



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Sekvenování genu *ORMDL3*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ZDRAVOTNÍ
LABORANT

Autor: Kristýna Krupilová

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „**Sekvenování genu *ORMDL3***“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 28. 4. 2021

.....

Kristýna Krupilová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D., za odborné vedení práce, cenné rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnoval. Děkuji také Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity za možnost provedení praktické části v její laboratoři. V neposlední řadě děkuji mé rodině za trpělivost a podporu.

Sekvenování genu *ORMDL3*

Abstrakt

Hlavním tématem předkládané práce je analýza sekvencí genu *ORMDL3*, který je identifikován jako potenciální rizikový faktor řady onemocnění, přičemž nejdiskutovanějším z nich je dětské astma. Tento gen je členem skupiny genů *ORMDL*, kódující transmembránové proteiny ukotvené v endoplazmatickém retikulu. *ORMDL3* je u člověka lokalizován na chromozomu 17, v oblasti 17q21.1.

V teoretické části práce jsou blíže specifikována autoimunitní onemocnění, na jejichž vzniku a rozvoji se mutace v genu *ORMDL3* do určité míry podílí. Těmito onemocněními je již zmíněné astma, dále Crohnova choroba, revmatoidní artritida, inzulin dependentní diabetes mellitus a primární biliární cirhóza. Následně je zde popsána metoda Sangerova sekvenování, pomocí níž byly vzorky sekvenovány, a novodobá metoda NGS.

Praktická část práce je zaměřena na přípravu vzorků pro Sangerovo sekvenování a hodnocení sekvenačních dat. K amplifikaci požadovaného úseku pro sekvenační reakci byla použita metoda PCR. Takto bylo připraveno 20 anonymizovaných vzorků DNA. K sekvenování firmou Genseq s.r.o. bylo odesláno 15 vzorků. Dále bylo hodnoceno 20 poskytnutých vzorků, z nichž 10 bylo od dětí z Českobudějovicka a 10 od dětí z Karvinska. Také tyto vzorky byly anonymizovány.

Pro analýzu sekvencí jednotlivých vzorků DNA byl využit volně přístupný program BioEdit a databáze NCBI. Sekvence byly přečteny z obou stran (forward a reverse), nalezené mutace identifikovány a výsledná data zaznamenána do grafů. Po přečtení vlastních sekvencí byla u 5 z 15 vzorků přítomna heterozygotní mutace. Stejná mutace byla přítomna také v poskytnutých sekvencích, konkrétně u 8 z 10 Českobudějovických a 3 z 10 Karvinských. Tato mutace není v databázi NCBI dosud popsána.

Klíčová slova

ORMDL3; astma; Sangerovo sekvenování; PCR; heterozygotní mutace

Sequencing of the *ORMDL3* gene

Abstract

The main topic of the presented bachelor thesis is a sequence analysis of the *ORMDL3* gene, which is identified as a potential risk factor for many diseases, the most discussed of which is childhood asthma. This gene is a member of the *ORMDL* gene family, which encodes transmembrane proteins anchored in the endoplasmic reticulum. In humans, *ORMDL3* is located on chromosome 17, in region 17q21.1.

In the theoretical part of the thesis the autoimmune diseases, on which origin and development the mutations in the *ORMDL3* gene participate to a certain extent, are specified. These diseases include the aforementioned asthma, Crohn's disease, rheumatoid arthritis, insulin-dependent diabetes mellitus and primary biliary cirrhosis. Also, the Sanger sequencing method by which the samples were sequenced, and the modern NGS method are described here.

The practical part of the thesis is focused on preparation of samples for Sanger sequencing, and evaluation of sequencing data. To amplify the desired region for the sequencing reaction, the PCR method was used. 20 anonymized DNA samples were prepared this way. For sequencing by Genseq s.r.o. 15 samples were sent. Furthermore, 20 provided samples were evaluated, 10 of which were from children from the České Budějovice region and 10 from children from the Karviná region. These samples were also anonymized.

To analyze the sequences of individual DNA samples, freely available BioEdit program and the NCBI database was used. The sequences were read from both sides (forward and reverse), the found mutations were identified and the resulting data were plotted in graphs. After the sequences were read, a heterozygous mutation was present in 5 of the 15 samples. The same mutation was also present in the provided sequences, specifically in 8 out of 10 from České Budějovice and 3 out of 10 from Karviná. This mutation has not yet been described in the NCBI database.

Keywords

ORMDL3; asthma; Sanger sequencing; PCR; heterozygous mutation

Obsah

Úvod	9
1 Gen <i>ORMDL3</i>.....	10
1.1 Sfingolipidy.....	10
1.2 Hladina Ca ²⁺	11
1.3 ATF6	11
2 Astma.....	12
2.1 Rizikové faktory rozvoje onemocnění	12
2.2 Patofyziologie a klinický obraz.....	12
2.3 Prevence	13
2.4 Diagnostika	14
2.5 Terapie.....	14
3 Inzulin dependentní diabetes mellitus (IDDM)	16
3.1 Patogeneze.....	16
3.1.1 Genetika	16
3.1.2 Rizikové faktory prostředí	17
3.2 Patomechanismus IDDM	17
3.3 Diagnostika a klinický obraz.....	17
3.4 Terapie.....	18
4 Crohnova choroba	19
4.1 Příznaky Crohnovy choroby	19
4.2 Rizikové faktory	19
4.3 Patofyziologie	20
4.4 Diagnostika	21
4.5 Terapie.....	21
5 Revmatoidní artritida	23
5.1 Příznaky RA	23
5.2 Etiopatogeneze	24
5.3 Klinický obraz.....	24
5.4 Diagnostika a diferenciální diagnostika.....	25
5.5 Terapie.....	26
5.6 Prognóza.....	27
6 Primární biliární cirhóza	28
6.1 Etiopatogeneze	28

6.2	Klinický obraz.....	28
6.3	Diagnostika	29
6.4	Terapie.....	29
6.5	Prognóza.....	29
7	Metody sekvenování	30
7.1	Sangerovo sekvenování.....	30
7.2	NGS (Next Generation Sequencing)	31
8	Cíle práce.....	33
9	Metodika vyšetření genu <i>ORMDL3</i>	34
9.1	Odběr vzorků DNA	34
9.2	Izolace DNA.....	34
9.2.1	Reagencie, spotřební materiál a laboratorní vybavení.....	35
9.2.2	Pracovní postup.....	35
9.3	Měření koncentrace DNA v izolátu	36
9.4	PCR	37
9.4.1	Průběh PCR.....	37
9.4.2	Reagencie, spotřební materiál a laboratorní vybavení.....	38
9.4.3	Použité primery	39
9.4.4	Pracovní postup.....	39
9.4.5	Sekvenovaný úsek.....	40
9.5	Elektroforéza	41
9.5.1	Reagencie, spotřební materiál a laboratorní vybavení.....	41
9.5.2	Pracovní postup.....	42
9.6	Enzymatické přečištění PCR produktů	43
9.6.1	Reagencie, spotřební materiál a laboratorní vybavení.....	43
9.6.2	Pracovní postup.....	43
9.7	Příprava na sekvenaci DNA	44
9.7.1	Reagencie a spotřební materiál	44
9.7.2	Pracovní postup.....	44
10	Výsledky	45
10.1	Osobně izolované vzorky DNA	45
10.1.1	Koncentrace DNA v izolátu.....	46
10.1.2	Elektroforéza.....	46
10.2	Hodnocená sekvencí.....	47
10.2.1	Hodnocení sekvencí vzorků DNA dětí z Českobudějovicka.....	47

10.2.2	Hodnocení sekvencí vzorků DNA dětí z Karvinska.....	50
10.2.3	Srovnání sekvencí z Českobudějovicka a Karvinska	50
10.2.4	Hodnocení vlastních sekvencí	53
11	Diskuse.....	55
12	Závěr.....	59
13	Literatura	60
14	Seznam grafů, tabulek a obrázků	69
15	Seznam zkratk.....	70

Úvod

Astma je jedním z nejčastějších chronických onemocnění a jeho prevalence neustále narůstá. Toto onemocnění je socioekonomickým problémem po celém světě (Kudo et al., 2013) a nejčastěji postihuje děti a mladistvé (Verlaan et al., 2009).

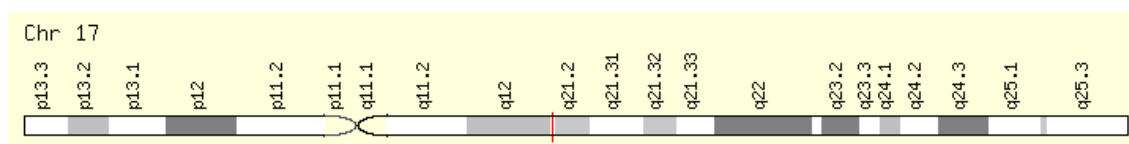
Přítomnost mutace v genu *ORMDL3* může zvýšit riziko rozvoje astmatu, ale i řady dalších autoimunitních onemocnění (Bugajev et al., 2016). Mezi tato autoimunitní onemocnění patří Crohnova choroba (zánětlivé onemocnění střev), inzulin dependentní diabetes mellitus (tělo není schopné dodávat nebo efektivně využívat inzulin), revmatoidní artritida (postihuje klouby) a primární biliární cirhóza (onemocnění jater) (Verlaan et al., 2009).

Cílem práce je osvojení základních metod molekulární biologie a dále srovnání nalezených mutací v genu *ORMDL3* mezi populacemi dětí z Karvinska a Českobudějovicka. Součástí práce bude popis laboratorních metod od izolace DNA, její kvantifikace, PCR amplifikace, až po přípravu vzorků pro Sangerovo sekvenování. Sekvence jednotlivých vzorků budou analyzovány a výsledky analýzy následně porovnány v ohledu na již zmíněné oblasti, ze kterých děti pochází. Sledována bude četnost výskytu mutací a nalezené mutace budou blíže specifikovány.

Bude ověřeno, že metodiku sekvenování z primárního vzorku bukalního stěru lze použít v klinické praxi. Výsledek této práce by měl přispět ke vztahu výskytu mutací v závislosti na prostředí.

1 Gen *ORMDL3*

Gen *ORMDL3* (Orosomucoid like-3 protein) je členem genové rodiny *ORMDL*, která kóduje transmembránové proteiny ukotvené v endoplazmatickém retikulu. Do této skupiny genů patří také gen *ORMDL1* a *ORMDL2*. *ORMDL3* je u člověka lokalizován na chromozomu 17, v oblasti 17q21.1. Obsahuje celkem 7 exonů (NCBI, 2021), z toho 3 kódující. Kódující oblast čítá celkem přes 2 tisíce bází (Hjelmqvist et al., 2002). Polymorfismy v lokusu na chromozomu 17q21.1. jsou spojovány se zvýšenou expresí genu *ORMDL3* a přispívají tak k patogenezi několika onemocnění (Zhang et al. 2019).



Obrázek 1 Lokace genu *ORMDL3* (zdroj: GeneCards, © 2021)

Gen *ORMDL3* je úzce spojen s častým výskytem astmatu u kojenců a dětí předškolního věku (Bugajev et al., 2016). Astma ovšem není jediným onemocněním, u kterého je pozorována přítomnost tohoto genu. Dalšími zánětlivými onemocněními jsou Crohnova choroba, revmatoidní artritida, inzulin dependentní diabetes mellitus a primární biliární cirhóza (Verlaan et al., 2009).

1.1 Sfingolipidy

Sfingolipidy jsou podstatné v celé řadě dějů. Hrají důležitou roli při udržování funkce a integrity membrány, zachování struktury a funkce lipoproteinů a při prevenci mnoha nemocí. Tvoří velmi odolnou lipidovou dvojvrstvu plazmatické membrány, a tím chrání povrch buněk před škodlivými faktory prostředí. Jednoduché metabolity sfingolipidů, mající funkci mediátorů v signalizačních kaskádách, se účastní zánětu, nekrózy, apoptózy, diferenciací, stresových faktorů a dalších specifických procesů (Worgall, 2017).

Gen *ORMDL3* působí jako mediátor sfingolipidové homeostázy a může mít vliv na funkci eozinofilů. Nadměrná exprese *ORMDL3* snižuje syntézu sfingolipidů, zvyšují se tak zánětlivé markery, a dochází k remodelaci a hyperreaktivitě dýchacích cest v reakci na alergické podněty. Vše tedy naznačuje tomu, že nesprávná regulace sfingolipidů přispívá k rozvoji dětského astmatu (Worgall, 2017).

1.2 Hladina Ca²⁺

Gen *ORMDL3* je široce exprimován v různých tkáních. Jeho exprese je vysoká zejména v buňkách účastnících se zánětlivé odpovědi. *ORMDL3* mění homeostázu Ca²⁺ v ER, které je důležité pro signalizaci, výrobu, fungování a ukládání vnitrobuněčného Ca²⁺. Změny hladiny Ca²⁺ v ER vedou k rozložení proteinové odpovědi, což je proces považovaný za endogenní induktor zánětu. Následkem dysregulace Ca²⁺ je několik patologických stavů, mezi které se řadí nesprávná funkce pumpy SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase) (Bugajev et al., 2016).

Pumpa SERCA je zprostředkovatelem transportu vápenatých iontů z cytosolu do ER. Produkt genu *ORMDL3* inhibuje pumpu SERCA, což má za následek sníženou koncentraci ER vápníku a zvýšenou reakci rozvinuté proteinové odpovědi (UPR) (Cantero-Recasens et al., 2010).

UPR se podílí na remodelaci dýchacích cest a je obzvláště relevantní v buňkách imunitního systému, kde má vliv na vývoj lymfocytů a funkci plazmatických buněk. Je aktivována v případě rozložených nebo nesprávně složených proteinů v lumenu ER. Cílem UPR je obnovení správné funkce buňky zastavením translace proteinu, degradací nesprávně složených proteinů a následnou aktivací signálních drah. Tyto dráhy vedou ke zvýšení produkce chaperonů a podílejí se na skládání proteinů. Pokud se tento proces nepovede, následuje apoptóza (Cantero-Recasens et al., 2010).

1.3 ATF6

Dále je gen *ORMDL3* spojen s aktivačním transkripčním faktorem 6 (ATF6). ATF6 je stresem regulovaný transkripční faktor, který aktivuje transkripci molekul ER. V případě výskytu špatně poskládaných proteinů v ER dochází k proteolytickému štěpení ATF6, přičemž se cytosolická část tohoto faktoru přesune do jádra a zapříčiní transkripci chaperonů (Das a Broide, 2016). ATF6 společně s dalšími transmembránovými proteiny lokalizovanými v endoplazmatickém retikulu detekují množství rozloženého proteinu v lumenu organely a slouží jako stresové receptory. Transdukují signál do jádra, který vede k regulaci transkripce a syntézy proteinů. Souhrnně signalizují rozvinutou proteinovou odpověď (UPR) (Ron a Walter, 2007).

2 Astma

Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest a je vážným zdravotním a socioekonomickým problémem po celém světě. (Kudo et al., 2013). Nejčastěji postihuje děti a mladistvé (Verlaan et al., 2009). Přítomnost mutace v genu *ORMDL3* způsobuje u dětí o 60 až 70 % vyšší riziko vzniku astmatu (Gordon, 2011). V České republice trpí astmatem minimálně 800 tisíc lidí (Brhel, 2008).

Toto onemocnění vzniká nejčastěji v dětství, avšak ve většině případů přetrvává až do dospělosti (Care Comm, © 2020). Lze tedy říct, že astmatem mohou trpět osoby všech věkových kategorií. V současné době jej nelze zcela vyléčit, a ani mu nijak účinně primárně předcházet. Pokud není toto onemocnění pod kontrolou, způsobuje značné omezení každodenního života a ve vážnějších případech i smrt (Kašák, 2018). Je také úzce spojeno s alergiemi a může být doprovázeno alergickými stavy, jako je například senná rýma (Care Comm, © 2020). Zavedení léčby inhalačními kortikosteroidy výrazně přispělo ke zlepšení života nemocných trpících astmatem. V současnosti tak lze u většiny pacientů plně kontrolovat symptomy astmatu. K těžkým exacerbacím nemoci s nutností péče na JIP tak dochází velmi vzácně (Ševčík a Matějovič, 2014).

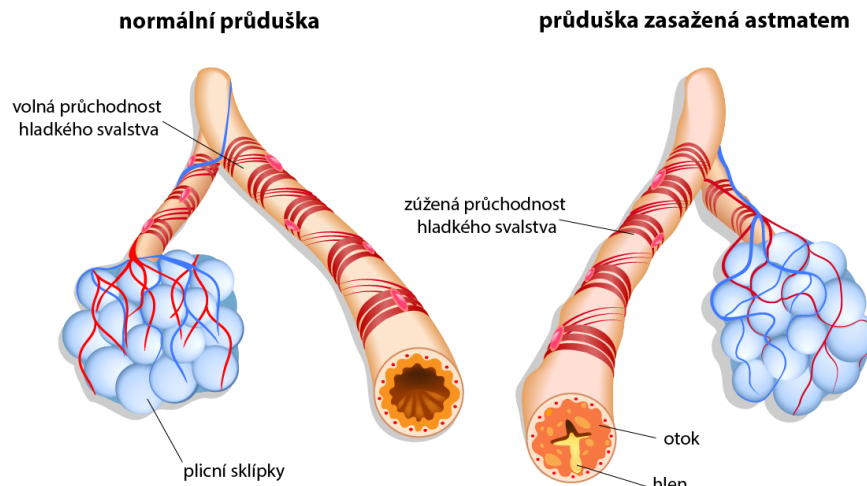
2.1 Rizikové faktory rozvoje onemocnění

Na vzniku astmatu se podílejí dědičné faktory spolu s negativním vlivem vnějšího prostředí (Kašák, 2018). Mezi rizikové faktory zevního prostředí patří např. alergeny, kouření, pasivní kouření a roztoči. U dospělých astma začíná často po nachlazení, viróze nebo při expozici dráždivému faktoru na pracovišti. Vývoj astmatu u dětí je dán zejména expozicí roztočů v domácnosti (prach - koberce, matrace, plyšáci). Trus roztočů obsahuje bílkovinu, která v případě přecitlivělosti jedince vyvolává po vdechnutí reakci na výstelce průdušek vedoucí k zánětu dýchacích cest (Ayres, 2001).

