



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Analýza polymorfismu G2964A genu STAT6 pomocí sekvenování

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Valeriia Kotova

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Analýza polymorfismu G2964A genu STAT6 pomocí sekvenování* 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 3.5.2021

.....

podpis

Poděkování

Chtěla bych hodně poděkovat váženému panu Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, trpělivost a věnování svého času. Také chci poděkovat rodičům za jejich podporu a neocenitelné rady.

Analýza polymorfismu G2964A genu STAT6 pomocí sekvenování

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá polymorfismem G2964A genu *STAT6*, který byl vyšetřován metodou sekvenování, a vlivem tohoto polymorfismu na výskyt atopických onemocnění, hlavně alergií na ořechy.

Gen *STAT6* je lokalizován u člověka na chromozomu 12 v lokusu 12q13.3 a obsahuje 23 exonů. *STAT6* byl dříve spojen s celkovou koncentrací IgE v séru a atopií v různých populacích. Jedním z nejběžnějších polymorfismů toho genu je SNP polymorfismus G2964A, který se nachází v 3' -netranslatované oblasti (rs324015).

V teoretické části je uvedena základní informace o sekvenování DNA, alergologických pojmech (včetně potravinových alergií), a také informace o vyšetřovaném genu *STAT6*.

Praktická část je zaměřena na detekci polymorfismu rs324015 ve vyšetřovaném souboru 20 lidí kavkazské populace. Následně byly detekovány tři různé genotypy: heterozygotní varianta G/A se vyskytovala u 17 osob a homozygotní varianty G/G byly nalezeny u 2 lidí a A/A u 1 člověka. Vzhledem k vyšetření poměrně malého souboru byly v rámci diskuse použity výsledky bakalářské práce z minulých let studentky Markéty Vadlejchové. Spojením statistických dat byly dosaženy nové údaje. Frekvence výskytu alely G byla jenom o trochu vyšší u osob, které trpí alergií na ořechy. Během analýzy dosažených výsledků nebyla prokázána určitá korelace mezi výskytem jednotlivých alel/genotypů a výskytem alergií na ořechy a jiných atopických onemocnění.

Klíčová slova

STAT6; sekvenování; genový polymorfismus; G2964A; rs324015; alergie na ořechy

Analysis of the G2964A polymorphism of the STAT6 gene by sequencing

Abstract

This bachelor's thesis deals with the polymorphism of the STAT6 gene, which was investigated by the sequencing method and the impact of this polymorphism on the occurrence of atopic diseases, mainly nut allergies.

The STAT6 gene is located on chromosome 12 in humans at locus 12q13.3 and contains 23 exons. STAT6 was previously associated with total serum IgE levels and atopy in various populations. One of the most common polymorphisms in that gene is the SNP polymorphism G2964A, which is in the 3'-untranslated region (rs324015).

The theoretical part contains basic information about DNA sequencing, terms from allergology (including food allergies) and information about the investigated STAT6 gene.

The practical part is focused on the detection of the rs324015 polymorphism in the examined group from 20 people of the Caucasian population. Subsequently, three different genotypes were detected: heterozygous G/A variants were found in 17 subjects and homozygous G/G variants were found in 2 subjects and A/A in 1 subject. Due to the analysis of a relatively small group, the results of the bachelor's thesis from past years of the student Markéta Vadlejchová were used in the discussion. By combining statistical data, new results were achieved. The frequency of the G allele was only slightly higher in people with a nut allergy. During the analysis of the results obtained, no correlation was found between the occurrence of individual alleles/genotypes and the occurrence of nut allergies and other atopic diseases.

Key words

STAT6; sequencing; gene polymorphism; G2964A; rs324015; nut allergy

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Genetická informace	9
2.1.1	DNA	9
2.1.2	Gen a genetický kód	9
2.1.3	Genom	10
2.1.4	Polymorfismus genu.....	10
2.2	Sekvenování DNA	12
2.2.1	Historie analýzu genomu	12
2.2.2	Klasické metody sekvenování	14
2.2.3	Metody nové generace.....	16
2.2.4	Metody 3.generace	21
2.2.5	Srovnání sekvenačních metod	22
2.3	Alergie	24
2.3.1	Atopie	24
2.3.2	Alergeny	24
2.3.3	Anafylaxe.....	25
2.3.4	Potravinová alergie.....	25
2.4	<i>STAT6</i>	28
2.4.1	Struktura	28
2.4.2	Aktivace.....	29
2.4.3	Funkce	30
2.4.4	Polymorfismus	31
3	Cíle práce, výzkumné předpoklady a výzkumná otázka	32
4	Metodika	33
4.1	Odběr vzorků a příprava k analýze	33
4.2	Izolace DNA	33
4.3	Stanovení koncentrace DNA	35
4.4	Amplifikace DNA metodou PCR	35
4.5	Elektroforéza PCR produktů.....	38
4.6	Enzymatické přečištění PCR produktů.....	40
4.7	Příprava vzorků ke sekvenování	41

5	Výsledky	42
5.1	Měření koncentrace izolované DNA	42
5.2	Kontrola produktů PCR	43
5.3	Interpretace výsledků sekvenogramu	43
5.4	Analýza sekvenačních dat pro polymorfismus G2964A genu <i>STAT6</i>	46
6	Diskuze	53
7	Závěr	57
8	Použitá literatura	58
9	Seznam zkratek	66

1 Úvod

V současné době mnoho lidí postihují různé typy alergií, což je reakce imunitního systému na zevní noxy – alergeny. Alergenem může být jakákoliv látka schopna vyvolat alergickou odpověď (Hořejší, 2017).

Jednou z nečastých alergií je alergie potravinová. Potravinovou alergií trpí po celém světě až 5% populace. K nejčastějším symptomům patří kožní reakce (kopřivkový pupen), edém jazyka a orofaryngu, dušnost, astma, zvracení, průjemy, bolesti břicha a křeče (Krejsek, 2004).

Výskyt alergií ovlivňují faktory prostředí, ale i genetické faktory. Různé skupiny genu mohou být spojeny s různou expresí IgE, intenzitou zánětlivé odpovědi nebo klinickým projevem. Bylo popsáno zhruba 18 oblastí genomu, kde se pravděpodobně nacházejí geny, jejichž produkty jsou součástí abnormální atopické reaktivity, například na chromozomech 2q, 5q, 6p, 12q, 13q a 20p. Patří sem geny pro mediátory, chemokiny, prozánětlivé cytokiny a transkripční faktory (Špičák, 2004; Krejsek, 2004).

Důležitou roli v alergické odpovědi hraje gen *STAT6*, který je polymorfní a zřejmě souvisí s rizikem vzniku alergie na ořechy. Proteiny rodiny STAT mají duální roli přenašečů signálu a transkripčních faktorů. Tím, že ovlivňují diferenciaci, proliferaci, migraci a apoptózu buněk se podílejí na udržení humorální a imunitní homeostázy i na embryonálním vývoji (Takeda, 1996).

2 Teoretická část

2.1 Genetická informace

Genetická informace se zapisuje v organismu ve formě sekvence nukleotidu a obecně se chápe jako informace, která je primárně obsazena v nukleotidové sekvenci (Rosypal, 2003).

2.1.1 DNA

DNA je zkratkou pro deoxyribonukleovou kyselinu. Popsání struktury DNA Watsonem a Crickem v 1953 bylo velkým průlomem ve studii nukleových kyselin (Snustad, 2017).

Informace kódovaná ve struktuře DNA je dána pořadím nukleotidu v řetězci. Řetězec nukleotidů se skládá z cukr-fosfátové páteře, k níž jsou připojené báze, jedna báze ke každému cukru v pateři. Každá báze – A (adenin), C (cytosin), G (guanin) a T (thyamin) – je používána k zapsání biologické informace do struktury DNA. Organismy se navzájem liší sekvenci nukleotidu, a tím i biologickou informací (Rosypal, 2003; Snustad, 2017).

2.1.2 Gen a genetický kód

Geny jsou základní informační jednotkou dědičnosti. Každý gen podmiňuje vytvoření určitého konkrétního znaku nebo se spolu s jinými geny účastní při jeho tvorbě (Kočárek, 2004).

Genetický kód je systém pravidel, podle kterých jednotlivé kodony určují zaražení standardních aminokyselin do polypeptidu. Překlad na ribozomu se děje podle určitého kódu, v němž každá aminokyselina v polypeptidovém řetězci je vyjádřena či kódována trojicí nukleotidu označovanou jako triplet (Rosypal, 2003).

Základní jednotkou genetického kódu je kodon, tj. poradí tři nukleotidu kódující v polypeptidu určitou aminokyselinu nebo signalizující začátek, případně konec jeho syntézy na ribozomu (Rosypal, 2003).

2.1.3 Genom

Kompletní genetická informace organismu se nazývá genom. Tento termín je taky používán pro DNA, která tuto informaci obsahuje. Genom eukaryotických organismu je tvořen dvěma složkami: jaderným genomem (souborem genu v buněčném jádře) a mimojaderným genomem (souborem genu v mitochondriích nebo chloroplastech) (Rosypal, 2003).

Typická lidská buňka obsahuje DNA o délce přibližně jeden metr (3×10^9 nukleotidů), kompletní nukleotidová sekvence lidského genomu by zabrala více než 1000 knih o stejné velikosti (Rosypal, 2003).

Během dělení musí buňka zkopírovat celý svůj genom, aby obě dceřiné buňky nesly stejnou informaci. K tomu dochází během procesu, který je označen jako replikace. Při replikaci se genetická informace přenáší z jedné molekuly do jiné molekuly stejného typu. Replikace DNA dává vznik dvěma novým dvoušroubovicím, které pocházejí z mateřského helixu. Tvorba kopií molekul by měla probíhat semikonzervativním způsobem – dceřiné molekuly DNA si zachovávají stejnou informaci jako mateřská molekula DNA (Rosypal, 2003; Alberts, 2005).

Každý gen má více konkrétních forem neboli alel. Soubor všech alel daného jedince označujeme jako genotyp. Pojem genotyp nelze směřovat s genomem, protože genotypy jedinců stejného druhu mohou být rozdílné, zatímco genom je jejich společným znakem. Genom je soubor genetického materiálu podbuněčných forem, buněk, jedince nebo druhu (Bednář, 2005).

Vnější projevem genotypu je fenotyp. Jde o soubor všech znaku organismu, které lze zpravidla zjistit přímým pozorováním jedince. Fenotyp tvoří konkrétní formy znaku, jako například barva očí, výška, forma vlasu atd. (Kočárek, 2004).

2.1.4 Polymorfismus genu

Pod pojmem genetický polymorfismus rozumíme existence velkého počtu alel na příslušném lokusu v populaci (Nečas, 2000).

Genové polymorfismy se mohou vyskytovat v jakékoli oblasti genomu. Existují polymorfní geny, které mají jen dvě až tři formy alel. Zatímco mohou existovat i geny s několika desítkami případně i stovkami alel, jsou to geny pro globinové řetězce, geny hlavního histokompatibilního komplexu (HLA), geny imunoglobulinů, geny zásobních proteinů rostlin a některé krevné skupinové geny (Kuciel, 2004).

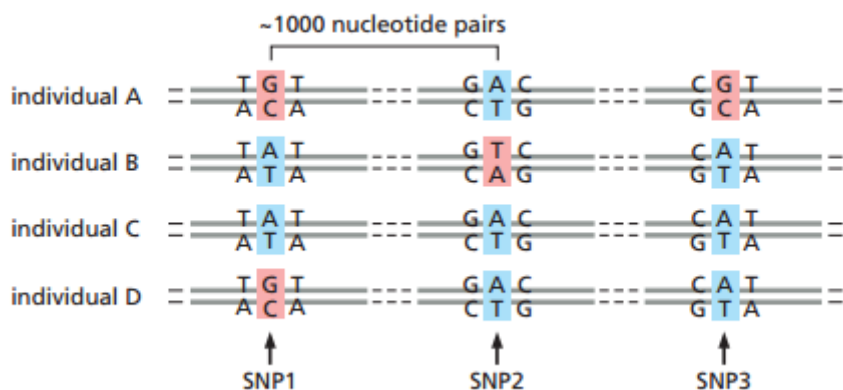
U eukaryot je polymorfní asi každý 500. nukleotid v kódujících sekvencích DNA a každý 50. v nekódujících sekvencích DNA. Mitochondriální DNA je přibližně 5-10 x častěji polymorfní než jaderná DNA (Bednář, 2004).

