

Jméno a UČO:

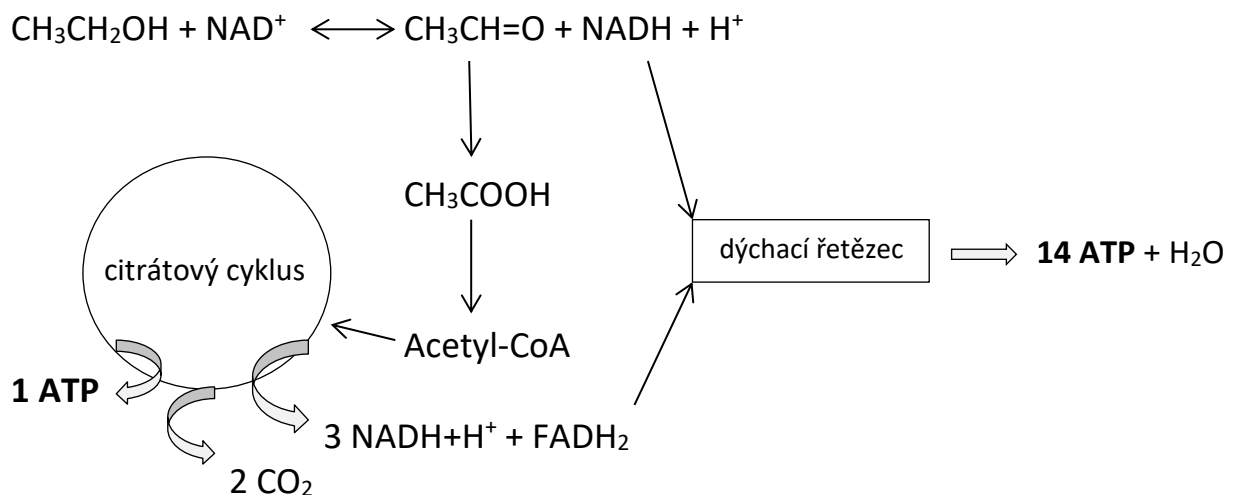
Datum:

ÚLOHA E

Analýza polymorfismu pro ADH a stanovení její aktivity v séru

TEORETICKÝ ÚVOD

Alkoholdehydrogenáza (ADH) je enzym oxidující primární a sekundární alkoholy a dioly. Zřejmě nejvýznamnějším z těchto alkoholů je ethanol, jehož metabolismus je lokalizován v gastrointestinálním traktu, především v játrech (až 98 %). Zde dochází účinkem ADH ve spolupráci s koenzymem NAD^+ k oxidaci ethanolu na acetaldehyd. Vznikající acetaldehyd je pak dále oxidován aldehyddehydrogenázou (ALDH) na acetát, který ve svalové tkáni vstupuje do citrátového cyklu jako acetyl-CoA a je postupně přeměněn na CO_2 , H_2O a energii v podobě 15 molekul ATP (obr. 1). Existuje několik typů ADH a ALDH enzymů, které jsou kódovány různými geny. Ukázalo se, že tyto různé varianty mohou u lidí ovlivňovat riziko vzniku závislosti na alkoholu. Předpokládá se, že mechanismus vzniku závislosti spojených s výskytem určitých forem ADH a ALDH je způsoben lokálním zvýšením obsahu acetaldehydu vyplývajícím buď z rychlé oxidace ethanolu, nebo pomalejší oxidace acetaldehydu.



Obrázek. 1: *Metabolismus ethanolu*

U lidí bylo identifikováno sedm různých genů pro ADH (*ADH1A*, *ADH1B*, *ADH1C*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7*) nacházejících se na chromosomu 4. Jednotlivé formy ADH byly pak na základě podobného obsahu aminokyselin a kinetických parametrů rozděleny do pěti tříd. Třída I obsahuje geny pro *ADH1A*, *ADH1B* a *ADH1C*, které mají hlavní podíl na oxidaci ethanolu

v játrech. Do třídy II patří gen pro *ADH4*, který se uplatňuje při oxidaci ethanolu až při vyšších koncentracích. Gen pro *ADH5* patří do třídy III kóduje enzym zvaný formaldehydrogenáza a vyznačuje se velmi nízkou afinitou pro ethanol. mRNA *ADH6* (třída IV) byla izolována z jater plodu i z jater dospělých jedinců, tento enzym však doposud nebyl z tkáně vyizolován a je o něm známo jen málo. Do poslední rodiny V patří *ADH7*, který se podílí na oxidaci retinolu a v menší míře také na oxidaci ethanolu.

