

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



# **Diagnostika vybraných typů vrozených anemií**

**Bakalářská práce**

**Nikola Hlawiczková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2018**

**Vedoucí práce: RNDr. Martina Divoká, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů pod vedením vedoucí práce RNDr. Martiny Divoké, Ph.D.

V Olomouci dne 2. 5. 2018

## Souhrn

Předložená bakalářská práce s názvem „Diagnostika vybraných typů vrozených anemií“ se zabývá studiem změn v genu pro  $\beta$ -globinový řetězec molekuly hemoglobinu a jejich klinických projevů u 10 pacientů s podezřením na hemoglobinopatii, kteří byli vyšetřeni na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Teoretická část shrnuje základní poznatky a informace o hematopoéze, hemoglobinu a jeho syntéze na genetické úrovni. Dále objasňuje problematiku hemoglobinopatií, jejich rozdělení na jednotlivé typy a jejich molekulární diagnostiku.

Experimentální část je zaměřena na detekci mutací v genu pro  $\beta$ -globinový řetězec molekuly hemoglobinu. Praktická část byla provedena v období od dubna 2017 do září 2017. Výchozím materiálem pro analýzu  $\beta$ -globinového genu byla izolovaná DNA z periferní krve 10 pacientů, u kterých bylo podezření na nosičství hemoglobinopatie. Vzorky DNA byly vyšetřeny pomocí vybraných molekulárně genetických metod, jejichž výsledky jsou v této bakalářské práci uvedeny.

## Summary

The presented bachelor thesis entitled “Diagnostics of selected types of congenital anemia” deals with the study of  $\beta$  globin gene mutations and its clinical manifestations in 10 individuals with suspected hemoglobinopathy. Patients were examined at Hemato-Oncology Clinic of Faculty Hospital in Olomouc.

The theoretical part summarizes a basic knowledge and informations about hematopoiesis, hemoglobine and its synthesis at the molecular level. It also explains the issue of hemoglobinopathy, their classifications and molecular diagnostics.

The practital part focuses on detection of mutations in the  $\beta$ -globin gene. Experimental part was done during the period from April 2017 to September 2017. The main material for analysis of  $\beta$ -globin gene is DNA isolated from a peripheral blood of 10 patiens with suspected hemoglobinopathy. DNA samples were examined using selected molecular genetic methods and the results are presented in this bachelor thesis.

Ráda bych poděkovala RNDr. Martině Divoké, Ph.D. za vedení, odborné rady, cenné připomínky, trpělivost a věnovaný čas, který mi poskytla během vypracovávání této bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala celému kolektivu Laboratoře molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za příjemnou spolupráci.

Poděkování patří rovněž mé rodině, která mě finančně a psychicky podporovala po celou dobu studia.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>3</b>
3.1	Hematopoéza .....	3
3.2	Hemoglobin .....	5
3.2.1	Genetická podstata syntézy hemoglobinu .....	6
3.3	Hemoglobinopatie.....	7
3.3.1	Talasemie .....	8
3.3.2	Strukturní hemoglobinové varianty.....	10
3.4	Diagnostika hemoglobinopatií.....	12
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>14</b>
4.1	Biologický materiál .....	14
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	14
4.3	Seznam použitých přístrojů a spotřebního materiálu.....	15
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	17
4.4.1	PCR amplifikace .....	17
4.4.2	Elektroforetická separace a purifikace PCR produktů .....	18
4.4.3	Sekvenační analýza .....	19
4.4.4	Purifikace a separace produktů sekvenační analýzy .....	20
4.4.5	Detekce sekvenačních produktů.....	20
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>27</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>28</b>

## Seznam zkratek

EPO	erythropoetin
bp	„base pairs“, páry bází
ddNTP	dideoxyribonukleosidtrifosfáty (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP)
dNTP	deoxynukleosidtrifosfáty
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
Hb	hemoglobin
<i>HBA</i>	$\alpha$ -globinový gen
<i>HBB</i>	$\beta$ -globinový gen
HGVS	Human genome variation society
HOK	Hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice v Olomouci
LF UP	Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
primer F	<i>forward</i> primer
primer R	<i>reverse</i> primer
<i>Taq</i>	<i>Thermus Aquaticus</i>
UV	ultrafialové záření

## Seznam obrázků

<b>Obr. 1.</b> Schéma hematopoézy.....	4
<b>Obr. 2.</b> Kvartérní struktura molekuly Hb .....	5
<b>Obr. 3.</b> Schéma struktury $\alpha$ -globinového lokusu (HBA).....	6
<b>Obr. 4.</b> Schéma struktury $\beta$ -globinového lokusu (HBB).....	7
<b>Obr. 5.</b> Schéma Sangerova sekvenování na automatickém sekvenátoru .....	13
<b>Obr. 6.</b> Detekce amplifikovaných úseků DNA mixu A a B na 1,5% agarózovém gelu.....	18
<b>Obr. 7.</b> Detekce přečištěné DNA z mixů A a B na 1,5% agarózovém gelu .....	19
<b>Obr. 8.</b> Chromatogram pacienta č. 1 s mutací <b>IVS-I-6 (T→C)</b> .....	21
<b>Obr. 9.</b> Chromatogram pacienta č. 2 s mutací <b>cd 38/39 (-C)</b> .....	22
<b>Obr. 10.</b> Chromatogram pacienta č. 3 s mutací <b>-86 (C→A)</b> .....	22
<b>Obr. 11.</b> Chromatogram pacienta č. 4 s <b>Hb Lepore (ACC→ACT)</b> . .....	22
<b>Obr. 12.</b> Chromatogram pacienta č. 5 s <b>HbE <math>\beta</math>26 (Glu→Lys)</b> . .....	23
<b>Obr. 13.</b> Chromatogram pacienta č. 6 s mutací <b>cd 39 (C→T)</b> .....	23
<b>Obr. 14.</b> Chromatogram pacienta č. 7 s mutací <b>IVS-I-1 (G→A)</b> .....	23
<b>Obr. 15.</b> Chromatogram pacienta č. 8 s mutací <b>IVS-I-110 (G→A)</b> . .....	24
<b>Obr. 16.</b> Chromatogram pacienta č. 9 s mutací <b>cd 6 (-A)</b> .....	24
<b>Obr. 17.</b> Chromatogram pacienta č. 10 s mutací <b>-87 (C→T)</b> .....	24



## Seznam tabulek

<b>Tab. 1.</b> Složení reakční směsi A a B pro PCR amplifikaci specifických úseků <i>HBB</i> genu.....	17
<b>Tab. 2.</b> Složení reakční směsi pro sekvenační analýzu.....	19
<b>Tab. 3.</b> Sekvenační primery pro mix A a B .....	20
<b>Tab. 4.</b> Přehled zjištěných mutací <i>HBB</i> genu u vyšetřených pacientů .....	21

# 1 Úvod

Hemoglobinopatie jsou nejrozšířenější monogenně dědičné poruchy hemoglobinu, které jsou způsobeny buď jeho poškozenou syntézou, anebo jeho abnormální strukturou. Poškozená syntéza zapříčiňuje vznik talasemie, která se podle typu defektního globinového řetězce rozlišuje na  $\alpha$ -talasemii a  $\beta$ -talasemii. Abnormální struktura globinu vede k tvorbě strukturních hemoglobinových variant. Hemoglobinopatie mají širokou škálu klinických projevů od mírných hypochromních anemií až po těžké formy se závislostí na pravidelných transfúzích. Výskyt hemoglobinopatií se soustřeďuje do malarických oblastí Afriky a Asie, nicméně jsou detekovány na celém světě. Jejich přítomnost ve střední Evropě je relativně vzácná, avšak v české a slovenské populaci jsou hemoglobinopatie nejčastější příčinou vrozené anémie.

Bakalářská práce se zabývá diagnostikou hemoglobinopatií, resp. detekcí změn v  $\beta$ -globinovém genu u 10 pacientů s podezřením na hemoglobinopatii. Molekulárně genetická metoda použita v experimentální části zahrnuje přímou detekci mutací na DNA úrovni pomocí Sangerova sekvenování.

## 2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je shromáždit stručný přehled literárních údajů zaměřených na problematiku hemoglobinopatií, jejich diagnostiku a určit mutace v genu pro  $\beta$ -globin (*HBB*) u vybraného souboru pacientů s podezřením na hemoglobinopatii. V experimentální části jsou uvedeny výsledky vlastních vyšetření s použitím techniky Sangerova sekvenování.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Hematopoéza

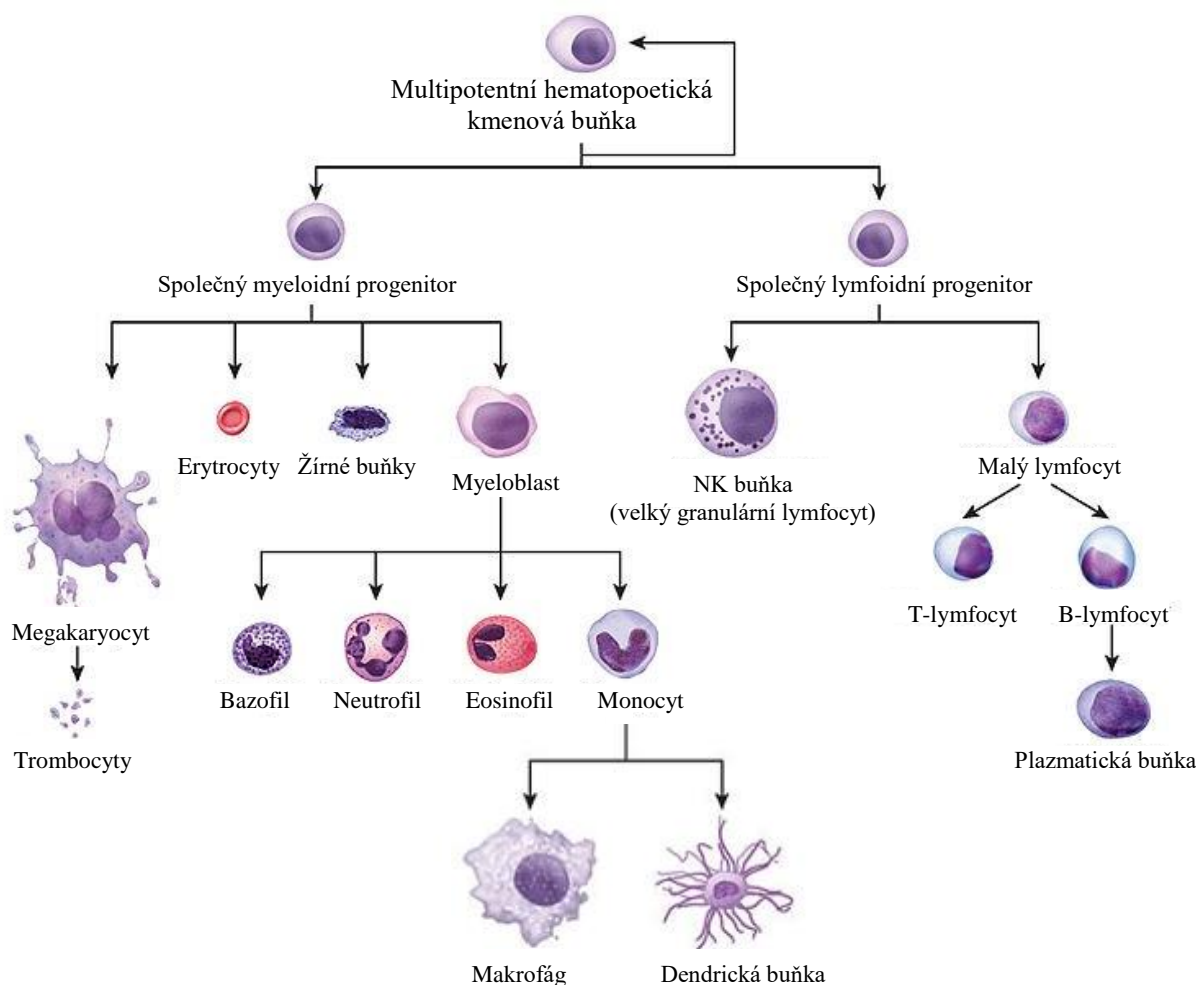
Hematopoéza neboli krvetvorba, je proces tvorby a obnovy krevních buněk v jednotlivých krvetvorných orgánech. Krvetvorba probíhá v průběhu celého života a je rozdělena do prenatální a postnatální fáze. Prenatální tvorba krevních buněk se dělí na tři období: mezoblastové, hepatolienální a dřeňové.

