnost přemístit cholesterol do buněk. Cholesterol v mozkové tkáni následně podporuje produkci Abeta proteinu. ApoE4 hůře opravuje poškozené neurony. (Cibičková L., Palička V., 2005)

### **1.3.2 Angiotensin – konvertující enzym (ACE)**

Hlavní funkcí enzymu ACE je přeměňování angiotensinu I na angiotensin II. Zatímco angiotensin nemá v těle téměř žádnou funkci, angiotensin II zvyšuje krevní tlak. ACE se také podílí na štěpení amyloid beta proteinu. (URL 12)

ACE je jednou z nejdůležitějších součástí renin-angiotensinového systému – RAS. Ten se podílí na udržování homeostázy, a to ovlivňováním vylučování vody a regulací krevního tlaku. Také ovlivňuje behaviorální procesy – paměť, učení, žízeň apod.

Gen pro ACE má inzerčně-deleční polymorfismus (I/D ACE). Jeho dva genotypy se liší přítomností či absencí části DNA o délce 287 bp v intronu 16. Alela I je tak dlouhá přibližně 490 bp, alela D 190 bp. V populaci se nejčastěji vyskytuje alela I. (Dostálová Z., 2006)

I/D polymorfismus může také přispívat k rozvoji Alzheimerovy choroby, ačkoliv přímá souvislost nebyla prokázána.

## **2 Praktická část**

### **2.1 Použité metody**

#### **2.1.1 Izolace DNA pomocí paramagnetických částic**

Izolace DNA je proces získávání nukleových kyselin jakožto genetické informace z biologického materiálu.

Použité paramagnetické částice (MPs) mají kovové jádro a specificky upravený povrch, na který dokážou díky vnějšímu magnetickému poli navázat bioreaktivní molekuly. Paramagnetické částice se přidávají ke vzorku, kde na sebe cílené molekuly navážou. Poté jsou magnetem uchyceny ve zkumavce, zbytek roztoku je odstraněn. Následně jsou MPs odděleny od cílových molekul, se kterými můžeme dále pracovat. (Húska et al. 2008)

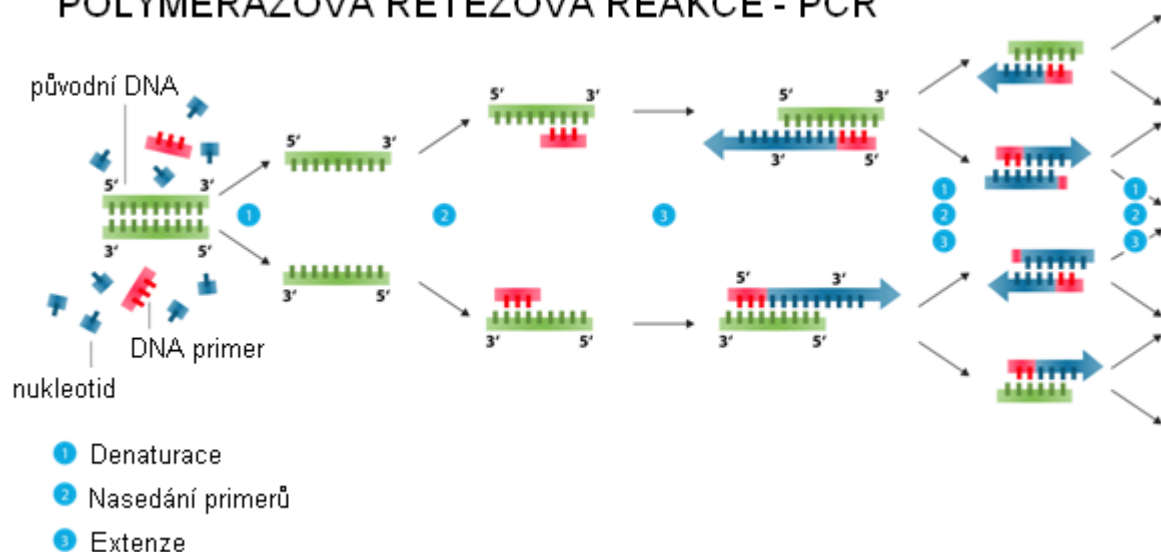
U získaného vzorku DNA se vyhodnocuje jeho čistota pomocí spektrofotometru, který měří koncentraci na základě pohlcování světla.

### **2.1.2 PCR – polymerázová řetězová reakce**

Metoda PCR využívá primery a enzym DNA polymerázu k namnožení požadovaného úseku DNA. Amplifikace probíhá v termocykléru v několika krocích, přičemž délka jednotlivých kroků a teplota mohou být pro různé směsi odlišné.

1. Počáteční denaturace DNA – dvoušroubovice se rozdělí na jednořetězcovou DNA (ssDNA), na kterou mohou nasednout primery. Probíhá nejčastěji při 95 °C, protože při této teplotě dochází k inhibici obvyklých polymeráz. Při PCR se používají termostabilní polymerázy pocházející z bakterií žijících ve velkém horku. Tyto polymerázy jsou schopné přečkat i 95 °C a následně amplifikovat DNA.
2. Denaturace DNA – pokračuje rozdělování dvoušroubovice na jednořetězcové DNA.
3. Nasedání primerů (anealing) – primery se připojují na vlákna DNA.
4. Elongace – probíhá syntéza komplementárního řetězce DNA. Na primery se připojí DNA polymeráza a k vláknu DNA připojuje volné nukleotidy ve směru od 5' konce ke 3' konci.
5. Kroky 2 – 4 se opakují v několika cyklech, aby se docílilo požadovaného množství úseků DNA.
6. Závěrečná polymerační reakce (finální extenze) - dosyntetizování řetězců DNA.
7. Směs se zchladí.

## POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE - PCR



zdroj obrázku: URL 9, upraveno

### 2.1.3 Restrikční analýza

Restrikční analýza využívá štěpení DNA na krátké úseky pomocí restrikčních endonukleáz. Liší se od sebe rozpoznáváním určitých krátkých sekvencí nukleotidů, ve kterých štěpí DNA na různě dlouhé fragmenty. Různé DNA se od sebe dají rozpoznat díky rozdílné délce těchto fragmentů, zapříčiněné přítomností či absencí rozpoznávacího místa endonukleázy.

Restrikční endonukleázy pocházejí z bakterií, kde slouží jako ochrana před cizorodou DNA virů. Je známo asi 1500 endonukleáz. Rozpoznávají obvykle palindromatické sekvence – tedy takové, které mají stejné pořadí nukleotidů na obou vláknech čteno od 5' konce. Restrikční endonukleázy, které rozpoznávají krátkou sekvenci nukleotidů, obvykle naštěpí DNA na mnoho kratších úseků. Naopak endonukleázy rozpoznávající dlouhou sekvenci nukleotidů štěpí DNA na delší úseky. (URL 8)

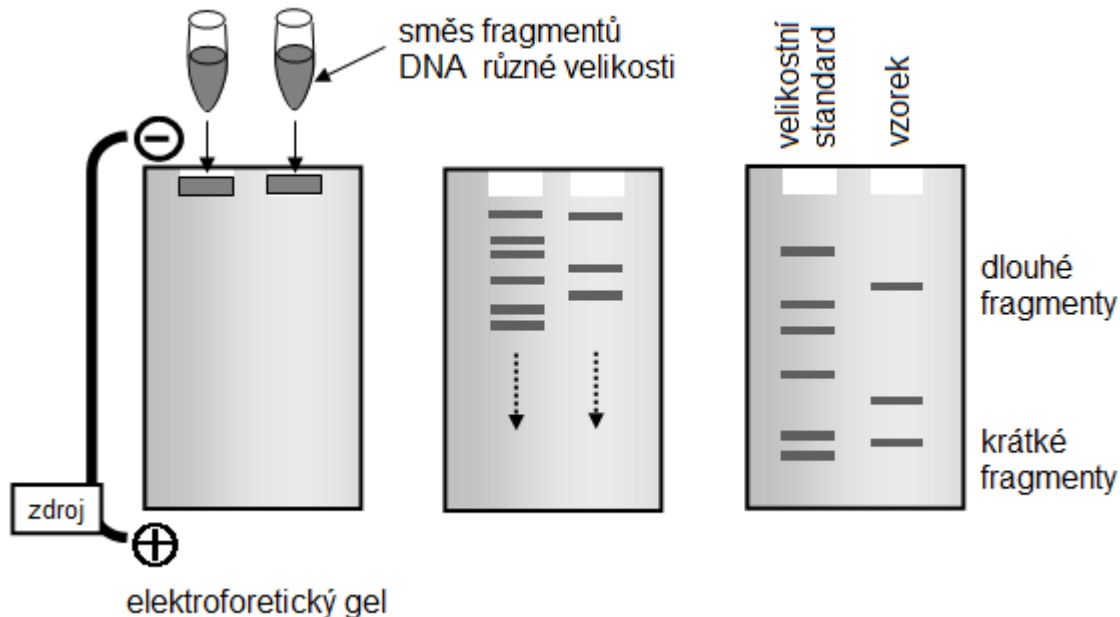
Použitá endonukleáza HhaI pochází z bakterie *Haemophilus haemolyticus* a pracuje nejlépe při teplotě 37 °C. Rozpoznává sekvenci GCGC.

### 2.1.4 Gelová elektroforéza

Elektroforéza je jednou z nejvyžívanějších metod k analýze nukleových kyselin a proteinů. Využívá schopnosti pohybu záporně nabitých částic v elektrickém poli.

Nejčastěji se jako nosné médium využívají agarózové nebo polyakrylamidové gely. Molekuly DNA se jimi mohou pohybovat různou rychlostí – delší úseky pomaleji, kratší rychleji. Ty se proto dostanou na gelu dál od původního místa.

Jednotlivé vzorky se umisťují do předem připravených jamek v gelu. Do jedné z nich se vkládá velikostní standard s předem určenými fragmenty. Ten slouží ke kvalifikovanému odhadu velikostí fragmentů určovaných vzorků. (URL 4, URL 5)



Migrace částic v gelu. Zdroj obrázku: URL 3

Po skončení elektroforézy je žádoucí úseky DNA zviditelnit. Pro tyto účely se využívá barvivo (SYBR Green nebo ethydium bromid), které se na DNA naváže a lze jej vidět pod UV zářením. Výsledky elektroforézy se sledují v UV transluminátoru. (URL 10)

## 2.2 Provedení

DNA byla získána setřením epitelových buněk z bukální sliznice a byla izolována podle upraveného protokolu izolačního kitu Prepito NA Body Fluid Kit (chemagen-Perkin Elmer) na automatizovaném přístroji PREPITO. Vzorky pocházely od pacientů z ČR trpících AD a od kontrolních osob.