Rozlišujeme dva základní typy genetického polymorfismu. V případě bodového polymorfismu jde o variaci v jediném nukleotidu (obr.1). Příčinou bodového polymorfismu je bodové mutace, většinou substituce nebo delece několika bází. Druhým typem polymorfismu DNA je polymorfismus repetitivních sekvencí, kde se v genomové DNA vyskytují v mnoha kopiích. Podle délky sekvence zahrnuje tři druhy: mikrosatelity (repetitivní motiv tvořen 2 až 6 bázemi, příčinou vzniku je nejčastěji nehomolický crossing-over) minisatelity (jsou tvořeny sekvencemi 10-60 párů bází, DNA je uspořádána v formě tandemové repetice) a maxisatelity (repetitivní DNA má délku nad 5×10^5 párů bází) (Bednář, 2004).

Polymorfismus délky restričních fragmentů a jednonukleotidové polymorfismy mohou být využívány k identifikaci genů, které ovlivňují komplexní znaky (Snustad, 2017).

Polymorfismy lze v laboratoři identifikovat pomocí různých metod. Nejvýznamnější technikou používanou v diagnostice polymorfismů je metoda polymorfismu délky restričních fragmentů (PCR-RFLP). Restriční analýza využívá ke štěpení DNA enzym bakteriální endonukleázy a restriční fragmenty jsou poté odděleny gelovou elektroforézou podle jejich velikosti (Saiki, 1985).

Polymorfismus genu leží v podstatě molekulárně biologické metody DNA-fingerprinting, která se využívá především ve forenzní genetice. Umožňuje vyštěpit polymorfní úseky pomocí endonukleáz a pak jejich analyzovat s využitím elektroforézy. Je možný snadno určit totožnost zavražděné oběti z kosterních pozůstatků, identifikovat původce zločinu z části tkáně a také zjistit otce dítěte při paternitních sporech (Kočárek, 2004).



Obrázek 1: Jednonukleotidový polymorfismus. Horní molekula DNA u jedinců se od spodní molekuly DNA liší v jedné nukleotidové pozici

Zdroj: Alberts, 2014

2.2 Sekvenování DNA

Pod pojmem sekvenování DNA rozumíme jednu z metod molekulární biologie, která umožňuje určit sekvence nukleotidu v jednom řetězci DNA. Sekvenování probíhá prostřednictvím syntézy nového komplementárního vlákna přidáváním nukleotidů ve směru 5' > 3' podle jednovláknové DNA (templátu) enzymem DNA-polymerázou.

2.2.1 Historie analýzy genomu

Na konci 70. let už byly vyvinuty metody, které umožňovaly jednoduše a rychle určit nukleotidovou sekvenci jakýchkoli fragmentů DNA. Plné určení dlouhých řetězců DNA už bylo možné. Nicméně, objem informací o sekvenci DNA je nyní tak velký (obsahuje desítky miliard nukleotidů), že k její analýze je třeba použít výkonné přístroje (Křemen, 1998).

Při sekvenování DNA se zpočátku používaly techniky, které byly zavedeny pro určení pořadí nukleotidů v RNA. DNA se na začátku transkribovala pomocí RNA-polymerázy a pak se sekvenovala (Křemen, 1998).

Prvním kompletním genomem DNA, který byl osekvenován v roce 1977, byl genom bakteriofága ϕ X174 obsahující ssDNA o velikosti 5,386 bp (Sanger, 1977).

V roce 1984 britské vědci z Medical Research Council dešifrovali kompletní sekvenci DNA Epstein-Barrové viru a zjistili, že obsahuje 172 282 nukleotidů. Dokončení sekvence znamenalo významný zlom v sekvenování DNA, protože výsledek byl dosažen bez předchozích znalostí genetického profilu viru (Amon, 2004).

Haemophilus influenzae byl prvním volně žijícím organismem, u kterého byl osekvenován celý genom v roce 1995 Hamiltonem Smithem, který je laureátem Nobelovy ceny za objev restriční endonukleázy v 1978. Genom kmene Rd KW20 se skládá z 1 830 138 párů bází DNA v jediném kruhovém chromozomu, který obsahuje 1604 genů kódujících proteiny, 117 pseudogenů, 57 genů tRNA a 23 dalších genů RNA. Tyto výsledky získal pomocí metody shotgun, která je určena pro sekvenování dlouhých úseků DNA (více než 1000 párů bází) (Fleischmann, 1995).

Laboratoř amerického biologa Leroy Hooda Kalifornského technologického institutu v roce 1986 představil první poloautomatický stroj pro sekvenování DNA. Přístroj využíval princip sekvenace syntézou, kde oligonukleotidový primer byl fluorescentně značen (Smith, 1986).

První plně automatizovaný sekvenční přístroj ABI 370 od společnosti Applied Biosystems a Dupont's Genesis 2000 byl prezentován v roce 1987. Přístroj byl založen na principu fluorescenčního značení umožňující identifikaci všech čtyř dideoxynukleotidů (Prober, 1987).

Sekvence genomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byla zjištěna v roce 1996. To byl první eukaryotický genom, který byl úplně osekvenován. Genom *Saccharomyces cerevisiae* se skládá z přibližně 12156677 párů bází a 6275 genů, uspořádaných na 16 chromozomech (Goffeau, 1996).

Ke zjištění sekvence lidského genomu v roce 2001 byla použita metoda shotgun. Úplně sekvenování lidského genomu bylo dokončeno už v roce 2003 (Jones, 2018).

Po vývoji metod sekvenování založených na fluorescenci s DNA sekvencerem se stalo sekvenování DNA jednodušším a řádově rychlejšími.

2.2.2 *Klasické metody sekvenování*

Ke klasickým metodám sekvenování patří dvě základní metody: Sangerovo sekvenování a Maxamovo-Gilbertovo sekvenování.

2.2.2.1 *Sangerová metoda*

Enzymatická metoda, též označovaná metodou dideoxy a plus a minus metoda, byla poprvé navržena Frederickem Sangerem a ho kolegy v roce 1977, avšak se stala a se stala víceméně jedinou běžně používanou metodou sekvenování na mnoho let (Kolísko, 2017).

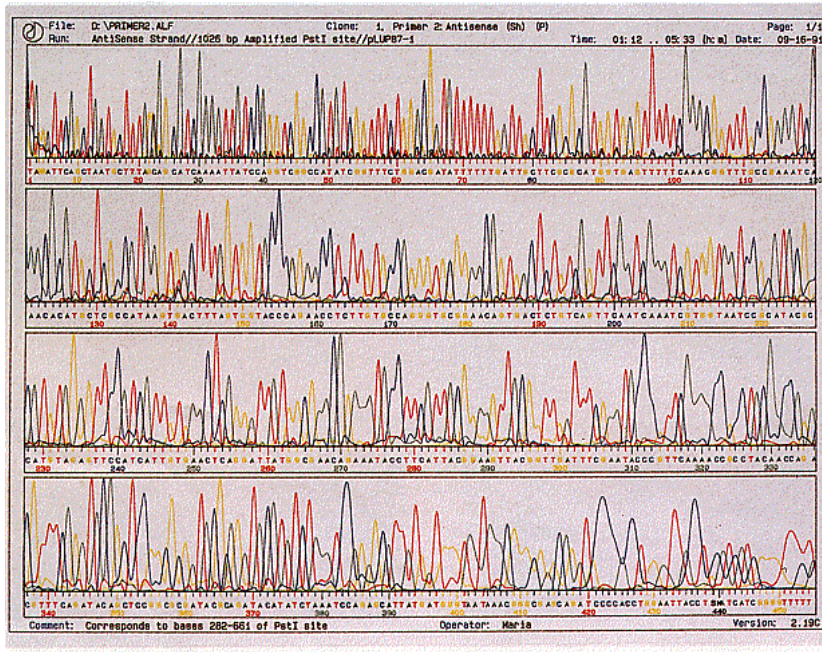
Sangerová metoda je založena na procesu replikace DNA *in vitro* prováděné za přítomnosti dTTP (dideoxyribonukleosidových trifosfátů) (Sanger, 1975).

Kvůli tomu, že sekvenování Sangerovou metodou je biochemickou reakcí, má stejné omezení jako jiné biochemické reakce. Nesmí probíhat dokončena, také i gel, ve kterém se třídí podle velikosti produkty reakce, nemůže mít nekonečnou délku (Ústav biologie LF UP, 2020).

Tradičním způsobem se sekvenování provádí mimo buňky ve čtyřech oddělených zkumavkách obsahujících vlastní typ ddNTP – v každé dochází k terminaci reakce v pozici jiného typu nukleotidu. Na začátku k jednořetězcové DNA přisedá 15-25 bp dlouhý primer (značený radioaktivně), který je komplementární k začátku sekvenovaného místa, od navázaného primeru probíhá syntéza DNA za přítomnosti dNTP (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a jednoho z dideoxynukleotidů (ddATP, ddCTP, ddGTP nebo ddTTP). ddNTP se náhodně začlení do syntetizovaného řetězce místo příslušného dNTP (např. místo dATP dosedne ddATP). Kvůli tomu, že ddNTP nemají OH skupinu, takže nebude moci vytvořit fosfodiesterovou vazbu, po jejich dodání do syntetizovaného řetězce se syntéza zastaví. Pak po skončení reakce jejich produkty musejí být rozděleny v gelu kapilární elektroforézou kde se detekují, zaznamenávají se fluorescenční barviva a je zjištěna délka nového řetězce pomocí sekvenogramu (Sanger, 1975).

V současné době je sekvenování úplně automatizované a se provádí ve speciálních přístrojích – sekvencérech. Reakce probíhá v jedné zkumavce, kam se přidává fluorescenčně značené dideoxynukleotidy o různé vlnové délce a DNA polymeráza. Reakční směs se dal oddělí kapilární elektroforézou v roztoku, fragmenty DNA se

zaznamenají fluorescenčním detektorem. Výsledky jsou analyzovány počítačem a pak jsou zobrazeny na sekvenogramu jako posloupnost barevných piků odpovídajících čtyřem nukleotidům (obr.2) (Blackburn, 2015).



Obrázek 2: Příklad sekvence DNA dosaženou automatickým sekvenováním metodou Sanger. Bylo nalezeno 455 nukleotidů genu *lysU* u bakterie *E. coli*

Zdroj: Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ

Sangerovo sekvenování bylo považováno za velmi výkonné, protože umožnilo sekvenovat přibližně 500-1000 párů bází najednou ve srovnání s několika bázemi pomocí Maxam-Gilbertové metody (Blackburn, 2015).

Za vývoj této výkonné techniky získal Sanger a jeho kolegové v roce 1980 Nobelovu cenu v chemii (Nobel Media AB, 2020).

2.2.2.2 Maxam-Gilbertova metoda

Max-Gilbertova metoda je technikou DNA sekvenování, která je založena na principu chemických reakcí štěpících terminálně značené báze s následnou elektroforézou značených DNA fragmentů v polyakrylamidovém gelu (Maxam, 1977).

Byla předložena v roce 1977, stejně jako Sangerova metoda. Maxam-Gilbertovo sekvenování rychle získalo popularitu po publikaci dva roky později než „plus a minus“ metoda, protože purifikovaná DNA mohla být použita přímo, zatímco Sangerová metoda vyžadovala, aby každý začátek čtení byl replikován pro produkci jednořetězcové DNA (Saccone, 2005).

Tato metoda využívá práce s jednovláknovou DNA, která na svém 5' konci radioaktivně značena fosforem-32. Chemické štěpení jednotlivých typů bází se provádí ve čtyřech zkumavkách, v každé zkumavce je prováděno štěpení jen určitých typů bází. Molekula DNA se stepi v místech, kde došlo k modifikaci bazi. U purinů (adenin a guanin) dojde k depurinace kyselinou mravenci, guaniny metilovány dimethylsulfátem a pyrimidiny se hydrolyzují hydrazinem. Tím vznikne směs různě dlouhých fragmentů, které končí v místě určité báze, která se pak dá do polyakrylamidového gelu. Tam seřadí se podle své délky, nejdále doputují ty nejkratší sekvence. Následně se spustí elektroforéza, kde pak určujeme rozdíly v délce fragmentu, tj. jak daleko od začátku fragmentu tato báze byla. Pro vizualizaci fragmentů je gel vystaven rentgenovému filmu pro autoradiografii, čímž se získá řada tmavých pásů, z nichž každý ukazuje umístění identických radioaktivně značených molekul DNA (Maxam, 1977).

Metoda již není používána kvůli přítomnosti nebezpečných chemikálií a její technické složitosti. To zakazuje použití v malých laboratořích molekulární biologie, tudíž byla nahrazena metodami sekvenování nové generace (Saccone, 2005).

2.2.3 *Metody nové generace*

V současné době zájem o sekvenování roste exponenciálně s tím, že velké množství DNA musí být analyzováno rychle, levně a přesně. Díky novým sekvenčním technologiím NGS je nyní možné sekvenovat celý lidský genom během několika hodin (Kulski, 2015).