U genů pro *ADH1B* a *ADH1C* bylo objeveno několik SNPs ovlivňujících kinetické vlastnosti těchto enzymů. Například polymorfismus nacházející se v kódující oblasti *ADH1B* genu, který vede k záměně aminokyseliny argininu v pozici 48 za histidin (*ADH1B*48H*) nebo polymorfismus v genu *ADH1C* vyznačující se záměnou valinu v pozici 350 za izoleucin (*ADH1C*350I*). Tyto substituce mají za následek produkci atypických forem enzymů s mnohonásobně zvýšenou V_{max} pro oxidaci ethanolu na acetaldehyd oproti formám klasickým (zvýšení až o 70%). Výsledky řady analýz ukazují, že polymorfismy *ADH1B*48H* a *ADH1C*350I* se právě vyskytují u osob s nadměrnou konzumací alkoholu. Přímá souvislost mezi polymorfismy a alkoholismem však nebyla potvrzena.

Restrikční analýza

Restrikční endonukleasy jsou enzymy, které rozpoznávají ve dvoušroubovicové DNA specifickou sekvenci složenou obvykle ze 4 až 6 párů bazí a v tomto místě DNA specificky štěpí. Většina rozpoznávaných sekvencí restrikčními enzymy jsou tzv. palindromy. Některé restrikční enzymy katalyzují štěpení dvou vláken DNA v polohách symetricky rozmístěných okolo středu palindromové sekvence (*HhaI*); vznikají tak fragmenty s kohezními či lepivými konci. Jiné restrikční enzymy naopak štěpí řetězec přímo ve středu palindromu (*SspI*). Vznikají pak fragmenty se zarovnanými či tupými konci.

K analýze jednotlivých polymorfismů využijeme restrikční analýzu genu *ADH1C* za využití restriktasy *SspI* (rs698). Jako materiál pro analýzu bude sloužit vzorek lidské krve, ze kterého budeme amplifikovat část oblasti genu obsahující daný polymorfismus, a následně se provede restrikční analýza.

Restrikční místo pro restriktasu *SspI*: AAT|ATT

TTA|TAA

Záměna Val/Ile v genu *ADH1C* je výsledkem jednonukleotidové substituce G/A, kdy štěpení restriktasou *SspI* podléhá alela A.

Aktivita ADH

Aktivita ADH se měří kolorimetrickou metodou využívající redukci N,N-dimethyl-4-nitrosoanilinu (NDMA) a ethanolu jako substrátu. Výrazně žlutý NDMA je v přítomnosti $NADH+H^+$ enzymaticky redukován na bezbarvý hydroxylaminový derivát. Jde tedy o recyklaci koenzymu, který se redukuje při oxidaci ethanolu a následně se opět oxiduje při redukci NDMA. Změna zbarvení reakční směsi se pozoruje při 440 nm.

Odběr kapilární krve

Kapilární krev se používá v případech, kdy je třeba jen malé množství vzorku. Hlavní zásady při odběru:

- prohrátím místa vpichu (bříško prstu, ušní boltec, u kojenců pata) zabezpečit dobré prokrvení (přiložit teplý vlhký obklad 3 min před vlastním odběrem)
- místo vpichu dezinfikovat
- vpich směřovat ze strany do bříška prstu, kde je lepší prokrvení než ve středu
- po nabodnutí lancetou první kapku otřít (příměs tkáňového moku), další tvorbu kapek podpořit lehkým tlakem (při silném vymačkávání je v krvi příměs tkáňového moku)
- krev se obvykle odebírá do speciálních kapilárních krevních zkumavek nebo do malých plastových či skleněných zkumavek. U proužkových testů se kapka krve aplikuje přímo.
- po odběru přiložit na místo vpichu vatou smočenou dezinfekčním prostředkem

Zpracování krve

Krev odebraná bez použití protisrážlivých prostředků se po kratší době sráží, v důsledku přeměny rozpustného fibrinogenu na vláknitou síť fibrinu. Odstředěním (10 min., 10 000xg, pokojová teplota) sražené krve se získá sérum. Doba srážení musí být dostatečná (při pokojové teplotě po 15–30 min). Předčasné oddělení séra od krevních elementů však může vést k dodatečné tvorbě fibrinu a koagulaci séra.