Mezoblastové období začíná mezi 14. a 20. dnem nitroděložního života tvorbou prvních primitivních krvinek – erytroblastů. Primitivní erytroblasty vznikají extraembryonálně v krevních ostrůvcích žloutkového vaku. Propojením krevních ostrůvků se tvoří základy cévní stěny a cévního systému embrya.

Hepatolienální období nastupuje od 6. týdne těhotenství, kdy se hlavním místem krvetvorby stávají játra.

Poslední prenatální fáze nastává zhruba od 10. týdne intrauterinního života, kdy dochází k soustředění krvetvorby do kostní dřeně. Postupně se dřeňová krvetvorba zvyšuje a krátce po narození nahrazuje krvetvorbu v játrech. Dochází tak k přechodu prenatální krvetvorby na krvetvorbu postnatální (Jagannathan-Bogdan a Zon, 2013).

Jednotlivé krevní elementy vznikají diferenciací z hematopoetických kmenových buněk kostní dřeně, které mají pluripotentní a sebeobnovující funkci. Pluripotence je schopnost diferencovat se do mnoha různých typů buněk a sebeobnova je obecnou vlastností kmenových buněk. Působením cytokinů (např. interleukiny, růstové faktory, hormony) kmenové hematopoetické buňky proliferují a diferencují se do dvou typů progenitorových buněk – myeloidního progenitoru a lymfoidního progenitoru. Progenitorové buňky podléhají další diferenciaci do jedné nebo několika krevních řad. Procesem myelopoézy se z myeloidního progenitoru tvoří erytrocyty, trombocyty, granulocyty a monocyty. Lymfoidní progenitor podléhá lymfopoéze a následnou diferenciací se tvoří T- a B- lymfocyty a NK buňky (Akashi a kol., 2000; Obr. 1.).



**Obr. 1.** Schéma hematopoézy  
(upraveno podle: <http://anatomylibrary.us/anatomy-of-a-white-blood-cell/>,  
navštíveno: 29. 3.2018)

Erytropoéza je proces tvorby červených krvinek – erytrocytů. Vývoj červených krvinek zahrnuje diferenciaci pluripotentních hematopoetických kmenových buněk na myeloidní progenitor a následné rozrůznění na erytroidní vývojovou řadu (Dzierzak a Philipsen, 2013).

Prvním místem produkce primitivních červených krvinek neboli erytroblastů v embryu jsou krevní ostrůvky žloutkového vaku (Palis a Yoder, 2001). Tvorba embryonálního Hb je v 6. týdnu nahrazena syntézou fetálního Hb (HbF) ve fetálních játrech (hepatolienální období). Od 10. týdne intrauterinního života se místem hematopoézy stává kostní dřeň a těsně po narození nastává přepnutí HbF na Hb dospělého typu (Divoký a kol., 2005).

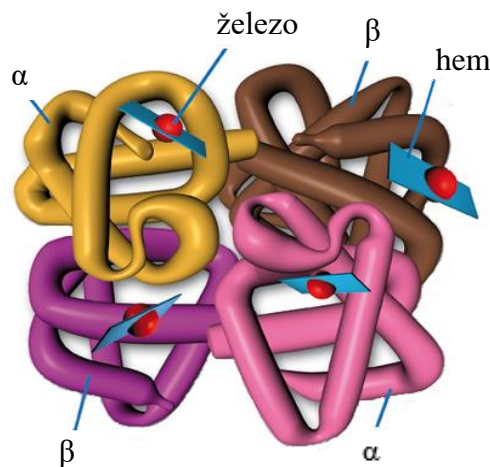
Primitivní erytroblasty se od definitivních červených krvinek výrazně odlišují. Primitivní červené krvinky jsou velké jaderné buňky, které syntetizují embryonální globiny. Jejich postupnou diferenciací vznikají definitivní červené krvinky, které exprimují fetální globiny a globiny dospělého typu (Palis a Yoder, 2001).

Rozrůznění hematopoetických buněk je řízeno specifickými růstovými faktory, které stimulují maturaci a diferenciaci prekurzorů. Mezi nejznámější růstové faktory patří hormony (např. erythropoetin, EPO) a cytokiny (např. interferony, interleukiny) (Jindrák, 2001).

### 3.2 Hemoglobin

Hemoglobin (Hb), též červené krevní barvivo, je z funkčního hlediska nejdůležitější součástí červené krvinky a představuje více než 90 % suché hmotnosti erythrocytu (Novotný, 2011). Nejvýznamnější funkcí Hb je transport kyslíku ( $O_2$ ) z plic do tkání a oxidu uhličitého ( $CO_2$ ) z tkání zpět do plic. Hb je také součástí důležitého pufrčního systému krve, který vyrovnává případné změny pH.

Molekula Hb se skládá z bílkovinné části globinu a prostetické skupiny hemu. Lidské Hb mají tetramerní strukturu tvořenou dvěma páry polypeptidových řetězců, z nichž každý řetězec obsahuje hemovou skupinu. Každou prostetickou hemovou skupinu tvoří tetrapyrolový prstenec v podobě protoporfyrinu s centrálně uloženým atomem šestivazného dvojmocného železa (Obr. 2.).



**Obr. 2.** Kvartérní struktura molekuly Hb  
(upraveno podle: <http://thealevelbiologist.co.uk/heamoglobin>,  
navštíveno: 29. 3. 2018)

Hemové železo je čtyřmi vazbami vázáno v centru tetrapyrolového kruhu, pátá vazba napojuje hemovou skupinu na globinový řetězec a šestá vazba reverzibilně váže molekulu kyslíku za vzniku oxyhemoglobinu. Jedna molekula Hb je tedy schopna transportovat až čtyři molekuly kyslíku (Marengo-Rowe, 2006).

Hb je tvořen dvěma páry řetězců, podle kterých rozlišujeme několik druhů hemoglobinů. Majoritně se vyskytující Hb dospělého typu je tvořen dvěma páry globinových

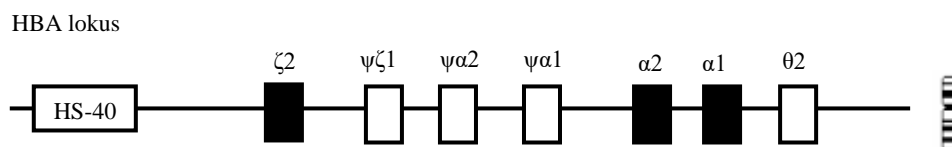
řetězců  $\alpha$  a  $\beta$  (HbA,  $\alpha_2\beta_2$ ). Minoritně se v dospělé krvi vyskytuje také Hb, který je tvořen dvěma  $\alpha$  a  $\delta$  globinovými řetězci (HbA<sub>2</sub>,  $\alpha_2\delta_2$ ). Řetězce  $\beta$  mohou být nahrazeny i  $\gamma$  řetězci za vzniku fetálního hemoglobinu (HbF,  $\alpha_2\gamma_2$ ), který za normálních okolností tvoří v dospělosti méně než 1 % celkového Hb (Novotný, 2011).

### 3.2.1 Genetická podstata syntézy hemoglobinu

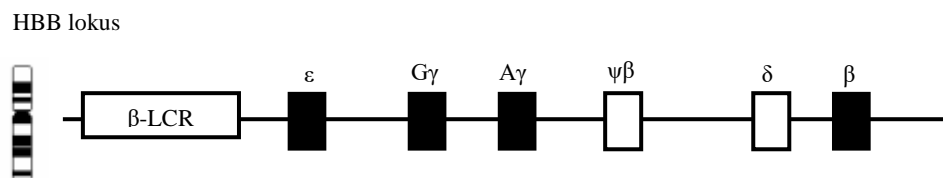
Biosyntéza hemu je přímočarý proces, který probíhá v erytroidních prekurzorech. Základní kroky zahrnují syntézu tetrapyrolového kruhu a jeho změnu na protoporfyrin, do kterého se pomocí enzymu ferochelatasy váže atom dvojmocného železa. Železo je do erytroidních progenitorů inkorporováno z transferinu skrz transferinové receptory pomocí endocytózy (Novotný, 2011).

V erytroidních prekurzorech probíhá také biosyntéza obou typů globinových řetězců  $\alpha$  a  $\beta$ . Geny kódující tyto řetězce jsou na chromozomech přítomny ve dvou lokusech. Gen pro  $\alpha$ -globinový řetězec (*HBA*) je lokalizován v blízkosti telomery na chromozomu 16 v lokusu HBA. Gen pro  $\beta$ -řetězec (*HBB*) se nachází na krátkém rameni chromozomu 11 v lokusu HBB. Globinové lokusy obsahují jak funkční specificky uspořádané geny, tak nefunkční tzv. „pseudogeny“ anebo geny, které se během vývoje u zdravých jedinců vypínají.

