

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2011

Bc. Šárka Kocourková

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Katedra antropologie a genetiky člověka



Bc. Šárka Kocourková

Čipová analýza cRNA ze vzorků plné krve smíchané s RNA later u kardiovaskulárních onemocnění

Microarray analysis of cRNA from blood samples mixed with RNA later in patients with cardiovascular disease

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Petra Feglarová

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Ing.Petry Feglarové, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Ing. Petře Feglarové za velkou podporu a ochotu poradit mi a odpovědět na všechny mé dotazy a Prof. RNDr. Janě Zvárové za možnost spolupracovat na velice zajímavém projektu.

Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům servisní laboratoře na ÚMG AV ČR, v.v.i. za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům, sourozencům a známým za podporu po celou dobu mého studia.

Obsah

1	Úvod.....	5
1.1	Kardiovaskulární systém.....	7
1.1.1	Cévní mozková příhoda	7
1.1.2	Infarkt myokardu	9
1.1.3	Ateroskleróza	11
1.1.4	Diabetes mellitus	14
1.2	Kardiovaskulární onemocnění a genetika	15
1.2.1	Hledání genů predisponujících k IM	16
1.2.2	Vybrané studie.....	17
1.3	Čipové technologie	20
1.3.1	Historie.....	20
1.3.2	Technologie výroby.....	22
1.3.3	Princip čipové technologie.....	24
1.3.4	Typy čipů	25
1.3.5	Firma Illumina - BeadChip	26
2	Cíle práce	28
3	Materiál a přístroje.....	29
3.1	Vzorky plné krve s RNAlater.....	29
3.2	Chemikálie	35
3.3	Přístrojové vybavení	36
4	Metody	37
4.1	Izolace celkové RNA	37
4.1.1	Kontrola kvality izolované RNA na Bioanalyzeru 2100	41
4.2	Amplifikace.....	43
4.3	Hybridizace	46

4.4	PCR.....	48
4.4.1	Reverzní transkripce (RT).....	50
4.4.2	Real Time PCR.....	51
5	Výsledky	54
5.1	Výsledky čipové analýzy	54
5.2	Výsledky RT-PCR.....	62
6	Diskuze.....	70
7	Závěr	82
8	Seznam použitých zkratk.....	83
9	Seznam použité literatury.....	89
10	Přílohy	98
	Příloha 1.....	98
	Příloha 2.....	100
	Příloha 3.....	104
	Příloha 4.....	105
	Příloha 5.....	106

Abstrakt

Kardiovaskulární onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí v české populaci. Až 80 % úmrtí je způsobeno infarktem myokardu, což je multigenně podmíněné onemocnění. V pořadí třetí nejčastější příčinou úmrtí v České republice je po nemocech srdce a nádorových onemocněních cévní mozková příhoda. Poznatky o genetické etiologii multifaktoriálně podmíněných nemocí se neustále rozšiřují. Naším cílem bylo pomocí celogenomového expresního čipu charakterizovat klinicky významné geny pro tato kardiovaskulární onemocnění. Na základě znalosti těchto genů, bude možné predikovat rizikovou skupinu pacientů, určit adekvátní postup léčby a přispět k navržení vhodné medikace.

V rámci této diplomové práce bylo analyzováno 174 vzorků plné krve. Z toho bylo 24 pacientů s cévní mozkovou příhodou, 92 pacientů infarktem myokardu a 56 kontrol. Vzorky jsme získávali z Městské nemocnice v Čáslavi. Vzorky z akutní fáze infarktu myokardu byly porovnávány s kontrolními náběry daných pacientů po šesti měsících od srdeční příhody. K této dvojici vzorků byly pomocí vybraných kritérií přiřazovány kontrolní osoby. Vzorky pacientů s cévní mozkovou příhodou byly porovnávány pouze s přiřazenými vzorky kontrolních osob.

Klinicky a statisticky významná diferenciální exprese genů byla stanovena s využitím Bioconductoru verze 2.3 s balíčkem limma v jazyce R verze 2.8.1. V rámci statistické analýzy byla identifikovaná skupina 5 genů, jejichž exprese se významně lišila u pacientů, kteří zemřeli do 6 měsíců po příhodě oproti pacientům, kteří nezemřeli.

Práce byla podporována Centrem biomedicínské informatiky projektem 1M06014 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

Klíčová slova: kardiovaskulární onemocnění, infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, exprese genu, čipová analýza

Abstract

Cardiovascular diseases are one of the leading causes of death in the Czech population. Up to 80 % of deaths are caused by myocardial infarction, a multigene affected disease. Knowledge of the genetic etiology of multifactorial diseases is continuously expanding. Our aim was due to whole - genome expression chip characterize clinically important genes for these cardiovascular diseases. On the basis of knowledge of these genes we could predict high-risk group of patients, determine appropriate treatment procedures and contribute to the suggestion of appropriate medication.

In this work were analyzed 174 whole blood samples. Out of them 24 were stroke patients, 92 patients with myocardial infarction and 56 controls. The samples were collected at the metropolitan Hospital in Čáslav. Samples taken at acute phase of myocardial infarction were compared with control blood collections of these patients after six months from the hearth attack. To these couples of samples were matched samples from control individuals according to several criteria. Samples of stroke patients were compared only with matched controls.

Clinically and statistically significant differential expression of genes was ascertained using Bioconductor version 2.3 with package limma in language R version 2.8.1. The statistical analysis identified a group of five genes whose expression was significantly different in patients who died within 6 months after hearth attack compared with patients who didn't die.

The work was supported by the Center of Biomedical Informatics project 1M06014 of the Ministry of Education, Youth and Sports CR.

Keywords: cardiovascular disease, myocardial infarction, stroke, gene expression, microarray analysis

1 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění postihující srdce a cévy mohou mít mnoho podob, jako jsou například vysoký krevní tlak, ischemická choroba srdeční, onemocnění srdce a mozková mrtvice. Jsou nejčastější příčinou úmrtí v Evropské unii (EU) a ročně způsobují přibližně 40 % úmrtí (2 miliony lidí). V USA celkově tvoří kardiovaskulární onemocnění 56 % příčin všech úmrtí.

Finanční zátěž systému zdravotnictví, související s těmito onemocněními, je velmi vysoká. V roce 2006 byla téměř 110 miliard eur v rámci EU. To představuje 223 eur na osobu ročně, což je přibližně 10 % celkových výdajů na zdravotní péči v celé EU. Kromě toho jsou také jednou z hlavních příčin dlouhodobé pracovní neschopnosti a způsobují výrazné ekonomické ztráty na trhu práce. Proto se v současné době vynakládají nemalé částky na podporu výzkumu těchto onemocnění.

Rozsah onemocnění je v současné době zjišťován řadou vyšetření, jakými jsou např. magnetická rezonance, katetrizační vyšetření, scintigrafie. Každé z těchto vyšetření má však i svá omezení, např. radiační zátěž nebo invazivitu vyšetření.

Většina kardiovaskulárních onemocnění patří mezi komplexní onemocnění, což znamená, že se na jejich vzniku a progresi podílí komplex genetických, epigenetických a vnějších faktorů. Pokud by se podařilo najít „predisponující“ geny, zvyšující riziko výskytu, či stanovit prognózu onemocnění a zjistit jejich přesnou úlohu v rozvoji onemocnění, mohly by se tyto znalosti využít k predikci pacientů a poté k včasné úpravě životního stylu.

Identifikace genů pomocí molekulárně biologických metod zaznamenala v posledních letech výrazný posun nejen v odhalení příčin některých závažných onemocnění člověka (např. závažné dědičné poruchy metabolismu, neuromuskulární poruchy), ale také významně rozšířila znalosti o vzniku a rozvoji infarktu myokardu (Hojo *et al.*, 2000).

S rozvojem moderních technologií se biologický význam obecně posouvá od klasického odhalování konkrétních genetických lokusů (nebo polymorfizmů) působících poruchu jednoho genu ke snaze sledovat polygenní a multifaktoriální poruchy člověka pomocí genomových expresních čipů, jejichž analýza poskytuje komplexnější obraz onemocnění (Verducci *et al.*, 2006).

Využití čipové technologie nám umožňuje analyzovat všechny geny lidského genomu u jednoho vzorku najednou, za stejných podmínek a poměrně rychle. Je to metoda, jejíž použití se velmi rychle rozrůstá. Unikátnost námi prováděných analýz spočívá v tom, že nesrážlivá krev pacientů je ihned po odběrech smíchána s roztokem *RNAlater*[®], čímž je zachován expresní profil daného vzorku.

1.1 Kardiovaskulární systém

Kardiovaskulární systém (cévní a oběhová soustava) je tvořen dvěma oddíly: centrálním (srdce) a periferním (krevní cévy). Jejich úkolem je zásobovat tkáně kyslíkem, živinami a hormony v souladu s tkáňovými potřebami a odvádět odpadní produkty látkové přeměny z tkání. Kardiovaskulární systém se také podílí na udržování tělesné teploty. Neplní-li kardiovaskulární systém některou z těchto funkcí, objevuje se oběhová nedostatečnost neboli kardiovaskulární onemocnění. Tato onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí na celém světě. Postihují srdce a cévy a mohou mít mnoho podob.

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) zahrnují: ischemickou chorobu srdeční – onemocnění cév zásobujících srdeční sval, cerebrovaskulární neboli mozkocévní onemocnění - onemocnění cév zásobujících mozek, periferní arteriální (tepenné) onemocnění - onemocnění cév zásobujících paže a nohy, revmatické choroby srdeční - poškození srdečního svalu a srdečních chlopní z revmatické horečky, která je způsobena streptokokovou bakterií, vrozené srdeční choroby – vrozená vývojová vada srdce, hluboké žilní trombózy a plicní embolie - krevní sraženiny v žilách nohou, které se mohou uvolnit a posunout do srdce a plic, vysoký krevní tlak či vady chlopní. Mezi nejběžnější pak patří akutní infarkt myokardu (AIM) a cévní mozková příhoda (CMP), kterými se budu v této práci zabývat.

1.1.1 Cévní mozková příhoda

Při cévní mozkové příhodě dochází k nekróze části mozkové tkáně v důsledku přerušení krevního zásobení dané oblasti mozku.

Bylo zjištěno několik základních příčin cévní mozkové příhody. Patří mezi ně ateroskleróza, která je v populaci nad 60 let zcela běžným fenoménem. Obvyklým místem vzniku aterosklerotických plátů jsou tepny velkého a středního průměru. Patogeneze aterosklerózy bude podrobněji popsána u infarktu myokardu. Další možnou příčinou CMP je intrakraniální mikroangiopatie, která je zodpovědná přibližně za 20-25 % ischemických příhod. Jedná se o stavy charakterizované poškozením drobných arteriol o průměru 0,4-0,5 mm, z nichž nejčastější je hyalinóza arteriol, která se nachází u převážné většiny mozků osob nad 70 let a v dramaticky větší míře u hypertoniků. Vzniká deponováním

krevních proteinů v narušené cévní stěně, přičemž svalová vrstva je postupně nahrazována tímto materiálem a kolagenní přestavbou. Výsledkem je koncentrické zúžení, ztráta elasticity tepny a postupně až její uzávěr.

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro vznik hyalinózy arteriol je hypertenze a v menší míře diabetes mellitus. Kardioembolický iktus je příčinou CMP ve 25-30 % případů. Jeho příčinou je buď některý oddíl levého srdce nebo embolie přes foramen ovale patens (vrozený defekt síňového septa s trvale otevřeným zejícím otvorem). Složení embolu může být velmi variabilní. Embolizovaný fragment čerstvého trombu tvořený fibrinem a trombocyty se velmi dobře léčí trombolytickou léčbou. Starý zorganizovaný trombus, materiál kalcifikovaného plátu nebo fragment myxomu lze lyzovat jen minimálně nebo vůbec ne. Stavy vedoucí ke kardioembolizmům jsou fibrilace síní, chlopenní vady a náhrady, akutní infarkt myokardu, kardiochirurgický nebo endovaskulární výkon na srdci, srdeční selhání a bakteriální endokarditida. Další možnou příčinou jsou low-flow infarkty způsobené sníženým průtokem krve hluboce pod ischemický práh, tedy bez uzávěru tepny. Hlavním důvodem je kritické snížení cerebrálního perfúzního tlaku. CMP může být způsobena také řadou neobvyklých příčin, jako jsou drogy, traumata, infekční choroby, systémový lupus erytematodes, Sjögrenův syndrom a jiné (Kalina *et al.*, 2008).

Za rok 2007 bylo v České republice (ČR) hospitalizováno 10 433 mužů a 10 007 žen s mozkovým infarktem, z toho 1 855 zemřelo. Dále bylo hospitalizováno 6 875 mužů a 8 243 žen s cévní mozkovou příhodou, která nebyla určena jako mozkový infarkt nebo krvácení, 1 939 z nich zemřelo během hospitalizace (www.uzis.cz. 2007. Zdravotnická statistika ČR. Hospitalizovaní v nemocnicích ČR 2007). V roce 2008 bylo s mozkovým infarktem přijato 11 115 mužů a 10 775 žen, 1 923 zemřelo. S cévní mozkovou příhodou, která nebyla určena jako mozkový infarkt nebo krvácení bylo přijato 5 523 mužů a 6 573 žen, z nichž 1 591 zemřelo (www.uzis.cz. 2008. Zdravotnická statistika ČR. Hospitalizovaní v nemocnicích ČR 2008).

Pro srovnání v USA v roce 2010 prodělalo 795 000 lidí mozkovou mrtvici (Lloyd-Jones *et al.*, 2010). V průměru je tedy incidence CMP v USA kolem 258 případů na 100 000 obyvatel a rok. V České republice je incidence asi 250 případů na 100 000 obyvatel a rok.

1.1.2 Infarkt myokardu

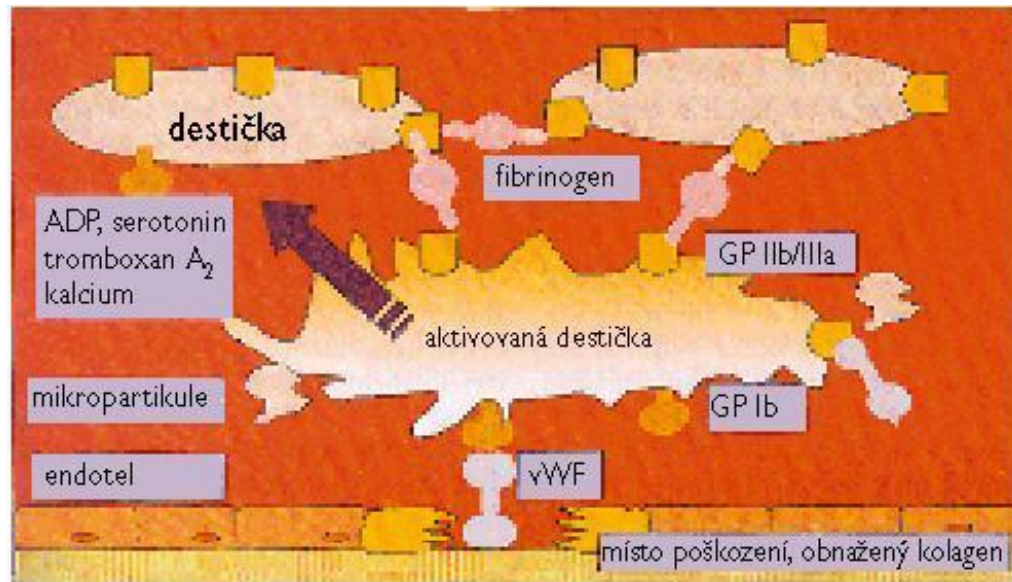
Infarkt myokardu (IM) je definován jako akutní ložisková nekróza srdečního svalu vzniklá na základě náhlého uzávěru či extrémního zúžení věnčité tepny zásobující příslušnou oblast. Ve více než 95 % je příčinou koronární ateroskleróza s rupturou intimy a trombózou v místě plátu. Ve vzácných případech může mít infarkt myokardu jiný původ (spazmy, embolie do věnčitých tepen). Infarkt myokardu je možné definovat na základě řady klinických, elektrokardiografických, biochemických nebo patologických ukazatelů. IM je multigenně podmíněné onemocnění. Stejně jako na konci dvacátého století, tak i na počátku jednadvacátého je akutní infarkt myokardu ve vyspělých zemích stále jednou z hlavních příčin morbidity a mortality (Špaček a Widimský, 2003a).

V roce 2007 zemřelo na infarkt myokardu v České republice 3 737 mužů a 2 930 žen (www.uzis.cz, 2007. Zdravotnická ročenka České republiky 2007). Hospitalizovaných bylo v témže roce 14 083 mužů a 8 361 žen s diagnózou akutní infarkt myokardu (www.uzis.cz, 2007. Zdravotnická statistika ČR. Hospitalizovaní v nemocnicích ČR 2007). V roce 2008 bylo přijato do nemocnic v České Republice 13 919 mužů a 8 403 žen s diagnózou akutní infarkt myokardu (www.uzis.cz, 2008. Zdravotnická statistika ČR. Hospitalizovaní v nemocnicích ČR 2008). Ve stejném roce na tuto diagnózu zemřelo 3 819 mužů a 2 970 žen (www.uzis.cz, 2008. Zdravotnická ročenka České republiky 2008: 32).

Pro srovnání v USA v roce 2010 prodělalo 785 000 Američanů IM. Přibližně každých 25 sekund dostane jeden Američan AIM a přibližně každou minutu jeden člověk v USA na AIM zemře (Lloyd-Jones *et al.*, 2010). Kardiovaskulární onemocnění způsobuje ročně přes 4,3 milionů (48 %) úmrtí v Evropě a přes 2 miliony (42 %) úmrtí v EU (European Cardiovascular Disease Statistics, 2008).

Příčinou infarktu myokardu je uzávěr koronární tepny. Angiografické studie provedené v prvních hodinách po vzniku IM prokazují ve více než 90 % částečný nebo úplný trombotický uzávěr infarktové tepny, nasedající zpravidla na nestabilní aterosklerotický plát (Fuster, 1999). Obvyklé děje při vzniku uzávěru koronární tepny jsou následující: ruptura, exulcerace či mikroskopická trhлина aterosklerotického plátu, agregace destiček, neúplně obturující trombus. Na uzávěru se podílí též doprovodný spazmus koronární tepny. Velmi důležitá je aktivace destiček (zvýšená agregace, zvýšená vazba fibrinu na glykoproteinový

receptor GP IIb/IIIa na povrchu destiček, zvýšená produkce tromboxanu) a lokální dysfunkce endotelu (snížení tvorby prostacyklinu a relaxačního faktoru tvořeného endotelem – EDRF -endotelium-derived relaxing factor - Obr. 1).



Obr. 1 Adheze a agregace destiček na poškozenou sliznici Adheze destiček je iniciována kontaktem destiček s nefyziologickým povrchem, *in vivo* s poškozenou cévní stěnou. Interakce mezi kolagenem a destičkami je zprostředkována glykoproteinovými receptory na povrchu destiček, cirkulujícími plazmatickými proteiny (vWF - Von Willebrandův faktor, ADP - adenosindifosfát) a sérologickými vlastnostmi krve (www.zdn.cz).

Po uzavěru věnčité tepny jsou buňky myokardu schopny přežít přibližně 20 minut se schopností úplné regenerace při obnovení dávek kyslíku, obvykle během této doby nedochází k žádným histologickým změnám. Nedochází k poškození vláken srdečního svalu, k uvolnění biochemických markerů nekrózy ani ke změnám na EKG křivce. Pokud hypoxie trvá déle, začínají první buňky podléhat nekróze, tedy intravitálnímu odumírání buněk a tkání. V okolí nekrózy dochází na rozdíl od apoptózy k zánětu.

Podle makroskopického vzhledu lze infarkty dělit na transmurní, kde nekróza prostupuje celou nebo téměř celou tloušťkou stěny srdečního svalu, a netransmurní (intramurní), kde nekróza zahrnuje pouze vnitřní část stěny srdečního svalu a nedosahuje až k epikardu (Derumeaux *et al.*, 2001).

Nekróza obvykle postupuje od endokardu k epikardu a od centra ke krajům ischemické oblasti. Postup nekrózy od endokardu k epikardu trvá přibližně 4-12 hodin (obvykle kolem 6 hodin, výjimečně až 24 hodin). Rychlost postupu nekrózy ovlivňuje úplnost přerušení

koronárního průtoku, přítomnost vedlejších větví, spotřeba kyslíku v myokardu (tj. výše systolického tlaku a srdeční frekvence) a předtrénování myokardu na ischemii, což je předchozí opakovaná expozice myokardu ischemii (Davies, 2000). Již po několika vteřinách po uzávěru koronární tepny postupně mizí kontrakce ischemické části myokardu. Vzniká porucha kinetiky levé komory v povodí příslušné věnčité tepny. Nejlehčí stupeň poruchy je hypokineze (snížení kontrakcí), těžší je akineze (vymizení kontrakcí), nejtěžší dyskineze (vymizení kontrakcí a pasivní systolické vyklenování postižené oblasti (Špaček a Widimský, 2003b).

1.1.3 Ateroskleróza

Jak už jsem se zmínila výše, nejčastější příčinou vzniku infarktu myokardu a cévní mozkové příhody je koronární ateroskleróza. Hlavní úlohu v ní hrají poruchy metabolismu lipidů. Dále se uplatňují faktory jako endoteliální dysfunkce, zánětlivé a imunologické procesy, kouření a ruptura nestabilního plátu. Incidence aterosklerózy stoupá při zvyšování plazmatické koncentrace cholesterolu nad 3,9 mmol/l. Riziko koronární aterosklerózy také zvyšuje stoupající plazmatická koncentrace oxidovaných částic cholesterolu s nízkou denzitou (LDL) a snižující se koncentrace HDL-částic cholesterolu s vysokou denzitou (Romm *et al.*, 1991).

Hypercholesterolemie (zvýšená hladina cholesterolu v plazmě) je spojena s významně zvýšenou expresí genu pro receptor AT₁ pro angiotenzin II, která vede k vystupňování biologických účinků angiotenzinu II (Nicking *et al.*, 1997). I další receptory umožňují přenos oxidovaných částic LDL do buněk endotelu a makrofágů, které se následně mění v pěnové buňky. Jedná se například o lecitinu podobný oxidovaný LDL-receptor (LOX-1) nebo scavengerové receptory makrofágů (Li a Mehta, 2000). Oxidované LDL částice mohou vést k ruptuře endoteliálních buněk a přes uvolněné cytokiny spustit geneticky determinované zánětlivé a imunitní mechanismy. Dochází ke zvýšené expresi genu pro vaskulární buněčnou adhezivní molekulu (VCAM-1) a aktivaci integrinu β 1 vázajícího monocyty. Dále dochází k poruše endoteliální funkce s poklesem produkce antiagregačně a vazodilatačně působícího oxidu dusnatého. Rupturou pěnových buněk se uvolňují oxidované LDL, intracelulární enzymy a volné kyslíkové radikály, které dále poškozují cévní stěnu (Shih *et al.*, 1999). Není zcela známo, jakou roli při rozvoji aterosklerotických změn hraje hypertria-

cylglycerolémie, ale je známo, že podporuje vznik trombózy. Vyšší koncentrace triacylglycerolů v krvi je spojena s vyššími koncentracemi fibrinogenu, koagulačního faktoru VII a X a vyšší viskozitou krve. Podobně účinkuje i zvýšení koncentrace lipoproteinu (a), který inhibuje konverzi plazminogenu na plazmin (Loscalzo *et al.*, 1990). Endotelin 1, který je produkován endoteliálními buňkami má také důležitou roli v patogenezi aterosklerózy. Oxidované částice LDL-cholesterolu podporují jeho tvorbu a tím potencují jeho vazokonstrikční účinek. Endotelin 1 je účinným mitogenem buněk hladkého svalu medie cév a stimuluje jejich migraci směrem k endotelu. Vyskytuje se v intracelulárních i extracelulárních složkách aterosklerotických lézí a bývá uvolňován v reakci na mechanický stres (Lerman *et al.*, 1991).

Počátečním krokem v procesu aterosklerózy je endoteliální dysfunkce, navozená dyslipidemií a zesílená kuřáckým návykem. Způsobuje poškození vazodilatace, která je zprostředkována endotelem, a sníženou produkci oxidu dusnatého s menší inhibicí agregace destiček (Quyyumi *et al.*, 1995). Při rozvoji aterosklerotického procesu se aktivuje buněčná i humorální složka zánětu. Aktivované destičky indukují sekreci monocytárního chemotaktického proteinu 1 (MCP-1) a na svém povrchu exprimují gen pro P-selektin, což je adhezivní molekula, která je spolu s dalšími (E-selektin, ICAM-1, VCAM-1) přítomná i na povrchu endotelu v místech zánětu a umožňuje adhezi T-lymfocytů a monocytů. Jejich vzájemným působením vznikají stimulační faktory, jež způsobují přeměnu monocytů na makrofágy (Gawaz *et al.*, 1998). Prozánětlivé chemokiny a cytokiny, produkovány leukocyty (IL-1, IL-6) nebo aktivovanými endoteliálními buňkami (IL-8), jsou mohutným stimulem pro proliferaci a migraci hladkých svalových buněk medie, která vede k formování aterosklerotického plátu (Simonini *et al.*, 2000). V aterosklerotickém plátu jsou hojně zastoupeny i žírné buňky, které obsahují a uvolňují další důležitý mediátor, faktor nekrotizující tumor (TNF- α) (Kaartinen *et al.*, 1996). Leukotrieny (biologicky aktivní lipidy) jsou syntetizovány a uvolňovány leukocyty a mají řadu prozánětlivých účinků uplatňujících se v aterosklerotických lézích. Mohou navíc způsobovat vazokonstrikci (Allen *et al.*, 1998). Častá lokalizace plátů v místech ohybu nebo větvení cév zvýrazňuje význam změny laminárního charakteru proudění krve a snížení rychlosti průtoku krve (low shear stress), která může negativně ovlivnit endoteliální funkci (Malek *et al.*, 1999). Průběh aterosklerotického procesu je tedy multifaktoriální (viz Tab. 1).

Tab. 1 Celulární, biochemické a patofyziologické faktory účastníci se v etiopatogenezi aterosklerózy (Špaček a Widimský, 2003c)

Faktor	Popis
oxLDL	oxidované částice cholesterolu s nízkou denzitou
VCAM-1	vaskulární buněčná adhezivní molekula 1
ICAM-1	intracelulární adhezivní molekula 1
LOX-1	lecithin-like oxidized LDL-receptor
MCP-1	monocytární chemotaktický protein 1
ET-1	endotelin 1
IL-1,IL-6,IL-8	interleukin 1, interleukin 6, interleukin 8
VEGF	cévní endoteliální růstový faktor
FGF	růstový faktor produkovaný fibroblasty
TGF- α , β	transformující růstový faktor α , β
PDGF	růstový faktor produkovaný destičkami
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor
TNF- α	faktor nekrotizující tumor α
CRP	C-reaktivní protein
HSP 60	tepelný šokový protein 60
shear stress	stříhové napětí

Mezi rizikové faktory aterosklerózy, které nelze ovlivnit, patří věk, mužské pohlaví a genetická zátěž. Mezi ovlivnitelné faktory patří hladina LDL částic v plazmě. Je prokázáno, že koncentrace celkového cholesterolu v krvi vyšší než 5,0 mmol/l, resp. LDL-cholesterolu vyšší než 3,0 mmol/l jsou spojeny se zvýšením kardiovaskulárního rizika (Kinoshian *et al.*, 1994). Rizikovým faktorem je i hypertenze. Dalšími rizikovými faktory jsou inzulinová rezistence, porušení glukózové tolerance nebo diabetes mellitus. Se zvýšeným rizikem IM je spojena také obezita a vyšší plazmatické koncentrace homocysteinu (Stampfer *et al.*, 1992). Vliv na výskyt AIM mají ale i jiné faktory. Zajímavostí je, že se počet AIM zvyšuje například ve dnech, kdy je pozorována vyšší rychlost slunečního větru a ve dnech následujících. Naopak ve dnech, kdy je větší hustota částic slunečního větru se počet AIM snižuje (Střešík *et al.*, 2005). Kouření patří mezi důležité ovlivnitelné faktory. Incidence srdečního infarktu je zvýšená šestkrát u žen a třikrát u mužů, kteří kouří 20 a více cigaret denně, oproti nekuřákům (Prescot *et al.*, 1998).

Při manifestaci akutních koronárních syndromů, včetně IM, se často vyskytuje trombóza nasedající na rupturu aterosklerotického plátu. Histologická vyšetření nestabilních plátů potvrzují zánětlivé změny ve fibrózním krytu. Především v místech, kde kryt plátu přechá-

zi v endotel, je přítomna výrazná infiltrace aktivovanými makrofágy a T-lymfocyty (Libby, 1995). Hlavní příčina ruptury nestabilního plátu není zcela jasná. Jedním z faktorů, který přispívá ke ztenčování fibrózního krytu plátu, je působení metaloproteináz, které jsou uvolňovány z makrofágů. Metaloproteinázy degradují kolagen a další komponenty matrix. K destabilizaci plátu přispívá zánětlivá reakce, oxidativní stres či stříhové napětí (Rajavashisth *et al.*, 1999).

Recentní práce posledních 6 let se zabývají z mnoha úhlů pohledu expresními profily osob s aterosklerózou a jejího vztahu k zánětlivým procesům v cévách (Satterthwaite *et al.*, 2005).

1.1.4 Diabetes mellitus

Jedním z rizikových faktorů aterosklerózy je diabetes mellitus (DM). DM je skupinou chronických, etiopatogenetických heterogenních onemocnění, jejichž základním rysem je hyperglykémie (zvýšená koncentrace glukózy v krvi nad normu). Hladina glykémie je udržována u zdravého jedince v rozmezí 3 až 8 mmol/l řadou hormonálních, autoregulačních a neuroregulačních mechanismů. Hyperglykémie se rozvíjí v důsledku nedostatečného účinku inzulínu, který může být způsoben jeho absolutním nebo relativním nedostatkem. DM je provázen poruchou metabolismu cukrů, tuků a bílkovin. Jako další příznaky se postupně vyvíjí dlouhodobé cévní komplikace jako je retinopatie (postižení cév vyživujících sítnici), nefropatie (onemocnění ledvin), neuropatie (postižení nervů); (Bartoš a Pelikánová, 2003a).

Protože příjem glukózy potravou není rovnoměrný a její potřeba k udržení energetického metabolismu je trvalá, je v podmínkách nalačno tvořena v organismu. Mezi tkáně schopné produkovat glukózu patří játra a kůra ledvin. Zdrojem glukózy v játrech je glykogenolýza (štěpení glykogenu) a glukoneogeneze (syntéza glukózy z aminokyselin, laktátu).

Regulace glykémie je těsně spjata s metabolismem tuků a bílkovin. Jak už bylo zmíněno výše, uplatňují se vlivy nervové (sympatikus, parasympatikus), autoregulační (hypoglykémie a hyperglykémie) a hormonální (inzulin). Hormonální regulace inzulinem má pravděpodobně největší význam. Jeho účinky jsou antagonizovány glukagonem a adrenalinem v játrech, adrenalinem a růstovým hormonem v tukové tkáni, kortizolem ve svalech a adrenalinem v ledvinách.

Inzulín je specifický glykoprotein, jehož molekula se skládá ze dvou polypeptidových řetězců (A, B), které jsou spojeny disulfidickými můstky. Řetězec A obsahuje 21 aminokyselin, řetězec B 30 aminokyselin. Gen pro inzulín se nachází na krátkém raménku 11. chromozomu a jeho exprese vzniká v B buňkách Langerhansových ostrůvků inzulín. Proces biosyntézy inzulínu trvá asi 30-120 minut. Pro nastartování syntézy je důležitý vzestup ATP, který je navozen glukózou a dalšími nutrienty.

Rozlišují se dva typy DM a to diabetes mellitus typ 1 a diabetes mellitus typ 2.

DM typ 1 je způsoben selektivní destrukcí B buněk vedoucí k absolutnímu nedostatku inzulínu a projevuje se již v dětství. Nejčastější formou typu 1 je autoimunitně podmíněný DM. Při tomto typu onemocnění dochází ke zničení B buněk na základě autoimunitního procesu. Přítomny jsou cirkulující protilátky inzulínu a proinzulínu proti Langerhansovým ostrůvkům. Spouštěcím mechanismem, který navodí autoimunitní proces, je pravděpodobně virová infekce či styk s jiným exogenním nebo endogenním agens.

DM typ 2 se manifestuje nejčastěji v dospělosti. Pro tento typ je typický familiární výskyt a v 60 - 90 % je spojen s nadváhou. Příčinou bývá inzulínová rezistence spolu s poruchou sekrece inzulínu (Bartoš a Pelikánová, 2003b).

1.2 Kardiovaskulární onemocnění a genetika

Kardiovaskulární onemocnění patří mezi multigenně podmíněná onemocnění, což znamená, že na rozvoji onemocnění se podílí genetické a environmentální faktory. Genetické faktory patří do polygenní skupiny, kdy se na onemocnění podílí velké množství genů s malým účinkem. Většina dostupné literatury se v souvislosti s kardiovaskulárními onemocněními zabývá jednobodovými mutacemi. Za často se vyskytující kardiovaskulární onemocnění není zodpovědná jedna kauzální mutace, ale většinou jde o velké množství polymorfizmů asociovaných s infarktem myokardu nebo ischemickou chorobou srdeční.

V roce 2002 začal mezinárodní HapMap projekt, který měl za cíl identifikovat geny asociované s tak častými onemocněními jako je astma, diabetes mellitus, malignity a kardiovaskulární onemocnění. Projekt trval 3 roky a byl zaměřen na SNP (*single nucleotide polymorphism*). Tedy bodové mutace, které se mohou vyskytovat v kódujících oblastech DNA (a mohou ovlivnit expresi genu) ale častěji se objevují v nekódujících oblastech. Byl

sestaven katalog HapMap, což je jakýsi seznam častých genetických variant vyskytujících se u lidí. Obsahuje typy variant, kde se vyskytují v našem genomu a jak jsou distribuovány v populacích různých světadílů. Projekt nepřirazuje specifické genetické varianty k určitému onemocnění, ale spíše upozorňuje na vazby různých variant s rizikem nejčastějších onemocnění (www.hapmap.org).

K roku 2007 bylo známo nejméně 5000 studií zabývajících se testováním kandidátních genů polygenně dědičných kardiovaskulárních onemocnění. Zajímavé je, že výsledky těchto studií jsou často kontroverzní. Velmi často se výsledky jednoho týmu zásadně liší od výsledků jiné skupiny. V současné době je identifikováno nejméně 192 polymorfizmů ve 102 genech, které lze spojovat s výskytem infarktu myokardu (Grochová a Groch, 2007).

Ateroskleróza a onemocnění věnčitých tepen jsou také multigenně podmíněná onemocnění. Předpokládá se 500 až 800 zúčastněných genů. Při volbě kandidátních genů se vychází z patogenetických mechanismů onemocnění koronárních artérií. Řada studií se zabývá zkoumáním renin-angiotenzinového systému, lipidového metabolismu, zánětlivých faktorů a hemokoagulace.

V současné době je stanoveno několik genů, jejichž polymorfizmy by mohly mít vliv na kardiovaskulární onemocnění a které jsou nejčastěji diskutovány. Jsou to gen pro connexin 37, jehož polymorfizmy zhoršují intracelulární komunikaci a vedou ke zvýšené adhezi monocytů na endotel. Gen stromelysin 1, u něhož polymorfizmy způsobují nestabilitu aterosklerotického plátu, gen inhibitoru aktivátoru plazminogenu typ I, u kterého polymorfizmy zvyšují plazmatickou trombocytogenitu a gen pro lymfotoxin alfa, který zvyšuje zánětlivost arteriální stěny a nestabilitu aterosklerotického plátu (Grochová a Groch, 2007).