Postup práce:

Odběr vzorku krve

Odběr kapilární krve se provádí z boku špičky prstu (toto místo je nejméně citlivé na bolest)

1. Připravte si sterilní, jednorázovou autolancetu – odšroubujte sterilní čepičku a nastavte hloubku vpichu.
2. Otřete prst kapesníčkem s alkoholem a vyčkejte, dokud prst nebude úplně suchý.
3. Uchopte jednorázovou autolancetu mezi ukazováčkem, prostředníčkem a palcem. Přitiskněte autolancetu pevně z boku ke špičce prstu (toto místo je nejméně citlivé na bolest) a palcem stiskněte spoušť na doraz.
4. První malou kapku otřete a další tvorbu kapek podpořte jemným masírováním prstu směrem ke konečku.
5. Krev odeberte do sterilní mikrozkušavky. Odeberte vzorek pro PCR a zbytek krve nechte srážet 30 min.

PCR

1. Smíchejte 4 µl odebrané krve se 4 µl 5 nM EDTA.
2. Připravte reakční směsi dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Složení reakční směsi

krev	2,5 µl
SspI F+R primer (10 µM)	1,5 ul
Kapa MasterMix B	12,5 µl
DMSO	1,3 µl
PCR voda	7,2 µl

3. Reakční směsi jemně promíchejte, krátce stočte a vložte do termocycleru. Na termocycleru nastavte následující program:

95°C	5 min	
95°C	30 s	} 40x
55°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

Restrikční analýza polymorfismu genu ADH1C

1. Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Reakční směs SspI

PCR produkt	10 µl
10x FastDigest Buffer Green	2 µl
Enzym SspI	1 µl
PCR voda	7 µl

2. Reakční směs promíchejte, krátce stočte a inkubujte 20 min při 37°C.
3. Připravte si 1,5% agarosový gel.
4. Vzorky naneste na gel v následujícím pořadí: Délkový marker –RA SspI

Stanovení aktivity ADH v krevním séru

1. Sraženou krev centrifugujte 10 min při pokojové teplotě při 10 000 x g.
2. Opatrně odeberte sérum a přeneste do sterilní mikrozkušavky.
3. Připravte reakční směsi dle uvedené tabulky do mikrokyvety:

Sérum	20 µl
Reakční pufr	60 µl

4. Reakční směs promíchejte a měřte změnu absorbance při 440 nm po dobu 20 min při 25°C.

Vyhodnocení

- Na základě výsledku restriční analýzy určete, jaký genotyp ADH1C genu obsahoval váš vzorek krve
- Vypočtete specifickou aktivitu ADH ($\epsilon_{440} \text{NDMA} = 34 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) v kat/ml séra