HBA lokus se skládá z embryonálního genu  $\zeta$  a dvou  $\alpha$ -globinových genů fetálního a dospělého typu ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ ), které se na chromozomu nacházejí v pořadí, podle kterého se během ontogeneze exprimují (Obr. 3.). HBB lokus sestává z pěti funkčních genů ( $\epsilon$ , G $\gamma$ , A $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\beta$ ), které leží opět v pořadí jejich exprese během ontogeneze (Obr. 4.).



**Obr. 3.** Schéma struktury  $\alpha$ -globinového lokusu (HBA) ležícího v blízkosti telomery na chromozomu 16. HS-40 je pozitivní regulační oblast, která zesiluje globinovou expresi. Funkční geny jsou na HBA lokusu vyznačeny černými obdélníky, bezbarvé obdélníky označují pseudogeny ( $\psi$ ). Upraveno podle Divoký a kol., 2013.



**Obr. 4.** Schéma struktury  $\beta$ -globinového lokusu (HBB) na krátkém rameni chromozomu 11.  $\beta$ -LCR je pozitivní regulační oblast, která zesiluje globinovou expresi. Funkční geny jsou na HBB lokusu vyznačeny černými obdélníky, bezbarvé obdélníky označují pseudogeny ( $\psi$ ). Upraveno podle Divoký a kol., 2013.

Lidské globinové geny jsou si strukturně velmi podobné. Obsahují tři exony, mezi kterými se nacházejí dva introny. Pro správnou genetickou expresi je důležitá 5'-promotorová oblast a 3'-nepřekládaná oblast (UTR). V promotorech globinových genů jsou lokalizovány konzervativní sekvence, na které se vážou transkripční faktory iniciující transkripci. 3'-nepřekládaná oblast je zodpovědná za polyadenylaci globinové mRNA (Divoký a kol., 2013).

### 3.3 Hemoglobinopatie

Hemoglobinopatie jsou celosvětově nejrozšířenější monogenně dědičná onemocnění. Světová zdravotnická organizace odhaduje počet postižených jedinců na 270 milionů, což zaujímá přibližně 7 % světové populace. Výskyt nemoci je soustředěn především do malarických oblastí, oblasti Středomoří a do rozvojových zemí Asie a Afriky, nicméně v důsledku populační migrace lze hemoglobinopatie stále častěji diagnostikovat i ve střední Evropě (Weatherall, 2008).

Hemoglobinopatie jsou choroby hemoglobinu, které mohou být způsobeny kvantitativními nebo kvalitativními globinovými poruchami. Kvantitativní globinové poruchy neboli talasemie vznikají v důsledku snížené či chybějící syntézy  $\alpha$  nebo  $\beta$ -globinových řetězců, čímž dochází v erytrocytech k jejich nerovnováze. Kvalitativní globinové defekty, též strukturní hemoglobinové varianty, jsou charakteristické aminokyselinovou záměnou v globinovém řetězci, které vedou ke tvorbě abnormálních hemoglobinů. Mezi hemoglobinopatie se řadí také dědičné přetrvávání produkce fetálního hemoglobinu (HPFH), které je způsobeno poruchou přechodu ze syntézy fetálního hemoglobinu na Hb dospělého typu (Divoký a kol., 2013).



### 3.3.1 Talasemie

Vzájemný poměr  $\alpha$  a  $\beta$ -globinových řetězců v Hb molekule je fyziologicky jedna ku jedné. Porušení rovnováhy globinových řetězců v molekule Hb vede ke vzniku talasemie. Talasemie patří k nejrozšířenějším anemiím na světě s převážně autosomálně recesivním typem dědičnosti. Jsou charakteristické sníženou ( $\alpha^+$ ,  $\beta^+$ ) nebo chybějící ( $\alpha^0$ ,  $\beta^0$ ) syntézou jednoho nebo několika globinových řetězců. Nejčastěji postihují obyvatele středoziemních oblastí, Afriky a Asie. Podle typu postiženého globinového řetězce hovoříme o  $\alpha$ - nebo  $\beta$ -talasemii (Divoký a kol., 2013).

$\alpha$ -talasemie jsou charakterizovány sníženou produkcí  $\alpha$ -globinových řetězců. Nejčastější příčinou vzniku  $\alpha$ -talasemie jsou delecce funkčních  $\alpha$ -globinových genů, výjimečně mohou být způsobeny i bodovou mutací. Lidský diploidní genom obsahuje 4 funkční  $\alpha$ -globinové geny ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), které mohou být postupně redukovány na 3, 2, 1 anebo žádné kopie  $\alpha$ -globinového genu. Při snížené syntéze  $\alpha$ -globinových řetězců dochází k precipitaci nadbytečných  $\gamma$ -řetězců ve fetálním období nebo  $\beta$ -řetězců v dospělosti, které tvoří rozpustné homotetramery. Tyto tetramery jsou pro erytroidní progenitory méně toxické, než v případě  $\beta$ -talasemie, ale jsou natolik nestabilní, že nedokáží přenášet kyslík.

Na základě různých klinických projevů rozlišujeme tyto skupiny  $\alpha$ -talasemie:

- tiché nosičství  $\alpha$ -talasemie
- nosičství  $\alpha$ -talasemie
- choroba HbH ( $\beta_4$ )
- syndrom Hb Bart's ( $\gamma_4$ )

Příčinou tiché neboli němé  $\alpha$ -talasemie je inaktivace jednoho  $\alpha$ -globinového genu ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ), která je nejčastěji způsobena jeho delecí. Tato forma až na mikrocytozu (snížený objem erytrocytu) nevyvolává žádné výrazné klinické projevy. Heterozygotní tiché nosičství lze detekovat pouze molekulárně genetickým vyšetřením a v ČR je relativně časté.

Nosičství  $\alpha$ -talasemie je nejčastěji charakterizováno delecí dvou  $\alpha$ -globinových genů. Rozeznáváme homozygoty pro  $\alpha^+$ -talasemii ( $-\alpha/-\alpha$ ) nebo heterozygoty pro  $\alpha^0$ -talasemii ( $- -/\alpha\alpha$ ). Nosičství  $\alpha$ -talasemie se projevuje mírnou mikrocytární anemií se zvýšeným počtem erytrocytů. V české populaci se nosičství  $\alpha$ -talasemie vyskytuje vzácně.

Choroba HbH je výsledkem ztráty tří  $\alpha$ -globinových genů a následné produkce nestabilního HbH ( $\beta_4$ ). HbH je složen ze čtyř  $\beta$ -globinových řetězců, které spolu precipitují v důsledku nedostatečné syntézy  $\alpha$ -řetězců. Tyto tetramery jsou nestabilní a mají zvýšenou

afinitu ke kyslíku, která způsobuje nedostatečné okysličování tkání. Choroba HbH způsobuje nositelům středně těžkou anemii a v ČR je její výskyt ojedinělý.

Syndrom Hb Bart's neboli *hydrops fetalis* vzniká již před narozením v důsledku homozygotního stavu pro  $\alpha$ -talasemii ( $-\alpha/\alpha$ ), resp. v důsledku ztráty všech čtyř  $\alpha$ -globinových genů. Tvoří se Hb Bart's, který je složen ze čtyř  $\gamma$ -globinových řetězců a není fyziologicky funkční. Tento stav je neslučitelný se životem (Divoká a kol., 2016).

$\beta$ -talasemie vzniká jako důsledek redukované tvorby nebo chybějící syntézy  $\beta$ -globinového řetězce. Lidský diploidní genom obsahuje 2 funkční geny pro  $\beta$ -řetězec, které jsou uloženy v lokusu HBB na krátkém raménku chromozomu 11. Nejčastější příčinou vzniku  $\beta$ -talasemie jsou bodové mutace v oblasti  $\beta$ -globinového genu (*HBB*) nebo jeho promotoru, výjimečně mohou být způsobeny delecemi části nebo celého  $\beta$ -globinového lokusu.  $\beta$ -talasemie mají mnohem závažnější klinické projevy než  $\alpha$ -talasemie. Při redukované tvorbě  $\beta$ -řetězců dochází k precipitaci volných  $\alpha$ -globinových řetězců, které jsou na rozdíl od volných  $\beta$ -řetězců u  $\alpha$ -talasemií více toxické pro erytroidní progenitory. Nadbytek  $\alpha$ -globinových řetězců způsobuje poškození membrány erytrocytu a jeho předčasné zničení.

$\beta$ -talasemie se klasifikují do tří skupin:

- $\beta$ -talasemie minor
- $\beta$ -talasemie intermedia
- $\beta$ -talasemie major

$\beta$ -talasemie minor je charakteristická poruchou jednoho z páru  $\beta$ -globinových genů ( $\beta^+/\beta$ ,  $\beta^0/\beta$ ). Postižení jedinci jsou heterozygoti pro  $\beta$ -talasemii a jsou klinicky asymptomaticí. V krevním nátěru je patrná mikrocytoza (MCV 55–77 fl), hypochromazie provázená erytrocytozou (až  $6 \times 10^{12}/l$ ), anizocytoza a poikilocytoza s ojedinělým bazofilním tečkováním a terčovitými erytrocyty. Nosičství  $\beta$ -talasemické alely potvrzuje nález zvýšené hladiny HbA<sub>2</sub> nad 3,5 %. Nemocní s  $\beta$ -talasemií minor nevyžadují žádnou léčbu. Tato forma talasemie se v ČR vyskytuje relativně často.

$\beta$ -talasemie intermedia je charakteristická pro nositele homozygotní  $\beta$ -talasemie ( $\beta^+/\beta^+$ ) nebo heterozygotní  $\beta$ -talasemie ( $\beta^+/\beta^0$ ). Projevuje se vysokou fenotypovou variabilitou, od těžkých forem s nízkou hodnotou Hb (~60 g/l), s poškozením tělesného růstu, kostními změnami, bolestmi kostí a splenomegalií až po asymptomatickou formu s relativně normální hodnotou Hb (~100–120 g/l). V krevním nátěru je patrná hypochromazie (MCH 20–22 pg) a mikrocytoza (MCV 50–70 fl). Výskyt této formy talasemie je v ČR vzácný.