Platformy NGS kombinuje techniky Sangerové metody pro paralelní zpracování milionů reakcí, což má za následek velmi vysokou rychlost a dostupnou cenu. Projekty sekvenování genomu, čí realizace v minulosti trvala mnoho let, nyní lze s NGS dokončit za několik hodin, i když s kratší délkou čtení a menší přesností (Kulski, 2015).

Metody nové generace sekvenování DNA zahrnují tři obecné kroky (Voelkerding, 2009):

- příprava knihovny: knihovny jsou vytvářeny náhodnou fragmentací DNA, následovanou ligací pomocí linkerů
- amplifikace: knihovna je amplifikována pomocí metod klonální amplifikace a PCR
- sekvenování: DNA je sekvenována pomocí jedné z několika různých metod

2.2.3.1 Pyrosekvenování

Pyrosekvenování (též označena metoda Roche 454) bylo první alternativou Sangerové metody pro sekvenování DNA *de novo*. Byla zahájena Rothbergem a kolegy v roce 2006. Projekt ve farmaceutické firmě CuraGen byl označován názvem 454, přestože čísla nemají žádný zvláštní význam (Pollak, 2003).

Je to technologie založená na principu „sequencing by synthesis“ (sekvenování podle syntézy). Sekvenování probíhá v přítomnosti polymerázových enzymů: DNA polymerázy, ATP sulfurylázy, luciferázy a apyrázy (Kulski, 2015).

Na rozdíl od použití dideoxynukleotidů k ukončení amplifikace řetězce (jako v Sangerově sekvenování), pyrosekvenování místo toho detekuje uvolnění pyrofosfátu (PPi), když jsou do řetězce DNA přidány nukleotidy (Fakruddin, 2012).

Na začátku je používána technika emulzní PCR ke konstrukci polonin potřebných pro sekvenování a odstraňování komplementární vlákno. Dále sekvenační primer ssDNA hybridizuje s koncem řetězce, tj. oblastí vázající primer. Čtyři různé dNTP jsou postupně přidány jeden po druhém, a každé připojení nukleotidu je provázáno uvolněním PPi v množství ekvimolárním množství přidaného nukleotidu. Když je správný dNTP enzymaticky inkorporován do řetězce, způsobí to uvolnění PPi. V přítomnosti ATP sulfurylázy a adenosinu se pyrofosfát převádí na ATP. Tato molekula ATP se používá pro konverzi luciferinu na oxyluciferin katalyzovanou luciferázou, která produkuje světlo, a ten světelný záblesk zaznamenán detektorem fotonů a zobrazen jako pík na pyrogramu. V posledním kroku dochází k degradaci nepřipojené dNTP a nespotřebované ATP pomocí apyrázy. Proces se znovu opakuje a sekvence je odečítána z pyrogramu (Fakruddin, 2012).

Pyrosekvenování má potenciální výhody přesnosti, flexibility, paralelního zpracování a lze jej snadno automatizovat. Hlavní nevýhodou této metody je použití finančně nákladné chemie a její nízká rychlost (Kulski, 2015).

Roche 454 otevřelo nové možnosti pro provádění sekvenční analýzy DNA. Ukázalo se, že tato metoda je vysoce vhodná pro analýzu SNPs (Barbazuk, 2007).

2.2.3.2 *Illumina*

Sekvenování Illumina je v současné době nejpopulárnější technologií na trhu NGS a je zodpovědná za více než 90 % generovaných sekvenčních dat na světě (Illumina Inc., 2015).

Illumina se liší od Roche 454 v tom, že je založena na technologii sekvenování syntézou pomocí odnímatelných fluorescenčně značených nukleotidů zakončujících řetězce, které mají vyšší výkon při nižších nákladech na reagentie (Kulski, 2015).

Společnost Illumina poskytuje šest sekvenčních strojů na průmyslové úrovni (NextSeq 500, HiSeq série 2500, 3000 a 4000 a HiSeq X série pět a deset) o různé výkonnosti (120–1500 Gb). Je také možným využít kompaktní laboratorní sekvencer s názvem MiSeq. I když je malý, má výkon 0,3 až 15 Gb a je vhodný pro *in vitro* molekulární diagnostiku (Kulski, 2015).

Základní mechanismus Illuminy se skládá ze čtyř základních kroků: příprava knihovny, generování klastru, vlastní sekvenování a analýza dat. V průběhu prvního kroku DNA je fragmentovaná na krátké úseky délkou kolem 200-500 bp ligačními a indexovými sekvencemi adaptéru. Pro generování klastrů je knihovna fragmentů ligovaných adaptérem vložena do průtokové cely (flow cell), kde jsou tyto fragmenty připojeny na sklíčko povrchově vázaných oligonukleotidů, které jsou k nim komplementární. Každý připojený fragment adaptéru je poté amplifikován pomocí PCR. Výsledkem toho jsou dva řetězce, každý obsahuje jeden volný a jeden pevný konec. Dále následují sekvenování – přidávání primeru s DNA polymerázou a fluorescenčně značenými dNTP. Klastry jsou excitovány laserem pro vysílání charakteristického světelného signálu specifického pro každý nukleotid. Pro analýzu dat jsou sekvence ze vzorových knihoven odděleny na základě jedinečných indexů prezentovaných během přípravy knihovny (Quail, 2008).

Sekvenováním pomocí platformy Illumina je možné získat data velikosti 1 Tb denně s využitím malého množství vzorku. Délka čtení na párovaných koncích je 300 bp na platformě MiSeq (Morey, 2013).

Přesnost platformy Illumina se uvádí jako 99,9 %. Metoda poskytuje možnost mnohonásobného sekvenování, současně lze analyzovat až 96 různých vzorků naráz (Morey, 2013).

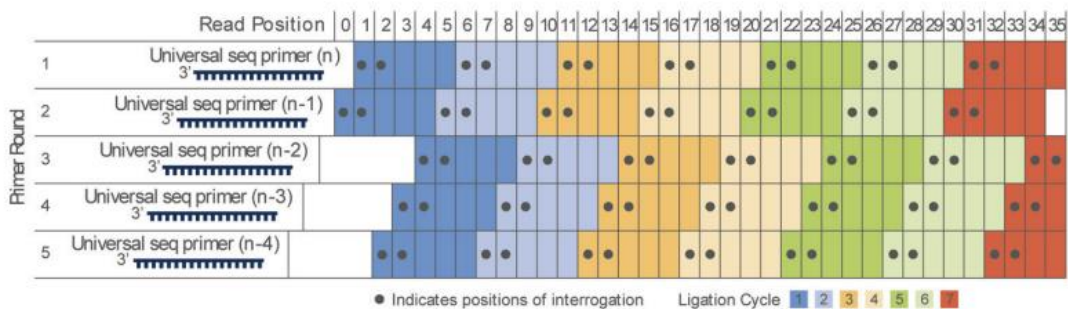
2.2.3.3 SOLiD

Metoda SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) patří k nové generaci vysoce účinného sekvenování, dostupná na trhu od roku 2007 (Voelkerding, 2009).

Je enzymatickou metodou, která používá DNA ligázu široce využívanou v biotechnologiích kvůli její schopnosti ligace – spojování dvou fragmentů DNA kovalentní vazbou (Ravishankar, 2017).

Emulzní PCR se používá ke klonální amplifikaci oblasti vázající primer ssDNA (známé jako adaptér), která byla konjugována s cílovou sekvencí na kuličkách. Tyto kuličky poté naneseny na skleněný povrch – lze dosáhnout vysoké hustoty kuliček, což zase zvyšuje výkonnost této techniky. Jakmile dojde k nanesení kuliček, začne se sekvenování prostřednictvím ligace. Po prvního cyklu se odstraní prodloužený produkt a templát je resetován s primerem komplementárním k pozici N-1. Následně se používají kratší primery (N-2, N-3 atd.). Vyzařovaná barva bude zachycena jako signál. Po celkem pěti cyklech je možné přečíst vlastní sekvenci. Každá báze je charakterizována dvěma barvami z různých cyklů (obr.4) (Morey, 2013).

Hlavní výhodou této metody je vysoká přesnost, a to je vyšší než 99,95 % na prvních 25 bp. Hlavní nevýhody jsou krátké délky čtení (50–75 bp), velmi dlouhá doba průběhu, a to je 7 až 14 dní. O metodě se také uvádí, že má určité problémy se sekvenováním palindromických sekvencí (Kulski, 2015).



Obrázek 3: Přehled sekvenčních cyklů. Základní barvy jsou označeny 0, 1, 2 a 3 (modrá, zelená, žlutá a červená). Každá báze je charakterizovaná dvěma signály s různých cyklu

Zdroj: Časopis lékařů českých, 2009

2.2.3.4 IonTorrent

IonTorrent je metodou polovodičové sekvenování založenou na elektrochemické detekci vodíkových iontů, které se uvolňují během polymerace DNA (Kulski, 2015).

Byl to první přístroj, který nepoužíval pro detekci skenovaných bází DNA světelný signál, ale elektrický. Je rychlý, kompaktní a ekonomický, lze ho použít v mnoha laboratořích jako stolní přístroj (Kulski, 2015).

Na fragment DNA knihovny je nanesen dNTP, stejně jak u metody pyrosekvenování. dNTP je poté amplifikován do nového řetězce, pokud je komplementární k nukleotidu na cílovém řetězci. Pokaždé, když je úspěšně přidán nukleotid, je uvolněn vodíkový iont a detekován ionogramem. Podle intenzity změny pH lze poznat, kolik bází bylo přiřazeno – pH roztoku se mění s každou přidanou bází o 0,02 jednotky (Mardis, 2013; Kolísko, 2017).

Polovodičové sekvencery Ion Torrent produkují průměrnou délku přibližně 400 nukleotidů na čtení, což je poměrně málo ve srovnání s metodami Sagnera a pyrosekvenování. Další nevýhodou, což má také i platforma Roche 454, je problém se čtením repetitivních homopolymerních sekvencí (Kolísko, 2017).

2.2.4 Metody 3.generace

V posledních několika letech se začaly využívat i metody sekvenování třetí generace. Na rozdíl od metod druhé generace není DNA templát před sekvenováním namnožen. Tím dochází ke čtení signálu z jediné původní molekuly (Kolísko, 2017).

2.2.4.1 SMRT

Technologie SMRT (Sekvenování jedné molekuly DNA v reálném čase) byla nabídnuta firmou PacBio v roce 2009 (Ari, 2016).

SMRT metoda je založena na principu replikaci DNA. Postupně se připojují komplementární fluorescenčně značené dNTPs, které volně tečou v roztoku. Proces probíhá ve speciálních komůrkách čipů, jsou označeny ZMWs (zero-mode waveguides), které umožňují zachycení fluorescenčního signálu po rozštěpení fluoroforu. Sekvenování se provádí za použití nemodifikované polymerázy. Fluorescenční značka je oddělena od nukleotidu po jeho začlenění do řetězce DNA (Mendel, 2020).

Ta metoda umožňuje sekvenovat velmi dlouhé fragmenty DNA (> 60 kbp) a zároveň poskytuje údaje o metylaci sekvenované DNA. Vyšetření sekvence lidského genomu včetně reagensů se pohybuje kolem \$1000 (Hrabák, 2017).

2.2.4.2 Nanopore

Platforma Oxford Nanopore je velmi citlivá analytická technika, která využívá elektroforetickou translokaci molekul v roztoku přes póry v nano měřítku (Kudr, 2014).

Principem technologii nanopórů je průchod vlákna DNA miniaturním pórem, kterým prochází elektrický proud. Při průchodu dochází ke kolísání proudu specifickým způsobem odpovídajícím procházejícímu nukleotidu (Papoušek, 2018).

Vstup, výstup a průchod jednotlivých molekul analytu nanopórem způsobuje pokles počtu iontů procházejících pórem, tedy celkového proudu procházejícího aparaturou oproti referenčnímu proudu a je kontinuálně detekován jako soubor odporových pulzů.

Změny procházejícího elektrického proudu pak naznačují fyzikálně chemické vlastnosti procházející molekuly: konformace, struktura a náboj (Kudr, 2014).

Sekvenátory Nanopore jsou levné a malé přístroje, což usnadňuje jejich pořízení do laboratoří. Nicméně vyžaduje nejen specializované vybavení a reagentie, ale také i specifické softwarové nástroje a algoritmy (Míka, 2019).

2.2.4.3 *Helicos*

Platforma Helicos byla nejnovější metodou pro analýzu jednotlivých molekul DNA na základě fluorescenčního sekvenování. Byla vyvinutá společností Helicos Biosciences (Kulski, 2016).