ÚLOHA F

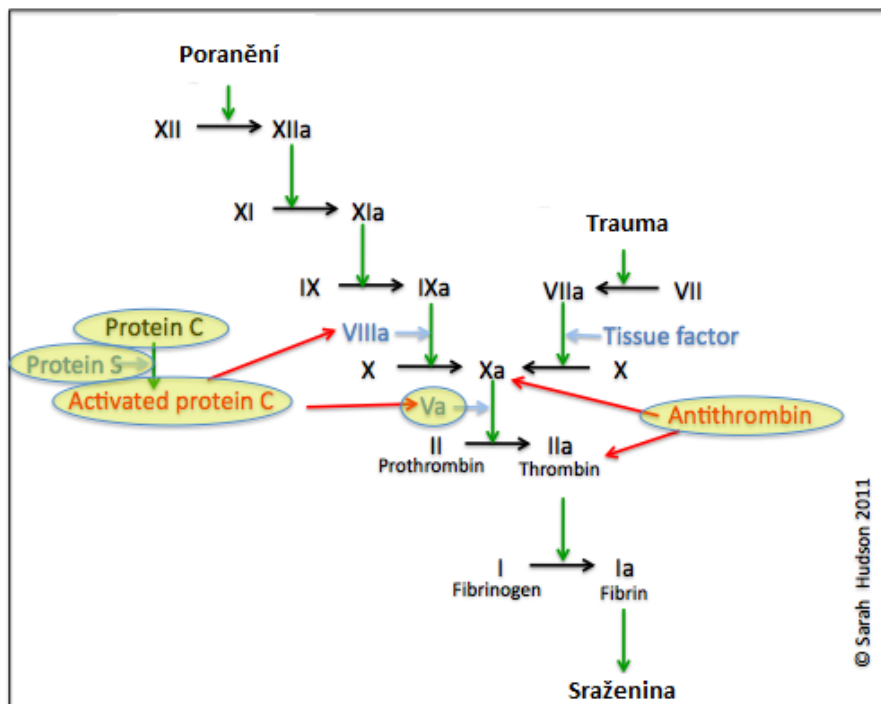
Analýza Leidenské mutace

TEORETICKÝ ÚVOD

Jednou ze základních funkcí krve v organismu je udržování stálého vnitřního prostředí tzv. homeostázy, což je základní podmínka pro jeho správné fungování, resp. existenci. Vzhledem k této nezastupitelné roli krve v těle, musí existovat mechanismus zabraňující jejím nadměrným ztrátám v případě poranění. Schopnost krve srážet se v místě poranění je složitý mnohastupňový proces (Obrázek 2), který je na každé úrovni přísně regulován. Účinná regulace tohoto procesu je obzvláště důležitá, protože nekontrolované srážení krve by mělo pro organismus fatální následky.

Podnětem ke vzniku krevní sraženiny však nemusí být pouze vnější poranění, může jít i o souhru endogenních pro-koagulačních faktorů, jako je zpomalení krevního průtoku cévou, poranění krevní cévy či geneticky podmíněná zvýšená krevní srážlivost.

Genetická dispozice ke zvýšené krevní srážlivosti představuje významný rizikový faktor. Jde o případy, kdy jsou v důsledku mutace v těle produkovány krevní faktory v pozměněné formě, což způsobuje např. jejich funkční změny či zvýšenou koncentraci. U osob s těmito dispozicemi ovšem ke spontánním trombózám obvykle nedochází, teprve až v součinnosti s dalšími rizikovými faktory se může, ale také nemusí, krevní sraženina vytvořit.



Obrázek 2. Schéma procesu srážení krve

V rámci cvičení bude provedena analýza jedno nukleotidového bodového polymorfismu (SNP) 1691 G/A genu pro faktor V. Faktor V je plazmatický glykoprotein s klíčovou rolí v koagulaci. V koagulační kaskádě působí buď pro koagulačně (pokud byl natráven trombinem či aktivovaným faktorem X) nebo antikoagulačně (pokud byl natráven aktivovaným proteinem C). Tzv. Leidenská mutace způsobuje rezistenci faktoru V k aktivovanému proteinu C, což vede k nedostatečné degradaci mutované varianty proteinem C. Tato mutace je nejznámější a nejrozšířenější, vyskytuje se cca u 5 % osob v populaci. Nositelům Leidenské mutace hrozí až 7x vyšší riziko žilní trombózy.

Ke genotypizaci vzorku bude využita restriční analýza s následnou detekcí vzniklých fragmentů pomocí 2% agaróзовého gelu. Princip metody spočívá ve štěpení produktů amplifikace části genu pro faktor V pomocí restriční endonukleázy *TaqI*, kdy buď dochází ke štěpení PCR produktu (wt alela) nebo nedochází ke štěpení PCR produktu (mutantní alela).

Postup práce:

PCR

1. Smíchejte 4 μ l odebrané krve se 4 μ l 5 nM EDTA.
2. Připravte reakční směsi dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Složení reakční směsi

krv	2,5 μ l
FV F+R primer (10 μ M)	1,5 μ l

Kapa MasterMix B	12,5 μ l
PCR voda	8,5 μ l

3. Reakční směsi jemně promíchejte, krátce stočte a vložte do termocycleru. Na termocycleru nastavte následující program:

95°C	5 min	} 40x
95°C	30 s	
55°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

Restrikční analýza polymorfismu genu pro FV

1. Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Reakční směs TaqI

PCR produkt	10 μ l
10x FastDigest Buffer Green	2 μ l
Enzym TaqI	1 μ l
PCR voda	7 μ l

2. Reakční směs promíchejte, krátce stočte a inkubujte 20 min při 37°C.
3. Připravte si 2.0 % agarosový gel.
4. Vzorok naneste na gel v následujícím pořadí: Délkový marker –RA TaqI

Vyhodnocení

- Na základě výsledku restrikční analýzy určete, jaký genotyp genu pro FV obsahoval váš vzorek krve a jestli jste nositeli Leidenské mutace.