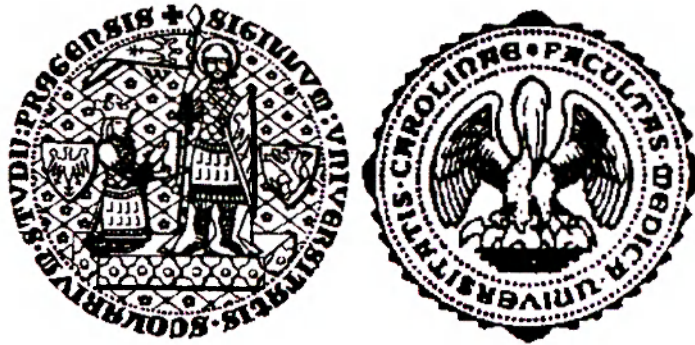


Univerzita Karlova v Praze  
I.lékařská fakulta  
Zdravotnická technika



Identifikace genetických determinant inzulínové rezistence pomocí srovnávacího  
sekvenování genů.

Bakalářská práce

Autor: Petra Slámová

Vedoucí diplomové práce: odb.as.MUDr. František Liška, PhD.

Praha 2007

## Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Identifikace genetických determinant insulinové rezistence pomocí srovnávacího sekvenování genů vypracovala samostatně. Veškerou použitou literaturu uvádím v seznamu literatury.

V Praze dne 1.6.2006

Petra Slámová

## Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu MUDr. Františkovi Liškovi, PhD za čas který věnoval konzultacím této bakalářské práce a ing. Blance Chylíkové za její cenné rady při práci v laboratoři.

## ABSTRAKT

Genetická výbava člověka podmiňuje nejen jeho fyziologické znaky, ale obsahuje také předpoklady pro vznik mnoha onemocnění. Významným zdrojem morbidity a mortality jsou lidská multifaktoriálně podmíněná onemocnění jako je hypertenze nebo metabolický syndrom. Na základě získaných poznatků o struktuře a funkci lidského genomu jsme schopni pomocí analýzy DNA postupně odhalovat molekulárně genetickou podstatu těchto dědičných onemocnění. Hledání zodpovědných genů u člověka je však velmi složité, proto lze s výhodou využít definovaných modelových organismů. Předmětem mojí práce byly modely metabolického syndromu u laboratorního potkana SHR, PD, BN. K izolaci jednotlivých komponent metabolického syndromu byly použity kongenní kmene. V procesu identifikace zodpovědných genů/alel, bylo vytvořeno několik kongenních podlinií. Sublinie SHR-*Lx*-PD5 má v genetickém pozadí původu SHR pouze 14 genů na 8 chromosomu, které jsou PD původu. Tento úsek způsobuje značné snížení inzulínové senzitivity kosterního svalu u kmene SHR-*Lx*-PD5 oproti SHR.

Zabývala jsem se analyzováním dvou z těchto genů, *Htr3a* a *Htr3b*, které kódují podjednotky serotoninového receptoru 5-HT<sub>3</sub>. Odhalila jsem 10 polymorfismů typu SNP (single nucleotide polymorphism = polymorfismů jednoho nukleotidu), z toho v jednom případě dochází ke změně aminokyseliny a sice histidinu na arginin, v posledním exonu *Htr3b*. Tato záměna (His364Arg) je funkčním kandidátem ovlivnění metabolického profilu u kmene PD5 a je třeba ji dále analyzovat.

## ABSTRACT

The human genome determines not only physiological traits, but also susceptibility to many diseases. Human multifactorial diseases such as hypertension and metabolic syndrome are a significant source of morbidity and mortality. Methods of DNA analysis and knowledge about structure and function of the human genome make it possible to devolve the molecular genetic basis of hereditary diseases.

Searching for the genes which are responsible for multifactorial diseases in human faces major obstacles. Therefore, it is advantageous to use defined model organisms. In my work I used the models of metabolic syndrome in the Norway rat, PD cub and SHR. To isolate particular components of the metabolic syndrome congenic strains have been used. In the process of identification of the causative alleles we have produced several congenic sublines.

In congenic subline PD5, there is a segment of PD origin encompassing 14 genes on chromosome 8 the genetic background is of SHR origin. This segment causes substantial reduction of muscle- ..... insulin sensitivity in PD5.

I analysed two genes in this region: *Htr3a* and *Htr3b* encoding subunits of the 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptor. I revealed 10 SNPs (single nucleotide polymorphisms) in both genes. However, only in one case aminoacid change occur, in particular histidin is changed to arginin in the last exon of *Htr3b*. This substitution (H364R) is a functional candidate for the metabolic profile derangement in PD5 and thus should be pursued further.

## OBSAH:

1	UVOD.....	7
1.1	METABOLICKÝ SYNDROM.....	9
1.2	BACKGROUND.....	10
2	METODIKA.....	12
2.1	IZOLACE Z RNA TKÁNÍ FENOLOVOU METODOU.....	12
2.2	IZOLACE GENOMOVÉ DNA .....	13
2.3	REVERZNÍ TRANSKRIPCE .....	14
2.4	RT – PCR.....	15
2.5	PCR .....	16
2.6	ELEKTROFOREZA.....	21
2.7	SEKVENACE .....	23
2.8	ETHANOLOVÉ ČIŠTĚNÍ.....	24
3	VÝSLEDKY .....	26
3.1	PŘEHLED PRIMERŮ A OČEKÁVANÝCH PRODUKTŮ .....	26
3.2	GENOMICKÁ DNA .....	27
3.3	CDNA .....	33
3.4	SEKVENACE .....	37
4	DISKUSE .....	40
5	ZÁVĚRY .....	41
6	BIBLIOGRAFIE .....	43

## 1. ÚVOD

Moderní metody analýzy DNA a na jejich základě získané poznatky o struktuře a funkci lidského genomu nám nyní, v „postgenomové“ éře 21. století, umožňují rozšifrovat molekulárně genetickou podstatu nejen monogenních, ale i multifaktoriálně podmíněných znaků, tj. najít geny, které jsou za tyto znaky zodpovědné. Nejprve je třeba si uvědomit, že každý člověk má (stejně jako každý jedinec jiného pohlavně se rozmnožujícího organismu s výjimkou jednovaječných dvojčat) unikátní genetickou výbavu, neboli unikátní sadu DNA molekul.

Srovnáme-li DNA dvou jedinců, tak v každých 100-300 nukleotidech se budou lišit v jednom písmenu genetického kódu, v tzv. SNP (z anglického single nucleotide polymorphism) [1] tedy v jednonukleotidové variaci sekvence DNA. Ačkoli jsou SNP absolutně nejfrekventovanějším typem polymorfismu DNA, v lidském genomu se vyskytují i další významné typy polymorfních sekvencí, např. tzv. Indels (inzerce a delece) [2, 3].

Inzerce (adice) je zařazení jednoho nebo více nadbytečných nukleotidových párů. Pokud je zařazen takový počet nukleotidů, který není celočíselným násobkem 3 ( $3n$ ), dojde k posunu čtecího rámce (tzv. frameshift mutation) a následně k syntetizování zcela odlišného polypeptidu nebo dokonce k předčasnému ukončení proteosyntézy, vznikem terminačního kodonu. Zařazení  $3n$  nukleotidů prodlužuje polypeptidový řetězec o  $n$  aminokyselinu podle inzerované sekvence.

Delece je ztráta jednoho nebo více nukleotidů původní sekvence. Účinek je podobný jako u inzercí, pouze místo prodloužení se polypeptidový řetězec zkracuje.

Genetická výbava člověka podmiňuje do značné míry nejen jeho somatické znaky, ale obsahuje také předpoklady pro vznik mnoha, více či méně závažných onemocnění. Nejčastěji jsou v této souvislosti připomínána zhoubná nádorová onemocnění, ale geneticky podmíněno může být i mnoho nemocí, jejichž projevy jsou zdánlivě náhodné a bez zřejmé souvislosti s genetickou výbavou. Mnoho nemocí skutečně propukne v důsledku nezdravého životního stylu. V poslední době stále vzrůstá i vliv narušeného životního prostředí.

Již od počátků moderní genetiky byly vyslovovány hypotézy, že na patogenezi všech onemocnění se neúčastní oddělené faktory - prostředí a dědičnost, ale že zásadní roli hrají interakce mezi nimi. Důvod, proč se zabývat interakcemi mezi geny a prostředím u komplexních znaků, jako je např. níže zmíněný metabolický syndrom, je hned několik. Kdybychom zkoumali zvlášť genetickou složku onemocnění a zvlášť účast faktorů prostředí bez ohledu na jejich vzájemné interakce, došli bychom k nesprávným závěrům stran rozsahu podílu obou složek. Celá řada epidemiologických studií dnes stále nereflektuje genetickou různorodost v rámci zkoumané skupiny a naopak mnohé studie čistě genetické pomíjejí důležité rozdíly mezi faktory prostředí (sociálně ekonomický status, stres, obezita, abúzus). Identifikací variant genů, které zodpovídají u jejich nositelů za senzitivitu nebo rezistenci vůči faktorům prostředí ve srovnání s většinovou populací, navíc získáváme přesnější náhled na patogenezi onemocnění samotného a přímo mohou vyplynout i nové možnosti a postupy terapeutického ovlivnění.



## 1.1 METABOLICKÝ SYNDROM

Metabolický syndrom (též někdy známý jako Reavenův syndrom, syndrom X či syndrom inzulínové rezistence), je onemocnění charakterizované především rezistencí k účinkům inzulínu, poruchou metabolismu lipidů a sklony k hypertenzi a obezitě. Syndrom je provázen závažnými zdravotními problémy – např. infarkty myokardu, mozkovými mrtvicemi či cévními komplikacemi. Typickým znakem metabolického syndromu je nadbytek tukové tkáně v oblasti pasu (centrální obezita). Tato tkáň je méně citlivá k hormonu inzulínu, jehož hladina stoupá a vede k zadržování tekutin v těle a ke vzestupu krevního tlaku. Současně se z této tkáně více uvolňují mastné kyseliny, které způsobují růst hladiny krevních tuků, triacylglycerolů. Právě vyšší krevní tlak a vyšší hladina krevních tuků vedou k poškození tepen zásobujících srdce a mozek. V určitém okamžiku nestačí už ani vyšší hladiny inzulínu a v krvi začne stoupat hladina krevních cukrů, což je jeden z příznaků diabetu mellitu a další faktor přímo poškozující naše cévy. Při vzniku syndromu hraje roli dědičná dispozice a faktory životního stylu, k nimž patří přejídání, nedostatek fyzického pohybu, alkohol, kouření a obezita.