1.2.1 Hledání genů predisponujících k IM

Možností jak hledat geny mající vztah k IM je několik:

1. Vazebné analýzy - využívají vazebné nerovnováhy, která je způsobena vazbou genů. Vazebná nerovnováha je nenáhodná asociace alel dvou lokusů, což znamená, že určitá kombinace alel se vyskytuje v populaci častěji, než by se dalo očekávat při náhodné tvorbě holotypů z alel na základě jejich četnosti. Genetickou vazbou rozumíme skutečnost, že dva nebo více sledovaných genů jsou součástí téže vazebné skupiny. Například geny lokalizované na jednom chromozomu jsou ve vazbě.

2. Asociační studie - při kterých se vyhledávají lidé se studovaným onemocněním (tzv. případy, cases) a lidé bez onemocnění (tzv. kontroly). Následně se pak sleduje, jestli se nějaká určitá alela nebo genotyp nevyskytuje u nemocných častěji než u kontrol.

3. GWAS (*genome-wide associating study*) - díky GWAS došlo ve výzkumu kardiovaskulárních chorob k obrovskému pokroku. GWAS vedly k určení zhruba 106-ti lokusů asociovaných s kardiovaskulárními onemocněními. Rozšíření těchto studií umožňují celogenomové SNP panely, které mohou současně skenovat až jeden milion SNP (Illumina, Affymetrix). Velké množství zpracovaných dat, vede k nutnosti zlepšovat také nástroje pro jejich analýzu (Aulchenko *et al.*, 2007). Přestože jsou GWAS úspěšné v identifikaci lokusů spojených s kardiovaskulárními nemocemi, zůstává široká část genetických komponent KVO i jejich metabolických rizikových faktorů zahrnující plazmatické lipidy, DM typu 2, *body mass index* (BMI), neprozkoumána. Interakce gen-gen, gen-prostředí mohou poskytnout v této otázce významné informace (Lanktree a Hegele, 2009).

1.2.2 Vybrané studie

Koncem roku 2003 byla publikována studie Wang *et al.* (2003). Ve své studii sledovali velmi početnou rodinu, ve které se vyskytovalo 13 pacientů s IM nebo ischemickou chorobou srdeční (ICHS). Podle rodokmenu se jednalo o autozomálně dominantní typ dědičnosti. Rizikové faktory zahrnující dyslipidémii, hypertenzi a kouření cigaret se vyskytovaly u jen některých členů rodiny. Ve studii byla použita genomová vazebná analýza s 382 markery, které pokrývaly chromozomy 1 až 22. Na základě výsledků byla identifikována silná vazba na lokus chromozomu 15q26. Tento region obsahuje 93 genů (43 známých genů a 50 hypotetických genů). Nakonec byla identifikována delece 6 aminokyselin v 11. exonu genu MEF2A (*myocyte enhancer factor 2A*) u všech 10 žijících členů rodiny s IM. Vypadá to, že delece 21kb v lokusu 15q26 způsobuje narušení stěny koronární tepny a tím usnadňuje ukládání aterosklerotických plátů, což později vede k IM. V době publikace svých závěrů však autoři neměli dostatečný počet zdravých kontrol a závěry byly získány na příliš malém souboru pacientů.

Později byly tyto výsledky zpochybněny dalšími autory Weng *et al.* (2005), kteří hledali mutaci v 11. exonu genu MEF2A u 300 jedinců s nefamiliárním výskytem IM před 55. rokem života u mužů a 65. rokem života u žen. Kontrolní skupina čítala také 300 jedinců.

Ani u jednoho z nemocných nebyla mutace nalezena, ale byla objevena u jednoho kontrolního jedince.

V prosinci roku 2002 byla publikována jedna z nejrozsáhlejších studií, která byla provedena v Japonsku, kde je relativně nízký výskyt IM. Yamada *et al.* (2002) z univerzity v Nagoye publikovaly výsledky své studie, které získali z analýz 5061 nepříbuzných Japonců. Analyzovali 112 polymorfizmů v 71 kandidátním genu asociovaných s koronární aterosklerózou, vazokonstrikcí, hypertenzí, diabetem, hyperlipidemií a dalšími metabolickými faktory. Skupinu nemocných tvořilo 2 819 jedinců (2 003 mužů a 816 žen) japonských pacientů s IM/ ICHS, kteří byli hospitalizováni na jedné z 15 klinik od července 1994 do prosince 2001. Kontrolní skupina čítala 2 242 jedinců (1 306 mužů a 936 žen). Při své práci využili fluorescenčně značené alelově specifické primery a kolorimetricky značené alelově specifické primery. Na základě svých výsledků prokázali, že IM je signifikantně spojován s polymorfizmem C1019T (náhrada cytosinu na pozici 1019 thyminem) v genu connexin 37 u mužů. U žen našli dva polymorfizmy spojené s IM. Polymorfizmus 4G-668/5G (náhrada 4 guaninů na pozici -668- 5 guaniny) v genu pro inhibitor aktivátoru plazminogenu typ 1 a polymorfizmus 5A-1171/6A (náhrada 5 adeninů na pozici -1171- 6 adeniny) v genu pro stromelysin 1.

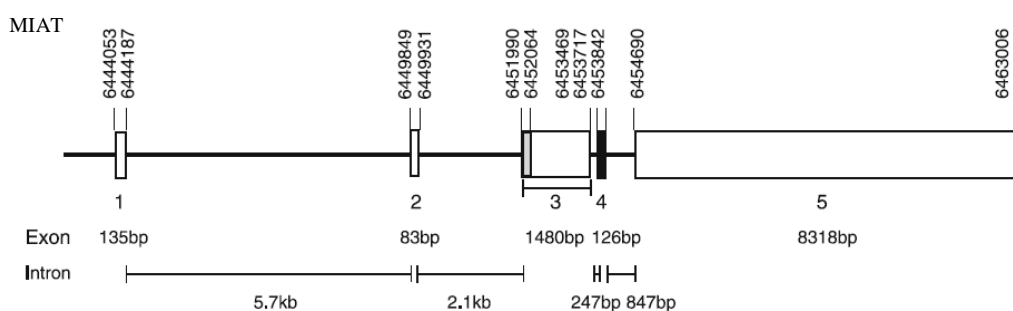
Jiná nezávislá studie malého souboru švédských pacientů prokázala, že stejný polymorfizmus C1019T v genu pro connexin 37 je asociován se ztluštěním intimy karotid mužů. Zkoumaný soubor se skládal z 80 pacientů a 80 kontrolních jedinců mužského pohlaví (Boerma *et al.*, 1999). Asociace polymorfizmu C1019T s aterosklerotickými pláty byla prokázána i u obyvatel Taiwanu. Studie byla provedena na 177 jedincích s koronárním onemocněním a 102 kontrolních jedincích (Yeh *et al.*, 2001).

Alela 4G v genu pro inhibitor aktivátoru plazminogenu typu 1 byla spojena s IM v malé skupině švédských mužů (Eriksson *et al.*, 1995). Rozsáhlá studie mužů v USA ale neprokázala polymorfizmus 4G-668/5G jako rizikový (Ridker *et al.*, 1997). Ke stejnému negativnímu výsledku dospěla také studie na skupině nemocných žen z Nizozemska (12 239 žen v rozmezí věku 52 až 67 let). Naopak dokonce byla prokázána souvislost genotypu 4G/4G s nižším rizikem cévní mozkové příhody oproti heterozygotům 4G/5G (Roest *et al.*, 2000).

Ozaki *et al.* (2005) publikovali výsledky asociační studie na 94 pacientech s IM, ve které za pomoci 92 788 SNP markerů identifikovali lokus na chromozomu 6p21 spojený

s infarktem myokardu. Zejména polymorfismus v genu LTA (*lymfotoxin alfa*). Dále identifikovali galactin - 2 protein jako vazebného partnera LTA proteinu.

Další studie japonských vědců publikovaná v roce 2006 identifikovala nový gen MIAT (*myocardial infarction associated transcript*) v lokusu 22q12.1. Gen MIAT má 5 exonů a *in vitro* translace ukázala, že nekóduje žádný translační produkt (Obr. 2). Gen MIAT patří mezi geny pro funkční RNA, což znamená, že jeho produkt nepodléhá translaci. Ve studii bylo použito 52 608 SNP markerů. Studie zahrnovala 3 464 jedinců s IM a 3 819 kontrolních jedinců (Ishii *et al.*, 2006).



Obr. 2 Genomová struktura genu MIAT (Ishii *et al.*, 2006).

Ve studii *GeneQuest* bylo analyzováno 74 SNP v 62 genech u 352 nemocných s familiárním výskytem AIM a 418 jedinců kontrolní skupiny. Výsledkem této studie byl nález možného vztahu mezi vznikem časného AIM a genů pro trombospondin (TSP). Celkově byly nalezeny 3 různé SNP ve třech genech kódujících TSP. Především SNP pro TSP - 4 je polymorfismus, který je přítomný u více než 30 % populace a je provázen vyšším výskytem AIM než ostatní polymorfizmy. Skupina TSP proteinů hraje významnou roli v integritě cév a trombóze (Topol *et al.*, 2001).

V roce 2004 publikovali Tobin *et al.* (2004) výsledky genetické studie, která byla provedena u 547 pacientů s AIM a 505 kontrolních osob. Sledovali vztah mezi IM a 58 SNP v 35 kandidátních genech a našli možný pozitivní vztah mezi SNP (C-629A) v genu pro transportní protein esteru cholesterolu CETP (*cholesteryl ester transfer protein*) a SNP (gly460trp) v genu pro α -adducin.

Jak je z výsledků studií patrné, potenciálně zajímavých genů ve vztahu ke KVO s jejich polymorfizmy je mnoho, ale jejich význam není natolik podstatný, aby jejich výskyt mohl být využit pro stanovení AIM či CMP.

1.3 Čipové technologie

Tradiční přístup k analýze genové exprese je zdoluhavý proces s rozdílnými experimentálními potřebami pro každý zkoumaný gen. Zavedení *microarray* technologie umožnilo analyzovat tisíce genů najednou. Technologie využívá schopnosti vláken DNA nebo RNA spolu hybridizovat (spojit se) na základě komplementarity basí (Hughes a Tillo, 2006).

Využití čipové technologie je velmi různorodé. Velmi často nachází své využití ve výzkumu rakoviny. Kim *et al.* (2010) použili čipovou technologii k výzkumu rakoviny štítné žlázy, která je jednou z nejčastějších endokrinních malignit a zjistili, že u pacientů byla snížena exprese u 96 genů a u 16 genů byla exprese zvýšená. Tavares *et al.* (2008) použili čipovou analýzu pro zkoumání účinku léčby karcinomu retinových buněk HDAC inhibitory. Na základě svých výsledků, zjistili, že léčba zvyšuje expresi několika genů a genových rodin, což vede ke snížení buněčné proliferace. Liu *et al.* (2007) využili čipovou technologii pro hledání nových genů retiny, které by mohly být ovlivněny tyroidními hormony, u kterých se prokázalo, že mají vliv na její rozvoj. Identifikovali 12 nových genů, deset z nich mělo zvýšenou expresi a dva sníženou. Lu *et al.* (2008) pomocí čipové diagnostiky určovali genomické odchylky u novorozenců.

1.3.1 Historie

Čipové technologie se začaly masivně rozvíjet zhruba před 15 lety, jejich použití stále vzrůstá a zvyšuje se množství jejich aplikací. Od základní aplikace na problematiku molekulárně genetickou, kdy analyzovanou substancí byly nukleové kyseliny, se postupně jejich používání rozšířilo i do oblasti proteinové, buněčné a tkáňové. Vývoj se ubíral v zásadě dvěma směry. Za prvé k neustálému zvyšování počtu současně prováděných detekcí a za druhé směrem k čipům specializovaným na řešení určitých specifických otázek (Brdička a Bruchová, 2006).

Použití souboru odlišných fragmentů DNA pro expresní analýzu bylo poprvé popsáno v roce 1987. Výsledky byly použity k identifikaci genů, jejichž exprese je modulována interferonem. Zkoumaná RNA byla rozdělena elektroforézou na formaldehyd-agarózovém gelu a poté přenesena na nytran-nylonovou membránu, ta byla inkubována 2 hodiny při 80°C. Následovala prehybridizace po dobu 24 hodin při 37°C ve speciálním pufru. Poté

byly do pufru přidány rekombinantní plazmidy připravené alkalickou lyzí a nick-translací. Po 48 hodinách byla membrána dvakrát promyta promývacími roztoky a sušena. Výsledky byly získány autoradiografií (Kulesh a Clive, 1987).

Samotná *microarray* technologie se vyvinula z metody *Southern blotting*, při které jsou fragmenty DNA připojeny k podložce a poté se k nim napojí, známé fragmenty genů. Metodu představil v roce 1975 E. M. Southern. Tuto techniku lze označit za přímého předchůdce DNA čipu, protože se zde objevuje princip ukotvení značené nukleové kyseliny k pevnému podkladu.

Prvními skutečnými prototypy dnešních čipů byly čipy vyvinuté v roce 1989 týmem S. P. A. Fodora, který použil metodu fotolitografie, při níž jsou oligonukleotidy syntetizovány *in situ*. Firma Affymetrix tuto metodu využívá pro přípravu svých produktů (Fodor a Pirrung, 1991).

Dalším mezníkem bylo vyrobení DNA čipu v roce 1995, který představil Mark Shena. Jako modelový organizmus byla použita rostlina *Arabidopsis thaliana*, která nabízí mnoho výhod pro analýzu genové exprese. Jednou z jejích hlavních předností je malá velikost genomu. Pro výrobu čipu byly použity DNA řetězce získané z DNA knihoven, které byly na sklíčko natištěny pomocí vysokorychlostního robotického tisku (Shena *et al.*, 1995).

V roce 1997 byla metoda *microarray* použita pro analýzu genové exprese a porovnání genomu kmene *Saccharomyces cerevisiae* Y55 oproti referenčnímu kmeni *Saccharomyces cerevisiae* S288c, kdy byly objeveny sekvenční polymorfizmy (Lashkari *et al.*, 1997).

Geograficky je vznik a rozmach čipů spojen s Kalifornií. V současné době jsou vývoj a výroba rozšířeny po celém světě. Dnes se převážná většina čipů vyrábí komerčně s předem daným osazením DNA řetězců, avšak existují také čipy zákaznické, u kterých si může zákazník nadefinovat vlastní sestavu DNA řetězců (Brdička a Bruchová, 2006).

Dnešním trendem je především zvyšování množství zároveň analyzovaných sekvencí, rychlejší zpracování směřující k automatizaci, nižší nutné vstupní množství vzorku (analýzy z jednotlivých buněk) a samozřejmě menší finanční náklady umožňující větší množství analýz. Paralelně dochází také k významnému rozvoji sekvenačních metod, jež nalézají široké uplatnění v dnešních analýzách.

1.3.2 Technologie výroby

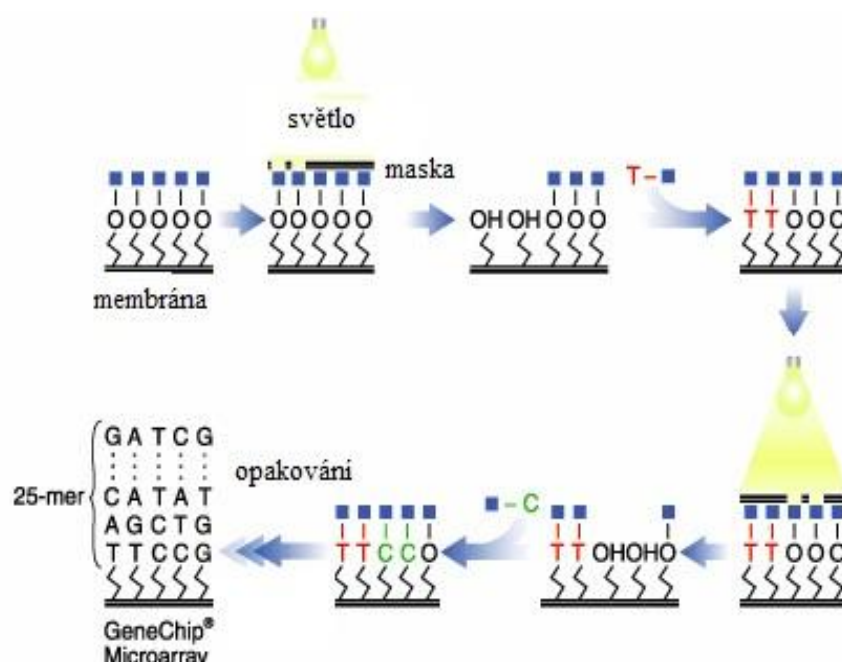
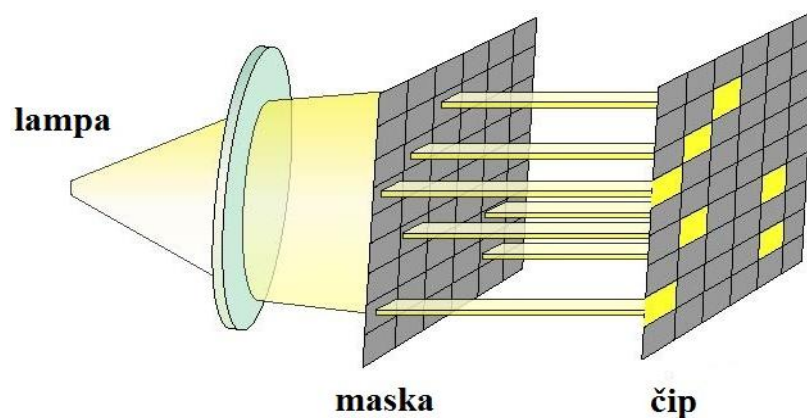
K výrobě čipů se nejčastěji používá nylonových membrán, skleněných nebo plastických materiálů. Plastické a nylonové materiály jsou používány k výrobě tzv. makročipů, které se od mikročipů liší svou velikostí a hustotou nanesených spotů. Například nylonový čip *Atlas Human cDNA Expression Array* od firmy Clontech má rozměry 8x12 cm a sleduje expresi 588 genů. U tzv. zákaznických čipů si mohou zákazníci vybrat složení sond na čipu. K výrobě mikročipů se běžně používá klasické mikroskopické sklíčko. Jeho povrch je upraven vrstvou hydrofobních polymerů (poly-L-lysin, modifikovaný silan) poskytující reakční skupiny -NH₂, -OH a =O pro navázání oligonukleotidu (Merkerová *et al.*, 2006).

Nanášení nukleotidových řetězců (sond) na čip lze provádět třemi základními metodami:

1. Metoda ink jet printing je výroba mikročipu pomocí tryskového tisku. Spočívá v mechanickém tištění předem připravených DNA řetězců dlouhých řádově stovky nukleotidů. Jednotlivé sondy jsou nanášeny na čip tenkými, ostrými jehlami (*ink-jet printing*) v objemu cca 1 nl a natištěné spoty pak mají 100-150 μm v průměru (Merkerová *et al.*, 2006). Oligonukleotidy mohou být připojovány k modifikovanému nosiči prostřednictvím chemických spojek, tzv. linkerů (např. na bázi polyetylén glykolu). Pro indukci tvorby kovalentních vazeb lze také použít UV záření (Ahmed, 2006).

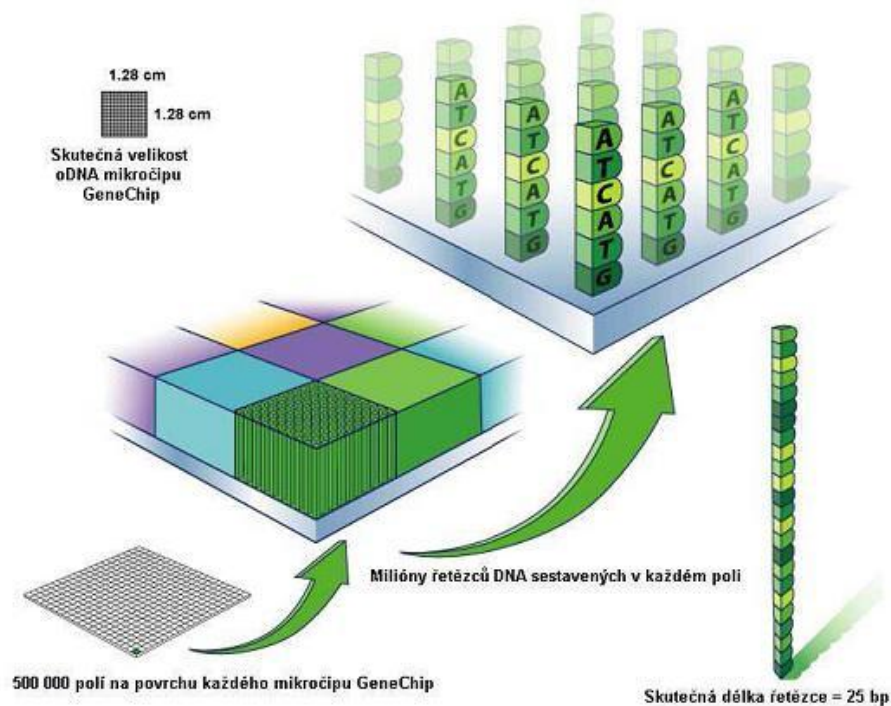
2. Fotolitografická metoda, jejímž základem je přímé syntetizování oligonukleotidových DNA řetězců na povrchu skleněného čipu (*in situ*). Povrch čipu musí být nejdříve upraven nanesením vrstvy fotolabilních protektivních molekul s vazebnými skupinami pro nukleotidy. Fotolitografická maska (Obr. 3) řídí spolu s UV paprskem syntézu tak, že vazebná místa oligonukleotidů jsou světlem aktivována a reagují s novými nukleotidy, které jsou na povrch sklíčka nanášeny ve formě roztoku (Ahmed, 2006).

Opakováním cyklů, střídáním masek a roztoků se specifickými nukleotidy se dosahuje tvorby 25-merního uniformního DNA řetězce. V případě *GeneChipu* firmy Affymetrix je každý gen reprezentován jedenácti 25-merními sondami z různých oblastí téhož genu uspořádanými do čtverce Obr. 4 (www.affymetrix.com).



Obr. 3 Princip fotolitografické metody (www.affymetrix.com).

3. Ink jetting metoda využívá piezoelektrického jevu. Jedná se o obdobu inkoustové tiskárny. Kapalina je nasáta do miniaturní trysky a je jí udělen náboj. Změnou náboje na jejím povrchu se reguluje tisk kapek bez kontaktu s nosičem. Metodou tryskového tisku jsou vyráběny například čipy firmy Agilent. Tyto čipy obsahují, na rozdíl od čipů vyráběných firmou Affymetrix, 60-merní DNA řetězce. Toto uspořádání zvyšuje citlivost i pro nízká množství transkriptů (Ahmed, 2006).



Obr. 4 Povrch DNA mikročipu (*GeneChip*, Affymetrix).

1.3.3 Princip čipové technologie

DNA čipové technologie jsou založeny na hybridizaci značených nukleových kyselin, získaných z analyzovaného vzorku, s DNA řetězci (sondami) na povrchu čipu reprezentujícími zkoumaný gen. Značení lze použít radioaktivní, fluorescenční či chemické (založené na detekci chemiluminiscence). Nejčastěji používaným značením je fluorescenční.

Výchozím materiálem pro expresní čipovou analýzu je vzorek celkové RNA nebo mRNA, který je pomocí reverzních transkriptáz a značených nukleotidů přepsán do cRNA. Ta následně hybridizuje s komplementárními DNA řetězci na čipu. Po odmytí nenavázaných sond se měří fluorescenční signál, který je snímán skenerem s vysokým rozlišením. Geny jsou představovány jednotlivými poli. Intenzita signálu pole odpovídá hladině exprese daného genu. Po detekci, analýze a normalizaci signálu je vytvořen tzv. „profil genové exprese“ analyzovaného vzorku (Merkerová *et al.*, 2006).

Podle počtu použitých barviv rozdělujeme:

1. Duální značení, které využívá porovnávání intenzit fluorescenčních signálů dvou odlišně značených vzorků hybridizovaných na jednom čipu (např. vzorek z nádorové tkáně

a kontrolní vzorek). Každý ze vzorků je značen odlišným fluorescenčním barvivem. Nejčastěji používaná barviva jsou Cy3 (zelená) a Cy5 (červená), mající odlišná, úzká emisní spektra, a proto jsou velmi vhodná pro duální fluorescenční značení. Složením signálů obou značek pak vzniká barva spotu, která vypovídá o kvantitativním rozdílu v expresi genu mezi oběma vzorky. Toto značení využívá například firma Agilent nebo Eppendorf (Merkerová et al, 2006).

2. Jednobarevné značení používá pouze jeden typ barviva. Analýzou takového čipu získáme hodnoty genové exprese. Příkladem takového systému je Affymetrix *GeneChip* (www.affymetrix.com).

1.3.4 Typy čipů

Vývoj čipové technologie jde velmi rychle dopředu a s tímto rozvojem souvisí i vznik různých typů čipů. Mezi základní typy čipů patří:

1. Expresní čipy - pomocí těchto čipů se určuje hladina exprese určitého genu. Na jejich povrch jsou nanášeny jako sondy molekuly cDNA vzniklé reverzní transkripcí z mRNA nebo sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy pro každý gen. Míra exprese genů se porovnává mezi zkoumanými vzorky a vzorky kontrol. Síla signálu je úměrná množství navázaného transkriptu daného genu ve vzorku. Tedy čím je ve vzorku více transkriptu, tím se ho více naváže na sondy a zvýší se signál. Díky tomu můžeme zjistit, zda dochází při určité nemoci k „up“ či „down“ regulaci exprese daného genu. Expresní čipy vyrábí například firma Illumina (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>).

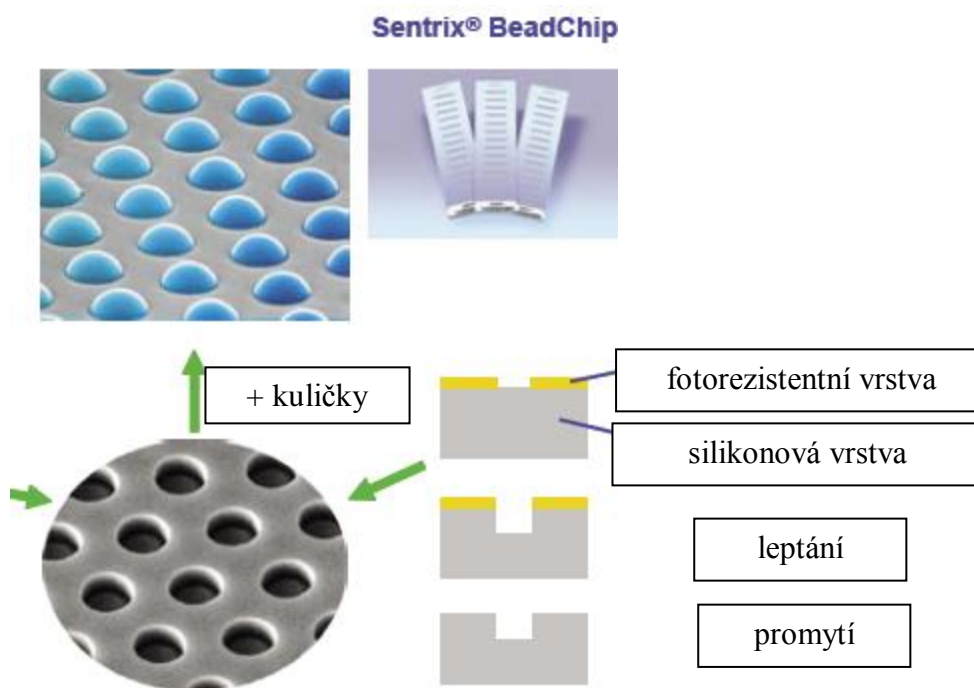
2. CGH čipy - metoda nazvaná *microarray comparative genomic hybridization*, která umožňuje analýzu nebalancovaných změn celého genomu, především ztrát chromozomálního materiálu či výskyt nadpočetných kopií chromozomálních úseků u rakovinových buněk. Principem CGH je současná hybridizace fluorescenčně značené DNA zkoumaného a kontrolního vzorku s komplementárními fragmenty natištěnými na povrchu čipu. Ke značení se používají barevně odlišné fluorochromy. Označené DNA jsou smíchány v ekvimolárním poměru a hybridizovány. Po odmytí nenavázaných sond se nasnímá obraz čipu pomocí laseru v zelené i červené barvě. Speciálně navržený software pak automaticky identifikuje každý spot na čipu a stanoví poměr obou fluorochromů. Rozdíl v poměrech pak určuje nebalancované změny např. v nádorovém genomu.

3. SNP čipy - SNP (*single nucleotide polymorphism*) čipy detekují jednonukleotidové polymorfizmy. Jsou tak studovány genetické variace, jako jsou inserce, delece, repetitivní polymorfizmy a translokace (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>).

V roce 2001 byla zhotovená mapa lidského genomu se všemi známými SNP, které se vyskytovaly ve statisticky dostatečné míře. Zmapováno bylo 1,42 milionu jednonukleotidových polymorfizmů (Sachidanandam *et al.*, 2001).

1.3.5 Firma Illumina - BeadChip

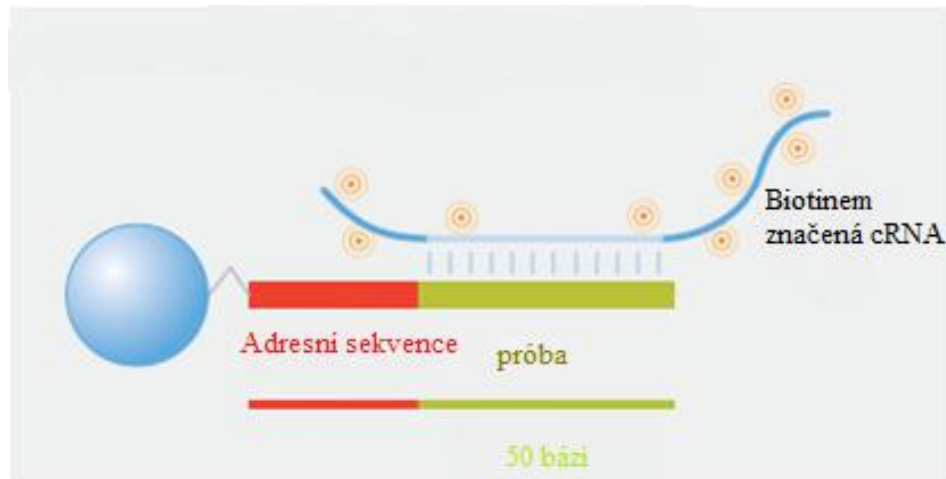
Ve své práci jsem použila čipy firmy Illumina, Inc. Čipy jsou určeny pro přímou hybridizaci a patří do kategorie celogenomových čipů. Každý čip obsahuje 48 804 prób, které pocházejí z *The National Center for Biotechnology Information Reference Sequence* (NCBI), pro 25 440 genů. Firma Illumina, Inc. vyrábí čipy ve dvou formátech: *Sentrix Array Matrix* a *Sentrix BeadChip*.



Obr. 5 Povrch čipu firmy Illumina formátu *Sentrix BeadChip* s fotorezistentní vrstvou a následně s nanojamkami (Fan *et al.*, 2005).

Mnou používaný formát *BeadChip* kombinuje dvě techniky výroby. Na začátku je sklíčko pokryté silikonem a nesouvislou fotorezistentní vrstvou, ve které jsou pomocí

technologie mikroelektromechanického systému (MEMS) připraveny nanojamky (Obr. 5). Následně se čip pokryje kuličkami (Obr. 6), na kterých jsou navázány adresní sekvence a sondy. Do každé jamky zapadne vždy jen jedna kulička. Pomocí adresní sekvence, kterou každá kulička obsahuje, je pak určena poloha sondy na čipu (Fan *et al.*, 2005).



Obr. 6 Silikonová kulička s navázanou adresní sekvencí a sondou (www.illumina.com).

Využívala jsem lidské čipy, kde na jednom čipu jsou pozice pro šest samostatných vzorků, a prostor pro jeden vzorek je tvořen dvěma poli. Průměrné zastoupení každé sondy je kolem dvaceti pozic pro každý vzorek na čipu. V rozvržení vzorků na jednotlivé čipy, pro lepší diferenciální analýzu genové exprese, jsme vždy dbali na to, aby na jednom čipu byli dvojice (u CMP - kontrola a případ) či trojice (u AIM - kontrola, případ a následný náběr po šesti měsících) souvisejících vzorků.

2 Cíle práce

V rámci mé práce jsem musela nastudovat problematiku infarktu myokardu a cévní mozkové příhody a využití čipové analýzy jako robustní metody pro detekci genů. Cílem práce bylo stanovit geny, jejichž exprese se liší u pacientů s AIM, AIM6 (odběr krve pacienta s AIM po 6 měsících od příhody) a CMP v porovnání s kontrolami či jinou sestavu diferenciálně expremovaných genů, která by byla klinicky zajímavá z hlediska prognózy stavu pacientů, případně určující z pohledu predispozice ke KVO.

Hlavní náplní této práce pak bylo zpracování vzorků plné krve smíchané s *RNAlater*[®] až po čipovou analýzu u pacientů s infarktem myokardu, cévní mozkovou příhodou a kontrolních pacientů, jejichž náběr zajišťovala Městská nemocnice Čáslav nebo u některých akutních infarktů myokardu kardiologická klinika v Pardubicích.

U pacientů s AIM nás zvláště zajímalo, zdali se liší exprese genů u pacientů, kteří zemřeli do 6 měsíců po AIM z kardiovaskulárních příčin, a u pacientů s AIM, kteří nezemřeli, a byl u nich proveden kontrolní náběr. Zde prezentovaná analýza byla prováděna za účelem možnosti najít způsob stanovení prognózy pacientů s primárním infarktem myokardu a pro toto stanovení nalézt vhodnou kombinaci genů. Biologickým vzorkem odebraným z těla pacienta pro analýzu by pak mohly být buňky periferní krve, které jsou vhodné především pro minimální invazivitu získání potřebného materiálu a tudíž minimální zátěží pro pacienty.

Výsledky našich analýz nám umožnily odpovědět na následující otázky:

- Je možné využít vzorky periferní plné krve pro čipovou analýzu genové exprese?
- Jaké jsou kritické parametry zvoleného postupu?
- Liší se exprese některých genů u pacientů s AIM zemřelých do 6 měsíců na kardiovaskulární příčinu oproti pacientům s AIM, kteří nezemřeli?
- Mohou zvýšené hodnoty intenzit genové exprese indikovat zvýšené riziko úmrtí v souvislosti s kardiovaskulárními příčinami?
- Při jakém nastavení parametrů statistických vyhodnocení získáme rozumné množství statisticky a klinicky významně diferenciálně exprimovaných genů, které by bylo možné případně využít v klinické praxi?

3 Materiál a přístroje

3.1 Vzorky plné krve s RNAlater

Každému vzorku daného pacienta byl přiřazen identifikační kód. Pro odběr krve byly připraveny 15 ml zkumavky se 7,6 ml *RNAlater*[®], do kterých bylo přidáno 2,4 ml nesrážlivé krve ihned po odběru. Po homogenizaci směsi byly vzorky zamrazeny. Vzorky byly uskladněny v mrazicím boxu; při -70°C. Před izolací daného vzorku se vzorek v 15 ml zkumavce nechal na ledu rozmraznout a po promíchání byl rozpipetován do 2ml zkumavek po 1,8 ml, což je výchozí množství pro izolaci RNA. Alikvoty pak byly opět zamrazeny, aby byly připravené pro případné další izolace a minimalizoval se počet cyklů zmrazení a rozmrazení vzorku.

V rámci práce, která je podporována Centrem biomedicínské informatiky projektem 1M06014 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR bylo doposud zpracováno více než 306 vzorků. V Tab. 2 jsou uvedeny vzorky, které jsem zpracovala já. Jelikož statistické vyhodnocování výsledků probíhá postupně a je časově náročné, jsou zde uvedeny pouze výsledky z prvních analýz provedených na níže uvedených vzorcích (viz Tab. 3).

