

7. Detekce polymorfizmu A118G (Asn40Asp) genu pro μ -opioidní receptor pomocí RealTime PCR.

Úvod

Opioidní systém v mozku zprostředkovává řadu funkcí v různých jeho částech. Opioidní látky mohou být původu endogenního či exogenního, jejichž biologické účinky jsou zprostředkovávány receptory μ (mí), δ (delta) a κ (kappa). Endogenní (tělu vlastní) opioidy jako jsou endorfiny, enkefaliny a dynorfiny mají analgetické účinky a jsou důležitou součástí odměňovacího systému. Exogenní opioidy mohou také vedle analgetických a uklidňujících účinků působit silně euforicky (drogy), mohou způsobovat nevolnost nebo narušovat kognitivní (poznávací) funkce. Opioidní systém se významně podílí na modulaci emocí, úzkosti, stresu, učení, paměti. Mimoto se účastní i modulace funkcí imunitního systému (Börner et al., 2007). PET studie (pozitron emisní tomografie) postmortem, prokázaly nejvyšší hustotu μ -receptorů v kortexu cingula, v thalamu, periaqueduktální oblasti a nucleus caudatus. Stimulace těchto receptorů vede k aktivaci dalších neurotransmiterových systémů jako jsou cholinergní, adrenergní a dopaminergní (Leppä et al., 2006).

Opioidní systém byl dosud zkoumán především z hlediska jeho analgetických účinků a mechanismů vyvolávajících euforické stavy u drogově závislých. Drakenberg et al. (2006) našel téměř 90 % výskyt genotypu A/G polymorfizmu A118G genu pro μ -receptor u závislých na heroinu. Alela G zapříčiňuje snížení exprese μ -receptoru, jak na úrovni transkripce, tak na úrovni translace. Změny se týkaly zejména mRNA pro prekurzor enkefalinu, jejíž snížení bylo patrné v celé oblasti striata závislých na heroinu, což má celkový vliv na limbický a motorický systém. Vzhledem k četným interakcím a značné provázanosti opioidního systému s dalšími neurotransmiterovými systémy, obzvláště s dopaminergním, se začíná zkoumat jeho případná role v patogenezi nejrůznějších duševních chorob. U schizofrenie byla nalezena významná asociace s alelou G genu pro μ -opioidní receptor. Alela G snižuje expresi μ -opioidního receptoru, čímž může v průběhu vývoje mozku negativně zasáhnout do myelinizace kortikálních axonů a ovlivnit tak vznik hyperaktivity dopaminového systému typického pro schizofrenii (Šerý et al., 2009).

Popis polymorfizmu: jedná se o jednobodový polymorfizmus, kdy v pozici 118 nukleotidové sekvence alternuje Adenin s Guaninem resp. v pozici 40 proteinové sekvence Asparagin (Asn) s kyselinou Asparagovou.

Reagencie:

Primery

- MU1 5'- CAC GAA CGC CAG CAA TTG - 3'
- MU2 5'- TGA TCG TGA TGG CCG TGA T - 3'

Sondy

- A (Asn alela): název SMUA (3'- Eclipse a 5'- Yakima Yellow)
sekvence 5'- CA CTT AGA TGG CAA CCT GTC CGA CCC A - 3'
- G (Asp alela): název SMUG (3'- Eclipse a 5'- FAM)
sekvence 5'- CC CAC TTA GAT GGC GAC CTG TCC GA - 3'

Reakční směs (25 µl):

- 12,5 µl TaqManUniversal PCR Master Mix
- 1 µM každého z primerů (0,5 µl)
- 0,125 µM sondy SMUA (0,5 µl)
- 0,075 µM sondy SMUG (0,3 µl)
- 100 ng genomové DNA (2 µl)

Reakce i detekce je prováděna pomocí automatizovaného systému PCR-Real Time AB7300.

Amplifikace:

- počáteční denaturace – 2 minuty při 50°C a 10 minut při 95°C
 - 20 sec – 95°C (denaturace)
 - 35x 20 sec – 58°C (annealing)
 - 32 sec – 72°C (extenze)

Odlíšné genotypy (AA, AG, GG) budou detekovány díky navázaným sondám na základě jejich fluorescence.