

25. Enzymové a jiné markery využívané v diagnostice vybraných patologických stavů

Lukáš Pácal

1. Cíl

Srovnání elektroforeogramů izoenzymů laktátdehydrogenázy separovaných v agarózovém gelu ze vzorků normálních a patologických sér.

2. Úvod do problematiky

Laktátdehydrogenáza (LD, EC 1.1.1.27) je cytoplazmatický ubikvitární enzym. Katalyzuje reverzibilní přeměnu laktátu na pyruvát (poslední krok anaerobní glykolýzy). V organismu jsou přítomny dva typy polypeptidových řetězců označovaných jako H (heart) a M (muscle). Každá molekula enzymu je tetramer tvořený jedním nebo oběma typy podjednotek. Různými kombinacemi těchto podjednotek vzniká pět izoenzymů (enzymy, které mají stejnou funkci, ale liší se strukturou; primární izoenzymy vznikají v důsledku rozdílů ve struktuře dvou a více genů, v případě sekundárních izoenzymů je odlišnost způsobena posttranslační modifikací; izoenzymy se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, např. elektroforetickou pohyblivostí): LD1 (H₄), LD2 (H₃M), LD3 (H₂M₂), LD4 (HM₃) a LD5 (M₄). Podjednotky M převládají v izoenzimech LD4 a LD5 vyskytujících se hlavně v tkáních s převahou anaerobního metabolismu (kosterní svalstvo, játra) kde katalyzují přeměnu pyruvátu na laktát. Isoenzymy s převahou podjednotek H (LD1 a LD2) katalyzují přeměnu laktátu na pyruvát ve tkáních s aerobním metabolismem (myokard, mozek, ledviny, erytrocyty).



redukovaný NADH + H⁺ lze dokázat následující reakcí s tetrazoliovou solí



Zvýšené hodnoty LD v plazmě nacházíme u:

1) poškození myokardu

- vzestup izoenzymů LD1 a LD2, např. při akutním infarktu myokardu (LD1/ LD2 větší než jedna, u zdravých osob je poměr menší než jedna)

2) poškození jater

- elevace izoenzymů LD4 a LD5, např. akutní virová hepatitida, cirhóza, otrava organickými rozpouštědly

3) krevních chorob

- hemolytické a megaloblastické anemie

Izoenzymy se liší nábojem, a proto se dají elektroforeticky rozdělit. Izoenzym LD1 se pohybuje nejrychleji směrem k anodě, LD5 naopak ke katodě. Při následné inkubaci v roztoku obsahujícím substrát enzymu (laktát) a barvivo lze vizualizovat jednotlivé izoenzymy, které reagují se substrátem za vzniku NADH a H⁺, který redukuje bezbarvý indikátor NBT na barevný formazan. Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství jednotlivých izoenzymů.

3. Materiál

Skleněná podložní sklíčka (7,6 x 2,6 cm), elektroforetická vana, el. zdroj, termostat, automatická pipeta a špičky, vzorky séra.

Roztoky:

Barbitalový pufr:

Barbitalum solubile	10,3 g
Kyselina dietylbarbiturová	1,84 g
Aqua destillata	ad 1000 ml

Barvicí roztok:

Lithiumlaktát (substrát pro enzym)

Koenzym NAD⁺

Oxidované barvivo tetrazoliová modř (NBT)

Přenašeč elektronů mezi NADH a barvivem (fenazinmethosulfát)

Pufr o pH 8,6 a aktivující ionty

4. Postup

Na očištěnou skleněnou podložní mikroskopickou sklíčku nalijeme na nivelizačním stolku 1 % agarózový roztok a necháme ztuhnout.

Na sklíčka nanášíme analyzované vzorky séra (10 µl) pomocí hrany filtračního papíru a necháme 15 minut difundovat do agarózy. Na každé sklíčko nanášíme 2 vzorky.

Po 15 minutách povrch gelu opláchneme destilovanou vodou a vložíme do elektroforetické aparatury. Sklíčka s gelem spojíme s barbitalovým pufrem pomocí proužků filtračního papíru, uzavřeme aparaturu, spojíme se zdrojem a dělíme za následujících podmínek : U = 200 V, I = cca 32 mA, t = 55 min, T = 10°C.

Po ukončení elektroforetického dělení vložíme sklíčka agarózovou vrstvou dolů do Petriho misek (3 sklíčka/misku) a opatrně podlijeme inkubačním roztokem. Barvíme 45 min při 37°C. Po obarvení vložíme na 30 min do vypírací lázně a poté vysušíme.