$\beta$ -talasemie major neboli Cooley's anaemia vzniká následkem homozygotního nebo dvojitého heterozygotního stavu pro  $\beta$ -talasemii. Závažnost a průběh onemocnění závisí na zděděné kombinaci alel ( $\beta^0/\beta^0$ ,  $\beta^+/\beta^+$ ,  $\beta^0/\beta^+$ ). Nemocní obvykle trpí těžkou chudokrevností a vyžadují pravidelnou transfúzní léčbu (Divoký a kol., 2013). Vlivem pravidelných transfúzí dochází u pacientů k přetížení železem, což způsobuje retardaci růstu, postižení sexuálního vývoje a dalších endokrinních žláz. Vývoj je spojen se změnou skeletu a postupnou deformací vnitřních orgánů, zejména jater a srdce. V krevním nátěru nacházíme mikrocytozu, hypochromazii, anizocytozu, poikilocytozu a zvýšený počet erytroblastů (Cao a Galanello, 2010). V ČR je tento typ talasemie diagnostikován výjimečně u imigrantů z malarických oblastí (Divoký a kol., 2013).

### 3.3.2 Strukturální hemoglobinové varianty

Strukturální hemoglobinové varianty neboli abnormální hemoglobiny vznikají v důsledku kvalitativních poruch v globinové složce Hb. Poruchy jsou následkem aminokyselinové záměny v globinovém řetězci, což mění funkci, rozpustnost či stabilitu výsledného Hb.

Nejčastější molekulární příčinou vzniku abnormálních Hb jsou bodové mutace v kódujících oblastech globinových genů, nicméně příčinami mohou být i krátké delece a elongace DNA či genové fúze (Divoký a kol., 2013).

Strukturální globinové varianty mohou být jak autosomálně recesivně dědičné, tak autozomálně dominantně dědičné a na základě jejich fenotypu je lze klasifikovat do čtyř skupin:

- „talasemické Hb“ neboli varianty s abnormální Hb syntézou (např. HbE)
- Hb varianty s tendencí se shlukovat a tvořit srpkovité erytrocyty (HbS)
- nestabilní Hb, též abnormální varianty s hemolýzou a tendencí precipitovat (např. Hb Köln)
- Hb varianty s abnormální vazbou ke kyslíku a vrozenou polycytemií (např. Hb Olomouc) (Kohne, 2011)

Nejnámějšími Hb variantami s talasemickým fenotypem jsou HbE a Hb Lepore. Výskyt varianty HbE se soustřeďuje do Indie, Filipín a do zemí jihovýchodní Asie. Příčinou vzniku HbE je nukleotidová substituce v kodonu 26 *HBB* genu (GAG→AAG), která navozuje změnu kyseliny glutamové za lysin ( $\beta_{26}$  Glu→Lys). Výsledkem je redukováná syntéza  $\beta$  řetězců, čímž se tvoří mírně nestabilní molekuly Hb s  $\beta$ -talasemickými rysy. Varianta HbE svým nositelům nezpůsobuje žádné významné klinické projevy,

nicméně v interakci s jinou  $\alpha$ - nebo  $\beta$ -talasemií vyvolává velmi širokou škálu klinických syndromů s různou závažností (Fucharoen a Weatherall, 2012).

Abnormální Hb Lepore má celosvětové působiště. Tato varianta Hb vzniká v meióze v důsledku nerovnoměrného překřížení (crossing-over)  $\delta$  a  $\beta$ -globinových genů a jejich následnou genovou fúzí. Existuje několik typů Hb Lepore, které vznikají nerovnoměrným překřížením na odlišných místech zmíněných genů. Produktem fúze jsou hybridní globinové řetězce  $\delta\beta$  charakterizující Hb Lepore s talasemickým fenotypem. Heterozygoti (HbA/Hb Lepore) jsou asymptomatictí, popř. mají příznaky podobné  $\beta$ -talasemii minor. Homozygoti (Hb Lepore/Hb Lepore) mohou mít symptomy podobné  $\beta$ -talasemií intermedia anebo  $\beta$ -talasemií major (Thein a Wood, 2009).

Klinicky nejvýznamnější strukturní hemoglobinovou variantou je HbS, který tvoří srpkovité erythrocyty se sklonem k agregaci. Zvýšená frekvence této Hb varianty v Africe a ve Středomoří souvisí s výskytem malárie, proti které jsou heterozygoti HbS (ale i heterozygoti s jinými globinovými mutacemi) chráněni. Příčinou vzniku srpkovitého erythrocytu je substituce v kodonu 6 *HBB* genu (GAG→GTG), která zaměňuje kyselinu glutamovou za valin. Výsledkem jsou erythrocyty, které v deoxyformě polymerizují a ztrácejí flexibilitu. Dochází tak k ucpání krevních kapilár a ke chronické hemolytické anemii. Tyto symptomy postihují pouze homozygoty (HbS/HbS), heterozygoti (HbA/HbS, přenašeči) jsou klinicky asymptomatictí (Steinberg, 2008).

Nestabilních Hb variant existuje mnoho, nicméně většina z nich je autozomálně dominantně dědičná a vyvolává hemolytickou anemii. Nejčastější příčiny vedoucí k nestabilitě Hb jsou aminokyselinové substituce narušující sekundární, terciální nebo kvartérní Hb uspořádání nebo narušující konfiguraci hemové kapsy, popř. delece nebo elongace aminokyselin v globinové složce Hb. Nejrozšířenějším nestabilním Hb je Hb Köln.

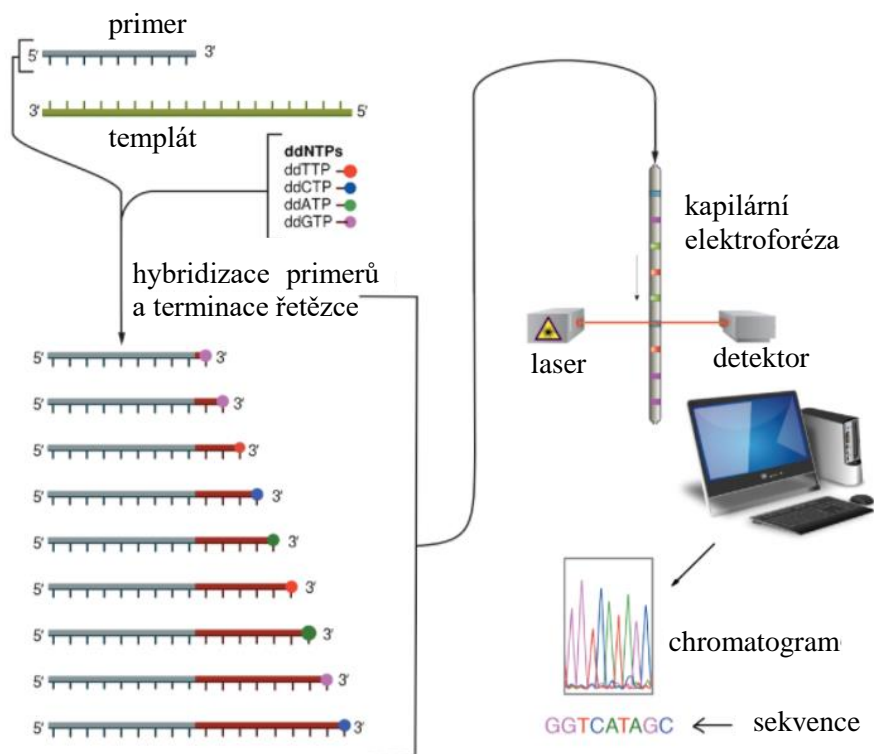
Hb varianty s abnormální vazbou ke kyslíku mají v důsledku mutace sníženou nebo zvýšenou vazbu ke kyslíku. Hb se zvýšenou afinitou ke kyslíku váží kyslík pevněji, což vede k jeho sníženému uvolňování ve tkáních, zvýšení produkce EPO a vzniku polycytemie. Snížením afinity Hb pro kyslík dochází ke snadnému uvolňování kyslíku do tkání, čímž se sníží produkce EPO a vzniká mírná anemie (Marengo-Rowe, 2006). V ČR byl diagnostikován např. Hb Olomouc, který afinitu ke kyslíku zvyšuje (Indrák a kol., 1987).

V české populaci je výskyt strukturních Hb variant velmi vzácný, nicméně nejčastěji diagnostikovanou Hb variantou je talasemický HbE a Hb Lepore. Na území ČR byl také zaznamenán např. nestabilní Hb Köln a HbS u imigrantů (Divoký a kol., 2013).

### 3.4 Diagnostika hemoglobinopatií

Bodové mutace v *HBB* genu se na molekulární úrovni detekují přímou sekvenční analýzou, která umožňuje stanovit pořadí nukleotidů v molekule DNA (Vrbacký, 2010).

V současné době je nejběžnější metodou enzymová metoda sekvenování, která je též známá pod jménem svého autora jako Sangerovo sekvenování (Sanger a kol., 1977). Princip této metody spočívá ve specifické inhibici enzymové syntézy vláken DNA. Reakční směs pro Sangerovo sekvenování obsahuje vedle nezbytných reagentů a normálních čtyř typů deoxynukleotidů i dideoxynukleotidy (ddNTP). ddNTP jsou chemické analogy nukleotidů, které nemají 3'-OH skupinu potřebnou k elongaci DNA a jsou značeny specifickými fluorescenčními barvami. Reakce probíhá v jedné zkumavce na základě polymerázové řetězové reakce v termo-cykleru a je katalyzována *Taq* DNA polymerázou. V místě, kde polymeráza místo běžného deoxynukleotidu zařadí do DNA řetězce ddNTP, dochází k terminaci syntézy vlákna DNA. V důsledku náhodné inkorporace nukleotidových analogů do řetězce vznikají různě dlouhé DNA fragmenty, které vždy končí jedním ze čtyř odlišně značených ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Vzniklé různě dlouhé řetězce se rozdělí kapilární elektroforézou v automatickém sekvenátoru, kde souběžně probíhá i analýza fluorescenčně značených koncových ddNTP za použití laseru napojeného na počítač. Výsledkem fluorescenčních signálů je pořadí jednotlivých bází ve zkoumané DNA, které je zachyceno v chromatogramu (Vrbacký, 2010; Obr. 5.).



**Obr. 5.** Schéma Sangerova sekvenování na automatickém sekvenátoru (upraveno podle: <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/dna-sequencin>, navštíveno: 29. 3. 2018)

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Pro analýzu byla použita izolovaná DNA 10 nepříbuzných pacientů sledovaných na HOK v Olomouci s podezřením na hemoglobinopatii. Izolaci DNA provedli zaměstnanci HOK z periferní krve fenol-chloroformovou metodou nebo pomocí izolátoru nukleových kyselin (MagNA Pure, Compact, Roche).