V souhrnu lze říci, že lidská multifaktoriálně podmíněná onemocnění představují významný zdroj morbidit a mortalit, i značnou ekonomickou zátěž. Dědičná složka těchto onemocnění je však nesmírně komplexní a hledání zodpovědných genů nadmíru složité [4]. Proto lze s výhodou využít definovaných modelových organismů. Takto získané výsledky mohou být významným přínosem pro studium odpovídajících lidských onemocnění, vzhledem k vysokému stupni homologie architektury genomu i fyziologických procesů u savců.

## 1.2 BACKGROUND

SHR (spontánně hypertenzní potkan) a PD/Cub (polydaktylní potkan) jsou dva modely lidského metabolického syndromu. Kmen BN/Cub (Brown Norway) je neobézní, nevykazuje poruchy v metabolismu lipidů a sacharidů a má normální krevní tlak. SHR jako model metabolického syndromu a hypertenze.

Kmen PD/Cub má mutovanou alelu genu *Lx*, projevující se syndromem polydaktylie-luxace. Tento inbrední kmen je na ústavu ÚBLG 1.LF a VFN chován již od roku 1969, přičemž původně sloužil jako modelový organizmus pro studie zabývající se vývojem končetin a teratogenezí. Nicméně v devadesátých letech minulého století bylo zjištěno, že jednou z vlastností kmene je i zvýšená hladina triacylglycerolů [5]. Počátkem tohoto století pak byl kmen PD/Cub ustanoven jako model metabolického syndromu [6].

K izolaci jednotlivých komponent metabolického syndromu byly použity kongenní kmene, tedy takové kmene, u kterých je na genetické pozadí kmene jednoho vnášen předem zvolený omezený segment genomu kmene druhého. Přenesením 30 cM dlouhé oblasti potkaního chromosomu 8, smíšeného původu od kmene PD a BN na genetické pozadí kmene SHR, byl vytvořen kongenní kmen SHR-*Lx*. Ve srovnání s progenitorovým kmenem SHR bylo u SHR-*Lx* zjištěno snížení krevního tlaku za současného zhoršení několika metabolických parametrů souvisejících s metabolickým syndromem [7, 8]. Jedním ze standardních postupů v rámci procesu identifikace zodpovědných genů/alel je metoda tzv. pozičního klonování. Diferenciální úsek kongenního kmene je cíleným křížením postupně omezován při zachovaném efektu na sledovaný fenotyp. S použitím výchozího kmene SHR-*Lx* bylo vytvořeno několik kongenních podlinií. Sublinie SHR-*Lx*-PD5 obsahuje přibližně 1,4 Mb sekvence původu pouze od kmene PD, zahrnující pouze 14 genů. Zbytek genomu tohoto kmene je původu SHR [9].

Ze srovnání metabolických a morfometrických dat a profilů genové exprese mezi kmeny SHR-*Lx* PD5 a SHR vyplynulo, že několik zřetelných metabolických poruch pozorovaných v původním kongenním kmeni SHR-*Lx* je v PD5 stále přítomno. Dá se tedy předpokládat, že zodpovědné genomické determinanty byly "chyceny" uvnitř relativně krátkého diferenciálního segmentu původu PD/Cub.

Nejvýznamnějším parametrem je pravděpodobně značné snížení inzulínové senzitivity kosterního svalu u kmene SHR-*Lx*-PD5. Jedním z kandidátních genů je *Plzf* (promyelotic leukaemia zinc finger, také *Zbtb16*), jehož změněná regulace je s největší pravděpodobností rovněž zodpovědná za mutaci *Lx*. Protein *Plzf* je represor transkripce s širokým uplatněním v regulaci různorodých procesů, vč. metabolismu. V této souvislosti je zajímavé, že sekvenční analýza *Plzf* genu odhalila SNP vedoucí k substituci threoninu za serin u kmene SHR v aminokyselinové pozici 208 (T208S), nikoli však u kmene SHR-*Lx* nebo BN/Cub. Mezi 14-ti protein-kódujícími geny v diferenciálním segmentu kmene PD5 se nacházejí další geny *Htr3a* a *Htr3b*, kódující podjednotky serotoninového receptoru 5-HT3. *Htr3a* je kandidátním genem pro schizofrenii [10], 5-HT3 receptory se podílí na zprostředkování neusey (vyvolání zvracení) např. při nádorové chemoterapii, dále při patogenezi syndromu dráždivého tračníku [11], mutace 5-HT3 receptorů se mohou podílet na patogenezi Touretova syndromu [12]. Role *Htr3a* a *Htr3b* při patogenezi metabolického syndromu není dosud popsána, nicméně společně s cholecystokininem mají zásadní roli v regulaci příjmu potravy [13, 14] a centrální 5-HT3 receptory se podílejí na regulaci glykémie [15].

## 2. METODIKA

### 2.1 IZOLACE RNA Z TKÁNÍ FENOLOVOU METODOU

Hlavním úskalím práce s RNA je její citlivost na degradaci všudypřítomnými, vysoce stabilními RNázami. Proto je nutné všechny kroky provádět v rukavicích, smí se používat pouze materiál a chemikálie prosté RNáz. Veškeré sklo musí být pečené 2 hodiny při 250°C, plasty pouze vyjmuté z originálního balení v rukavicích a předsterilizované minimálně 20 minut při 121°C. Voda se používá DEPC – dekontaminovaná diethylpyrokarbonátem.

Potkany jsme usmrtili předávkováním inhalačního celkového anestetika - halothanu a odebrali příslušné orgány. Pro naše experimenty jsme použili mozek a varle, protože podle výsledků RT-PCR jsou Htr geny exprimovány právě zde. Orgány jsme ihned (do 30s) po odběru zmrazili v tekutém dusíku a rozmělnili je ve třecí misce na prášek. Vzorky, které nebyly určeny na okamžité použití, byly zmrazeny v - 70°C a ponechány jako zásobní.

Do sterilní zkumavky jsem přenesla 50 - 200 mg tkáně s 1 ml Trizolu (R) (Invitrogen) a protřepala, aby vznikla homogenní suspenze. Při větším množství vzorků je nutno mít homogenizované suspenze uložené na ledu a pak je zpracovat najednou. Nechala jsem vzorky odstát 10 minut při pokojové teplotě a centrifugovala 10 minut při maximálních otáčkách ve stolní centrifuze při teplotě 4°C. Supernatant jsem přelila do nové zkumavky. Tento krok slouží k odstranění zbytků buněk a mezibuněčné hmoty.

Do zkumavky jsem přidala 200 µl chloroformu (směs 24 dílů chloroformu a 1 díl isoamylalkoholu) na každý 1 ml roztoku Trizolu. Protřepala až se utvoří emulze a nechala otáčet 15 minut při pokojové teplotě. Fenol přítomný v trizolu přejde spolu s proteiny a částečně DNA do organické chloroformové fáze. Centrifugovala jsem 15 minut při maximálních otáčkách při teplotě 4°C.

Supernatant obsahující RNA přepipetujeme do nové zkumavky. Pracujeme velmi opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci sraženinou na rozhraní fází, nebo fenolem.

Precipitujeme RNA 500  $\mu$ l 100% isopropanolu na každý 1 ml trizolu. Přidáme izopropanol a dobře promícháme otáčením zkumavky.

Centrifugujeme 10 minut při 4°C při maximálních otáčkách. Vylijeme co nejlépe isopropanol a přidáme 1 ml 70% ethanolu a krátce protřepeme. Centrifugujeme 8 minut při 4°C při maximálních otáčkách. Ethanol vylijeme do poslední kapky, zbytek popřípadě vypipetujeme. Pro lepší čistotu RNA je možné krok se 70% ethanolem zařadit ještě jednou. Vysušíme zkumavky při pokojové teplotě.

Jakmile se peleta zprůhlední, což znamená, že je suchá, přidáme 50  $\mu$ l DEPC vody. Necháme rozpouštět v lednici 1 hodinu, nebo tento krok lze nahradit rozpouštěním v topném hnízdě při 68 °C 10 minut. Poté vrátíme na led nebo do mrazáku.

Pokud chceme RNA více koncentrovanou, můžeme snížit množství vody na 30  $\mu$ l v 2 ml zkumavkách, popřípadě 10  $\mu$ l v 1,5 ml zkumavkách. Pokud nebudeme delší dobu RNA potřebovat, je dobré ji uchovávat při -80°C. Jinak uchováváme při -20°C.

## **2.2 IZOLACE GENOMOVÉ DNA**

Potkanovi jsme odebrali 0,5 cm ocásku, který jsme nastříhali na malé kousky a zalili trávicím pufrům (50mM Tris HCl pH 8, 50 mM EDTA, 0,5% SDS), který se připravuje v laboratoři. K tomu jsme přidali 35  $\mu$ l proteinázy K (Sigma), důkladně protřepali a přes noc nechali inkubovat ve vodní lázni zahřáté na 55 °C. Ráno jsme mix opětovně promíchali a přidali 700  $\mu$ l směsi fenol - chloroform - isoamylalkohol ( 25:24:1). Ependorfky jsme nechali 20 minut otáčet a pak jsme je centrifugovali na 9 000g 3 minuty. Poté jsme přepipetovali supernatant do čisté zkumavky a celý krok zopakovali ještě jednou. Supernatant jsme přepipetovali do čisté zkumavky, za přídatku 70  $\mu$ l 3M octanu sodného a nechali chvíli otáčet.

Potom jsme přidali 700  $\mu$ l 96% ethanolu, za pomalého otáčení se začínala srážet DNA a posléze jsme centrifugovali na 9 000g 1 minutu. Obsah zkumavky jsme slili a přidali 1 ml 70% ethanolu, protřepali a zcentrifugovali na 9 000g 1 minutu. Opětovně jsme slili a nechali důkladně vyschnout a poté rozpouštět v 150 - 200  $\mu$ l v pufru TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0). Koncentraci a čistotu DNA a RNA jsme změřili spektrofotometricky při absorbanci 260 nm. Kontrolu integrity jsme provedli elektroforeticky na 1% agarose.

### 2.3 REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Detekce a analýza molekul RNA patří k důležitým molekulárně biologickým postupům. Molekuly mRNA se podílejí pouze z 1 - 2% na celkovém množství izolované RNA (převážnou část tvoří rRNA). Adaptace amplifikačních technik umožňuje relativně snadnou analýzu mRNA tím, že po reverzní transkripci následuje amplifikace cDNA pomocí PCR.