### 2.2.1 ApoE - genotypizace

Část genu pro ApoE byla amplifikována pomocí PCR reakce za využití značených primerů APO1 FAM a APO2 TAMRA. Složení reakce:

APO1 F primer	0,3 $\mu$ l
APO2 T primer	0,3 $\mu$ l
PCR voda	8,2 $\mu$ l
dNTP	0,5 $\mu$ l
KAPA Enhancer 1	4 $\mu$ l
KAPA 5x Buffer A	4 $\mu$ l
7-Deaza-G	0,2 $\mu$ l
KAPA 2G Robust HS polymeráza	0,25 $\mu$ l
<hr/>	
+ 1 $\mu$ l DNA (50 ng/ $\mu$ l)	

Nastavení termocycleru a teplotní profil:

95 °C	10 min	
<hr/>		
95 °C	1 min	
58 °C	30 s	35 cyklů
72 °C	1 min	
<hr/>		
4 °C	$\infty$	

Produkty PCR reakce byly naštěpeny pomocí restriční endonukleázy Hha I. Reakce obsahovala 10  $\mu$ l DNA amplifikátu, 1  $\mu$ l pufru a 1  $\mu$ l restriktázy Hha I. Štěpení probíhalo dle teplotního profilu: 30 minut při 37 °C a 5 minut při 95 °C.

Následně proběhla denaturace při 95 °C po dobu 2 minut a rychlé zchlazení po dobu 1 minuty.

Vzorky byly podrobeny fragmentační analýze na sekvenátoru ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). 1 reakce obsahovala 0,5  $\mu$ l DNA, 0,5  $\mu$ l délkového standardu (Standard LIZ 120) a 9  $\mu$ l formamidu. Podle délek značených restričních fragmentů byly stanoveny genotypy u jednotlivých pacientů.

### 2.2.2 ACE - genotypizace

Část genu pro ACE byla amplifikována pomocí PCR reakce s využitím forward a reverse primerů (ID1, ID2). Složení reakce:

Primer ID1	0,1 $\mu$ l
Primer ID2	0,1 $\mu$ l
PCR voda	7,5 $\mu$ l
8,75 $\mu$ l KapaFast Mix 2x	8,75 $\mu$ l
<hr/>	
+ 1 $\mu$ l DNA (50 ng/ $\mu$ l)	

Nastavení termocycleru a teplotní profil:

94 °C	2,5 min	
<hr/>		
94 °C	20 s	
55 °C	30 s	40 cyklů
72 °C	30 s	
<hr/>		
72 °C	5 min	
15 °C	$\infty$	

Následně byla provedena elektroforéza PCR produktů na 1,5% agarózovém gelu. Na gel bylo nanášeno 10  $\mu$ l PCR směsi. Elektroforéza probíhala pod napětím 90 V po dobu cca 45 minut.

## 2.3 Výsledky

### 2.3.1 ApoE

Na přítomnost alely ApoE4 bylo vyšetřeno 225 pacientů trpících Alzheimerovou chorobou a 186 kontrolních osob. Věk byl u obou skupin srovnatelný, pohyboval se v rozmezí

od 67 do 85 let, průměrně 75 let. Vyšetřené osoby pocházejí z nemocnic a hospitalizačních ústavů v České republice.

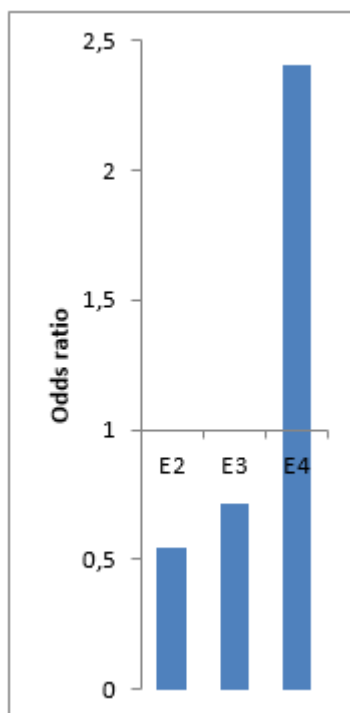
Při porovnání alelických frekvencí s využitím Fisher exact testu byl zjištěn statisticky významný rozdíl ve výskytu alely ApoE4 mezi pacienty s Alzheimerovou chorobou a skupinou kontrolních osob ( $p = 0.0001$ ). Tento rozdíl splňuje podmínku, že hodnota  $p$  je menší než 0,05 (hranice statisticky významného rozdílu). Všechny statistické údaje byly vypočítány pomocí internetových stránek <http://research.microsoft.com/en-us/um/redmond/projects/mscompbio/fisherexacttest> a <http://home.ubalt.edu/ntsbarsh/Business-stat/otherapplets/Catego.htm>

Genotypy:

genotyp	E2/E2	E2/E3	E2/E4	E3/E3	E3/E4	E4/E4	celkem
<b>pacienti</b>	1	23	<b>7</b>	103	<b>88</b>	<b>3</b>	225
<b>kontroly</b>	0	42	4	104	36	0	186
<b>celkem</b>	1	65	11	207	124	3	411