Na začátku DNA je jednoduše stříhána, přidává se k ní poly-A (poly-adeninový) konec a dále hybridizována na povrch průtokové buňky obsahující oligo-d nukleotid. Přidání fluorescenčních nukleotidů s koncovým nukleotidem zastaví cyklický proces, dokud nebude zachycen obraz jednoho nukleotidu pro každou sekvenci DNA. Pak se postup opakuje do té doby, kdy fragmenty budou zcela sekvenovány (Kulski, 2016).

Ta metoda umožňuje úspěšně sekvenování lidského genomu pro klinické hodnocení a sekvenování RNA za vzniku kvantitativních transkriptomů tkání a buněk (Kulski, 2016).

Helicos vyžaduje mnohem méně materiálu než jiné technologie, příprava vzorku nevyžaduje ligaci nebo amplifikaci PCR (Thompson, 2010).

2.2.5 *Srovnání sekvenačních metod*

Každá z výše popsaných metod má své vlastní výhody a nevýhody.

Zatím neexistuje žádná ideální metoda sekvenování, která by úplně splnila všechny lidské požadavky. Při výběru metody by se měla laboratoř spoléhat na taková kritéria, jako jsou požadovaná délka sekvenování, finanční možnosti pacienta a laboratoře a možná čekací doba na výsledky.

Níže je uvedena tabulka, která popisuje hlavní charakteristiky metod NGS.

Tabulka 1: Srovnání metod pro sekvenování DNA

Sekvencer	Mechanismus	Délka sekvence (bp)	Doba běhu	Přesnost	Cena za 1 gb (v dolarech)
Sanger	enzymatické štěpení DNA	400-900	20 minut – 3 hodiny	99,9 %	\$2 400 000
Maxam-Gilbert	chemické štěpení DNA	N/A	N/A	N/A	\$1 000 000
454 (Roche)	pyrosekvenování	700	10 hodin	99,9 %	\$0,01
Illumina	masívně paralelní sekvenování na destičce	75	9,5 dní	99,9 %	\$41-\$148
SOLiD	emulzní PCR reakce na kuličce	50+35 nebo 50+50	7-14 dní	99,9 %	\$2000
IonTorrent	detekce vodíkových kationtů polovodičovými čipy	600	2 hodiny	87 %	\$1000
SMRT (Pacific Biosciences)	replikace jednotlivé molekuly DNA v reálném čase	30	30 minut – 2 hodiny	87 %	\$7,2-\$43,3
Nanopore	replikace jednotlivé molekuly DNA v reálném čase prostřednictvím nanoporů membrány	2 272 580	1 minuta – 48 hodin	92-97 %	\$7–100
Helicos	jednomolekulové fluorescenční sekvenování v reálném čase	1 000 000 000	8 dní	99 %	N/A

Zdroj: Kulski, 2016; Quail, 2012; Liu, 2012; Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health, 2014

2.3 Alergie

Alergie můžeme definovat jako hypersenzitivní reakci, která je vyvolávána imunitními mechanismy. Pojem hypersenzitivita popisuje objektivně reprodukovatelné symptomy nebo znaky (Krejsek, 2004).

2.3.1 Atopie

Pojem atopie bývá často s pojmem alergie zaměňován. Je to geneticky podmíněná tendence jedinců odpovídat na expozici nízkým dávkám běžných alergenů zevního prostředí nadměrnou tvorbou specifických protilátek IgE. Při následné interakci takto vzniklých protilátek s alergenem pak dochází rozvoji zánětu, který se klinicky manifestuje jako alergické onemocnění (Hořejší, 2017).

Atopické osoby mají geneticky podmíněnou reaktivitu vytvářet po expozici alergenů zvýšené množství protilátek v třídě IgE. Tvorba alergen-specifických protilátek je součástí komplexnější abnormální reaktivity, která je určovaná aktivitou subsetu Th2 T-lymfocytů (Krejsek, 2004).

Aby došlo v organismu k rozvoji alergického onemocnění, musí být splněny dva základní předpoklady: genetická predispozice a interakce s adjuvantními vlivy zevního prostředí (Vernerová, 2012).

2.3.2 Alergeny

Alergen je antigen schopný vyvolat alergickou odpověď. Tento termín se užívá jak pro zdroj alergenů (roztoči, bříza, zvířecí srst...), tak i pro konkrétní imunochemicky nebo molekulárně definované antigenní struktury (Der p 1, Bet v 1, atd.) (Hořejší, 2016).

Takzvané hlavní alergeny jsou ty, proti kterým vyvíjí specifickou protilátkovou odpověď u většiny nemocných. Ostatní alergeny se řadí mezi vedlejší, na níž se reaguji pouze malá část alergiků (Krejsek, 2004).

2.3.3 Anafylaxe

Anafylaxe je život ohrožující reakce organismu, která je genetická podmíněna tendencí organismu odpovídat nízkým dávkám běžných alergenů zevního prostředí nadměrnou tvorbou specifických protilátek třídy IgE (Horejší, 2017).

Příznaky anafylaxe zahrnují zarudnutí, svědění, kopřivku s angioedém, postižení horních a dolních dýchacích cest, závrat nebo synkopu s hypotenze nebo bez hypotenze, gastrointestinální příznaky, jako jsou nauzea, zvracení, křeče a průjem (Brhel, 2008).

Těžká forma anafylaxe – anafylaktický šok – vzniká v řádech minut po expozici alergenu a může skončit i smrtí, není-li první pomoc poskytnuta včas (Bidat, 2005).

V České republice je každoročně hospitalizováno pro závažné alergické reakce kolem 200 lidí a je zaznamenáno kolem 5 úmrtí na anafylaktický šok (Brhel, 2008).

Podle dat získaných v letech 1992 až 2012 v Velké Británii anafylaxe vyvolaná ořechy se stala u 73 % celkového počtu všech fatálních případů (Turner, 2015).

2.3.4 Potravinová alergie

Alergická reakce může být vyvolávána velkým množstvím potravin. K nejčastějším potravinovým alergenům patří mléko, sója, vejce, pšenice, ořechy a ryby (Yu, 2016).

2.3.4.1 Příčiny

Alergie na složky potravy odráží abnormity v individuální imunitní reaktivitě. Jedná se o komplexní sumu genetických dědičných dispozic, které byly ovlivněny vnějším prostředím v průběhu ontogeneze (Krejsek, 2016).

Za klíčové je považováno kojenecké období, kdy je dobře dokumentován protektivní vliv kojení na rozvoj potravinových alergií. Je to dáváno do souvislosti s rozvojem přirozené střevní mikrobioty, která je podmínkou fyziologického nastavení slizniční i systémové imunity (Krejsek, 2016).

2.3.4.2 Průběh

V alergii na složky potravy se uplatňuje především imunopatologická reakce I. typu zprostředkovaná IgE protilátkami (Špičák, 2004).

Při prvním setkání s antigenem dochází k senzibilizaci pacienta. Stimuluje se diferenciací specifických klonů Th2-lymfocytů, které pod vlivem IL-4 donutí B-lymfocyty vytvářet IgE protilátky proti alergenu. IgE se pak nachytají na žírnou buňku, která pro něj má receptory (Horejší, 2004).

Po opakovaném setkání s alergenem, který je polyvalentní, dochází k přemostění molekul IgE, agregaci receptorů na povrchu těchto buněk a okamžitému uvolnění jejich granul – heparinu a histaminu. V průběhu pozdní fáze se uvolní metabolity kyseliny arachidonové: prostaglandiny, leukotrieny a tromboxany (Horejší, 2004).

2.3.4.3 Diagnostika

Diagnostika potravních alergií je mimořádně obtížná a ne vždy úspěšná. Klinické symptomy nejsou pro potravní alergii specifické. Je nutným odlišit jejich od symptomů potravních intolerancí. Základem je především podrobná osobní anamnéza, která má za cíl stanovit ty složky potravy, které způsobují klinické obtíže (Krejsek, 2016).

Významným diagnostickým nástrojem jsou kožní expoziční testy prováděné buď technikou prick nebo technikou patch, když testovaný jedinec exponován suspektním alergenům. Přispět mohou i diagnostické laboratorní testy, které mohou v případě pozitivitu ukázat na senzitivizaci pacienta. Jedná se o protilátky třídy IgE specifické pro podezřelé alergeny (Krejsek, 2016).

Za „zlatý“ diagnostický standart je považován dvojitě slepý placebem kontrolovaný potravinový expoziční test (double-blind placebo-controlled food challenge). Je založen na principu podání podezřelého alergenu v takové formě, ve které nejde rozpoznat podle vzhledu, chuti a vůně (Špičák, 2004).

2.3.4.4 Terapie

V léčbě potravinových alergií je na prvním místě eliminační dieta, pokud je znám alergen. Může trvat dva týdne až celý život (Špičák, 2004).

Farmakologická léčba je přestavena medikamenty v různých skupinách: antihistaminika, anticholinergika, antileukotrieny, kortikosteroidy, kromony, metylxantiny a sympatomimetika. Léčba léky v zásadě nemění přirozený dlouhodobý vývoj onemocnění, jde jenom o terapii příznaků (Špičák, 2004).

Imunoterapie může omezit farmakoterapii, která je spojena s určitými riziky, nežádoucí účinky a vyššími náklady. Léčba spočívá na základě opakovaného podávání postupně se zvyšujících dávek alergenu, což vede k vymizení potíží při expozici alergenu (Špičák, 2004).

2.3.4.5 Alergie na ořechy

V USA a Velké Británii postihuje alergie na arašidy a ořechy přibližně 1% celkové populace. Jedna se o nejčastější potravinovou alergii u dětí od 3 let (Bidat, 2005).

Nejčastějším ořechem vyvolávající alergie v Evropě je lískový ořech. Ve Spojených státech nejvýznamnějšími alergeny mezi ořechy jsou vlašský ořech a kešu; alergie na arašidy byla hlavní příčinou úmrtí v souvislosti s anafylaxií vyvolanou potravinovou alergií. Ve Velké Británii mezi nejběžnějšími alergeny patří brazilský ořech, mandle a vlašský ořech (Haroun-Díaz, 2017).

Alergie na určitý druh ořechu může vyvolat vznik zkřížené reakce. To znamená, že pokud je proti určitému antigenu vytvořeny IgG protilátky, pak na základě podobnosti struktury aminokyselin mohou reagovat i na jiný alergen (Špičák, 2004).

I když většina ořechů (mandle, lískové ořechy, arašidy...) patří do různých botanických rodin, může dojít ke zkřížené reaktivitě kvůli přítomnosti stejných homologních proteinů (Haroun-Díaz, 2017).

Nejčastějšími křížovými reakci u ořechů jsou:

- lískový ořech – vlašský ořech

- mandle – vlašský ořech
- mandle – pistácie
- mandle – lískový ořech
- mandle – pekan
- pistácie – kešu
- vlašský ořech – pekan
- pistácie – brazilsky ořech
- vlašský ořech – kokos

Znalost zkřívených reakce mezi různými druhy alergeny může významně přispět ke stanovení diagnózy alergika (Špičák, 2004; Novák, 2010).

Alergie na ořechy byla asociovaná se senzibilizací skupiny alergických proteinů Bet v 1 v Evropě a skupiny alergických proteinů LTP ve Španělsku (Haroun-Díaz, 2017).

2.4 STAT6

Gen *STAT6* (z anglického Signal Transducer and Activator of Transcription 6) se nachází u člověka na chromozomu 12, v lokusu 12q13.3. Zahrnuje více než 19 kb a obsahuje 23 exonů (Patel, 1998).

2.4.1 Struktura

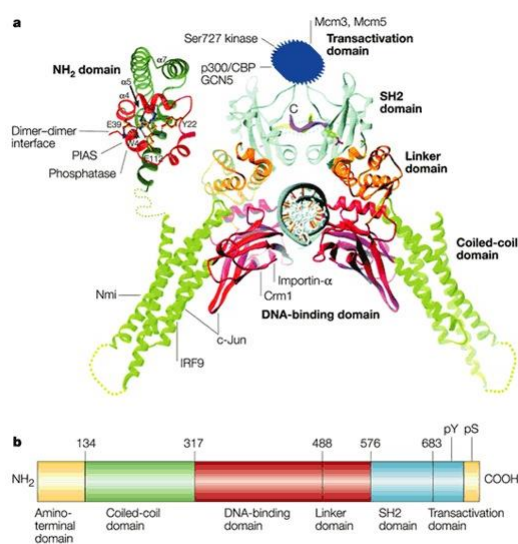
Protein STAT6 je homodimer, který je schopný vázat DNA po jeho fosforylace (Li, 2016).

Struktura proteinů STAT6 je podobná struktuře jiných proteinů skupiny STAT. Každý protomer (nejmenší strukturní jednotka oligomerního proteinu) lze rozdělit do pěti odlišných oblastí: doména N-terminální cívky, doména vázající DNA, doména linkeru, doména SH2 a doména obsahující C -terminální fosfotyrosinový konec (obr.4) (Li, 2016).