2.2 Patofyziologie a klinický obraz

Toto chronické zánětlivé onemocnění je doprovázeno rozsáhlými změnami ve stavbě dýchacích cest. Tyto změny jsou označovány jako remodelace, jejíž podstatou je proliferace fibroblastů, depozice kolagenu v subepitelové lamina reticularis a hyperplazie a hypertrofie buněk hladkých svalů (Brhel, 2008). K remodelaci dochází v důsledku

dlouhodobě probíhajícího zánětu. Reaktivita dýchacích cest je tak zvýšena a projevuje zhoršeným (omezeným) průtokem vzduchu plicemi. Dýchací cesty jsou zúženy stahem svaloviny průdušek a otokem sliznice, případně ucpané hlenovou zátkou, která uzavírá periferní průdušky (Kašák a Koblížek, 2009). Kromě toho hladké svalstvo dýchacích cest vykazuje zvýšenou proliferativní a migrační reakci a také zvýšenou sekreci nesčetného množství protizánětlivých cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (Mahn et al., 2009).



Obrázek 2 Zánět průdušek způsobující astma (zdroj: Designua, © 2021)

Astma se klinicky projevuje exacerbacemi s příznaky bronchiální obstrukce a kašlem. Pro bronchiální obstrukci je charakteristická dušnost, tíha na hrudi a pískání. Prvotním podnětem ke vzplanutí nemoci je negativní působení spouštěčů, kterými mohou být alergeny (např. srst, plísňe, pyly), respirační infekce (např. rhinoviry, viry parainfluenzy), hyperventilace (např. při tělesné námaze, smíchu), změny počasí, některé potraviny, léky (např. aspirin) a drogy (Kašák a Koblížek, 2009).

2.3 Prevence

Základním krokem při prevenci je vyhýbání se alergenům. Za nezbytnou je považována likvidace prachu v domácnosti (žijí v něm roztoči). Domácí zvířata jsou dalším ze spouštěčů alergické reakce (kočky, psi, králíci) a déletrvající kontakt s nimi může vést ke chronickému zhoršování astmatu. Pacienti by se měli vyhýbat potravinám, na které jsou alergičtí, ovšem ne vždy je dieta k udržení astmatických příznaků pod kontrolou dostatečná. Kuřáci by měli přestat kouřit a vyvarovat se pasivnímu kouření. Pokud matka

během těhotenství kouří, zvyšuje se tím riziko, že se jí narodí dítě s astmatem (Ayres, 2001).

2.4 Diagnostika

Stanovení diagnózy astmatu bývá obtížné, protože má podobné příznaky jako řada dalších onemocnění dýchací soustavy (Ayres, 2001). Klinicky jej lze stanovit podle čtyř hlavních příznaků mezi něž patří dušnost, hvízdavý dech, kašel a pocit tíhy na hrudi. Pro potvrzení diagnózy je nezbytné vyšetření funkce plic (Brhel, 2008). Základem pro určení astmatu jsou funkční dechové testy (měření vrcholové rychlosti výdechu a spirometrie), které měří míru zúžení dýchacích cest (Ayres, 2001). Alergologické vyšetření není pro stanovení diagnózy rozhodující, může ale pomoci k rozpoznání rizikových faktorů vyvolávajících u pacienta příznaky (Brhel, 2008).

2.5 Terapie

V současné době toto onemocnění nelze vyléčit, ale při dlouhodobé a preventivní léčbě je možné mít jej pod kontrolou. Léčba je prováděna za účelem udržení oxygenace, zmírnění bronchiální obstrukce, snížení otoku dýchacích cest a tvorby hlenu a podporu ventilace (Ševčík a Matějovič, 2014). Léky pro léčbu astmatu lze rozdělit na preventivní (kontrolující) a úlevové. Preventivní léky působí protizánětlivě a jsou užívány dlouhodobě (udržení kontroly nad astmatem), naopak léky úlevové jsou užívány dle potřeby (rychle působí a odstraňují bronchokonstrikci) (Brhel, 2008).

Inhalační kortikosteroidy (IKS) jsou v současnosti považovány za nejúčinnější preventivní antiastmatika s protizánětlivými účinky, která jsou zároveň i lékem modifikujícím nemoc. Jejich užívání je vhodné pro všechny věkové kategorie. Dlouhodobá terapie IKS efektivně potlačuje chronický zánětlivý proces v dýchacích cestách u většiny pacientů s bronchiálním astmatem. Časné nasazení terapie IKS pomáhá v prevenci vzniku ireverzibilních změn v dýchacích cestách (Hutyrová, 2015).

Kombinovaná farmakoterapie je nejúčinnější v kombinaci IKS a LABA, především ve fixní kombinaci jedním inhalátorem. Tato kombinace (IKS a LABA, případně IKS a teofyliny) je prospěšná hlavně u kuřáků (20-40 % astmatické populace), u kterých je důsledkem kouření rozvoj sekundární kortikorezistence. Kouření snižuje účinnost

enzymu HDAC2 nezbytného pro zastavení acetylace histonů a následného zastavení produkce protizánětlivých mediátorů (Brhel, 2008).

Teofyliny (např. Afonilum, Euphyllin) jsou léky v tabletové formě, původně užívány k uvolnění průdušek (bronchodilatační preparáty), nyní spíše v prevenci. Dalšími užívanými léky jsou blokátory leukotrienů (Singulair, Accolate), které jsou vhodné také především pro prevenci, ale mají i lehké bronchodilatační účinky (Ayres, 2001).

3 Inzulin dependentní diabetes mellitus (IDDM)

Inzulin dependentní diabetes mellitus, známý také jako diabetes mellitus 1. typu, je onemocnění, při kterém naše tělo není schopné dodávat nebo efektivně využívat inzulin (Nussbaum et. al, 2004). IDDM se řadí mezi autoimunní endokrinopatie. U osob náchylných k tvorbě autoprotilátek proti vlastním endokrinním žlázám je obvykle pozorována typická konfigurace HLA genů, ovšem ne každý, u koho je přítomna, onemocní. Počátkem vzniku onemocnění IDDM je hyperglykemie a ketacidóza, vyžadující léčbu inzulinem (Svačina, 2010).

Za sekreci inzulinu odpovídají β -buňky Langerhansových ostrůvků. Pokud dojde autoimunitním procesem ke zničení více než 90 % těchto buněk, dochází k nedostatečné sekreci inzulinu a k rozvoji onemocnění (Škrha, 2009).

3.1 Patogeneze

3.1.1 Genetika

Hlavní roli v rozvoji IDDM hrají genetické faktory. Onemocnění jako takové se nedědí, dědí se pouze náchylnost na něj. Významným ukazatelem je HLA-systém (Sršeň a Sršňová, 1995). HLA lokus může 30-60 % přispívat k susceptibilitě na IDDM (Nussbaum et. al, 2004). Bylo zjištěno, že 95 % bělošské rasy má haplotyp HLA-DR3 nebo HLA-DR4, popřípadě oba tyto haplotypy (Sršeň a Sršňová, 1995), ačkoli u kontrol jsou zjišťovány jen u 50 % populace (Nussbaum et. al, 2004). Tyto haplotypy neumožňují identifikovat geny pro individuální susceptibilitu.

V asociaci s HLA-DR4 se vyskytují podobně jako IDDM i další autoimunitní onemocnění, proto nelze určit specifický gen, který je zodpovědný za individuální susceptibilitu. Může se tedy jednat o jakýkoli gen (popřípadě geny) na dlouhém raménku chromozómu, na kterém jsou haplotypy DR4 (Sršeň a Sršňová, 1995).

Zdá se, že hlavním aspektem pro vnímavost k IDDM je alela DQ β 1'0302 (segreguje s DR4) a DQ β 1'0201 alela (segreguje s DR3). Naopak tomu je u alely DQ β 1'602 (segregována s DR2), která je jakousi ochrannou alelou potlačující vliv susceptibilní alely (v případě, že jsou přítomny obě) (Nussbaum et. al, 2004).

3.1.2 Rizikové faktory prostředí

Dalším faktorem pro susceptibilitu na IDDM je vliv vnějšího prostředí. Mezi rizikové faktory patří virové infekce (např. virus rubeoly, parotitidy, influenzy A), léky, výživa a některé chemické látky (např. nitrozamíny) (Sršeň a Sršňová, 1995). Diskutována je také předčasná výživa novorozenců produkty z kravského mléka (Fölsch et al., 2003). Právě časný příjem kravského mléka a virové infekce se zřejmě podílejí na vzniku autoimunitní reakce proti β -buňkám (Škrha, 2009).

3.2 Patomechanismus IDDM

Zmíněné exogenní faktory (virová infekce a časná expozice bovinnímu albuminu) mohou vyvolat autoimunitní reakci, při které dochází k destrukci β -buněk. K té dochází na základě sdílení antigenních determinantů mezi β -buňkami a virovým nebo bovinním albuminem. Ovšem skutečnost, že pouze u 1 % z 10 % osob majících tyto autoprotilátky se vyvine IDDM ukazuje, že autoprotilátky nejsou jediným faktorem, který se podílí na progresi tohoto onemocnění (Nussbaum et. al, 2004).

3.3 Diagnostika a klinický obraz

V současné době je diabetes mellitus diagnostikován a klasifikován podle kritérií Světové zdravotnické organizace nebo Americké diabetologické asociace (Perušičová, 2008). IDDM má obvykle rychlý nástup, proto je nezbytné rychlé zahájení léčby, aby bylo zabráněno ohrožení života ketacidózou (Svačina, 210).

Diagnostickými kritérii jsou v současné době:

1. glykemie $\geq 11,1$ mmol/l
 - a) náhodná + klasické symptomy
 - b) ve 120. minutě oGTT s podáním 75 g glukózy
2. glykemie $\geq 7,0$ mmol/l nalačno zjištěná opakovaně (Svačina, 2010)

Mezi abnormality vyvolané nedostatkem inzulínu patří hyperglykemie, zvýšené koncentrace volných mastných kyselin, ketoláték v séru a koncentrace triglyceridů, snížení syntézy a zvýšený katabolismus bílkovin, dehydratace. Typickým příznakem

IDMM je váhový úbytek, polyurie a polydypsie a acetonový foetor. V závažnějších případech dochází ke Kussmaulovu dýchání a ke kómatu (Svačina, 2010).

3.4 Terapie

Dieta a fyzická aktivita jsou v léčbě IDMM nezbytným opatřením. Dieta by měla založena na vyšší frekvenci jídel a omezení potravin s vyšším obsahem cukru. Sacharidy by tedy měly být přijímány rovnoměrně v průběhu celého dne (Svačina, 2010). Cílem regulované stravy je zabránit kolísání glykemií a rozvoji hypoglykémie. Fyzická aktivita snižuje glykémii a podíl tělesného tuku, zvyšuje utilizaci glukózy v organismu, upravuje lipidové spektrum a příznivě ovlivňuje krevní tlak (Perušičová, 2007). Současně s dietou je diabetik obvykle léčen intenzifikovaným inzulínovým režimem, který zahrnuje tři dávky krátkodobě působícího inzulínu a jednou či dvakrát denně dlouhodobě působícího inzulínu (Svačina, 2010).

Po navození normoglykemie může být potřeba inzulínu velmi malá, přesto jej nevysazujeme. Udržování léčby inzulínem je důležité jak z hlediska psychologického (je jisté, že brzy k inzulínoterapii znovu dojde), tak objektivního (vlivem léčby inzulínem dochází k pomalejšímu zániku exkrece vlastního inzulínu). Analoga inzulínu jsou syntetické molekuly blízké inzulínu a jsou připravovány záměnou aminokyselin nebo navázáním dalšího řetězce. Jsou předepisována jako předstupeň léčby inzulínovou pumpou, která je indikována u pacientů, u kterých není klasická inzulínoterapie dostatečně účinná (Svačina, 2010).

4 Crohnova choroba

Crohnova choroba je onemocnění běžně označováno jako zánětlivé onemocnění střev (Khatri, 2020). Toto onemocnění je charakterizováno transmurálním granulomatózním zánětem, který může postihnout jakoukoli část gastrointestinálního traktu (Ha a Khalil, 2015). Nejčastěji postiženou částí jsou již zmíněná střeva. Může se jednat o postižení tenkého střeva, tlustého střeva anebo obou dohromady (Ranasinghe a Hsu, 2020). Prevalence se za poslední desítky let neustále zvyšuje (Cosnes et al. 2011). Nejčastější období nástupu onemocnění je ve věku 15 až 30 let a 40 až 60 let. Crohnovu chorobu dosud nelze vyléčit, proto je léčba založena především na zmírnění příznaků, které pacientům brání v prožití aktivního a kvalitního života (Khatri, 2020).

4.1 Příznaky Crohnovy choroby

Nejčastějším příznakem onemocnění je chronický průjem s výskytem krve, hlenu anebo obojího současně. Na to navazují bolesti břicha a ztráta na váze pacienta (Ha a Khalil, 2015). Dále může být přítomno rektální krvácení (Khatri, 2020).

Crohnova choroba způsobuje místní (střeva) a systémové (extraintestinální) komplikace. Mezi místní komplikace patří absces, perianální píštěle, malabsorpce živin v tenkém střevě a řada dalších problémů. Systémovými komplikacemi jsou artritida a ankylozující spondylitida a kožní problémy erythema nodosum (Khatri, 2020), a méně obvyklá pyoderma gangrenosum (Ha a Khalil, 2015).

4.2 Rizikové faktory

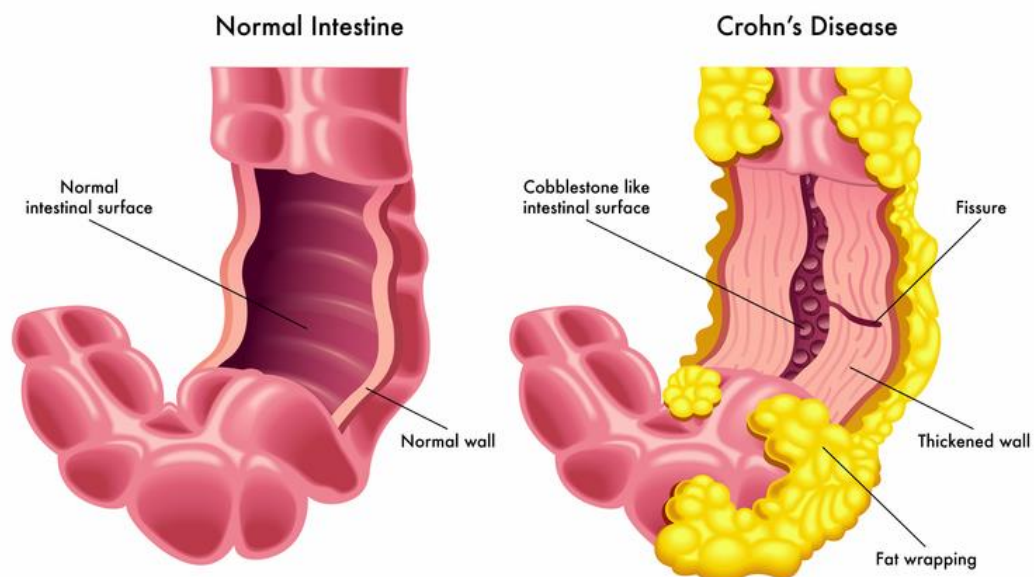
O tom, zda onemocníme Crohnovou chorobou rozhoduje interakce mezi genetickou predispozicí a rizikovými faktory prostředí (Ha a Khalil, 2015). Crohnova choroba je poměrně často dědičná, a to až u 20 % postižených (Khatri, 2020). Na rozvoji se podílejí i další zánětlivá onemocnění, včetně astmatu, ankylozující spondylitidy, atopické dermatitidy, psoriázy (lupénky) a primární sklerozující cholangitidy (Ha a Khalil, 2015). Hlavním rizikovým faktorem je kouření, které může vést ke zhoršení onemocnění a zvýšení pravděpodobnosti k nutnému operačnímu zákroku. Protizánětlivé léky jako je ibuprofen a další jemu podobné, nezpůsobují Crohnovu chorobu, ale mohou vést k zánětu střev a ke zhoršení stavu. Také strava hraje významnou roli. Negativní dopad má vysoký

příjem tuků a průmyslově zpracovaných potravin (Khatri, 2020). Naopak strava s vysokým obsahem vlákniny a ovoce působí pozitivně (Ha a Khalil, 2015).

4.3 Patofyziologie

Pro Crohnovu chorobu je charakteristický transmurální zánět. Ten může zahrnovat celý gastrointestinální trakt od úst až po perianální oblast. Jak již bylo zmíněno, nejčastěji postiženou oblastí je tenké a tlusté střevo. Nejprve je poškozena oblast kolem Lieberkühnových krypt, poté dochází ke tvorbě vředů (nejprve na povrchu sliznice, poté prostup do hlubších vrstev). Následná je tvorba granulomů ve všech vrstvách stěvní stěny. Zanícené oblasti střev jsou nahrazeny jizvami. Zánět a následné zjizvení vedou k obstrukci střev a tvorbě zúžení (Ranasinghe a Hsu, 2020).

Tvorba granulomů je u Crohnovy choroby velmi častá, nicméně jejich absence nevylučuje diagnózu. Častý je také vznik píštělí, které mohou propojit kličky střev (Ranasinghe a Hsu, 2020).



Obrázek 3 Porovnání vzhledu zdravého střeva a střeva postiženého Crohnovou chorobou (zdroj: Sambav Health, 2019)

4.4 Diagnostika

Ke stanovení diagnózy Crohnovy choroby nestačí pouze jedno vyšetření. Důvodem je velký počet příznaků, které mohou být přítomny i u jiných zdravotních problémů. Proto je zapotřebí mnoho vyšetření a jejich následné posouzení (Khatri, 2020). V současnosti je nejpoužívanějším diagnostickým vyšetřením ileokolonoskopie s biopsií (Ha a Khalil, 2015). Pomocí laboratorních testů jsou hledány známky infekce, zánětu, vnitřního krvácení a nízké hladiny některých látek (železo, bílkoviny, minerály). Krevní testy zahrnují několik různých vyšetření. Testy na protilátky zjišťují, zda se jedná o Crohnovu chorobu nebo ulcerózní kolitidu (ASCA, pANCA). Dále se vyšetřuje krevní obraz, C-reaktivní protein, elektrolyty, rychlost sedimentace erytrocytů, hladiny železa a B12 a funkce jater (Khatri, 2020). Využívány jsou rovněž zobrazovací metody jako je výpočetní tomografie (CT) a magnetická rezonance (MRI) (Ha a Khalil, 2015).

4.5 Terapie

Neexistuje žádná univerzální léčba. Lékař se pokusí společně s pacientem zjistit, jaká léčba je pro něj nejučinnější (Pathak, 2020). Primárně by měl pacient přestat kouřit, právě kvůli negativnímu dopadu na průběh onemocnění (Ha a Khalil, 2015).