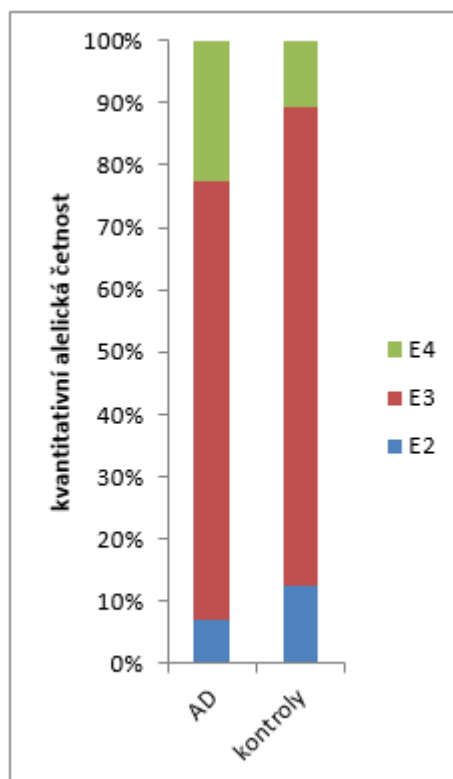
Porovnání genotypů pacientů s AD a kontrolních osob, tučně označen zvýšený výskyt alely ApoE4

Riziko spojené s alelou ApoE4:



Přítomnost alely ApoE4 zvyšuje riziko výskytu Alzheimerovy choroby 2,4krát. ( $OR^1 = 2,402$ ). Ostatní alely riziko AD nezvyšují.

Alelické frekvence:



Nejvíce zastoupenou alelou v populaci je alela ApoE3. Alela ApoE2, která má spíše protektivní účinek, byla s vyšší frekvencí nalezena u kontrolních osob. Riziková alela ApoE4 se výrazně častěji vyskytovala u pacientů s AD.

<sup>1</sup>OR - odds ratio – udává, kolikrát častěji se daná alela vyskytuje u nemocných lidí



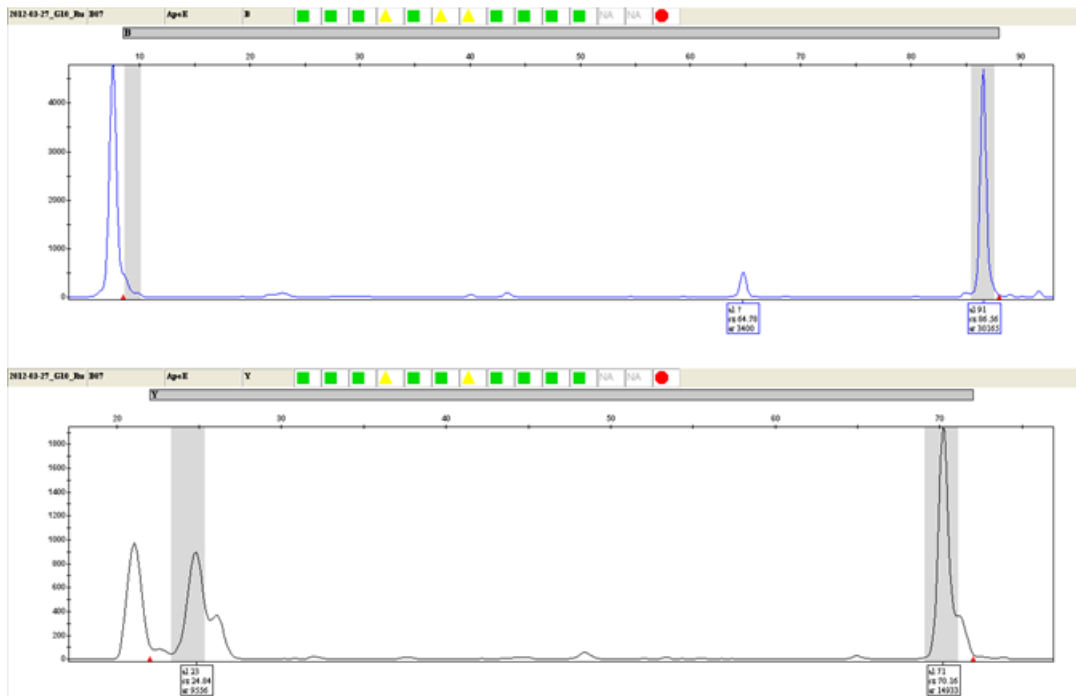
Genotypy polymorfismů ApoE:

	1. alela	2. alela	1. primer	2. primer
E2/E2	TT	TT	91	71
			91	71
E2/E3	TT	TC	91	71
			91	23
E2/E4	TC	TC	91	71
			19	23
E3/E3	TT	CC	91	23
			91	23
E3/E4	TC	CC	91	23
			19	23
E4/E4	CC	CC	19	23
			19	23