Nicméně, STAT6 má některé rozdíly ve své struktuře ve srovnání s jinými proteiny skupiny STAT. Doména SH2 u STAT6 je kratší než C-terminální konec STAT1 a

STAT3. Kromě toho, čtyři α -šroubovice z domény N-terminalní cívky u STAT6 jsou kratší než odpovídající oblasti v STAT1, STAT3 a STAT 5a (Li, 2016).

Dalším klíčovým rozdílem mezi STAT6 a ostatními STAT je úhel dimerizace. Ve STAT6 je úhel homodimeru větší než úhel v homodimerech STAT1 a STAT3. Tyto rozdíly umožňují, aby struktura proteinu STAT6 byla pružnější a tím přístupnější pro vazbu DNA ve srovnání s jinými proteiny skupiny STAT. Strukturní základ vazby DNA STAT6 se také liší. Pouze jeden zbytek STAT6 (ve srovnání se třemi zbytky ve STAT1) tvoří vazbu s bází DNA (Li, 2016).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Obrázek 4: Struktura proteinu STAT. (A) Richardsonův diagram ukazuje vazbu STAT1 dimeru na DNA a umístění vazebných míst různých proteinů v různých doménách. (B) Schematický lineární diagram ukazuje doménovou organizaci lidského STAT6: N-terminální doména (žlutá), oblast svinuté cívky (zelená), doména vázající DNA (červená), doména linkeru (červená), doména SH2 (azurová) a segment obsahující C-terminální fosfotyrosinový konec (žlutá)

Zdroj: Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002

2.4.2 Aktivace

Všechny STAT proteiny jsou primárně aktivovány proteiny skupiny JAK – Janusovými kinázami. Jejich hlavní roli je fosforylace proteinů rodiny STAT. Porucha aktivace

proteinů JAK vede ke zvýšené angiogenezi, procesu tvorby krevních kapilár, která je často pozorována u primárních nádorů (Xue, 2016).

Proteiny skupiny STAT také mohou být aktivovány receptory tyrozinkinázy, hlavně EGF, PDGF a FGF receptory. Mohou aktivovat STAT6 buď přímo samotně nebo nepřímo prostřednictvím proteiny skupiny JAK (Banerjee, 2015).

Nereceptorové tyrozinkinázy, jako jsou v-Src, v-Fps, v-Sis, PyMT, v-Abl, a jiné proteinkinázy (včetně několika MAPK) mohou způsobit aktivaci proteinů skupiny STAT (Garcia, 1998).

2.4.3 Funkce

Protein STAT6 hraje klíčovou roli v imunitních reakcích organismu zprostředkovaných cytokiny IL-4, IL-5 a IL-13. Tento protein je nutný pro funkce T-buněk, včetně vývoje Th2 buněk a IL-4 stimulovaných proliferačních odpovědí (Takeda, 1996; Ansel, 2006).

U B-lymfocytů STAT6 podporuje izotypový přesmyk protilátek třídy IgE na třídu IgG1. STAT6 také indukuje expresi některých molekul na buněčném povrchu odpovědných za prezentaci antigenu B-buňkami (Shimoda, 1996; Takeda, 1996).

STAT6 může vyvolat diferenciaci alternativně aktivovaných makrofágů (AAM) indukovanou IL-4 a zprostředkovává expresi genů indukovaných IL-13, jako je MHC třídy II. Aktivita STAT6 v AAM je spojena se supresí proliferace T-buněk (Martinez, 2009; Takeda 1996).

STAT6 usnadňuje transkripci zprostředkovanou receptorem PPAR- γ v makrofázích a dendritických buňkách. V dendritických buňkách STAT6 je schopen potlačovat produkci IL-10 a IL-12 (Szanto, 2010; Yao, 2005).

Bylo zjištěno, že STAT6 indukuje expresi genu *BCL2L1/BCL-X*, který je zodpovědný za antiapoptickou aktivitu IL4 (Aronica, 2000).

Nedávná studie ukázali, že *STAT6* také hraje klíčovou roli v antivirové signalizaci hostitelskými buňkami v reakci na virové infekce onkoproteiny (Chen et al., 2011).

2.4.4 Polymorfismus

Polymorfismus rs324015 nukleotidu G/A genu *STAT6* se nachází v 3'-netranslatované oblasti v pozici 2964 (Zhu, 2013).

V britské populaci se objevuje heterozygotní genotyp G/A s frekvencí 0,47 a je nejčastějším u této skupiny obyvatelstva. Dalšími genotypy jsou homozygoty G/G a A/A s frekvencí 0,43 a 0,1 (Amoli, 2000).

V dalším studiu byl polymorfismus rs324015 vyšetřován v souvislosti s alergií na ořechy. V britské populaci byla alela G přítomna u 87 % jedinců s alergií na ořechy a u 76 % osob, které nemají alergie na ořechy, ale trpí jiné atopické onemocnění. Homozygotnost G/G byla spojena s největší pravděpodobností přítomnosti alergií na ořechy, a to je u 75 % lidí. (Amoli, 2002).

Analýza polymorfismu G2964A genu *STAT6* u jedinců čínské populaci ukázala, že u homozygoty A/A bylo mírně zvýšeno riziko vzniku astmatu o 47 % ve srovnání s genotypem G/G. Výskyt alely A mírně zvýšil riziko astmatu v čínské populaci o 18 % (Zhu, 2013).

V japonské populaci u jedinců trpících astma byli nejčastěji přítomny genotypy A/A a A/G. Alely A a G se vyskytovaly s frekvencí 0,67 a 0,33. Byla prokázána korelace mezi výskytem těchto alel a nalezenou antigen specifickou IgE odpovědí nebo celkově zvýšením IgE v krvi (Gao, 2000).

U dětí egyptské populace bylo prokázáno, že existuje další polymorfismus genu *STAT6* rs324011. Genotyp T/T byl významně spojen s potencialitou rozvoje bronchiálního astmatu ve srovnání s genotypy C/C a C/T. Ve skupině dětí s bronchiálním astmatem byly hladiny sérového IL-4 a celkového IgE vyšší u dětí s genotypy C/T a T/T, než u dětí s genotypy CC (Gohary, 2018).

Bylo zjištěno, že v české a německé populaci je nejčastější haplotyp s6 spojen se zvýšenou hladinou celkového IgE u pacientů. U pozorovaných jedinců byl tento haplotyp významně častěji přenášen od otců a vykazoval vyšší tendenci ke zvětšení celkové hladiny IgE než haplotyp přenášený od matek (Godava, 2013).

3 Cíle práce, výzkumné předpoklady a výzkumná otázka

Cíle:

1. seznámit se s metodami molekulární genetiky v praxi
2. vyšetřit polymorfismus G2964A genu *STAT6* metodou sekvenování u dvaceti vzorků. Vzorky budou pocházet od osob trpících některou z alergií na ořechy i od osob bez alergie.
3. analyzovat výsledky a stanovit korelaci mezi polymorfismem G2964A genu *STAT6* a výskytem alergií na ořechy
4. určit, jestli je metoda sekvenování vhodnější než jiné metody molekulární biologie pro stanovení polymorfismu G2964A genu *STAT6*

Výzkumné otázky:

1. Jak souvisí výskyt jednotlivých genotypů a alel genu *STAT6* s alergickými projevy (respektive s alergií na ořechy)?
2. Mohla by metoda sekvenování hodit k rutinnímu vyšetření alergií na ořechy?

Výzkumné předpovědi:

Po analýze studií provedených v posledních dvou desetiletích je očividné, že polymorfismus genu hraje skutečně klíčovou roli v rozvoji nejen alergie na ořechy, ale i dalších atopických onemocnění, jako jsou například astma a bronchitida. Lze předpokládat, že v praktické části u vyšetřených lidí, kteří trpí alergií na určitý druh ořechů se bude vyskytovat alela G a pravděpodobně budou homozygoti. Metoda sekvenování může přispět analyzovat polymorfismus G2964A genu *STAT6* s vysokou přesností, rychlostí a nenáročností použitím bezpečných chemikálií.

4 Metodika

4.1 Odběr vzorků a příprava k analýze

Na odběr DNA pro další zpracování byla používána neinvazivní metoda stěru z bukální sliznice.

Odběr vzorku byl prováděn u 20 lidí, 11 z nich trpí alergií na určitý druh ořechu. Byly také prováděny odběry u lidí trpících na astma. Na každého jedince byly používány dvě zkumavky se sterilním tamponem pro přesnou analýzu. Dále bylo pracováno se anonymně.

Každý člověk prováděl odběr samostatně. Byl seznámen s pravidly správného odběru, tj. neměl jíst a pít před odběrem cca jednu hodinu, během odběru opatrně otočil sterilní tampon na sliznici po dobu nejméně 10 sekund a nedotýkal se okolí.

Po odběru byly vzorky označeny číslem a pak nechány v ledničce při teplotě pět stupňů do izolace DNA. Doba skladování by měla být co nejkratší.

4.2 Izolace DNA

Potřebné vybavení:

Automatické pipety, špičky, mikrozukavky typu Eppendorf objemem 1,5 ml, mikrozukavky s kolonkami, nůžky, rukavice, centrifuga Minispin, mixer Vortex Labnet International, vodní lázeň Julabo SW22

Reagencie a chemikálie:

- 200 μ l PBS
- 25 μ l proteinázy K
- 200 μ l ethanol (96%)
- pufr buffer BW (kit NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel)
- pufr B5 (kit NucleoSpin® od firmy Tissue Macherey-Nagel)

- pufr B3 (kit NucleoSpin® od firmy Tissue Macherey-Nagel)
- pufr BE (kit NucleoSpin® od firmy Tissue Macherey-Nagel)

Pracovní postup:

Na začátku do číselně označených mikrokumavek s objemem 1,5 µl byly napipetovány dva vzorky jedince stříháním konce sterilního tamponu pomocí nůžek, 200 µl pufru PBS, 200 µl lyzačního pufru B3 a 25 µl proteinázy K. Vzorky byly třikrát zvortexovány a centrifugovány po dobu cca 1 minuty. Pak vzorky byly inkubovány ve vodní lázni 20 minut při teplotě 60 °C.

Po inkubaci bylo do mikrokumavek pipetou přidáno 200 µl 96 % ethanolu. Mikrokumavky byly zase promíchány ve vortexu a stočeny v centrifuze.

Obsah mikrokumavek byl pipetou přenesen na speciální kolonky, které pak byly stočeny v centrifuze při 11 000 g po dobu 1 minuty. Mikrokumavka s filtrátem byla odstraněna.

Při prvním promytí do mikrokumavek bylo následně napipetováno 200 µl pufru Buffer BW. Pak mikrokumavky byly stočeny v centrifuze při 11 000 g po dobu 1 minuty. Zkumavka s filtrátem byla odstraněna.

Při druhém promytí do mikrokumavek bylo pipetou přidáno 200 µl pufru B5. Mikrokumavky byly stočeny v centrifuze při 11 000 g po dobu 1 minuty. Mikrokumavek a mikrokumavky s filtrátem byly odstraněny.

Následně byly mikrokumavky stočeny v centrifuze při 11 000 g po dobu 1 minuty. Tím z mikrokumavek byl odstraněn zbytečný ethanol. Tento krok byl ještě jednou opakován pro dosažení lepšího výsledku.

Na konci vlastní izolace DNA byl používán eluční pufr BE. Do mikrokumavek bylo odpipetováno 20 µl pufru BE. Pak byly nechány inkubovat při pokojové teplotě po dobu 10 minut a dále byly centrifugovány při 13 400 g po dobu 1 minuty.

4.3 Stanovení koncentrace DNA

Potřebné vybavení:

- automatické pipety
- špičky
- rukavice
- spektrofotometr Colibri Titertek Berthold

Reagencie a chemikálie:

- naizolovaná DNA v mikrokumavkách 1,5 μ l
- Pufř BE z kitu NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel)

Pracovní postup:

Na začátku musel být spektrofotometr nakalibrován. Na čočku spektrofotometru bylo odpitováno 1,5 μ l pufřu BE a pak na přístroje bylo stisknuto tlačítko „blank“.

Od každé DNA byl na čočku spektrofotometru napipetován objem 1,5 μ l a pak vzorek změřen stisknutím tlačítka „measure“. Měření proběhlo dvakrát. Výsledky byly zapsány do tabulky a z toho byl spočítán průměr.