Tab. 2 Seznam všech zpracovaných krevních vzorků s *RNAlater*[®]

ID	Vzorek	Pohlaví	Ročník	Exitus	Diabetes mellitus	Kouření	c (ng/μl) RNA	RIN	Verze čipu
C056	AIM	Muž	1953	Ne	Ne	Ano - 15	109,2	7,4	V2
P008	AIM	Žena	1949	Ne	Ne	Ne	41,9	8,1	V2
P009	AIM	Muž	1951	Ne	Ne	Ano - 2	28,6	7,1	V2
C029	AIM	Muž	1955	Ne	Ne	Ne	43,3	7,1	V2
C048	AIM	Žena	1960	Ne	Ne	Ne	170,3	8,5	V2
C099	AIM	Muž	1951	Ne	Ne	Ne	261,2	8	V2
C170	AIM	Žena	1929	Ne	Ano	Ne	404,7	6,1	V2
C172	AIM	Žena	1931	Ne	Ano	Ne	353	7,7	V2
C181	AIM	Žena	1934	Ne	Ano	Ne	195,2	8,1	V2
C069	AIM	Muž	1941	Ne	Ne	Ne	185,3	8,7	V2
P011	AIM	Muž	1947	Ne	Ne	Ne	245,2	6,9	V2
C147	AIM	Muž	1945	Ne	Ne	Ne	317,5	6,7	V2
C005	AIMD6	Muž	1939	Ano	Ne	Ne	89,5	8,1	V2
C053	AIMD6	Žena	1935	Ano	Ne	Ne	327,1	7,7	V2
P010	AIMD6	Žena	1928	Ano	Ano	Ne	188,3	8,1	V2

ID	Vzorek	Pohlaví	Ročník	Exitus	Diabetes mellitus	Kouření	c (ng/μl) RNA	RIN	Verze čipu
C174	AIM	Muž	1950	Ne	Ne	Ne	127,97	8	V2
C182	AIM	Muž	1954	Ne	Ne	Ano - 40	97,47	8,1	V2
C289	AIM	Muž	1957	Ne	Ne	Ne	213,42	8	V2
C218	AIM	Žena	1950	Ne	Ne	Ne	104,41	8,1	V2
C125	AIM	Muž	1928	Ne	Ano	Ne	184,7	8,4	V2
C139	AIM	Muž	1939	Ne	Ne	Ne	126,5	8,4	V2
C120	AIM	Muž	1949	Ne	Ne	Ne	103,6	8,7	V2
C063	AIM	Žena	1941	Ne	Ne	Ne	282,9	8,5	V2
C205	AIM	Muž	1944	Ne	Ano	Ano - 10	85,7	8,4	V2
C019	AIM	Žena	1930	Ne	Ne	Ne	36,59	7,7	V2
C013	AIM	Muž	1939	Ne	Ano	Ne	194,74	7,9	V2
C269	AIM	Muž	1938	Ne	Ne	Ne	320,41	8,2	V2
P019	AIM	Žena	1931	Ne	Ano	Ne	86,65	7,9	V2
C185	AIM	Muž	1937	Ne	Ano	Ne	191,54	8,2	V2
C195	AIM	Muž	1946	Ne	Ano	Ne	293,41	8,2	V2
C284	AIM	Muž	1953	Ne	Ne	Ano - 20	210,06	7,4	V2
C194	AIM	Muž	1933	Ne	Ne	Ne	160,62	8	V2
C238	AIM	Muž	1934	Ne	Ano	Ne	204,88	7,8	V2
C078	AIMD6	Muž	1937	Ano	Ano	Ne	170,38	8,2	V2
C231	AIM	Muž	1933	Ne	Ne	Ne	117,7	7,3	V3
C242	kontrola	Muž	1953	Ne	Ano	Ne	256,55	7,9	V3
C358	AIM6	Muž	1954	Ne	Ano	Ne	77,91	8,8	V3
C317	AIM	Muž	1954	Ne	Ano	Ne	144,63	7,5	V3
C292	AIM6	Muž	1933	Ne	Ne	Ne	217,2	7,5	V3
C103	kontrola	Muž	1929	Ne	Ne	Ne	77,25	7,4	V3
C331	AIM	Muž	1954	Ne	Ne	Ano - 20	70,76	7,4	V3
C367	AIM6	Muž	1954	Ne	Ne	Ne	86,63	8,1	V3
C145	kontrola	Žena	1942	Ne	Ne	Ne	61,81	8,3	V3
C355	AIM6	Žena	1944	Ne	Ne	Ne	72	7,7	V3
C309	AIM	Žena	1944	Ne	Ne	Ne	44,71	8,4	V3
C335	kontrola	Muž	1953	Ne	Ne	Ano - 20	252,26	8	V3
C333	kontrola	Muž	1927	Ne	Ne	Ne	143,68	8,6	V3
C294	kontrola	Muž	1939	Ne	Ne	Ne	118,86	8,4	V3
C316	CMP	Žena	1933	Ne	Ne	Ano - 5	224,83	7,6	V3
C123	kontrola	Žena	1932	Ne	Ne	Ne	210,16	7,5	V3
C075	CMP	Muž	1928	Ne	Ne	Ne	75,48	7,6	V3
C179	CMP	Muž	1938	Ne	Ne	Ano - 5	151,01	8,1	V3
C230	kontrola	Muž	1933	Ne	Ano	Ano - 20	228,72	7,7	V3
C328	CMP	Žena	1945	Ne	Ano	Ne	391,11	7,3	V3
C300	CMP	Muž	1945	Ne	Ano	Ne	117,87	7,8	V3
C156	kontrola	Žena	1944	Ne	Ne	Ano - 20	177,82	7,4	V3

ID	Vzorek	Pohlaví	Ročník	Exitus	Diabetes mellitus	Kouření	c (ng/μl) RNA	RIN	Verze čipu
C327	CMP	Muž	1938	Ne	Ne	Ne	317,92	7,5	V3
C198	kontrola	Muž	1944	Ne	Ne	Ne	285,64	7,7	V3
C140	kontrola	Žena	1955	Ne	Ne	Ano - 10	201,92	8	V3
C305	AIM	Muž	1948	Ne	Ne	Ne	214,15	7,9	V3
C341	AIM6	Muž	1948	Ne	Ne	Ne	170,5	8,5	V3
C307	AIM	Žena	1960	Ne	Ano	Ano - 20	315,22	8,2	V3
C362	kontrola	Muž	1948	Ne	Ne	Ne	113,44	8,5	V3
C351	AIM6	Žena	1960	Ne	Ne	Ano - 4	66,24	7,5	V3
C297	kontrola	Muž	1949	Ne	Ne	Ano - 10	264,94	8,6	V3
C226	AIM	Muž	1950	Ne	Ne	Ano - 15	102,93	8,5	V3
C296	AIM6	Muž	1950	Ne	Ne	Ano - 10	298,97	7,9	V3
C049	kontrola	Muž	1948	Ne	Ne	Ano - 25	159,19	8	V3
C291	AIM6	Muž	1950	Ne	Ne	Ne	183,2	8,4	V3
C236	AIM	Muž	1950	Ne	Ne	Ano - 15	215,91	8,4	V3
C189	AIM	Muž	1945	Ne	Ne	Ne	204,19	N/A	V3
C271	AIM6	Muž	1945	Ne	Ne	Ne	164,52	N/A	V3
C141	kontrola	Muž	1949	Ne	Ne	Ano - 10	187,47	7,6	V3
C359	kontrola	Muž	1944	Ne	Ne	Ne	163,09	7,5	V3
C277	AIM6	Muž	1951	Ne	Ne	Ano - 2	168,96	8,6	V3
C219	AIM	Muž	1951	Ne	Ne	Ano - 3	94,64	8,3	V3
C319	CMP	Muž	1933	Ne	Ano	Ne	183,87	7,9	V3
C332	CMP	Muž	1945	Ne	Ano	Ne	81,67	8,3	V3
C276	CMP	Muž	1942	Ne	Ne	Ne	69,38	8	V3
C272	kontrola	Muž	1930	Ne	Ano	Ne	99,19	9,1	V3
C213	kontrola	Muž	1941	Ne	Ne	Ne	159,11	7,8	V3
C204	kontrola	Muž	1943	Ne	Ne	Ne	170,48	7,9	V3
C312	CMP	Muž	1953	Ne	Ne	Ne	120,15	7,9	V3
C308	CMP	Muž	1952	Ne	Ano	Ne	186,31	8,1	V3
C225	kontrola	Muž	1953	Ne	Ne	Ne	237,9	7,8	V3
C150	kontrola	Muž	1952	Ne	Ne	Ne	115,55	8,4	V3
C283	CMP	Muž	1954	Ne	Ne	Ano -5	192,69	8,4	V3
C178	kontrola	Muž	1951	Ne	Ano	Ne	59,06	8,2	V3
C257	CMP	Žena	1937	Ne	Ne	Ne	75,38	7,7	V3
C253	kontrola	Muž	1930	Ne	Ano	Ne	107,22	7,8	V3
C364	CMP	Muž	1943	Ne	Ne	Ano - 15	197,08	N/A	V3
C209	kontrola	Žena	1937	Ne	Ne	Ano - 10	253,47	8,1	V3
C165	CMP	Muž	1932	Ne	Ne	Ano - 8	115,9	7,7	V3
C337	kontrola	Muž	1941	Ne	Ne	Ne	161,87	7,8	V3
C175	CMP	Žena	1940	Ne	Ano	Ne	102,94	7,1	V3
C265	CMP	Muž	1943	Ne	Ne	Ano - 20	95,33	7,6	V3
C344	kontrola	Muž	1942	Ne	Ne	Ne	182,13	8,2	V3

ID	Vzorek	Pohlaví	Ročník	Exitus	Diabetes mellitus	Kouření	c (ng/μl) RNA	RIN	Verze čipu
C256	CMP	Muž	1946	Ne	Ne	Ne	84,81	7,9	V3
C227	kontrola	Žena	1939	Ne	Ne	Ne	141,77	8,4	V3
C260	kontrola	Muž	1946	Ne	Ne	Ne	162,55	7,7	V3
C221	kontrola	Žena	1929	Ne	Ano	Ne	198,5	8,4	V3
C274	kontrola	Muž	1950	Ne	Ne	Ne	261,87	7,9	V3
C372	CMP	Žena	1933	Ne	Ano	Ne	15,06	8,6	V3
C380	CMP	Muž	1952	Ne	Ano	Ne	301,4	8,2	V3
C216	kontrola	Žena	1934	Ne	Ne	Ne	87,77	7,8	V3
C169	CMP	Žena	1936	Ne	Ne	Ne	136,64	8,3	V3
C320	AIM6	Muž	1929	Ne	Ne	Ne	146,26	8,4	V3
C333	kontrola	Muž	1927	Ne	Ne	Ne	160,45	8	V3
C264	AIM	Muž	1929	Ne	Ne	Ne	20,23	8	V3
C344	kontrola	Muž	1942	Ne	Ne	Ne	182,13	8,2	V3
C361	AIM6	Muž	1942	Ne	Ano	Ne	181,42	8	V3
C321	AIM	Muž	1942	Ne	Ano	Ne	190,67	7	V3
C295	CMP	Žena	1938	Ne	Ne	Ne	110,23	8,3	V3
C116	kontrola	Muž	1941	Ne	Ano	Ano - 20	135,22	8,1	V3
C311	kontrola	Žena	1937	Ne	Ne	Ne	387,88	8,5	V3
C258	CMP	Muž	1943	Ne	Ne	Ne	85,88	8,3	V3
C338	kontrola	Muž	1928	Ne	Ne	Ne	121,54	7,5	V3
C199	CMP	Muž	1928	Ne	Ne	Ne	97,81	7,9	V3
C410	AIM6	Muž	1953	Ne	Ne	Ne	91,16	7,7	V3
C033	kontrola	Muž	1954	Ne	Ne	Ano - 20	40,1	7,3	V3
C389	AIM	Muž	1958	Ne	Ne	Ano - 10	169,32	7,9	V3
C064	kontrola	Muž	1950	Ne	Ne	Ne	234,44	7,5	V3
C411	AIM6	Muž	1958	Ne	Ne	Ano - 10	200,49	7,9	V3
P029	AIM	Muž	1953	Ne	Ne	Ne	34,38	7,6	V3
C386	AIM	Žena	1950	Ne	Ne	Ne	259,78	9,1	V3
C114	kontrola	Žena	1946	Ne	Ne	Ne	216,59	8,8	V3
C113	kontrola	Muž	1939	Ne	Ne	Ano - 20	147,75	8,4	V3
C408	AIM6	Žena	1950	Ne	Ne	Ne	266,15	8,9	V3
P026	AIM	Muž	1945	Ne	Ne	Ano - 20	115,14	7,9	V3
C407	AIM6	Muž	1945	Ne	Ne	Ne	178,2	8,4	V3
C123	kontrola	Žena	1932	Ne	Ne	Ne	158,57	7,3	V3
C399	AIM	Žena	1942	Ne	Ano	Ne	356,2	7,4	V3
C418	AIM6	Žena	1935	Ne	Ne	Ne	51,3	7,8	V3
C136	kontrola	Žena	1938	Ne	Ano	Ne	106,79	7,5	V3
C397	AIM	Žena	1935	Ne	Ne	Ne	203,9	8,2	V3
C416	AIM6	Žena	1942	Ne	Ano	Ne	101,2	7,7	V3
C406	AIM6	Muž	1940	Ne	Ano	Ano - 3	214,71	8,8	V3
C322	AIM6	Muž	1946	Ne	Ano	Ne	265,63	8,5	V3

ID	Vzorek	Pohlaví	Ročník	Exitus	Diabetes mellitus	Kouření	c (ng/μl) RNA	RIN	Verze čipu
C281	AIM	Muž	1946	Ne	Ano	Ano - 10	113,98	8,3	V3
P027	AIM	Muž	1940	Ne	Ano	Ano - 10	301,19	9,3	V3
C275	kontrola	Muž	1934	Ne	Ne	Ano	220,28	9,4	V3
C391	kontrola	Muž	1944	Ne	Ano	Ne	62,25	9,2	V3
C392	kontrola	Žena	1929	Ne	Ano	Ne	282,32	7,6	V3
C336	AIM	Muž	1931	Ne	Ne	Ne	196,71	8	V3
C396	kontrola	Muž	1927	Ne	Ne	Ne	231,61	7,4	V3
C369	AIM6	Muž	1931	Ne	Ne	Ne	248,69	7	V3
C349	AIM	Žena	1933	Ne	Ano	Ne	293,93	7,7	V3
C373	AIM6	Žena	1933	Ne	Ano	Ne	198,79	7,6	V3
C413	AIM6	Muž	1966	Ne	Ne	Ne	330,04	7,6	V3
C394	AIM	Muž	1966	Ne	Ne	Ano - 20	169,43	7,3	V3
C403	kontrola	Muž	1962	Ne	Ne	Ano - 20	143,41	7,3	V3
C301	AIM6	Muž	1940	Ne	Ano	Ne	153,93	7,9	V3
C366	kontrola	Muž	1941	Ne	Ano	Ne	82,93	8	V3
C245	AIM	Muž	1940	Ne	Ano	Ne	302,31	7,3	V3
C078	AIM	Muž	1937	Ano	Ano	Ne	213,25	8,5	V4
C182	AIM	Muž	1954	Ne	Ne	Ano - 40	260,29	7,8	V4
C195	AIM	Muž	1946	Ne	Ano	Ne	195,08	8,5	V4
C266	AIM6	Muž	1946	Ne	Ano	Ne	144,34	8,2	V4
C304	kontrola	Muž	1946	Ne	Ano	Ne	188,79	8,5	V4
C287	kontrola	Muž	1936	Ne	Ano	Ne	174,03	8	V4
P010	AIM	Žena	1928	Ano	Ano	Ne	86,76	7,8	V4
C005	AIM	Muž	1939	Ano	Ne	Ne	51,49	7,6	V4
C010	kontrola	Muž	1938	Ne	Ne	Ne	190,23	7,5	V4
C208	kontrola	Žena	1928	Ne	Ano	Ne	184,38	7,3	V4
C289	AIM	Muž	1957	Ne	Ne	Ne	143,24	7,8	V4
C061	kontrola	Muž	1955	Ne	Ne	Ne	183,63	8,1	V4
P009	AIM	Muž	1951	Ne	Ne	Ano - 2	85,76	7,5	V4
C192	AIM6	Muž	1948	Ne	Ne	Ano - 2	370,1	8	V4
C100	AIM6	Žena	1959	Ne	Ne	Ne	269,73	7,6	V4
C066	kontrola	Muž	1947	Ne	Ne	Ano - 10	227,73	8,2	V4
C247	AIM6	Muž	1945	Ne	Ne	Ne	253,75	7,6	V4
C260	kontrola	Muž	1946	Ne	Ne	Ne	46,44	8	V4
C023	kontrola	Žena	1931	Ne	Ano	Ne	35,4	7,8	V4

Tab. 3 Seznam vzorků, které jsou zpracovány ve výsledcích čipové analýzy

ID	Vzorek	Pohlaví	Ročník	Exitus	Diabetes mellitus	Kouření	c (ng/μl) RNA	RIN	Verze čipu
C056	AIM	Muž	1953	Ne	Ne	Ano - 15	109,2	7,4	V2
P008	AIM	Žena	1949	Ne	Ne	Ne	41,9	8,1	V2
P009	AIM	Muž	1951	Ne	Ne	Ano - 2	28,6	7,1	V2
C029	AIM	Muž	1955	Ne	Ne	Ne	43,3	7,1	V2
C048	AIM	Žena	1960	Ne	Ne	Ne	170,3	8,5	V2
C099	AIM	Muž	1951	Ne	Ne	Ne	261,2	8	V2
C170	AIM	Žena	1929	Ne	Ne	Ne	404,7	6,1	V2
C172	AIM	Žena	1931	Ne	Ano	Ne	353	7,7	V2
C181	AIM	Žena	1934	Ne	Ano	Ne	195,2	8,1	V2
C069	AIM	Muž	1941	Ne	Ne	Ne	185,3	8,7	V2
P011	AIM	Muž	1947	Ne	Ne	Ne	245,2	6,9	V2
C147	AIM	Muž	1945	Ne	Ne	Ne	317,5	6,7	V2
C005	AIMD6	Muž	1939	Ano	Ne	Ne	89,5	8,1	V2
C053	AIMD6	Žena	1935	Ano	Ne	Ne	327,2	7,7	V2
P010	AIMD6	Žena	1928	Ano	Ano	Ne	188,3	8,1	V2
C174	AIM	Muž	1950	Ne	Ne	Ne	127,97	8	V2
C182	AIM	Muž	1954	Ne	Ne	Ano - 40	97,47	8,1	V2
C289	AIM	Muž	1957	Ne	Ne	Ne	213,42	8	V2
C218	AIM	Žena	1950	Ne	Ne	Ne	104,41	8,1	V2
C125	AIM	Muž	1928	Ne	Ano	Ne	184,7	8,4	V2
C139	AIM	Muž	1939	Ne	Ne	Ne	126,5	8,4	V2
C120	AIM	Muž	1949	Ne	Ne	Ne	103,6	8,7	V2
C063	AIM	Žena	1941	Ne	Ne	Ne	282,9	8,5	V2
C205	AIM	Muž	1944	Ne	Ano	Ano - 10	85,7	8,4	V2
C019	AIM	Žena	1930	Ne	Ne	Ne	36,59	7,7	V2
C013	AIM	Muž	1939	Ne	Ano	Ne	194,74	7,9	V2
C269	AIM	Muž	1938	Ne	Ne	Ne	320,41	8,2	V2
P019	AIM	Žena	1931	Ne	Ano	Ne	86,65	7,9	V2
C185	AIM	Muž	1937	Ne	Ano	Ne	191,54	8,2	V2
C195	AIM	Muž	1946	Ne	Ano	Ne	293,41	8,2	V2
C284	AIM	Muž	1953	Ne	Ne	Ano - 20	210,06	7,4	V2
C194	AIM	Muž	1933	Ne	Ne	Ne	160,62	8	V2
C238	AIM	Muž	1934	Ne	Ano	Ne	204,88	7,8	V2
C078	AIM6	Muž	1937	Ano	Ano	Ne	170,38	8,2	V2

3.2 Chemikálie

Tab. 4 Seznam použitých souprav a chemikálií

Souprava	Název	Katalogové číslo	Výrobce
Izolační	<i>RiboPure™ Blood Kit</i>	AM1928	Ambion, Inc.
K odstranění globinové frakce	<i>GLOBINclear™ Human</i>	AM1980	Ambion, Inc.
Pro Agilent	<i>Agilent RNA 6000 Nano Kit</i>	5067-1511	Agilent Technologies, Inc.
Amplifikační	<i>Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit</i>	AMIL1791	Ambion, Inc.
Hybridizační	<i>HumanWG-6 V3(2,4) Whole genome Expression BeadChip Kit</i>	BD-103-0203	Illumina, Inc.
Pro reverzní transkripci	<i>QuantiTect Rev. Transcription Kit</i>	205311	Quiagen
PCR	<i>Universal probelibrary set human</i>	04683633001	Roche Applied Science s.r.o.
	<i>LightCycler 480 Probes Master</i>	04887301001	Roche Applied Science s.r.o.
Chemikálie	Název	Katalogové číslo	Výrobce
	<i>RNAlater®</i>	AM7012	Ambion, Inc.
	<i>RNaseZap®</i>	AM9780	Ambion, Inc.
	Izopropanol	I9516	Sigma - Aldrich
	Etanol	E7148	Sigma - Aldrich

3.3 Přístrojové vybavení

Tab. 5 Seznam použitých přístrojů

Přístroj	Výrobce
Centrifuga 5415R	Eppendorf A.S.
Centrifuga 5810R	Eppendorf A.S.
Vortexer IKA MS 3 Basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler	Bio – Rad Life Sciences, Inc.
Agilent, 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Inc.
Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Julabo MP- Basis, Heating Immersion Circulator	JULABO Labortechnik GmbH
Vortex - Genie 2	Scientific Industries, Inc.
GeneChip hybridization Oven 640	Affymetrix® technology
Hybridization Oven	Illumina, Inc.
Illumina® BeadArray™ Reader	Illumina, Inc.
Hybex™ microsamples incubator	Inter Medico
Bloková digitální lázeň pro mikrozkušky BTD Grant	P-LAB a.s.
Laminární box (HEPA/UV sterilizing PCR workstation)	UVP, Inc.
Lightcycler 480 systém	Roche Applied Science, s.r.o.
2D třepačka s nakláněním Rocker II (260350)	Boekel Scientific
Třepačka orbitální OS10	Biosan

4 Metody

4.1 Izolace celkové RNA

Celková RNA byla izolována ze vzorků plné krve pomocí RiboPure™-Blood Kitu firmy Ambion, Inc. 2,4 ml odebrané krve pacienta bylo smícháno nejpozději do 15 minut od odběru v 15 ml zkumavce s 7,6ml *RNAlater*[®], který je dodáván spolu s izolačním kitem. Vzorek byl řádně promíchán a poté přesunut do mrazicího boxu -70°C k dlouhodobému skladování. Po izolaci je pomocí *GLOBINclear*[™] *Whole Blood Kitu* firmy Ambion, Inc. odstraněna globinová RNA.

Pracovní protokol izolace celkové RNA:

Izolace RNA pomocí kitu *RiboPure*[™] – *Blood*, Ambion Inc. byla prováděna tak, že vzorky byly vyndány z mrazicího boxu a ponechány na ledu rozmrazit. Snažili jsme se vždy šestice vzorků jdoucí na jeden čip připravovat najednou. Pro izolaci RNA bylo pipetováno 1,8 ml vzorku krve s *RNAlater*[®] do 2 ml zkumavky bez RNáz. Vzorek krve v roztoku *RNAlater*[®] byl centrifugován na 16 100 g (13 200 rpm) 1 min. Supernatant byl odstraněn včetně bílé fáze těsně nad peletem. Buňky byly lyzovány v 800 µl lyzačního roztoku a 50 µl roztoku acetátu sodného. Směs byla řádně promíchána na vortexu. Lyzát buněk byl extrahován s 500 µl kyselého fenol:chloroformu. Směs byla promíchána 30 s na vortexu a ponechána stát 5 min při laboratorní teplotě. Směs byla centrifugována na 16 100 g 1 min. Celá vodná fáze, které bylo kolem 1,2 ml, byla přenesena do nové 2 ml zkumavky bez RNáz, znovu centrifugována a vodná fáze bez jakékoli pelety odebrána do čisté zkumavky bez RNáz. Bylo přidáno 600 µl 100% etanolu a promícháno na vortexu.

700 µl vzorku bylo přeneseno na dodanou kolonku umístěnou v kolekční zkumavce a 5-10 s centrifugováno na 16 100 g. Kolekční zkumavky byly vyprázdněny a znovu do nich byly nasazeny kolonky. Do kolonek bylo nanášeno dalších 700 µl a poté zbytek vzorku a vždy 5-10 s centrifugováno na 16 100 g. Na filtry kolonek bylo nanášeno 700 µl promývacího roztoku 1 a 5-10 s centrifugováno na 16 100 g. Kolekční zkumavky byly vyprázdněny a znovu do nich byly vsazeny kolonky. Do kolonek bylo 2x nanášeno 700 µl promývacího roztoku 2/3 (láhev musí být doplněna o 56 ml 100% etanolu) a 5-10 s centrifugováno na 16 100 g. Kolekční zkumavky byly vyprázdněny a znovu do nich byly vsaze-

ny kolonky, centrifugovány, aby byla odstraněna veškerá kapalina. Kolonky byly přeneseny na označenou kolečkovou zkumavku a nanášeno 50 µl elučního roztoku (předehřátého na 75°C). 20 s ponecháno stát při laboratorní teplotě a 20-30 s centrifugováno na maximum. Při druhé eluci dalšími 50 µl elučního roztoku centrifugováno 1 min.

K RNA ve 100 µl elučního pufru bylo přidáno 5 µl DNáze pufru a 1 µl DNázy I a ponecháno 30 min inkubovat při 37°C. K RNA po odstranění DNA bylo přidáno 20 µl reagentie inaktivující DNázy. Směs byla jemně promíchána na vortexu a ponechána 2 min stát při laboratorní teplotě. Během této doby ještě byla směs dvakrát promíchána. Vzorek byl centrifugován 1 min na 16 100 g. V peletě byla DNázy inaktivující reagentie. Roztok RNA byl přenesen do nové zkumavky bez RNáz.

Byla změřena koncentrace RNA na Nanodropu, Thermo Scientific (1 µl), případně ponechán alikvot pro analýzu na Bioanalyzeru 2100, Agilent Technologies.

Po provedení čipové analýzy s takto ošetřenými vzorky RNA bylo zjištěno, že díky použití plné krve dochází k preferenční amplifikaci globinových RNA a nedostatečné intenzitě signálu ostatních genů. Proto byly vzorky RNA přečištěny pomocí *GLOBINclearTM* Kitu firmy Ambion:

K cca 110 µl vzorku RNA izolované pomocí *RiboPureTM Blood Kit*, Ambion z plné krve s *RNAlater[®]* bylo přidáno 11 µl octanu sodného (*RiboPureTM*) a 350 µl 100 % etanolu, vše bylo řádně promícháno. Vzorky byly uskladněny 1 hod v mrazicím boxu při teplotě –20°C. Pak byly centrifugovány při 16 100 g 30 min, 4°C, a supernatant byl opatrně odstraněn. Bylo přidáno 0,7 ml ledového 70 % etanolu, vzorek vortexován, centrifugován 10 min při 4°C a supernatant opatrně odstraněn. Peleta byla rozpuštěna ve 14 µl vody bez nukleáz (v 15 µl pokud chceme v tomto kroku měřit koncentraci na Nanodropu).

V průběhu centrifugace byly připraveny potřebné roztoky:

RNA vazebný pufr: Byly přidány 2 ml 100 % izopropanolu do koncentráту vazebného pufru, promícháno a skladováno při laboratorní teplotě.

RNA promývací roztok: Byly přidány 4 ml 100 % etanolu do koncentráту promývacího roztoku, promícháno a skladováno při laboratorní teplotě.

Kuličky resuspendující směs (1 reakce / 6 reakcí):

10 μ l / 60 μ l RNA Binding Beads (4°C)

4 μ l / 24 μ l RNA Bead Buffer (laboratorní teplota)

6 μ l / 36 μ l 100 % izopropanol

Směs byla homogenizována a skladována při laboratorní teplotě.

Streptavidinové magnetické kuličky (30 μ l / vzorek): do inkubátoru (50°C) byly vloženy zkumavky s 2x hybridizačním pufrem a pufrem pro streptavidinové kuličky minimálně na 15 min, které byly před použitím řádně vortexovány. V případě práce se šesti vzorky bylo 6x 30 μ l (180 μ l) homogenizovaných streptavidinových magnetických kuliček bylo pipetováno do čisté 1,5 ml zkumavky, centrifugováno cca 2 s na méně než 1000 g a zkumavka byla umístěna do magnetického stojánku na dobu 3-5 minut (dokud nebyl roztok průsvitný). Supernatant byl opatrně odstraněn a přidáno 6 x 30 μ l (180 μ l) pufru pro streptavidinové kuličky předehřátého na 50°C, řádně vortexováno a ponecháno inkubovat po dobu nejméně 15 min při 50 °C před dalším použitím.

Ke vzorkům RNA ve 14 μ l (1-10 μ g) byl přidán 1 μ l *Capture Oligo Mix*. Ke směsi bylo přidáno 15 μ l 2x hybridizačního pufru předehřátého na 50°C. Vzorky byly krátce vortexovány a rychle centrifugovány při max. 1000 g a ponechány inkubovat při 50°C po dobu 15 minut (dojde k hybridizaci s globinovou mRNA).

Připravené streptavidinové magnetické kuličky umístěné v inkubátoru byly jemně vortexovány a centrifugovány méně než 2 s na max. 1000 g. Ke každému vzorku RNA bylo přidáno 30 μ l připravených streptavidinových magnetických kuliček, směsi řádně promíchány vortexováním, stočeny cca 2 s na 1000 g a ponechány inkubovat 30 min při teplotě 50°C. Po vyjmutí z inkubátoru jemně vortexovány, centrifugovány cca 2 s na max. 1000 g a zkumavky umístěny do magnetického stojánku na 3-5 min (dokud nebyl roztok průsvitný). Supernatanty obsahující celkovou RNA bez globinové mRNA opatrně odstraněny a přeneseny do čistých 1,5 ml zkumavek.

Byl předehřát eluční pufr na 58°C. Ke každému RNA vzorku bylo přidáno 100 μ l RNA vazebného pufru. Kuličky resuspendující směs byla řádně homogenizována vortexováním a následně bylo přidáno 20 μ l směsi ke každému vzorku. Směs byla 10 s řádně vortexována, aby došlo k navázání RNA na kuličky, centrifugována cca 2 s na 1000 g. Zkumavky byly umístěny do magnetického stojánku na 3-5 minut (dokud nebyl roztok průsvitný). Opatrně byly odstraněny veškeré supernatanty. Zkumavky byly vyjmuty z magnetického

stojánku. Až poté bylo ke každému vzorku přidáno 200 μ l RNA promývacího roztoku, řádně 10 s vortexováno, krátce a jemně stočeno. Zkumavky se vzorky byly umístěny do magnetického stojánku na 3-5 minut než došlo k usazení magnetických kuliček s navázanou RNA, opatrně byl odstraněn veškerý supernatant a zkumavky byly vyjmuty ze stojánku. Zkumavky byly krátce a jemně stočeny, umístěny zpět do magnetického stojánku a malou špičkou byla odstraněna veškerá kapalina. Zkumavky se vzorky byly vyndány z magnetického stojánku a otevřené nechány 5 min na vzduchu oschnout.

Ke každému vzorku bylo přidáno 30 μ l elučního pufru předehřátého na 58°C, řádně 10 s vortexováno a směs byla inkubována 5 min při 58°C. Řádně 10 s vortexováno a krátce a jemně centrifugováno (cca 2 s na 1000 g). Vzorky byly umístěny do magnetického stojánku na 3 až 5 minut, než došlo k usazení magnetických kuliček. Supernatant obsahující přečištěnou celkovou RNA bez globinových frakcí byl opatrně odebrán do čistých 1,5 ml zkumavek.

Kritickým parametrem se stal poměr absorbancí 260 nm ku 230 nm, který by měl být pro čipovou analýzu vyšší než 1,5. Pro zajištění dostatečné kvality musela být prováděna finální etanolová precipitace.

K cca 30 μ l vzorku RNA izolované pomocí *RiboPureTM Blood Kit*, Ambion z plné krve s *RNAlater[®]* přečištěné kitem *GLOBINclearTM Whole Blood Kit* byly přidány 3 μ l octanu sodného (*RiboPureTM*) a 90 μ l 100 % etanolu. Řádně promícháno a vzorky byly uskladněny přes noc v mrazicím boxu při teplotě -20°C. Ráno byly vzorky centrifugovány při 16 100 g 30 min, 4°C, supernatant byl opatrně odstraněn a peleta byla promyta 0,7 ml vychlazeného 70 % etanolu. Vzorek byl vortexován, centrifugován 15 min při 4°C a poté byl veškerý supernatant opatrně odstraněn. Pelety byly rozpuštěny ve 14 μ l vody bez nukleáz či dle velikosti pelety a vstupní koncentrace ve větším objemu.

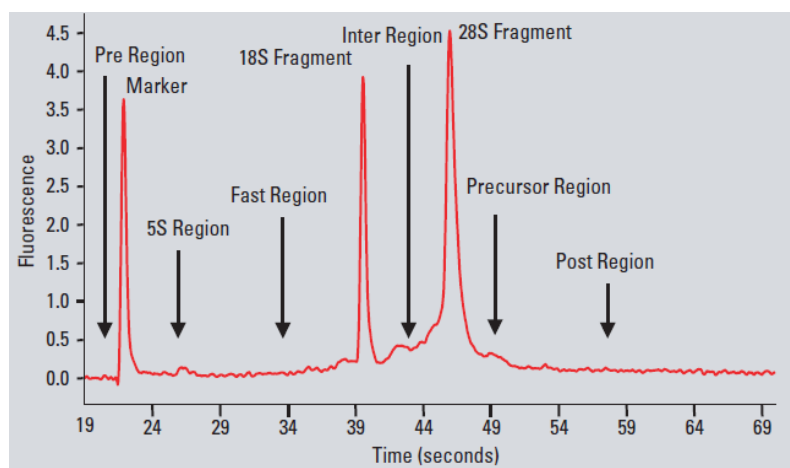
Byla změřena koncentrace přečištěné a přesrážené RNA na Nanodropu ND 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc. (1 μ l), integrita byla stanovena pomocí Bioanalyzeru 2100, Agilent Technologies (1 μ l) – pomocí souprav *Agilent RNA 6000 Nano/Pico Kit* (kat. č. 5067-1511/5067-1513).

4.1.1 Kontrola kvality izolované RNA na Bioanalyzeru 2100

Integrita molekul RNA je pro čipovou technologii velmi důležitá. RNA je rychle rozkládána v přítomnosti RNáz enzymů. Následkem toho se ve vzorcích běžně vyskytují krátké fragmenty RNA, které nejsou žádoucí pro experiment.

Starším způsobem používaným ke stanovení integrity RNA byla elektroforéza na agarózovém gelu, barveném ethidium bromidem. Typicky se na gelu objevily dva proužky, jeden pro 28S a druhý pro 18S ribozomální podjednotku. Bylo potřebné použití výrazně většího množství vzorku a k přesnému vyhodnocení integrity bylo zapotřebí dalších analytických softwarů.