V prvním kroku se provede denaturace RNA a annealing primerů pro reverzní transkripci - v mém případě oligo dT, které hybridizují s polyA sekvencí mRNA.

	7,1 $\mu$ l
oligo dT (45 M)	0,8 $\mu$ l
RNA	2,1 $\mu$ l
inkubace 10 minut při 70°C zkumavky se vyndají na chladící stojánek přidáme RT-mix:	
H <sub>2</sub> O DEPC	9,6 $\mu$ l
5x RT pufr	5 $\mu$ l
dNTP 1mM	5 $\mu$ l
DTT (dithiothreitol)	2 $\mu$ l
inhibitor RNasy (40U/ l)	1 $\mu$ l
MMLV RT (200 U/ l)	1,2 $\mu$ l

*Tab.1 Reverzní transkripce*

Enzym reverzní transkriptáza z viru myší leukemie (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase – MMLV RT) se do mixu dává jako poslední, aby nedošlo k jeho inaktivaci.

Inkubuje se 1 hodinu při 37°C. Po inkubaci se zkumavky vyndají do chladicího stojánu, naředí dle potřeby. V našem případě se do každé zkumavky přidá 35 µl 10 mM Tris pufru o pH 8,5 a 40 µl DEPC vody (výsledná cDNA je 4x zředěná v 5mM Tris pufru). Připravené cDNA se skladuje v mrazáku při -20°C.

## **2.4 RT - PCR**

Jako RT - PCR se označuje taková polymerázová řetězová reakce, kterou předchází reverzní transkripce.

Je to velmi hodnotná metoda k analýze genové exprese, k detekci infekčních agens, k detekci genetických nemocí (eliminují se introny, poskytuje informace o alternativním sestřihu). Mezi používané reversní transkriptázy patří MLV, AMV, Tth. Reversní transkriptázy M-MuLV (z Moloneyho myšního leukemického viru) a AMV (z ptačího myeloblastického viru) jsou schopny syntetizovat cDNA až do 10 kb, zatímco bakteriální termostabilní Tth DNA polymerasa ijen do 2 kb. Používají se tři typy primerů: specifické oligonukleotidy pro syntézu vybrané určité mRNA, směs náhodných hexanukleotidů a oligo(dT) . Takto získaná cDNA pak slouží jako templát pro PCR.



## 2.5 PCR - POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Slouží k namnožení - amplifikaci specifických úseků DNA.

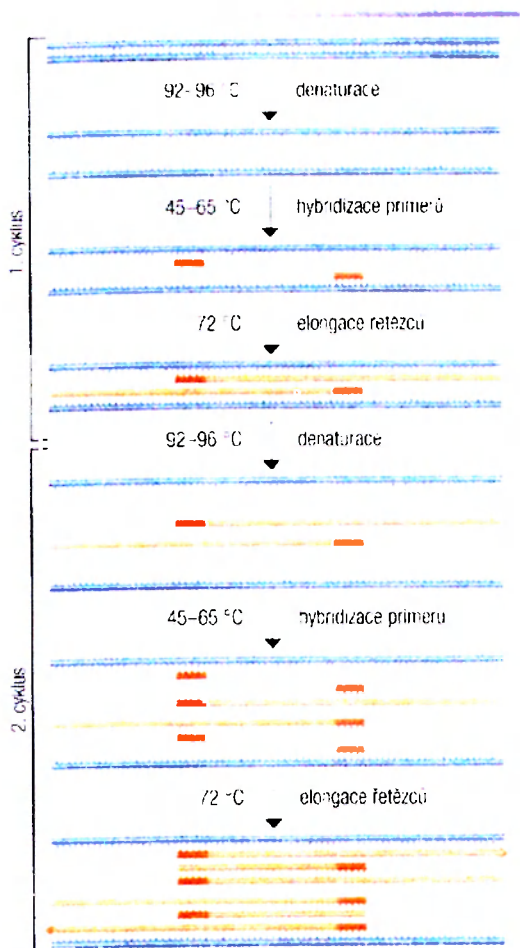
Reakce vychází ze znalosti kinetiky denaturace a opětovné renaturace molekul DNA. Při teplotě 92°C je dvojšroubovice DNA kompletně denaturována a v reakční směsi se vyskytuje výhradně v jednořetězové formě. Při poklesu teploty dochází díky vzájemné komplementaritě řetězců k opětovné renaturaci molekuly.

Pomocí polymerázové řetězové reakce lze však namnožit jen takové fragmenty, které jsou alespoň ohraničeny úseky o známé sekvenci, pokud jejich sekvence není známa kompletně. Podle těchto sekvencí jsou potom navrhovány tzv. primery, tj. jednořetězové molekuly DNA o délce 20 - 25 párů bází. Důležité je, aby cílové sekvence s nimiž primery hybridizují, byly specifické jen pro vyšetřovanou oblast a nevyskytovaly se na jiných místech genomu. Tyto oligonukleotidy jsou syntetizovány uměle a jsou nezbytnou součástí reakční směsi, stejně tak jako jednotlivé deoxynukleotidfosfáty (dNTP), vhodný reakční pufr a termostabilní enzym - Taq DNA polymeraza. PCR probíhá v přístroji zvaném cykler a sestává ze tří základních kroků.



*Obr. 1 Uzavřený (a) a otevřený cykler (b).  
Po odklopení víka vidíme uvnitř přístroje kovový blok  
s otvory pro vkládání zkumavek se vzorky.*





Obr.2 Schéma Polymerázové řetězové reakce (PCR)

V prvním kroku reakce dochází při teplotě zhruba 92 - 98 °C k denaturaci dvojšroubovice templátové DNA.

V druhém kroku je teplota snížena a primery přítomné v reakční směsi mohou vyhledat komplementární úseky cílové DNA a vytvořit s nimi dvojšroubovici. Tato část reakce bývá označována jako annealing nebo hybridizace primerů. Teplotu annealingu je možné teoreticky vypočítat na základě znalosti sekvence primerů, prakticky je však nutné optimální teplotu pro každou dvojici primerů hledat experimentálně.

Probíhá při teplotě 45 – 65 °C.

Třetí krok reakce začíná při teplotě 72 °C a dochází při ní k prodlužování, nebo-li elongaci nukleotidových řetězců, působením Taq DNA polymerázy. Přítomnost krátkých dvojřetězových úseků s volným 5'- koncem je předpokladem pro činnost tohoto enzymu, který nasedne na konec primerů a začne dosyntetizovávat druhé komplementární vlákno dvojšroubovice. Enzym Taq polymerázy byl izolován z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* a je tudíž schopen pracovat optimálně při teplotách kolem 72 °C.

Uvedené kroky představují pouze první cyklus PCR, jenž by sám o sobě k namnožení zkoumaného úseku DNA nestačil. Teprve ve třetím cyklu se vytvářejí dvojřetězcové fragmenty DNA o délce odpovídající amplifikovanému úseku. Aby se jich vytvořilo dostatečné množství, opakují se tři reakční kroky - denaturace, annealing a elongace ve dvaceti až čtyřiceti na sebe navazujících cyklech.

V závěru PCR získáme směs obsahující velké množství amplifikovaných fragmentů. Aby je bylo možno použít pro další vyšetření, musíme je oddělit od zbytku DNA. Pro analýzu produktu reakce je nejspolehlivější metodou elektroforéza, která umožňuje nejen určit, zda došlo k amplifikaci, ale také zda se jedná o předpokládanou délku fragmentu.

K výhodám reakce patří potřeba minimálního množství výchozí DNA, rychlost a vysoká specifita. Z charakteru reakce vyplývají její nevýhody, především její náchylnost ke kontaminaci cizorodou DNA, vedoucí k falešné pozitivitě. S ohledem na možnost kontaminace vzorků produkty amplifikačních reakcí probíhá izolace DNA a příprava reakčních směsí v prostoru odděleném od laboratoře, v níž jsou amplifikáty analyzovány.

Primery jsme navrhli na základě známých sekvencí s použitím programu Primer 3 (Rozen a Skaletsky) tak, aby optimální annealingová teplota byla 60°C. Seznam použitých primerů je uveden v (*Tab. 9 a Tab. 10.*)

Pro genomickou DNA jsme primery navrhovali tak, aby exon ležel zhruba uprostřed ampliconu dlouhého maximálně 500 bp, protože byl analyzován kapilární elektroforézou na sekvenátoru ABI 310 (Applied Biosystems) na tzv. krátké kapiláře, která by delší úsek nezpracovala.

<b>PCR receptura</b>	
Destilovaná H <sub>2</sub> O	5,9 µl
betain	3,0 µl
dNTP (200 mM)	1,0 µl
Pfu pufr 10x	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (20 mM)	1,2 µl
R primer (10 µM)	0,6 µl
F primer (10 µM)	0,6 µl
Taq polymerasa (10U/µl)	0,7 µl
DNA 100ng/ µl	1 µl

*Tab 2. Receptura polymerázové řetězové reakce*

**PCR amplifikace byla provedena za následujících podmínek:**

Počáteční denaturace	94°C	3 min	35 cyklů
Denaturační krok	94 °C	30 s	
Annealing	57-60 °C *	45 s	
Elongace	72°C	90 s	
Konečná elongace	72°C	5 min	

\* specifická podle primeru

*Tab3.program Polymerázové řetězové reakce*

Alternativně jsem použila DNA polymerázu Phusion (Finnzymes), která má opravnou 3'-5' exonukleázovou aktivitu, ale zároveň vysokou účinnost polymerace. Hodí se proto zejména na amplifikaci dlouhých úseků, ale podle zkušeností naší laboratoře je často účinnější i u běžné PCR.