4.4 Amplifikace DNA metodou PCR

PCR metoda je založena na principu enzymatické amplifikace DNA in vitro syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích. Celý proces se skládá za několika etap. Na začátku dochází k tepelné denaturaci DNA. V další fázi dojde k nasednutí primeru na komplementární 3' konce cílové DNA. Syntéza nových vláken probíhá za použití DNA polymerázy izolované z bakterie *Thermus aquaticus*. Tento enzym je označován za *Taq* polymerázu, zůstává aktivní i po zahřátí na vysokou teplotu. Jeho hlavní role je prodloužení vlákna DNA směrem od 5' konce ke 3' konci. V poslední fázi dochází k denaturaci nově vytvořených DNA duplexu zahříváním. Celý

proces se znovu opakuje. Po každém cyklu dojde ke zdvojnásobení počtu kopii úseku mezi primery, množství kopii sekvence DNA roste logaritmičtě (Horejši, 2011).

Hlavní výhodou PCR je to, že ta metoda umožňuje získat požadovanou sekvenci DNA bez jejich předchozího klonování ve vektorech. Při standardních podmínkách PCR bývají úseky DNA amplifikovány o velikosti 3-4 kb. Lze získat produkty i delší 5 kb, ale s nižším molárním množstvím (Šmarda, 2005).

Potřebné vybavení:

- Mikrozkušavky typu Eppendorf objemem 1,5 ml
- PCR zkušavky objemem 0,2 ml
- automatické pipety
- špičky
- rukavice
- termocykler Mj Mini BioRad

Reagencie a chemikálie:

- Naizolovaná DNA
- OneTag Primer Quick-Load (BioLabs)
- STAT6 Forward Primer (Generi Biotech)
- STAT6 Reverse Primer (Generi Biotech)
- voda

Byly používány STAT6 Forward a Reverse primery s následujícími sekvencemi:

Forward 5'-GAA GTT CAG GCT CTG AGA GAC-3'

Reverse 5'-CCA TCA CCC TCA GAG AGC-3'

Sekvence primerů byly převzaty z článku „*Polymorphism in the STAT6 gene encodes risk for nut allergy*“, rok 2002, autor Amoli M.M.

Všechno potřebné vybavení, postupy, reagentie a chemikálie byly součástí laboratoře v Českých Budějovicích Zdravotně Sociální Fakulty Jihočeské Univerzity.

Pracovní postup:

Na začátku byly všechny chemikálie vyndány z mrazničky a nechány při pokojové teplotě. Dále byly zvortexovány a stočeny v centrifuze.

Nejprve bylo provedeno 10x ředění (10 pmol) forward a reverse primerů tak, že do mikrozkušavky objemem 1,5 ml bylo odpipetováno 45 μ l vody a 5 μ l příslušných primerů.

Do sady označených PCR mikrozkušavek byla dodána reakční směs ve množství, které je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2. Reakční směs

Reagentie	Množství
OneTag Quick-Load 2x Master Mix	7,5 μ l
Forward Primer	1,5 pmol/l
Reverse Primer	1,5 pmol/l
Voda	3 μ l

Zdroj: vlastní

Následně do každé PCR zkumavky byla postupně odpipetována předem naizolovaná DNA ve množství 1,5 μ l. Každá zkumavka obsahovala celkem 15 μ l reakční směsi.

Při větším počtu vzorků byl předem namíchán mastermix. Mastermix obsahoval násobek reagentii uvedených v tabulce 2. Pak byl odpipetován do PCR zkumavek a byla přidána DNA ve stejném množství.

Na konci byly všechny vzorky zvortexovány a stočeny v centrifuze.

Na termocykleru byl nastaven program podle teplotního profilu PCR uvedeného v tabulce 3.

Tabulka 3. Teplotní profil PCR.

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklu
Počáteční denaturace	99 °C	3 min	1
Denaturace	99 °C	45 s	40
Annealing	55 °C	45 s	
Extenze	72 °C	45 s	
Terminální extenze	72 °C	2 min	1

Zdroj: vlastní

Optimilizace PCR byla provedena v laboratoři již před rokem.

4.5 Elektroforéza PCR produktů

Pro kontrolu přítomnosti PCR produktů byla používaná gelová elektroforéza. Základem této metody je různá pohyblivost negativně nabitých nukleových kyselin v stejnosměrném proudu podle jejich velikosti. Elektroforetickým prostředím byla využívána agaróza, která je polymerem disacharidu agarobiozy. K vizualizaci DNA bylo používáno barvivo ethidiumbromid.

Potřebné vybavení:

- kádinka
- odměrný válec

- automatická pipeta
- špičky
- rukavice
- elektroforetická vana
- transiluminator UVITEC Cambridge

Reagencie a chemikálie:

- PCR produkty
- prášková agaróza
- pufr TBE
- barvivo ethidiumbromid
- velikostní marker DNA ladder Quick-Load 100 bp (BioLabs)

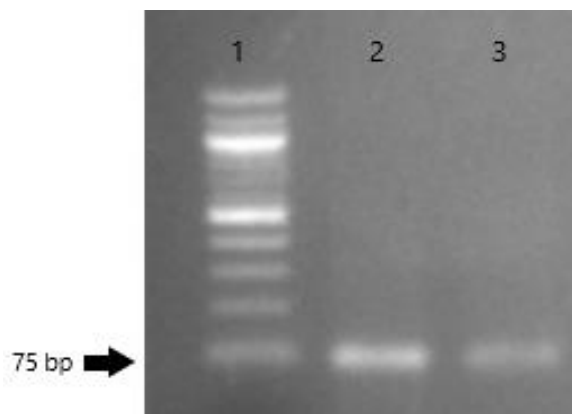
Pracovní postup:

Pro přípravu 2 % agarozového gelu bylo na laboratorních vahách na začátku odváženo 2 g agarózy. Pomocí odměrného válce bylo do kádinky s agarózou přidáno 100 ml pufru TBE. Kádinka byla následně ohřata v mikrovlnné troubě takovou dobu, aby zmizely všechny bubliny a agar se úplně rozpustil. Po ochladnutí bylo pipetou přidáno ke gelu 4 μ l ethidiumbromidu. Vznikla směs byla dobře promíchána.

Dále do elektroforetické vany byl vložen hřeben a následně byl vylit připravený agarozový gel. Po tuhnutí gelu byl hřeben odstraněn. Do vytvořených hřebním jamek bylo postupně odpipetováno 10 μ l produktů PCR, přičemž do první jamky bylo přidáno 5 μ l velikostního markeru DNA ladder.

Pro zpuštění elektroforézy byly připevněny elektrody a připojeny ke zdroji. Elektroforéza probíhala 40 minut při napětí 110 V.

Na konci procesu byla elektroforéza vypnuta, gel byl z vany vyjmut a byl přenášen na transluminator pro vizualizaci UV světlem. Ofocený výsledek (obr. 5) byl použit k rozhodnutí, zda amplifikace DNA proběhla úspěšně nebo ne. Přítomnost pruhů na elektroforéze znamená, že vzorek se může hodit k dalšímu zpracování.



Obrázek 5: Rozdělení produktů PCR metodou gelové elektroforézy. První jamka obsahuje DNA ladder, jamky 2-3 obsahují produkty PCR

Zdroj: vlastní

4.6 Enzymatické přečistění PCR produktů

Pro dosažení lepšího výsledku sekvenování DNA je vhodné provádět enzymatické přečistění PCR produktu. Hlavním cílem toho procesu je zbavení již nepotřebných chemikálií, které zbyly ve zkumavkách, tj. neinkorporovaných dNTP a primerů.

Potřebné vybavení:

- PCR zkumavky objemem 0,2 ml
- automatická pipeta
- špičky
- rukavice
- termocykler Mj Mini BioRad

Reagencie a chemikálie:

- PCR produkty
- exonukleáza EXO I (New England BioLabs)
- alkalická fosfatáza rSAP (New England BioLabs)

Pracovní postup:

Do PCR zkumavek byly odpipetovány 5 µl PCR produktů, 0,5 µl EXO I a 1 µl rSAP. Vzorky byly zvortexovány a stočeny v centrifuze. Pak byly dány do termocyklu, kde byl předem nastaven program na inkubaci vzorků při teplotě 37 °C na dobu 15 minut. Pro následnou enzymatickou inaktivaci byl zapnut program, který probíhal při teplotě 80 °C po dobu 15 minut.

4.7 Příprava vzorků ke sekvenování

Potřebné vybavení:

- mikrozkušavky typu Eppendorf objemem 1,5 ml
- automatické pipety
- špičky
- rukavice

Reagencie a chemikálie:

- Přečištěné PCR produkty
- STAT6 Reverse Primer (Generi Biotech)
- voda

Pracovní postup:

Sada 20 mikrozkušavek byla označena čarkovým kódem firmy Genseq.

Vzhledem k tomu, že vyšetřovaný polymorfismus se nachází na začátku sekvence, nebyl použit Forward Primer, ale Reverse Primer.

Do každé zkumavky bylo postupně odpipetováno 1,5 µl přečištěných PCR produktů, 5 µl STAT6 Reverse Primeru a 3,5 µl vody. Zkušavky byly pevně zavřeny, zvortexovány a stočeny v centrifuze. Pak byly vzorky odeslány do laboratoře GenSeq.

5 Výsledky

5.1 Měření koncentrace izolované DNA

Pro změření koncentrace předem izolované DNA byla použita spektrofotometrická metoda. Spektrofotometr byl předem nakalibrován BE (elučním pufrem) pufrem, poté bylo provedeno měření konkrétních vzorků. Vzorky byly změřeny na spektrofotometru dvakrát, z čehož byl dal spočítán průměr. Získaná data jsou uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4. Naměřená koncentrace DNA

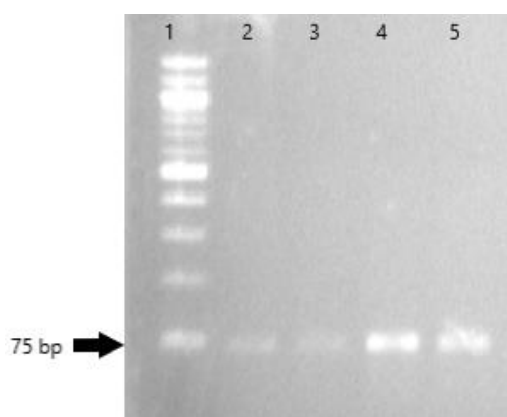
číslo zkumavky	koncentrace DNA (ng/μl)	průměr (ng/μl)	číslo zkumavky	koncentrace DNA (ng/μl)	průměr (ng/μl)
1.	60,14	62,92	11.	28,59	28,58
	65,7			28,57	
2.	39,75	39,24	12.	54,91	54,91
	38,73			54,91	
3.	95,2	97,6	13.	18,54	18,61
	100			18,67	
4.	45,8	48,03	14.	6,3	6,38
	50,25			6,45	
5.	135,08	135,64	15.	76,82	75,51
	136,2			74,19	
6.	21,15	17,76	16.	59,4	61,28
	14,37			63,15	
7.	28,97	28,88	17.	38,92	39,63
	28,79			40,34	
8.	51,59	51,60	18.	16,08	16,925
	51,62			17,77	
9.	32,41	24,55	19.	8,23	10,79
	16,70			13,35	
10.	24,25	24,42	20.	19,28	14,325
	24,59			9,37	

Zdroj: vlastní

5.2 Kontrola produktů PCR

Kontrola amplifikovaných vzorků metodou PCR byla provedena pomocí metody gelové elektroforézy.

Úspěšnost izolace DNA a její následná amplifikace byla zjištěna podle fotografie, která byla pořízena po ukončení elektroforézy. Detekovaný bílý pruh v jamce s nakapaným produktem PCR svědčí o přítomnosti DNA s určitou délkou. S toho vyplývá, že ten vzorek se mohl hodit k následujícímu sekvenování (obr. 6).