Délky fragmentů polymorfismů genů pro ApoE

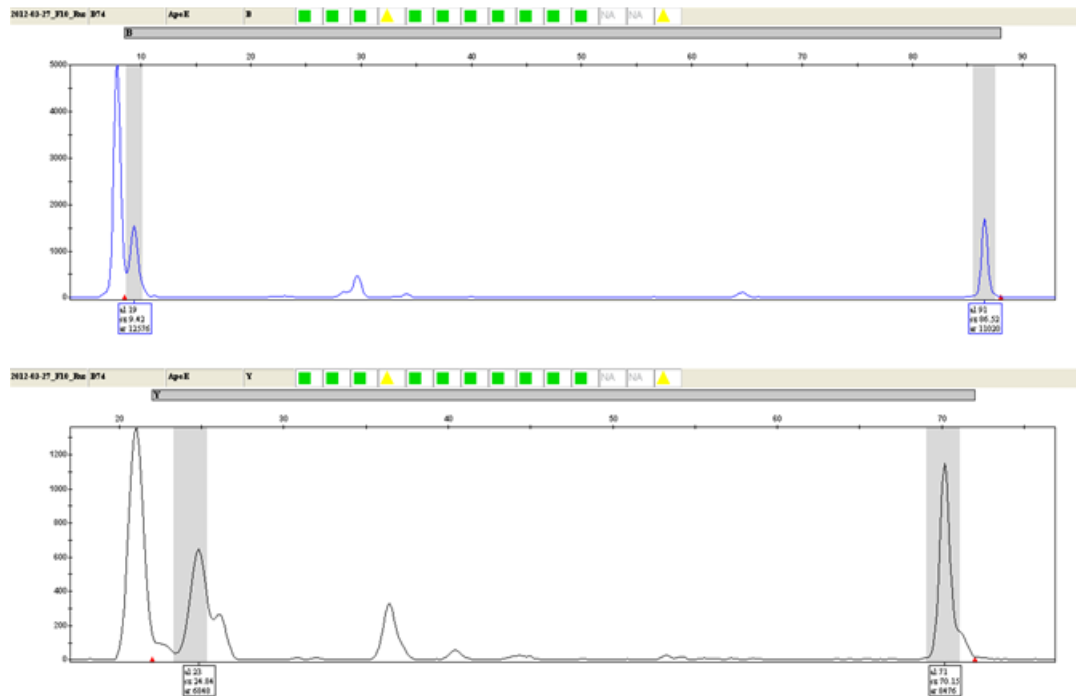
Ukázky genotypů ApoE

## ApoE2/ApoE3



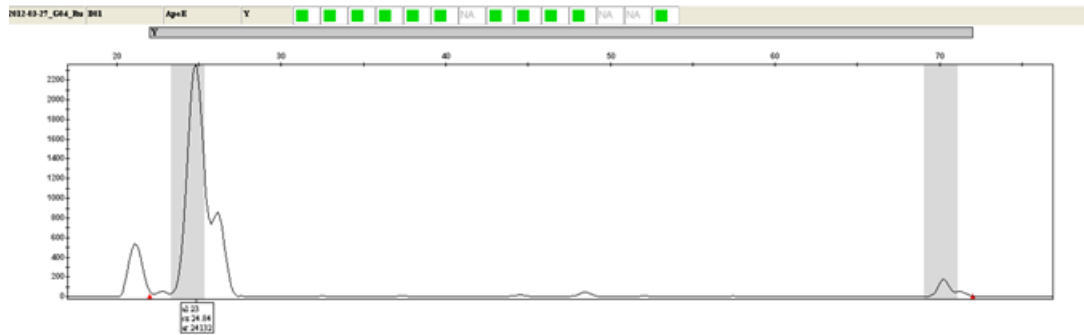
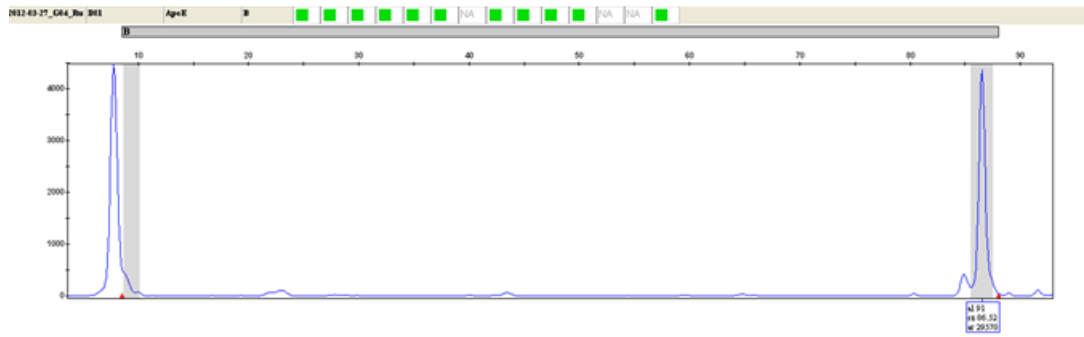
Genotyp s alelami ApoE2 a ApoE3: Fragmentsy jsou dlouhé 91, 71 a 23 bp.