<b>PCR receptura s Phusion polymerázou</b>	
Destilovaná H <sub>2</sub> O	5,8 µl
betain	4,0 µl
dNTP (200 mM)	4,0 µl
5x pufr GC	4,0 µl
R primer (10 µM)	0,6 µl
F primer (10 µM)	0,6 µl
Phu polymerasa	0,2 µl
DNA 100ng/ µl	2 µl

*Tab.4 Receptura polymerázové řetězové reakce Phusion polymerázou*

**PCR amplifikace byla provedena za následujících podmínek:**

Počáteční denaturace	98°C	30 s	30 cyklů
Denaturační krok	98 °C	10 s	
Annealing	63°C	30 s	
Elongace	72°C	40 s *	
Konečná elongace	72°C	5 min	

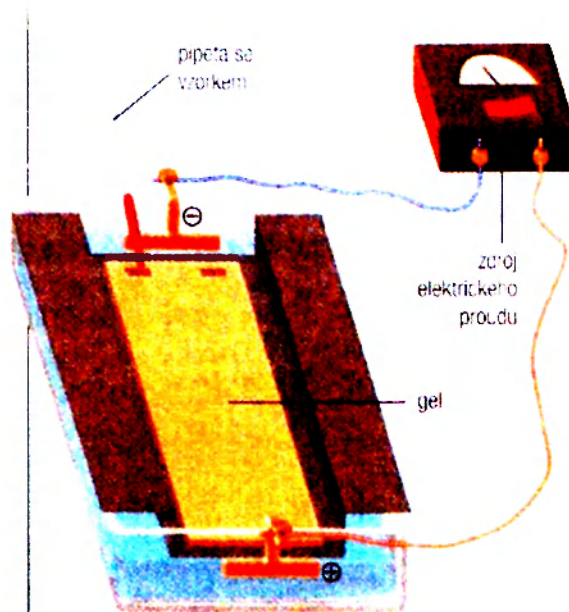
\*délka elongace se používá 30s na fragmentdlouhý 1kb

*Tab5. Program Polymerázové řetězové reakce*

Jelikož je Phusion polymeráza citlivější na změnu teplot díky 3'-5' exonukleotidové aktivitě by mohlo dojít za pokojové teploty k degradaci primerů, proto jsem PCR mix připravovala na chladícím stojánku a ependorfky vkládala do již předeřátého cykleru na 98°C.

## 2.6 ELEKTROFORÉZA

Elektroforéza je založená na izolaci molekul o rozdílné hmotnosti, popř. odlišném elektrickém náboji. Roztok obsahující fragmenty DNA převádíme do jamek v tzv. elektroforetickém gelu. Vytvoříme jej rozpuštěním polysacharidu zvaného agaróza v horké vodě. Tento hustý koloidní roztok pak nalijeme na povrch elektroforetické desky a necháme ochladit. Vytvoří se rosolovitá vrstva podobná aspiku. V některých případech se místo agarózy používají jiné polymerní látky, např. polyakrylamid. Elektroforetickou desku pak umístíme do zvláštní aparatury, která je připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Z jamek na okraji elektroforetického gelu jsou pak záporně nabitě fragmenty DNA přitahovány ke kladné elektrodě, neboť na jeden nukleotid připadá 1 záporný náboj zbytku kyseliny fosforečné. Pokud se vytvoří fragmenty o rozdílné délce (reprezentující dvě různé alely), dojde na elektroforetickém gelu k jejich oddělení, takže je můžeme spolehlivě rozlišit. Kratší úseky DNA procházejí elektroforetickým gelem rychleji než delší úseky, proto je nalézáme ve větší vzdálenosti od výchozí jamky. Fragmenty v gelu zviditelníme přidáním fluorescenčního barviva, obvykle ethidium-bromidu, které se váže specificky na DNA a v ultrafialovém světle jasně září. Elektroforeticky se rovněž ověří velikost získaného fragmentu, která je daná lokalizací primerů a lze ji tedy předem zjistit na základě znalosti sekvence DNA. Je-li výsledkem reakce fragment odlišné velikosti, je potřeba reakci dále optimalizovat.



Obr. 3 Schéma elektroforézy

### Příprava agarosy

<b>agarosa</b>	<b>1,5%</b>	<b>2%</b>
agarosa	1,2 g	1,6g
Destilovaná voda	64 ml	64 ml
TBE pufr	16 ml	16 ml

Tab.6 příprava agarosy

Odměřené suroviny jsem důkladně promíchala a přivedla k varu. Do horkého roztoku jsem připipetovala 1  $\mu$ l etidium - bromidu a nechala zchladit pod tekoucí vodou na 60°C. Pak jsem vše nalila do elektroforetické vany a nechala tuhnout 30 minut při pokojové teplotě. Ztuhlý gel jsem zalila 5x zředěným TBE pufrům. Do vytvořených jamek jsem nanášela vzorky o objemu 5  $\mu$ l. Poté jsem spustila elektroforézu při elektrickém napětí 85V, a nechala jsem běžet 15 až 35 minut.

## 2.7 SEKVENACE

K odhalení sekvence DNA se používá metod, které se souhrnně nazývají sekvenční analýzy DNA - sekvenování.

Jedna z nejpoužívanějších metod stanovení sekvence DNA je modifikací PCR. K analýze se používá jen jeden oligonukleotidový primer, který je komplementární k počáteční oblasti sekvenovaného úseku DNA. Reakční směs dále obsahuje DNA- polymerázu, deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP) a dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP). Tyto syntetické nukleotidy (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) mají na 3' uhlíkovém atomu deoxyribózy navázané místo -OH skupiny pouze vodík. Každý druh ddNTP je označen jiným fluorescenčním barvivem.

Vzorek vyšetřované DNA s reakční směsí umístíme do cykleru a postupně měníme teplotu stejně jako při klasické PCR. Při následné syntéze se do nových řetězců DNA začleňují jednotlivé nukleotidy. Pokud je místo dNTP zařazen ddNTP, tvorba příslušného řetězce se zastaví, neboť další nukleotid lze připojit pouze na OH- skupinu, nikoli tam kde je samotný vodík. Tak se během procesu vytvoří velký počet fragmentů DNA o různé délce. Elektroforetickým rozdělením směsi získáme spektrum těchto úseků, které se budou vzájemně lišit právě o délku jednoho nukleotidu. Podle výskytu specifického fluorescenčního barviva na konci každého fragmentu lze zjistit, kterým ddNTP byla syntéza ukončena. Pořadí těchto ddNTP na konci jednotlivých úseků udává sekvenci analyzovaného řetězce DNA.



Sekvenační mix	
Mix	2,0 µl
Primer	0,5 µl
DMSO	0,3 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 µl
DNA	0,7 µl

*Tab.7 Sekvenační mix*

**Sekvenační reakce byla provedena za následujících podmínek:**

Počáteční denaturace	96°C	1 min	25 cyklů
Denaturační krok	96 °C	20 s	
Annealing	50°C	10 s	
Elongace	60°C	3 min	

*Tab.8 Sekvenační reakce*

## 2.8 ETANOLOVÉ ČIŠTĚNÍ

Provádí se bezprostředně po sekvenační reakci, pro vyčištění produktu a zlepšení jeho kvality.

Do reakce o objemu 10 µl jsem dala 28 µl ethanolu I ( 64 dílů 95 % ethanolu + 16 dílů vody) - výsledná koncentrace je 60 % ethanol.

Nechala jsem 15 minut odstát při laboratorní teplotě a centrifugovala 20 minut při 13 000 otáčkách. Bylo nutné dodržet orientaci zkumavky špičkou na stejnou stranu. Po stočení jsem zkumavky vyndala do stojánku a důkladně vylila prudkým otočením na sterilní buničitou vatu. Poté jsem do reakce přidala 84 µl 70 % ethanolu II ( 70 dílů 95 % ethanolu + 25 dílů vody). Jemně jsem protřepala a dala hned stočit do centrifugy na 10 minut při 13 000 otáčkách.



Po vyjmutí zkumavek z centrifugy jsem obsah zkumavek opět vylila do sterilní buničité vaty a zkumavky dala otevřené vysušit do cykleru na 1 minutu při 90 °C. Poté se do suchých zkumavek přidá 25 µl formamidu a nechá se v cykleru denaturovat 3 - 4 minuty při 95 °C. Po skončení denaturace se zkumavky okamžitě vyndají do chladícího stojánu a dají se do mrazáku, kde setrvají až do analýzy.

Vlastní analýza sestává z rozdělení produktů sekvenační reakce kapilární elektroforézou na sekvenátoru ABI 310 (Applied Biosystems). Sekvenátory umožňují přesné zařazení fragmentů podle velikosti a následně automatické odečtení sekvence zkoumané DNA. K vyhodnocení výsledků slouží specializovaný počítačový program SeqMan od společnosti DNASTAR. S jeho pomocí lze identifikovat mutace zodpovědné za vznik geneticky podmíněných chorob.

### 3. VÝSLEDKY

Po odebrání tkáňových vzorků a genomové izolaci DNA jsem navrhla primery a každý úsek jsem podrobila polymerázové řetězové reakci s optimalizací podmínek. Produkty optimalizované PCR jsem sekvenovala.

#### 3.1. PŘEHLED PRIMERŮ A OČEKÁVANÝCH PRODUKTŮ

Gen	Primer Forward	Primer Reverse	Délka bp
Htr3a 1	gcgcttgctagaaaacttgg	tcacctgggctcaacttct	393
Htr3a 2	agccatctctctgtccaga	ggtgccagaccacaggtact	379
Htr3a 3	tttaacaggccagcatctcc	cagggttagcctttgagcac	436
Htr3a 4	tggggtctttatcgaccag	gcgtaaggagagcttgaac	381
Htr3a 5	gtgagggtctgctcttcag	gcctagcatgtgcaaggtct	410
Htr3a 6	gctcaggaaaccaggactga	ggacttgagttggcaaaga	440
Htr3a 7	ctgtccttccccaagcaat	ctctccccagactgtcac	429
Htr3a 8	ccctattccctcccactt	cggctgactgacttctctgg	388
Htr3a 9a	cccaccaccctcttttat	ctggggttgctcagatgaat	416
Htr3a 9b	tacagcatcacctggctcac	cgtagggaagtaccacaa	437
Htr3a 9c	ggatggctcattccacagt	atccttgacgcttctct	409
Htr3b 1	ccacaagtgagcagacagga	ccacctgagtgagctggatt	440
Htr3b 2	acctcagcaccagctttctc	gcctagccctagcagttcaa	431
Htr3b 3	aaagccacaggtgtcacia	ggaacctcaaaaacgagga	440
Htr3b 4	ggctgatgaattgggtcagt	gccccgcaattgtatctta	382
Htr3b 5	cctatgtgcttgagttcctg	tagaccgtggctctcatgg	421
Htr3b 6	aaaactgggaattgggaagg	tctctgcttcagacactgg	395
Htr3b 7	tctgcttcagctccctaaa	tggtctaggagggtgtcagg	440
Htr3b 8	tgtctgatgaggtgccaaga	aacaaagcaagcaggattgg	414
Htr3b_9	agctgtgctcctctaacca	ccttctcagaccctctcca	438