Léky jsou obvykle první volbou léčby (Pathak, 2020). Ty slouží k potlačení příznaků a zánětlivé reakce v těle (Ha a Khalil, 2015). Kortikosteroidy uklidňují imunitní systém a zmírňují otoky. Jsou předepisovány pouze pro krátké užití, protože mohou způsobit vážné vedlejší účinky. Dalšími léky jsou aminosalicyláty a imunomodulátory. Může být používán také paracetamol k potlačení bolesti. Naopak ibuprofen, naproxen a aspirin mohou příznaky zhoršit. Antibiotika jsou předepisována k zabránění vzniku infekcí v zažívacím traktu, které by mohly vést k abscesům nebo píštělím (Pathak, 2020).

Další možností léčby je dieta. Pokud je onemocnění v pokročilém stádiu, dochází k vyloučení perorálního příjmu potravy. Pacient pije pouze čiré tekutiny (Pathak, 2020) a je mu aplikována parentální nebo enterální výživa. Účinná je také bezsezbytková dieta (vyloučení nerozpustné vlákniny a tučných jídel) (Pacienti IBD z. s.). Strava by měla být rozdělena do malých porcí konzumovaných v průběhu dne (Pathak, 2020).

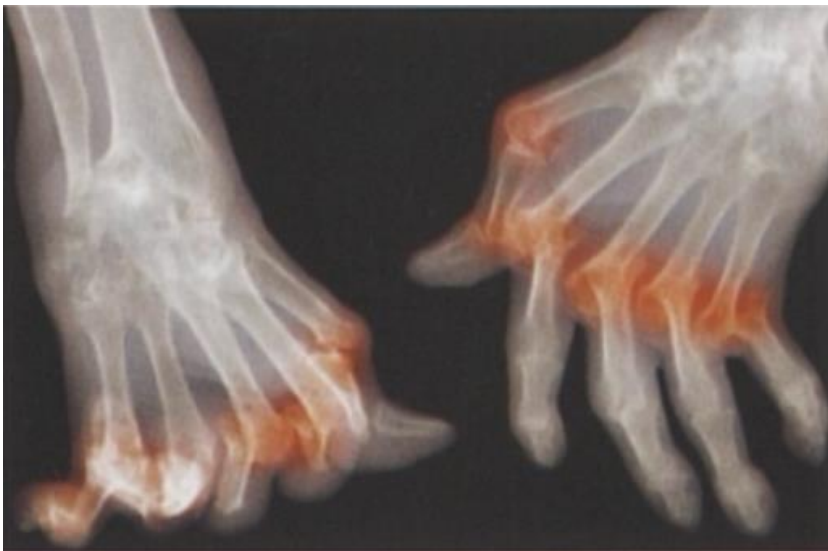
I v případě, že se léčba po nějakou dobu jeví jako účinná, je po určité době potřeba provést u většiny pacientů s diagnostikovanou Crohnovou chorobou chirurgická resekce (Pathak, 2020). Ta je nutná zejména při neúspěšné léčbě léky, opakované neprůchodnosti střev, podvýživě a při komplikacích jako je perforace a abscesy. Po operaci ovšem základní patologie stále přetrvává, což má za následek vysokou recidivitu onemocnění (až 45 % po 5 letech a až 61 % po 10 letech) (Ha a Khalil, 2015). Nejčastěji je u pacientů s Crohnovou chorobou prováděna ileocekální resekce. Nutné je vyhnout se opakovaným operacím, které vedou ke zkrácení tenkého střeva (Pacienti IBD z. s.).

5 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida (RA) je chronické zánětlivé onemocnění postihující synoviální výstelky kloubů, šlach a tíhových váček (Pavelka, 2010). Charakteristickým klinickým projevem je chronická symetrická polyartritida s následným vznikem kloubních destrukcí a deformit. Mnoho nemocných trpí současně také mimokloubními a systémovými příznaky (Pavelka, 2012). Neléčená RA snižuje kvalitu života a přispívá k výraznému funkčnímu omezení nemocných. Kardiovaskulární komplikace neléčené RA mají za následek vyšší mortalitu postižených touto nemocí (Seifert et al., 2013).

5.1 Příznaky RA

První příznaky onemocnění se projevují většinou pomalu a nenápadně, a začínají symetrickým postižením rukou. Oteklé bazální a střední klouby na rukou bývají bolestivé a po ránu zatuhlé. Postupem nemoci jsou prsty deformovány a získávají vřetenovitý tvar (Fučíková, 1995). Vlivem zánětu může dojít k odbourávání chrupavky v postiženém kloubu, difuzní periartikulární dekalcinaci a lokálnímu odbourávání kosti se vznikem destrukcí a následných deformit. Na rentgenovém snímku je pak zúžení chrupavky a přítomnost erozí. Pokud se jedná o těžší případ, mohou se objevit známky vaskulitidy (Pavelka, 2012).



Obrázek 4 Klouby prstů těžce postiženy RA (zdroj: Parker, 2007)

5.2 Etiopatogeneze

Původ onemocnění není známý. Předpokládá se, že hlavním podnětem pro rozvoj nemoci je vliv dědičných a vnějších faktorů (Pavelka, 2010). Chronický zánět je udržován zánětlivými buňkami infiltrujícími synoviální membránu a dutinu kloubu. Aktivace těchto buněk je nejpravděpodobněji vyvolána kloubním antigenem uvnitř kloubu (Pavelka, 2012). Predispozicí pro rozvoj RA je nosičství alel HLA-DR4 či HLA-DR1. Častá je také přítomnost sérových autoprotilátek proti IgG (revmatoidní faktory) a proti ACPA (citrulinovým peptidům) (Pavelka, 2010).

Patologickým projevem RA je obvykle růst zánětlivé tkáně uvnitř kloubu. Tato tkáň má destruktivní účinek způsobující poškození chrupavky a následnou aktivaci osteoklastů, čímž dochází k odbourávání kosti a vzniku erozí typických pro RA (Pavelka, 2012). Významným faktorem v udržování zánětu je vysoká tvorba prozánětlivých cytokinů, především tumor nekrotizujícího faktoru (TNF- α), a interleukinu 1 a 6 (IL-1, IL-6) (Pavelka, 2010).

5.3 Klinický obraz

Revmatoidní artritida postihuje 2-3krát častěji ženy než muže a její nástup je pozvolný v průběhu několika týdnů až měsíců (Seifert et al., 2013). Zprvu začíná velmi nenápadně, přičemž typickými příznaky jsou zvýšená teplota, únava, nechutenství, úbytek hmotnosti a celková slabost. Nejprve bývají postiženy především drobné klouby zápěstí, metakarpofalangeální (MCP), proximální interfalangeální (PIP) a radiokarpální (RC) klouby (Pavelka, 2012). Velké nosné klouby končetin jsou artritidou postiženy obvykle až po delším průběhu onemocnění (Seifert et al., 2013).

Klouby postižené RA jsou obvykle nateklé, teplé a velmi citlivé. Nemocní mívají slabý stisk ruky neúměrný intenzitě bolesti. Ráno po probuzení jsou klouby nejbolestivější a často zatuhlé. Tato ranní zatuhlost trvá několik desítek minut až hodin. Mimokloubní projevy onemocnění, mezi něž patří např. revmatické uzle, postižení plic či vaskulitida, se většinou objeví až po delším trvání onemocnění (Seifert et al., 2013).

5.4 Diagnostika a diferenciální diagnostika

Diagnostika RA je určována na základě klinických projevů, přítomnosti revmatoidního faktoru a RTG změn. Kritéria pro diagnózu RA jsou uvedena v tabulce č. 1. Rozlišujeme čtyři stádia RA, a to na základě anatomického postižení a rentgenového obrazu (tab. 2). Stádium RA nemocného je určováno podle nejvíce postiženého kloubu.

Tabulka 1 Revidovaná kritéria Americké revmatologické asociace pro diagnózu RA

Kritérium	Definice
1. Ranní ztuhlost	ranní ztuhlost v kloubu a kolem kloubu trvající alespoň 1 hodinu před maximálním zlepšením
2. Artritida tří nebo více kloubních oblastí	současná přítomnost otoku měkkých tkání kolem kloubů nebo přítomnost tekutiny v kloubu (ne však kostěných výrůstků) pozorovaná lékařem; týká se 14 kloubních oblastí (vlevo nebo vpravo) – PIP, MCP, zápěstí, lokte, kolena, kotníky a MTP
3. Artritida ručních kloubů	alespoň jedna kloubní oblast na ruku postižena (zápěstí, MCP, PIP)
4. Symetrická artritida	současné postižení stejných kloubních oblastí (viz bod 2.) na obou stranách těla (u bilaterálního postižení PIP, MCP nebo MTP se nevyžaduje absolutní symetrie)
5. Revmatoidní uzly	podkožní uzly nad kostními výběžky nebo nad extenzory nebo v juxtaartikulární oblasti pozorované lékařem
6. Revmatoidní faktory	průkaz abnormálních koncentrací RF v séru jakoukoliv metodou, která je pozitivní u méně než 5 % kontrol
7. Rentgenové změny	RTG změny typické pro RA na předozadním snímku rukou a zápěstí, které musejí zahrnovat eroze nebo nepochybnou kostní dekalifikaci lokalizovanou v kloubech nebo jejich bezprostředním okolí) samotně artrotické změny nestačí)

Zdroj: Pavelka, 2010

Tabulka 2 Stadia RA (podle Steinbrockera)

Stadium I	změny pouze v měkkých částech; žádné RTG destrukce, může být periartikulární poróza
Stadium II	osteoporóza, mírné známky destrukce, žádné deformity, může být pohybové omezení, svalová atrofie, uzly, tendovaginitidy
Stadium III	destrukce chrupavky a kosti, deformity, rozsáhlé svalové atrofie, mimokloubní změny
Stadium IV	vedle změn předcházejících stadií je fibrózní či kostěná ankyulóza

Zdroj: Pavelka, 2010

Diferenciální diagnostika je v počátcích onemocnění revmatoidní artritidou poměrně široká a může být velmi obtížná (tab. 3). Důležité je odlišit RA a další zánětlivé artropatie od častěji vyskytující se osteoartrózy. Jelikož je prevalence osteoartrózy velmi vysoká, mohou se u nemocného vyskytovat zároveň (Seifert et al., 2013).

Tabulka 3 Diferenciální diagnostika RA

Osteoartróza	
Spondylartritidy	ankylozující spondylitida, artritida psoriatická
Systémová onemocnění pojiva	SLE, smíšené onemocnění pojiva, myozitida, Sjögrenův syndrom
Vaskulitidy	
Krystalové artropatie	
Sarkoidóza	
Revmatologická polymyalgie	
Infekce	septická artritida gonokoková a negonokoková, borelióza, bakteriální endokarditida, virové artritidy
Paraneoplastická artritida	

Zdroj: Seifert et al., 2013

5.5 Terapie

Léčba diagnostikované RA by měla být nasazena bez odkladu, aby nedocházelo k výrazné progresi onemocnění. Cílem léčby je dosažení remise nebo alespoň nízké aktivity onemocnění. Aktivita je nejčastěji hodnocena kompozitním indexem DAS28 (Disease Activity Score), který zohledňuje počet oteklých a citlivých kloubů. Celkem je vyšetřováno 28 kloubů – ramena, lokty, zápěstí, metakarpofalangeální klouby, proximální interfalangeální klouby a kolena. Dále je hodnocena hodnota reaktantů akutní fáze (sedimentace erytrocytů, CRP) a celková aktivita onemocnění hodnocená nemocným (vizuální analogová škála) (Seifert et al., 2013).

Tabulka 4 Kompozitní index DAS28

Hodnota DAS28	Aktivita onemocnění
> 5,1	vysoká
3,2-5,1	střední
2,6-3,2	nízká
< 2,6	remise

Zdroj: Seifert et al., 2013

Terapie RA je především komplexní a zahrnuje interdisciplinární přístup. Léčba by měla přispívat ke zmírnění bolesti, redukci zánětu, zábraně destruktivních procesů a udržení funkce. Pokud se jedná o akutní stav, je vhodný klid a pobyt na lůžku. V tomto případě jsou doporučovány izometrické svalové kontrakce a dlahy. Dlahy jsou vhodné k úlevě od bolesti a stabilizaci kloubu. Účelem fyzikální terapie a rehabilitace je zmírnění a potlačení bolesti, odstranění ztuhlosti, obnovení pohybu, svalové síly a funkce kloubu (Pavelka, 2012).

Základem farmakologické léčby RA jsou takzvaná choroby modifikující léčiva (DMARD). V první fázi bývá léčba často kombinována s podáváním glukokortikoidů. Nesteroidní antirevmatika jsou užívána pro symptomatickou úlevu nemocného. Terapie biologickými léky (anti-TNF) je indikována u pacientů, u kterých selhala léčba DMARD (Seifert et al., 2013).

5.6 Prognóza

Průběh RA je pozvolný s epizodami remisí, ke kterým dochází nejčastěji v prvním roce onemocnění. Někteří nemocní trpí trvale progresivním typem s rychlým vývojem destrukcí. Při dlouhodobém průběhu dochází ke vzniku kloubních deformit a značnému funkčnímu poškození (Pavelka, 2012). Průběh RA se v těhotenství u většiny nemocných viditelně zlepšuje, avšak po porodu často dochází k relapsu choroby (Pavelka, 2010).

6 Primární biliární cirhóza

Primární biliární cirhóza (PBC) je chronické cholestatické, granulomatózní a destruktivní onemocnění (Souček et al., 2011) charakterizované postupující destrukcí malých intrahepatálních žlučovodů s portálním zánětem vedoucím k fibróze a cirhóze jater (Chapel et al., 2018).

6.1 Etiopatogeneze

Název této nemoci je spíše historický, protože díky stále se zlepšujícím diagnostickým možnostem lze tuto chorobu, ve většině případů, zachytit již ve fázi chronické hepatitidy (Dítě, 2007). Příčinou rozvoje je autoimunitní poškození žlučových cest, při kterém cytotoxické lymfocyty napadají a ničí biliární epitel (Souček et al., 2011). Dochází k uvolňování cytokinů a vzniku zánětlivé reakce. Ta vede k postupné destrukci interlobulárních žlučovodů, cholestáze, fibroprodukcí a cirhóze. Protilátky jsou namířeny především proti pyruvát-dehydrogenázovému komplexu mitochondrií (Lata et al., 2010). Důvodem negativního působení aktivovaných T-lymfocytů (CD4+ A CD8+) ve žlučových cestách je exprimace zvýšeného množství adhezivních molekul, antigenů MHC II. třídy, receptorů pro IL-2 a již zmíněné pyruvát dehydrogenázy (Chapel et al., 2018). Na rozvoji onemocnění se podílejí také genetické faktory (Lata et al., 2010) a faktory prostředí. Intrahepatální žlučové cesty mohou být poškozeny také nějakými agens (jedná se nejspíše o mikroorganismy typu chlamydií nebo retrovirů), a to může u senzitivních jedinců vést k rozvoji autoimunitní odpovědi (Chapel et al., 2018).

6.2 Klinický obraz

Ve většině případů jsou touto nemocí postiženy ženy ve středním věku. Nejtypičtějším příznakem je pruritus, který může nastoupit v jakékoli fázi onemocnění (Lata et al., 2010). Současně se vyskytují také symptomy jiných autoimunitních onemocnění (Souček et al., 2011). Velmi často se vyskytují i kostní změny (osteoporóza) v důsledku chronické cholestázy (Dítě, 2007). Bolesti kostí tak mohou být v některých případech prvním příznakem rozvoje PBC (Brodanová, 1997). V pokročilejších stádiích choroby je častý ikterus, suchá kůže a nález xantelazmat (Lata et al., 2010).

6.3 Diagnostika

V laboratorním vyšetření je typický nález zvýšené hladiny alkalické fosfatázy, a to až na 2-3násobek, mnohdy i gamaglutamyltransferázy (GGT). Zvýšené jsou také aminotransferázy. Charakteristickým ukazatelem je nález antimitochondriálních protilátek (AMA) (Dítě, 2007). Diagnóza a stupeň progresu je stanovena biopsií (Lata et al., 2010).

6.4 Terapie

Pro zpomalení progresu choroby je podávána kyselina ursodeoxycholová (Ursosan, Ursofalk), v dávce 15 mg/kg/den, která snižuje koncentraci toxických žlučových kyselin (Souček et al., 2011). Obvykle je nezbytná substituce vitaminů rozpustných v tucích. V některých případech může být efektivní podávání imunosupresiv (cyklosporin, azathioprin, prednison). Pruritus lze někdy ovlivnit cholestyraminem. Pokud není pruritus zvládnut, lze provést plazmaferézu. Důležitá a nutná je prevence či léčba kostní nemoci (substituce kalcia, vitamin D, bisfosfonáty), která postihuje zejména ženy. Řešením PBC je transplantace jater. V malém procentu případů ovšem může dojít k recidivitě nemoci i v transplantovaných játrech (Lata et al., 2010).

6.5 Prognóza

U asymptomatických nemocných je klinický průběh velmi proměnlivý a často obtížně předvídatelný (Souček et al., 2011). Choroba je zvolna progredující a pro prognózu je stěžejní doba záchytu. U neléčených asymptomatických pacientů dochází k selhání jater a jejich průměrné přežití je 15 let (Dítě, 2007). Po nástupu symptomů může být prognóza stanovena podstatně přesněji (Souček et al., 2011).

7 Metody sekvenování

Metody sekvenování DNA jsou prováděny za účelem stanovení sekvence (pořadí) nukleotidů v molekule DNA. Tyto metody jsou modifikací polymerázové řetězové reakce (PCR), která je ukončena na specifickém místě (Kočárek, 2008). Začátečním bodem sekvence je 5' - konec sekvenačního primeru a 3' - konec (obsahující volnou -OH skupinu) je místem prodlužování řetězce DNA-polymerázou. Následně jsou vzniklé fragmenty separovány pomocí kapilární elektroforézy ve speciálním genetickém analyzátoru (Snustad et al., 2009).

Moderní sekvenační přístroje umožňují automatizované sekvenování probíhající pouze v jedné reakční směsi v jedné zkumavce. Pro detekci je používána kapilární elektroforéza a čtecí laserové zařízení, které dokáže zachytit signál značeného ddNTP. Výstupním materiálem je elektroforetogram znázorňující barevné vrcholky křivek (pozice nukleotidů v sekvenci) (Kuciel a Urban, 2016).