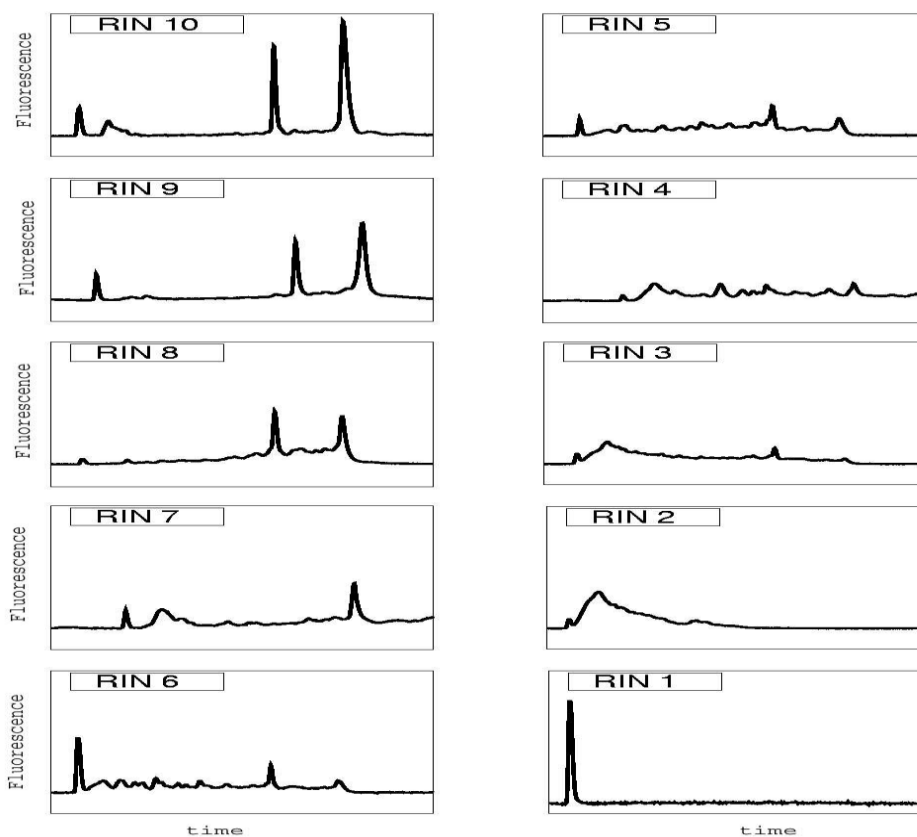
V roce 1999 byl představen Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies pro separaci DNA, RNA a proteinů. Agilent je nástroj pro kontrolu kvality využívající technologii mikrokapilární elektroforézy. Pro analýzu stačí malé množství vzorku, který je v kanálcích komerčně vyráběného čipu pro 12 vzorků rozdělen podle své molekulární hmotnosti a následně detekován pomocí laserem vyvolané fluorescence. Výsledky jsou zobrazeny jako elektroferogram (Schroeder *et al.*, 2006). Elektroferogram má několik segmentů, kdy nás nejvíce zajímají segmenty 18S a 28S (Obr. 7).



Obr. 7 Jednotlivé segmenty elektroferogramu. Zleva: úvodní oblast, marker, 5S oblast, oblast rychlých molekul, oblast 18S podjednotek, mezioblast, oblast 28S podjednotek, oblast prekursorů a závěrečná oblast (Mueller *et al.*, 2004).

Izolovaná RNA dosahuje různé kvality dle použitého výchozího materiálu, použitého způsobu izolace a dle možností minimalizace degradace v průběhu pracovních postupů.

Stupeň degradace RNA je u systému agilent udán tzv. číslem RIN a poměrem ribozomálních podjednotek 28S/18S (Obr. 8).



Obr. 8 Kategorie integrity RNA. Obrázek ukazuje možné rozložení hodnot integrity RNA. Hodnoty dosahují hodnot od 10, značící neporušenou RNA, až po 1, která znamená úplně degradovanou RNA (Schroeder *et al.*, 2006).

Pracovní protokol:

Před začátkem práce byly chemikálie vyndány z ledničky a ponechány 30 minut na stole, aby se vytemperovaly na laboratorní teplotu. Do Bioanalyzery 2100 byl dán čip s 350 μ l *RNaseZap*®, aby se vyčistil. Po 10 minutách byl vyměněn za čip s 350 μ l vody bez RNáz.

550 μ l *RNA 6000 Nano* gelu bylo napipetováno do zkumavky s filtrem. Zkumavka s gelem byla centrifugována 10 minut na 1500 g (4000 rpm). Gel byl rozpipetován do 0,5 ml zkumavek po 65 μ l alikvotech, které byly uskladněny před použitím v ledničce, maximálně však po dobu jednoho měsíce. Řádně vortexem promíchaná *RNA 6000 Nano dye* byla přidána v objemu 1 μ l k 65 μ l alikvotu gelu. Gel byl vortexován a dán do centrifugy na 10 minut při 13000 g při laboratorní teplotě.

RNA Nano čip byl vyndán z obalu a umístěn do *Chip priming station*. 9 μ l gelu s barvičkou bylo napipetováno do jamky označené **G**, byla zaklapnuta *Chip priming station* a stlačen píst, který vhání gel do připravených kapilár. Píst zůstal stlačený přesně 30 sekund a poté byl uvolněn a samovolně nechán pozvolna vystoupat do původní polohy, aby se tlaky vyrovnaly a nedošlo k roztržení gelového sloupce. *Chip priming station* byla otevřena a bylo pipetováno 9 μ l gelu s barvičkou do pozic označených **G**. Do jamek pro vzorky a do jamky s označením **H** bylo pipetováno vždy 5 μ l *RNA 6000 Nano Marker*.

Alikvot *RNA 6000 ladder* a vzorky o objemu 1 μ l byly denaturovány v cycleru na 70°C po dobu 2 minut a následně byly zchlazeny na laboratorní teplotu. 1 μ l *RNA 6000 ladder* byl napipetován do jamky označené **H**. 1 μ l každého vzorku byl pipetován do jedné z dvanácti příslušných jamek (optimální koncentrace vzorku byla 80-300 ng/ μ l).

Čip byl umístěn do IKA vertexu na 1 minutu při 2 400 rpm a následně do Bioanalyzeru 2100 k provedení vlastní analýzy.

4.2 Amplifikace

RNA je třeba během amplifikace označit biotinem k hybridizaci na čípech. Protokol se skládá z reverzní transkripce s využitím oligo(dT) primeru pro syntézu cDNA obsahující T7 promotorovou sekvenci. K získané cDNA je syntetizován druhý řetězec při využití DNA polymerázy a RNázy H. Přečištěný cDNA produkt vstupuje do *in vitro* transkripce s T7 RNA polymerázou. Výsledná cRNA je následně přečištěna od nukleotidů, solí, enzymů a anorganického fosfátu. Vstupní množství RNA, které jsme využívali pro amplifikaci, bylo 150 ng v objemu maximálně 11 μ l. Pro jednotlivé kroky byl využit *DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler*, Bio-Rad Laboratories.

Pracovní protokol:

RNA vzorky o objemu 11 μ l (150 ng RNA) byly umístěny do sterilních 0,2 ml zkumavek bez RNáz. Případně byly do daného objemu naředěny vodou bez nukleáz. Při laboratorní teplotě byl připraven master mix pro reverzní transkripci - syntézu jednořetězcové DNA:

1 μ l T7 oligo(dT) primer
2 μ l 10x pufr pro první řetězec
4 μ l směs dNTP složky byly přidávány v daném pořadí
1 μ l inhibitor RNáz
1 μ l ArrayScript (enzym).

Master mix byl jemně vortexován a krátce centrifugován (5 s). Bylo přidáno 9 μ l master mixu do každého vzorku RNA, důkladně promícháno pipetováním (2-3x) a 3-4x cvrnknuto do zkumavek. Krátce centrifugováno a umístěno do bloku cykleru (42°C). Reakce byly inkubovány 2 hod při 42°C, poté krátce stočeny a dány na led (4°C).

Na ledu byl připraven master mix pro syntézu druhého řetězce cDNA:

63 μ l voda bez nukleáz
10 μ l 10x pufr pro druhý řetězec
4 μ l směs dNTP složky byly přidávány v daném pořadí
2 μ l DNA polymerázy
1 μ l RNázy H.

Master mix byl jemně vortexován a krátce centrifugován (5 s). Bylo přidáno 80 μ l master mixu ke každému vzorku, důkladně promícháno pipetováním (2-3x) a 3-4x cvrnknuto do zkumavek. Směsi byly krátce centrifugovány, umístěny do předem vychlazeného bloku cykleru na 16°C. Reakce byly inkubovány 2 hod při 16°C, poté 4°C.

Získaná cDNA byla přečištěna. Centrifugace byly prováděny při 10 000 g a laboratorní teplotě (otáčky nesmí překročit 16 000 g, došlo by k poškození skleněného filtru a vlákna filtru by mohla kontaminovat eluát). Bylo vytemperováno dostatečné množství vody bez nukleáz pro eluci na 55°C (při teplotě \geq 58°C dochází k částečné denaturaci cDNA) nejméně 10 min před použitím. Do promývacího pufru bylo přidáno 24 ml etanolu.

Ke vzorkům cDNA bylo přidáno 250 μ l cDNA vazebného pufru, důkladně promícháno pipetováním (2-3x), 3-4x poklepano na zkumavky a krátce stočeno. Kolonky byly umístěny do dodaných promývacích zkumavek a na jejich střed nanášeny vzorky (cDNA s cDNA vazebným pufrům). Centrifugováno 1 min 10 000 g, eluát byl zlikvidován. Na každou kolonku bylo aplikováno 500 μ l promývacího pufru, centrifugováno na 10 000 g po dobu 1 min a eluát byl zlikvidován. Vzorky na kolonkách byly opětovně 1 min centrifugovány 10 000 g (odstranění veškerého promývacího pufru). Kolonky s cDNA byly přendány do elučnic zkumavek. Na střed kolonek bylo nanášeno 20 μ l vody bez nukleáz vytemperova-

né na 55°C, necháno 2 min stát při laboratorní teplotě a poté centrifugováno 1,5 min 10 000 g.

Získaná dvouřetězcová DNA v cca 17,5 µl vody z výsledného eluátu byla použita pro in-vitro transkripci. Při laboratorní teplotě byl připraven master mix pro syntézu cRNA:

2,5 µl T7 10x reakční pufr
2,5 µl směs T7 enzymu složky se přidávají v daném pořadí
2,5 µl směs biotinem značených NTP.

Master mix byl jemně vortexován a krátce centrifugován (5 s). Bylo přidáno 7,5 µl master mixu ke každému vzorku cDNA, důkladně promícháno pipetováním (2-3x) a 3-4x cvrknuto do zkumavek. Vzorky byly krátce centrifugovány a umístěny do bloku cykleru, kde byly inkubovány při 37°C po dobu 14 hod, poté 4°C. Reakce byly ukončeny přidáním 75 µl vody bez nukleáz ke každému vzorku cRNA a důkladně, ale jemně, vortexovány.

Při následném přečištění došlo k odstranění enzymů, solí a neinkorporovaných nukleotidů. Centrifugace byly prováděny při 10 000 g při laboratorní teplotě (otáčky nesmí překročit 16 000 g, došlo by k poškození skleněného filtru a vlákna filtru by mohla kontaminovat eluát). Bylo vytemperováno dostatečné množství vody bez nukleáz pro eluci na 60°C nejméně 10 min před použitím (od verze čipů V3 se začal používat nový protokol, při kterém je voda temperována jen na 55°C) a byly připraveny kolonky do sběrných zkumavek.

Ke každému vzorku ve 100 µl bylo přidáno 350 µl cRNA vazebného pufru. Ihned bylo přidáno 250 µl 100 % etanolu, vzorky 3x promíchány pipetováním, ale nevortexovány a necentrifugovány. Po smísení etanolu se vzorkem byla směs přenesena na střed připravených kolonek, centrifugováno 1 min 10 000 g, eluát byl zlikvidován. Na střed každé cRNA kolonky bylo aplikováno 650 µl promývacího pufru, centrifugováno 1 min 10 000 g a eluát byl zlikvidován. Zkumavky s kolonkami byly centrifugovány další 1 min 10 000 g (odstranění veškerého promývacího pufru) a kolonky poté byly umístěny do nových sběrných zkumavek. Na střed kolonky bylo nanášeno 200 µl vody bez nukleáz vytemperované na 60°C, necháno 2 min stát při laboratorní teplotě a centrifugováno 1,5 min 10 000 g (od verze čipů V3 byl používán nový protokol amplifikace a na střed kolonky bylo nanášeno 200 µl vody bez nukleáz vytemperované na 55°C a vzorky se nechaly inkubovat 10 minut v termobloku vyhřátém na 55°C).

Byla změřena koncentrace amplifikované cRNA na Nanodropu (1 µl). Pokud byla nižší než 150 ng/µl či byl nízký poměr absorbancí 260 nm ku 230 nm, tak musely být vzorky

precipitovány. Aby bylo se všemi vzorky nakládáno stejně, finálně byly v našem případě sráženy všechny amplifikované cRNA vzorky.

Ke vzorku přečištěné cRNA byla přidána 1/10 objemu 3M CH₃COONa, pH 5,2, *Ribo-Pure*TM (10 µl) a 2,5 násobek objemu 100% etanolu (275 µl), důkladně promícháno a ponecháno 60 min v mrazicím boxu při -20°C. Vzorky byly centrifugovány na 16 100 g po dobu 30 až 60 min při 4°C a opatrně byl odstraněn supernatant. Pelety byly promyty 500 µl 70% etanolu, zkumavky centrifugovány na 16 100 g po dobu 15 min při 4°C, supernatant opatrně odstraněn, případně byly znovu rychle centrifugovány a odstraněny i zbytky etanolu. Pelety cRNA byly ponechány cca 2 min na vzduchu, aby oschly. Poté byly suspendovány v požadovaném objemu vody bez nukleáz (≥ 12 µl).

Výtěžek závisel na množství a kvalitě poly(A)RNA v celkové RNA. Byla změřena koncentrace na Nanodropu (1 µl) a stanoven profil délek cRNA pomocí Bioanalyzeru 2100, Agilent (1 µl), který má být mezi 250-5500 nt s většinou cRNA mezi 1000-1500 nt.

4.3 Hybridizace

Posledním laboratorním úkonem je hybridizace. Vzorky amplifikované cRNA jsou naneseny na čip a přes noc dojde k hybridizaci na základě komplementarity bází s příslušnými sondami jednotlivých genů.

Pracovní protokol:

Pokud byla finální koncentrace cRNA ≥ 150 ng/µl a profil v pořádku, byly vzorky použity pro hybridizaci na *Human WG6-v2 (3,4) Expression BeadChip* firmy Illumina.

Byla vytemperována hybridizační pec s výkyvnou plošinou na 58°C alespoň 1 hod před použitím. Vzorky byly připraveny tak, aby vstupní množství cRNA do hybridizace bylo 1,5 µg. Maximální možný objem je 10 µl, případně vzorky na tento objem byly doplněny vodou bez nukleáz a promíchány. Po dobu 10 min nechány stát při laboratorní teplotě, aby došlo k řádnému rozpuštění. Do hybridizační pece vytemperované na 58°C byly na 10 min vloženy zkumavky s *GEX-HYB* a *GEX-HCB* (pro rozpuštění skladováním precipitovaných solí). Ke každému vzorku 1,5 µg cRNA v 10 µl vody bez nukleáz bylo přidáno 20 µl *GEX-HYB*, byly jemně vortexovány a rychle centrifugovány.

Illumina Hyb Chamber Basket byl umístěn do *BeadChip Hyb Chamber*. Bylo pipetováno 200 μ l *GEX-HCB* do každého ze dvou rezervoárů pro zvlhčující pufr v každé *Hyb Chamber*. Pufr byl dáván pouze do komor, které byly použity. *Hyb Chamber* byl utěsněn víkem a nechán při laboratorní teplotě ($\sim 22^{\circ}\text{C}$) než byly čipy dány do *Hyb Chamber*. Na laboratorní teplotu vytemperované čipy byly vyndány z jejich obalů. Byly používány výhradně rukavice bez pudru. Čipy byly pinzetou drženy za krycí folii v oblasti barkódu, vloženy do *Hyb Chamber Insert* tak, aby jejich směr souhlasil se symbolem barkódu na *Insertu* (vybavení potřebné pro hybridizaci čipů je zobrazeno s popisem v Příloze 4).

Analyzované vzorky cRNA smíchané s *GEX-HYB* byly zahřáty na 65°C po dobu 5 min. Jemně vortexovány a rychle centrifugovány, aby byla kapalina shromážděna na dně zkumavky. Před dalším použitím vzorky ponechány při laboratorní teplotě vychladnout a ihned poté byly pipetovány na čipy. *Hyb Chamber Inserts* obsahující čipy byly umístěny do *Hyb Chamber* a bylo pipetováno 30 μ l analyzovaného vzorku na vstupní otvor každého pole. *Hyb Chamber* opatrně uzavřen víkem a inkubován v hybridizační peci při 58°C po dobu 16 hodin s rychlostí kyvů plošiny nastavenou na 5.

Před ukončením práce v daný den byl ještě připraven 1x vysokoteplotní promývací pufr přidáním 50 ml 10x koncentrovaného zásobního roztoku ke 450 ml vody bez RNáz. Teplota zahřívacího bloku naplněného 500 ml 1x vysokoteplotního promývacího pufru byla nastavena na 55°C , víko bylo zavřeno a ponecháno hřát přes noc.

Další den byl připraven promývací roztok E1BC přidáním 3 ml E1BC pufru do 1 l vody bez RNáz. Na laboratorní teplotu byl předeřhát blokovací pufr E1 (4 ml/čip). Bylo připraveno odpovídající množství blokovacího pufru E1 (2 ml/čip) se streptavidin-Cy3 (2 μ l zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml na jeden chip). Byla použita jedna kónická zkumavka pro všechny aktuálně zpracovávané čipy a před detekcí byl tento roztok uchováván v temnu.

Z hybridizační pece byla vyndána *Hyb Chamber* a rozebrána. Čipy byly ponořeny do 250 ml promývacího roztoku E1BC a byla z nich opatrně oddělena krycí folie. Rozebrání a umístění v E1BC promývacím roztoku bylo opakováno pro všechny aktuálně zpracovávané čipy. Čipy byly následně umístěny do držáku, který byl za rukojeť přemístěn do *Hybex Waterbath Insert* obsahujícího 1x vysokoteplotní promývací pufr přes noc předeřhátý na 55°C . Se zavřeným víkem byly čipy bez třepání inkubovány 10 min. Během této inkubace bylo připraveno 250 ml promývacího roztoku E1BC v čisté barvicí nádobě. Ihned po

10 min inkubaci s vysokoteplotním promývacím pufrem byl držák s čipy přesunut do připraveného čerstvého promývacího roztoku E1BC. Držák krátce a intenzivně v nádobě protřepán pohybem nahoru a dolů, poté na 5 min umístěn na rotační třepačku na maximální rychlost, při které nedocházelo k vyšplíchnutí roztoku z nádoby (120 rpm).

Držák byl přemístěn do čisté barvicí nádoby s 250 ml 100 % etanolu. Krátce a důsledně pomocí rukojeti držáku byly čipy proprány a poté 10 min třepány na orbitální třepačce při maximální rychlosti. Čipy byly přemístěny do čisté barvicí nádoby s 250 ml promývacího roztoku E1BC, krátce a intenzivně promíchány a třepány na orbitální třepačce po dobu 2 min.

Čipy byly přemístěny do připravených *Wash Tray* se 4 ml blokovacího pufru E1, dány na výkyvnou desku (analyzovaná plocha se vzorky musí vždy směřovat nahoru) a kývány na střední rychlost po dobu 10 min.

Čipy byly přendány do čisté *Wash Tray* se 2 ml blokovacího pufru E1 se streptavidin-Cy3, přikryty víkem a kývány na střední rychlost dalších 10 min.

Čipy byly přesunuty do připravené čisté barvicí nádoby s 250 ml promývacího roztoku E1BC, krátce proprány a poté 5 min rotačně třepány při laboratorní teplotě. Čipy v držáku byly přesunuty do centrifugy s rotorem na mikrodestičky a centrifugovány při laboratorní teplotě na 270 g po dobu 4 min. Usušené čipy byly ihned skenovány pomocí *Illumina*[®] *BeadArray Readeru* na skenovací faktor 1,0 a 1,5 a získaná data jsou uchovávána na DVD a webovém úložišti dat.

4.4 PCR

Výsledky získané prostřednictvím čipových technologií, které by mohly být využity v diagnostice nebo jako možné cíle pro další výzkum, musí být nezávisle ověřeny jinou standardní metodou. Takovou metodou je např. kvantitativní Real-Time PCR.

Metodu PCR (*polymerase chain reaction*, polymerázové řetězové reakce) objevil roku 1983 Kary B. Mullis, který za svůj objev dostal o deset let později Nobelovu cenu za chemii. PCR umožňuje získat *in vitro* požadovanou sekvenci DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech. Princip metody je založen na replikaci nukleové kyseliny, cyklic-

ky se opakující enzymovou syntézou nových řetězců vybraných úseků dsDNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy.

Během reakce dochází k denaturaci, tedy disociaci fragmentů dsDNA na jednotlivé řetězce. Řetězce jsou k sobě poutány pomocí vodíkových můstků, které při dodání energie zanikají. Energie se dodá zahřátím na 92 - 95°C. Dalším krokem je nasedání primerů (tzv. *annealing*). Správné navázání primerů je určujícím krokem celé reakce. Po navázání primerů, což jsou krátké oligonukleotidy specifické komplementární sekvence, následuje syntéza nových řetězců navazujících na 3' konce primerů. Tyto tři kroky se cyklicky opakují až do doby, kdy dojdou reakční komponenty či je množství produktu dostačující pro požadované analýzy.

S přibývajícím výsledky z čipové analýzy se mění spektrum genů, které je třeba ověřit metodou PCR. Na základě pokračujících analýz a dalších výsledků jsme provedli PCR pro geny uvedené v Tab. 6.

Tab. 6 Vybrané geny pro RT-PCR

Symbol	MIM ID	Název	lokalizace
FOS	164810	V-FOS FBJ Murine osteosarcoma viral oncogene	14q24.3
VNN3	606592	Vanin 3	6q23-q24
IL18RAP	604509	IL-18 receptor accessory protein	2q12
ADORA 3	600445	Adenosine A3 receptor	1p21-p23
ERLIN 1	611604	Endoplasmatic reticulum lipid RAFT-associated protein 1	10q21-q22
IL18R1	604494	Interleukin 18 receptor 1	2q12
ARG 1	608313	Arginase 1	6q23
SPATC 1	610874	Spermatogenesis- and centriole-associated 1	8q24
HPRT	308000	Hypoxanthine Guanine Phosphorybosyl transferasa 1	Xq26-27.2
18S rRNA	102630		

4.4.1 Reverzní transkripce (RT)

Protože po izolaci z plné krve máme k dispozici celkovou RNA, musel reakci PCR předcházet krok reverzní transkripce. Tedy přepsání celkové RNA do cDNA. Pro reverzní transkripci byl použit *QuantiTect Rev. Transcription Kit* od firmy Qiagen.

Pracovní protokol:

Protokol byl určen pro přepis 10 pg až 1 µg. Naše vzorky byly naředěny na 100 ng/12 µl. Ke vzorkům byly přidány 2 µl gDNA wipeout pufru, 7x. Následovala inkubace 2 minuty při 42°C a pak byly vzorky dány na led.

Ke vzorkům ve 14 µl bylo přidáno vždy 6 µl master mixu (viz Tab. 7). Vzorky byly inkubovány 15 minut při 42°C, následně 3 min při 95°C a pak byly ponechány při 4°C.

Poté byly připraveny alikvoty, které byly použity do RT-PCR. Finální objem jedné PCR reakce byl 5 µl, z čehož vzorek cDNA tvořil 2,3 µl. Jelikož do reakce nemá jít více než 1/10 objemu reakce, proto bylo dáváno 0,5 µl vzorku po reverzní transkripci. Vzorek byl tedy doplněn 1,8 µl vody na požadovaný objem.

Tab. 7 Složení master mixu pro RT

Komponenta	V (µl)
reverzní transkriptáza	1
RT buffer, 5x	4
RT primer mix	1
suma	6

Tab. 8 Vybrané vzorky pro verifikační analýzu

ID	typ	Datum izolace	RIN	28/18S	c (ng/µl)	V (µl)	výtěžek (ng)
C305	AIM	14.7.2010	7,9	0,8	214,15	10	2141,5
C307	AIM	23.6.2010	8,2	1	315,22	9,5	2994,59
C236	AIM	12.7.2010	8,4	0,8	215,91	10	2159,1
C292	AIM 6M	19.5.2010	7,5	0,8	217,2	9,5	2063,4
C296	AIM 6M	12.7.2010	7,9	0,9	298,97	10	2989,7
C242	kontrola	19.5.2010	7,9	0,9	256,55	9	2308,95
C335	kontrola	20.5.2010	8	1	252,46	9	2272,14
C140	kontrola	14.7.2010	8	0,7	201,92	10	2019,2
C297	kontrola	14.7.2010	8,6	0,8	264,94	10	2649,4
C141	kontrola	13.7.2010	7,6	0,7	187,47	10	1847,7

4.4.2 Real Time PCR

Real Time PCR je metoda založena na klasickém principu PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat množství amplifikované DNA během každého cyklu. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství syntetizované nukleové kyseliny. Data jsou sbírána během celé reakce pomocí speciálních „termocyklerů“ s optikou umožňující excitaci substrátů a následnou detekci fluorescence v každé jamce.

Používané substráty lze rozdělit do dvou skupin:

1. nespecifické - nespecificky se vážou na dvouvláknovou DNA - typicky SYBR Green
2. specifické (sondy) - ve své struktuře mají oligonukleotidový řetězec, kterým se hybridizují k PCR amplikonu. Pracují na principu FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) mezi fluorescenčním barvivem (fluorofor - F nebo R) a zhasičem (quencher - Q) nebo nedochází ke štěpení a probe svítí po hybridizaci. Nárůst fluorescenční aktivity u FRET je způsoben zvýšením vzdálenosti mezi molekulou R a Q po rozštěpení navázané sondy polymerázou (VanGuilder *et al.*, 2008).

My jsme při naší práci použili specifické próby firmy Roche, jejichž seznam je uveden v Tab. 9.

Pro reakci bylo vybráno sedm genů, u kterých měla být ověřena úroveň exprese. Jeden vybraný gen, u něhož nebyla hladina genové exprese při čipové analýze ani zvýšena ani snížena (SPATC 1) a dva další tzv. „housekeeping“ geny pro možnost výpočtu relativní exprese.

Pro každý gen musely být navrženy primery. K tomuto účelu jsme využili software dostupný na stránkách firmy Roche Applied Science s.r.o., na kterých je možnost si primery pro systém *Lightcycler 480* navrhnout a hned se u nich zobrazí i potřebná sonda. Návrh primerů tímto softwarem je optimalizován na teplotu vhodnou pro používaný systém sond. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tab. 9.

Obdržené primery byly podle přiložených informací naředěny na dané koncentrace zásobních roztoků, ze kterých se pak dále ředily pracovní roztoky.

Tab. 9 Primery a sondy pro vybrané geny

Gen	Sonda #	Amplikon	Levý primer	Pravý primer	kat. č.
FOS	67	72 nt	ctaccactca- cccgcagact	aggtccgtg- cagaagtctt	4688660001
VNN3	80	94 nt	ggagtgaact- ggattccatgtag	tgtgttgccga- atctaattcaa	4689038001
IL18RAP	9	128 nt	tgggctct- caattccttctg	gccttgagta- tccccttcat	4685075001
ADORA 3	42	147 nt	aagaggac- acgggctggta	tggttttgtg- cctgataggt	4688015001
ERLIN 1	50	76 nt	cacacaaata- tgccacctcaa	gcaatggc- ctggtactttt	4688112001
IL18R1	86	68 nt	tcttgacca- aagcttaacca	aagcagagc- agttgagcctta	4689119001
ARG 1	64	76 nt	caaggtggcaga- agtcaagaa	gcttccaatt- gccaaactgt	4688635001
SPATC 1	3	73 nt	ttcctcacgc- cagaacaat	tcttcgagg- actcgttcgtt	4685008001
HPRT	73	102 nt	tgaccttgatt- tattttgcatacc	cgagcaaga- cgttcagtctt	4688961001
18S rRNA	74	70 nt	ggagaggga- gcctgagaaac	tcgggagtg- ggttaattgc	4688970001

Pro každý gen byl připraven roztok, který obsahoval oba potřebné primery, tedy přímý i zpětný primer, kdy každý měl koncentraci 20 μ M.

Pár primerů – 20 μ M každý: přední: 4 μ l
 zpětný: 4 μ l
 H₂O: 12 μ l

Následně byl připraven roztok, který se již pipetoval ke vzorkům a obsahoval oba primery, sondu, a master mix (viz Tab. 10).

Tab. 10 Reakční objemy PCR reakce

Reagencie	koncentrace	V μ l/ 1 reakce	V μ l na 36 reakcí
Primer pair	20 μ M	0,1	3,6
UPL Probe	10 μ M	0,1	3,6
UPL probes master	2 x	2,5	90
Σ		2,7	97,2

Do 384 jamkové destičky pak byly pipetovány vzorky a reakční roztok podle návrhu destičky (viz Příloha 1).

Po napipetování všech reagentů byla destička zalepena fólií, krátce stočena, aby se všechna kapalina dostala na dno jamek a byla vložena do *Lightcycleru 480*. Následně byl spuštěn program (viz Tab. 11).

Tab. 11 Program LightCycler 480, Roche Applied Science

Typ analýzy	Počet cyklů	Segment	Rychlost nárůstu °C/s	Cílová tep.	Čas
žádný	1	-	4,8	95°C	10 min
kvantifikační	60	denaturace	4,8	95°C	10 s
		nasedání	2,5	59°C	30 s
		prodlužování	4,8	72°C	1 s
žádný	1		2,5	40°C	30 s

Po skončení programu RT-PCR jsme dostali výsledky jako *Ct* hodnotu, tedy počet cyklů, ve kterých fluorescence dosáhne prahové hodnoty.

5 Výsledky

5.1 Výsledky čipové analýzy

Krevní vzorky jsme získávali z Městské nemocnice Čáslav v letech 2006 - 2010 či z kardiologické kliniky v Pardubicích, které zabezpečovaly náběry krevních vzorků od pacientů. Do genetického vyšetření pacientů s akutním infarktem myokardu byli zařazováni nemocní, kteří byli přijati či ambulantně ošetřeni pro diagnózu AIM.

Infarkt byl diagnostikován na základě anamnestických údajů, EKG křivky a laboratorního průkazu nekrózy myokardu. AIM byl definován jako bolest na hrudi nebo její ekvivalent trvající alespoň 10 minut v posledních 24-ti hodinách s elevací úseku ST na EKG křivce (STEMI), či bez elevací ST (NONSTEMI).

Biochemický průkaz nekrózy byl stanovován vyšetřením troponinu I. Jako pozitivní hodnotu troponinu I bylo považováno překročení horního limitu fyziologické hodnoty tj. 0,03 µg/l.

Jako pomocná diagnostická metoda byla používána echokardiografie k průkazu regionální poruchy kinetiky levé komory v povodí „infarktové“ tepny.

Jako standardní panel vyšetření pacientů s podezřením na AIM byl vyšetřován troponin I okamžitě při přijetí a dále ve 4 - 6 hodinových intervalech v prvních 24 hodinách, dále AST, ALT, KO, koagulace (QT, APTT), glykémie, iontogram, urea, kyselina močová, lipidogram, CRP, u diabetiků HBA1c. Vyšetření CK a CK-MB mass a LD bylo prováděno nepravidelně dle uvážení lékaře.

Vstupním kritériem pro zařazení do studie byl věk do 80 let a hospitalizace ve výše zmíněném nemocničním zařízení s diagnózou primárního výskytu akutního infarktu myokardu.

Vzorky byly odebírány pacientům s infarktem myokardu v akutní fázi onemocnění, kontrolní náběr se uskutečňoval po 6 měsících od příhody. Ke každému pacientovi byla přiřazena adekvátní kontrola na základě stanovených kritérií, kterými jsou věk (věk kontroly vyšší než u pacienta maximálně o 5 let), pohlaví, status diabetes mellitus a kouření. U pacientů s mozkovou mrtvicí byl vzorek krve odebrán pouze v akutní fázi, kontrola po 6 měsících už odebírána nebyla. Pro každého pacienta jsou vedeny záznamy i o dalších sig-

nifikantních klinických údajích. U každého vzorku jsou dále zaznamenány data o předání vzorku, izolaci, amplifikaci, hybridizaci.

V rámci mé práce, která je podporována Centrem biomedicínské informatiky projektem 1M06014 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR jsem až po čipovou analýzu zpracovala 172 vzorků, které jsou uvedeny v kapitole Materiál a přístroje v Tab. 2.

Jelikož pro následnou amplifikaci, je třeba, aby izolovaná totRNA měla dostatečnou kvalitu, izolace byly často pro jednotlivé vzorky několikrát opakovány, aby bylo dosaženo co nejlepšího vstupního materiálu pro další kroky postupu. My jsme se u našich vzorků řídili poměrem absorbancí 260 nm ku 280 nm, který jsme dostali po přeměření koncentrace na Nanodropu a který po izolaci musel být větší než 1,8. Dále pak hodnotou *RNA Integrity Number* (RIN), která by měla být větší než 7,0 a poměrem ribozomálních podjednotek 28S/18S, který by měl být větší než 0,7. Tyto údaje jsme získali při měření kvality RNA vzorku na Bioanalyzeru 2100, Agilent Technologies.

Jelikož statistické vyhodnocování výsledků probíhá postupně a je časově a technicky náročné, je zde uvedena ucelená část dat, která poskytla zajímavé výsledky z prvních analýz ze čtyřiatřiceti vzorků uvedených v Tab. 3. Některé původní analýzy čipů verze 2 nám totiž neposkytly dostatečně významně diferenciatně exprimované geny mezi porovnávanými skupinami vzorků. Jednalo se například o porovnání náběrů akutních případů infarktu myokardu s přiřazenými kontrolami či s kontrolními náběry po šesti měsících. V případě přiřazených kontrol versus AIM byla otevřena otázka přílišné podobnosti těchto kontrolních pacientů. V případě AIM versus kontrolní náběry po šesti měsících vyvstala otázka míry akutnosti případů IM, čas mezi danou událostí a dostavením se do nemocničního zařízení, která je též evidována, a mírou stability geneticky predisponujícího obrazu genové exprese. V případě analýz CMP nebyly na čipech verze 2, až na jeden analyzovaný čip se třemi dvojicemi vzorků, shledány klinicky významné rozdíly v míře exprese jednotlivých genů. Zdá se, že svou roli zde hraje i šarže použitých čipů, která se bohužel i v rámci jedné objednávky liší a může hrát výraznou roli v rámci našich analýz.

V rámci analýzy vybrané skupiny 34 vzorků (Tab. 3) byly identifikovány geny, které se z hlediska genové exprese jeví jako prognostické ve smyslu očekávané doby přežití pacientů s primárním výskytem akutního infarktu myokardu. Jedná se o sestavu pěti genů, jejichž expresní intenzity se ve skupinách pacientů zemřelých v období 6 měsíců po primární srdeční příhodě (AIMD6) a pacientů přežívajících déle (AIM) statisticky a klinicky význam-

ně odlišovaly. Tato sada exprimovaných genů a genetických lokusů charakterizuje stupňovanou stresovou odpověď v organismu v období vzniku a bezprostředního rozvoje infarktu myokardu (období 0 - 24 hodin od události).

Tab. 12 a 13 shrnují procentuální podíly pacientů podle popisných charakteristik relevantních klinických a demografických údajů. Kompletní datový soubor obsahoval záznamy o 34 pacientech s primárním výskytem akutního infarktu myokardu, z toho 30 ve skupině AIM, 4 ve skupině AIMD6. V souboru bylo 23 mužů a 11 žen. Ve skupině AIM bylo 21 mužů a 9 žen, ve skupině AIMD6 byly 2 ženy a 2 muži. Ve skupině AIM bylo 9 osob s diagnózou diabetu mellitus typu 2 a 21 bez této diagnózy, zatímco ve skupině AIMD6 byly 2 osoby s touto diagnózou a 2 bez ní.