## ApoE2/ApoE4



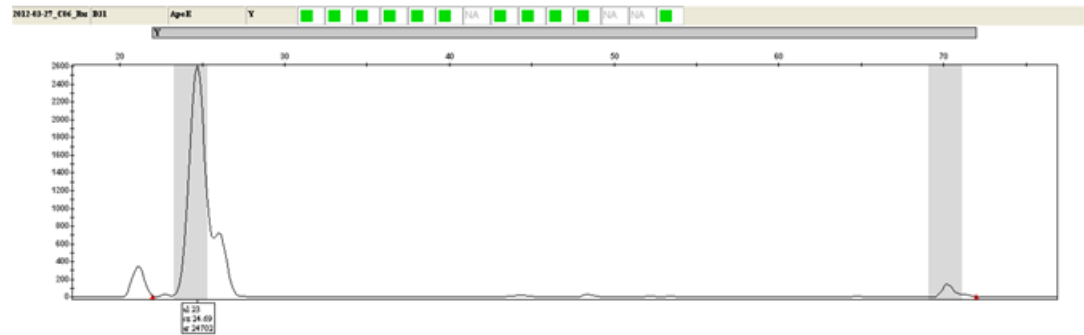
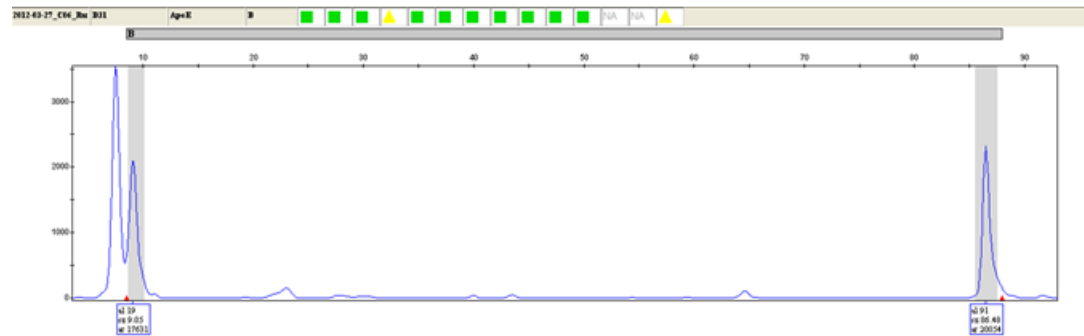
Genotyp ApoE2 a ApoE4: Fragmentsy dlouhé 91,71,19 a 23 bp.

## ApoE3/ApoE3



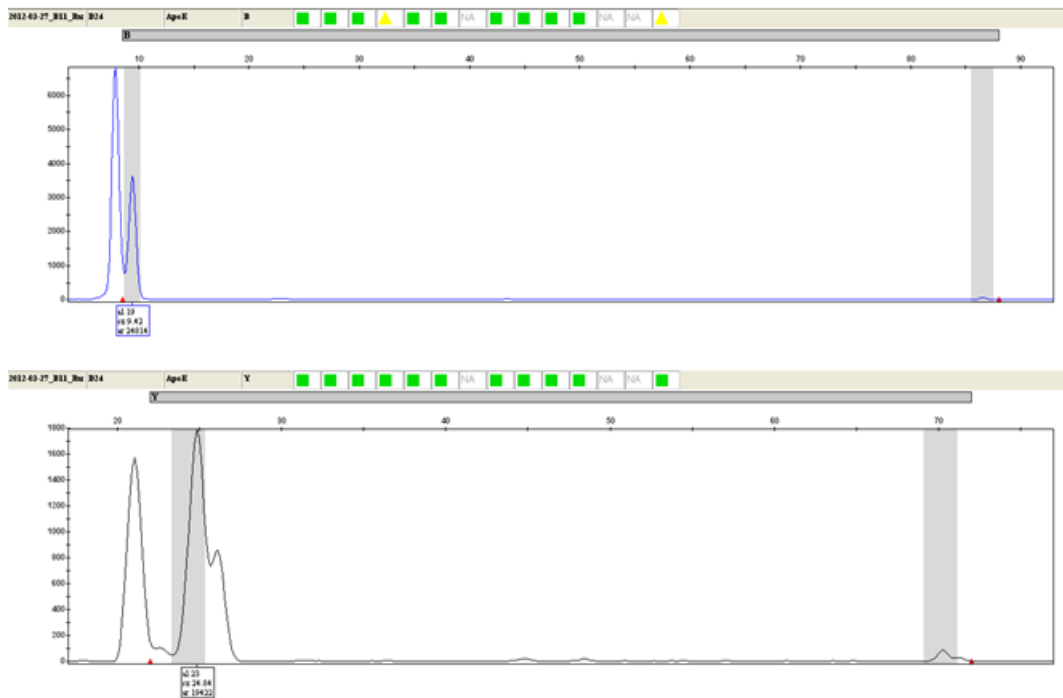
Genotyp ApoE3/ApoE3: Fragmety dlouhé 91 a 23 bp.

## ApoE3/ApoE4



Genotyp ApoE3/ApoE4: Fragmety dlouhé 91, 23 a 19 bp.

## ApoE4/ApoE4



Genotyp ApoE4/ApoE4: Fragmenty jsou dlouhé 19 a 23 bp.

### 2.3.2 I/D ACE

Na I/D ACE polymorfismus bylo vyšetřeno 326 pacientů a 248 kontrolních osob. Průměrný věk byl opět 75 let a všechny osoby pocházely z České republiky.