7.1 Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování je metodou, která umožnila sekvenování celého lidského genomu (McMurry, 2015). Jde o enzymatickou metodu založenou na prodlužování krátkých primerů DNA polymerázou, která je zakončena značenými dideoxynukleotidy (Murray, 2012) Nejprve je DNA zvýšením teploty denaturována a vznikají tak jednotlivé řetězce ssDNA. Aby byl sekvenován jen jeden řetězec z dvouřetězcové DNA dochází k navázání krátkého oligonukleotidového primeru. Na 3'-konci začíná syntéza (ve směru 3' → 5') nového řetězce, který je komplementární s templátovým řetězcem DNA (Kuciel a Urban, 2016).

Sekvenace byla dříve prováděna ve čtyřech zkumavkách. V každé z těchto zkumavek byla sekvenační směs, která byla složena z jednořetězcové DNA, primeru, deoxynukleotidů (dATP, dTTP, dGTP a dCTP), DNA polymerázy a modifikovaných dideoxynukleotidů (ddATP, ddTTP, ddGTP a ddCTP). Narozdíl od deoxynukleotidů (dNTP), na jejichž 3'-konci je navázána -OH skupina, mají dideoxynukleotidy (ddNTP) na 3'-konci navázán pouze -H. Fragmenty jsou tvořeny ve čtyřech paralelních reakcích (Kuciel a Urban, 2016).

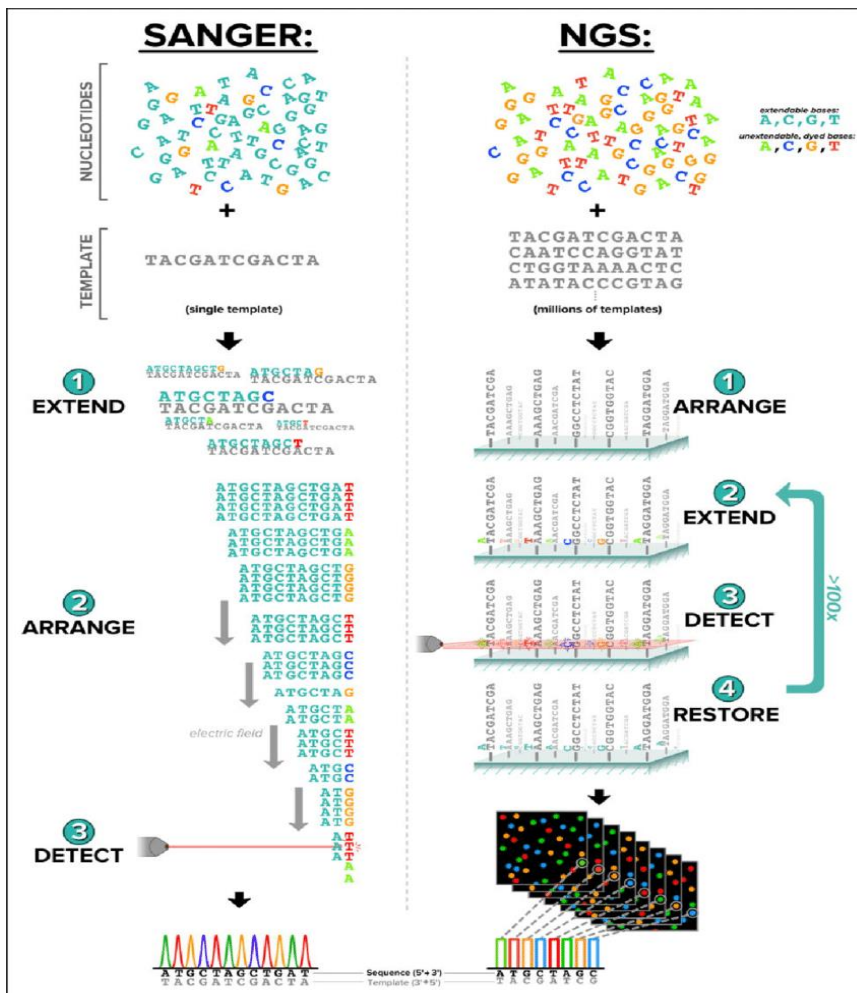
V dané reakci je udržován poměr dNTP:ddNTP přibližně 100:1, přičemž ukončení řetězce na daném nukleotidu je dáno pravděpodobností 1/100. Vznikající fragmenty tak končí na všech možných místech nukleotidů, které jsou vzdáleny stovky nukleotidů od původního konce primeru (Snustad et al., 2009).

Po uvolnění fragmentů DNA (z templátových řetězců) je prováděna separace polyakrylamidovou gelovou elektroforézou, za účelem rozdělení fragmentů po jedné bázi (Kuciel a Urban, 2016). Pruhy, vzniklé na gelu, charakterizují nukleotidovou sekvenci nejdelšího syntetizovaného řetězce. Tyto fragmenty jsou na gelu řazeny dle své délky. Čím kratší fragment je, tím delší vzdálenost urazí (nejkratší fragment dává vznik pruhu nejbliže anodě). Kompletní nukleotidová sekvence řetězce DNA je stanovována postupným čtením pruhů na gelu v závislosti na jejich pozici od anody (Snustad et al., 2009).

V současnosti jsou používány automatické sekvenátory, které umožňují průběh sekvenace v jedné zkumavce (Kuciel a Urban, 2016). V těchto automatických sekvenátorech jsou používána fluorescenční barviva. Klasická gelová elektroforéza je nahrazena kapilární, jejíž rychlost separace je několikanásobně vyšší (Karger a Guttman, 2009). Každý nukleotid je značen jinou barvou. Signál zachycený laserovým zařízením je převáděn do podoby elektroforetogramu, v němž jsou zobrazeny barevně lišící se píky (dle přítomnosti daného nukleotidu). Píky jsou automaticky převedeny do pořadí bází, a dávají tak vznik sekvence komplementární k templátovému řetězci (Kuciel a Urban, 2016).

7.2 NGS (Next Generation Sequencing)

Jednou z nejrychleji rozvíjejících se metod současnosti je NGS, které umožňuje sekvenování celého genomu a diagnostiku celé řady onemocnění. Hlavní výhodou této metody je jednoduchost zpracování vzorků pomocí komerčně dodávaných NGS kitů. Ty umožňují sekvenaci nejen úseků nukleových kyselin, ale i celých genomů rychleji a levněji, než je tomu u ostatních sekvenačních metod. Během jednoho běhu je zpracováno velké množství (tisíce až miliony) sekvencí. Nejčastěji používanými metodami je enrichment a amplifikované sekvenování (Kuciel a Urban, 2016).



Obrázek 5 Tradiční Sangerovo sekvenování ve srovnání s NGS (zdroj: Price et. al, 2018)

8 Cíle práce

Cílem bakalářské práce bylo:

1. Seznámení s literaturou pojednávající o genu *ORMDL3*.
2. Osvojení si základních metod molekulární biologie – izolace DNA, PCR, sekvenování, hodnocení sekvencí.
3. Srovnání výskytu nalezených mutací v genu *ORMDL3* mezi populacemi dětí z Karvinska a Českobudějovicka.

9 Metodika vyšetření genu *ORMDL3*

Praktická část bakalářské práce byla provedena v laboratoři Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích pod vedením Ing. Tomáše Nixe, Ph.D. Bylo analyzováno 20 anonymizovaných vzorků od náhodně vybraných jedinců. U těchto jedinců byl proveden bukální stěr a následně izolována DNA. U vyizolované DNA byl metodou PCR amplifikován daný úsek genu a poté pomocí elektroforézy ověřena přítomnost produktu genu *ORMDL3*. Následně byl produkt PCR přečištěn a odeslán k sekvenaci. Sekvence byla provedena firmou GenSeq s.r.o.

9.1 Odběr vzorků DNA

V prvním kroku praktické části byly odebrány vzorky DNA. Tyto vzorky byly získány z bukálního stěru a následně byla provedena izolace DNA. Před provedením odběru byli probandi řádně poučeni, jak před odběrem postupovat. Bylo jim řečeno, aby alespoň hodinu před provedením odběru nejedli, a pokud možno pili pouze čistou vodu. Bukální stěr byl proveden pomocí sterilního výtěrového tamponu, kterým byla bukální sliznice důkladně vytřena po obou stranách dutiny ústní. Aby byla využita celá plocha výtěrového tampónu bylo jím jemně otáčeno. Po dokončení výtěru byl sterilní tampón umístěn do zkumavky a vzorek řádným způsobem označen. Všechny odebrané vzorky byly anonymizovány.

9.2 Izolace DNA

Aby mohla být DNA studována musí být nejdříve extrahována z buněk. DNA lze extrahovat z různých typů tkání, různými způsoby. Nejprve dochází k lýze buněk za použití lyzačního roztoku obsahujícího pufrovací sloučeniny a následně využitím enzymatických reakcí ke zničení všech nežádoucích makromolekul (proteinů a RNA). Výsledkem izolace DNA je získání čisté genomové DNA. (Fowler et al., 2013).

K izolaci DNA byl použit komerčně dodávaný kit od firmy Geni biotech (Kit for isolation of DNA from body fluids), založen na speciálních mikrokolonkách. Izolace byla provedena dle příslušného izolačního protokolu.

9.2.1 Reagencie, spotřební materiál a laboratorní vybavení

Reagencie:

- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Buffer BL1
- Proteinasa K
- 96-100% Ethanol
- Wash Buffer BL2
- Wash Buffer BL3
- Elution Buffer BL4

Spotřební materiál:

- 1,5 ml zkumavky
- 2 ml sběrné zkumavky
- promývací kolonka
- špičky
- rukavice

Laboratorní vybavení:

- pipety
- vodní lázeň
- vortex
- centrifuga

9.2.2 Pracovní postup

Před zahájením samotné izolace byla zapnuta vodní lázeň a Elution Buffer BL4 předehřát na teplotu 70°C. Proteináza K byla ponechána k rozpuštění.

V dalším kroku byly nadepsány štítky a dle nich označeny 1,5 ml mikrozkušavky. Do označených mikrozkušavek byly sterilně odstříženy příslušné výtěrové tampóny. Následně k nim bylo napipetováno 200 µl PBS, 200 µl Buffer BL1 a 25 µl Proteinasy K. Mikrozkušavky byly uzavřeny a zvortexovány. Poté byly vloženy do vodní lázně a ponechány k inkubaci po dobu 25 minut při teplotě 70°C.

V mezičase byla připravena pro každý vzorek kolonka a dvě sběrné zkumavky. Kolonky a sběrné zkumavky byly opět řádně označeny. Do sběrné zkumavky byla vložena kolonka. Zkumavka, o objemu 1,5 µl, pro konečnou DNA byla polepena připraveným štítkem. Takto byly připraveny kolonky a zkumavky pro každý vzorek. Po inkubaci byly vzorky opět zvortexovány a krátce stočeny.

Vatové tampóny byly sterilně odstraněny a k lyzátu bylo připipetováno 210 µl ethanolu. Následně byly vzorky zvortexovány a krátce stočeny.

Pro navázání DNA byly použity předem připravené promývací kolonky umístěné ve 2 ml sběrných zkumavkách, na které byly přepipetovány jednotlivé vzorky. Poté proběhla centrifugace při 11 000 x g po dobu 1 minuty.

Po centrifugaci byly kolonky vyjmuty ze sběrných zkumavek a umístěny do nových, označením odpovídajících, zkumavek. Předešlé sběrné zkumavky byly včetně filtrátu vyhozeny do nádoby určené na biologický odpad. Poté bylo na kolonky napipetováno 500 µl Wash Buffer BL2 a vzorek byl centrifugován při 11000 x g po dobu jedné minuty. Filtrát ze sběrných zkumavek byl vylit a bylo přidáno 600 µl Wash Buffer BL3. Následovala opět centrifugace vzorků při 11000 x g po dobu 2 minut. Zkoumaná DNA zůstala navázána na silikagel v kolonce a filtrát společně se sběrnou zkumavkou vyhozen.

Kolonky s DNA byly přendány do štítkem polepených 1,5 ml zkumavek pro konečnou DNA a k nim připipetováno 25 µl předehřátého Buffer BL4 (70°C). Proběhla inkubace vzorků při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Po inkubaci byly centrifugovány při 11000 x g po dobu 1 minuty. Poté byla kolonka ze zkumavek vyjmuta a vyhozena. Po dokončení izolace byla získána čistá DNA v řádně značené 1,5 ml mikrozkumavce. Takto vyizolovaná DNA byla skladována při teplotě -20°C.

9.3 Měření koncentrace DNA v izolátu

K měření koncentrace vyizolované DNA byl použit spektrofotometr Colibri Microvolume, na kterém bylo nastaveno měření nucleid acid. Koncentrace DNA byla měřena proti Buffer BL4 (blank).

Do kapiláry bylo pipetováno nejprve 1,5 µl blanku a poté byly měřeny koncentrace vzorků DNA. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára očišťována. Koncentrace jednotlivých vzorků byly měřeny dvakrát a poté zprůměrovány. V případě, že se hodnoty

prvního a druhého měření výrazně lišily, bylo měření opakováno. Koncentrace jednotlivých vzorků byly zaznamenány do tabulky (tab. 8).

Po dokončení měření byly vzorky DNA umístěny do mrazicího boxu o teplotě -20 °C.

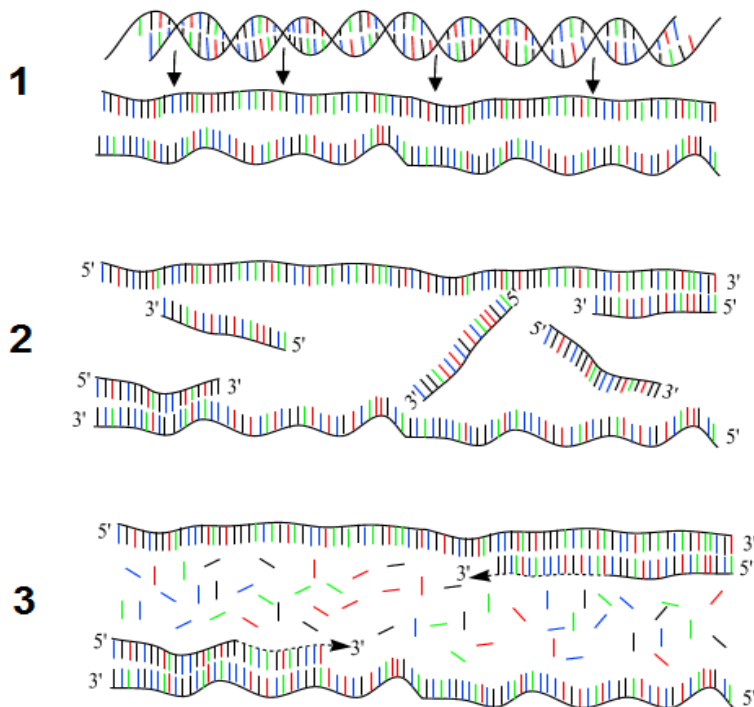
9.4 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR-Polymerase Chain Reaction) je metodou pro přípravu potřebného množství vybraných sekvencí DNA pro další analýzu (amplifikace úseku DNA) (Nussbaum et al., 2004). Tato technika je založená na principu řízené replikace DNA, během které se v polymerační reakci v průběhu několika hodin amplifikuje část sekvence DNA a vytvoří se tak miliony kopií výchozího úseku DNA (Kuciel a Urban, 2016). Kromě vybrané DNA jsou součástí reakce dva primery, sekvence DNA o délce 20-30 bazí. Těmito primery jsou F (forward) a R (reverse), které slouží k ohraničení vybraného úseku DNA. Dále je zapotřebí termostabilní DNA polymeráza, klíčový enzym pro syntézu PCR produktu (Garibyan a Avashia, 2013), díky němuž jsou primery prodlužovány podle sekvence mezi nimi (Nussbaum et al., 2004). Je také potřeba dodat nukleotidy. Přístroj umožňující namnožení DNA se nazývá termální cykler. Jeho hlavní částí je termální blok, do kterého jsou v PCR mikrozkušnicích vkládány vzorky DNA. Termální cykler dokáže velmi rychle měnit teplotu v mikrozkušnicích (Kuciel a Urban, 2016). Teplota je měněna v několika cyklech, při kterých dochází k denaturaci, annealingu a extenzi, což vede k exponenciálnímu množování dané sekvence DNA (Nussbaum et al., 2004).

9.4.1 Průběh PCR

PCR reakce probíhá ve 30 až 50 po sobě jdoucích cyklech, přičemž každý z těchto cyklů zahrnuje tři reakce probíhající při různých teplotách (amplifikační cyklus) (Passarge, 2018). Nejprve dochází k denaturaci dvouvláknové DNA, která je způsobena krátkým zahřátím vzorku na 90-95°C. První denaturace probíhá déle (8-9 minut), aby došlo k rozpletení všech dvojevláknů DNA. Následující cykly probíhají pouze 15-30 sekund (Kuciel a Urban, 2016). Další reakcí je annealing, během kterého dochází ke snížení teploty na 50-65°C, což umožní primerům připojit se pomocí vodíkové vazby na konkrétní místo na templátové jednořetězové DNA. Připojení primerů probíhá během 15-60 sekund (Your Genome, 2016). Poslední fází je extenze, během níž dochází

k zahřátí na 70-72°C po dobu 30-60 sekund a prodloužení připojených primerů pomocí termostabilní Taq polymerázy (Kuciel a Urban, 2016). Nové fragmenty DNA, které vznikají během PCR, slouží také jako templáty, ke kterým se může DNA polymerázový enzym připojit a začít s tvorbou DNA. Výsledkem je obrovské množství kopií specifického segmentu DNA vytvořených za relativně krátkou dobu (Your Genome, 2016).



Obrázek 6 PCR - 1. Denaturace, 2. Annealing, 3. Extenze (zdroj: Bárťová, 2011)

9.4.2 Reagencie, spotřební materiál a laboratorní vybavení

Reagencie:

- vyizolovaná DNA
- Master Mix (One TaqTM Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer, New England BioLabs)
- primer forward
- primer reverse
- PCR voda

Spotřební materiál:

- špičky
- 0,2 ml mikrozkušavky
- rukavice

Laboratorní vybavení:

- termální cykler
- pipety
- vortex
- centrifuga

9.4.3 Použité primery

V PCR reakci byly použity primery ORMDL3_F (forward) a ORMDL3_R (reverse), které byly navrženy v laboratoři za pomoci programu Primer BLAST. Tento program je volně dostupný na stránkách NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Výchozí koncentrace primerů byla 100 pmol/μl. Primery byly naředěny na koncentraci 10 pmol/μl. Aby došlo k tomuto naředění, bylo do označených mikrozkušavek pipetováno 5 μl zásobního roztoku primeru společně s 45 μl PCR vody. Primery byly syntetizovány na zakázku firmou Generi Biotech.