Tab. 12 Počty pacientů a procentuální vyjádření zastoupení popisných charakteristik kategorií veličin

Proměnná		Počty a procentuální údaje ve skupinách	
		AIM	AIMD6
Pohlaví	Muži	21 (70 %)	2 (50%)
	Ženy	9 (30 %)	2 (50%)
Kouření	Kuřáci	5 (17 %)	0 (0 %)
	Nekuřáci	25 (83 %)	4 (100 %)
Diabetes mellitus II. typu	ANO	9 (30 %)	2 (50 %)
	NE	21 (70 %)	2 (50 %)

Tab. 13 Popisné charakteristiky spojitých veličin

Skupina	Věk pacienta		
	N	Průměrná	Směrodatná odchylka
AIM	30	63,9	9,4
AIMD6	4	72,3	4,7

Samotnému zpracování dat předchází několik kroků předzpracování. Prvním z nich je kontrola kvality, která se provádí metodou analýzy hlavních komponent (*principal component analysis* - PCA) nebo klasickou explorativní analýzou.

Šum signálu na pozadí čipu, u kterého se předpokládá normální rozložení, byl odstraněn pomocí konvolučního modelu. Tento model předpokládá, že signál z čipů čtený pomocí skeneru je směsí normálně rozděleného šumu a exponenciálně rozděleného signálu intenzit genové exprese (Ritchie *et al.*, 2007).

Protože mnoho statistických testů předpokládá data s normálním rozdělením, je potřeba transformace dat. Navíc tato transformace usnadňuje vizuální prošetření dat – extrémně vysoké hodnoty by jinak neumožňovaly prošetřit nižší a častější intenzity. Existuje několik transformací, které mohou značně zredukovat nesouměrnosti, ale pro výhodnou interpretaci dat je používána ve většině případů \log_2 transformace. Tato transformace je definována jako $X \rightarrow \log_2(X)$.

Všechny laboratorní kroky provedení čipové analýzy od návrhu po vytvoření souboru nezpracovaných dat jsou zdrojem technického vlivu na nezpracovaná data: druh vzorků (čerstvě zmrazený nebo fixovaný formalínem, tkáňové nebo krevní vzorky), volba čipové sklička (cDNA, Affymetrix), DNA značení (typ fluorescenčních značek), hybridizace, skenování a software analýzy obrazu. Proto je nezbytné zkontrolovat, zda jsou nezpracovaná data ovlivněna nějakými náhodnými nebo systematickými chybami. Normalizace je skupina transformací, jejímž cílem je tyto odchylky eliminovat. Při normalizaci bychom měli mít na paměti, že zde není jen nechtěná technická variabilita, kterou se pokoušíme detekovat a eliminovat, ale je zde také biologická variabilita, kterou se pokoušíme odhalit, a ta by eliminována být neměla. Cílem normalizace je vyloučit z dat nechtěné efekty a docílit, aby data z různých čipů byla srovnatelná bez obav, že nalezené významnosti jsou dány technickou odchylkou.

Normalizace může být vykonána v rámci jednoho sklička (*within array level*) upravující technické odchylky uvnitř každého čipu, anebo mezi čipy (*between array level*) opravující distribuční rozdíly mezi různými čipy z našeho experimentu. Existují různé druhy technických odchylek, na odstranění každé z nich slouží speciální metody. Naše data byla normalizována pomocí kvantilové normalizace (Smyth a Speed, 2003). Kvantilová normalizace je založena na pořadí pozorování, takže neexistují žádné předpoklady na rozložení dat. Nejprve je normalizace založená na pořadí provedena na podskupině invariantních genů, a pak jsou lineární interpolací odhadovány zbývající intenzity spotů.

Dalším krokem je nespecifická filtrace, která je určena k vyhození neinformativních sond, tedy takových, které mají malou intenzitu a malou změnu v expresi.

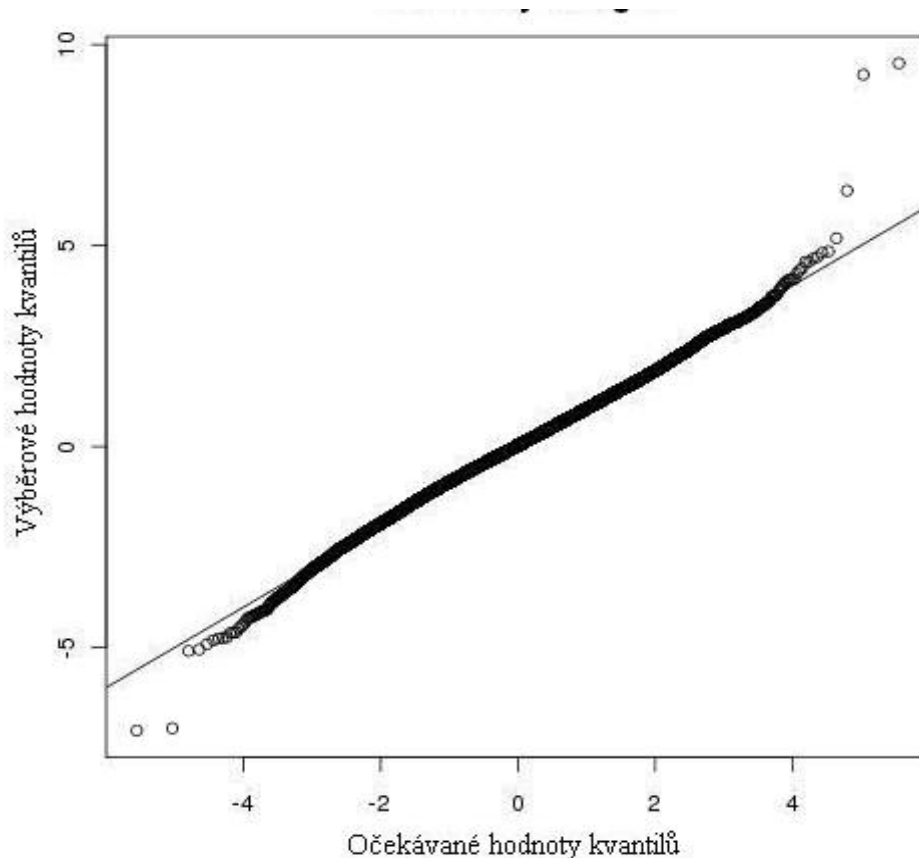
Data genové exprese byla analyzována pomocí lineárních modelů pro analýzu dat z *microarray* experimentů „limma“ (Smyth *et al.*, 2004), navržených pro systém R, což je jazyk a prostředí pro statistické výpočty a grafiku. R systém poskytuje širokou škálu statistických (lineární a nelineární modely, klasické testy, analýzy z časových řad, klastrování) a grafických technik (<http://www.r-project.org>) v rámci projektu Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>).

Medicínská hypotéza předpokládala možnost genetické determinace (predispozice) krátkodobé úmrtnosti (tj. úmrtnosti do 6 měsíců od okamžiku výskytu primární srdeční příhody) pacientů s primárním výskytem infarktu myokardu, a to nezávisle na ostatních klinických rizikových faktorech. Zajímal nás tedy kontrast genové exprese mezi skupinami pacientů AIM a AIMD6 (proměnná „skupina“), a to jak neadjustovaný, tak též po adjustaci vlivu výše zmíněných rizikových faktorů – „pohlaví“, „věku“, výskytu diabetu mellitus „DM“ a „kouření“.

Vzhledem k tomu, že o Illumina čípech je známo, že aktuální naměřené hodnoty intenzit genové exprese bývají na jednotlivých čípech plošně posunuty o neznámou konstantu, je tuto skutečnost nutné zohlednit v rámci statistické analýzy a odpovídající korekční konstanty je třeba odhadnout v lineárním modelu. Z tohoto důvodu také není vhodné uvažovat o korelacích mezi naměřenými hodnotami intenzit genové exprese a hodnotami klinických proměnných. Relevantní závěry proto nutně vycházejí pouze z výsledků obdržených z lineárního modelu.

Adjustovaný i neadjustovaný model zohledňoval vliv čipu na hodnoty logaritmovaných intenzit genové exprese. Intenzity genové exprese vstupují do lineárního modelu jako dvojkové logaritmy původních hodnot. Graf 1 ukazuje diagnostiku lineárního modelu pro data intenzit genové exprese logaritmovaná při základu 2. Ideální graf by měl shodné empirické a teoretické hodnoty kvantilů, takže všechny zobrazené hodnoty by ležely na přímce. Graf potvrzuje, že použití lineárního modelu je adekvátní. Oba modely tedy můžeme schematicky popsat následovně:

1. neadjustovaný model: $\log_2(\text{intenzity}) \sim \text{čip} + \text{skupina}$
2. adjustovaný model: $\log_2(\text{intenzity}) \sim \text{čip} + \text{pohlaví} + \text{věk} + \text{dm} + \text{kouření} + \text{skupina}$



Graf 1 Kvantilový Q-Q graf. Na osu x byly vyneseny teoretické (očekávané) kvantily normálního rozdělení, na osu y výběrové kvantily konstruované přímo z dat. U ideálního grafu by byly shodné teoretické a empirické hodnoty kvantilů, tedy by všechny zobrazené hodnoty ležely na přímce.

Statistická analýza prokázala statisticky významnou asociaci mezi krátkodobou úmrtností subjektů (v horizontu 6 měsíců po primární akutní srdeční příhodě) a jejich expresním genovým profilem u 2 genů na základě neadjustovaného modelu (viz Tab. 14) a u 5 genů na základě adjustovaného modelu (viz Tab. 15).

Za diferenciálně exprimované byly považovány geny, které splňovaly jak podmínku statistické významnosti na hladině 5 %, tak též klinické významnosti, která předpokládá hodnotu fold-change (FC) alespoň 2 v absolutní hodnotě. FC je poměr naměřených hodnot experimentálních vzorků ku hodnotám kontrolních vzorků. Na základě tohoto kritéria byly identifikovány dva geny uvedené v Tab. 14. Dosažené výsledky naznačují, že pravděpodobnost diferenciální exprese je u těchto dvou genů 98 %, resp. 96 %.

Adjustovaný model navíc zohledňoval vliv známých klinických rizikových faktorů, které souvisí s výskytem infarktu myokardu a které byly vybrány jako parametry, na jejichž

základě byl prováděn výběr párových kontrol. Výsledky této analýzy jsou shrnuty v Tab. 15.

Tab. 14 Výsledky analýzy genové exprese na základě neadjustovaného LIMMA modelu ve statistické systému R/Bioconductor

Illumina ID	Log-FC	Průměrná exprese	t-stat.	p-hodnota	BH adjust. p-hodnota (q-hodnota)	Pravděpod. diferenciální exprese	Název / Lokus genu
3420112	4,0155	5,5758	10,593	4,8179 e-10	1,6223 e-05	0,98	TCRA
7150370	3,3618	5,1390	9,106	7,2134 e-09	1,2145 e-04	0,96	LOC65 0751

Illumina ID - Illumina identifikátor genu

Log-FC - dvojkový logaritmus podílu intenzit ve skupinách AIMD6 a AIM

Průměrná exprese - průměrná hodnota intenzit genové exprese ve spojeném souboru

BH adjustovaná p-hodnota - Benjamini-Hochbergova adjustace dosažené hladiny významnosti pro mnohonásobná porovnávání (Benjamini *et al.*, 2005)

Pravděpod. diferenciální exprese - pravděpodobnost, že sledovaný gen je skutečně diferenciálně exprimován

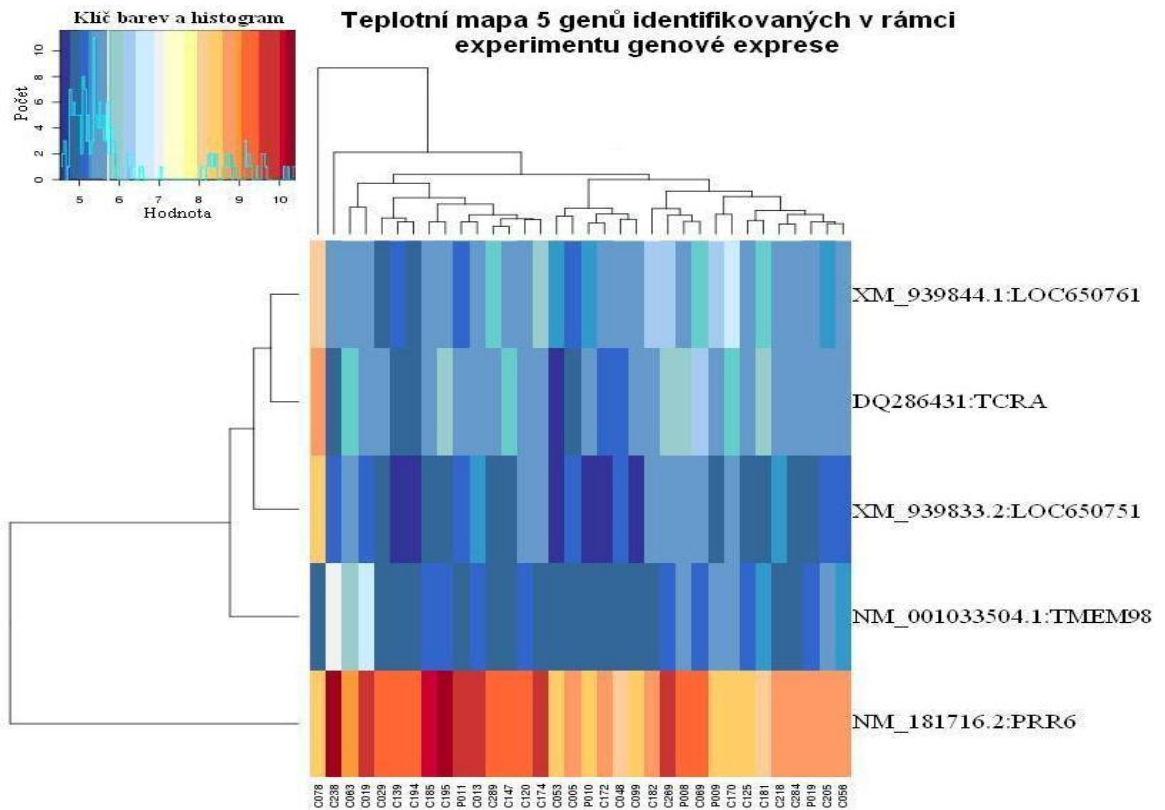
Tab. 15 Výsledky analýzy genové exprese na základě adjustovaného LIMMA modelu ve statistickém systému R/Bioconductor

Illumina ID	Log-FC	Průměrná exprese	t-stat.	p-hodnota	BH adjust. p-hodnota (q-hodnota)	Pravděpod. diferenciální exprese	Název/ Lokus genu
3420112	4,0116	5,5758	9,537	2,0514 e-08	0,00054436	0,95	TCRA
7150370	3,3302	5,1390	9,251	3,2333 e-08	0,00054436	0,94	LOC65 0751
2750435	2,9070	5,6414	6,367	5,6727 e-06	0,03820238	0,72	LOC65 0761
2750431	-2,1157	9,0074	-7,012	1,6234 e-06	0,01366580	0,81	PPR6
70370	-2,0306	5,1537	-7,069	1,4558 e-06	0,01366580	0,82	TMEM 98

Průměrné (nelogaritmované) hodnoty genové exprese v populacích AIM a AIMD6 jsou uvedeny v Tab. 16. Zvýšené hodnoty intenzit genové exprese u prvních tří genů uvedených v Tab. 15 a 16 (TCRA, LOC650751 a LOC650761) a naopak hodnoty nižší u zbývajících dvou genů (PPR6 a TMEM98) indikují zvýšené riziko úmrtí v souvislosti s kardiovaskulárními příčinami.

Tab. 16 Průměrné (nelogaritmované) hodnoty genové exprese v populacích AIM a AIMD6

Populace	Geny					
	Název genu	TCRA	LOC650751	LOC650761	PRR6	TMEM98
	Gen „accession number“	DQ286431	XM_939833.2	XM_939844.1	NM_181716.2	NM_001033504.1
	Illumina ID	3420112	7150370	2750435	2750431	70370
Průměrné hodnoty genové exprese						
AIM		47,3	34,2	50,4	592,5	39,7
AIMD6		133,9	105,3	100,5	360,5	29,6



Obr. 9 Teplotní mapa pěti identifikovaných genů, ze které lze odečítat hodnoty intenzit daných genů u vzorků.

Na Obr. 9 je teplotní mapa spolu s klastrováním, která znázorňuje u jednotlivých pacientů (vzorků) graficky (barevně) hodnoty intenzit genové exprese u 5 vybraných genů. Podle barevného klíče lze odečíst intenzitu daného genu pro daný vzorek. Pacienti jsou zde

rozlišení dle skupin, tedy AIM a AIMD6. Klastrování je určeno k nalezení shluků dat s vysokým stupněm vzájemné podobnosti. Nejvyšší intenzity (červená škála) jsou vidět u nejvíce exprimovaného genu pro PRR6.

5.2 Výsledky RT-PCR

Tab. 17 Výsledky RT- PCR

Pozice	Vzorek/gen	Ct	Pozice	Vzorek/gen	Ct
A1	C305, IL18RAP	30,55	G23	C335, SPATC1	35,47
A2	C305, IL18RAP	30,80	G24	C335, SPATC1	33,08
A3	C305, IL18RAP	30,31	H1	C140, IL18RAP	30,46
A4	C305, IL18R1	29,70	H2	C140, IL18RAP	30,67
A5	C305, IL18R1	28,48	H3	C140, IL18RAP	30,50
A6	C305, IL18R1	28,85	H4	C140, IL18R1	29,32
A7	C305, ADORA3	33,70	H5	C140, IL18R1	29,14
A8	C305, ADORA3	33,32	H6	C140, IL18R1	29,70
A9	C305, ADORA3	33,21	H7	C140, ADORA3	34,01
A10	C305, ERLIN1	29,64	H8	C140, ADORA3	33,91
A11	C305, ERLIN1	30,23	H9	C140, ADORA3	33,70
A12	C305, ERLIN1	29,64	H10	C140, ERLIN1	30,15
A13	C305, VNN3	28,30	H11	C140, ERLIN1	30,52
A14	C305, VNN3	28,60	H12	C140, ERLIN1	30,33
A15	C305, VNN3	28,30	H13	C140, VNN3	29,00
A16	C305, ARG1	29,10	H14	C140, VNN3	29,20
A17	C305, ARG	29,21	H15	C140, VNN3	29,17
A18	C305, ARG2	29,48	H16	C140, ARG1	29,30
A19	C305, FOS	28,75	H17	C140, ARG1	29,60
A20	C305, FOS	28,60	H18	C140, ARG1	29,58
A21	C305, FOS	28,62	H19	C140, FOS	28,49
A22	C305, neg.kontrola, SPATC1	35,38	H20	C140, FOS	28,58
A23	C305, neg.kontrola, SPATC1	34,08	H21	C140, FOS	28,57
A24	C305, neg.kontrola, SPATC1	34,12	H22	C140, SPATC1	32,71
B1	C307, IL18RAP	30,49	H23	C140, SPATC1	33,47
B2	C307, IL18RAP	30,43	H24	C140, SPATC1	32,83
B3	C307, IL18RAP	30,49	I1	C297, IL18RAP	30,69
B4	C307, IL18R1	30,10	I2	C297, IL18RAP	30,78
B5	C307, IL18R1	30,10	I3	C297, IL18RAP	30,98
B6	C307, IL18R1	30,10	I4	C297, IL18R1	28,40
B7	C307, ADORA3	35,27	I5	C297, IL18R1	28,14

Pozice	Vzorek/gen	Ct	Pozice	Vzorek/gen	Ct
B8	C307, ADORA3	34,24	I6	C297, IL18R1	28,50
B9	C307, ADORA3	35,31	I7	C297, ADORA3	33,60
B10	C307, ERLIN1	30,27	I8	C297, ADORA3	33,71
B11	C307, ERLIN1	30,48	I9	C297, ADORA3	33,26
B12	C307, ERLIN1	30,31	I10	C297, ERLIN1	30,82
B13	C307, VNN3	29,16	I11	C297, ERLIN1	30,79
B14	C307, VNN3	29,60	I12	C297, ERLIN1	31,11
B15	C307, VNN3	29,30	I13	C297, VNN3	29,26
B16	C307, ARG1	30,60	I14	C297, VNN3	29,63
B17	C307, ARG1	31,11	I15	C297, VNN3	29,58
B18	C307, ARG1	30,51	I16	C297, ARG1	27,87
B19	C307, FOS	28,37	I17	C297, ARG1	27,81
B20	C307, FOS	28,41	I18	C297, ARG1	27,98
B21	C307, FOS	28,67	I19	C297, FOS	29,23
B22	C307, SPATC1	33,49	I20	C297, FOS	29,80
B23	C307, SPATC1	35,17	I21	C297, FOS	28,90
B24	C307, SPATC1	33,30	I22	C297, SPATC1	32,26
C1	C236, IL18RAP	30,85	I23	C297, SPATC1	33,59
C2	C236, IL18RAP	31,12	I24	C297, SPATC1	33,07
C3	C236, IL18RAP	30,97	J1	C141, IL18RAP	31,85
C4	C236, IL18R1	31,50	J2	C141, IL18RAP	30,65
C5	C236, IL18R1	30,97	J3	C141, IL18RAP	31,09
C6	C236, IL18R1	31,24	J4	C141, IL18R1	30,77
C7	C236, ADORA3	34,69	J5	C141, IL18R1	30,54
C8	C236, ADORA3	35,12	J6	C141, IL18R1	31,24
C9	C236, ADORA3	35,76	J7	C141, ADORA3	36,63
C10	C236, ERLIN1	30,97	J8	C141, ADORA3	36,16
C11	C236, ERLIN1	31,30	J9	C141, ADORA3	34,63
C12	C236, ERLIN1	31,12	J10	C141, ERLIN1	31,90
C13	C236, VNN3	29,89	J11	C141, ERLIN1	31,56
C14	C236, VNN3	29,53	J12	C141, ERLIN1	31,62
C15	C236, VNN3	29,81	J13	C141, VNN3	29,60
C16	C236, ARG1	31,90	J14	C141, VNN3	29,26
C17	C236, ARG1	32,45	J15	C141, VNN3	29,19
C18	C236, ARG1	32,03	J16	C141, ARG1	30,36
C19	C236, FOS	30,60	J17	C141, ARG1	30,12
C20	C236, FOS	30,12	J18	C141, ARG1	30,53
C21	C236, FOS	30,37	J19	C141, FOS	29,53
C22	C236, SPATC1	0	J20	C141, FOS	29,34
C23	C236, SPATC1	35,58	J21	C141, FOS	29,46
C24	C236, SPATC1	35,57	J22	C141, SPATC1	34,05

Pozice	Vzorek/gen	Ct	Pozice	Vzorek/gen	Ct
D1	C292, IL18RAP	31,61	J23	C141, SPATC1	34,00
D2	C292, IL18RAP	31,89	J24	C141, SPATC1	33,03
D3	C292, IL18RAP	31,94	K1	C305, HPRT	30,47
D4	C292, IL18R1	31,72	K2	C305, HPRT	30,35
D5	C292, IL18R1	31,51	K3	C305, HPRT	30,55
D6	C292, IL18R1	31,50	K4	C305, 18SrRNA	13,92
D7	C292, ADORA3	35,23	K5	C305, 18SrRNA	13,72
D8	C292, ADORA3	36,21	K6	C305, 18SrRNA	13,70
D9	C292, ADORA3	36,06	K7		
D10	C292, ERLIN1	31,68	K8	C242, HPRT	29,85
D11	C292, ERLIN1	31,67	K9	C242, HPRT	29,78
D12	C292, ERLIN1	31,88	K10	C242, HPRT	29,87
D13	C292, VNN3	30,10	K11	C242, 18SrRNA	13,11
D14	C292, VNN3	29,75	K12	C242, 18SrRNA	13,30
D15	C292, VNN3	29,98	K13	C242, 18SrRNA	13,00
D16	C292, ARG1	30,00	K16	voda, IL18RAP	0
D17	C292, ARG1	30,13	K17	voda, IL18RAP	0
D18	C292, ARG1	30,15	K18	voda, IL18RAP	0
D19	C292, FOS	29,77	K20	voda, ARG1	0
D20	C292, FOS	29,76	K21	voda, ARG1	0
D21	C292, FOS	29,75	K22	voda, ARG1	0
D22	C292, SPATC1	33,85	L1	C307, HPRT	29,76
D23	C292, SPATC1	33,59	L2	C307, HPRT	30,90
D24	C292, SPATC1	34,56	L3	C307, HPRT	29,53
E1	C296, IL18RAP	31,00	L4	C307, 18SrRNA	15,26
E2	C296, IL18RAP	31,23	L5	C307, 18SrRNA	15,14
E3	C296, IL18RAP	31,11	L6	C307, 18SrRNA	15,14
E4	C296, 8618R1	31,73	L8	C335, HPRT	29,71
E5	C296, 8618R1	30,71	L9	C335, HPRT	29,71
E6	C296, 8618R1	31,64	L10	C335, HPRT	29,62
E7	C296, ADORA3	37,05	L11	C335, 18SrRNA	15,20
E8	C296, ADORA3	36,55	L12	C335, 18SrRNA	14,96
E9	C296, ADORA3	37,09	L13	C335, 18SrRNA	14,99
E10	C296, ERLIN1	30,45	L16	voda, IL18R1	0
E11	C296, ERLIN1	31,68	L17	voda, IL18R1	0
E12	C296, ERLIN1	30,84	L18	voda, IL18R1	0
E13	C296, VNN3	29,70	L20	voda, FOS	0
E14	C296, VNN3	30,00	L21	voda, FOS	0
E15	C296, VNN3	29,48	L22	voda, FOS	0
E16	C296, ARG1	32,52	M1	C236, HPRT	29,89
E17	C296, ARG1	33,07	M2	C236, HPRT	29,81

Pozice	Vzorek/gen	Ct	Pozice	Vzorek/gen	Ct
E18	C296, ARG1	33,32	M3	C236, HPRT	30,50
E19	V296, FOS	30,80	M4	C236, 18SrRNA	14,73
E20	V296, FOS	30,80	M5	C236, 18SrRNA	14,64
E21	V296, FOS	30,18	M6	C236, 18SrRNA	14,55
E22	C296, SPATC1	35,61	M8	C140, HPRT	29,60
E23	C296, SPATC1	35,63	M9	C140, HPRT	29,65
E24	C296, SPATC1	0	M10	C140, HPRT	29,49
F1	C242, IL18RAP	31,60	M11	C140, 18SrRNA	14,20
F2	C242, IL18RAP	31,22	M12	C140, 18SrRNA	14,40
F3	C242, IL18RAP	31,29	M13	C140, 18SrRNA	13,99
F4	C242, IL18R1	30,87	M16	voda, ADORA3	0
F5	C242, IL18R1	30,74	M17	voda, ADORA3	0
F6	C242, IL18R1	30,69	M18	voda, ADORA3	0
F7	C242, ADORA3	36,37	M20	voda, SPATC1	0
F8	C242, ADORA3	36,49	M21	voda, SPATC1	0
F9	C242, ADORA3	35,65	M22	voda, SPATC1	0
F10	C242, ERLIN1	31,31	N1	C292, HPRT	30,80
F11	C242, ERLIN1	31,70	N2	C292, HPRT	30,51
F12	C242, ERLIN1	31,38	N3	C292, HPRT	30,36
F13	C242, VNN3	30,90	N4	C292, 18SrRNA	13,28
F14	C242, VNN3	30,19	N5	C292, 18SrRNA	13,29
F15	C242, VNN3	30,11	N6	C292, 18SrRNA	13,24
F16	C242, ARG1	30,46	N8	297, HPRT	31,56
F17	C242, ARG1	30,64	N9	297, HPRT	31,27
F18	C242, ARG1	30,60	N10	297, HPRT	31,48
F19	C242, FOS	29,69	N11	C297, 18SrRNA	13,24
F20	C242, FOS	29,92	N12	C297, 18SrRNA	13,23
F21	C242, FOS	29,92	N13	C297, 18SrRNA	13,70
F22	C242, SPATC1	33,79	N16	voda, ERLIN1	0
F23	C242, SPATC1	0	N17	voda, ERLIN1	0
F24	C242, SPATC1	33,95	N18	voda, ERLIN1	0
G1	C335, IL18RAP	30,10	N20	voda, HPRT	0
G2	C335, IL18RAP	30,98	N21	voda, HPRT	0
G3	C335, IL18RAP	31,25	N22	voda, HPRT	0
G4	C335, IL18R1	30,65	O1	C296, HPRT	30,60
G5	C335, IL18R1	30,57	O2	C296, HPRT	29,99
G6	C335, IL18R1	30,44	O3	C296, HPRT	30,15
G7	C335, ADORA3	32,19	O4	C296, 18SrRNA	13,58
G8	C335, ADORA3	32,35	O5	C296, 18SrRNA	13,60
G9	C335, ADORA3	32,96	O6	C296, 18SrRNA	13,64
G10	C335, ERLIN1	30,58	O8	C141, HPRT	30,50

Pozice	Vzorek/gen	Ct	Pozice	Vzorek/gen	Ct
G11	C335, ERLIN1	30,30	O9	C141, HPRT	29,91
G12	C335, ERLIN1	30,75	O10	C141, HPRT	30,19
G13	C335, VNN3	29,12	O11	C141, 18SrRNA	14,33
G14	C335, VNN3	29,21	O12	C141, 18SrRNA	14,22
G15	C335, VNN3	29,20	O13	C141, 18SrRNA	14,41
G16	C335, ARG1	31,80	O16	voda, VNN3	0
G17	C335, ARG1	31,46	O17	voda, VNN3	0
G18	C335, ARG1	31,09	O18	voda, VNN3	0
G19	C335, FOS	29,17	O20	voda, 18SrRNA	33,98
G20	C335, FOS	29,50	O21	voda, 18SrRNA	34,88
G21	C335, FOS	29,36	O22	voda, 18SrRNA	33,24
G22	C335, SPATC1	35,22			

Pro každý gen byla spočítaná relativní exprese a sestaven graf na porovnání relativní exprese u vzorků pacientů s AIM a u kontrol. Grafy jsou uvedeny v Příloze 2. Vzorek C297 (kontrola) byl vyřazen z konečného vyhodnocení, jednalo se o odlehle hodnoty, protože jeho hodnoty se příliš lišily od ostatních kontrol. Tyto hodnoty jsou proto ve výsledcích označeny červeně. Tab. 18 až 25 obsahují výpočet relativní exprese pro dané geny, popis použitých zkratk uvedený u Tab. 18 platí i pro ostatní tabulky.

Tab. 18 Výpočet relativní exprese genu IL18RAP

ID	KONT		ID	TEST		ΔCt		KONT		TEST		Poměr $2^{-\Delta\Delta Ct}$
	HG	G(IL18RAP)		HG	G	KONT	TEST	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
C242	29,83	31,11	C305	30,52	30,54	1,28	0,02	0	1	-1,26	2,39	2,30
C335	29,68	31,37	C307	30,06	30,47	1,69	0,41	0,41	0,75	-0,87	1,83	1,75
C140	29,58	31,11	C236	30,07	30,98	1,53	0,91	0,25	0,84	-0,37	1,29	1,24
C297	31,44	30,54	C292	30,56	31,81	-0,9	1,25	-2,18	4,53	-0,03	1,02	0,98
C141	30,2	30,82	C296	30,25	31,11	0,62	0,86	-0,66	1,58	-0,42	1,34	1,28
Průměr						1,28			1,04		1,57	1,51
SD						0,47			0,37		0,52	0,49
SEM						0,24			0,19		0,23	0,22

SD - směrodatná odchylka

SEM - střední chyba průměru

HG - housekeeping gen

G- testovaný gen

KONT - kontroly

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - relativní expese

Poměr $2^{-\Delta\Delta Ct}$ - poměr relativní exprese vzorku ku průměru relativní exprese kontrol

Tab. 19 Výpočet relativní exprese genu IL18R1

ID	KONT		ID	TEST		ΔCt KONT	ΔCt TEST	KONT		TEST		Poměr $2^{-\Delta\Delta Ct}$
	HG	G(IL18R1)		HG	G			$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
C242	29,83	30,77	C305	30,52	29,01	0,94	-1,51	0,37	0,77	-2,08	4,22	4,0
C335	29,68	30,55	C307	30,06	30,1	0,87	0,04	0,30	0,81	-0,53	1,44	1,37
C140	29,58	29,39	C236	30,07	31,23	-0,19	1,16	-0,76	1,69	0,59	0,66	0,63
C297	31,44	28,35	C292	30,56	31,58	-3,09	1,02	-3,66	12,62	0,45	0,73	0,69
C141	30,2	30,85	C296	30,25	31,36	0,65	1,11	0,08	0,94	0,54	0,69	0,65
Průměr						0,57			1,05		1,75	1,47
SD						0,52			0,43		1,68	1,60
SEM						0,26			0,22		0,75	0,71

Popis zkratok viz Tab. 18

Tab. 20 Výpočet relativní exprese genu ADORA 3

ID	KONT		ID	TEST		ΔCt KONT	ΔCt TEST	KONT		TEST		Poměr $2^{-\Delta\Delta Ct}$
	HG	G (ADORA3)		HG	G			$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
C242	29,83	36,17	C305	30,52	33,41	6,34	2,89	1,58	0,34	-1,88	3,67	2,39
C335	29,68	32,5	C307	30,06	34,94	2,82	4,88	-1,95	3,85	0,11	0,92	0,60
C140	29,58	33,87	C236	30,06	34,52	4,29	4,46	-0,48	1,39	-0,30	1,24	0,81
C297	31,44	33,52	C292	30,56	35,83	2,08	5,27	-2,69	6,43	0,50	0,70	0,46
C141	30,2	35,81	C296	30,24	36,9	5,61	6,66	0,85	0,56	1,90	0,27	0,18
Průměr						4,77			1,53		1,36	0,89
SD						1,55			1,61		1,34	0,87
SEM						0,77			0,81		0,60	0,39

Popis zkratok viz Tab. 18

Tab. 21 Výpočet relativní exprese genu ERLIN 1

ID	KONT		ID	TEST		ΔCt KONT	ΔCt TEST	KONT		TEST		Poměr $2^{-\Delta\Delta Ct}$
	HG	G(ERLIN1)		HG	G			$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
C242	29,83	31,36	C305	30,52	29,84	1,53	-0,68	0,37	0,77	-1,84	3,57	3,47
C335	29,68	30,54	C307	30,06	30,35	0,86	0,29	-0,30	1,23	-0,87	1,82	1,77
C140	29,58	30,33	C236	30,06	31,13	0,75	1,07	-0,41	1,33	-0,09	1,06	1,03
C297	31,44	30,9	C292	30,56	31,74	-0,54	1,18	-1,70	3,24	0,02	0,98	0,96
C141	30,2	31,69	C296	30,24	30,99	1,49	0,75	0,33	0,79	-0,41	1,33	1,29
Prměr						1,16			1,03		1,75	1,70
SD						0,41			0,29		1,07	1,04
SEM						0,20			0,14		0,48	0,46

Popis zkratok viz Tab. 18

Tab. 22 Výpočet relativní exprese genu VNN 3

ID	KONT		ID	TEST		ΔCt KONT	ΔCt TEST	KONT		TEST		Poměr $2^{-\Delta\Delta Ct}$
	HG	G(VNN3)		HG	G			$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
C242	29,83	30,40	C305	30,52	28,40	0,57	-2,12	0,88	0,55	-1,82	3,52	3,32
C335	29,68	29,18	C307	30,06	29,35	-0,50	-0,71	-0,20	1,14	-0,40	1,32	1,25
C140	29,58	29,11	C236	30,06	29,74	-0,47	-0,32	-0,16	1,12	-0,02	1,01	0,95
C297	31,44	29,49	C292	30,56	29,94	-1,95	-0,62	-1,65	3,13	-0,31	1,24	1,17
C141	30,20	29,38	C296	30,24	29,73	-0,82	-0,51	-0,52	1,43	-0,20	1,15	1,09
Průměr						-0,31			1,06		1,75	1,56
SD						0,60			0,37		1,05	0,99
SEM						0,30			0,19		0,47	0,44

Popis zkratek viz Tab. 18

Tab. 23 Výpočet relativní exprese genu ARG 1

ID	KONT		ID	TEST		ΔCt KONT	ΔCt TEST	KONT		TEST		Poměr $2^{-\Delta\Delta Ct}$
	HG	G(ARG1)		HG	G			$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
C242	29,83	30,57	C305	30,52	29,26	0,74	-1,26	0,10	0,93	-1,90	3,73	3,35
C335	29,68	31,45	C307	30,06	30,74	1,77	0,68	1,13	0,46	0,04	0,97	0,87
C140	29,58	29,49	C236	30,06	32,13	-0,09	2,07	-0,73	1,66	1,43	0,37	0,33
C297	31,44	27,89	C292	30,56	30,09	-3,55	-0,47	-4,19	18,25	-1,11	2,16	1,93
C141	30,20	30,34	C296	30,24	32,97	0,14	2,73	-0,50	1,41	2,09	0,23	0,21
Průměr						0,64			1,12		1,33	1,34
SD						0,83			0,53		1,46	1,31
SEM						0,42			0,27		0,65	0,59

Popis zkratek viz Tab. 18

Tab. 24 Výpočet relativní exprese genu FOS

ID	KONT		ID	TEST		ΔCt KONT	ΔCt TEST	KONT		TEST		Poměr $2^{-\Delta\Delta Ct}$
	HG	G(FOS)		HG	G			$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
C242	29,83	29,84	C305	30,52	28,65	0,01	-1,87	0,54	0,69	-1,34	2,53	2,43
C335	29,68	29,34	C307	30,06	28,48	-0,34	-1,58	0,19	0,88	-1,05	2,07	1,99
C140	29,58	28,54	C236	30,06	30,36	-1,04	0,30	-0,51	1,42	0,83	0,56	0,54
C297	31,44	29,31	C292	30,56	29,76	-2,13	-0,80	-1,60	3,03	-0,27	1,20	1,16
C141	30,2	29,44	C296	30,24	30,59	-0,76	0,35	-0,23	1,17	0,88	0,54	0,52
Průměr						-0,53			1,04		1,38	1,33
SD						0,46			0,32		0,89	0,86
SEM						0,23			0,16		0,40	0,38

Popis zkratek viz Tab. 18

Tab. 25 Výpočet relativní exprese genu SPATC 1

ID	KONT		ID	TEST		ΔCt KONT	ΔCt TEST	KONT		TEST		Poměr $2^{-\Delta\Delta Ct}$
	HG	G(SPATC1)		HG	G			$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
C242	29,83	33,87	C305	30,52	34,53	4,04	4,01	0,06	0,96	0,04	0,98	0,91
C335	29,68	34,59	C307	30,06	33,99	4,91	3,93	0,94	0,52	-0,04	1,03	0,96
C140	29,58	33	C236	30,06	35,58	3,42	5,52	-0,55	1,47	1,55	0,34	0,32
C297	31,44	32,97	C292	30,56	34	1,53	3,44	-2,45	5,45	-0,53	1,45	1,34
C141	30,2	33,73	C296	30,24	35,65	3,53	5,41	-0,45	1,36	1,44	0,37	0,34
Průměr						3,98			1,08		0,83	0,77
SD						0,68			0,43		0,47	0,44
SEM						0,34			0,22		0,21	0,20

Popis zkratok viz Tab. 18

Transkript genu pro IL18RAP ohraničený našimi primery je průměrně přibližně 1,5x více obsažen ve vzorcích pacientů s IM než v kontrolních vzorcích. U genu pro IL18R1 je to průměrně asi 1,7x více ve vzorcích pacientů s IM než v kontrolních vzorcích. U genu ADORA 3 je daného transkriptu kolem 0,9x méně ve vzorcích s IM než v kontrolních vzorcích. Pro gen ERLIN 1 nám vyšlo, že jeho transkript je 1,7x více obsažen ve vzorcích s IM než v kontrolních vzorcích. Gen VNN3 je průměrně téměř 1,6x více přítomen ve vzorcích pacientů s IM než u kontrolních vzorků. Genu pro Arg 1 je přibližně 1,3x více ve vzorcích pacientů s IM než v kontrolních vzorcích obdobně jako u genu FOS. Kontrolního genu SPATC1 je pak kolem 0,8x méně ve vzorcích s IM než v kontrolních vzorcích. Získané hodnoty s uvedením směrodatných odchylek a střední chyby průměru jsou uvedeny v tabulkách s výsledky pro jednotlivé geny.