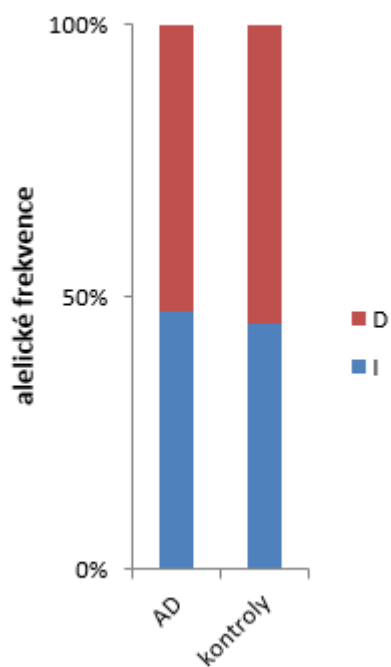
U polymorfizmu I/D ACE nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v genotypových a alelických frekvencích mezi studovanými skupinami osob. Hodnoty pravděpodobností genotypových frekvencí:  $p=0,691$  (D/D),  $p=0,12$  (I/D),  $p=0,18$  (I/I). Tyto hodnoty však nesplňují podmínku statisticky významného rozdílu ( $p < 0,05$ ).

Alelické frekvence:

Případ/kontrola	I	D
<b>AD</b>	308	344
<b>kontroly</b>	223	273

Celkově se alela I vyskytovala u nemocných osob v počtu 308, u kontrolních osob v počtu 223. Alela D byla u pacientů zastoupena 344krát, u zdravých jedinců 273krát.

Procentuální srovnání:



Výskyt alel I a D je srovnatelný jak u skupiny osob s AD, tak u kontrolní skupiny.

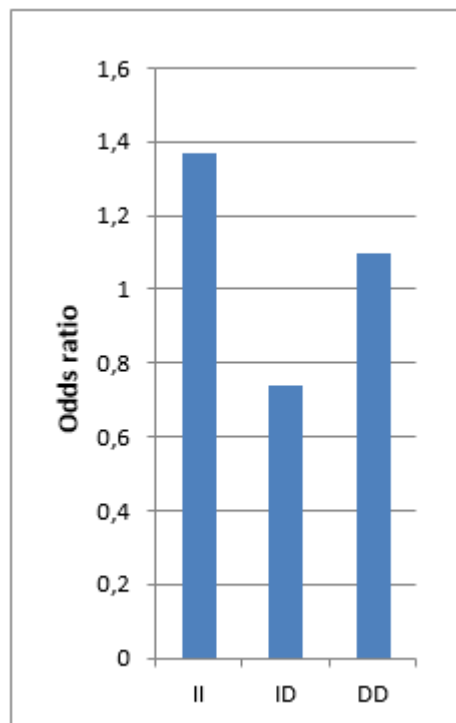
Porovnání genotypů pacientů se zdravými jedinci:

Případ/kontrola	II	ID	DD
<b>AD</b>	74	160	92
<b>kontrola</b>	41	141	66

74 pacientů s AD byli homozygoti s alelami II, 92 homozygoti s alelami DD a ve 160 případech se jednalo o heterozygoty. U kontrolních osob bylo 41 II homozygotů, 66 DD homozygotů a 141 heterozygotů.

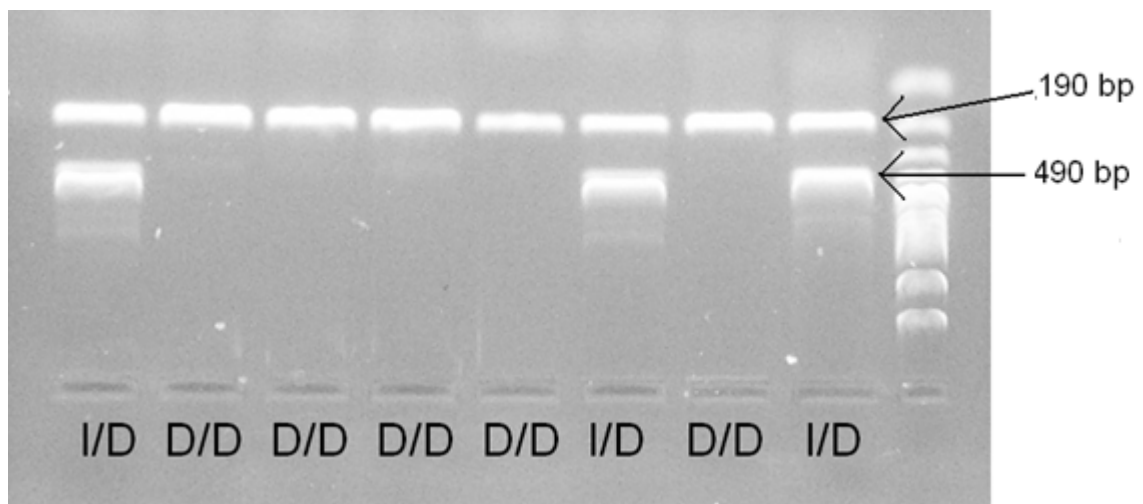
Homozygotní genotypy II a DD se u pacientů s AD vyskytují častěji.

Rizikovost genotypů vyjádřena pomocí OR:



Žádný z polymorfismů významně nezvyšuje riziko vzniku Alzheimerovy choroby.

Výstup gelové elektroforézy:



Ukázka výsledku gelové elektroforézy: 8 vzorků, 3 s I/D polymorfismem, 5 s D/D polymorfismem.