Tabulka 5 Sekvence použitých primerů

Primery	Sekvence	Délka
ORMDL3 exon 1 F	5' - GTTTGCTGTTGTGAGGGCTG - 3'	20 bp
ORMDL3 exon 1 R	3' - CAGGAAACCACCAGAGACCC - 5'	20 bp

Zdroj: vlastní

9.4.4 Pracovní postup

Reagencie pro PCR byly vyndány z mrazícího boxu a ponechány k rozmrznutí. Mezitím byly řádně označeny PCR mikrozkušavky o objemu 0,2 ml, do nichž bylo napipetováno 1,5 μl primeru F a R, 7,5 μl Master Mixu a 2 μl DNA (množství lze lehce upravit v závislosti na koncentraci DNA). Obsah jednotlivých mikrozkušavek byl doplněn PCR vodou na objem 15 μl. Poté byly mikrozkušavky zvortexovány, stočeny a vloženy do

termálního bloku cyklieru. Program byl nastaven podle teplotního profilu uvedeného v tabulce 6. Jelikož byl již dříve tento teplotní profil pro amplifikaci genu *ORMDL3* v laboratoři použit, nebylo potřeba jej optimalizovat.

Tabulka 6 Teplotní profil PCR

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
1. Počáteční denaturace	95°C	10 min	1
2. Denaturace	95°C	30 s	35
3. Annealing	60°C	30 s	35
4. Extenze	72°C	1 min	35
5. Konečná extenze	72°C	10 min	1
6. Chlazení	12°C	12 hod	1

Zdroj: vlastní

9.4.5 Sekvenovaný úsek

Část exonu 1 genu *ORMDL3* je na znázorněn hnědou barvou a primery barvou žlutou. Sekvenovaný úsek *ORMDL3* genu má délku 497 bází.

```

gttttgctcctctccagaagacaggaggtttgctgttgtagggctgctcttctctgggggaggggaatgggaaggctcacctggtggc
tgccctgggtggtgctcagccttggctgagtgctggcactggtggcccgatattgtatgtggagccaagaggggtggggcggga
aggagggggaaagagctaccagcaaaaaagtggtaacacaacagagtgtcgcaggctctggttgaggcaggtatgaaccacatc
agggccagcactaagcagccacctgccagctatggcagcagaagtctggctcaactctgtagacctagtcgacctctgccagcctc
tctctctgtttctccccatcagggtaggggcccagttggtgtttactaatggaagtgtatgtatccatagtcacacgaaagtctcaagagtgt
ttcctcattgccagctttttgttagttattgatctctcttttcaggggctctggtggtttctgctctcagggcacctagtggttaggctcagg
aagaagcttctgagggtgttgctaggacctaggtctaggctttctaggctcatcaagttttgttgctgccctgtgaaagccagaagggc
gtatgggtgctgtgatctgggaffcccaaggctttggcactctggacaactaggaagggttagtgactttctataccagcacc
tgtaggtgcccgttacagagaggtgatgggtggcagttcaggtcagactgggaagctttccctctccttagtcagagtaagtcttc
agagccctcactgtcagccacatgccgcctcccctcaggtggagcttttgcgtagcagctgtcccaggggctgctagagtaactga
agcccaaggccctgggaagataaacaatctgagccagctctggctttctagatacttgaattctgttaggctcaattatccagcctagtg
gtgctgctgatgggtcccaggagcatctctcaatcagaatgcccccaggctggcgacgggtgttctgttgggatggcgtgtgtg
ggtcacatttctctgaggtctctaaagctggagctgtctgagaagaggaaactgtctctgtatcctggaagtaataactggcccctgagg
actcagctctctgtcaggccctcagggatctggggacagccaaactctggataaggggcagatcattccacccttctctctacttcc
ctctgctcactgtgggttgcggccacctctgttc

```

(NCBI - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_001320801.2)

9.5 Elektroforéza

Elektroforéza na gelu je prováděna především za účelem kontroly proběhlé PCR reakce. Gelová elektroforéza je základní metodou pro separaci molekul či fragmentů DNA na základě jejich velikosti a náboje. Jedním z nejpoužívanějších způsobů separace fragmentů DNA je elektroforéza na agarózovém gelu (Kuciel a Urban, 2016).

Gel je vyroben z polysacharidu zvaného agaróza, který je izolován z mořských řas (*Gelidium*, *Gracilaria*) a obsahuje opakující se podjednotky agarobiózy (L- a D-galaktózy) (Kuciel a Urban, 2016). Touto složitou sítí polymerních molekul s póry se molekuly DNA pohybují různou rychlostí v závislosti na velikosti (molekuly DNA mají stejné množství náboje na hmotnost, proto jsou fragmenty DNA oddělovány pouze na základě jejich velikosti) (Khan Academy, © 2021).

Na gelu jsou takzvané startovací jamky (sloty), do kterých je pipetována DNA a poté následuje zapojení elektroforézy. Fosfátová kostra molekuly DNA má záporný náboj. Z tohoto důvodu se tedy molekuly DNA pohybují v elektrickém poli od katody (negativně nabitá elektroda) k anodě (kladně nabitá elektroda) (Kuciel a Urban, 2016).

Molekuly DNA jsou na gelu separovány podle velikosti. Nejkratší fragmenty DNA budou blízko pozitivního konce gelu, naopak dlouhé zůstanou v blízkosti jamek (Khan Academy, © 2021). Stupeň migrace molekuly DNA gelem závisí na několika faktorech – velikost molekuly DNA, koncentrace agarózy, typ agarózy, konformace DNA, napětí, elektroforetický pufr, přítomnost etidium bromidu (EtBr). K vizualizaci fragmentů DNA v elektroforetických gelech je nejvíce používáno barvení etidium bromidem a následné osvětlení UV světlem. EtBr je schopen začleňovat se do vlákna DNA, a dochází tak ke zviditelnění fragmentů (Kuciel a Urban, 2016).

9.5.1 Reagencie, spotřební materiál a laboratorní vybavení

Reagencie:

- 1 x TBE
- agaróza
- ethidium bromid (SERVA)
- 100bp DNA-Ladder (NEB, ROTH)
- destilovaná voda

Spotřební materiál:

- rukavice
- špičky

Laboratorní vybavení:

- odměrný válec
- pipety
- Erlenmeyerova baňka
- Elektroforetická vana
- UV transiluminátor a detekční systém s kamerou (UVITEC)
- flash disk

9.5.2 Pracovní postup

Nejprve byl připraven 3% agarózový gel. Do baňky byly naváženy 3 g agarózy a převedeno 100 ml 1x TBE. Poté byla baňka zahřívána v mikrovlnné troubě a průběžně kontrolována, aby nedošlo ke vzkypění gelu mimo baňku. Po vymizení bublin bylo zahřívání ukončeno. Baňka byla ochlazována pod proudem tekoucí vody na 70°C. Následně bylo opatrně přidáno 5 μ l ethidium bromidu. Promíchaný obsah baňky byl nalit do formy a byl zasazen hřebínek, který slouží pro vytvoření jamek v gelu. Takto připravený gel byl ponechán ke ztuhnutí.

Ze ztuhlého gelu byl odstraněn hřebínek a gel vložen do elektroforetické vany. Elektroforetická vana byla následně zalita 1xTBE pufrem tak, aby v něm byl celý gel ponořený. Následovalo pipetování. Do první jamky bylo napipetováno 5 μ l 100bp DNA-Ladderu a do následujících jamek 5 μ l produktů PCR. Po dokončení pipetování byla elektroforetická vana zahrazena víkem a byly připojeny elektrody. Elektroforéza byla spuštěna při 110 V po dobu 35 minut.

Po proběhlé elektroforéze byl gel vyjmut z vany a umístěn na UV transiluminátor. Po prosvícení UV světlem byl pořízen snímek. Ten byl vytisknut a přesunut na flash disk.

9.6 Enzymatické přečištění PCR produktů

Aby byly sekvenační grafy dobře čitelné, je doporučováno produkty PCR před sekvenováním přečistit. Nejčastější příčinou nečitelnosti je přítomnost různých inhibitorů v původních biologických materiálech (tkáň, krev atd.), které buďto nebyly odstraněny při izolaci DNA nebo se do ní dostaly při dalších laboratorních úkonech (zbytky pufrů – soli, alkoholy, detergenty), dále pak zbytky primerů a nukleotidy (Kujanová, 2019).

DNA bylo přečištěno za použití kittu EXOSAP (New England Biolabs).

9.6.1 Reagencie, spotřební materiál a laboratorní vybavení

Reagencie:

- EXO I (NEB)
- rSAP (NEB)
- produkt PCR

Spotřební materiál:

- 0,2 µl zkumavky
- špičky
- rukavice

Laboratorní vybavení:

- pipety
- vortex
- centrifuga
- cycler

9.6.2 Pracovní postup

Před započítím přečištění DNA byly nadepsány 0,2 µl zkumavky pro PCR produkty vzorků. PCR produkty byly zvortexovány, krátce stočeny a po 5 µl pipetovány do těchto zkumavek. Používané enzymy, umístěné v mrazící destičce, byly vyndány z mrazáku

a připipetovány do zkumavek k 5 µl PCR produktu. Enzym EXO I byl pipetován po 0,5 µl a enzym rSAP po 1 µl. Poté byly zkumavky uzavřeny, zvortexovány a stočeny.

Takto připravené zkumavky byly vloženy do cycleru a byl spuštěn příslušný program během kterého došlo působením teploty k inkubaci (37°C) a aktivaci enzymů (80°C). Následně proběhlo chlazení (4°C) a DNA byla připravena k sekvenování. Teplotní profil je dán výrobcem (New England Biolabs).

9.7 Příprava na sekvenaci DNA

Příprava vzorků na sekvenování byla provedena zvlášť pro primer forward a primer reverse. Poté byly poslány na sekvenaci firmou GenSeq s.r.o.

9.7.1 Reagencie a spotřební materiál

Reagencie:

- přečištěný PCR produkt
- primer forward
- primer reverse
- PCR voda

Spotřební materiál:

- 1,5 ml zkumavky
- špičky
- rukavice

9.7.2 Pracovní postup

Pro přípravu každé DNA na sekvenování byly polepeny barcody dvě 1,5 ml zkumavky (jedna pro F a druhá pro R). Do zkumavek byl napipetován 1-2 µl přečištěného PCR produktu (množství lze lehce upravit podle síly bandu na elektroforéze) a 5 µl daného primeru. Poté byl obsah mikrozkušavek doplněn PCR vodou na objem 10 µl. Vzorky byly odeslány k Sangerovu sekvenování.

10 Výsledky

V praktické části byly odebrány vzorky DNA, které byly anonymizovány. Z odebraných vzorků byla izolována DNA, měřena její koncentrace, provedena amplifikace požadovaného úseku pomocí PCR a provedena elektroforéza za účelem zjištění úspěšnosti amplifikace. Následovalo přečištění PCR produktů a příprava vzorků na sekvenování. Poté byly vzorky odeslány k sekvenaci firmou GenSeq s.r.o.

Vyšetřován byl soubor 20 osobně izolovaných vzorků náhodných jedinců. Dále byl vyšetřován soubor 10 vzorků dětí z Českobudějovicka a 10 vzorků dětí z Karvinska, poskytnutých pouze k hodnocení. Tyto vzorky DNA byly analyzovány a byla u nich hledána přítomnost mutace genu *ORMDL3* v části exonu 1. Sekvence byly hodnoceny v programu BioEdit (editor pro prohlížení sekvencí), a poté vyhledávány v databázi NCBI.

10.1 Osobně izolované vzorky DNA

V první fázi laboratorní práce bylo izolováno 5 vzorků poskytnutých dobrovolníky. Tyto vzorky, stejně jako další následně odebrané, byly anonymizovány. U těchto vzorků byla naměřena velmi nízká koncentrace DNA v izolátu (viz tabulka 8). Z tohoto důvodu nebyly vzorky již dále vyšetřovány. Nízká koncentrace DNA mohla být způsobena nedůkladným výtěrem bukalní sliznice, případně chybou v laboratorní práci. Laboratoř nedisponuje žádným přístrojem pro zakoncentrování vzorků. Precipitace by vzhledem k velmi nízké koncentraci a množství neměla smysl.

U následujících vzorků byl stěr z bukalní sliznice proveden důkladněji a koncentrace DNA byla již dostačující k dalšímu laboratornímu vyšetřování. K sekvenování tedy bylo celkem 15 sekvencí forward a 15 sekvencí reverse.

Po nanesení produktu PCR vzorků 7, 8 a 10 na gel a proběhlé elektroforéze byly pruhy velmi slabé. To mohlo být způsobeno nízkou koncentrací DNA, nebo v důsledku nepřesného pipetování, či vyplavení produktu PCR z jamek. Z tohoto důvodu byla PCR u těchto vzorků opakována. Vzorky 16 a 17 měly nižší koncentraci DNA v izolátu, a ani pruhy na gelu nebyly příliš výrazné. Proto u těchto vzorků bylo do sekvenační reakce přidáno více produktu PCR, aby bylo dosaženo co nejlepšího osekvenování. Po dokončení přípravy na sekvenaci byly vzorky odeslány k sekvenaci firmou GenSeq s.r.o.

10.1.1 Koncentrace DNA v izolátu

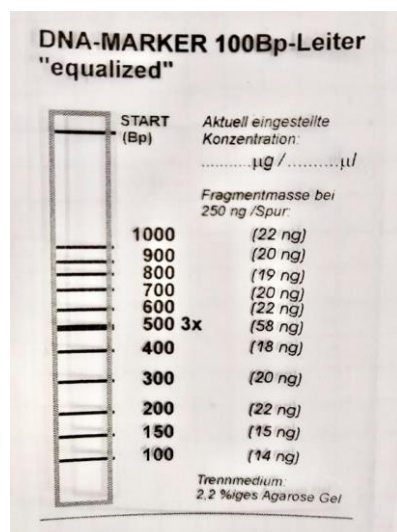
Tabulka 7 Koncentrace DNA v izolátu

Číslo vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Číslo vzorku	Koncentrace (ng/μl)
1	0,02	11	28,65
2	0,02	12	37,91
3	1,18	13	30,68
4	2,37	14	42,26
5	0,39	15	39,84
6	20,21	16	13,41
7	21,53	17	12,63
8	18,43	18	32,81
9	32,39	19	35,21
10	20,11	20	42,32

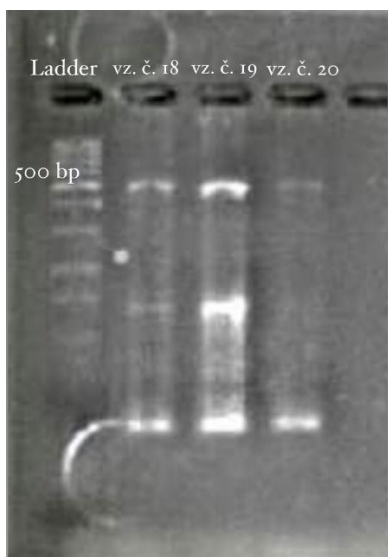
Zdroj: vlastní

10.1.2 Elektroforéza

Před sekvenováním byla kontrolována úspěšnost amplifikace za využití gelové elektroforézy. Velikost produktů byla hodnocena v porovnání s DNA-Ladderem (obrázek 10) a odpovídala zhruba 500 bp (obrázek 11). Dle síly bandu na gelu po proběhlé elektroforéze bylo při přípravě na sekvenování pipetováno do zkumavek příslušné množství produktu.



Obrázek 7 Použitý DNA Ladder (zdroj: vlastní)



Obrázek 8 Elektroforéza na gelu (zdroj: vlastní)

10.2 Hodnocená sekvencí

Sekvence byly nejprve prohlíženy v programu BioEdit a poté vyhledávány v databázi NCBI. Byly hodnoceny dle reference: Homo sapiens *ORMDL3* sphingolipid biosynthesis regulator 3 (*ORMDL3*), transcript variant 1, mRNA; Sequence ID: NM_001320801.2

Osobně izolované vzorky byly označeny čísly 1-20 a vzorky poskytnuté pouze k hodnocení byly značeny číslem s čárkou (1'-20'), aby byly odlišeny.

10.2.1 Hodnocení sekvencí vzorků DNA dětí z Českobudějovicka

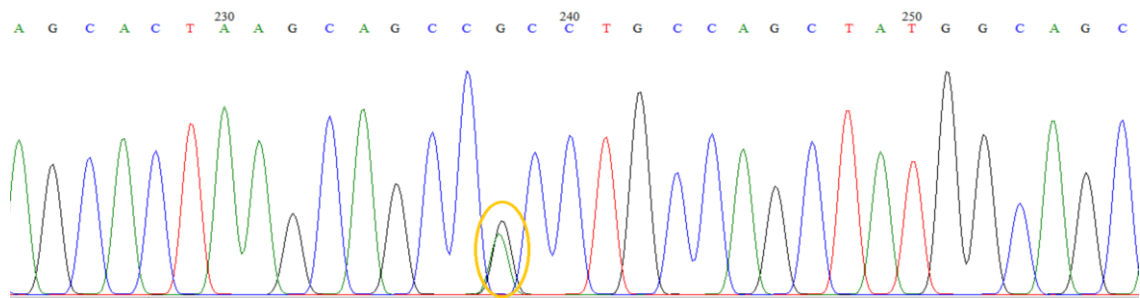
K vyhodnocení bylo poskytnuto 20 sekvencí (10 F a 10 R). Tyto vzorky byly označeny čísly 1'-10'. Po prohlédnutí všech sekvencí v programu BioEdit byla ve vzorcích 2', 5', 7', 8' a 10' nalezena heterozygotní mutace. Všechna tato vlákna byla velmi hezky osekvenována a dobře čitelná. Pouze na začátku sekvencí byl přítomen šum, který kolem 30 bp vymizel. Sekvence byly dlouhé 460-476 bp, tedy o něco kratší (délka části exonu 1 genu *ORMDL3* je 497 bp). Tyto malé rozdíly v délce a lehký šum jsou zanedbatelné a nemají na celkové hodnocení výrazný vliv. Na základě dobrého osekvenování a čitelnosti byla mutace u těchto vzorků ověřena v obou vláknech (přítomna ve forward i v reverse).

V sekvencích forward byla mutace u vzorků 2' a 5' lokalizována na 237 bp, u vzorků 8' a 10' na 238 bp a u vzorku 7' na 235 bp (stejná heterozygotní mutace). V sekvenci

reverse byla u vzorku 2' mutace lokalizována na 209 bp, u vzorku 5' na 204 bp, u vzorku 7' na 207 bp a u vzorku 8' a 10' na 208 bp.

Jedná se o mutaci: NM_001320801.2:g.425A>G (HGVS). V databázi NCBI nebyla tato mutace dosud popsána.