6 Diskuze

Nejvíce časově náročnou a obtížnou součástí práce byla izolace celkové RNA. Získat ze vzorků alespoň požadovanou minimální kvalitu a koncentraci bylo někdy velmi obtížné. Každý vzorek se choval individuálně a proto standardizovat protokol, aby tímto faktorem nebyly ovlivněny výsledky čipové analýzy, bylo naší prioritou. Někdy stačila jedna izolace a někdy až z posledních zbytků krve se podařilo izolovat potřebné množství celkové RNA. Několikrát nezbývalo nic jiného než vybrat alespoň nejlepší výsledek ze všech izolací daného vzorku, protože počet izolací je omezen odebraným objemem pacientovy krve.

Jedním z dalších kritických kroků bylo odstraňování globinové frakce. U jednoho vzorku se dokonce ani po třech přečištěních nepodařilo globinovou frakci odstranit, stále docházelo k její preferenční amplifikaci, a vzorek musel být vyřazen a nahrazen vzorkem jiným.

V rámci analýzy vybraných vzorků byla identifikována skupina genů, které se z hlediska genové exprese jeví jako prognostické ve smyslu očekávané doby přežití pacientů s primárním výskytem akutního infarktu myokardu. Jedná se o sestavu 5 genů, jejichž expresní intenzity se ve skupinách pacientů zemřelých v období 6 měsíců po primární srdeční příhodě (AIMD6) a pacientů přežívajících déle (AIM) statisticky a klinicky významně odlišovaly.

Při hledání informací o námi vybraných genech jsem se zaměřila i na geny, které leží ve stejné nebo blízké oblasti, protože je možné, že sousedící geny se podílejí na stejné biochemické dráze nebo jejich produkty mají podobnou funkci. Základní informace o genech jsem čerpala z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Gen TCRA (*T-cell antigen receptor, polypeptide alfa*), jehož exprese byla nejvíce zvýšena, je lokalizován na lidském chromozomu 14 v cytogenetické oblasti q11.2, na dlouhých raménkách. Cytogenetická oblast se určuje z cytogenetických (chromozomových) map, které jsou založeny na fyzické podobě chromozomů. Různými technikami lze dosáhnout odlišného pruhování chromozomů. Rutinně používané je G pruhování, k němu reverzní je R pruhování. Poloha genu na cytogenetické mapě je pak udávána číslem chromozomu, písmenem označujícím raménko a čísla jednotlivých oblastí dle pruhů. Zvýšená exprese tohoto genu je podle našich výsledků spojena s vyšší pravděpodobností úmrtnosti

v souvislosti s AIM. Sekvence zjištěná v roce 1984 odhalila skutečnost, že polypeptid alfa, kódovaný TCRA genem, vykazuje vysokou homologii s imunoglobulinovými polypeptidovými řetězci. To by mohlo znamenat, že jsme identifikovali pouze odpověď organismu na stresovou či zátěžovou situaci a geny nemusí být možná specifické pro prognózu IM.

Sekvence DNA odpovídající mRNA úseku genu TCRA:

atgaaatcct tgagagtttt actagtgatc ctgtggcttc agttgagctg ggtttgagc	60
caacagaagg aggtggagca gaattctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc	120
tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat	180
tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atggtgacaa agaagatgga	240
aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc	300
cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgtgaacg atgccagact catgtttgga	360
gatggaactc agctgggtgt gaagcccaat atccagaacc ctgaccctgc cgtgtaccag	420
ctgagagact ctaaatccag tgacaagtct gtctgcctat tcaccgattt tgattctcaa	480
acaaatgtgt cacaaagtaa ggattctgat gtgtatatca cagacaaaac tgtgctagac	540
atgaggctta tggactcaa gagcaacagt gctgtggcct ggagcaacaa atctgacttt	600
gcatgtgcaa acgcctcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt cccagccca	660
gaaagtctct gtgatgcaa gctggctgag aaaagctttg aaacagatac gaacctaaac	720
ttcaaaacc tgctcagtgat tgggtccga atcctctctc tgaagtgge cgggtttaat	780
ctgctcatga cgctcggct gtgtccagc tga	813

V blízkosti genu *TCRA* se nachází gen pro *METTL 3 (methyltransferase like 3)* v oblasti 14q11.1. V oblasti 14q11.1 - q12 se nachází gen *SALL 2 (sal - like 2)*. Ve stejné oblasti 14q11.1 leží gen pro *ABHD4 (abhydrolase domain containing 4)*, jehož produkt se podílí na katabolických reakcích s lipidy a *DAD 1 (defender against cell death 1)*. *DAD 1* protein chrání buňky před apoptickou smrtí, byl identifikován jako negativní regulátor programované smrti v termosenzitivní buněčné linii tsBN7. Gen *DAD 1* byl zkoumán v souvislosti s rakovinou štítné žlázy (Ziya *et al.*, 2011). Ale u žádného z genů, ležících v blízkosti *TCRA* zatím nebyla prokázána souvislosti s IM.

Genetický lokus LOC650751, který je u skupiny vzorků pacientů AIMD6 významně upregulován, je umístěn na lidském chromozomu 14. Jedná se, o blíže nespecifikovaný gen kódující proteinovou strukturu, která je podobná imunoglobulino-vému řetězci iota, resp. jeho preproproteinu. Imunoglobulinový řetězec iota kódovaný genem *VPREB1 (pre-B lymphocyte 1)*, patří do rodiny imunoglobulinů. Je exprimován selektivně při rozvoji raných stádií B-lymfocytů (proB a raný preB lymfocyt). Polypeptidový řetězec iota je spojen IgM řetězcem a formují molekulární komplex exprimovaný na povrchu preB lymfocytu. Tento komplex se zřejmě podílí na přeskupování IG genů při rané diferenciaci antigeně specifických receptorů B lymfocytů. B lymfocyty jsou pak hlavní složkou specifické hu-

morální (protilátkové) imunity. V blízkosti daného lokusu leží gen pro TRAV1 - 1 (*T cell receptor alpha variable 1 -1*), u kterého ale také nebyla prokázána přímá souvislost s IM.

Sekvence DNA odpovídající mRNA úseku genetického lokusu LOC650751:

```
atgtggggag ctttccttct ctatgtttcc atgaagatgg gaggcactgc aggacaaagc      60
cttgagcagc cctctgaagt gacagctgtg gaaggagcca ttgtccagat aaactgcacg      120
taccagacat ctgggttta tgggctgtcc tggtagcagc aacatgatgg cggagcaccc      180
acatttcttt cttacaatgc tctggatggg ttggaggaga caggtcgttt ttcttcattc      240
cttagtcgct ctgatagtta tggttacctc ctctacagc agctccagat gaaagactct      300
gcctcttact tctgcgctgt gagagacaca gtgactatga ggctctctta a              351
```

Genetický lokus LOC650761 je umístěn rovněž na chromozomu 14. V době návrhu sond byl charakterizován jako blíže nespecifikovaný gen kódující proteinovou strukturu, podobnou prekursoru alfa řetězce V (oblast CTL-L17) receptoru T-buněk. Sekvence DNA odpovídající sondě na čipu genetického lokusu LOC650761 je uvedena jako SEQ. ID No. 3 ve výpisu sekvencí v Tab. 26.

Sekvence DNA odpovídající mRNA úseku genetického lokusu LOC650761:

```
atgaagtgtc taccttctgc agactccaat ggctcaggaa ctgggaatgc agtgccaggc      60
tcgtggtatc ctgcagcaga tggggggagt tttccttctt tatgtttcca tgaagatggg      120
aggcactaca ggacaaaaca ttgaccagcc cactgagatg acagctacgg aaggtgcat      180
tgtccagatc aactgcacgt accagacatc tgggttcaac gggctgttct ggtaccagca      240
acatgctggc gaagcaccca catttctgtc ttacaatggt ctggatgggt tggaggagaa      300
aggctgtttt tcttcattcc ttagtcggtc taaagggtac agttacctcc ttttgaagga      360
gctccagatg aaagactctg cctcttacct ctgtgctgtg agagacacgg tgactatgag      420
gcctcttag                                     430
```

Tato sekvence je uvedena tak, jak byla platná v době návrhu sond pro dané geny a lokusy. V současné době je však tento záznam zrušen, což nás přivádí k otázce, zda se jednalo vůbec o kódující oblast či je zvýšená exprese tohoto lokusu spojena s regulací odpovědi organismu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/89037601?report=genbank>).

TMEM98 (*Transmembrane protein 98*) je v případě skupiny AIMD6 méně exprimován oproti skupině AIM. Jedná se o gen lokalizovaný na lidském chromozomu 17 v cytogenetické oblasti 17q11.2, kódující transmembránový protein 98, známý rovněž jako DKFZp564K1964. Gen TMEM98 je konzervován u dalších organismů (šimpanzi, psi, skot, myši či krysy). To že gen je konzervován u dalších organismů, může znamenat evoluční výhodu pro nositele tohoto genu. Daný gen by mohl mít pro svého nositele zásadní význam pro přežití. Protein kódovaný genem TMEM98 je strukturální komponentou endo-

plazmatického retikula (ER), je obecně integrován do buněčných membrán a jeho transkripční varianta 1 je dlouhá 1808 párů bází (Clark *et al.*, 2003). Celkem jsou dosud popsány 4 transkripční varianty a gen se skládá z 8 exonů. Je zařazen do rodiny lidských CCDS genů (*the consensus coding sequence*). Konsenzuální sekvence (*consensus sequence*) je charakteristická a relativně konzervovaná sekvence bází DNA společná většímu počtu genů (nebo jejich regulačních oblastí) příbuzných funkcí nebo alespoň vykazujících určitou evoluční homologii. Pojem se analogicky používá také pro RNA a pro bílkoviny (odpovídající sekvence aminokyselin), jde o sekvence přítomné v homologických místech genomu různých druhů nebo na různých místech téhož genomu. Základním rysem je konzervativní (stálá) přítomnost určitých bází v určitých (relativních) polohách a společná či podobná funkce příslušné bílkoviny nebo její domény.

Sekvence DNA odpovídající mRNA úseku genu TMEM98:

```

cccggggcgg ggcgcaggca gggaccctcc gctcccctct ccgtctgccg cccggacggg      60
ccaccgcggg ggcgcgagga aggggtgttg ggtcgccagg gcccgcctcc cagctgcccc      120
ggccgccggg gggcctggcg gtgacggcgg cgcctggcgg cggggatttg gcgcgggccg      180
ggggccgggg gccggggcgc gggggcgcga ggctggattc ctagggccgc ggcgctccc      240
ggcatgctcc gctgcaggcc cgcgcccgcg cccggacttt gccatcggcg gggcagtcgc      300
gggatgcgcc cgggagccac agcctgagct ttagccatg aggaggatgt gaccgggact      360
gagtcaggag cctctgga gcatggagac tgtgtgtgatt gttgcatag gtgtgctggc      420
caccatcttt ttggcttctg ttgcagcctt ggtgtggtt tgcaggcagc gctactgccg      480
gccgcgagac ctgctgcagc gctatgattc taagcccatt gtggacctca ttggtgcat      540
ggagaccag tctgagccct ctgagtaga actggacgat gtcgttatca ccaacccca      600
cattgaggcc attctggaga atgaagactg gatcgaagat gcctcgggtc tcatgtcca      660
ctgcattgcc atctgaaga tttgtcacac tctgacagag aagcttgtg ccatgacaat      720
gggctctggg gccaagatga agacttcagc cagtgtcagc gacatcattg tggtgccaa      780
gcgatcagc ccagggtgg atgatgtgt gaagtcgatg taccctcctg tggacccaa      840
actcctggac gcacggacga ctgccctgct cctgtctgtc agtcacctgg tctgtgtgac      900
aaggaatgcc tgccatctga cgggaggcct ggactggatt gaccagtctc tctcggctgc      960
tgaggagcat ttggaagtcc ttcgagaagc agccctagct tctgagccag ataaaggcct      1020
cccaggccct gaaggcttc tgcaggagca gtctgcaatt tagtgcctac aggccagcag      1080
ctagccatga aggccctgc cgccatccct ggatggctca gcttagcctt ctacttttc      1140
ctatagatt agttgttctc cacggctgga gattcagct gtgtgtgcat agtaaagcag      1200
gagatccccg tcagttatg cctctttgc agtgcaaac tgtggctggg gattggcagt      1260
ctaatactac agttagggga gatgccattc actctctgca agaggagtat tgaaaactgg      1320
tggactgca gctttattta gtcacctag tgtttcaag aaaattgagc caccgtctaa      1380
gaaatcaaga ggtttcacat taaaattaga atttctggcc tctctgac ggtcagaatg      1440
tgtggcaatt ctgatctgca tttcagaag aggacaatca attgaaacta agtaggggtt      1500
tctcttttg gcaagacttg tactctctca cctggcctgt ttcatttatt tgtattatct      1560
gcctgtccc tgaggcgtct gggctctccc tctccctgc aggttgggt tgaagctga      1620
ggaactaaa agttgatgat ttcttttta tctttatgcc tgcaatttta ctagctacc      1680
actaggtgga tagtaaattt atacctatgt ttcctcaaa aaaaaaaaaa aa      1732

```

V oblasti 17q11.2 se nachází gen pro SLC6A4, transportér serotoninu. Gen kóduje membránový protein, který transportuje neurotransmitter serotonin ze synaptických štěrbin na nesynaptické části neuronů. Zmíněný protein vymezuje působení serotoninu a jeho obnovu v závislosti na přítomnost sodíkových iontů. Gen pro SLC6A4 je exprimován hlavně v mozku a krevních buňkách. Tento transportér zajišťuje také selektivní reabsorpci inhibitorů serotoninu, čímž snižuje riziko deprese, která patří mezi rizikové faktory IM. Fumeron *et al.* (2002) zkoumali polymorfizmy v genu SLC6A4 pomocí PCR na souboru 671 pacientů s IM a 688 kontrolních pacientech. Na základě svých výsledků zjistili, že genotyp LL (leucin, leucin) SLC6A4 je spojen s vyšším rizikem IM. Tato asociace je nezávislá na dalších rizikových faktorech jako je kouření, BMI, hypertenze či hladině krevních lipidů. Pokud se v promotoru tohoto genu nachází opakovaný délkový polymorfismus, dochází k ovlivnění míry absorpce serotoninu, což může hrát roli v syndromu náhlého úmrtí kojenců, v agresivním chování pacientů s Alzheimerovou chorobou a v náchylnosti k depresi u lidí po prožití emocionálního traumatu.

Ve stejné cytogenetické oblasti 17q11.2 - q12 se nachází gen CCL2 pro chemokin monocytární chemoatraktivní protein 1 - MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*). Gen CCL2 je jedním z mnoha genů pro cytokiny seskupených na 17 chromozomu. Cytokiny jsou skupina sekretovaných proteinů zapojených v zánětlivém a imuno-regulačním procesu. Mají chemotaktickou aktivitu pro monocyty a bazofily, jsou zapojeny v patogenezi nemocí, u kterých dochází k infiltraci monocytů, jak je revmatoidní artritida a ateroskleróza. MCP-1 je exprimován v lidských aterosklerotických lézích a jeho receptor CCR2 je exprimován na leukocytech (Nelken *et al.*, 1991). Důkaz exprese MCP-1 v aterosklerotických lézích podala i studie Ylä-Herttuala *et al.* (1991). McDermott *et al.* (2005) analyzovali asociaci genetických variací v MCP - 1 s výskytem IM. Vycházeli z předpokladu, že gen CCL2 a s ním spojený receptor CCR2 jsou zapojeny v procesu aterosklerózy. Na základě své práce pak prokázali, že alela MCP-1-2578G je spojena s vyšším výskytem infarktu myokardu.

PRR6 (Prolin-rich 6) je downregulován u skupiny pacientů AIMD6. Jde o gen lokalizovaný na chromozomu 19 u organismu *Gallus gallus*. Velikost genomu *Gallus gallus* je 1,2 Gb. Poslední společný předek ptáků a savců žil před 310 miliony let. U *Homo sapiens* je tento gen znám jako *CENPV (centromere protein V)* a v databázích a literatuře může být označován rovněž jako p30, CENP-V nebo 3110013HO1Rik. V lidském jaderném genomu

je gen *CENPV* lokalizován na chromozomu 17, v cytogenetickém pruhu 17p11.2. Gen je konzervován u šimpanzů, psů, skotu, myši, krysa, kuřat, *C. elegans*, *A. thaliana* a rýže (v databázi uváděné homologie *CENPV* resp. *PRR6* gen). Gen má především funkci uhlík-síra lyázové aktivity. Účastní se svou aktivitou např. některých fází buněčného cyklu, dělení buněk, formování centromerického heterochromatinu, metabolických procesů, mitózy, pozitivní regulace cytokinů a také regulace chromozomové organizace. Nachází se v jádře buňky, v kondenzované chromosomální kinetochoře a ve střední části vřetenka. Právě jeho účast v metabolických procesech a regulaci cytokinů ho může spojovat s IM.

Sekvence DNA odpovídající mRNA úseku genu *PRR6*:

gcgcgcgcag gccggcgggg gcgcgccgcg ctgcgaggcc tgcgcgccag gctgcgggag	60
ccatgcggcg atcgaggagc tctgcggccg ccaagctgcg cgggcagaag cggtcggggg	120
ctctccgggc ccccgcggcc tccgcggccg ctgccttggc acccagcgcc acccgcaac	180
ggcgctccgc tagccaggcc gggagcaaga gccaggcggg ggagaagccg ccgtcggaga	240
agccgcggct gaggcgtcg tcgccgcggg cccaggagga gggcccgggg gagccggcgc	300
cgctgagct ggcgttctc ccgccaccgc cgcgcggcc gccgactccc ggcacccga	360
cgtcctcggc gtccaacctg gacctgggcg agcagcggga gcgctgggag acgtccaga	420
agcggcagaa gcttacctcc gagggtgccg ccaagctcct gctagacacc tttgaatacc	480
agggcctggt gaagcacaca ggaggctgcc actgtggagc agttcgttt gaagttggg	540
ctcagcaga cttgcatata tttgactgca attgcagcat ttgcaagaag aagcagaata	600
gacactcat tgtccagct tctcgctca agctcctgaa gggagctgag cacataacga	660
cttacacgtt caatactcac aaagcccagc atacctctg taagagatgt ggcgttcaga	720
gcttctatac tccacgatca aaccccggag gcttcggaat tgccccccac tgcttgatg	780
agggcactgt gcggagtatg gtcactgagg aattcaatgg cagcgattgg gagaaggcca	840
tgaaagagca caagaccatc aagaacatgt ctaaagagtg agcttctgcc tctctgccc	900
tgaaaaggag gaatgattgg ggccagcaac tttgctctcc ctgcctgcc tcggtggtgc	960
tctgaaatgt ggctgacctg ggctgctggt tccgttact agggtcatct tgatctctgc	1020
agtttctcc agctaccagt ttcttaggc agcttttgt cctcctctg cccagatttt	1080
gatgtagct aattgacatc cttctctcc caactttgt gtgatctttt aggaaaaaaa	1140
ataaatattt ttaacattaa agcaaaaaaa aaaaaaaaaa a	1181

Nejbliže oblasti 17p11.2, která má souvislost s IM, se nachází oblast 17p13. Nachází se zde gen pro *CXCL16* (*chemokin CXC ligand 16*). *CXCL16* patří do skupiny chemokinů, jejichž první dvě ze čtyř konstantně přítomných cysteinových podjednotek jsou rozděleny jinou aminokyselinou (X). *CXCL16* existuje v transmembránové podobě a v rozpustné formě. Transmembránová forma působí jako „scavengerový“ receptor pro oxidované LDL částice, zatímco rozpustná forma působí jako chemoatraktant především na CD8+ T-lymfocyty. Navíc rozpustná forma *CXCL16* ovlivňuje *in vitro* buněčnou proliferaci buněk hladké svaloviny lidské aorty. Lundberg *et al.* (2005) se ve své studii zabývali běžnými polymorfizmy (Ala181Val) v exonu 4 tohoto genu a jejich vlivu na rozvoj koronárního

onemocnění. V rámci své práce genotypizovali 387 pacientů po infarktu myokardu a 387 k nim přiřazených kontrol. Na základě svých výsledků pak zjistili, že tzv. „missense“ mutace v genu pro CXCL16 jsou spojeny se zvýšenou stenózou koronárních arteriál u pacientů po IM. Ke studiu stenózy byl použit angiogram, který byl rozdělen do 15 koronárních segmentů. Tyto segmenty pak byly analyzovány QCA systémem (*Medis quantitative sonary angiography systems*). U každého segmentu byl měřen průměr, minimální průměr lumen, průměr stenózy, délka segmentu, plocha plátu a jiné parametry.

V případě všech zde uváděných genů a genetických lokusů jsou míněny geny a genetické lokusy hybridizující s odpovídajícími sondami (viz Tab. 26) na celogenomových expresních čípech Illumina. Sekvence DNA kódující mRNA jsou uváděny podle dostupných katalogů pouze pro informaci.

Tab. 26 Sekvence sond identifikovaných genů

Illumina ID	Sekvence sondy	Definice	SEQ. ID No.
3420112	ACGATGCCAGACTCAT-GTTTGGAGATGGAAC-CAGCTGGTGGTGAAGCCC	Lidský alfa prekurzor receptoru T-buněk (TCRA)	1
7150370	GCAGGACAAAGCCTTGAG-CAGCCCTCTGAAGTGA-CAGCTGTGGAAGGAGC	Lidský preproprotein podobný iota řetězci imunoglobulinu (LOC650751)	2
2750435	GTGTCTACCTTCTGCA-GACTCCAATGGCTCAGGA-ACTGGGAATGCAGTGC	Lidský prekurzor podobný V-oblasti (CTL-L) alfa řetězce receptoru T-buněk (LOC650761)	3
2750431	CAACTTTGCTCTCCCTGCC-GTGCCCTCGGTGGTGCTCCT-GAATGTGGCTGA	Prolinem bohatý protein (PRR6), též lidský protein V centromery (CENPV)	4
70370	GGCCTGTTTCATTTATTT-GTATTATCTGCCTG-GTCCCTGAGGCGTCTGGG	Lidský transmembránový protein 98 (TMEM98)	5

Dalšími geny nacházejícími se na 17 chromozomu a mající vztah k IM jsou například gen pro eotaxin (CCL11). Eotaxin je silný chemokin, který podporuje migraci a aktivaci eozinofilních granulocytů, které se podílí v patogenezi široké škály alergických onemocněních. Ačkoliv jsou eozinofilní granulocyty v aterosklerotických lézích vzácné, receptory pro eotaxin (CCR3) jsou přítomny v lézích jak na makrofázích, tak na žírných buňkách. Tudiš se eotaxin může podílet na aterosklerotickém zánětu. Economou *et al.* (2001) infor-

movali o tom, že plazmatická koncentrace eotaxinu je zvýšená u pacientů s koronární aterosklerózou. Ve své studii pak Zee *et al.* (2004) prokázali, že substituce A23T (treoninu za alanin na 23 pozici) je spojena s rizikem IM. Pro svou práci použili 523 vzorků pacientů s IM a 2092 kontrolních vzorků, které zpracovali PCR metodou.

Dále je to například gen pro PECAM - 1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule*) lokalizovaný v oblasti 17q23.3. Polymorfismus R643G (glycin za arginin na pozici 643) tohoto genu je spojen s rizikem IM (Elrayess *et al.*, 2004).

Velká část genů, u kterých je nalezena spojitost s IM je zapojena v obranných mechanismech organismu, v alergických reakcích či mají nějakou souvislost s cytokiny, konkrétně velmi často s chemokiny. To by mohlo být potvrzení již dříve zmíněné hypotézy, že se daří identifikovat spíše odpověď organismu na stresovou a zánětlivou reakci doprovázející aterosklerotické změny než samotné geny spojené s IM.

Bohužel všechny studie, které prokazují souvislost genů s IM, jsou zaměřeny na polymorfizmy a jejich vztah k tomuto onemocnění. Informace zahrnující diference v úrovních exprese genů, které by měly prokazatelnou souvislost s IM, nejsou k dispozici. I z tohoto důvodu je velmi složité interpretovat biologický význam zde uvedených výsledků, i když z hlediska vyhodnocení obdržených dat se jeví jako velice zajímavé. Problémem prezentovaných výsledků je malý počet AIMD6 vzorků, který ale bohužel nemáme šanci ovlivnit. V průběhu studie nebylo možné rozšířit náběry na další pracoviště, protože incidence IM se v rámci regionů České republiky liší. Při odběru vzorků z příliš mnoha regionů by byly výsledky ovlivněny vnějšími faktory životního prostředí. Lepší objasnění očekáváme až s postupným vyhodnocováním dalších provedených analýz.

Z primárních výsledků dalších analýz nás zaujaly geny analyzované RT-PCR pro komparaci výsledků z čipů. Přestože první výsledky z čipové analýzy obsahují u dvou genů sníženou expresi, další výsledky ukazují spíše na geny, jejichž exprese je zvýšená. Proto nebyl pro RT-PCR vybrán, žádný gen, u něhož by byla předpokládaná snížená exprese. Při vyhodnocování výsledků z RT-PCR jsme se soustředili na to, jestli je vyšší relativní exprese u vzorků pacientů s AIM než u kontrolních vzorků. Kromě genu ADORA 3 a SPATC 1 (kontrolní gen) dosáhly všechny geny větší relativní exprese u vzorků pacientů než u kontrol. Nejvyšší hodnoty FC pak dosáhl gen ERLIN1, který měl 1,7 x vyšší relativní expresi než kontrolní vzorky.

Gen pro IL18RAP (*interleukin 18 receptor accessory protein*) se nachází v cytogenetické oblasti 2q12. V literatuře je tento gen označován také jako ACPL, CD218b, IL18RB, CDw218b MGC120589 nebo MGC120590. Protein kódovaný tímto genem tvoří přídatnou subjednotku heterodimerického receptoru pro IL 18 a zvyšuje vazebnou afinitu IL18R1 (*interleukin 18 receptor 1*) k IL18.

Gen pro IL18R1 (*interleukin 18 receptor 1*) leží také v oblasti 2q12. V literatuře a databázích může být označován také jako CD218a, IL18RA, IL1RRP, CDw218a, IL-1Rrp. Protein kódovaný tímto genem je cytokinový receptor, který patří do interleukin 1 receptorové rodiny. Tento receptor specificky váže IL18.

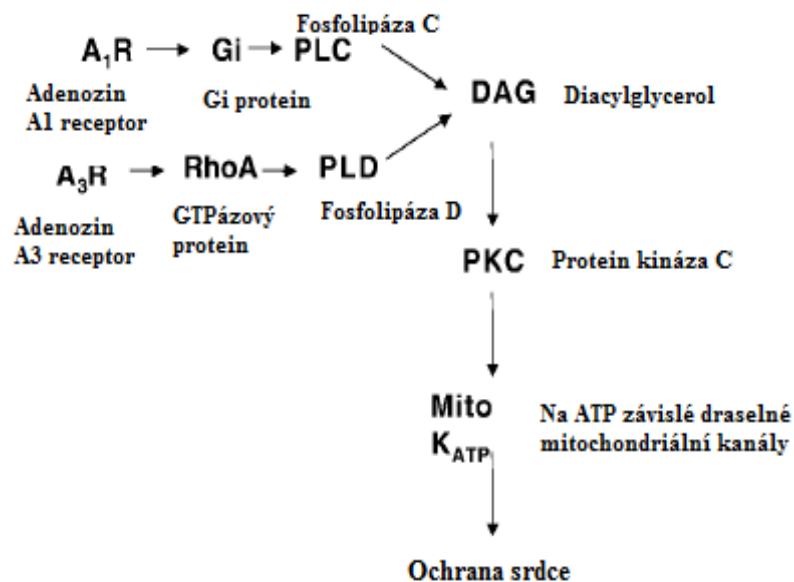
U těchto genů, pro IL18RAP a IL18R1, zatím nebyla prokázána souvislost s IM. Blízko obou genů, v oblasti 2q14, ale leží gen pro IL1B (*interleukin 1β*), u jehož polymorfizmu 511C/T byla prokázána souvislost s IM (Iacoviello *et al.*, 2005). Protein tohoto genu patří do interleukin 1 cytokinové rodiny. Dle těchto dat je tedy pravděpodobné, že i analyzované proteiny spojené s IL 18 by mohly mít souvislost s IM. IL1B je produkovaný aktivovanými makrofágy a je důležitým mediátorem zánětlivé reakce. Dále se účastní buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy.

Na druhém chromozomu se ještě nachází gen pro VAMP 8 (*vesicle-associated membrane protein 8*) v oblasti 2p12 -p11.2, u jehož polymorfizmů rs1010 (9369T/C) a rs1058588 (9258C/T) byla prokázána souvislost s IM. Protein kódovaný tímto genem se účastní procesu degranulace destiček (Schiffman *et al.*, 2006).

Gen ADORA 3 (*adenosine A3 receptor*) leží v cytogenetické oblasti 1p13.2. Také je znám pod označením A3AR, AD026, bA552M11.5 nebo RP11-552M11.7. Genem kódovaný protein patří do rodiny adenosinových receptorů a je zapojen v inhibici degranulace neutrofilů. Tento receptor se podílí na obranných mechanismech srdce během případné ischemie. Zkoumání všech mechanismů vedoucích k ochraně srdce před ischemií stále probíhá. Ge *et al.* (2006) ve své studii na zvířecím modelu prokázali, že agonista A3AR CL-IB-MECA ([2-chloro-N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5_Nmethylcarboxamide]) snižuje ischemické poškození srdce aktivací právě adenosin A3 receptoru a následnou úpravou metabolických procesů. Po navázání adenosinu na A3AR dojde k aktivaci příslušného G proteinu (GTPáza důležitá ve vnitrobuněčné signalizaci) na vnitřní straně membrány, což vede buď k vzestupu nebo poklesu určitého druhého signálního posla, nejčastěji cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) nebo IP3 (inositoltrifosfát). Zatím není definitivně potvr-

zeno, že by v savčích myocytech byly exprimovány funkční A3 receptory. Tudiž obranná reakce zprostředkovaná A3AR nemusí být nutně odpovědí myocytů, ale nepřímou reakcí na ischemii jiných typů buněk. Na aktivaci A3AR se podílí aktivace nebo přemístění protein kinázy C, PI3 kinázy (fosfatidylinositol-3-fosfát) a MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), které ovlivňují mitochondriální KATP (ATP senzitivní draslíkové) kanály, které jsou v srdeční tkáni (Peart a Headrick, 2007).

Práce na ptačích buňkách, které mohou a nemusí být relevantní k savčím buňkám, ukazují, že A3AR je významný při aktivaci fosfolipázy D přes RhoA (*Ras homolog gene family, member A*). RhoA je malý GTPázový protein, který reguluje aktinový cytoskelet (Lee *et al.*, 2001). Na Obr. 10 je znázorněna dráha aktivace KATP pomocí A3AR.



Obr. 10 Zapojení A3AR při ochraně srdce před ischemií u ptačího modelu (Lee *et al.*, 2001).

Další z genů vybraných do PCR je gen pro ERLIN 1 (*endoplasmic reticulum lipid raft associated 1*), který leží v oblasti 10q21-q22. Gen může být také označen KE04, KEO4, SPFH1, Erlin-1, C10orf69 nebo RP11-316M21.1. Je součástí komplexu ERLIN1/ERLIN2, který způsobuje s ER spojenou degradaci inositol 1, 4, 5-trifosfátového receptoru (IP3Rs). Inositoltrifosfát (IP₃, přesněji inositol-1,4,5-trifosfát) je ve vodě rozpustný cukerný alkohol esterifikovaný na třech místech fosfátovými skupinami. Je to významný druhý posel v buněčné signalizaci, který vzniká činností fosfolipázy C z jistého vzácnějšího membránového fosfolipidu (konkrétně z PIP₂ *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*). Druhým

produktem této enzymatické reakce je 1,2-diacylglycerol (DAG), rovněž druhý posel, ten však na rozdíl od inositoltrifosfátu zůstává ukotven ve fosfolipidové membráně.