## **3 Závěr a diskuze**

### **3.1 ApoE**

U genu pro apolipoprotein E se ukázala být nejrizikovější alela ApoE4, která 2,4x zvyšovala pravděpodobnost onemocnění Alzheimerovou chorobou.

Tento výsledek odpovídá i výsledkům studií z jiných zemí (Bertram et al. 2007, Takei et al. 2009)

### **3.2 ACE**

U inzerčně-delečního polymorfismu v genu pro ACE nebyla nalezena významná souvislost s propuknutím nemoci, přestože u pacientů s AD převládaly homozygotní genotypy.

Mnoho jiných studií sledujících vliv polymorfismu I/D ACE na Alzheimerovu chorobu dospělo k protichůdným výsledkům. Některé práce považují za rizikovou alelu I/D (Lehnan et al., 2005) či I/I (Kolsch et al., 2005).

Po navýšení počtu osob zařazených do studie lze předpokládat nález statisticky významných souvislostí. Studie s větším počtem studovaných subjektů mají obecně větší statistickou váhu.

## Použitá literatura

- [1] ABRAHAMAS, P., Rodinná encyklopedie zdraví. *Ottovo nakladatelství*, 2005, str. 134
- [2] BARTOŠ, A., ŘÍPOVÁ, D., Pokroky v diagnostice Alzheimerovy nemoci. *Psychiatria pre prax*, 1/2007, str. 17-19
- [3] BARTRAM, L. a kol., Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat. Genet.*, 39 (2007), str. 17–23
- [4] DOSTÁLOVÁ, Z., Diskuze: Některé genetické aspekty u vybraných závažných těhotenských patologií. 2007, diplomová práce, bez číslování
- [5] HLOUŠKOVÁ, A., Genetické testování dispozic k Alzheimerově chorobě. 2008, bakalářská práce, str. 17
- [6] HÚSKA, D. a kol., Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA. *CHEMmagazín*, Číslo 3, Ročník XVIII, 2008, str. 14-15
- [7] ILIEV, R., Alzheimerova choroba z pohledu molekulární biologie. 2010, bakalářská práce, str. 6-10, 22
- [8] JANDA, P., Patogeneze Alzheimerovy choroby z hlediska molekulární biologie. 2013, diplomová práce, str. 26-28
- [9] KOLSCH, H. a kol., ACE I/D polymorphism is a risk factor of Alzheimer's disease but not of vascular dementia. *Neuroscience Letters*, 2005, Volume 377, Issue 1, str. 37 - 39
- [10] KOUHOLÍK, F., JIRÁK, R., Alzheimerova nemoc a další demence. *Grada Publishing*, 1998, str. 11-45
- [11] LEHMANN, D. J. a kol., Large Meta-Analysis Establishes the ACE Insertion-Deletion Polymorphism as a Marker of Alzheimer's Disease. 2005, article, str. 305-317
- [12] PEŠÁK, L., Molekulární příčiny Alzheimerovy choroby. 2013, bakalářská práce, str. 16-20



[13] ŠIMKOVÁ, K., Alzheimerova choroba: péče a její vliv na životy rodinných pečujících. Magisterská diplomová práce, 2010, str. 27, 37

[14] TAKEI, N. a kol., Genetic association study on in and around the APOE in late-onset Alzheimer disease in Japanese. Volume 93, Issue 5, květen 2009, strany 441-448

### Internetové zdroje

[15] URL 1: <http://www.snpedia.com/index.php/APOE> [Cit. 11. 1. 2015]

[16] URL 2: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APOE> [Cit. 11. 1. 2015]

[17] URL 3: [http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-gelova\\_elektroforeza&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz) [Cit. 29. 12. 2014]

[18] URL 4: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm> [Cit. 20. 12. 2014]

[19] URL 5: [http://biotechbuster.blogspot.cz/2008/08/sds-page\\_19.html](http://biotechbuster.blogspot.cz/2008/08/sds-page_19.html)  
[Cit. 20. 12. 2014]

[20] URL 6: <http://alzheimermf.cz/pro-pecujici-a-pacienty/oskar-fischer-a-alzheimerova-choroba/> [Cit. 26. 12. 2014]

[21] URL 7: <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/diagnoza/> [Cit. 2. 1. 2015]

[22] URL 8: <http://stary.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/newlook/defa3.htm>  
[Cit. 29. 1. 2015]

[23] URL 9: [http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction) [Cit. 27. 12. 2014]

[24] URL 10: [http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=navody-izolace\\_dna\\_a\\_pcr&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=navody-izolace_dna_a_pcr&lang=cz)  
[Cit. 26. 12. 2014]

[25] URL 11: [http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/genetika\\_komplexnich\\_znaku.htm](http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/genetika_komplexnich_znaku.htm)  
[Cit. 7. 2. 2015]

[26] URL 12: <http://www.yourhormones.info/hormones/angiotensin.aspx>  
[Cit. 1. 2. 2015]

[27] URL 13: <http://pvac.vscht.cz/pvac/vyzkumne-projekty/monitorovani-diagnosticky-vyznamnych-biomarkeru-alzheimerovy-nemoci> [Cit. 22. 12. 2014]

[28] URL 14: <http://www.osel.cz/popisek.php?popisek=14586&img=1272795162.jpg> [Cit. 20. 2. 2015]