U sekvencí s primerem forward byla na stejném místě lokalizována báze adeninu a guaninu. Po zadání sekvence do internetové databáze NCBI blast bylo zjištěno, že by na této pozici měl ležet pík adeninu.



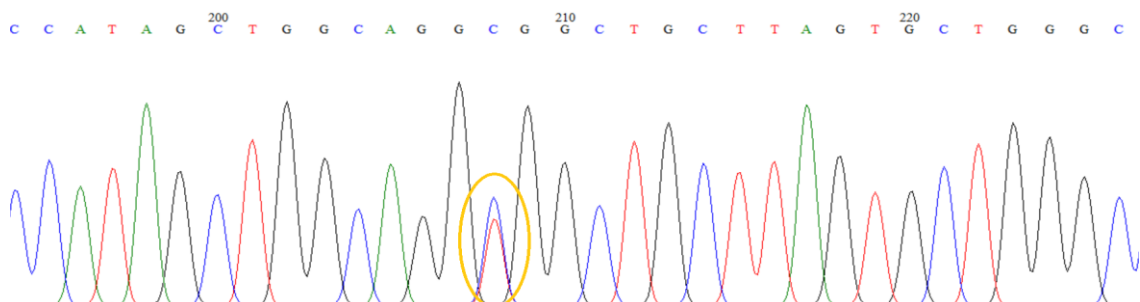
Obrázek 9 Sekvence 8' F BioEdit, heterozygotní mutace na 238 bp (zdroj: vlastní)

```

Query 1  AGCCGCCTGCCAGCTATGGCAGCAGAAGTTTTTCGGCTCAACTCCTGTAGACCTAGTCGAC 60
          |||||
Sbjct 421 AGCCACCTGCCAGCTATGGCAGCAGAAGTTTTTCGGCTCAACTCCTGTAGACCTAGTCGAC 480
          |||||
  
```

Obrázek 10 Část sekvence 8' F zobrazené v NCBI Blast, A>G (zdroj: vlastní)

Jak bylo již zmíněno, u těchto pěti vzorků byla mutace potvrzena z obou vláken. V sekvencích s primerem reverse se překrýval pík cytosinu a thyminu. Správně by zde měla být báze thyminu.



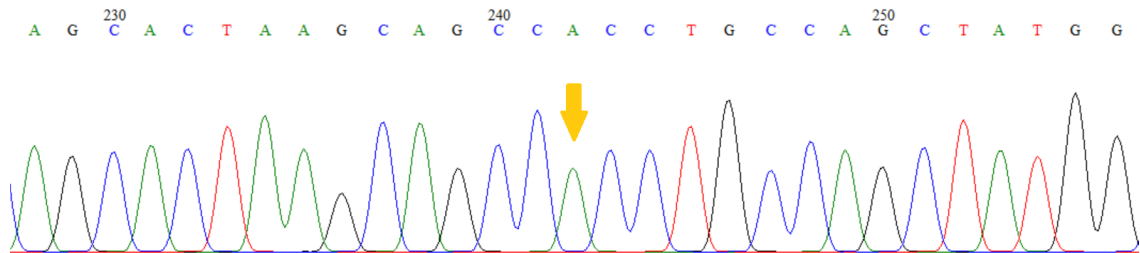
Obrázek 11 Sekvence 8' R BioEdit, heterozygotní mutace na 208 bp (zdroj: vlastní)

```

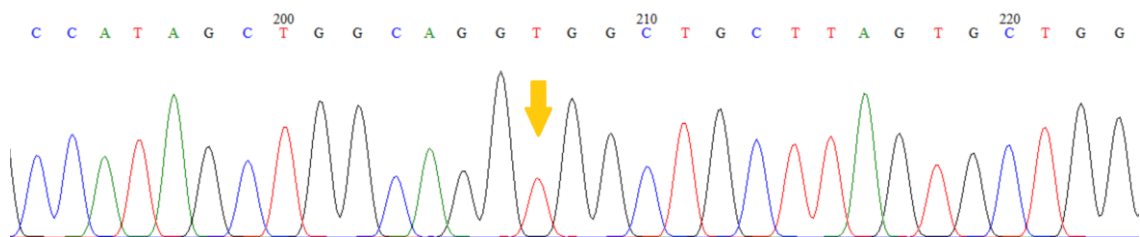
Query 1  CAGGCCGCTGCTTAGTGCTGGGCCCTGATGTGGTTTTTCATAACCTGCCTCAAACCAGAGCC 60
          |||||
Sbjct 429 CAGGTGGCTGCTTAGTGCTGGGCCCTGATGTGGTTTTTCATAACCTGCCTCAAACCAGAGCC 370
          |||||
  
```

Obrázek 12 Část sekvence 8' R zobrazené v NCBI Blast, T>C (zdroj: vlastní)

Sekvence 4' a 9' byly také hezky osekvenovány. Nebyl zde žádný výrazný šum, a mohly tak být hodnoceny z obou vláken. Po přečtení v BioEdit nebyla ani u jedné z nich přítomna žádná viditelná mutace. S databází NCBI se shodovaly ze 100 %.

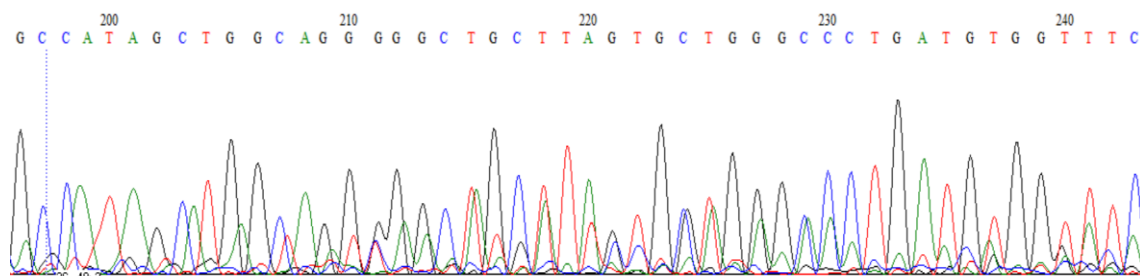


Obrázek 13 Sekvence 9' F BioEdit, bez mutace (zdroj: vlastní)



Obrázek 14 Sekvence 9' R BioEdit, bez mutace (zdroj: vlastní)

Sekvence vzorku číslo 1' byla hodnocena pouze z vlákna forward. Na tomto vláknu byla také přítomna heterozygotní mutace (237 bp). V sekvenci s primerem reverse byl velký šum, který byl přítomen po celé délce vlákna. Z tohoto důvodu nebylo možné sekvenci číst a potvrdit tak mutaci i z druhého vlákna.



Obrázek 15 Sekvence 1' R BioEdit, šum (zdroj: vlastní)

Sekvence vzorku číslo 3' byla naopak hodnocena pouze z vlákna reverse. I na tomto vláknu byla přítomna heterozygotní mutace (209 bp). Sekvence s primerem forward byla velmi špatně čitelná a nelze ji tak hodnotit. Mutace tedy nebyla potvrzena z obou vláken, a proto i zde můžeme uvažovat pouze o suspektní na mutaci.

Velmi zajímavá byla sekvence vzorku 6' u kterého byla mutace nalezena pouze v sekvenci forward (238 bp). V sekvenci reverse nebyla přítomna. Obě vlákna byla velmi dobře čitelná, a i jejich délka byla odpovídající.

10.2.2 Hodnocení sekvencí vzorků DNA dětí z Karvinska

Stejně jako u vzorků z Českobudějovicka bylo k vyhodnocení poskytnuto 20 sekvencí (10 F a 10 R). Tyto vzorky byly označeny čísly 11-20. Po vyhodnocení v programu BioEdit byla u vzorků 11', 13' a 19' přítomna stejná heterozygotní mutace (NM_001320801.2:g.425A>G). Na začátku těchto sekvencí byl šum přítomný na delším úseku, než tomu bylo u vzorků z Českobudějovicka. Vymizel okolo 100 bp a sekvence tak mohly být dobře hodnoceny. Délka sekvencí byla téměř stejná. Jelikož byla čitelnost obou vláken těchto vzorků velmi dobrá, byla mutace potvrzena z vlákna forward i reverse.

U vzorku 11' byla v sekvenci s primerem forward přítomna mutace na 231 bp. Vzorky 13' a 19' měly tuto mutaci lokalizovanou na 236 bp. V sekvencích reverse byla u vzorku 11' mutace na 216 bp, u vzorku 13' na 208 bp a u vzorku 19' na 211 bp.

Opět stejně jako u sekvencí z Českobudějovicka, tak i u sekvencí z Karvinska byla v sekvencích s primerem forward na stejném místě lokalizována báze adeninu a guaninu. Správně by zde měl být adenin. V sekvencích s primerem reverse se překrýval pík cytosinu a thyminu. Dle NCBI by správně v tomto místě měla být přítomna báze thyminu.

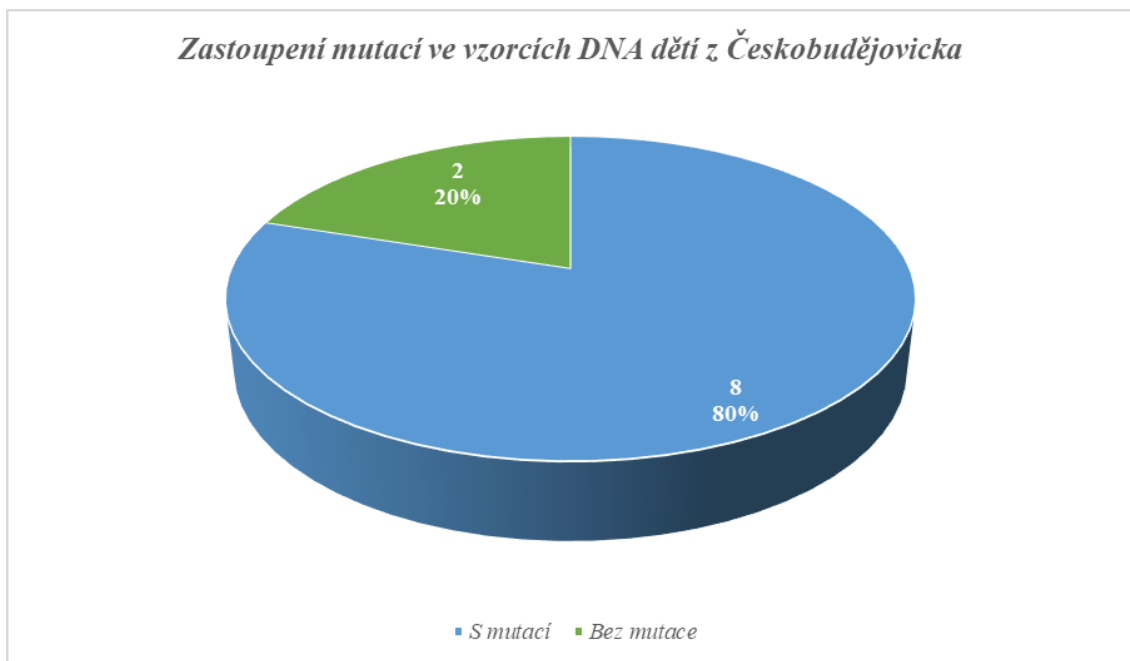
Sekvence vzorků 12', 14', 15', 16', 17', 18' a 20' byly také čitelné až od 100 bp a jejich délka odpovídala předchozím. U žádné z těchto sekvencí nebyla nalezena žádná mutace a s NCBI se shodovaly ze 100 %.

10.2.3 Srovnání sekvencí z Českobudějovicka a Karvinska

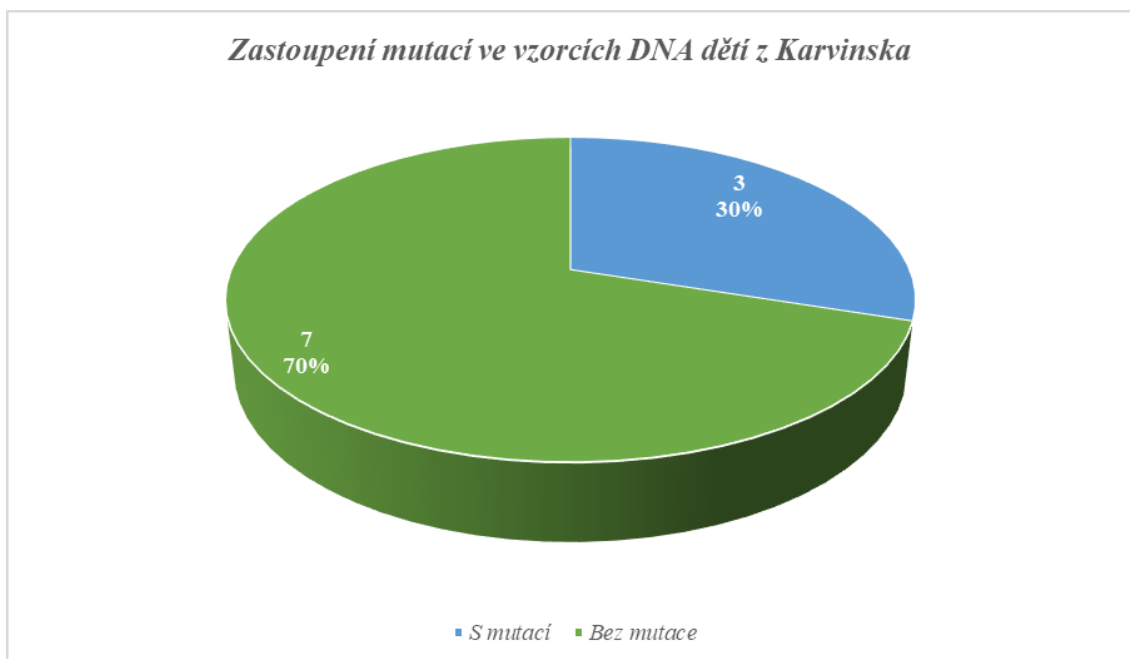
Sekvence z Českobudějovicka vyšly lépe než sekvence z Karvinska. S největší pravděpodobností to bylo dáno tím, že DNA se stěrů byla vyizolována do týdne od odběru. Naopak vzorky DNA dětí z Karvinska byly sbírány po dobu 8 měsíců a až poté vyizolovány a odeslány na sekvenaci.

U vzorků z Českobudějovicka byla mutace nalezena v 8 z 10 (80 %), 2 (20 %) vzorky tedy byly bez přítomnosti mutace. Ve vzorcích z Karvinska byla mutace přítomna ve

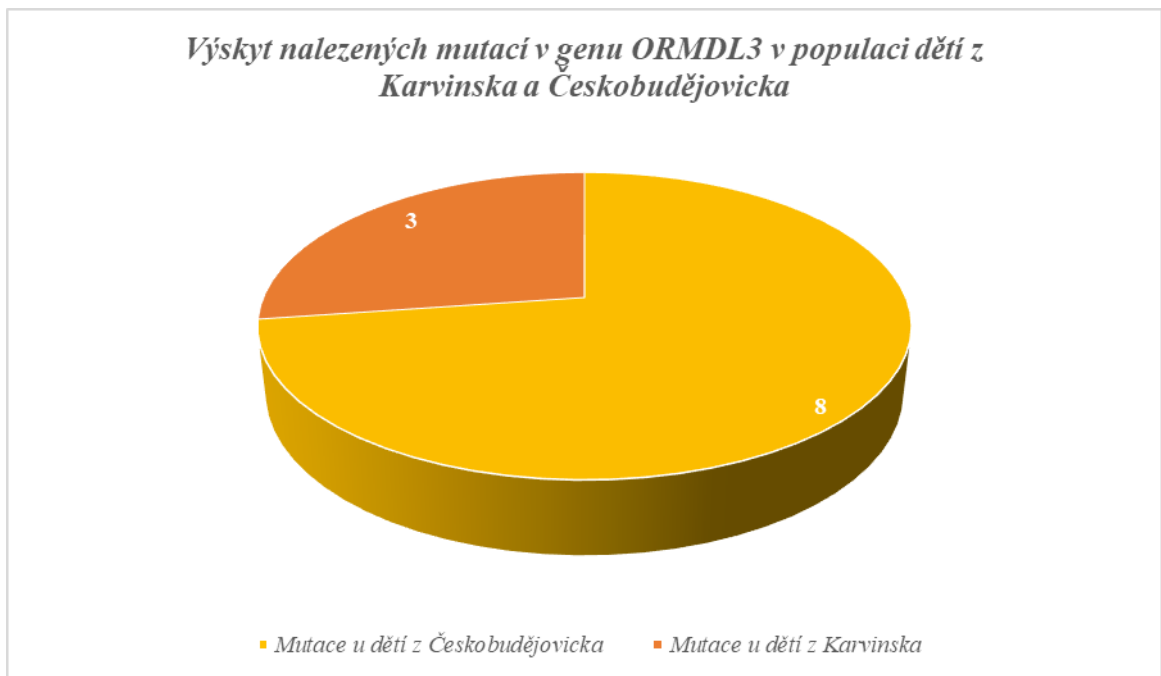
3 z 10 (30 %). Ve zbylých sekvencích z Karvinska, konkrétně v 7 vzorcích (70 %), nebyla mutace přítomna. Pokud tedy porovnáme celková procenta mutací (včetně suspektních), v Českobudějovických vzorcích byla mutace přítomna v 80 % z nich, kdežto v Karvinských pouze ve 30 %. Tyto rozdíly mohou být dány jak geneticky, tak vlivem vnějších faktorů (např. znečištěné ovzduší, hygiena v domácnosti).



Graf 1 Zastoupení mutací ve vzorcích DNA dětí z Českobudějovicka (zdroj: vlastní)



Graf 2 Zastoupení mutací ve vzorcích DNA dětí z Karvinska (zdroj: vlastní)



Graf 3 *Výskyt nalezených mutací v genu ORMDL3 mezi populacemi dětí z Karvinska a Českobudějovicka (zdroj: vlastní)*

10.2.4 Hodnocení vlastních sekvencí

Po osekvenování firmou GenSeq s.r.o. byly sekvence přístupné pod heslem na stránkách eurofins Genomics. Jak již bylo zmíněno, prvních 5 vzorků nebylo odesláno k sekvenaci a jejich analýza končila izolací DNA.