### 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

#### Použité chemikálie

- 100 bpDNA Ladder (Promega, kat. č. G2101)
- Agaróza I pro DNA elektroforézu (Amresco, kat.č. 0710-500G)
- AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Buffer II and MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, Life technologies, kat. č. N8080243)
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100mmol/l, Promega, kat. č. U1330)
- specifické primery (Eastport)
- Etanol (96%, lékárna FNOL)
- Ethidium bromid (10mg/ml, Top-Bio, kat. č. P047)
- Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Life technologies, kat. č. 4311320)
- Nanášecí pufr („LoadingDye“) 6x (Promega, kat. č. G1881)
- Reverzně osmotická a ultračistá voda ze systému Direct-Q 3UV (Millipore)

#### Použité soupravy

- BigDye® Terminátor v1. 1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, kat. č. 4337450)
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAgen, kat. č. 28706)

#### Použité roztoky a jejich příprava

##### 10x TBE elektroforetický pufr, pH 8,3–8,5

- 1 M Tris
- 0,89 M kyselina boritá
- 0,02 M EDTA

#### 70% Ethanol

73 ml 96% absolutního alkoholu

27 ml reverzně osmotické a ultračisté vody

#### Agarózový 1,5% gel

1,5 g agarózy

100 ml 1x TBE pufru

2 µl ethidium bromidu

#### Octan sodný, pH 5,5 (3 M, lékárna FNOL)

### **4.3 Seznam použitých přístrojů a spotřebního materiálu**

#### **Použité přístroje**

- analytická váha FA-2000 (LAB systém)
- automatické pipety (Pipetman®, Gilson France) + špičky s filtrem
- centrifuga 5430 R (Eppendorf)
- centrifuga Biofuge 22R (Heraeus, Německo)
- dokumentační systém AlphaDigiDoc™RT2 (Alpha Innotech)
- elektroforéza horizontální MSMIDI (Clever Scientific Ltd)
- genetický analyzátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)
- lednička s mrazícím boxem -20 °C (Liebherr)
- mikrovlnná trouba 1195 (ETA)
- mrazící boxy -80 °C (SANYO, Japonsko)
- program Chromas Version 2.6.2. (Technelysium Pty Ltd, Austrálie)
- stolní minicentrifuga C 1301 (Labnet)
- transiluminátor 312 nm (VILBER LOURMAT)
- výrobník ledu Icematic F100 Compact (CASTELMAC Spa, Itálie)
- zařízení na úpravu vody Direct-Q 3UV (Millipore)
- zdroj k napětí ELFO ST 304 (Apelex)
- termoblok (BioSan, Litva)
- Thermocycler peqSTAR 2x Gradient (PEQLAB-Life Science, Německo)
- vortex CERTOMAT ® MV (B. Braun Biotech International)



**Použitý spotřební materiál**

- laboratorní sklo (Erlanmayerovy baňky, odměrné válce) (SIMAX, Česká republika)
- latexové ochranné rukavice
- materiál potřebný pro provoz genetického analyzátoru ABI PRISM 3100 a provedení sekvenační analýzy (Applied Biosystems)
- mikrokumavky (1,5ml; SARSTEDT, Německo)
- PCR mikrokumavky (0,2ml; Applied Biosystems)

## 4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

### 4.4.1 PCR amplifikace

PCR amplifikace *HBB* genu byla provedena na vzorcích DNA od deseti nepříbuzných pacientů, kteří byli sledováni na HOK. Podle tab. 1. byly do dvou 0,2ml mikrokumavek připraveny dva master mixy (A a B). Mater mix A obsahoval F primer 662 a R primer 109. Master mix B obsahoval F primer 195 a R primer 230. PCR reakční směs byla krátce zvortexována a zcentrifugována.

**Tab. 1.** Složení reakční směsi A a B pro PCR amplifikaci specifických úseků *HBB* genu

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem na 1 vzorek [ $\mu$ l]
deionizovaná H <sub>2</sub> O	-	-	20
pufř	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol/l	2 mmol/l	2
dNTP	10 mmol/l	0,2 mmol/l	0,5
primer F	100 pmol/ $\mu$ l	20 pmol/ $\mu$ l	0,2
primer R	100 pmol/ $\mu$ l	20 pmol/ $\mu$ l	0,2
<i>Taq</i> polymeráza	5 U/ $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l	0,2

#### Sekvence primerů:

**MIX A**      **662:** 5'- AGA TCC ATC TAC ATA TCC CAA AGC - 3'  
                 **109:** 5'- CCC TTC CTA TGA CAT GAA CTT AAC CAT - 3'

**MIX B**      **195:** 5'- GTG GTC TAC CCT TGG ACC C - 3'  
                 **230:** 5'- GTA TTT TCC CAA GGT TTG AAC TAG CTC - 3'

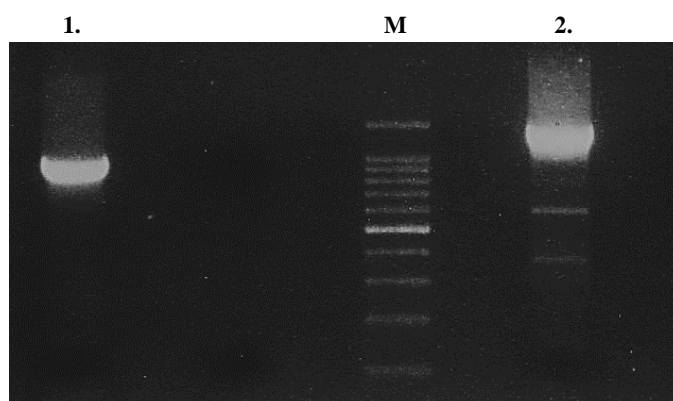
Do obou mixů byl napipetován 1  $\mu$ l DNA konkrétního pacienta. Celkový objem PCR reakce činil 25  $\mu$ l. Amplifikace probíhala v naprogramovaném termo-cykléru.

#### Základní časový a teplotní profil PCR reakce:

- Počáteční denaturace: 95 °C, 10 min      1 cyklus
- Denaturace: 95 °C, 45 s  
Hybridizace primerů: 56 °C, 45 s  
Prodlužování primerů: 72 °C, 60 s      } 35 cyklů
- Finální extension: 72 °C, 10 min      1 cyklus

#### 4.4.2 Elektroforetická separace a purifikace PCR produktů

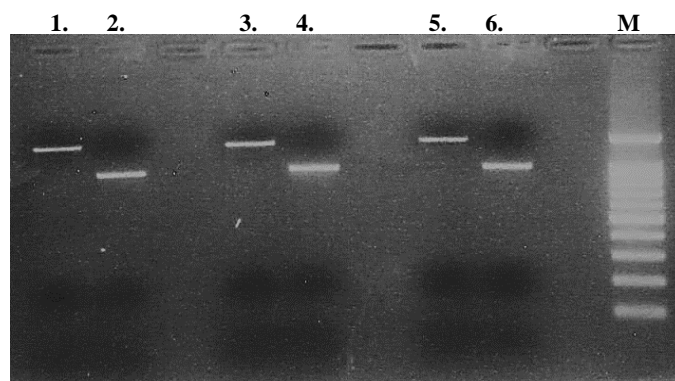
Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 1,5 g agarózy a přidáno 100 ml 1x koncentrovaného TBE pufru. Směs se vařila v mikrovlnné troubě až do vzniku čírého roztoku. Po ochlazení rozvařená agaróza byla do směsi přidána 2  $\mu$ l ethidium bromidu (10 mg/ml). Takto připravený roztok byl nalit do elektroforetické vaničky s předem připraveným hřebínkem a nechal se ztuhnout. Po dokonalém ztuhnutí gelu byl hřebínek opatrně vytažen a vanička byla vložena do elektroforetické komůrky. Prostor elektroforetické komůrky byl po kontrolní rýsku zalit 1x koncentrovaným TBE pufrem. Před nanesením vzorků do gelu bylo 20  $\mu$ l PCR produktu mixu A a B smíseno s 3  $\mu$ l 6x nanášecího „loading“ pufru. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit 1  $\mu$ l 100 bp DNA Ladder (0,13  $\mu$ g/ $\mu$ l). Elektroforetická separace vzorků obvykle probíhala 30 min při 100 V. Přítomnost amplifikované DNA byla hodnocena pod UV transiluminátorem, kdy jasné bandy odpovídaly očekávanému PCR fragmentu (Obr. 6.).



**Obr. 6.** Detekce amplifikovaných úseků DNA mixu A a B na 1,5% agarózovém gelu. Naneseno 20  $\mu$ l z každého mixu. Dráha 1 představuje separovaný PCR produkt DNA mixu A a dráha 2 separovaný PCR produkt DNA mixu B pacienta č. 1 (Tab. 4.). Dráha M obsahuje 1  $\mu$ l 100 bp standardu molekulové hmotnosti (Promega).

Po elektroforetické separaci byly specifické PCR produkty pod UV lampou z agarózového gelu vyřezány a vloženy do čistých 1,5ml mikrozkuvek. Takto připravené PCR produkty byly následně purifikovány pomocí QIAquick Gel Extraction Kit dle protokolu doporučeného výrobcem (QIAGEN). K vyřezaným PCR produktům bylo přidáno 600  $\mu$ l QG pufru. Mikrozkuvky se vzorky byly za občasného promíchání inkubovány při 50 °C po dobu 10 min nebo do rozpuštění gelu. Následně byl veškerý objem přenesen na kolonku, která byla umístěna v záchytné mikrozkuvce. Připravená kolonka se centrifugovala 1 min při 13 000 g. Po odstranění roztoku ze záchytné mikrozkuvky bylo na kolonku napipetováno 500  $\mu$ l pufru QG a předešlý krok se zopakoval. Dále bylo na kolonku

přidáno 750  $\mu$ l pufru PE (předem naředěného 96% etanolem) a po 1min centrifugaci při 13 000 g byl roztok ze záchytné mikrozkušavky znovu odstraněn. Bez dalšího přidání pufru byla kolonka opět 2 min centrifugována při 13 000 g a přenesena do čisté 1,5ml mikrozkušavky. Na membránu kolonky bylo napipetováno 40  $\mu$ l elučního pufru a po 1min stání za laboratorní teploty byla kolonka centrifugována při 13 000 g po dobu 1 min a 30 s. Množství a kvalita eluované DNA byla hodnocena gelovou elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu s přidavkem ethidium bromidu v 1x koncentrovaném TBE pufru (Obr. 7.).



**Obr. 7.** Detekce přečištěné DNA z mixů A a B na 1,5% agarózovém gelu. Naneseny 2  $\mu$ l z každého mixu. Dráhy 1, 3 a 5 jsou purifikované DNA mixy B pacientů č. 2, 3, 4 (Tab. 4.). Dráhy 2, 4 a 6 jsou purifikované DNA mixy A totožných pacientů. Dráha M představuje 100 bp standardu molekulové hmotnosti.