Obarvená a vysušená skříčka naskenujeme a analyzujeme pomocí softwaru TotalLab.

5. Závěr

Počítačově zpracované výsledky elektroforetické separace zaznamenáme do protokolu. Popíšeme rozdíly mezi spektrem izoenzymů LD z normálního a patologického séra a interpretujeme je.

26. Hyperlipoproteinemie

Julie Bienertová Vašků

1. Cíl

Prokázat přítomnost/nepřítomnost mutace R395W v genu pro LDL receptor u pokusného subjektu a srovnání výsledku se zdravým kontrolním subjektem a pacientem s familiární hypercholesterolémií.

2. Úvod do problematiky

Primární dyslipidémie jsou vrozené poruchy metabolismu spojené jak s alterovanou hladinou lipoproteinů v plazmě, jejich neobvyklou distribucí a/nebo tvorbou aberantních lipoproteinových molekul.

Poruchy mohou obecně postihovat alfa-lipoproteiny (např. Tangierská choroba, deficit LCAT, deficit Apo A-1, porucha jaterní triacylglycerolové lipázy) nebo beta-lipoproteiny, kde je pak možné dílčí třídění na:

1. poruchy syntézy a sekrece betalipoproteinů
2. výskyt anomálního apoproteinu B
3. poruchy v přeměně betalipoproteinů
4. běžná polygenně determinovaná hypercholesterolémie

Mezi nejčastější poruchy metabolismu betalipoproteinů patří

1. vrozené defekty apoB – předpokládá se u velkého procenta pacientů se šlachovými xantomy, kde se dříve myslelo na poruchu LDL receptoru
2. hypobetalipoproteinémie spojená s modifikovanými apo B – abnormální molekuly Apo B (B-25, B-28, B-37, B-39, B-40, B-46) vedou k nižší stabilitě plazmatických lipoproteinů a nižší plazmatické hladině lipidů
3. familiární hypercholesterolémie – nejčastější primární dyslipidémie, heterozygotní forma má frekvenci cca 1/500, homozygotní forma je mnohem vzácnější - má frekvenci cca 1/10⁶; na pokladě poruchy LDL receptorů dochází ke zvýšené produkci LDL, jejich prodloužené cirkulaci a sníženému vychytávání. To vede u heterozygotů ke 2-3x zvýšené plazmatické hladině LDL cholesterolu oproti zdravým, ICHS se u nich rozvíjí během třetího až čtvrtého decenia. U homozygotů jsou hladiny LDL cholesterolu 6-8 vyšší oproti normě a neléčení pacienti většinou umírají na infarkt myokardu před 20 rokem věku. Podkladem onemocnění jsou mutace v LDL receptoru.
4. polygenní hypercholesterolémie – velmi časté civilizační onemocnění, na geneticky predisponovaném terénu dochází sumací určitých environmentálních vlivů (faktory vnějšího prostředí, zejména faktory životního stylu) k hypercholesterolémii. Je zřetelná nutriční závislost, onemocnění lze výrazně kompenzovat dietou.

Mutace R395W způsobuje záměnu argininu za tyrozin v pozici 395, což je podmíněno substitucí GGG→TGG v 9. exonu genu pro LDL-receptor. Tato mutace ruší restrikční místo pro endonukleázu HpaII, takže normální alela po PCR a restrikci poskytuje fragmenty 137, 56 a 30 bp, zatímco restrikce mutantní alely vede k zisku alel 167 a 56 bp. Uvedená mutace patří mezi asi dvacet nejčastějších mutací v LDL receptoru v české populaci.

3. Materiál, metody

PCR: molekulárně-biologická metoda sloužící k amplifikaci fragmentů DNA o definované délce, což umožňuje získat v krátkém čase velké množství kopií příslušné sekvence a tím představuje východisko pro celou řadu dalších molekulárně-biologických postupů. Metoda má tři fáze: 1. denaturace DNA – oddělování dvou řetězců DNA od sebe, 2. annealing – navázání ohraničujících oligonukleotidů (primerů) a 3. elongace – syntéza očekávaných fragmentů DNA.

Roztoky:

H₂O, reakční pufr obohacený o bovinní sérum albumin (RP+BSA)(10xkoncentrovaný), MgCl₂ (25mM), deoxynukleotid trifosfáty-dNTP (směs dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 10mM), primer 70 a 71 (10mM), genomová DNA pacienta heterozygotního pro FH, jedince suspektního z FH a zdravého člověka (asi 50ng/μl), Taq polymeráza (5U/μl).