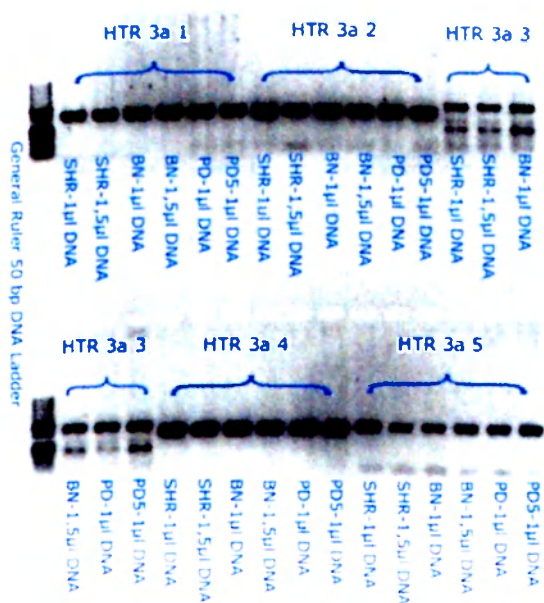
*Tab.9 Přehled použitých primerů na genomickou DNA*

Gen	Primer Forward	Primer Revers	Délka pb
Htr3a c1	ctcccagtacaccccagaaa	cccacgtccacaaactcatt	648
Htr3a c2	ttctggaccgacgagtttct	ggcgctgtaaactctgctta	748
Htr3a c3	taagcctcgctgagaccatc	actgtggaaatgagccatcc	749
Htr3a c1a	caggcagcagttggaaaag	cacagaaagaagctgccactc	776
Htr3b c1	tgcaccaaagttaccacia	cacagaaagaagctgccactc	776
Htr3b c2	gacattgagaacgacaaaaggtc	taccatccctccttctca	845
Htr3b c3	taagcctcgctgagaccatc	actgtggaaatgagccatcc	749

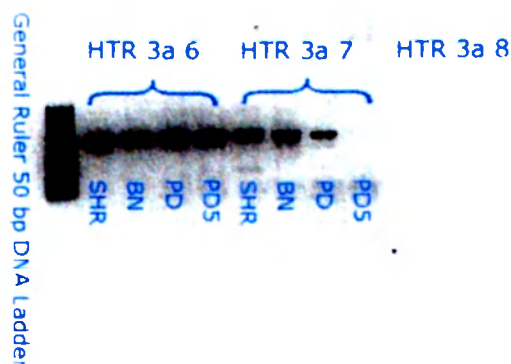
*Tab.10 Přehled použitých primerů na cDNA*

### 3.2 GENOMICKÁ DNA

PCR – Htr 3a1, Htr 3a2, Htr 3a3, Htr 3a4, Htr 3a5



*Obr.4 Htr 3a1, Htr 3a2, Htr 3a3,  
Htr 3a4, Htr 3a5  
Annealing 60 °C  
1,5 % agarosa, 85 V 35 min.*

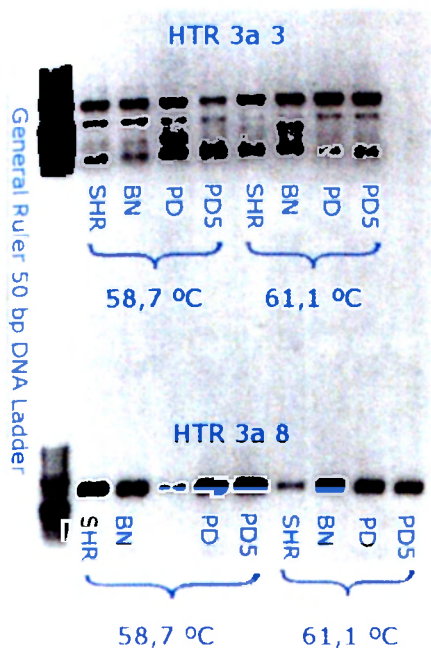


*Obr.5 Htr 3a6, Htr 3a7, Htr 3a8  
Annealing 60 °C  
1,5 % agarosa, 85 V 35 min*

U vzorků Htr 3a1, Htr 3a2, Htr 3a3 , Htr 3a4 a Htr 3a5 jsem použila dvojí přidavek DNA – 1 µl a 1,5 µl. Jelikož jsem u výsledků nezaznamenala rozdíl, do dalších reakcí jsem vždy přidávala po 1 µl DNA.

PCR vzorky Htr 3a1, Htr 3a2, Htr 3a4, Htr 3a5, Htr 3a6, Htr 3a7(kromě vzorku PD5) vyšly, proto jsem udělala sekvenční reakci. Sekvence vzorku Htr 3a3 nebyla možná, neboť produkt nevyšel čistě. Bude podroben další optimalizaci metody spolu se vzorkem 3a8, který nevyšel vůbec.

## PCR Htr 3a3, Htr 3a8

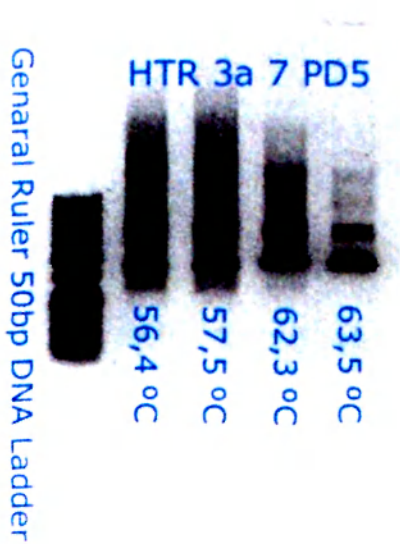


Obr.6 Htr 3a3, Htr 3a8  
Annealing 58,7 °C, 61,1 °C  
1,5 % agarosa, 85 V 35 min.

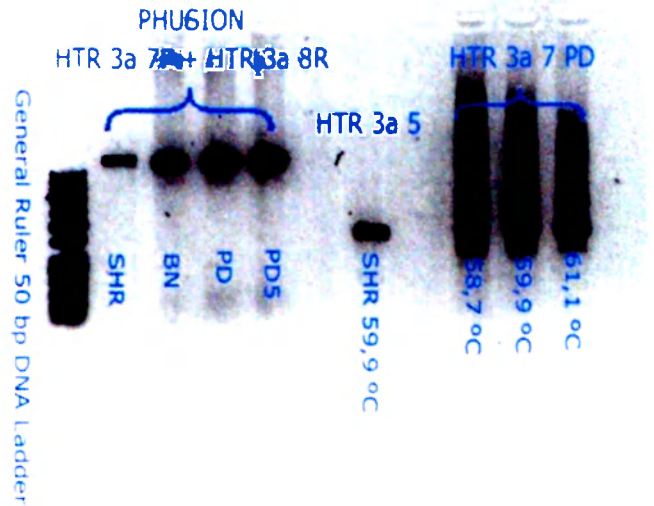
PCR s annealingem při teplotách 58,7 °C a 61,1 °C vyšla o mnoho lépe. K sekvenaci jsem použila vzorek Htr 3a3 při teplotě 61,1 °C a Htr 3a8 při teplotě 58,7 °C

Vzorek Htr 3a7 PD5 v předchozí reakci při annealing 60°C nevyšel. Proto jsem ho ve dvou fázích podrobila gradientu teplot (Obr. 7) při teplotách 56,4°C 57,5°C 62,3°C 63,5°C a (Obr. 8) při teplotách 58,7°C 59,9°C 61,1°C. Ani jeden z těchto vzorků nebyl vhodný k sekvenací reakci, proto jsem zkusila dát vzorek Htr 3a7 PD5 na teplotní gradient (Obr. 9) při teplotách annealingu 58,9°C 61,2°C 62,4°C 63,6°C a 64,8°C s Phusion polymerázou. Nejlépe vyšel vzorek z teploty 61,2°C, který jsem použila k sekvenování.

PCR Htr 3a7 PD5, Htr 3a7F + Htr 3a8R PHUSION



Obr.7 Htr 3a7 PD5  
Teplotní gradient  
Agarosa 1,5 % 85V 35 min.

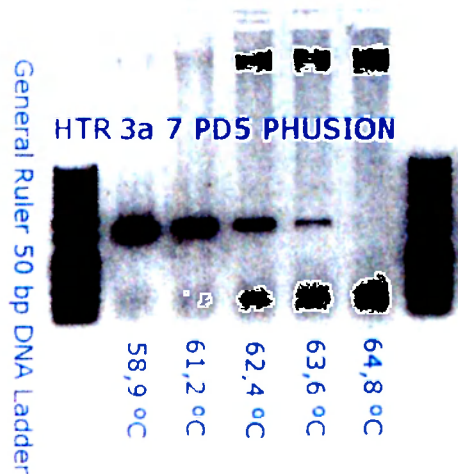


Obr.8 Htr 3a7F + Htr 3a8R Phusion, Htr 3a5, Htr 3a7 PD  
Teplotní gradient  
Agarosa 1,5 % 85V 35 min.

PCR HTR 3a7 PD5 PHUSION

H <sub>2</sub> O	5,8 µl
betain	4,0 µl
dNTP	4,0 µl
5x pufr GC	4 µl
R primer	1 µl
F primer	1 µl
Phu polymerasa	0,2 µl

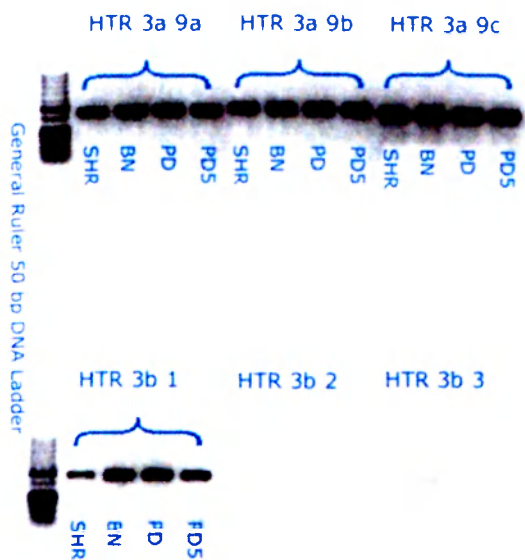
20 µl Mixu + 2 µl DNA



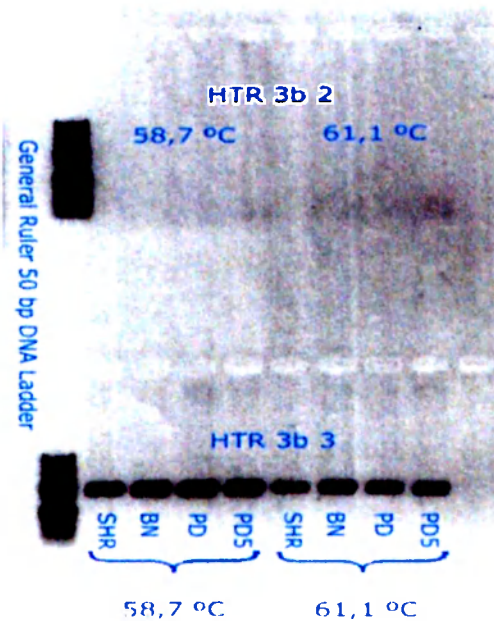
Obr.9 Htr 3a7 PD5  
Teplotní gradient PHUSION  
Agarosa 1,5% 85V 35 min.