#### 4.4.3 Sekvenační analýza

Výchozím materiálem pro sekvenační analýzu byla eluovaná DNA získaná purifikací PCR produktů mixu A a B. Podle tab. 2. byla připravena reakční směs pro sekvenační analýzu na 6 sekvenačních reakcí. Z mixu A byly provedeny 3 reakce s jednotlivými primery 662, 427 a Ex2-AS. Z mixu B byly provedeny další 3 reakce s primery 437, Ex3-AS a 229 (Tab. 3.)

**Tab. 2.** Složení reakční směsi pro sekvenační analýzu

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Pipetovaný objem na 1 reakci [ $\mu$ l]
deionizovaná H <sub>2</sub> O	-	-	1–6
purifikovaný templát	-	10 ng/ $\mu$ l	1–6
5x sekvenační pufr	5x	0,5x	1
sekvenační primer	5 pmol/ $\mu$ l	5 pmol/reakce	1
Big Dye Terminátor v 1.1 kit	-	-	2

**Tab. 3.** Sekvenační primery pro mix A a B

Varianta mixu	PCR primery	Sekvenační primery
MIX A	662, 109	662, 427, Ex2-AS
MIX B	195, 230	437, Ex3-AS, 229

Celkový objem sekvenační reakce činil 10  $\mu$ l. Sekvenační reakce probíhala v naprogramovaném termo-cykléru.

**Základní časový a teplotní profil sekvenační reakce:**

- Počáteční denaturace: 95 °C, 5 min 1 cyklus
  - Denaturace: 95 °C, 30 s
  - Hybridizace primerů: 53 °C, 15 s
  - Prodlužování primerů: 60 °C, 4 min
- } 28 cyklů

**4.4.4 Purifikace a separace produktů sekvenační analýzy**

Přečištění sekvenačních produktů probíhalo v čistých 1,5ml mikrozkuvkách, do kterých byl přidán 1  $\mu$ l octanu sodného (3 M, pH 5,5) a 25  $\mu$ l 96% ethanolu. Mikrozkuvky byly po 10min inkubaci při -80 °C centrifugovány v chlazené centrifuze (4 °C) při 21 000 g po dobu 10 min. Následně byl odebrán supernatant a zbylý pelet byl promyt 50  $\mu$ l chlazeného 70% ethanolu (-20 °C). Po opětovné centrifugaci a odstranění supernatantu se pelet sušil ve tmě. Rozpuštění vysušeného peletu probíhalo v 20  $\mu$ l deionizovaného formamidu. Výsledný produkt byl přenesen do jamek sekvenační destičky a 5 min denaturován při 95 °C. Po denaturaci byla sekvenační destička prudce ochlazená na ledu.

**4.4.5 Detekce sekvenačních produktů**

Vzorky v sekvenační destičce byly analyzovány genetickým analyzátozem ABI PRISM 3100 a hodnoceny počítačovým programem Chromas Version 2.6.2.

## 5 Výsledky

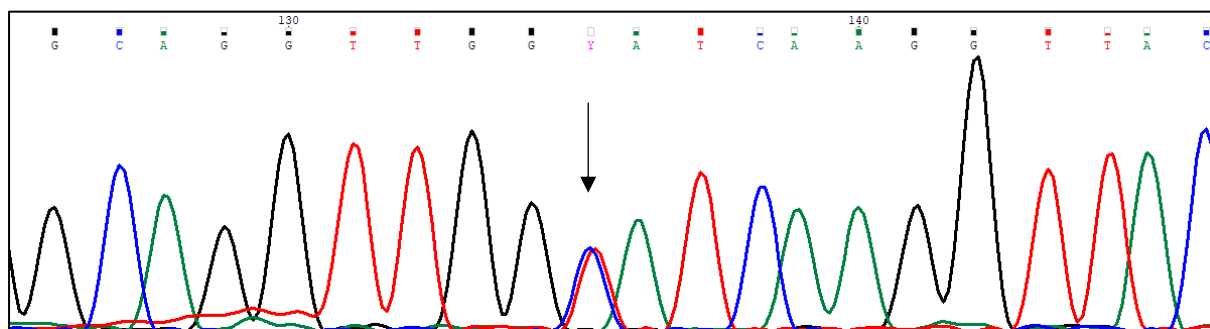
Experimentální část této bakalářské práce byla provedena na Hemato-onkologické klinice FN a LF UP v Olomouci, kde byly molekulárními metodami detekovány mutace v genu pro  $\beta$ -globin (*HBB*) u 10 pacientů s podezřením na hemoglobinopatii.

V období od dubna roku 2017 do září roku 2017 bylo v rámci soboru pacientů vyšetřeno 6 mužů a 4 ženy (Tab. 4.). Jako diagnostický vzorek byla použita izolovaná DNA, která byla podrobena přímé fluorescenčně značené sekvenační analýze.

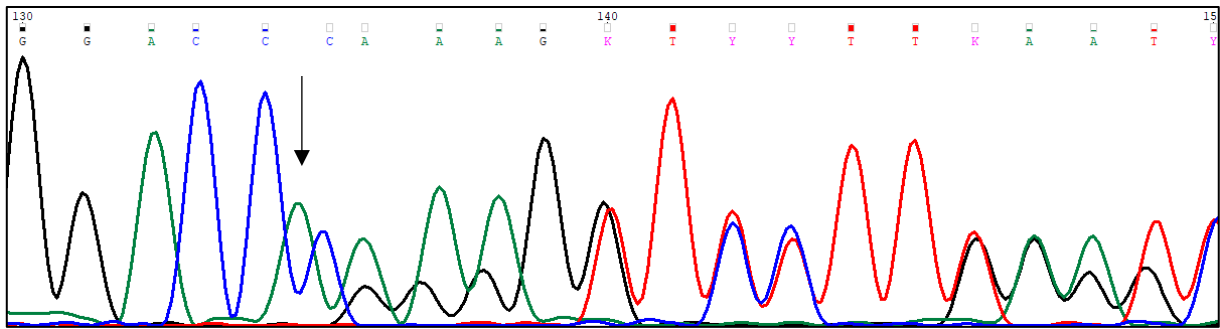
Vyšetření prokázalo u 8 pacientů nosičství  $\beta$ -talasemické alely, jejichž příčinou byly nukleotidové substituce nebo delece v *HBB* vedoucí ke změně čtecího rámce (Obr. 8.–10., 13.–17.). U 2 pacientů byla diagnostikována *HBB* mutace vedoucí k tvorbě strukturní Hb varianty, resp. Hb Lepore a HbE (Obr. 11., 12.). Veškeré zjištěné mutace *HBB* genu byly v heterozygotním stavu a svým nositelům způsobovaly mírnou mikrocytární anémii.

**Tab. 4.** Přehled zjištěných mutací *HBB* genu u vyšetřených pacientů

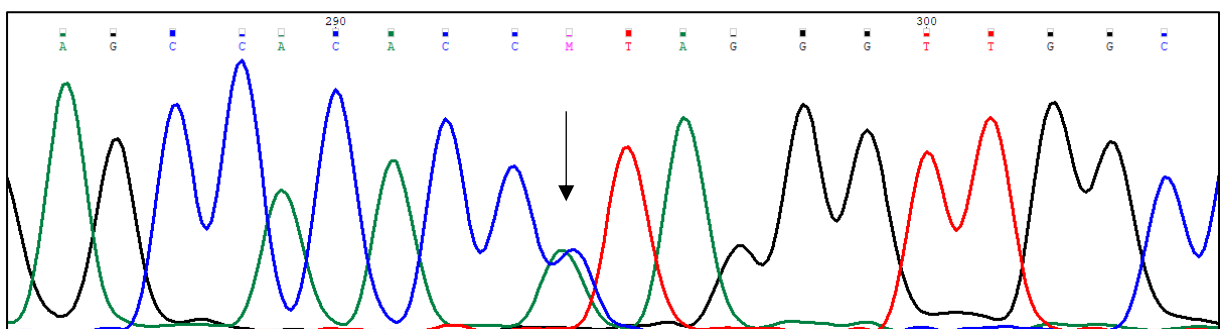
Pacient	Pohlaví/věk	Mutace <i>HBB</i> genu	HGVS nomenklatura
1	Žena/53	IVS-I-6 (T-C)	<i>HBB</i> :c.92 + 6T >C
2	Muž/44	cd 38/39 (-C)	<i>HBB</i> :c.118delC; p.Gln40Argfs*22
3	Muž/21	pozice -86 (C-A)	<i>HBB</i> :c.-136C >A
4	Muž/40	Hb Lepore	<i>HBB</i> : <i>HBD</i> : <i>HBB</i> : fusion
5	Muž/34	HbE $\beta$ 26 (Glu-Lys)	<i>HBB</i> :c.79G >A
6	Žena/36	CD 39 (C-T)	<i>HBB</i> :c.118C >T; p.Gln40*
7	Žena/7	IVS-I-1 (G-A)	<i>HBB</i> :c.92 + 1G >A
8	Muž/40	IVS-I-110 (G-A)	<i>HBB</i> :c.93-21G >A
9	Muž/3	cd 6 (-A)	<i>HBB</i> :c.20delA; p.Glu7Glyfs*13
10	Žena/58	pozice -87 (C-T)	<i>HBB</i> :c.-137C >T



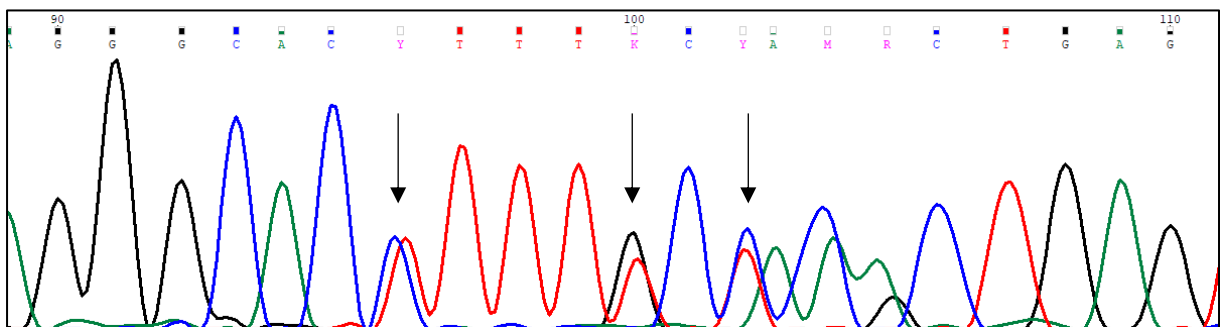
**Obr. 8.** Chromatogram pacienta č. 1 s mutací **IVS-I-6 (T→C)**. Jedná se o substituci T za C v nukleotidu 6 intronu I *HBB* genu (viz šipka). Pacient vykazuje heterozygotní nosičství  $\beta$ -talasemické alely.