4. Postup

a) Rozpis přípravy mastermixu pro PCR

	na 1 vzorek (v μl)	na 3 vzorky (v μl)
1. H ₂ O	13,3	40
2. RP+BSA	2,5	7,5
3. MgCl ₂	1	3
4. dNTP	0,5	1,5
5. primer 70	1,25	3,75
6. primer 71	1,25	3,75
7. DNA	5	
8. Taq	0,125	0,38
PCR směs	20	
celkem	25	

Do 3 označených eppendorfek napipetujeme 5μl DNA zkoumaného vzorku (A), pacienta heterozygotního pro FH (B) a DNA zdravého člověka (C). Vypočítané množství roztoků 1-6 pro 3 vzorky uvedené v tabulce napipetujeme do zvláštní eppendorfky, nakonec napipetujeme roztok

8 a dobře pipetou promíchejte. Z této směsi odebereme 20 μ l a přidáme k jednotlivým vzorkům DNA, vše dobře promícháme.

Eppendorfky s amplifikační směsí vložíme do amplifikátoru a spustíme uložený program reakce:

počet cyklů	denaturace (teplota/čas)	annealing (teplota/čas)	elongace (teplota/čas)
1	95°C/5'	62°C/1'	72°C/1'
35	95°C/1'	62°C/1'	72°C/1'
1	95°C/1'	62°C/1'	72°C/5'

b) Restrikce amplifikovaného produktu příslušnou restriktázou

Roztoky: H₂O, restrikční pufr (10x), HpaII (8U/ μ l)

Provedení:

Rozpis restrikční směsi:

	1 vzorek (μ l)	3 vzorky (μ l)
1.H ₂ O	7,3	22
2.restrikční pufr	2	6
3.HpaII (restrikční enzym)	0,7	2,1
4.DNA (amplifikační produkt)	10	
celkem	20	

Do označených eppendorfek (A,B,C) napipetujeme 10 μ l DNA. Ve zvláštní eppendorfce promícháme roztoky 1-3 a směs rozpipetujeme do eppendorfek s DNA.

Restrikční směs umístíme do termostatu (37⁰C) na min. 2 hod.

c) Elektroforetická separace produktu

Roztoky: 1xTBE pufr (příprava gelu a elektroforetický pufr), nanášecí pufr (bromfenolová modř: ficol, 1:1), etidium bromid

Provedení:

Příprava 2% gelu: 2g NuSieve agarózy rozvaříme ve 100ml 1xTBE, po zchladnutí na 50⁰C přidáme 10μl etidium bromidu, nalijeme na misku s hřebenem a necháme 30 minut ztuhnout, opatrně vysuneme hřeben a gel umístíme do elektroforetické aparatury s 1xTBE pufrem

Vzorky pro nanášení na gel smícháme s nanášecím pufrem na parafinovém filmu takto: 10μl vzorku+5μl nanášecího pufru, celý objem potom nanese pipetou do komůrek na gelu.

Vzorky pro elektroforézu:

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1) DNA A (zkoumaný vzorek) | po amplifikaci |
| 2) DNA A | po amplifikaci a restrikci |
| 3) DNA B (jedince suspektního z FH) | po amplifikaci |
| 4) DNA B | po amplifikaci a restrikci |
| 5) DNA C (zdravého člověka) | po amplifikaci |
| 6) DNA C | po amplifikaci a restrikci |
| 7) DNA | po kontrolní amplifikaci a restrikci |

Po nanesení všech vzorků připojíme elektroforézu ke zdroji, zdroj nastavíme na 90-100V a necháme asi 30 minut elektroforeticky rozdělit fragmenty DNA (DNA je záporně nabitá, putuje ke kladnému pólu, přičemž se do ní navazuje etidium bromid, který v UV svítí oranžově). Po skončení elektroforézy gel prohlížíme na UV transiluminátoru a výsledek vyfotíme.

4. Výsledky

Popis získaného elektroforeogramu ve vztahu k mutaci R935W v genu pro LDL receptor, popis délky jednotlivých alel.

5. Závěr

Stručně popíšeme princip metody. Zhodnotíme, zda zkoumaný pacient byl/nebyl heterozygotem/homozygotem pro mutaci R395W v genu pro LDL a zdůvodníme proč. Podáme vysvětlení výsledků elektroforézy zaznamenaných na kopii fotografie. Zdůvodníme, proč

heterozygotní pacient má po restrikci daný počet fragmentů DNA ve srovnání se zdravým jedincem a amplifikačním produktem .