PCR - Htr 3a9a, Htr 3a9b, Htr 3a9c, Htr 3b1, Htr 3b2, Htr 3b3



Obr.10 Htr 3a9a, Htr 3a 9b, Htr 3a9c, Htr 3b1, Htr 3b2, Htr 3b3  
 Annealing 60 °C  
 agarosa 1,5 %, 85 V 35 min.



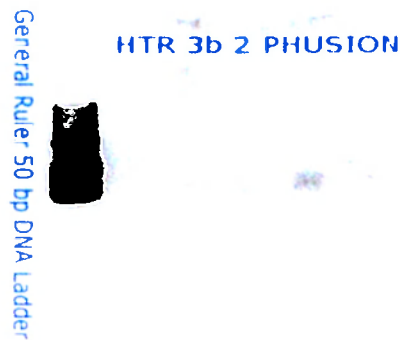
Obr.11 Htr 3b2, Htr 3b3  
 Annealing 58,7 °C, 61,1 °C  
 Agarosa 1,5 %, 85 V 35 min.

PCR u vzorků Htr 3a9a, Htr 3a9b, Htr 3a9c a Htr 3b1 vyšla na poprvé, PCR vzorku Htr 3b2 a Htr 3b3 jsem musela zopakovat při teplotě 58,7 °C a 61,1 °C. U vzorků Htr 3a9a, Htr 3a9b, Htr 3a9c, Htr 3b1 a Htr 3b3 vyšel čistý produkt, a tak mohly být nasekvenovány. K sekvenci vzorku Htr 3b3 jsem použila PCR s 61,1 °C. PCR u Htr 3b2 nevyšla ani při jedné zkušované teplotě, proto jsem reakci zopakovala znovu s Phusion polymerasou.

## PCR Htr 3b2 PHUSION

H <sub>2</sub> O	5,8 $\mu$ l
betain	4,0 $\mu$ l
dNTP	4,0 $\mu$ l
5x pufr GC	4 $\mu$ l
R primer	1 $\mu$ l
F primer	1 $\mu$ l
Phu polymerasa	0,2 $\mu$ l

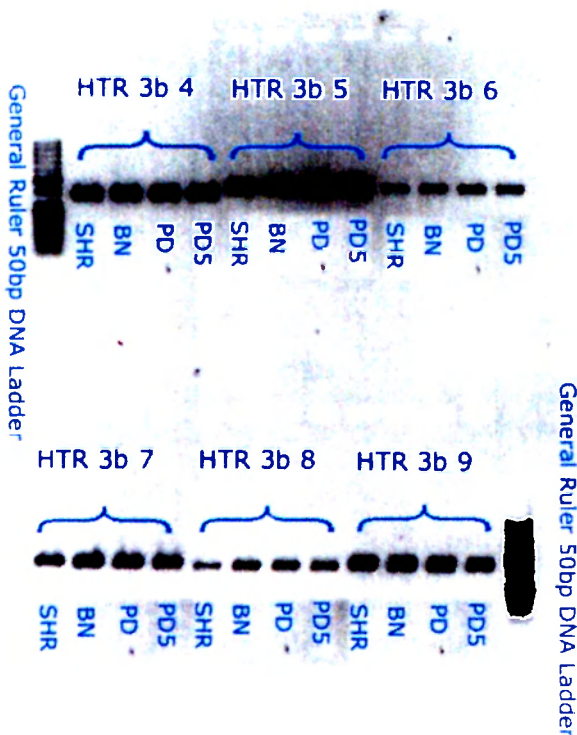
20  $\mu$ l Mixu + 2  $\mu$  DNA



Obr.12 Htr 3b2 PHUSION  
Annealing 72 °C 30s  
agarosa 1,5 %, 85V 35 min.

Při PCR s phusion polymerasou jsem pracovala na mrazícím stojánku, abych ji nedeaktivovala. I přes její vyšší účinnost reakce nevyšla. Usoudila jsem, že to bude špatným výběrem primeru, proto jsem objednala primer nový.

PCR - Htr 3b4, Htr 3b5, Htr 3b6, Htr 3b7, Htr 3b9



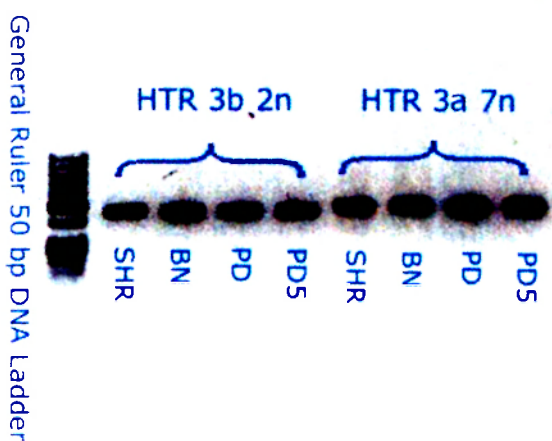
Obr.13 Htr 3b4, Htr 3b5, Htr 3b6, Htr 3b7,  
Htr 3b8, Htr 3b9  
Annealing 60 °C  
Agarosa 1,5 %, 85 V 35 min.

PCR u *Htr3a7* vyšla velmi čistě, ale sekvenace tohoto vzorku příliš dobře nevyšla, protože sekvenovaný úsek obsahoval repetitivní oblast.

DNA eukaryot a také člověka obsahuje značný podíl nekódujících sekvencí. Tak jako kódující DNA i nekódující může být unikátní a nebo se může nacházet v genomu ve více identických nebo podobných kopiích. Sekvence DNA s vysokým množstvím kopií se nazývají repetitivní sekvence.

Nový primer *Htr3a7* byl vybrán, tak, aby se této oblasti vyhnul.

PCR HTR 3b 2n + HTR 3a 7n



Obr.14 *Htr 3b2n, Htr 3a7n*  
Annealing 60 °C  
Agarosa 1,5 % 85V 35 min.

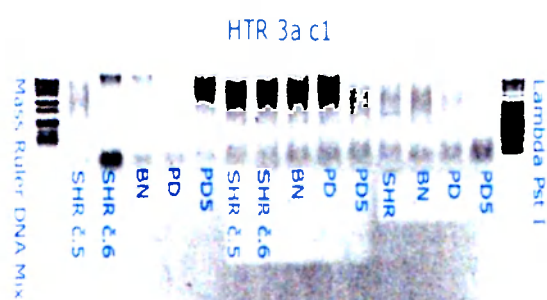
PCR *Htr 3a 7n* a *3b 2n*, vyšla také čistě a vzorek byl tedy podroben sekvenační reakci.

Jelikož se mi povedlo pomocí PCR a sekvenční reakce nasekvenovat celou oblast genů *Htr 3a* a *Htr 3b* s genomickou DNA, rozhodla jsem se tyto geny podrobit i sekvenaci s cDNA .

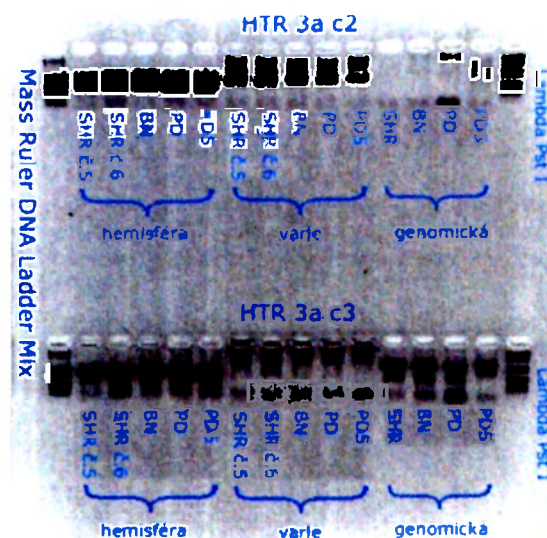


### 3.3 cDNA

RT-PCR Htrt 3a c1, Htr 3a c2, Htr 3a c3



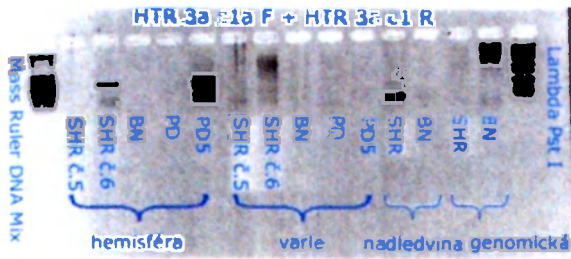
Ob.r15 Výsledek RT-PCR Htr 3ac1  
Annealing 60 °C  
2% agarosa, 85 V 15 min.



Obr.16 RT-PCR Htr 3ac2 a Htr 3ac3  
Annealing 60 °C  
2% agarosa, 85 V 15 min.

Protože vzorky hemisféry Htr 3ac1 a Htr 3ac2 v RT-PCR metodě vyšly čistě, provedla jsem sekvenační reakci. Vzorky Htr 3ac1 je nutno ještě optimalizovat. Použila jsem alternativní primer 3ac1 F. Receptura RT-PCR zůstává stejná, annealing probíhá také při 60C.