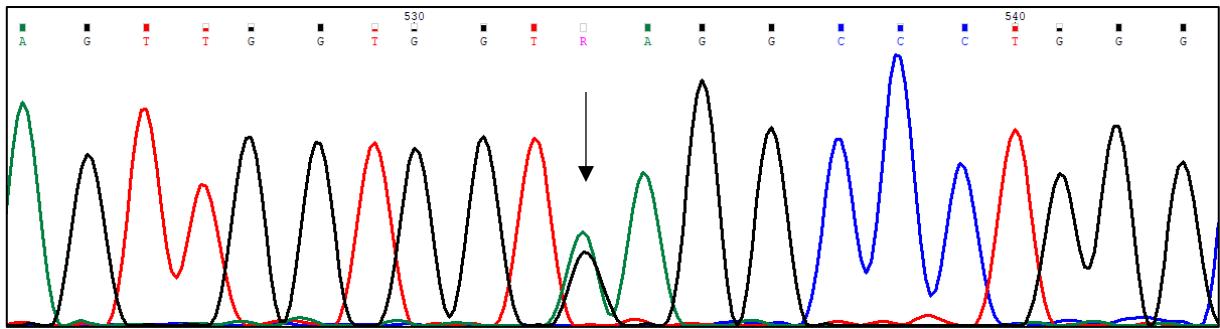
**Obr. 9.** Chromatogram pacienta č. 2 s mutací cd 38/39 (-C). Jedná se o posunovou mutaci v *HBB* genu mezi kodony 38/39 z důvodu delece C (viz šipka). Mutace je v heterozygotní formě.



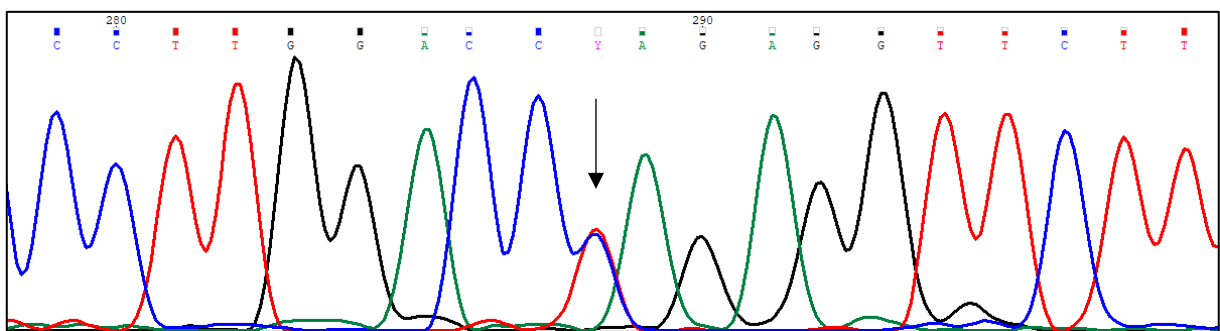
**Obr. 10.** Chromatogram pacienta č. 3 s mutací -86 (C→A). Jedná se o nukleotidovou substituci C za A v pozici -86 v *HBB* genu (viz šipka). Pacient vykazuje heterozygotní nosičství.



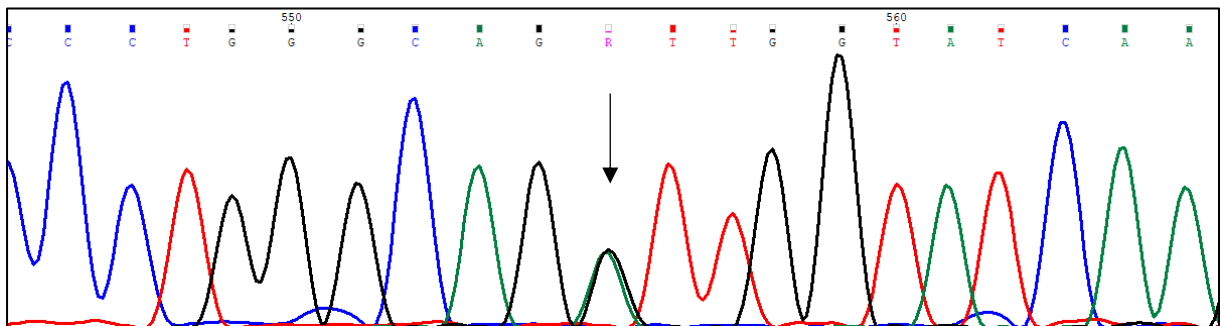
**Obr. 11.** Chromatogram pacienta č. 4 s **Hb Lepore** (ACC→ACT). Jedná se o fúzi  $\delta$  a  $\beta$  globinových genů. První šipka ukazuje změnu cd 84 – polymorfismus (ACC→ACT), druhá šipka označuje cd 86 a třetí šipka cd 87, kde začíná překryv  $\delta$  a  $\beta$  globinových genů, od cd 88 následuje 100% homologie. Hb varianta je v heterozygotním stavu.



**Obr. 12.** Chromatogram pacienta č. 5 s **HbE**  $\beta 26$  (Glu→Lys). Jedná se o nukleotidovou substituci G za A v kodonu 26 v *HBB* genu měnící glutamovou kyselinu za lysin (viz šipka). Mutace je v heterozygotní formě.

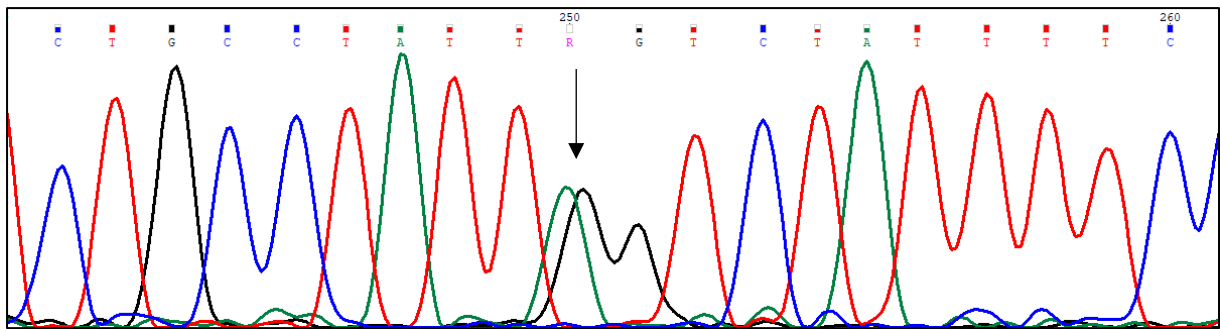


**Obr. 13.** Chromatogram pacienta č. 6 s mutací **cd 39** (C→T). Jedná se o nukleotidovou substituci C za T v kodonu 39 *HBB* genu (viz šipka). Pacient je heterozygot.

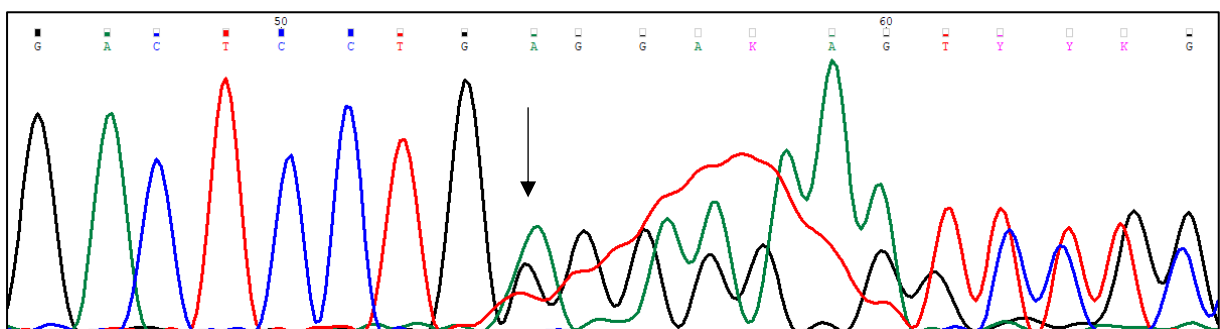


**Obr. 14.** Chromatogram pacienta č. 7 s mutací **IVS-I-1** (G→A). Jedná se o nukleotidovou substituci G za A v intronu I *HBB* genu (viz šipka). Pacient je heterozygot.

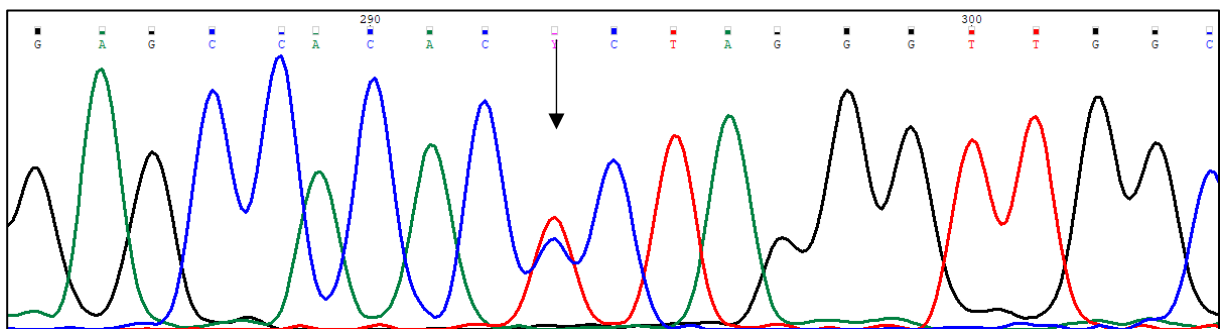




**Obr. 15.** Chromatogram pacienta č. 8 s mutací **IVS-I-110 (G→A)**. Jedná se o nukleotidovou substituci G za A v intronu I *HBB* genu (viz šipka). Pacient je heterozygot.



**Obr. 16.** Chromatogram pacienta č. 9 s mutací **cd 6 (-A)**. Jedná se o posunovou mutaci v *HBB* genu v kodonu 6 z důvodu delece A. Pacient je heterozygot. Šipka ukazuje začátek posunu čtecího rámce u postižené alely, červená linka ukazuje zvýšené pozadí, jedná se o artefakt.



**Obr. 17.** Chromatogram pacienta č. 10 s mutací **-87 (C→T)**. Jedná se o nukleotidovou substituci C za T v pozici -87 *HBB* genu (viz šipka). Pacient je heterozygot.