IP₃ difunduje po svém vzniku po celé buňce a váže se na endoplazmatické retikulum, konkrétně na ligandem-řízený iontový kanál. Jedná se o IP₃-dependentní vápníkový kanál, který se po navázání IP₃ otevře a do cytosolu začnou proudit vápníkové ionty. To způsobí další přenos signálu, obvykle pomocí vápníku a DAG totiž dojde k aktivaci proteinkinázy C, která může mít různou funkci v závislosti na typu buňky. Následně je inositoltrifosfát rychle buď fosforylován na IP₄, nebo defosforylován na IP₂, aby unik vápníku z ER nepokračoval. Při zvýšení expresi ERLIN 1 by mohlo docházet ke zvýšené degradaci receptoru pro IP₃, ten by se neměl kam navázat a docházelo by k narušení biochemické dráhy.

V blízkosti genu ERLIN 1 v oblasti 10q24-q26 se nachází gen pro ADRB1 (*adrenergic, beta-1- receptor*), jehož polymorfismus Arg389Gly (substituce argininu za glycin na pozici 389) má spojitost s IM (Iwai *et al.*, 2003). Protein kódovaný genem ADRB1 zajišťuje fyziologický účinek hormonu adrenalinu a neurotransmiteru noradrenalinu. Hormon adrenalin připravuje tělo na výkon a je základním hormonem stresové reakce „útok nebo útek“. Adrenalin společně s kortizolem se podílí na udržení organismu při životě při stresové reakci. Vyplavený adrenalin způsobí okamžitou přeměnou glykogenu na krevní cukr glukózu, která dodává energii svalům. Problém nastane pokud nedojde k využití energie při útěku nebo boji. V dnešní době se však lidé často dostávají do stresových situací, při kterých dochází k vyplavení andrenalinu, ale nedochází k využití kumulované energie. Zvýšená hladina krevního cukru je ale pro buňky nežádoucí a tělo začne vysílat signály k jeho likvidaci. Pod vlivem zvýšené hladiny krevního cukru dochází v buňkách k celé řadě nežádoucích biochemických procesů, které vedou k příznakům civilizačním nemocí, ke kterým patří i IM.

Gen pro VNN3 (*vanin 3*), ležící v oblasti 6q23.2, je prostřední gen skupiny tří vaninových genů na šestém chromozomu v rozmezí 6q23-q24. Polymorfismus rs2272996 (N131S) v genu pro VNN1 je spojován s hypertenzí (Zhu a Cooper, 2007).

Gen pro ARG 1 (*arginase liver*) ležící v oblasti 6q23 je předposledním genem v seznamu genů, které byly vytipované pro kontrolu metodou RT-PCR. Argináza katalyzuje hydrolýzu argininu na ornitin a močovinu. Existují přinejmenším dvě izoformy savčí arginázy (typ I a typ II), které se liší svou tkáňovou distribucí, buněčnou lokalizací a fyziologickou funkcí. Typ I kódovaný naším vybraným genem je cytosolový enzym, kte-

rý je exprimován především v játrech jako součást ornitinového cyklu. Dumont *et al.* (2007) ve své studii prokázali, že polymorfismus rs2781666 (4195G/T) má souvislost s infarktem myokardu a se zvětšováním tloušťky intimy.

V blízkosti genů ARG 1 a VNN3 konkrétně v oblasti 6q22 leží gen pro ROS 1 (*c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase*). Tento protoonkogen je exprimován ve velké míře v různých rakovinových buňkách. Protein kódovaný tímto genem může plnit funkci růstového nebo diferenciačního faktoru pro receptory. Shiffman *et al.* (2005) u něj také prokázali souvislosti s IM.

Jiným genem ležícím v blízké sousedství našich genů je gen pro ENPP1 (*ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*) v oblasti 6q22-q23. Bacci *et al.* (2005) pak v rámci své studie zjistili, že polymorfismus rs1044498 (48213A/C) tohoto genu je u pacientů s diabetem mellitus spojen s IM. Z našich pacientů, jejichž vzorky byly zpracovány v RT-PCR měl DM pacient s číslem C307 a kontrolní vzorek C242.

Posledním genem, u kterého jsme předpokládali změnu exprese, byl gen FOS (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*). Tento gen leží v cytogenetické oblasti 14q24.3 a podílí se na regulaci buněčné proliferace, diferenciace a transformace. V některých případech bývá exprese toho genu spojena s apoptickou smrtí buněk. Patří do tzv. FOS rodiny genů spolu s FOSB, FOSL1 a FOSL 2. Tato genová rodina kóduje proteiny motivem leucinové zipu. Pomocí tohoto motivu, některé bílkoviny vytvářejí dimery. Tvoří jej dva α -helixy, u nichž je každý sedmý aminokyselinový zbytek leucin.

Gen SPATC 1 byl zvolen jako referenční gen, u kterého při čipové analýze nebyla zjištěna ani zvýšená ani snížená exprese. Výsledky z RT-PCR však ukázaly, že jeho exprese byla u daných vzorků nižší než u kontrolních vzorků. Gen dostáhl pouze kolem 77 % z hodnoty exprese kontrol.

Je patrné, že vytipované geny by měly mít vztah k IM, i když hladiny exprese nebyly významně odlišné od kontrolních vzorků, ale velký vliv na jejich expresi má jistě i imunitní odpověď organismu, zapojení v buněčné signalizaci či apoptóza. Spojení mezi změnou exprese těchto genů a IM bude muset být ještě potvrzeno dalšími experimenty.

7 Závěr

Na celogenomových expresních čípech firmy Illumina, Inc. bylo zpracováno 174 vzorků RNA izolované ze stabilizované plné krve pacientů s akutním infarktem myokardu, cévní mozkovou příhodou a k nim přiřazených kontrolních jedinců. Podařilo se mi zpracovat požadovaný počet čipů, každý se šesti pozicemi pro vzorky.

Podle našich zkušeností je možné použít periferní plnou krev pro expresní čipovou analýzu, pokud se ihned po odběru smíchá s *RNAlater*[®], který okamžitě zastavuje činnost RNáz a je slučitelný s většinou izolačních technik RNA. Hlavní výhodou tohoto postupu je malá invazivita pro pacienta a možnost dlouhodobého skladování vzorků.

Mezi problémy tohoto postupu patří dosažení dostatečné kvality a koncentrace RNA pro amplifikaci a hybridizaci s limitujícím objemem odebrané krve, především v akutní fázi, která je rozhodující. Dále nutnost odstraňovat globinovou frakci RNA, která je jinak přednostně amplifikována. Právě nutnost další manipulace s RNA může vést ke snižování její kvality, i když determinující se jevila spíše kvalita odebraného vzorku. Kritickými parametry jsou též nalezení vhodných kontrol a závažnost akutního stavu pacienta.

Pro získávání rozumného počtu genů ze statistických analýz jsme zvolili 5 % hladinu statistické významnosti. Pro klinickou významnost jsme určili hodnotu FC rovnou dvěma v absolutní hodnotě.

Na základě výsledků statistické analýzy pomocí lineárního modelu LIMMA na souboru čtyřiatřiceti vzorků byla vybrána skupina pěti genů. Podle našich výsledků dochází ke změně exprese u pacientů, kteří zemřeli do šesti měsíců po AIM z kardiovaskulárních příčin oproti těm, kteří příhodu přežijí, u genů TCRA, LOC650751, LOC650761, PRR6 a TMEM98, u nichž dosud nebyl prokázán vztah k IM. Zjištěná změna exprese u této skupiny genů se jeví statisticky a klinicky významně jako prognostická ve smyslu očekávané doby přežití pacientů s primárním výskytem infarktu myokardu a je tudíž spojena s vyšším rizikem úmrtí.

V návaznosti na pokračující vyhodnocování výsledků s přibývajícím množstvím vzorků byla provedena kontrolní RT-PCR, ve které bylo analyzováno osm genů, u nichž byla zjišťována míra exprese. Kromě genu ADORA 3 a SPATC 1 genu, který byl kontrolní, měly všechny geny zvýšenou relativní expresi oproti kontrolním vzorkům. Gen pro ARG 1 již byl publikován v souvislosti s IM.

8 Seznam použitých zkratek

A - adenin

ABHD4 (abhydrolase domain containing 4)

ADORA 3 (adenosine A3 receptor) - gen pro adenzinový A3 receptor

A3AR (adenosine A3 receptor) - adenzinový A3 receptor

ADP - adenzindifosfát

ADRB1 (adrenergic, beta-1- receptor)

AIM - akutní infarkt myokardu

ALT - alaninaminotransferáza

APTT - aktivovaný parciální tromboplastinový čas

AST - aspartátaminotransferáza

ARG 1 (arginase 1) - argináza 1

C - cytosin

cAMP - cyklický adenzinmonofosfát

CCDS (the consensus coding sequence) - konsenzuální sekvence

CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2) - ligand 2 pro chemokiny s motivem C-C

CCL11 (chemokine (C-C motif) ligand 11) - ligand 11 pro chemokiny s motivem C-C

CCR2 (chemokine (C-C motif) receptor 2) - receptor 2 pro chemokiny s motivem C-C

CCR3 (chemokine (C-C motif) receptor 3) - receptor 3 pro chemokiny s motivem C-C

cDNA - komplementární DNA

CENPV (centromere protein V) - centromerický protein V

CETP (cholesteryl ester transfer protein) - transportní protein ester cholesterolu

CGH čipy (comparative genomic hybridization) - komparativní genomická hybridizace

CK - kreatinkináza

CK - MB mass - kreatinkináza srdečního svalu

CL-IB-MECA ([2-chloro-N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5_Nmethylcarboxamide])

CMP - cévní mozková příhoda

CRP - C reaktivní protein

cRNA - komplementární RNA

CXCL16 (chemokin CXC ligand 16)

Cy3 (cyanine dyes) - cyaninové barvivo, chráněná značka společnosti Amersham

Cy5 (cyanine dyes) - cyaninové barvivo, chráněná značka společnosti Amersham

ČR - Česká republika

DAD 1 (defender against cell death 1) - obránce proti buněčné smrti 1

DAG - 1,2-diacylglycerol

DM - diabetes mellitus

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DNáza I - deoxyribonukleáza I

dsDNA - dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina

EDRF (endotelium derived relaxing faktor) - endotelem produkováný relaxační faktor

EKG - elektrokardiogram

ENPP1 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1)

ER - endoplazmatické retikulum

ERLIN 1 (endoplasmatic reticulum lipid RAFT-associated protein 1)

ET - 1 - endotelin 1

EU - Evropská unie

FC - fold change

FGF (fibroblast growth factor) - fibroblastový růstový faktor

FOS (V-FOS FBJ Murine osteosarcoma viral oncogene)

FOSB (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B)

FOSL1 (FOS-like antigen 1)

FOSL 2 (FOS-like antigen 2)

FRET (fluorescence resonance energy transfer) - fluorescenční rezonanční přenos energie

G - guanin

Gly - glycin

GP IIb/IIIa - glykoprotein IIb/IIa

GWAS (genome wide - associating study) - genomová asociační studie

HBA1c - glykovaný hemoglobin

HDAC (histone deacetylases) - histondeacetyláza

HDL (high - density lipoprotein) – vysokodenzitní lipoprotein

HK - housekeeping gen

Hod - hodina

HPRT (hypoxanthine Guanine Phosphorybosyl transferasa 1)

HSP 60 - tepelný šokový protein 60

ICAM -1 (inter-cellular adhesion molecule 1) - intracelulární adhezivní molekula 1

IGF - 1 (insulin-like growth factor 1) - inzulinu podobný růstový faktor

ICHS - ischemická choroba srdeční

IL1B (interleukin 1 β) - interleukin 1 beta

IL - 1 - interleukin 1

IL - 6 - interleukin 6

IL - 8 - interleukin 8

IL18RAP (IL-18 receptor accessory protein) - s interleukin 18 receptorem spojený protein

IL18R1 (IL 18 receptor 1) - interleukin 18 receptor 1

IM - infarkt myokardu

IP2 - inositoldifosfát

IP3 - inositoltrifosfát

IP4 - inosoltetrafosfát

IP3Rs - inositol 1, 4, 5-trifosfátový receptor

KATP - ATP senzitivní draslíkové kanály

KO - krevní obraz

KVO - kardiovaskulární onemocnění

LD - laktátdehydrogenáza

LDL (low - density lipoprotein) – nízkodenzitní lipoprotein

LOX- 1 (lecitin - like oxidized LDL receptor) - lecitinu podobný oxidovaný LDL receptor

LTA - lymfotoxin α

MAPKs (mitogen-activated protein kinases) - mitogeny aktivovaná protein kinázy

MCP - 1 (monocyte chemotactic protein-1) - monocytární chemotaktický protein 1

MEF2A (myocyte enhancer factor 2A) - myocytární posilovací faktor 2

MEMS (microelectromechanical systems) - mikroelektromechanický systém

METTL 3 (methyltransferase like 3)

MIAT (myocardial infarction associated transcript) - transkript spojený s infarktem myokardu

min - minuta

ml - mililitr

mmol/l - milomol na litr

mRNA (messenger RNA) - mediátorová RNA

- NH₂ - aminoskupina

ng - nanogram

ng/ μ l - nanogram na mikrolitr

NONSTEMI (non-ST elevation MI) - křivka EKG bez elevace v ST úseku

= O - ketonová skupina

Obr. - obrázek

- OH - hydroxylová skupina

oxLDL - oxidovaný nízkodenzitní lipoprotein

PCA (principal component analysis) - analýza hlavních komponent

PCR (polymerase chain reaction) - polymerázová řetězová reakce

PDGF (platelet-derived growth factor) - růstový faktor produkováný destičkami

PECAM - 1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule)

pg - pikogram

PI3 - fosfatidylinositol-3-fosfát

PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate)

PRR6 (prolin-rich 6)

QCA systems (medis quantitative sonary angiography systems)

QT - Quickův test

RhoA (Ras homolog gene family, member A)

RIN (RNA integrity number) - číslo integrity RNA

RNA - ribonukleová kyselina

RNáza H - ribonukleáza H

rpm (revolutions per minute) - otáčky za minutu

ROS 1 (c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase)

RT - reverzní transkripce

SALL 2 (sal - like 2)

SLC6A4 - (solute carrier family 6, member 4) - rozpustný nosič rodiny 6, člen 4

s - sekunda

SNP - (single nucleotide polymorphism) – jednonukleotidová záměna

SPATC 1 (spermatogenesis- and centriole-associated 1)

STEMI (ST Elevation Myocardial Infarction) - elevace křivky EKG v úseku S-T zapříčiněná infarktem myokardu

T - thymin

Tab. - tabulka

TCRA (T-cell antigen receptor, polypeptide alfa) - antigenní receptor T buněk

TGF α (transforming growth factor α) - transformující růstový faktor α

TGF β (transforming growth factor β) - transformující růstový faktor β

TMEM98 (transmembrane protein 98) - transmembránový protein 98

TNF α (tumor necrosis factor) - tumor nekrotizující faktor α

TSP - trombospodin

TRAV1 - 1 (T cell receptor alpha variable 1 -1)

Trp - tryptofan

$\mu\text{g/l}$ - mikrogram na litr

μl - mikrolitr

μM - mikromolární

USA (The United States of America)- Spojene státy americké

UV - ultrafialové záření

VAMP 8 (vesicle-associated membrane protein 8)

VCAM - 1 (vascular cell adhesion protein 1) - adhezní protein cévních buněk

VNN3 - vannin 3

VPREB1 (pre-B lymphocyte 1) - pre-B lymfocyt 1

vWF - Von Willebrandův faktor, faktor koagulační kaskády

18S - menší podjednotka ribozomu

28S - větší podjednotka ribozomu

9 Seznam použité literatury

Ahmed FE. 2006. Microarray RNA transcriptional profiling: Part I. Platforms, experimental design and standardization. *Expert Rev. Mol. Diagn.*6: 4.

Allen S, Dashwood M, Morrison K, Yacoub M. 1998. Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 97: 2406-2413.

Aulchenko YS, Struchalin MV, Van Duin CM. 2010. ProbABEL package for genome-wide association analysis of imputed data. *BMC bioinformatics* 2010,11: 134.

Bacci S, Ludovico O, Prudente S, Zhang YY, Di Paola R, Mangiacotti D, Rauseo A, Nolan D, Duffy J, Fini G, Salvemini L, Amico C, Vigna C, Pellegrini F, Menzaghi C, Doria A, Trischitta V. 2005. The K121Q polymorphism of the ENPP1/PC-1 gene is associated with insulin resistance/atherogenic phenotypes, including earlier onset of type 2 diabetes and myocardial infarction. *Diabetes* 54: 3021-3025.

Bartoš V, Pelikánová T a kol. 2003a. *Praktická diabetologie: Klasifikace a patogeneze diabetu*. Praha: Maxdorf. p 13-46.

Bartoš V, Pelikánová T a kol. 2003b. *Praktická diabetologie: Základní poznatky o diabetu*. Praha: Maxdorf. p 13-46.

Benjamini Y, Kenigsber E, Reiner A, Yekutieli D. 2005. FDR adjustments of microarray experiments. Department of statistics and O.R., Tel Aviv. University: 1-3.

Boerma M, Forsberg L, Van Zeijl L, Morgenstern R, De Faire U, Lemne C, Erlinge D, Thulin T, Hong Y, Cotgreave IA. 1999. A genetic polymorphism in connexin 37 as a prognostic marker for atherosclerotic plaque development. *Journal of internal medicine* 246: 211-218.

Brdička R, Bručková H. 2006. Vznik a rozmach čipových technologií. *Klinická onkologie* 19: 331-332.

Clark HF, Gurney AL, Abaya E, Baker K, Baldwin D, Brush J, Chen J, Chow B, Chui C, Crowley C, Currell B, Deuel B, Dowd P, Eaton D, Foster J, Grimaldi Ch, Gu Q, Hass PE, Heldens S, Huang, A, Kim HS, Klimowski L, Jin Y, Johnson, Lee J, Lewis L, Liao D, Mark M, Robbie E, Sanchez C, Schoenfeld J, Seshagiri S, Simmons L, Singh J, Smith V, Stinson J, Vagts A, Vandlen R, Watanabe C, Wieand D, Woods K, Xie MH, Yansura D, Yi S, Yu G, Yuan J, Zhang M, Zhang Z, Goddard A, Wood WI, Godowski P. 2003. The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. *Genome Res.* (10): 2265-2270.

- Davies MJ. 2000. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 83: 361-366.
- Derumeaux G, Loufoua J, Pontier G, Cribier A, Ovize M. 2001. Tissue doppler imaging differentiates transmural from nontransmural acute myocardial infarction after reperfusion therapy. *Circulation* 103: 589-596.
- Dumont J, Zureik M, Cotel D, Montaye M, Ducimetière P, Amouyel P, Brousseau T. 2007. *J Med Genet* 44: 526-531.
- Economou E, Tousoulis D, Katinioti A, Stefanadis C, Trikas A, Pitsavos C, Tentolouris C, Toutouza MG, Toutouzas P. 2001. Chemokines in patients with ischaemic heart disease and the effect of coronary angioplasty. *International Journal of Cardiology* 80: 55-60.
- Elrayess MA, Webb KE, Bellingan GF, Whittall RA, Kabir J, Hawe E, Syväne M, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesäniemi YA, Pasternack A, Miller GJ, Humphries SE. 2004. R643G polymorphism in PECAM -1 influences transendothelial migration of monocytes and is associated with progression of CHD and CHD events. *Atherosclerosis* 177: 127-135.
- Eriksson P, Kallin B, Van't Hooft F, Båvenholm P, Hamsten A. 1995. Allele - specific increase in basal transcription of the plasminogen - activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1851-1855.
- Fan JB, Hu SX, Craumer WC, Barker DL. 2005. BeadArray™ – based solution for enabling the promise of pharmacogenomics. *BioTechniques* 39: 583-588.
- Fodor SPA, Pirrung MC. 1991. Light-Directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251: 767-773.
- Fumeron F, Betoulle D, Nicaud V, Evans A, Kee, F, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Cambien F. 2002. Serotonin transporter gene polymorphisms and myocardial infarction: Etude Cas-Témoins de l'Infarctus du myocarde (ECTIM). *Circulation* 105: 2943-2945.
- Fuster V. 1999. Acute coronary syndromes: The degree and morphology of coronary stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 34: 1854-1856.
- Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K. 1998. Activated platelets induce monocyte chemotactic Protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 98: 1164-1171.
- Ge ZD, Peart JN, Kreckler LM, Wan TC, Jacobson MA, Gross GJ, Auchampach JA. 2006. Cl-IB-MECA [2-Chloro-N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5_-N-methylcarboxamide] reduces ischemia/reperfusion injury in mice by activating the A3 Adenosine receptor. *JPET* 319: 1200-1210.

- Gorden KS, Hall W, Hall E. 2004. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* 3: 1-26.
- Grochová I, Groch L. 2007. Genetika v Kardiologii. Část IV. Polygeně podmíněné kardi-ovaskulární nemoci; možnosti genové terapie v kardiologii. *Cor Vasa* 49: 327-332.
- Hojo Y, Ikeda U, Zhu Y, Okada M, Ueno S, Arakawa H, Fujikawa H, Katsuki T, Shimada K. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35: 968-973.
- Hughes T, Tillo D. 2006. *Algorithms in Molecular Biology*: 1-8.
- Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Gattone M, Pezzini A, Assanelli D, Lorenzet R, Del Zotto E, Colombo M, Napoleone E, Amore C, D Orazio A, Padovani A, De Gaetano G, Gianuzzi P, Donati MB. 2005. Polymorphisms of the Interleukin-1b gene affect the risk of myocardial infarction and ischemic stroke at young age and the response of mononuclear cells to stimulation in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 222-227.
- Ishii N, Ozaki K, Sato H, Mizuno H, Saito S, Takahashi A, Miyamoto Y, Ikegawa S, Kamatani N, Hori M, Saito S, Nakamura Y, Tanaka T. 2006. Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *J Hum Genet* 51: 1087-1099.
- Iwai CH, Akita H, Kanazawa K, Shiga N, Terashima M, Matsuda Y, Takai E, Miyamoto Y, Shimizu M, Kajiya T, Hayashi T, Yokoyama M. 2003. Arg389Gly polymorphism of the human β 1-adrenergic receptor in patients with nonfatal acute myocardial infarction. *Am Heart J* 146: 106-109.
- Kaartinen M, Penttila A, Kovanen PT. 1996. Mast cells in rupture-prone areas of human coronary atheromas produce and store TNF- α . *Circulation* 94: 2787-2792.
- Kalina M a kolektiv. 2008. Cévní mozková příhoda v medicínské praxi: Patofyziologie ischemické příhody Praha: Triton. p 47-55.
- Kim HS, Kim DH, Kim JY, Jeoung NH, Lee IK, Bong JG, Jung ED. 2010. Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean. *Intern Med* 25: 399-407.
- Kinosian B, Glick H, Garland GD. 1994. Cholesterol and coronary heart disease: Predicting risks by levels and ratios. *Ann Intern Med* 121: 641-647.
- Kulesh D, Clive D. 1987. Identification of interferon – modulated proliferation-related cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84: 8453-8454.

- Lanktree MB, Hegele RA. 2009. Gene-gene and gene-environment interactions: new insights into the prevention, detection and management of coronary artery disease. *Genome Medicine* 1 (28): 1-11.
- Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH. 1997. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13057-13059.
- Lee JE, Bokoch G, Liang BT. 2001. A novel cardioprotective role of RhoA: new signaling mechanism for adenosine. *FASEB J.* 15: 1886-1894.
- Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr. 1991. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 325: 997-1001.
- Li D, Mehta JL. 2000. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL – mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 101: 2889-2895.
- Libby P. 1995. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 91: 2844-2850.
- Liu Y, Fu L, Chen DG, Deeb SS. 2007. Identification of novel retinal target genes of thyroid hormone in the human WERI cells by expression microarray analysis. *Vision Res.* 47: 2314-2326.
- Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Lackland D, Lisabeth L, Mareseli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J. 2010. Heart Disease and Stroke Statistics 2010 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 121: e46-e215.
- Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM. 1990. Lipoprotein (a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* 10: 240-245.
- Lu XY, Phung MT, Shaw CA, Pham K, Neil SE, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Stanekiewicz P, Kang SL, Lalani S, Chinault AC, Lupski JR, Cheung SW, Beaudet AL. 2008. Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* 122: 1310-1318.
- Lundberg GA, Kellin A, Samnegård A, Lundman P, Tornvall P, Dimmeler S, Zeiher AM, Hamsten A, Hansson GK, Eriksson P. 2005. Severity of coronary artery stenosis is associated with a polymorphism in the CXCL16/SR-PSOX gene. *Journal of internal medicine* 257: 415-422.

- Malek AM, Alper SL, Izumo S. 1999. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282: 2035-2042.
- McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, Keaney JF, Larson MG, Vasani RS, Hirschhorn JN, O'Donnell CHJ, Murphy PM, Benjamin EJ. 2005. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein -1 levels and myocardial infarction in the Framingham heart study. *Circulation* 112: 1113-1120.
- Merkerová A, Kráčmerová A, Bruchová H. 2006. Využití biočipových technologií v onkologii. *Klinická onkologie* 19: 333-344.
- Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A. 2004. RNA integrity number (RIN) – standardization of RNA quality control. *Agilent*: 1-8.
- Nelken NA, Coughlin SH, Gordon D, Wilcox JN. 1991. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest* 88: 1121-1127.
- Nickenig G, Jung O, Strehlow K, Zolk O, Lint W, Scholkens BA, Bohm M. 1997. Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT 1-receptor expression. *Am J Physiol* 272: 2701-2707.
- Ozaki K, Tanaka T. 2005. Genome - wide association study to identify SNPs conferring risk of myocardial infarction and their functional analyses. *CMLS* 62: 1804-1813.
- Peart JN, Headrick JP. 2007. Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways. *Pharmacology a Therapeutics* 114: 208–221.
- Prescott E, Hippe M, Schnohr P, Hein HO, Vestbo J. 1998. Smoking and risk of myocardial infarction in women and men: longitudinal population study. *BMJ* 316: 1043-1047.
- Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Arora S, Gilligan DM, Panta JA, Cannon RO. 1995. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 95: 1747-1755.
- Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisel S, Xu XO, Chai NN, Fishbein MC, Kaul S, Cercek B, Sharifi B, Shah PK. 1999. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation* 99: 3103-3109.
- Ridker PM, Hennekens ChH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. 1997. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 95: 59-62.

- Ritchie ME, Silver J, Oshlack A, Holmes M, Diyagama D, Holloway A, Smyth GK. 2007. A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 23: 2700-2707.
- Roest M, Van der Schouw YT, Banga JD, Tempelman MJ, De Groot PG, Sixma JJ, Grobbee DE. 2000. Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. *Circulation* 101: 67-70.
- Romm PA, Green CE, Reagan K, Reagan K, Rackley CE. 1991. Relation of serum lipoprotein cholesterol levels to presence and severity of angiographic coronary artery disease. *Am J of cardiology* 67: 479-483.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Mart G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1,42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928-933.
- Satterthwaite G, Francis SE, Suvarna K, Blakemore S, Ward CH, Wallace D, Braddock M, Crossman D. 2005. Differential gene expression in coronary arteries from patients presenting with ischemic heart disease: further evidence for the inflammatory basis of atherosclerosis. *American Heart Journal* 150: 488-499.
- Shena M, Shalon D, Davis WR. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schiffman D, Rowland CHM, Louie JZ, Luke MM, Bare LA, Bolonick JI, Young BA, Catanese JJ, Stiggins CHF, Pullinger CR, Topol EJ, Malloy MJ, Kane JP, Ellis SG, Devlin J. 2006. Gene variants of VAMP8 and HNRPUL1 are associated with early-onset myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1613-1618.
- Shiffman D, Ellis SG, Rowland CM, Malloy MJ, Luke MM, Iakoubova OA, Pullinger CR, Cassano J, Aouizerat BE, Fenwick RG, Reitz RE, Catanese JJ, Leong DU, Zellner C, Sninsky JJ, Topol EJ, Devlin JJ, Kane JP. 2005. Identification of four gene variants associated with myocardial infarction. *AM. J. Hum. Genet.* 77: 596-605.
- Shih PT, Elices MJ, Fang ZT, Ugarova TP, Strahl D, Territo MC, Frank JS, Kovach NL, Cabanas C, Berliner JA, Vora DK. 1999. Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating b1 integrin. *J Clin Invest* 103: 613-625.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Lieber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular biology* 7: 3-17.

- Simonini A, Moscucci M, Muller DW, Bates ER, Pagani FD, Burdick MD, Strieter RM. 2000. IL-8 is an angiogenic factor in human coronary atherectomy tissue. *Circulation* 101: 1519-1526.
- Smyth GK, Hall W, Hall E. 2004. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* 3: 1-26.
- Smyth GK, Speed T. 2003. Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31: 265-273.
- Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH. 1992. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *Jama* 268: 877-881.
- Štěpánek J, Sitar J, Novák M. 2005. Akutní kardiovaskulární příhody a meziplanetární prostředí. *Bioklimatologie současnosti a budoucnosti*: 1-7.
- Špaček R, Widimský P. 2003a. Infarkt myokardu: Definice infarktu myokardu. Praha: Galén. p 13.
- Špaček R, Widimský P. 2003b. Infarkt myokardu: Nestabilní plát. Praha: Galén. p 31-34.
- Špaček R, Widimský P. 2003c. Infarkt myokardu: Rizikové faktory aterosklerózy. Praha: Galén. p 28-29.
- Tavares TS, Nanus D, Yang XJ. 2008. Gene microarray analysis of human retinal cell carcinoma: The effects of HDAC inhibitors and retinoid treatment. *Cancer Biol. Ther.* 7: 1607-1618.
- Tobin MD, Braund PS, Burton PR, Thompson JR, Steeds R, Channer K, Cheng S, Lindpaintner K, Samani NJ. 2004. Genotypes and haplotypes predisposing to myocardial infarction: a multilocus case-control study. *Eur Heart J* 25: 459-467.
- Topol EJ, McCarthy J, Gabriel S, Moliterno DJ, Rogers WJ, Newby LK, Freedman M, Metivier J, Cannata R, O'Donnell J, Kottke - Marchant K, Murugesan G, Flow EF, Stenina O, Daley GQ. 2001. Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin genes may be associated with familial premature myocardial infarction. *Circulation* 104: 2641-2644.
- VanGulde HD, Vrana KE, Freeman WM. 2008. Twenty - five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44: 619-629.
- Verducci JS, Melfi VF, Lin S, Wang Z, Roy S, Sen ChK. 2006. Microarray analysis of gene expression: considerations in data mining and statistical treatment. *Physiol. Genomics* 25: 355-363.

Wang L, Fan CH, Topol S, Topol E, Wang Q. 2003. Mutation of MEF2A in a inherited disorder with features of coronary artery disease. *Science* 302 (5650): 1578-1581.

Weng L, Kavaslar N, Ustaszewska A, Doelle H, Schackwitz W, Hébert S, Cohen JC, McPherson R, Pennacchio L. 2005. Lack of MEF2A mutations in coronary artery disease. *The Journal of clinical investigation* 115, No 4: 1016-1020.

Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M, Yokata M. 2002. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 347, No 24: 1916-1923.

Yeh HI, Chou Y, Liu HF, Chang S-CH, Tsai CHH. 2001. Connexin 37 gene polymorphism and coronary artery disease in Taiwan. *International journal of cardiology* 81: 251-255.

Ylä - Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. 1991. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 5252-5256.

Zee RYL, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Lee RT, Ridker PM. 2004. Threonine for alanine substitution in the eotaxin (CCL11) gene and the risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 175: 91-94.

Zhu X, Cooper RS. 2007. Admixture mapping provides evidence of association of the VNN1 gene with hypertension. *Plos ONE* 2(11): e1244.

Ziya Y, Arslan A, Akarsu E, Erkilic S, Igcı M, Oztuzcu S, Cengiz B, Gogebakan B, Cakmak EA, Demiryurek AT. 2011. Differential expression of a set genes in follicular and classic variants of papillary thyroid carcinoma. *Endor Pathol* 22: 86-96.

Interntové zdroje:

www.affymetrix.com

www.agilent.com

www.ehnheart.org

www.hapmap.org

www.illumina.com

<http://www.bioconductor.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/89037601?report=genbank>

www.genomics.agilent.com/GenericB.aspx?PageType=Custom&SubPageType=Custom&PageID=2011.