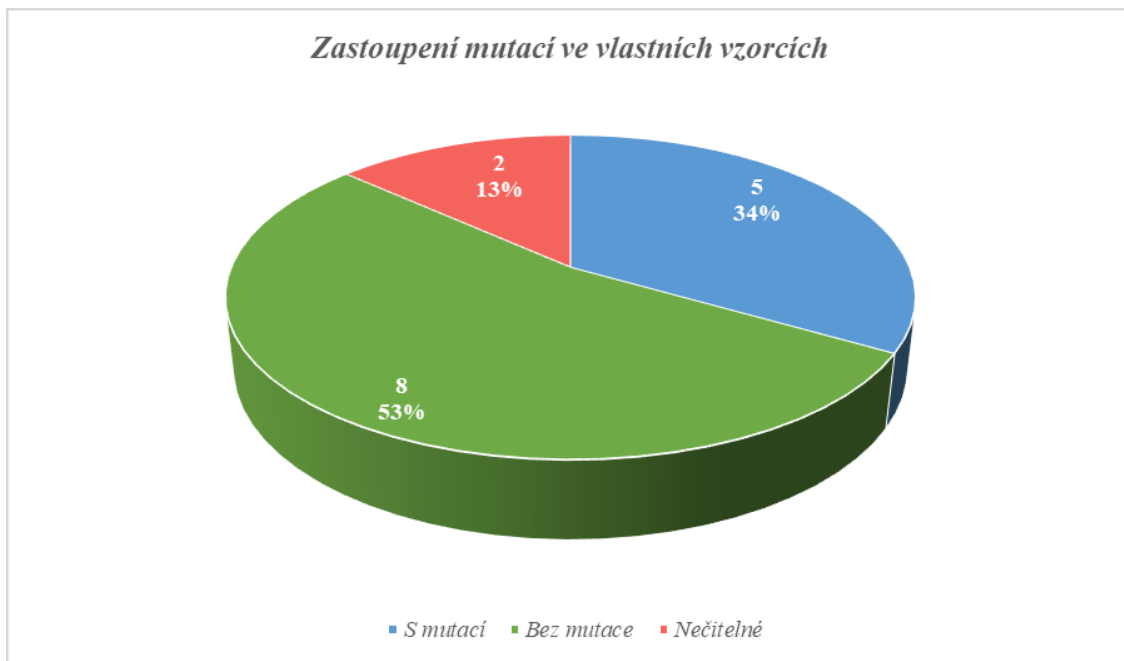
Vzorky 6, 8, 13, 14, 15 a 19 byly velmi dobře čitelné. Stejně jako u vzorků z Karvinska a Českobudějovicka byl na začátku sekvencí šum, který ale kolem 40 bp vymizel. Délka sekvencí se pohybovala okolo 460 bp. Byly tedy o kousek kratší, než by měly být. Tyto drobné odchylky nemají na hodnocení významný vliv. U žádné z těchto sekvencí nebyla mutace nalezena, s NCBI se shodovaly ze 100 %.

Mutace byla nalezena ve vzorcích 7, 11, 17 a 18. Čitelnost těchto sekvencí byla podobná těm, ve kterých mutace přítomna nebyla. Tato mutace byla přítomna v sekvencích forward a potvrzena i ze sekvencí reverse. U vzorku 7 byla mutace v sekvenci forward lokalizována na 238 bp. Vzorky 11, 17 a 18 měly tuto mutaci přítomnou na 236 bp. Docházelo zde k překrytí adeninu a guaninu. Jak již bylo zmíněno, dle NCBI by zde měla být báze adeninu. V sekvenci reverse vzorku 7 byla mutace na 208 bp, vzorku 11 na 210 bp a vzorků 17 a 18 na 211 bp. Jedná se o stejnou mutaci, která byla nalezena v předešlých vzorcích (Karvinsko, Českobudějovickou): NM_001320801.2:g.425A>G. (HGVS)

Mutace byla přítomna také v sekvenci forward vzorku 16. Sekvence reverse obsahovala silný šum a nebyla tak k hodnocení. Z tohoto důvodu nebylo možné mutaci potvrdit i z druhého vlákna. Pouze z vlákna forward byly hodnoceny také vzorky 9 a 20, u kterých ale nebyla mutace přítomna.

Vzorky 10 a 12 byly velmi špatně osekvenovány a nebyly vůbec hodnoceny. Šum zde byl od začátku až do konce a nebylo tak možné je číst. K chybě mohlo nejspíše dojít při laboratorní práci během přípravy na sekvenaci.

Celkově tedy byla mutace přítomna v pěti vzorcích, z toho ve čtyřech z nich byla potvrzena z obou vláken a v jednom případě pouze z vlákna forward. Bez výskytu mutace bylo osm vzorků, dva byly hodnoceny pouze z vlákna forward. Dva vzorky nebyly hodnoceny.



Graf 4 Zastoupení mutací ve vlastních vzorcích (zdroj: vlastní)

11 Diskuse

Nejprve bych se ráda zaměřila na vzorky, u kterých se nepodařilo dosáhnout výsledků. U prvních pěti vzorků pravděpodobně došlo k chybě při odběru bukálního stěru, v preanalytické fázi nebo během izolace. Koncentrace DNA v izolátu těchto vzorků byla velmi nízká, a proto nebyly dále laboratorně zpracovávány.

K této chybě mohlo dojít již při samotném odběru. Probandi byli poučeni a bukální stěr si provedli sami. Bukální sliznice tedy nemusela být setřena důkladně. Vliv také mohlo mít nedodržení všech instrukcí, se kterými byli probandi dostatečně dlouhou dobu před odběrem seznámeni. Abych předešla špatnému výtěru bukální sliznice u ostatních dobrovolníků, provedla jsem odběry následných vzorků (se souhlasem) sama. Všechny odebrané vzorky byly ihned anonymizovány.

Nízká koncentrace DNA v izolátu nemusela být zapříčiněna pouze samotným odběrem. Nelze vyloučit kontaminaci reagensií použitého izolačního kitu. Tento kit byl již použit jinými studenty a o stavu reagensií tedy lze pouze spekulovat.

V plánu byla izolace a následná analýza 20 vlastních vzorků. Jak již bylo zmíněno, izolace prvních pěti vzorků nebyla úspěšná. Z tohoto důvodu bylo laboratorně vyšetřováno vzorků pouze 15.

Elektroforéza není při přípravě vzorků nezbytným krokem, je prováděna pouze za účelem zjištění úspěšnosti amplifikace. U vzorků 7, 8 a 10 bylo odečítání výsledků po proběhlé elektroforéze nejasné, pruhy na gelu nebyly příliš výrazné a na první pohled zřejmé. Koncentrace DNA v izolátu se u těchto vzorků pohybovala v rozmezí 18,43 – 21,53 (byla dostačující). S největší pravděpodobností bylo příčinou nejasných výsledků částečné vyplavení produktu PCR ze slotů. Aby nedošlo ke zbytečným nákladům na sekvenování a ztrátě času při další laboratorní práci na těchto vzorcích, byla elektroforéza opakována. Výsledek opakované elektroforézy byl znatelně lepší, problém byl tedy pravděpodobně opravdu ve špatném pipetování do slotů.

Výsledky elektroforézy vzorku číslo 16 a 17 také nebyly příliš zřetelné. V tomto případě už ale elektroforéza opakována nebyla (koncentrace vzorků nebyla příliš vysoká). Namísto toho bylo do sekvenační reakce přidáno více produktu PCR, aby bylo dosaženo

co nejlepšího osekvenování. Sekvence těchto vzorků dopadla velmi dobře a jejich kvalita se téměř nelišila od zbylých hezky osekvenovaných sekvencí.

Vzorky byly odeslány k sekvenaci firmou GenSeq s.r.o. Se službami této firmy jsem byla spokojená, sekvenace byla provedena bez prodlevy. Využití služeb komerční laboratoře má nevýhodu v tom, že nelze individuálně upravit nastavení parametrů sekvenátoru (např. při nízké koncentraci DNA).

Příprava na sekvenaci a čtení sekvencí pro mne bylo novou zkušeností. Z tohoto důvodu byly nejprve hodnoceny sekvence, které mi byly poskytnuty. Bylo u nich předpokládáno lepší osekvenování (lehčí čtení a hodnocení).

K hodnocení sekvencí byl používán program BioEdit, který je zdarma dostupný na internetu. Tento program není pro čtení sekvencí tím nejlepším, ale vzhledem k jeho dobré dostupnosti je pro základní zhodnocení dostačující. Nerozpozná například heterozygotní mutace (za správný určí vyšší pík). Tyto mutace byly určeny čtením sekvencí pík po píku a následným dohledáním v databázi NCBI.

Sekvence z Českobudějovicka byly velmi pěkné. Jejich čitelnost byla bezproblémová. Jedinou sekvencí, kterou nelze hodnotit byla sekvence reverse vzorku 1'. Sekvence byly tedy ideální pro seznámení se s programem BioEdit a databází NCBI. Program BioEdit má několik funkcí, využívána však byla pouze funkce základní, která slouží k zobrazení píků bází. Práce s tímto programem nebyla nijak zvlášť obtížná. Databáze NCBI pro mne byla o něco složitější, nicméně po trpělivém snažení a konzultaci s vedoucím práce Ing. Tomášem Nixem, Ph.D., jsem se rychle zorientovala.

Ve vzorcích DNA dětí z Českobudějovicka byla mutace přítomna v 8 vzorcích (80 %). Výskyt mutace u dětí z Karvinska byl o poznání nižší. Byla nalezena pouze ve 3 vzorcích (30 %). Bez rozdílů na lokalitě (Českobudějovicko/Karvinsko) byly všechny nalezené mutace totožné – heterozygotní mutace (NM_001320801.2:g.425A>G).

Zajímavou byla sekvence vzorku 6' z Českobudějovicka, u kterého byla mutace přítomna pouze v sekvenci forward. Stejně jako forward bylo i vlákno reverse velmi dobře osekvenováno, ale nebyl zde žádný náznak mutace. Lze tedy vyloučit záměnu šumu za mutaci a naopak. Mutace by měla být přítomna v obou vláknech. Jelikož jsem tyto vzorky neizolovala, ale byly mi pouze poskytnuty sekvence k hodnocení, nemohu se k tomu blíže vyjádřit. Pokud by se jednalo o klinický vzorek, analýza by byla opakována.

Kvalita sekvencí z Karvinska byla o něco horší. Šum vymizel až okolo 100bp a jejich hodnocení bylo náročnější. Rozdílná kvalita vzorků nemusela být dána pouze odběrem a následnou laboratorní prací. Vliv na kvalitu sekvencí mohla mít doba sběru vzorků a jejich skladování. Odebrané vzorky dětí z Českobudějovicka byly vyizolovány do týdne od odběru, na rozdíl od vzorků z Karvinska, které byly sbírány po dobu 8 měsíců a teprve poté vyizolovány. Některé byly skladovány při pokojové teplotě, jiné v lednici či mrazících boxech.

Dle laboratorní příručky genetické laboratoře, vypracované Lonským (2017), lze nezpracovaný vzorek uchovávat při pokojové teplotě po dobu kratší 8 hodin, po dobu delší pak v lednici při 2 až 8°C maximálně 14 dní. Při nutnosti delšího uchování vzorku je nutno jej skladovat při -18 až -25°C. Doba, po kterou jsou vzorky skladovány, by ovšem dle van Wieren-de Wijer et al. (2009) neměla mít žádný vliv na výtěžek DNA.

Poté byly hodnoceny vlastní sekvence. Většina z nich byla dobře osekvenovaná i čitelná, až na dvě sekvence, které obsahovaly velký šum a nebyly tak vůbec hodnoceny. Mutace byla nalezena v 5 (34 %) z nich.

Celkově byly výsledky analýzy všech vzorků velmi pěkné a četnost zastoupení mutace poměrně vysoká. U všech vzorků, u kterých byla mutace nalezena, byla prokázána přítomnost totožné heterozygotní mutace (NM_001320801.2:g.425A>G).

Rozdíly v procentuálním zastoupení mutací v jednotlivých oblastech České republiky, mohou být dány několika faktory. Vliv může mít především kvalita vnějšího prostředí, ale také životospráva rodin, ve kterých děti žijí.

Dle výzkumu genetika Radima Šráma (2017) je v četnosti onemocnění dýchacích cest, mezi dětmi z Karviné a Českých Budějovic, značný rozdíl. U dětí z Karvinska jsou zaznamenány vyšší počty prodělaných viróz, ale také i častější výskyt zánětu dolních cest dýchacích a zánětů kůže. Nejpravděpodobnější příčinou je zřejmě poškození imunity způsobené znečištěným ovzduším. Vzduch v Českých Budějovicích je relativně čistý, kvalita ovzduší v Karviné je o něco horší (Šráma a Motlová, 2017).

Kvalita ovzduší není jediným faktorem, který zapříčiňuje problémy s dýcháním. Krieger (2010) poukazuje také na negativní vliv expozice vnitřním alergenům (roztoci, plísně, domácí zvířata).

Vzhledem ke kvalitě ovzduší, byl ve vzorcích z Karvinska očekáván četnější nálezy mutací, než ve vzorcích z Českobudějovicka. Jelikož byl vyšetřovaný soubor poměrně malý (10 dětí z každé oblasti) a životospráva rodin, ve kterých děti žijí není známa, nelze rozdíl ve výskytu mutací zcela objektivně hodnotit. V budoucnu by bylo dobré analyzovat větší soubor vzorků, případně vědět v jaké domácnosti děti žijí (např. přítomnost domácího zvířete).

12 Závěr

V rámci bakalářské práce byla vypracována odborná rešerše, ve které byla nastíněna problematika genu *ORMDL3* jako potenciálního rizikového faktoru pro rozvoj řady onemocnění, z nichž nejdiskutovanějším je dětské astma. Dalšími onemocněními, která byla v práci popsána, jsou Crohnova choroba, revmatoidní artritida, inzulin dependentní diabetes mellitus a primární biliární cirhóza. Nastíněny byly také metody sekvenování, jimiž jsou Sangerovo sekvenování, které bylo použito při sekvenaci vzorků firmou GenSeq s.r.o, a novější metoda NGS.

V praktické části byla popsána laboratorní práce, která zahrnovala odběr vzorků z bukalního stěru, izolaci DNA, měření koncentrace DNA, PCR, elektroforézu, přípravu na sekvenaci a závěrečné hodnocení sekvencí. Sekvence byly hodnoceny v programu BioEdit a nalezené mutace klasifikovány v genetické databázi NCBI.

Celkově bylo odizolováno 20 vzorků DNA, z nichž 15 bylo odesláno k sekvenaci. Dalších 20 vzorků bylo poskytnuto pouze k hodnocení. Celkově bylo tedy provedeno vyhodnocení 70 sekvencí (pro každý vzorek 2 sekvence – vlákno forward a reverse). V souboru všech vyšetřovaných vzorků byla u 16 z nich přítomna mutace. U všech vzorků se jednalo o stejnou heterozygotní mutaci (NM_001320801.2:g.425A>G).

Ve srovnání výskytu nalezených mutací, byla mutace přítomna u 3 z 10 karvinských dětí a u 8 z 10 českobudějovických dětí. Tento výsledek může být ovlivněn kvalitou vnějšího prostředí, případně životosprávou rodin, ve kterých děti žijí.

Cílem práce bylo seznámení se s odbornou literaturou pojednávající o genu *ORMDL3*, osvojení základních metod molekulární biologie a srovnání výskytu nalezených mutací v genu *ORMDL3* mezi populacemi dětí z Karvinska a Českobudějovicka. Všechny tyto cíle byly naplněny.

13 Literatura

1. AYRES, J. G., 2001. *Astma*. Praha: Grada. Informace a rady lékaře. 96s. ISBN 80-247-0091-3.
2. BÁRTOVÁ, E., 2011. Sekvenování DNA. *Enzymová Sangerova metoda*. [online] [cit. 2021-02-05]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-sekvenovani&lang=cz
3. BRHEL, P., 2008. *Diagnostika, léčba a prevence průduškového astmatu v České republice: uvedení globální strategie do praxe*. Praha: Česká iniciativa pro astma. 120s. ISBN 978-80-86396-32-3.
4. BRODANOVÁ, M., 1997. *Hepatologie v praxi: onemocnění jater a žlučových cest*. Praha: Galén. 389. ISBN 80-85824-47-7.
5. BUGAJEV, V., HALOVA, I., DRABEROVA, L. *et al*, 2016. Negative regulatory roles of ORMDL3 in the FcεRI-triggered expression of proinflammatory mediators and chemotactic response in murine mast cells. *Cell. Mol. Life Sci.* [online]. **73**, 1265–1285 [cit. 2021-02-15]. doi: 10.1007/s00018-015-2047-3. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-015-2047-3>
6. CANTERO-RECASENS, G., FANDOS, C., RUBIO-MOSCARDO, F, VALVERDE, M. A., VICENTE, R., 2010. The asthma-associated *ORMDL3* gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Human Molecular Genetics*. [online]. 19(1):111–121. [cit. 2021-02-15]. doi: 10.1093/hmg/ddp471. Dostupné z: <https://academic.oup.com/hmg/article/19/1/111/599403>
7. Care Comm, © 2020. *O astmatu*, [online]. [cit. 2021-04-14]. Dostupné z: https://www.astma-zero.cz/cs/o-astmatu?gclid=Cj0KCQiAwMP9BRCzARIsAPWTJ_EcYDJ-ixw7NiA02inWaz9A_jfpBklzVy8EGDNuSCUvvpvNfbwixc3YaAocCEALw_wcB

8. DAS, S., BROIDE, D. H., 2016. Why is Chromosome 17q21 linked to Asthma? Insights Allergy Asthma Bronchitis. *Journal of Clinical Immunology and Allergy*. [online]. [cit. 2020-08-17]. Dostupné z: <https://asthma-and-bronchitis.imedpub.com/why-is-chromosome-17q21-linked-to-asthma.php?aid=13668>

9. DESIGNUA, Shutterstock © 2021. *Inflammation of the bronchus causing asthma*. [online]. [cit. 2021-02-14]. Dostupné z: <https://www.shutterstock.com/cs/image-illustration/inflammation-bronchus-causing-asthma-166033781?src=hpKPGaPwpItcyNoIH-AU5Q-3-62>

10. DÍTĚ, P., c2007. *Vnitřní lékařství: učebnice pro lékařské fakulty. 2.*, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén. 586s. ISBN 978-80-7262-496-6.

11. FÖLSCH, U. R., SCHMIDT, R. F., KOCHSIEK, K., 2003. *Patologická fyziologie. 1. české vydání*. Praha: Grada. 588s. ISBN 80-247-0319-x.