Obrázek 6: Rozdělení produktů PCR metodou gelové elektroforézy. První jamka obsahuje DNA ladder, jamky 2-5 obsahují produkty PCR o velikosti přibližně 75 bp

Zdroj: vlastní

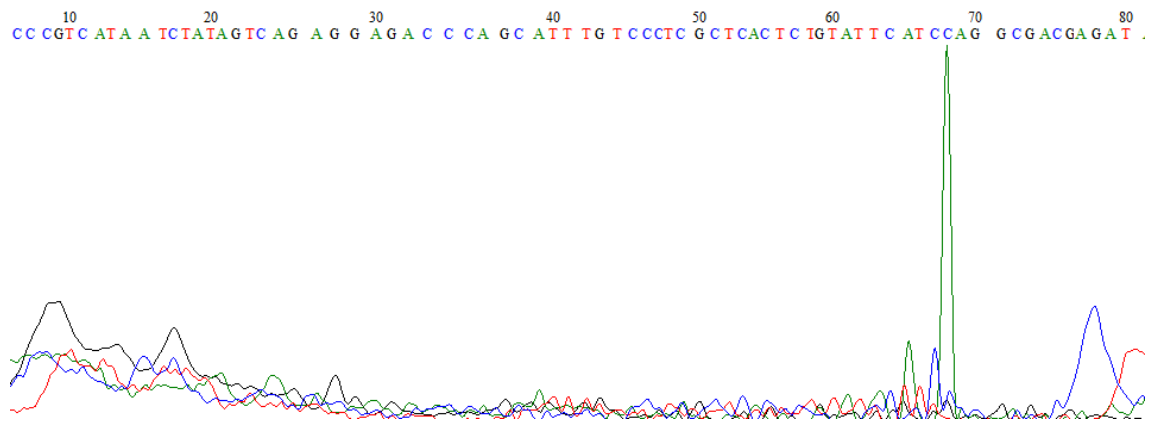
Po kontrole amplifikace byly produkty PCR enzymaticky přečištěny. U vzorků, které měly příliš nízkou koncentraci DNA (pod 15 ng/μl) bylo nutné přidat do PCR reakce větší množství DNA. Při přípravě vzorků ke sekvenování byl změněn poměr vody a namnožené DNA. Tak výsledná zkumavka obsahovala víc genetického materiálu.

Produkty PCR byly odpipetovány do nových zkumavek označených čarkovým kódem a odeslány do laboratoři GenSeq pro sekvenování.

5.3 Interpretace výsledků sekvenogramu

Pro vlastní hodnocení dosažených výsledků byl použit počítačový software BioEdit.

Poprvé bylo provedeno 5 sekvenací, avšak žádná z nich nebyla vhodná k hodnocení. V elektroforéze byly přítomny další nespecifické produkty a sekvenogram zahrnoval hodně šumů (obr. 7).



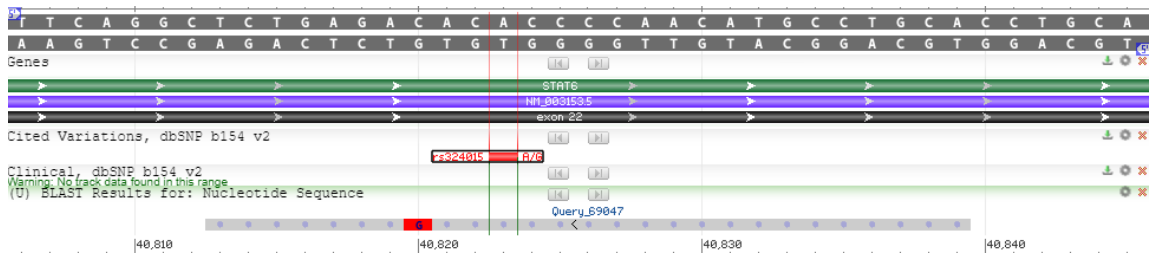
Obrázek 7: Nepovedená sekvenace jednoho z prvních vzorků. Sekvenogram zahrnuje hodně šumů, a proto ho nelze hodit.

Zdroj: vlastní

Sekvence nevyšly pravděpodobně kvůli tomu, že byly použity primery naředěné před rokem. Více příkladů k této problematice uvádí Pazdernik (2017), podle jeho výzkumu je teplota nejdůležitějším kritériem při skladování primerů. Pokud jsou primery skladovány při teplotě -20°C (zmrazené), zůstávají stabilní po dobu dvou let, bez ohledu na to, zda jsou skladovány v suchu, resuspendovány v pufru TE nebo ve vodě neobsahující nukleázy. Primery zůstávají stabilní při opakovaných cyklech zmrazování a rozmrazování až do 30 cyklu. Po 30 cyklu zmrazování a rozmrazování už se bude měnit jejich stabilita a funkce.

Pro přípravu dalších vzorků byly použity nové primery.

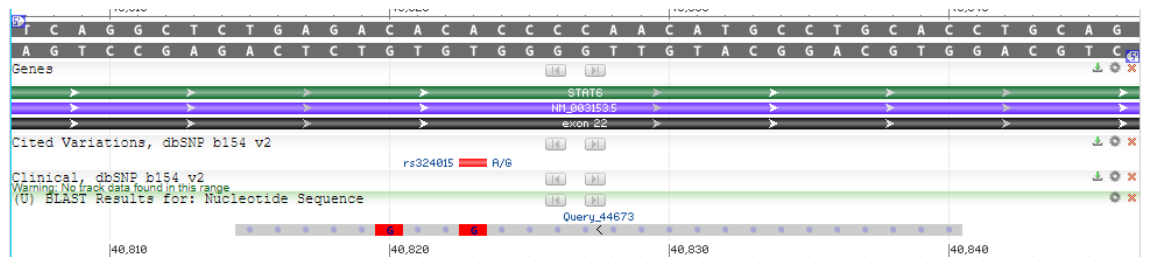
Vypočítání genotypové sekvence genu STAT6 obsahující polymorfismus rs324015 bylo provedeno pomocí databáze NCBI Human ReSeqGene Sequences. Sekvence nukleotidů v předpokládané oblasti byla vyhledaná v systému NCBI Blast. Systém umožňuje ukázat neshodu v určitých bázích, což odpovídá poloze nějaké mutace nebo polymorfismu v genu (obr. 8).



Obrázek 8: Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6), RefSeqGene (LRG_1369) on chromosome 12; červeným obdélníkem je ukázána poloha polymorfismu rs324015

Zdroj: <https://go.usa.gov/xsgNQ>

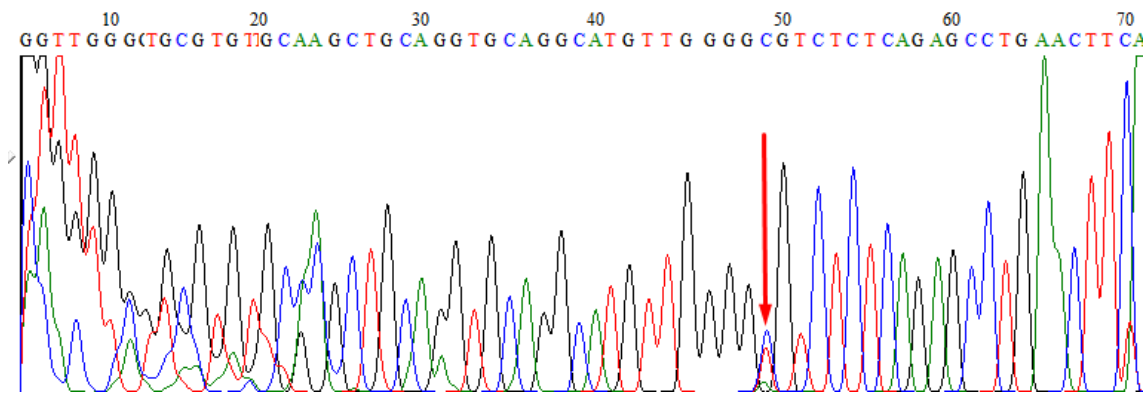
U některých vzorků byl nalezen výskyt další mutace/polymorfismu genu *STAT6*, který byl výrazně přítomnosti dalšího červeného obdélníku (obr. 9). V rámci této bakalářské práce nebyly dal vyhodnoceny.



Obrázek 9: Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6), RefSeqGene (LRG_1369) on chromosome 12. Červenými obdélníky je ukázána poloha polymorfismu rs32401 a další neznámá mutace/polymorfismus

Zdroj: <https://go.usa.gov/xsFaT>

Po rozpoznávání polohy polymorfismu ve sledovaných sekvencích v systému NCBI Blast bylo dal provedeno vlastní určování genotypů v programu BioEdit. Zobrazení dobré sekvence pro hodnocení je uvedeno na obrázku 10. Typizace genotypů byla vykonána odečítáním barevných piků sekvenogramů. V programu byly automaticky nastaveny následující barvy: modrá pro nukleotid C (G) a červená pro T (A). Objevení modrých a červených piků bylo hodnoceno jako homozygotní genotypy C/C (G/G) a T/T (A/A). Spolu překrývající piky byly typizovány jako heterozygotní genotyp C/T (G/A).



Obrázek 10: Příklad sekvence, která je vhodná k odečítání. Červenou šipkou je označena pozice polymorfismu G2964A genu *STAT6*

Zdroj: vlastní

5.4 Analýza sekvenčních dat pro polymorfismus G2964A genu *STAT6*

Celkově bylo pro polymorfismus genu *STAT6* typizováno 20 vzorků DNA od 20 jedinců kavkazské populace. Pro přesnější statistické vyhodnocení bylo plánováno provést analýzu většího počtu vzorků, to však komplikováno pandemické situací. Proto byly během diskuse použity výsledky bakalářské práce roku 2020 autorství Markety Vadlejchové.

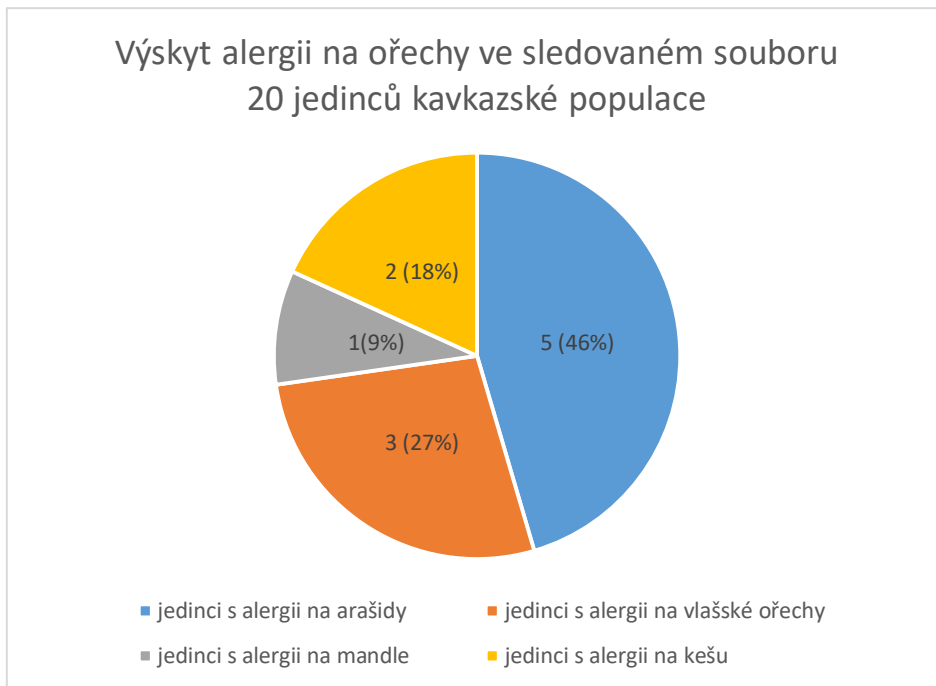
Vyšetřovaný soubor zahrnoval následující: 6 zdravých jedinců, 7 jedinců, kteří trpí alergií na jeden nebo na více druhů ořechů, 4 jedinců mající alergii na ořechy a také trpí atopická onemocnění (případně astma), poslední 3 jedinci trpí jenom atopickým onemocněním a nemají žádnou alergii na ořechy (graf 1).



Graf 1: Distribuce atopických onemocnění ve sledovaném souboru 20 jedinců kavkazské populace

Zdroj: vlastní

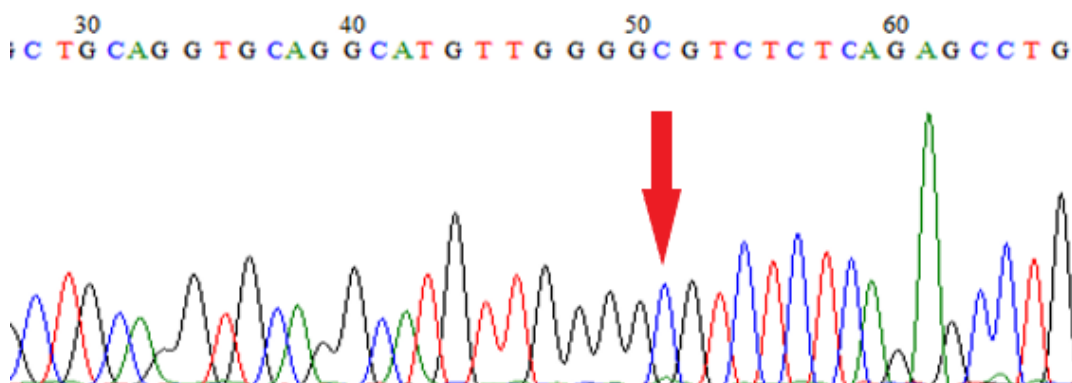
Z lidí, které prokázali alergii na ořechy, 5 jedinci mají alergii na arašídny, 3 jedinci mají alergii vlašské ořechy, 2 jedinci mají alergii na kešu a 1 jedinec trpí alergií na mandle (graf 2).