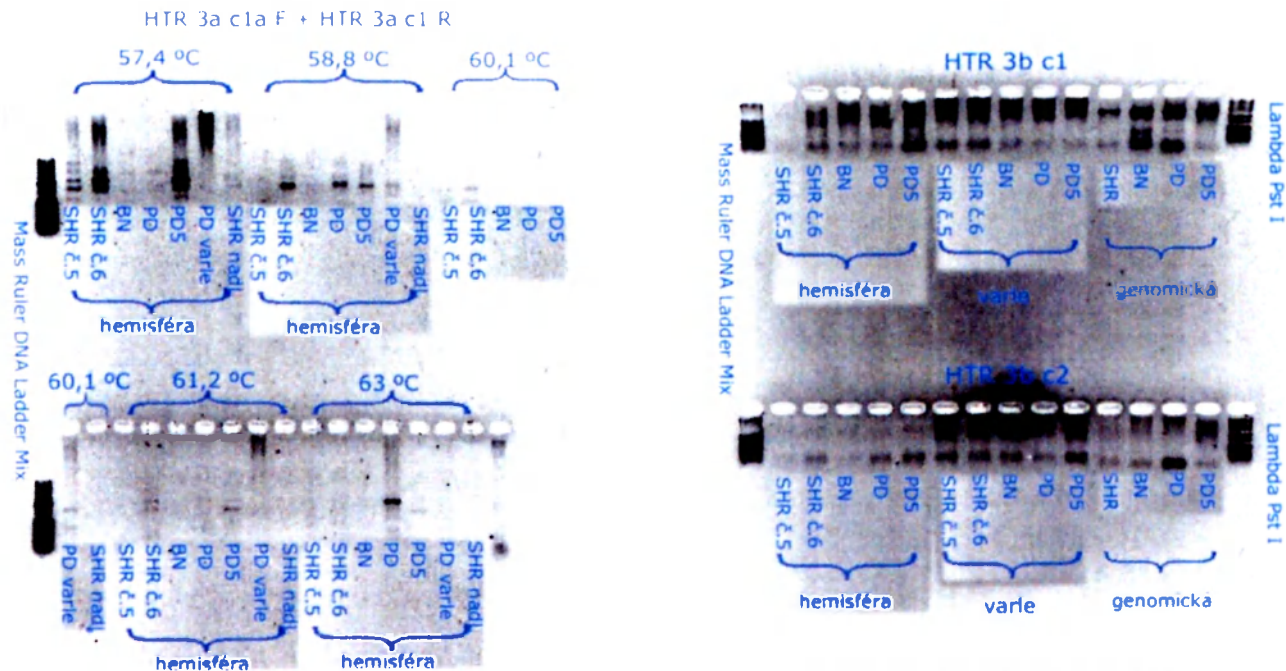
RT-PCR Htr 3a c1F + Htr 3a c1 R



Obr.17 RT-PCR Htr 3a c1aF + Htr 3a c1R  
Annealing 60C  
2%agarosa 85 V, 15 min.

Ani výsledek této reakce nebyl příznivý, dala jsem proto vzorky z hemisféry, u kterých byly geny více exprimovány, na teplotní gradient.

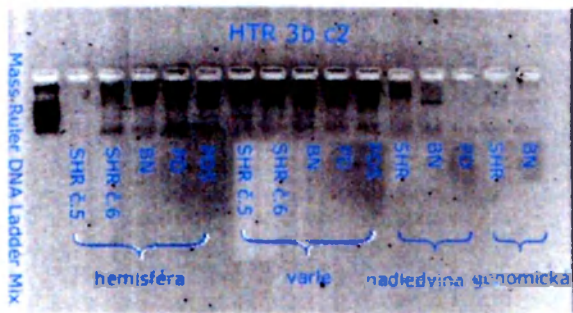
RT-PCR Htr 3a c1F + Htr 3a c1R gradient, Htr 3b c1, Htr 3b c2



Obr.18 RT- PCR teplotní gradient  
Htr 3a c1aF + Htr 3a c1R  
2%agarosa 85 V, 15 min.

Obr.19 RT-PCR Htr 3bc1, Htr 3bc2  
Annealing 60 °C  
2%agarosa 85 V, 15 min.

## RT-PCR Htr 3b c2, Htr 3b c2 gradient



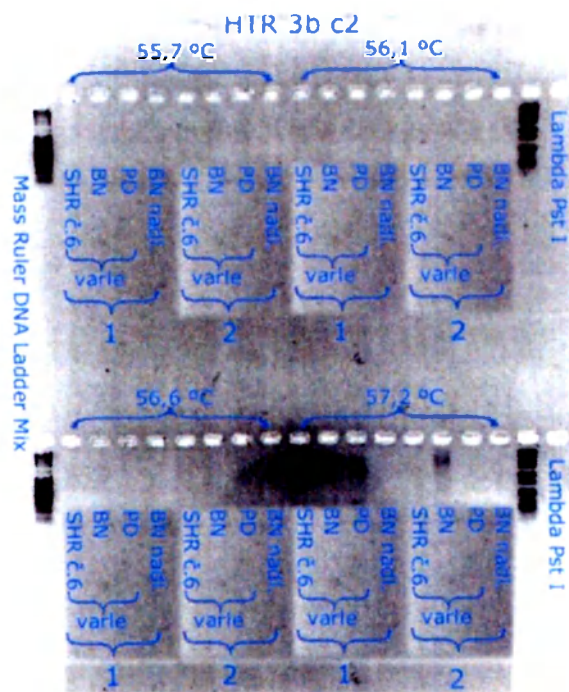
Obr.20 TR-PCR Htr 3bc2  
Annealing 57 °C  
2% agarosa 85V, 15 min

### Receptura č.1

H <sub>2</sub> O	7,3 µl
betain	4,0 µl
dNTP	1,0 µl
Pfu pufr	2,0 µl
MgCl <sup>2+</sup>	1,2 µl
R primer	0,7 µl
F primer	0,7 µl
Taq polymerasa	1,0 µl
Pfu polymerasa	0,1 µl

### Receptura č.2

H <sub>2</sub> O	6,9 µl
betain	4,0 µl
dNTP	1,2 µl
Pfu pufr	2,0 µl
MgCl <sup>2+</sup>	1,6 µl
R primer	0,7 µl
F primer	0,7 µl
Taq polymerasa	1,0 µl
Pfu polymerasa	0,1 µl

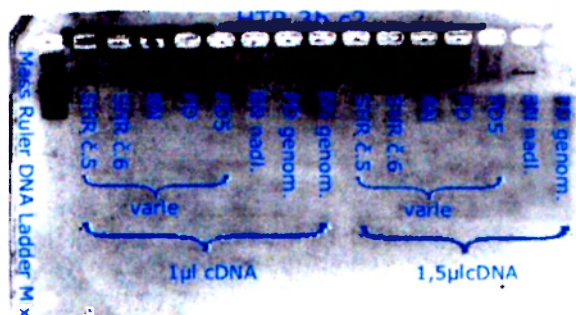


Obr.21 RT-PCR Htr 3bc2  
Teplotni gradient  
2 % agarosa, 85 V. 15 min.

- 18µl směsi + 1 µl cDNA  
+ 2 µl genom. DNA

RT-PCR při teplotním gradientu nevyšla, zopakovala jsem reakci s recepturou č.1, s rozdílným přidáním cDNA

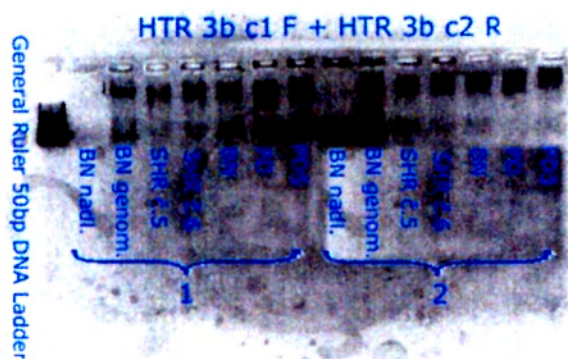
RT-PCR Htr 3b c2 - 1 $\mu$ l a 1,5  $\mu$ l cDNA



Obr.22 RT-PCR Htr 3bc2  
Annealing 60 °C  
2 % agarosa, 85 V 15 min.

ii takto RT-PCR nevyšla. Jako další možnost jsem zkombinovala primery Htr 3bc1F a c2 R, s použitím ruptury č.1 a č.2 (s rozdílným přidáním nukleotidů a hořčičku ) jako předchozím případě.

RT-PCR 3b c1 F+ Htr 3b c2 R



Obr.23 PCR Htr 3bc1F + 3bc2R  
Annealing 60 °C  
2 % agarosa, 85 V 15 min



cDNA sekvence nejsou úplné na 5'konci, díky nemožnosti amplifikace těchto úseků. Příčiny mohou být různé, např. složení, nedostatečná čistota RT, získávání RT, složení sekvenčního mixu.

### 3.4 SEKVENACE

Odhalila jsem 10 polymorfismů typu SNP, z toho v jednom případě dochází ke změně aminokyseliny a sice histidinu na arginin, v posledním exonu *Htr3b*.

gen	pozice	pozice	chromosom 8	změna AMK	SHR	BN	PD	PD5	Potvrzení cDNA	databáze
Htr 3a	intron 3	+ 14	52169753	Ne	C	C	T	T	Ne	
Htr 3a	intron 4	+ 51	52168705	Ne	T	T	C	C	Ne	
Htr 3a	intron 6	+ 160	52163480	Ne	G	G	A	A	Ne	
Htr 3a	Intron 7	+ 349	52162753	Ne	A	A	T	T	Ne	
Htr 3a	3'UTR exon 9	+139(tga)	52161450	Ne	A	A	G	G	Ano	
Htr 3a	3'UTR exon 9	+419(tga)	52161168	Ne	A	A	G	G	Ne	
Htr 3b	5'UTR exon 1	-55 (atg)	52228262	Ne	C	C	A	A	Ne	
Htr 3b	exon 8	Aa352	52199324	Ne (Arg352Arg)	G	G	A	A	Ne	
Htr 3b	exon 9	aa364	52198655	Ano (His364Arg)	A	A	G	G	Ne	AF155044 (SD*)
Htr 3b	exon 9	aa417	52198495	Ne (Leu417Leu)	C	C	T	T	Ne	Rs8155004 (SD*)

Tab.11 Znárodnění objevených mutací

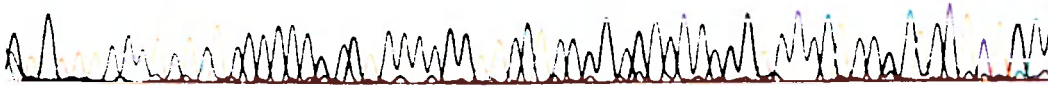
Obr. 24 ukazuje sekvenci v oblasti SNP 1 v intronu 3 Htr3a.

Obr. 25 ukazuje SNP v exonu 9 Htr3b, která vede k záměně aminokyseliny histamin za arginin.