12. FOWLER, S., ROUSH, R., WISE, J., 2013. Cloning and Genetic Engineering. *Concepts of Biology*. [online]. [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: <https://openstax.org/books/concepts-biology/pages/10-1-cloning-and-genetic-engineering>

13. FUČÍKOVÁ, T., 1995. *Klinická imunologie v praxi*. Praha: Galén. 319s ISBN 80-85824-24-8.

14. GARIBYAN, L. a AVASHIA, N., 2013. Polymerase Chain Reaction. *The Journal of investigative dermatology* [online]. **133**(3), 1–4 [cit. 2020-01-03]. doi: 10.1038/jid.2013.1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>

15. Gene Cards, The Human Gen Database, © 2021. *Genomics for ORMDL3 Gene*. [online]. [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ORMDL3>

16. GORDON, D. L., 2011. *Život bez nemocí: zaručené způsoby, jak se vyhnout více než 90 nemocem, od těch nejběžnějších po ty závažné*. Praha: Reader's Digest Výběr. 416s. ISBN 9788074061363.
17. HA, F., KHALIL, H., 2015. Crohn's disease: a clinical update. *Therapeutic advances in gastroenterology*. [online]. 8(6), 352–359. [cit. 2021-03-17]. doi: 10.1177/1756283X15592585 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4622286/>
18. HJELMQVIST, L., TUSON, M., MARFANY, G. *et al*, 2002. ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome Biol.* [online]. 3, research0027.1. [cit. 2020-12-19]. doi: 10.1186/gb-2002-3-6-research0027. Dostupné z: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2002-3-6-research0027>
19. HUTYROVÁ, B., 2015. *Inhalační kortikosteroidy v léčbě bronchiálního astmatu – máme se jich bát, nebo být rádi za jejich efekt?* [online]. 29(3): 105–107 [cit. 2020-10-11]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2015/03/05.pdf>
20. CHAPEL, H., HAENEY M., MISBAH, S. A., SNOWDEN, N., 2018. *Základy klinické imunologie: 6. vydání*. Přeložil THON, V. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton. 360s. ISBN 978-80-7553-396-8.
21. KARGER, B. L., GUTTMAN, A., 2009. *DNA sequencing by CE. Electrophoresis, 30 Suppl 1(Suppl 1)*. [online]. S196–S202. [cit. 2021-04-12] doi: 10.1002/elps.200900218. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2782523/>
22. KAŠÁK, V., 2018. *Asthma bronchiale: průvodce ošetřujícího lékaře*. 3., aktualizované a doplněné vydání. Praha: Maxdorf. Farmakoterapie pro praxi. 308s. ISBN 978-80-7345-585-9.

23. KAŠÁK, V., KOBLÍŽEK, V., c2009. *Naléhavé stavy v pneumologii*. 2., rozšířené vydání. Praha: Maxdorf. 535s. ISBN 978-80-7345-185-1.
24. Khan Academy, © 2021. *Gel electrophoresis*. [online]. [cit. 2020-12-12]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
25. KHATRI, M., 2020. Diagnosing Crohn's Disease. *WebMD. Crohn's Disease*. [online]. [cit. 2020-11-17]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/ibd-crohns-disease/crohns-disease/crohns-disease-diagnosis>
26. KHATRI, M., 2020. What Is Crohn's Disease? *WebMD. Crohn's Disease*. [online]. [cit. 2020-11-15]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/ibd-crohns-disease/crohns-disease/digestive-diseases-crohns-disease#1>
27. KOČÁREK, E., 2008. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vydání. Praha: Scientia. Biologie pro gymnázia. 211s. ISBN 9788086960364.
28. KRIEGER, J., 2010. Home is Where the Triggers Are: Increasing Asthma Control by Improving the Home Environment. *Pediatric allergy, immunology, and pulmonology*. [online]. 23(2), 139–145. [cit. 2021-04-17]. doi: 10.1089/ped.2010.0022. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3281289/>
29. KUCIEL, J., URBAN, T., 2016. *Principy genetiky*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. 200s. ISBN 978-80-7509-385-1.
30. KUDO, M., ISHIGATSUBO, Y., AOKI, I., 2013. Pathology of asthma. *Frontiers in microbiology*. [online]. 4, 263. [cit. 2020-10-12]. doi: 10.3389/fmicb.2013.00263. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768124/>

31. KUJANOVÁ, M., 2019. Přečištění PCR produktů – srovnání kolonkových souprav různých výrobců a naše tipy. *SEQme*. [online]. [cit. 2020-02-12]. Dostupné z: <https://www.seqme.eu/cs/magazine/precisteni-pcr-produktu>
32. LATA, J., BUREŠ J., VAŇÁSEK, T., c2010. *Gastroenterologie*. Praha: Galén. 256s. ISBN 978-80-7262-692-2.
33. LONSKÝ, P., 2017. Laboratorní příručka genetické laboratoře. *PRONATAL s.r.o.* [online]. [cit. 2021-04-17]. Dostupné z: <https://pronatal.cz/upload/redactor/1566833977-c2e3a871b0358b69a5e6acdd21ebe99e.pdf>
34. MAHN, K., HIRST, S. J., YING S., HOLT M. R., LAVENDER, P., OJO, O. O., SIEW, L., SIMCOCK, D. E., MCVICKER, C. G., KANABAR, V., SNETKOV, V. A., O'CONNOR, B. J., CHARLOTTA KARNER, COUSINS, D. J., MACEDO, P., FAN CHUNG, K., CORRIGAN, C. J., WARD, J. P. T., LEE, T. H., 2009. Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodelling in bronchial asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [online]. 106 (26) 10775-10780. [cit. 2021-03-17]. doi: 10.1073/pnas.0902295106. Dostupné z: <https://www.pnas.org/content/106/26/10775>
35. MCMURRY, J., 2015. *Organická chemie*. Brno: VUTIUM. 1200s. ISBN 978-80-7080-930-3.
36. MURRAY, R. K., 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vydání, 1. v nakladatelství Galén. Přeložil MATOUŠ, B. Praha: Galén. 800s. ISBN 978-80-7262-907-7.
37. NCBI, 2021. *ORMDL3 - ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3 [Homo sapiens (human)]*. [online]. [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=94103>

38. NUSSBAUM, R. L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F., 2004. *Klinická genetika*. 6. vydání. Praha: Triton. 426s. ISBN 8072544756.
39. PACIENTI IBD z. s. *Crohnova choroba*. [online]. [cit. 2021-04-14] Dostupné z: <https://www.crohn.cz/crohnova-choroba>
40. PACIENTI IBD z. s. *Dieta pro pacienty s crohnovou chorobou. Dieta ve stadiu relapsu*. [online]. [cit. 2021-04-14]. Dostupné z: <https://www.crohn.cz/souvisejici-informace/ibd-a-vyziva/dieta-pacienty-crohnovou-chorobou>
41. PARKER, S., 2007. *Lidské tělo*. Praha: Euromedia Group - Knižní klub. 256s. ISBN 978-80-242-2211-0.
42. PASSARGE, E., 2018. *Color atlas of genetics*. Fifth edition, revised and updated. Ilustroval WIRTH, J. Stuttgart: Thieme. 474s. ISBN 9783132414402.
43. PATHAK, N., 2020. Crohn's Disease Treatment: Common Medications for Treating Crohn's. *WebMD. Crohn's Disease*. [online]. [cit. 2020-11-17]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/ibd-crohns-disease/crohns-disease/crohns-disease-treatment-common-medications-for-treating-crohns>
44. PAVELKA, K., 2010. *Revmatologie*. 2., přepracované vydání. Praha: Galén. 177s. ISBN 978-80-7262-688-5.
45. PAVELKA, K., 2012. *Revmatologie*. Praha: Maxdorf. 740s. ISBN 978-80-7345-295-7.
46. PERUŠIČOVÁ, J., 2007. *Diabetes mellitus 1. typu*. Semily: Geum. 615s. ISBN 978-80-86256-49-8.
47. PERUŠIČOVÁ, J., 2008. *Diabetes mellitus 1. typu*. 2. vydání. Semily: Geum. 615s. ISBN 978-80-86256-62-7.

48. PRICE, K. S., STEVENSON, A., KING, E., READY, K., LAZARIN, G. A., 2018. Biological Research for Nursing. *Inherited Cancer in the Age of Next-Generation Sequencing*. [online]. 20(2) 192-204. [cit. 2021-03-01]. doi: 10.1177/1099800417750746. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/322475464_Inherited_Cancer_in_the_Age_of_Next-Generation_Sequencing
49. RANASINGHE, I. R., HSU, R., 2021. Crohn Disease. *StatPearls*. [online]. [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436021/>
50. RON, D., WALTER, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. [online]. 8, 519–529. [cit. 2020-08-19]. doi: 10.1038/nrm2199. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrm2199#citeas>
51. Sambav Health, 2019. *Crohn's Disease- A Common Life Threatening Illness*. [online]. [cit. 2020-09-14]. Dostupné z: <http://blog.sambav.com/health-fitness/crohns-disease-common-life-threatening-illness/>
52. SEIFERT, B., BENEŠ, V., BÝMA, S., 2013. *Všeobecné praktické lékařství*. 2., doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén. 673s. ISBN 978-80-7262-934-3.
53. SNUSTAD, D., SIMMONS, P., SIMMONS, M. J., RELICHOVÁ, J., ed. 2009. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita. 894s. ISBN 978-80-210-4852-2.
54. SOUČEK, M., ŠPINAR, J., VORLÍČEK, J., 2011. *Vnitřní lékařství*. Praha: Grada. 1788s. ISBN 978-80-210-5418-9.
55. SRŠEŇ, Š., SRŠŇOVÁ K., 1995. *Základy klinické genetiky*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Martin: Osveta. 259s. ISBN 80-217-0477-2.
56. SVAČINA, Š., 2010. *Diabetologie*. Praha: Triton. Lékařské repertorium. 188s. ISBN 978-80-7387-3486.

57. ŠEVČÍK, P., MATĚJOVIČ, M., 2014. *Intenzivní medicína*. 3., přepracované a rozšířené vydání. Praha: Galén. 1195s. ISBN 978-80-7492-066-0.
58. ŠKRHA, J., 2009. *Diabetologie*. Praha: Galén. 417s. ISBN 978-80-7262-607-6.
59. ŠRÁM, R., MOTLOVÁ, Ž., 2017. Podle výzkumu škodí špatný vzduch nejen dýchání, ale i kůži. *iDNES.cz, MAFRA, a. s.* [online]. [cit. 2021-03-12]. Dostupné z: https://www.idnes.cz/ostrava/zpravy/vysledku-vyzkumu-v-karvine-a-v-ceskych-budejovicich.A170613_2332429_ostrava-zpravy_woj
60. VAN WIEREN-DE WIJER, D. B. M. A., MAITLAND-VAN DER ZEE, A. H., DE BOER, A., BELITSER, S. V., KROON, A. A., DE LEEUW, P. W., SCHIFFERS, P., JANSSEN, R. G. J. H., VAN DUIJN, C. M., STRICKER, B. H. C. H., KLUNGEL, O. H., 2009. Determinants of DNA Yield and Purity Collected with Buccal Cell Samples. *European Journal of Epidemiology*. [online]. 24:677–682. [cit. 2021-04-02]. doi: 10.1007/s10654-009-9388-x. Dostupné z: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10654-009-9388-x.pdf>
61. VERLAAN, D. J., BERLIVET, S., HUNNINGHAKE, G. M., MADORE, A. M., LARIVIÈRE, M., MOUSSETTE, S., GRUNDBERG, E., KWAN, T., OUIOMET, M., GE, B., HOBERMAN, R., SWIATEK, M., DIAS, J., LAM, K. C. L., KOKA, V., HARMSSEN, E., SOTO-QUIROS, M., AVILA, L., CELEDÓN, J. C., WEISS, S. T., DEWAR, K., SINNETT, D., LAPRISE, C., RABY, B. A., PASTINEN, T., NAUMOVA, A. K., 2009. *Allele-Specific Chromatin Remodeling in the ZBP2/GSDMB/ORMDL3 Locus Associated with the Risk of Asthma and Autoimmune Disease* [online]. [cit. 2020-08-17]. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.08.007. Dostupné z: [https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297\(09\)00350-4](https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297(09)00350-4)
62. WORGALL, T.S., 2017. Sphingolipids, *ORMDL3* and asthma: what is the evidence? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. [online]. 20(2):99-103. [cit. 2021-03-17] doi: 10.1097/MCO.0000000000000349. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28030368/>

63. Your Genome, 2016. *What is PCR (polymerase chain reaction)?* [online]. [cit. 2021-01-07]. Dostupné z: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>
64. ZHANG, Y., WILLIS-OWEN, S. A. G., SPIEGEL, S., LLOYD, C. M., MOFFATT, M.F., COOKSON, W. O. C. M., 2019. The *ORMDL3* Asthma Gene Regulates ICAM1 and Has Multiple Effects on Cellular Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* [online]. 199(4):478-488. [cit. 2021-03-17]. doi: 10.1164/rccm.201803-0438OC. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30339462/>

14 Seznam grafů, tabulek a obrázků

Graf 1 Zastoupení mutací ve vzorcích DNA dětí z Českobudějovicka (zdroj: vlastní)	51
Graf 2 Zastoupení mutací ve vzorcích DNA dětí z Karvinska (zdroj: vlastní)	51
Graf 3 Výskyt nalezených mutací v genu ORMDL3 mezi populacemi dětí z Karvinska a Českobudějovicka (zdroj: vlastní)	52
Graf 4 Zastoupení mutací ve vlastních vzorcích (zdroj: vlastní)	54
Tabulka 1 Revidovaná kritéria Americké revmatologické asociace pro diagnózu RA	25
Tabulka 2 Stadia RA (podle Steinbrockera)	25
Tabulka 3 Diferenciální diagnostika RA	26
Tabulka 4 Kompozitní index DAS28	26
Tabulka 5 Sekvence použitých primerů	39
Tabulka 6 Teplotní profil PCR	40
Tabulka 7 Koncentrace DNA v izolátu	46
Obrázek 1 Lokace genu ORMDL3 (zdroj: GeneCards, © 2021)	10
Obrázek 2 Zánět průdušek způsobující astma (zdroj: Designua, © 2021)	13
Obrázek 3 Porovnání vzhledu zdravého střeva a střeva postiženého Crohnovou chorobou (zdroj: Sambav Health, 2019)	20
Obrázek 4 Klouby prstů těžce postiženy RA (zdroj: Parker, 2007)	23
Obrázek 5 Tradiční Sangerovo sekvenování ve srovnání s NGS (zdroj: Price et. al, 2018)	32
Obrázek 6 PCR - 1. Denaturace, 2. Annealing, 3. Extenze (zdroj: Bártová, 2011)	38
Obrázek 7 Použitý DNA Ladder (zdroj: vlastní)	46
Obrázek 8 Elektroforéza na gelu (zdroj: vlastní)	47
Obrázek 9 Sekvence 8' F BioEdit, heterozygotní mutace na 238 bp (zdroj: vlastní)	48
Obrázek 10 Část sekvence 8' F zobrazené v NCBI Blast, A>G (zdroj: vlastní)	48
Obrázek 11 Sekvence 8' R BioEdit, heterozygotní mutace na 208 bp (zdroj: vlastní)	48
Obrázek 12 Část sekvence 8' R zobrazené v NCBI Blast, T>C (zdroj: vlastní)	48
Obrázek 13 Sekvence 9' F BioEdit, bez mutace (zdroj: vlastní)	49
Obrázek 14 Sekvence 9' R BioEdit, bez mutace (zdroj: vlastní)	49
Obrázek 15 Sekvence 1' R BioEdit, šum (zdroj: vlastní)	49

15 Seznam zkratek

ACPA	Protilátky proti citrulinovým proteinům (Anti-citrullinated protein antibody)
AMA	Antimitochondriální protilátky (Anti-mitochondrial antibody)
Anti-TNF	Anti-tumor nekrotizující faktor (Anti-tumor necrosis factor)
ASCA	Protilátky proti <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> antibody)
ATF6	Aktivační transkripční faktor 6 (Activating transcription factor 6)
BL Buffer	Bass/Lead buffer
bp	párů bází (base pair)
CD4+	Helper T-cell
CD8+	Cytotoxic T-cell
CRP	C-reaktivní protein
CT	Výpočetní tomografie (Computed Tomography)
DAS28	Disease Activity Score
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
dCTP	Dideoxycytidintrifosfát
ddATP	Dideoxyadenosintrifosfát
ddCTP	Dideoxycytidintrifosfát
ddGTP	Dideoxyguanosintrifosfát
ddNTP	Dideoxynukleotidtrifosfát
ddTTP	Dideoxythymidintrifosfát
dGTP	Deoxyguanosintrifosfát
DMARD	Disease modifying antirevmatic drugs

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxynukleotidtrifosfát
dTTP	Deoxythymidintrifosfát
ER	Endoplazmatické retikulum
EtBr	Ethidium bromid
EXO I	Exonukleáza I
F	Forward primer
GGT	Gamaglutamyltransferáza
HDAC2	Histon deacetyláza2
HGVS	Human Genome Variation Society
HLA	Hlavní histokompatibilitní komplex (Major histocompatibility complex)
HLA-DR	Rizikové alely MHC
IDDM	Inzulín dependentní diabetes mellitus
IgG	Imunoglobulin G
IKS	Inhalační kortikosteroidy
IL-2	Interleukin-2
JIP	Jednotka intenzivní péče
LABA	Long-acting beta agonists
MCP	Metakarpofalangeální kloub
MHC	Hlavní histokompatibilitní komplex (Major Histocompatibility Complex)
MRI	Magnetická rezonance (Magnetic resonance imaging)
MTP	Metatarzofalangeální kloub
NCBI	National Centre for Biotechnology Information

NEB	New England BioLabs
NGS	Sekvenování další generace (next generation sequencing)
oGTT	Orální glukózový toleranční test
OH	Hydroxylová skupina
<i>ORMDL</i>	Orosomucoid like protein
<i>ORMDL1</i>	Orosomicoid like-1 protein
<i>ORMDL2</i>	Orosomucoid like-2 protein
<i>ORMDL3</i>	Orosoucoid like-3 protein
pANCA	Protilátky proti cytoplazmě neutrofilů se specifitou proti myeloperoxidáze (Anti Neutrofil Cytoplasm Autoantibodies)
PBC	Primární biliární cirhóza
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PIP	Proximální interfalangeální kloub
R	Reverse primer
RA	Revmatoidní artritida
RC	Radiokarpální kloub
RF	Revmatoidní faktor
rSAP	Shrimp alkaline phosphatase
RTG	Rentgenové záření
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SLE	Systémový lupus erythematoses
ssDNA	jednovláknová DNA (single-stranded DNA)
TBE	Tris Boritan Edta Buffer
TNF- α	Tumor necrosis factor-alfa

UPR	Rozvinutá proteinová odpověď (Unfolded protein response)
UV	Ultrafialové záření (ultraviolet)