## 6 Diskuse

Hemoglobinopatie jsou nejrozšířenější monogenní dědičné poruchy hemoglobinu. Jsou charakterizovány geneticky podmíněnými kvantitativními poruchami (talasemie) nebo kvalitativními defekty (abnormální Hb) a anemií. Výskyt většiny hemoglobinopatií se soustřeďuje do malárií postižených tropických regionů, nicméně je lze diagnostikovat na celém světě (Weatherall, 2008). Přítomnost hemoglobinopatií je v centrální Evropě relativně vzácná, avšak v České republice je toto onemocnění nejčastější příčinou vzniku vrozené anemie.

V souboru vyšetřených pacientů bylo detekováno 10 různých mutací v genu *HBB*, které zapříčinily nosičství  $\beta$ -talasemické alely nebo Hb varianty, konkrétně HbE a Hb Lepore. Podle Divoká a kol., 2016 je v české populaci nejfrekventovanější mutace IVS-I-1 (G→A), která byla diagnostikována i v tomto souboru pacientů. Jedná se o bodovou mutaci se záměnou guaninu za adenin v nukleotidu 1 v akceptorovém místě sestřihu intronu I. V důsledku mutace nedochází k obvyklému sestřihu a následně se nevytváří normální mRNA. Mutace byla nejspíš na české území introdukována ze středozevní oblasti, kde má svůj původ.

Druhá nejfrekventovanější *HBB* mutace v České republice je IVS-I-110 (G→A), která byla opět detekována mezi vyšetřenými pacienty. Mutace je charakterizována nukleotidovou substitucí guaninu za adenin ve 110. nukleotidu intronu I, kde vzniká nové sestřihové místo, což vede ke vzniku abnormální mRNA. Původ této mutace je ve středozevní oblasti, převážně v Řecku.

Dále byla v souboru pacientů zachycena mutace IVS-I-6 (T→C), která je taktéž typická pro středozevní oblast. Jedná se o mutaci v 6. nukleotidu intronu I, kde dochází k substituci tyminu za cytosin, což následně vede k mírné redukci efektivity sestřihu. Tato bodová mutace je v české populaci rovněž častá.

Další detekovaná mutace byla cd 39 (C→T), která je v české populaci také frekventovaná. Při této mutaci dochází ve 39. kodonu *HBB* ke změně cytozinu za tymin, čímž se tvoří nesmyslný kodon vedoucí k předčasné terminaci  $\beta$ -globinového řetězce. Mutace cd 39 se typicky vyskytuje v zemích okolo Středozevního moře (Divoký a kol, 2013).

Dvěma pacientům byla diagnostikována promotorová mutace. Jeden pacient měl mutaci měnící cytozin za adenin v promotorové pozici -86 (C→A), která je velmi rozšířená v italské populaci. Druhý pacient měl mutaci v pozici -87 (C→T), kde se substituoval cytozin za tymin. Tato mutace je někdy označována jako německo/italská. V obou případech mutace způsobuje

snížení transkripce  $\beta$ -globinového genu v důsledku špatné vazby transkripčního faktoru na promotor *HBB*.

V souboru pacientů byla zachycena další mutace typická pro středomořskou oblast – mutace cd 6 (-A). Při mutaci dochází v kodonu 6 k delecii adeninu, což způsobuje změnu čtecího rámce *HBB* a vede k terminaci translace v cd 18 *HBB* (Thein, 2013).

Mezi pacienty byla diagnostikována také mutace cd 38/39 (-C), která byla dosud detekována pouze v české populaci (Indrák a kol., 1991). Je charakterizována ztrátou cytozinu mezi kodony 38 a 39 a mění tak následně čtecí rámec *HBB* genu vedoucí ke vzniku předčasného stop kodonu.

Dvěma pacientům byla diagnostikována strukturní hemoglobinová varianta. První diagnostikovaná varianta byl mírně nestabilní HbE. Příčinou vzniku HbE je substituce guaninu za adenin ve 26. kodonu *HBB* (GAG→AAG), která mění výslednou aminokyselinu kyselinu glutamovou na lysin. Heterozygotní, ale i homozygotní stav svému nositeli nepřináší žádné výrazné klinické projevy. Druhou diagnostikovanou variantou byl Hb Lepore, který vzniká fúzí  $\delta$  a  $\beta$ -globinových genů. Heterozygotní nosičství nevyvolává nositeli žádnou výraznou klinickou manifestaci. V České republice je výskyt Hb abnormalit relativně vzácný, nicméně HbE a Hb Lepore jsou nejčastější diagnostikované Hb varianty v české populaci (Divoká a kol., 2016).

Všichni vyšetření pacienti vykazovali heterozygotní nosičství pro dané typy mutací. Jedná se tedy o nosiče  $\beta$ -talasemické alely s fenotypem mírné mikrocytární anemie (talasemie minor) nebo o nosiče alely pro HbE a Hb Lepore.

Nosičství talasemické alely vyvolává u pacientů příznaky podobné sideropenické anemii, která vzniká z nedostatku železa. Pro určení přiměřené léčby je proto nejdůležitější správně diagnostikovat příčinu vzniku anemie. Pacienti s talasemickou mutací mají vyšší riziko ukládání železa ve tkáních, což vede k přetížení organismu železem, a proto se nesmí léčit preparáty s obsahem železa. Na druhou stranu pacienti se sideropenickou anemií trpí sníženým obsahem železa ve tkáních a tuto léčbu potřebují (Divoký a kol., 2013).

Převážná většina talasemických alel pochází ze středozezemních oblastí, odkud byly postupně rozšířeny do dalších zemí světa. Jejich výskyt ve vyspělých zemích souvisí s demografickými změnami a historickými přesuny populací, které ovlivnily genetickou variabilitu současného obyvatelstva. Se stupňující se migrací v evropských zemích lze předpokládat, že se počet diagnostikovaných hemoglobinopatií bude zvyšovat (Divoká a kol., 2016).

## 7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo na základě molekulárně genetických metod detekovat mutace v  $\beta$ -globinovém genu u 10 pacientů, u kterých bylo podezření na hemoglobinopatii. Teoretická část shromažďuje základní informace a poznatky o problematice hemoglobinopatií. Praktická část se věnuje popisu použitých molekulárně genetických metod a jejich výsledkům.

Ze všech pacientů byla u 8 z nich potvrzena specifická mutace v genu *HBB*, která zapříčinila heterozygotní nosičství  $\beta$ -talasemické alely. Dvěma pacientům bylo diagnostikováno heterozygotní nosičství alely pro strukturní Hb variantu, konkrétně HbE a Hb Lepore.

## 8 Literatura

Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I. L. (2000): A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404 (6774): 193–197.

Cao A., Galanello R. (2010):  $\beta$ -thalassemia. *Genetics in Medicine*, 12 (2): 61–76.

Divoká M., Partschová M., Kucerová J., Mojžíková R., Cermák J., Pospíšilová D., Fabryová V., Prochazková D., Indrác K. a Divoký V. (2016): Molecular characterization of  $\beta$ -thalassemia in the Czech and Slovak populations: Mediterranean, Asian and unique mutations. *Hemoglobin*, 40 (3): 156–162.

Divoká M., Partschová M., Pospíšilová D., Orviská M., Lapčíková A., Indrác K., Čermák J., Divoký V. (2016): Alfa-talasemie u 45 českých rodin a 37 rodin cizinců žijících v České republice: přehled literatury a molekulárně-genetická diagnostika, *Transfúze a hematologie dnes*, 22 (3): 201–209.

Divoký V., Walczysková S., Pospíšilová D., Priwitzerová M., Takáčová S., Kostelecká I., Divoká M., Rožmanová Š., Jarošová M., Čermák J., Indrác K., Česko-slovenská kooperativní skupina pro diagnostiku hemoglobinopatií (2005): Některé vzácnější formy hereditárních anémií vyskytující se v dospělé populaci v ČR a SR –  $\beta$ -talasemie a nestabilní hemoglobinové varianty, *Vnitřní lékařství*, 51 (7–8): 886–893.

Divoký V., Indrác K., Mojžíková R. (2013): Hemoglobinopatie: talasémie a strukturní Hb varianty. In: Pospíšilová Š., Dvořáková D., Mayer J. a kol. (eds.): Molekulární hematologie, pp. 270–283, Galén, Praha.

Dzierzak E., Philipsen S. (2013): Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3 (4): a011601.

Fucharoen S., Weatherall D. J. (2012): The Hemoglobin E Thalassemias. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2 (8): a011734.

Indrak K., Wiedermann B. F., Batek F., Wilson J. B., Webber B. B., Kutlar A., Huisman T. H. (1987): Hb Olomouc or alpha 2 beta 2(86)(F2)Ala----Asp, a new high oxygen affinity variant. *Hemoglobin*, 11 (2): 151–5.

Indrak K., Indrakova J., Kutlar F. a kol. (1991): Compound heterozygosity for a beta zero-thalassemia (frameshift codons 38/39; -C) and a nondeletional Swiss type of HPFH (A→C at NT-110, Ggamma) in a Czechoslovakian family. *Annals of Hematology*, 63 (2): 111–115.

Jagannathan-Bogdan M, Zon LI (2013): Hematopoiesis. *Development*, 140 (12): 2463–2467.

Jindrák K. (2001): Erytropoéza. In: Anděl M., Kozák T. a kol. (eds): Vnitřní lékařství, pp. 21, Galén-Karolinum, Praha.

Kohne E. (2011): Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, 108 (31–32): 532–540.

Marengo-Rowe A. J. (2006): Structure-function relations of human hemoglobins. *Proceedings from Baylor University Medical Center*, 19 (3): 239–245.

Novotný J. (2011): Hemoglobin. In: Penka M., Tesařová E. a kol. (eds): Hematologie a transfuzní lékařství I, pp. 20–21, Grada, Praha.

Palis J., Yoder M. C. (2001): Yolk-sachematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. *Experimental Hematology*, 29 (8): 927–936.

Sanger F., Nicklen S., Coulson R. (1977): DNA sequencing with chain terminative inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 5463–5467.

Steinberg M. H. (2008): Sickle cell anemia, the first molecular disease: Overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Scientific World Journal* 8: 1295–1324.

Thein S. L. (2013): The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3: a011700.

Thein S. L., Wood W. G. (2009): The Molecular Basis of  $\beta$ Thalassemia,  $\delta\beta$  Thalassemia, and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. In: Steinberg M. H., Forget B. G., Higgs D. R., Weatherall D. J. (eds): Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management, pp. 323–356, Cambridge University Press, New York.

Vrbacký F. (2010): Cytogenetické a molekulárně genetické metody. In: Pecka M., Bláha M. a kol. (eds.): Praktická hematologie: laboratorní metody, pp. 311–322, Infiniti art, Český Těšín.

Weatherall D. J. (2008): Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Current Molecular Medicine*, 8 (7): 592–599.