<http://www.r-project.org>

www.uzis.cz, 2007. Zdravotnická statistika ČR. Hospitalizovaní v nemocnicích ČR 2007: 63

www.uzis.cz, 2007. Zdravotnická ročenka České Republiky 2007: 32

www.uzis.cz, 2007. Zdravotnická statistika ČR. Hospitalizovaní v nemocnicích ČR 2007: 63

www.uzis.cz, 2008. Zdravotnická ročenka České Republiky 2008: 32

www.uzis.cz, 2008. Zdravotnická statistika ČR. Hospitalizovaní v nemocnicích ČR 2008: 63

www.uzis.cz, 2008. Zdravotnická statistika ČR. Hospitalizovaní v nemocnicích ČR 2008: 63

10 Přílohy

Příloha 1

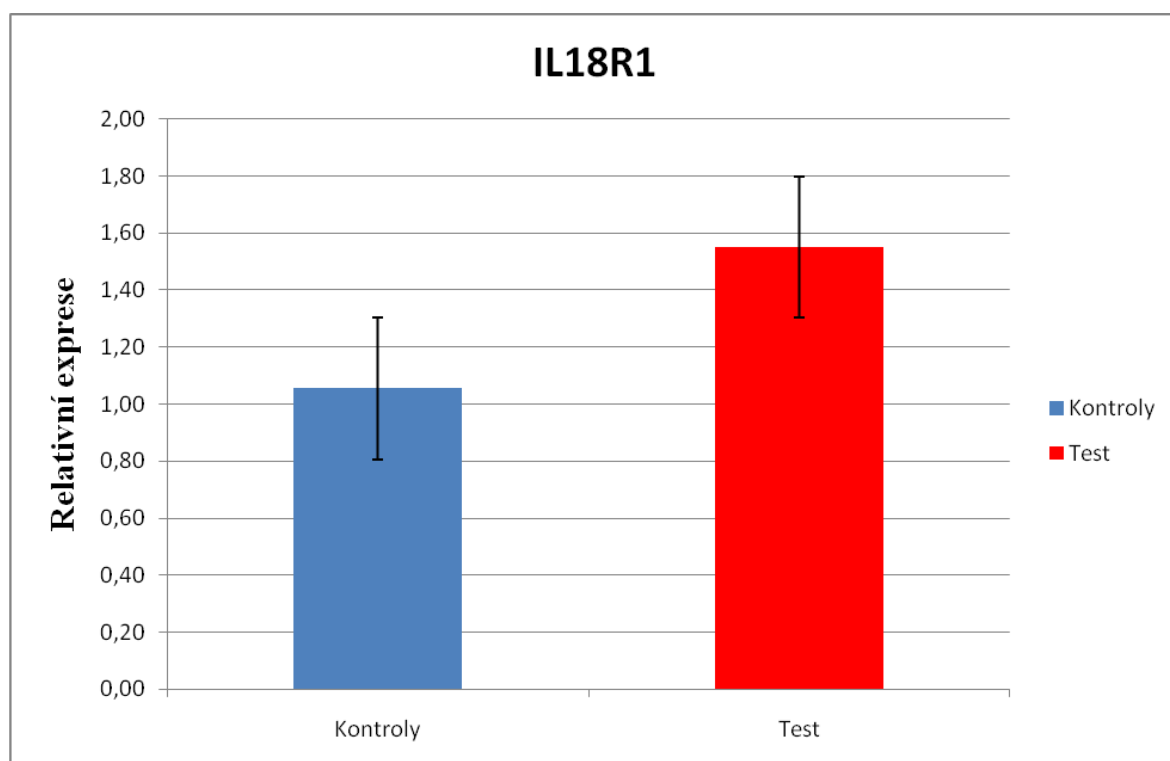
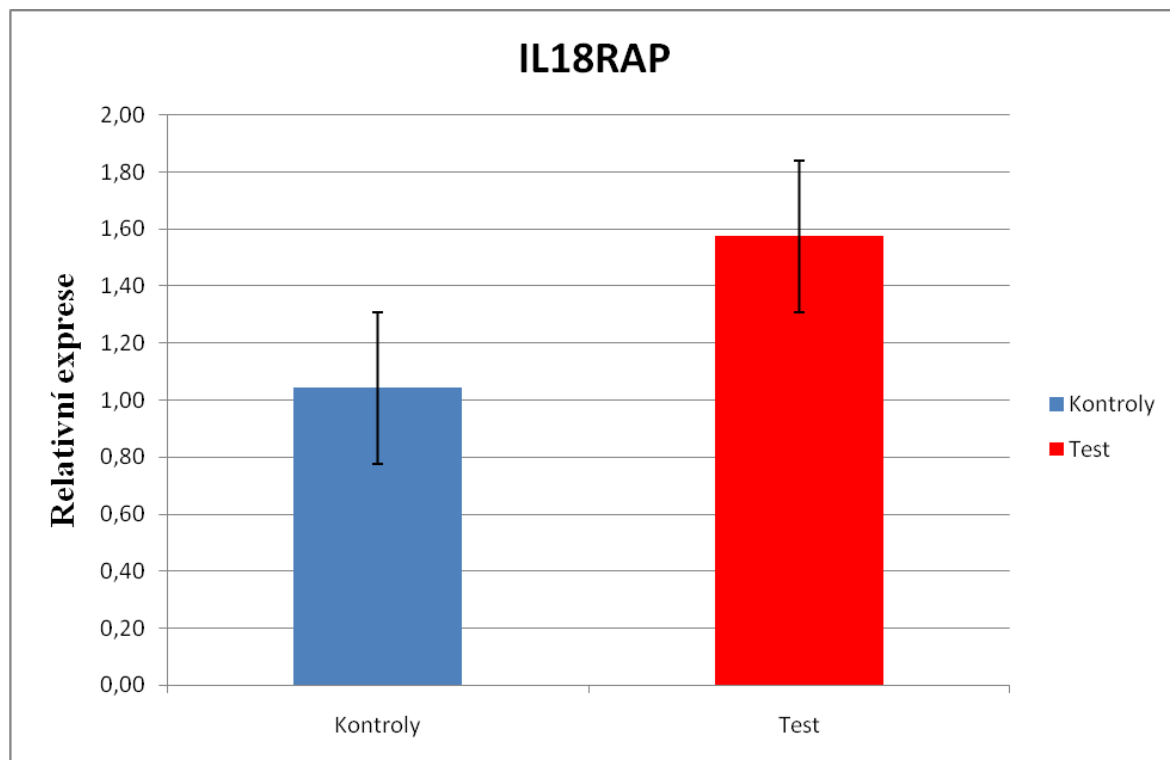
Rozložení vzorků na destičce pro PCR

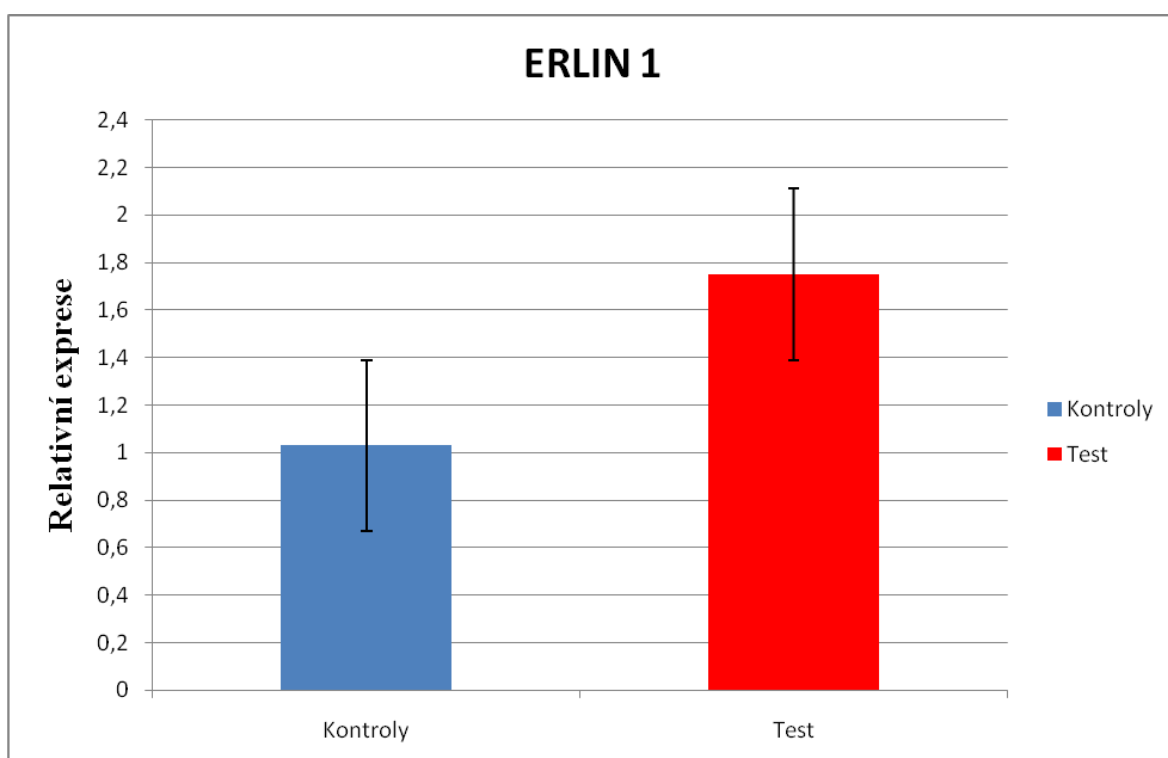
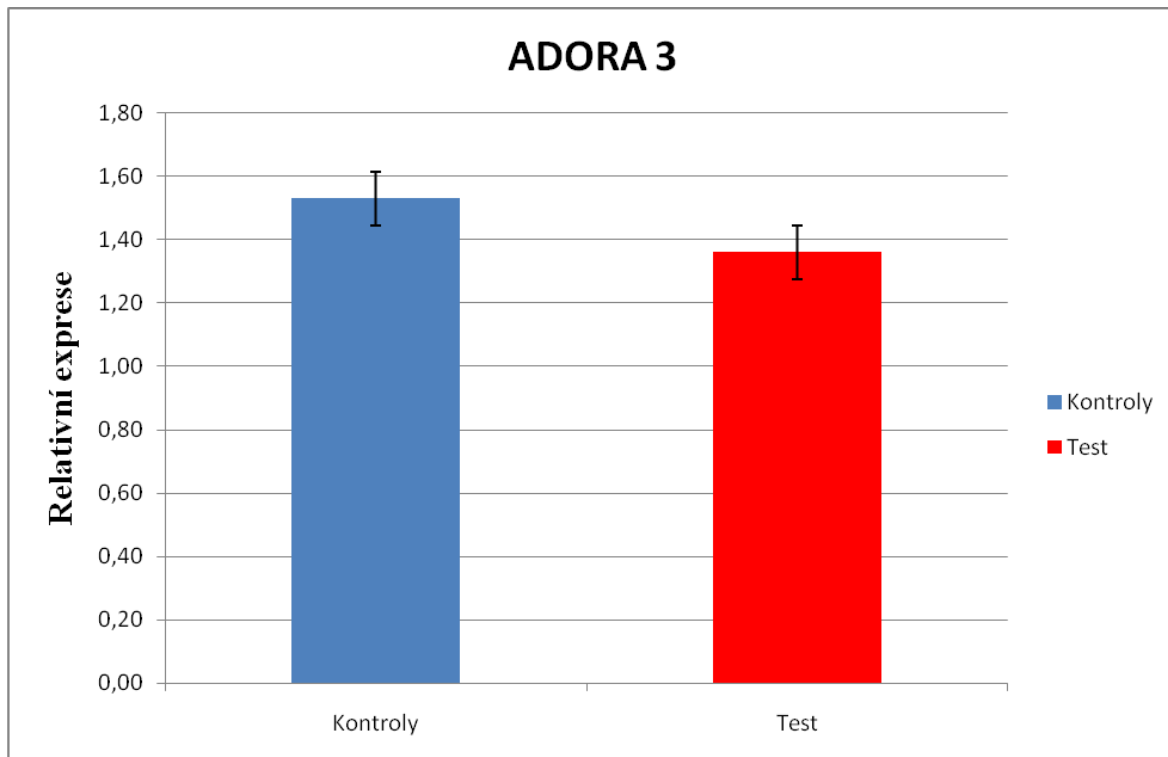
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C305, IL18RAP	C305, IL18RAP	C305, IL18RAP	C305, IL18R1	C305, IL18R1	C305, IL18R1	C305, ADORA3	C305, ADORA3	C305, ADORA3	C305, ERLIN1	C305, ERLIN1	C305, ERLIN1
B	C307, IL18RAP	C307, IL18RAP	C307, IL18RAP	C307, IL18R1	C307, IL18R1	C307, IL18R1	C307, ADORA3	C307, ADORA3	C307, ADORA3	C307, ERLIN1	C307, ERLIN1	C307, ERLIN1
C	C236, IL18RAP	C236, IL18RAP	C236, IL18RAP	C236, IL18R1	C236, IL18R1	C236, IL18R1	C236, ADORA3	C236, ADORA3	C236, ADORA3	C236, ERLIN1	C236, ERLIN1	C236, ERLIN1
D	C292, IL18RAP	C292, IL18RAP	C292, IL18RAP	C292, IL18R1	C292, IL18R1	C292, IL18R1	C292, ADORA3	C292, ADORA3	C292, ADORA3	C292, ERLIN1	C292, ERLIN1	C292, ERLIN1
E	C296, IL18RAP	C296, IL18RAP	C296, IL18RAP	C296, IL18R1	C296, IL18R1	C296, IL18R1	C296, ADORA3	C296, ADORA3	C296, ADORA3	C296, ERLIN1	C296, ERLIN1	C296, ERLIN1
F	C242, IL18RAP	C242, IL18RAP	C242, IL18RAP	C242, IL18R1	C242, IL18R1	C242, IL18R1	C242, ADORA3	C242, ADORA3	C242, ADORA3	C242, ERLIN1	C242, ERLIN1	C242, ERLIN1
G	C335, IL18RAP	C335, IL18RAP	C335, IL18RAP	C335, IL18R1	C335, IL18R1	C335, IL18R1	C335, ADORA3	C335, ADORA3	C335, ADORA3	C335, ERLIN1	C335, ERLIN1	C335, ERLIN1
H	C140, IL18RAP	C140, IL18RAP	C140, IL18RAP	C140, IL18R1	C140, IL18R1	C140, IL18R1	C140, ADORA3	C140, ADORA3	C140, ADORA3	C140, ERLIN1	C140, ERLIN1	C140, ERLIN1
I	C297, IL18RAP	C297, IL18RAP	C297, IL18RAP	C297, IL18R1	C297, IL18R1	C297, IL18R1	C297, ADORA3	C297, ADORA3	C297, ADORA3	C297, ERLIN1	C297, ERLIN1	C297, ERLIN1
J	C141, IL18RAP	C141, IL18RAP	C141, IL18RAP	C141, IL18R1	C141, IL18R1	C141, IL18R1	C141, ADORA3	C141, ADORA3	C141, ADORA3	C141, ERLIN1	C141, ERLIN1	C141, ERLIN1
K	C305, HPRT	C305, HPRT	C305, HPRT	C305,18SrRNA	C305,18SrRNA	C305,18SrRNA		C242, HPRT	C242, HPRT	C242, HPRT	C242,18SrRNA	C242,18SrRNA
L	C307, HPRT	C307, HPRT	C307, HPRT	C307,18SrRNA	C307,18SrRNA	C307,18SrRNA		C335, HPRT	C335, HPRT	C335, HPRT	C335,18SrRNA	C335,18SrRNA
M	C236, HPRT	C236, HPRT	C236, HPRT	C236,18SrRNA	C236,18SrRNA	C236,18SrRNA		C140, HPRT	C140, HPRT	C140, HPRT	C140,18SrRNA	C140,18SrRNA
N	C292, HPRT	C292, HPRT	C292, HPRT	C292,18SrRNA	C292,18SrRNA	C292,18SrRNA		C297, HPRT	C297, HPRT	C297, HPRT	C297,18SrRNA	C297,18SrRNA
O	C296, HPRT	C296, HPRT	C296, HPRT	C296,18SrRNA	C296,18SrRNA	C296,18SrRNA		C141, HPRT	C141, HPRT	C141, HPRT	C141,18SrRNA	C141,18SrRNA
P												

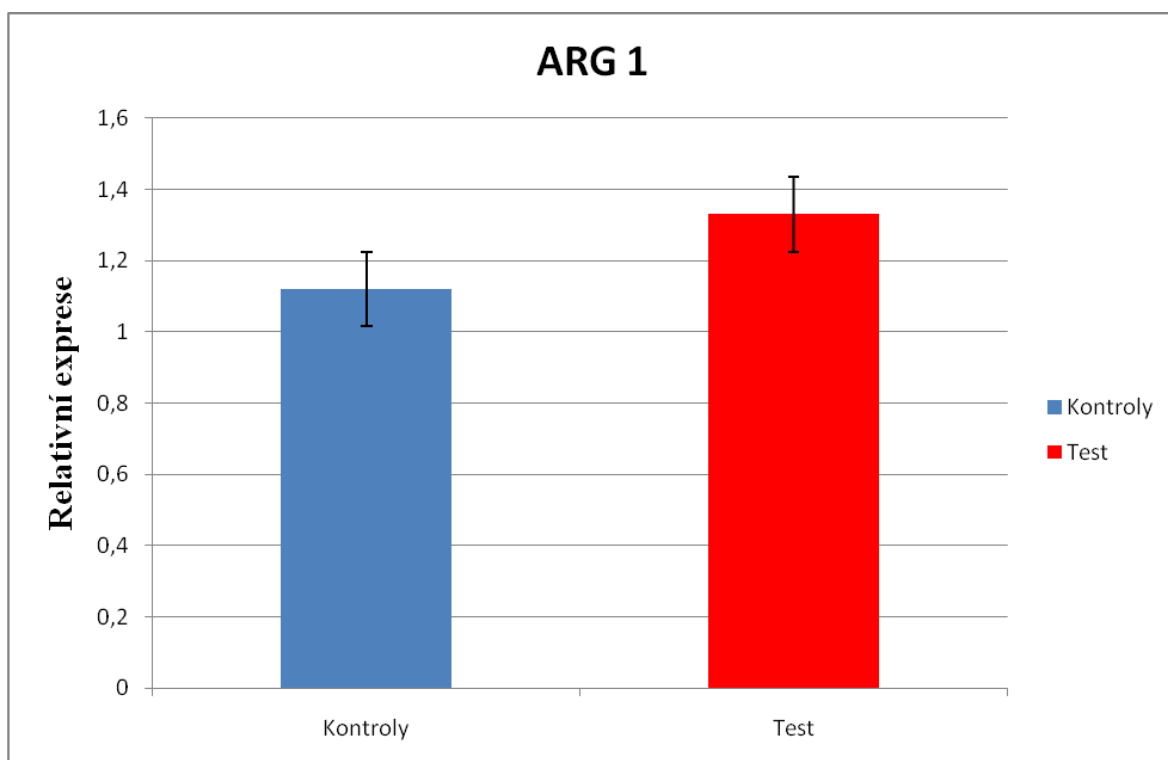
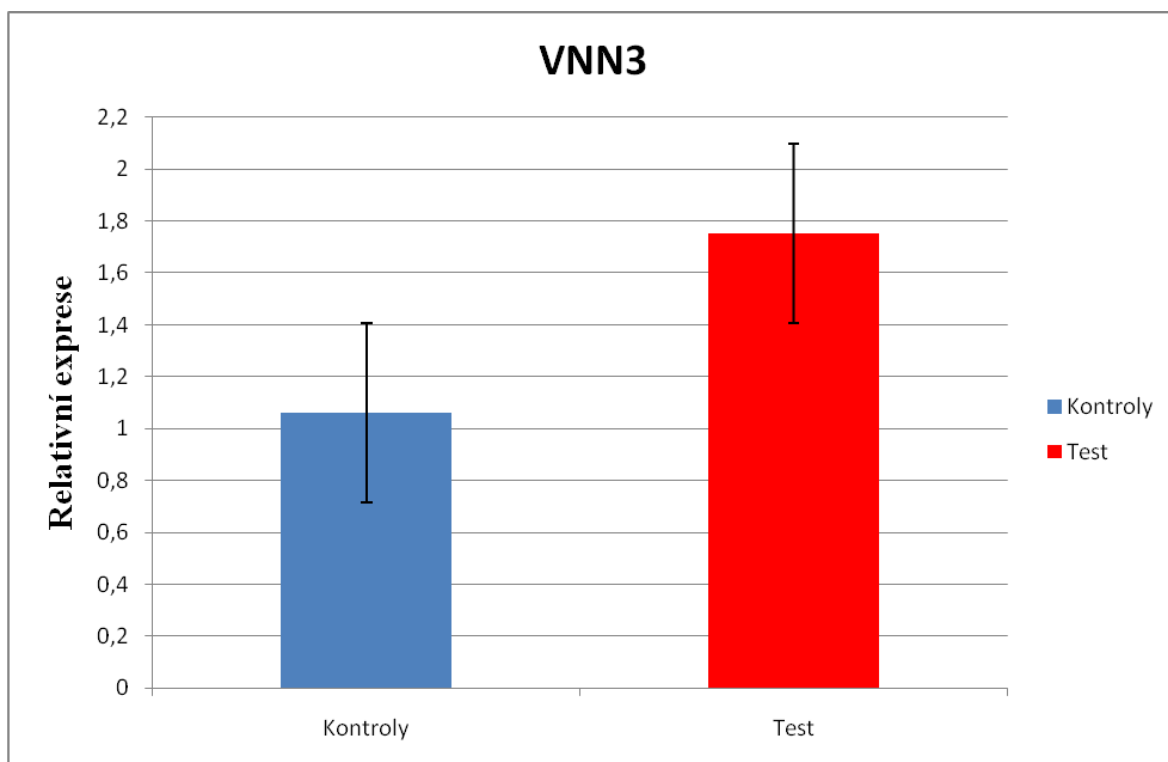
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	C305, VNN3	C305, VNN3	C305, VNN3	C305, ARG1	C305, ARG1	C305, ARG1	C305, FOS	C305, FOS	C305, FOS	C305 NegK, SPATC1	C305 NegK, SPATC1	C305 NegK, SPATC1
B	C307, VNN3	C307, VNN3	C307, VNN3	C307, ARG1	C307, ARG1	C307, ARG1	C307, FOS	C307, FOS	C307, FOS	C307, SPATC1	C307, SPATC1	C307, SPATC1
C	C236, VNN3	C236, VNN3	C236, VNN3	C236, ARG1	C236, ARG1	C236, ARG1	C236, FOS	C236, FOS	C236, FOS	C236, SPATC1	C236, SPATC1	C236, SPATC1
D	C292, VNN3	C292, VNN3	C292, VNN3	C292, ARG1	C292, ARG1	C292, ARG1	C292, FOS	C292, FOS	C292, FOS	C292, SPATC1	C292, SPATC1	C292, SPATC1
E	C296, VNN3	C296, VNN3	C296, VNN3	C296, ARG1	C296, ARG1	C296, ARG1	C296, FOS	C296, FOS	C296, FOS	C296, SPATC1	C296, SPATC1	C296, SPATC1
F	C242, VNN3	C242, VNN3	C242, VNN3	C242, ARG1	C242, ARG1	C242, ARG1	C242, FOS	C242, FOS	C242, FOS	C242, SPATC1	C242, SPATC1	C242, SPATC1
G	C335, VNN3	C335, VNN3	C335, VNN3	C335, ARG1	C335, ARG1	C335, ARG1	C335, FOS	C335, FOS	C335, FOS	C335, SPATC1	C335, SPATC1	C335, SPATC1
H	C140, VNN3	C140, VNN3	C140, VNN3	C140, ARG1	C140, ARG1	C140, ARG1	C140, FOS	C140, FOS	C140, FOS	C140, SPATC1	C140, SPATC1	C140, SPATC1
I	C297, VNN3	C297, VNN3	C297, VNN3	C297, ARG1	C297, ARG1	C297, ARG1	C297, FOS	C297, FOS	C297, FOS	C297, SPATC1	C297, SPATC1	C297, SPATC1
J	C141, VNN3	C141, VNN3	C141, VNN3	C141, ARG1	C141, ARG1	C141, ARG1	C141, FOS	C141, FOS	C141, FOS	C141, SPATC1	C141, SPATC1	C141, SPATC1
K	C242,18SrRNA			voda, IL18RAP	voda, IL18RAP	voda, IL18RAP		voda, ARG1	voda, ARG1	voda, ARG1		
L	C335,18SrRNA			voda, IL18R1	voda, IL18R1	voda, IL18R1		voda, FOS	voda, FOS	voda, FOS		
M	C140,18SrRNA			voda, ADORA3	voda, ADORA3	voda, ADORA3		voda, SPATC1	voda, SPATC1	voda, SPATC1		
N	C297,18SrRNA			voda, ERLIN1	voda, ERLIN1	voda, ERLIN1		voda, HPRT	voda, HPRT	voda, HPRT		
O	C141,18SrRNA			voda, VNN3	voda, VNN3	voda, VNN3		voda, 18SrRNA	voda, 18SrRNA	voda, 18SrRNA		
P												

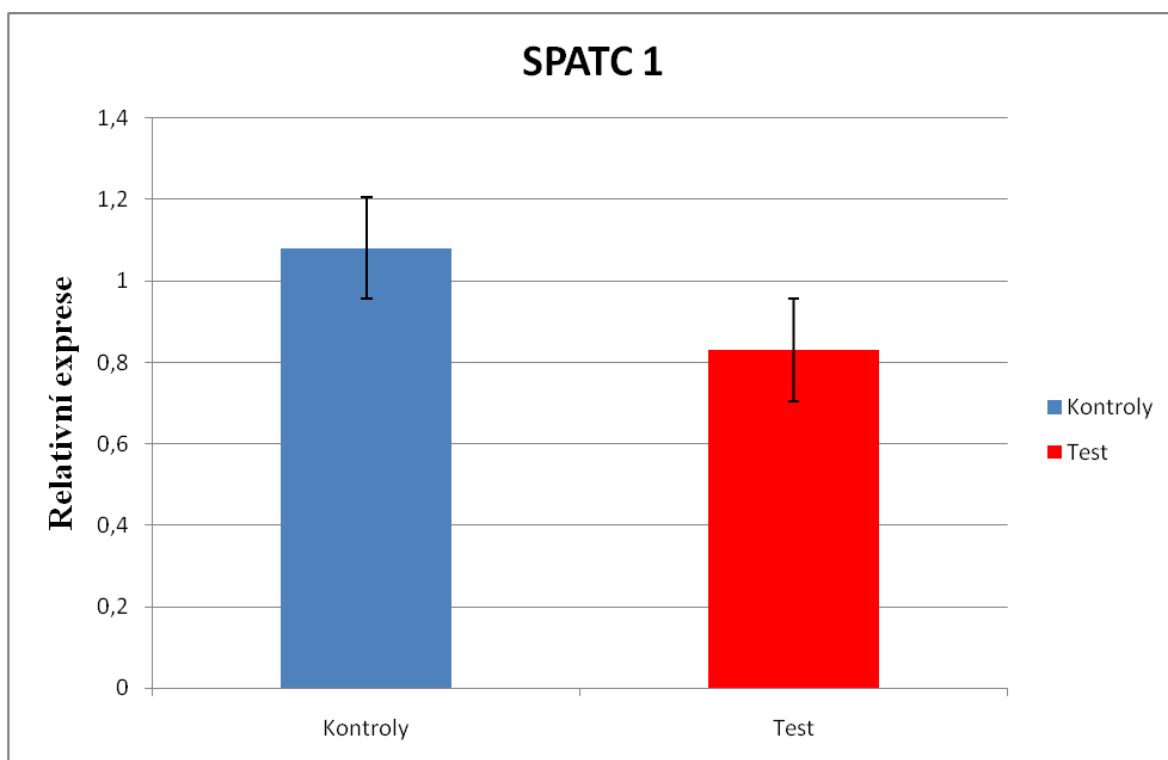
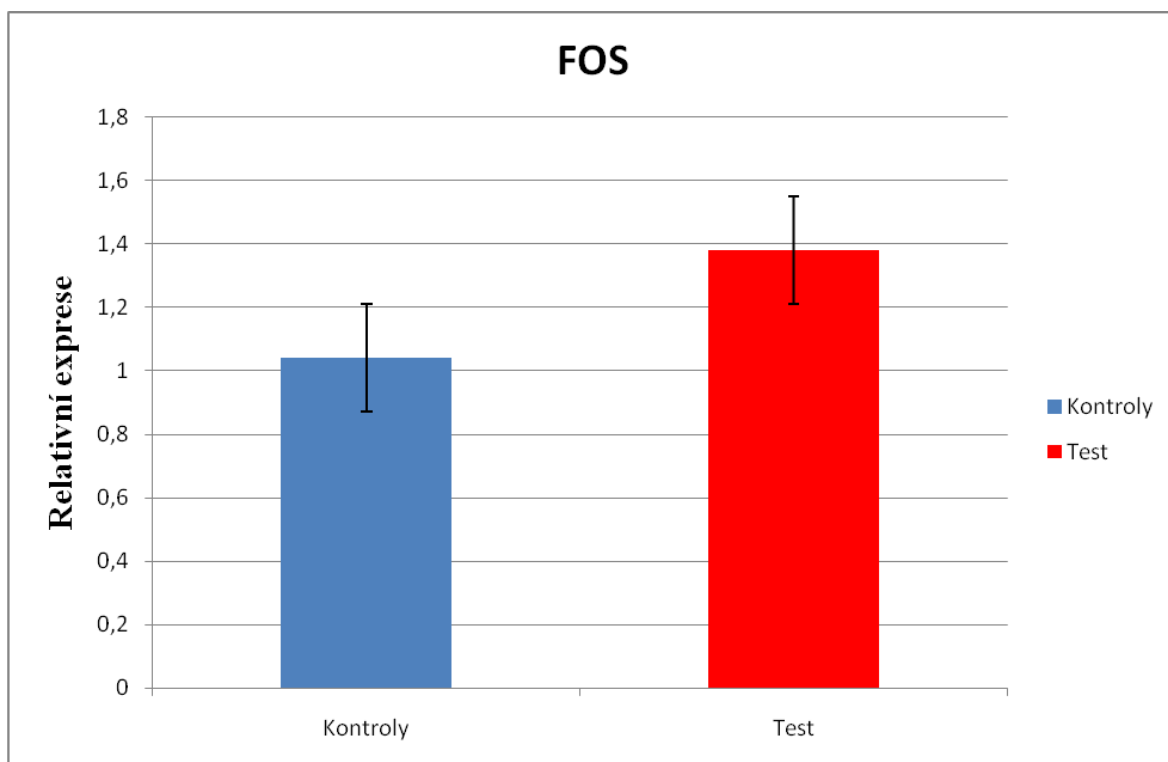
Příloha 2

Grafy porovnání relativní exprese u kontrol a nemocných pro daný gen



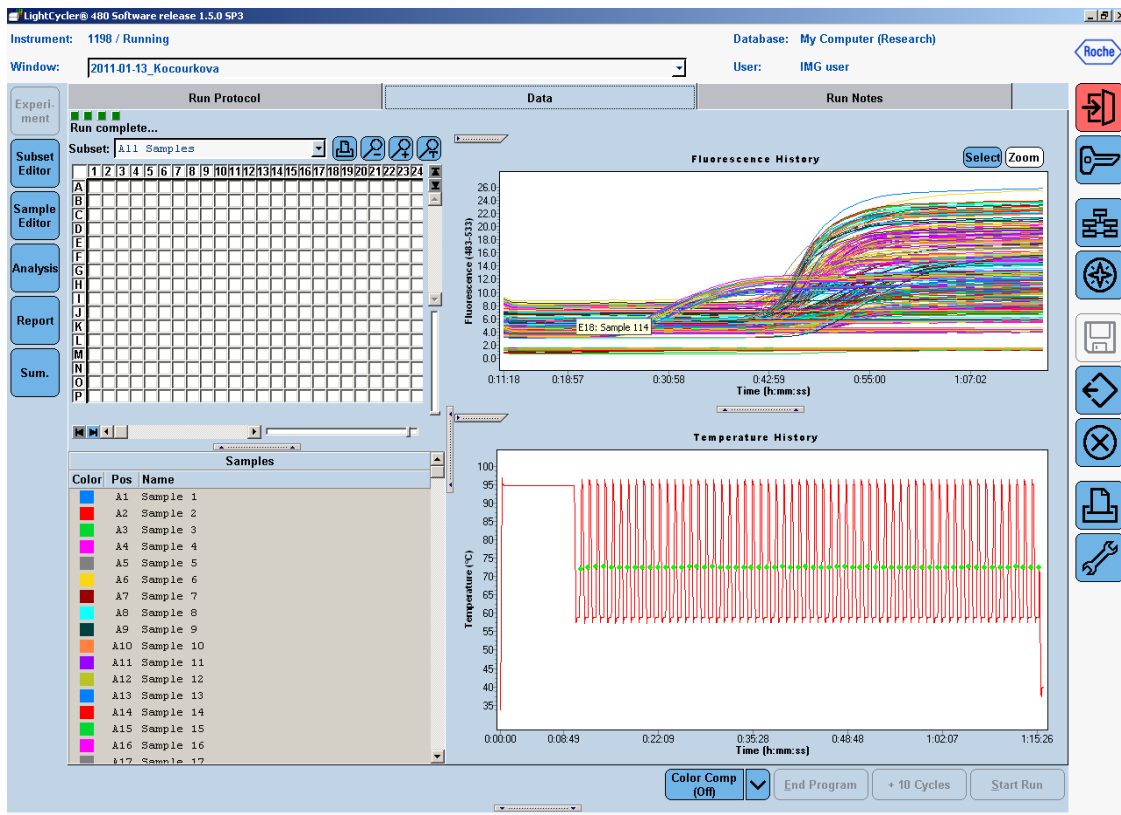
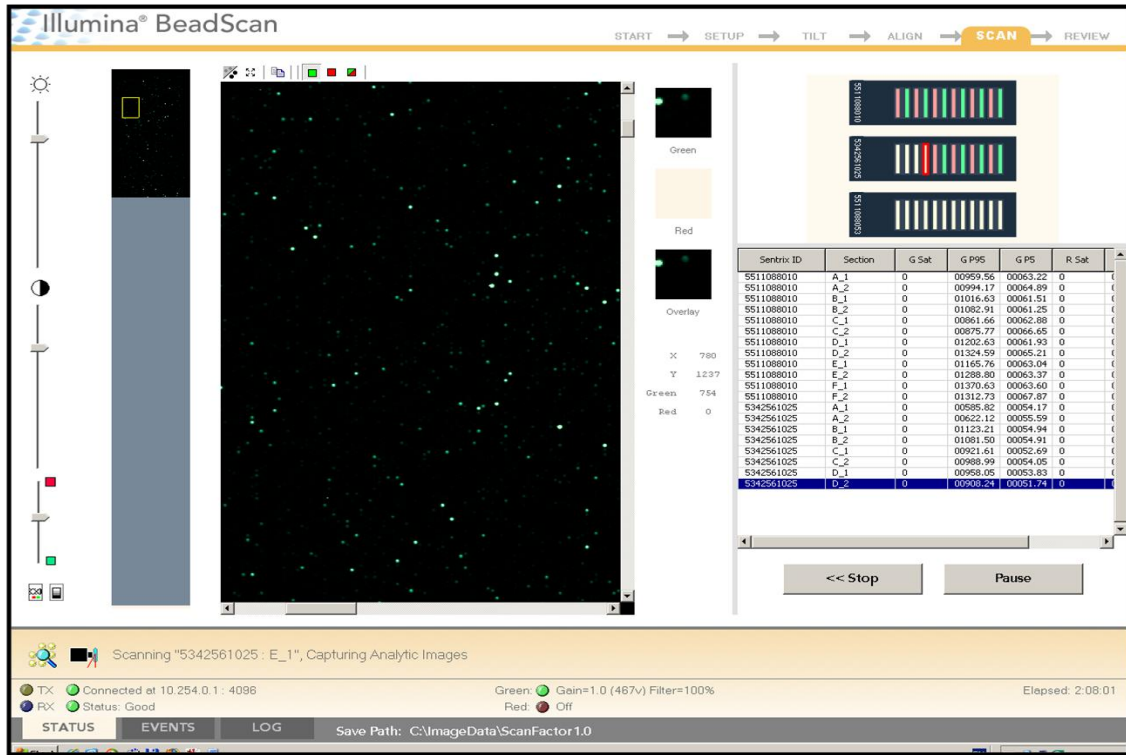






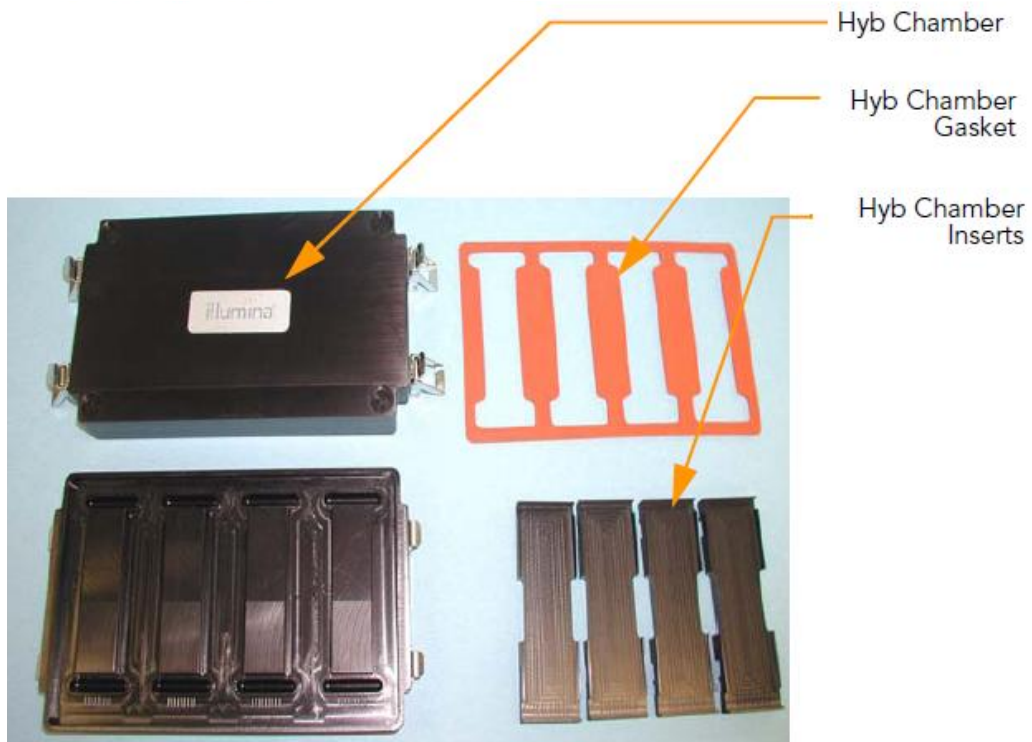
Příloha 3

Printscreen obrazovky při skenování čipu a RT-PCR



Příloha 4

Vybavení pro hybridizaci



Příloha 5

Mapa 17. a 14. chromozomu