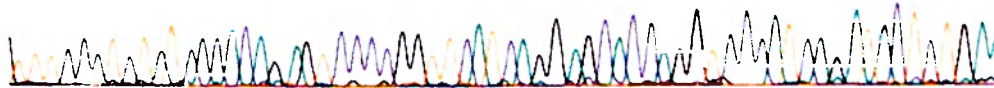
Val Ser Leu Tyr His Thr Glu Ser Pro Val His Gln Gly His Gln Val Pro Ser Asp Thr Leu  
G T T C C C C T C A T C A C A C A G A G T C C C C C G G T T C A T C A G G A G C A C C A G G T C C C A T C A G A T A C T C T G A

SHR



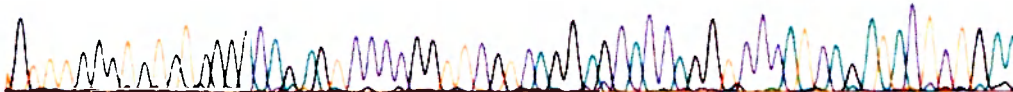
Val Ser Leu Tyr His Thr Glu Ser Pro Val His Gln Gly His Gln Val Pro Ser Asp Thr Leu  
T T T C C C C T C A T C A C A C A G A G T C C C C C G G T T C A T C A G G A G C A C C A G G T C C C A T C A G A T A C T C T G A

BN



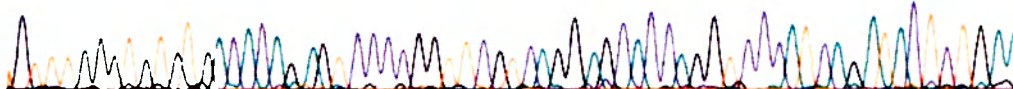
Val Ser Leu Tyr His Thr Glu Ser Pro Val Arg Gln Gly His Gln Val Pro Ser Asp Thr Leu  
G T T C C C C T C A T C A C A C A G A G T C C C C C G G T T C G T C A G G A G C A C C A G G T C C C A T C A G A T A C T C T G A

PD



Val Ser Leu Tyr His Thr Glu Ser Pro Val Arg Gln Gly His Gln Val Pro Ser Asp Thr Leu  
G T T C C C C T C A T C A C A C A G A G T C C C C C G G T T C G T C A G G A G C A C C A G G T C C C A T C A G A T A C T C T G A

PD5



Obr.25 Htr 3b 9F

Kmeny SHR a BN mají nezměněnou sekvenci, u kmenů PD a PD5 je výměna adeninu za guanin. Tato mutace mění aminokyselinu histamin za arginin.

## DISKUSE

Jak ukazuje (*Tab.11*) ve zkoumaných Htr genech jsem objevila celkem 10 SNPs, z toho 6 v Htr3a a 4 v Htr3b.

Veškerá genetická variabilita v těchto dvou genech je původu PD. Všechny polymorfismy jsou obsaženy v PD kmeni, mezi SHR a BN není žádný rozdíl i přes skutečnost, že kmen SHR je modelem metabolického syndromu a hypertenze. Kmen BN/Cub (Brown Norway) je neobézní, nevykazuje poruchy v metabolismu lipidů a sacharidů a má normální krevní tlak.

V genu Htr3a se nachází 6 SNP. V kódující oblasti se nenachází ani jeden.

SNP u Htr3a 1 - 4 se nacházejí v intronu v nekódované, nekonzervované oblasti. Mohly by ovlivňovat regulaci transkripce, nebo eventuelně genovou expresi.

Vzorky č. 1 a č. 2 jsou uloženy v blízkosti junkce intron-exon, mohly by proto ovlivňovat sestřih.

Vzorky č. 5 a č. 6 se nacházejí v nepřekládané oblasti exonu 3'UTR - v krátké konzervativní oblasti. SNP by mohly ovlivňovat stabilitu RNA.

V genu Htr3b jsou uloženy 4 SNP, 3 z nich se vyskytují v exonu v kódující oblasti.

Vzorek č.7 se nachází v 5'UTR exonu

Vzorky č. 8, 9 a 10 se nacházejí v exonu v kódující oblasti. Z toho jeden SNP mění aminokyselinu.

SNP č.8 se nachází v kódující oblasti, ale aminokyselinu nemění. Z hlediska proteinů se dá označit za němou mutaci.

SNP č.9 se nachází v kódující oblasti, kde mění aminokyselinu z histidinu na arginin. Toto SNP bylo již dříve nalezeno u jiného kmene potkana - „Sprague-Dawley“. Význam tohoto polymorfismu pro funkci genu Htr3b a následně pro



změněný metabolický profil kmene SHR-*Lx*-PD5 oproti kmenu SHR, není možno zatím stanovit. Je však jedním z kandidátních genů zodpovědných za zmíněný metabolický profil u PD oproti SHR.

SNP 10 – nevede k záměně aminokyseliny v proteinu Htr3b, nelze však vyloučit jeho případnou regulační funkci. Toto SNP již bylo nalezeno u téhož kmene potkana jako v předchozím případě Sprague-Dawley, prováděno z reakce s mRNA.

## ZÁVĚR

Během mé práce, se mi podařilo z izolovaných genomických vzorků provést polymerázovou řetězovou reakci celých úseků obou genů *Htr3a* a *Htr3b* a tyto produkty nasekvenovat. Z izolovaných vzorků cDNA jsem zdárně provedla RT-PCR a následující sekvenaci u dvou třetin *Htr3a*.

SNP byly analyzovány na sekvenátoru ABI 310 (Applied Biosystems) kapilární elektroforézou a k vyhodnocení výsledků jsem použila specializovaný počítačový program SeqMan.

V těchto dvou genech jsem odhalila celkem 10 SNPs – single nucleotide polymorphism z toho 6 v *Htr3a* a 4 v *Htr3b*.

Veškerá genetická variabilita v těchto dvou genech je původu PD, mezi SHR a BN není žádný rozdíl.

Z šesti SNPs nacházející se v genu *Htr3a*, jsou 4 uloženy v intronu a 2 v exonu. Žádné SNP z genu *Htr3a* neleží v kódující oblasti, ale podařilo se mi mutaci genu *Htr3a* 9b 3'UTR potvrdit sekvenací cDNA. Zbylé 4 SNP jsou uloženy v genu *Htr3b*. Všechny se vyskytují v exonu a 3 z nich se nacházejí v kódující oblasti. A to Htr 3b8 (Arg352Arg) a Htr 3b9 (His364Arg).

Htr 3b8 zůstává bez změny aminokyseliny. Z hlediska proteinů se dá proto označit za němou mutaci.

U genu Htr 3b9 (His364Arg) dochází k substituci z histidinu na arginin. Jedná se o záměnu jedné bazické aminokyseliny za druhou. Toto SNP bylo již dříve nalezeno u jiného hodavce - „Sprague-Dawley“.

Význam tohoto polymorfismu pro funkci genu Htr 3b a následně pro změněný metabolický profil kmene SHR-*Lx*-PD5 oproti kmenu SHR není možno zatím stanovit. Je však nezbytné tento SNP dále analyzovat. Není však pochyby o tom, že Htr 3b9 52198655 je kandidátním genem polymorfismu.

## BIBLIOGRAFIE

[1] SACHIDANANDAM , R., et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. . Nature. 2001, no. 15, s. 928-933.

[2] MILLS, RE, et al. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome.. Genome Res. 2006, no. 16, s. 1182-90.

[3] REDON, R., et al. Variation in copy number in the human genome. Nature. 2006, no. 23, s. 444-454.

[4] ŠEDA, O., et al. Diabetologie : Genetika diabetu. Praha : Triton s.r.o., 2005. 421 s.

[5] VRÁNA , A., et al. Triglyceridemia, glucoregulation, and blood pressure in various rat strains : Effects of dietary carbohydrates.. Annals of the New York Academy of Sciences. 1993, no. 683, s. 57-68.

[6] ŠEDOVÁ, L., et al. Rat inbred PD/cub strain as a model of dyslipidemia and insulin resistance. Folia biologica. 2006, no. 3, s. 99-106.

[7] KŘEN, V., et al. Genetic isolation of a region of chromosome 8 that exerts major effects on blood pressure and cardiac mass in the spontaneously hypertensive rat.. The Journal of clinical investigation. . 1997, no. 4, s. 577-581.

[8] ŠEDA, O., et al. Region of rat chromosome 8 determines complex nutrigenetic interactions under conditions of sucrose and cholesterol diets.. Prague medical report. 2006, no. 2, s. 251-260.

[9] ŠEDA, O., et al. A 14-gene region of rat chromosome 8 in SHR-derived polydactylous congenic substrain affects muscle-specific insulin resistance, dyslipidaemia and visceral adiposity. Folia biologica. 2005, no. 3, s. 53-61.

[10] THOMPSON, AJ, SULLIVAN, NL, LUMMIS, SC. Characterization of 5-HT3 receptor mutations identified in schizophrenic patients. J Mol Neurosci. 2006, no. 3, s. 273-81.

[11] KRZYWKOWSKI, K. Do polymorphisms in the human 5-HT3 genes contribute to pathological phenotypes?. Biochem Soc Trans. . 2006, no. 5, s. 872-5.

[12] NIESLER, B., et al. Serotonin receptor genes HTR3A and HTR3B are not involved in Gilles de la Tourette syndrome.. Psychiatr Genet. . 2005, no. 4, s. 303-304.

[13] HAYES, MR., et al. Serotonin type-3 receptors mediate cholecystokinin-induced satiation through gastric distension. . Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2006, no. 1, s. 115-23.

[14] HAYES, MR, COVASA, M. Hindbrain 5-HT3 receptors participate in control of meal size and mediate CCK-induced satiation.. Brain Res. 2006, no. 1, s. 99-107.

[15] CARVALHO, F., et al. Hyperglycemia induced by pharmacological activation of central serotonergic pathways depends on the functional integrity of brain CRH system and 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Horm. Metab. Res.* 2005, no. 8, s. 482-8.

[16] HALUZÍK, Martin, SVAČINA, Štěpán. *Metabolický syndrom a nukleární receptory PPAR*. Praha : Grada Publishing, 2005. 214 s.

[17] KARBEČNÁ , Marie. *Aplikace molekulární genetiky v klinické praxi*. Nakladatelství Karolinum Praha 1, Ovocný trh 3, Praha : Univezsita Karlova, 1999. 128 s.

[18] KOČÁREK, Eduard. *Genetika*. Radimova 37/50, 169 00, Praha 6 : Scientia, spol. s.r.o., pedagogické nakladatelství , 2004. 355 s.

[19] OTOVÁ, Berta, SOUKUP, František. *Biologie člověka pro bakalářské studium na lékařských fakultách : Základy genetiky*. Prahy 1, Ovocný trh 3, Praha : Karolinum - nakladatelství University Karlovy, 1997. 102 s.