Graf 2: Výskyt alergií na ořechy ve sledovaném souboru 20 jedinců kavkazské populace

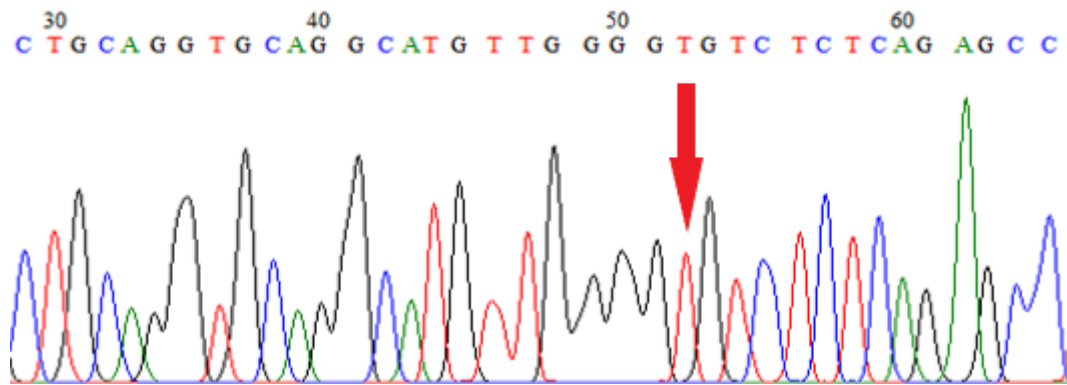
Zdroj: vlastní

Během praktické části bylo při odečítání sekvencí znázorněno 3 různých genotypů: dva homozygotních genotypů G/G a A/A (obr. 11 a 12) a jeden heterozygotní genotyp G/A (obr. 13).



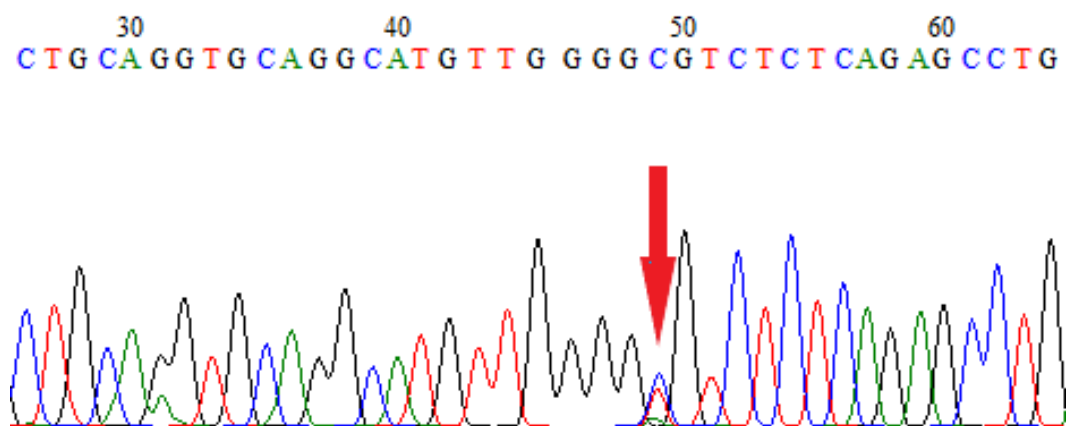
Obrázek 11: Detekovaný homozygotní genotyp G/G genu *STAT6*. Červenou šipkou je označena pozice polymorfismu G2964A.

Zdroj: vlastní



Obrázek 12: Detekovaný homozygotní genotyp A/A genu *STAT6*. Červenou šipkou je označena pozice polymorfismu G2964A.

Zdroj: vlastní



Obrázek 13: Detekovaný heterozygotní genotyp G/A genu *STAT6*. Červenou šipkou je označena pozice polymorfismu G2964A.

Zdroj: vlastní

Zjištěné genotypy u vyšetřovaných jedinců jsou uvedené v tabulce 5.

Tabulka 5: Zastoupení jednotlivých genotypů G/A, G/G a A/A ve sledovaném souboru 20 jedinců kavkazské populace

Číslo jedince	Zjištěný genotyp	Atopické onemocnění
1	G/A	astma, alergie na kešu
2	G/A	alergie na arašídny
3	G/A	žádné
4	G/A	žádné
5	G/A	alergie na mandle
6	G/G	alergie na arašídny
7	G/A	žádné
8	G/A	alergie na vlašské ořechy, arašídny
9	A/A	astma
10	G/A	alergie na vlašské ořechy
11	G/A	astma, alergie na vlašské ořechy, arašídny, kešu
12	G/A	atopická dermatitida
13	G/A	atopická dermatitida, alergie na arašídny
14	G/G	alergie na arašídny
15	G/A	atopická dermatitida
16	G/A	žádné
17	G/A	žádné

18	G/A	žádné
19	G/A	alergie na vlašské ořechy
20	G/A	astma, alergie na arašídy

Zdroj: vlastní

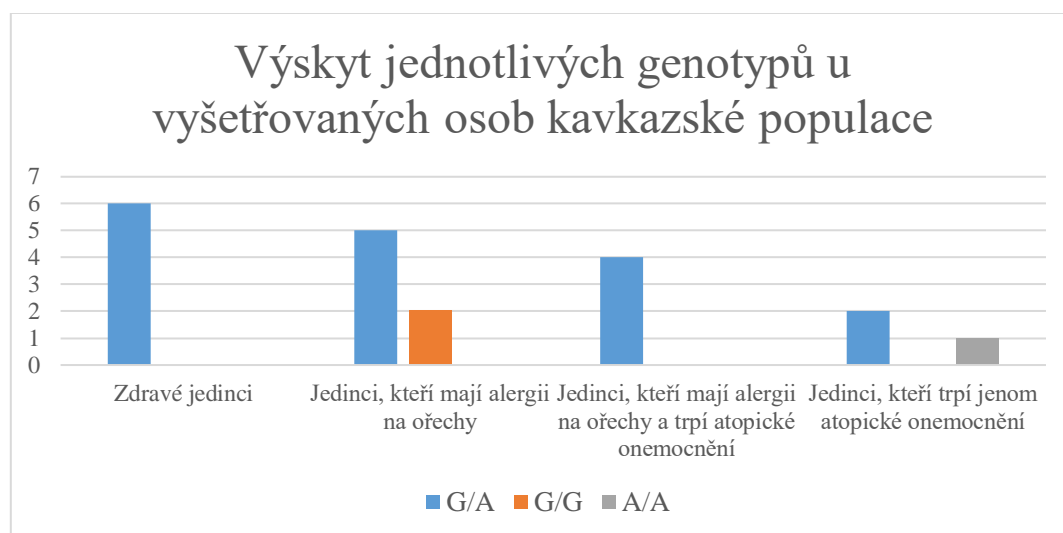
Ze 20 vyšetřovaných jedinců 17 mělo heterozygotní genotyp G/A.

Dva jedince vykazovaly homozygotní genotypy G/G a jeden A/A.

U lidí, kteří netrpí žádné atopické onemocnění, byl zjištěn genotyp G/A ve stoprocentním výskytu. Stejný genotyp G/A se stejnou frekvencí prokázali i jedince, kteří mají alergii na ořechy a atopická onemocnění.

U 7 vyšetřovaných osob, kteří trpí alergií na ořechy, byli nalezeni 2 jedinci s genotypem G/G s alergií na arašídy (28 %). Ze 3 lidí, kteří mají atopická onemocnění a nemají žádnou alergii na ořechy, byl u jednoho jedince trpící astmatem prokázán homozygotní genotyp A/A (33 %) (viz graf 3, tab. 6, tab. 7, tab. 8).

Graf 3: Výskyt jednotlivých genotypů u vyšetřovaných osob kavkazské populace (N = 20).



Zdroj: vlastní

Tabulka 6: Výskyt jednotlivých alel ve sledovaném souboru kavkazské populace (N = 20)

Alela	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
G	21	0,525
A	19	0,475

Zdroj: vlastní

Tabulka 7: Výskyt jednotlivých genotypů ve sledovaném souboru kavkazské populace (N = 20)

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
G/A	17	0,85
G/G	2	0,1
A/A	1	0,05

Zdroj: vlastní

Tabulka 8: Frekvence genotypů a frekvence alel ve sledovaném souboru kavkazské populace (N = 20)

Jedinci	Frekvence genotypů (%)			Frekvence alel	
	G/A	G/G	A/A	G	A
Zdraví jedinci	100 %	0 %	0 %	0,5	0,5
Jedinci, kteří mají alergii na ořechy	72 %	28 %	0 %	0,64	0,36
Jedinci, kteří mají alergii na ořechy a trpí atopické onemocnění	100 %	0 %	0 %	0,5	0,5
Jedinci, kteří trpí jenom atopické onemocnění	66 %	0 %	34 %	0,33	0,66

6 Diskuze

G2964A polymorfismus patří mezi nejběžnějšími polymorfismy v genu *STAT6*. Některé studie posledních třech desetiletí ukázaly korelaci mezi výskytem toho polymorfismu a výskytem astmatických onemocnění, včetně alergií na ořechy. Podle Amoli (2000, 2002) je nejčastějším genotypem v britské populaci genotyp G/A s frekvencí 0,47, přičemž alela G se nejvíce vyskytovala u lidí s atopickými onemocnění (87 % u lidí s alergií na ořechy a u 76 % jedinců, kteří netrpí alergií na ořechy, ale trpí jiným atopickým onemocněním). Jiné studie (Zhu, 2013; Gao, 2000) uvádějí, že v čínské a japonské populaci je výskyt alely A spojen s možností rozvoje astmatu, a to odpovídalo celkovému zvýšení IgE v krvi. U dalšího polymorfismu genu *STAT6*, což je polymorfismus GT s opakováním dinukleotidů, byla také objevena souvislost s rizikem rozvoje astmatu. V britské populaci byla frekvence alely GT₁₆ významně snížena v případech osob s atopickými onemocnění ve srovnání s kontrolními zdravými jedinci (Gao, 2004). Bylo také předpokládáno, že genetické varianty v genu *STAT6* mohou souviset s predispozicí k dětskému astmatu. U dětí japonské populace byl zjištěn významný rozdíl v genotypové frekvenci opakovaného polymorfismu GT mezi kontrolními vzorky a dětskými astmatiky ($p = 0,015$). Frekvence alely s 15 opakováním dinukleotidů byla u dětských astmatiků nižší než u kontrolních vzorků ($p = 0,0047$), zatímco kratší opakované alely (GT₁₂, GT₁₃ a GT₁₄) byly vyšší u dětských astmatiků než u kontrolních vzorků ($p = 0,0064$). Nicméně, nebyl zjištěn významný rozdíl v genotypové frekvenci polymorfismu GT u dospělých (Suzuki, 2004).

V rámci této bakalářské práce byl vyšetřován polymorfismus G2964A genu *STAT6* metodou sekvenování a souvislost s výskytem alergií na ořechy. Stanovení polymorfismu genu *STAT6* bylo provedeno u 20 osob kavkazské populace. Byli vyšetřeni jedinci ve 4 skupinách: zdraví jedinci bez atopických onemocnění, jedinci s atopickými onemocnění a s žádnou alergií na ořechy, jedinci s alergií na ořechy a s žádným atopickým onemocněním a jedinci, kteří trpí alergií na ořechy spolu s nějakým atopickým onemocněním. Před samotným hodnocením sekvenci u vyšetřovaných jedinců, byla provedena izolace DNA metodou buklárního steru z epitelu sliznic, stanovení koncentrace DNA na spektrofotometru, amplifikace DNA metodou PCR, elektroforéza produktů PCR na agarozovém gelu pro hodnocení výsledků amplifikace, enzymatické přečistění

produktů PCR a jejich příprava k sekvenování. Hodnocení získaných sekvenogramů bylo provedeno v programu BioEdit a za pomoci systému NCBI Blast.

Heterozygotní genotypy byly určeny u 17 lidí (85 %), ze kterých 9 má alergii na ořechy (1 na mandle, 2 na kešu, 3 na vlašské ořechy a 3 na arašídny).

Homozygotní varianta genu *STAT6* byla detekována u třech lidí (15 %) ve dvou genotypech. U dvou osob, kteří mají alergii na ořechy, byl prokázán genotyp G/G. U jednoho člověka, který je astmatikem, byl nalezen genotyp A/A.

Celkově byly zjištěny alely s frekvencemi 0,525 pro G a 0,475 pro A, což docela neodpovídá výsledkům studia Amoli (2000), u nichž byly v rámci vyšetření polymorfismu G2964A genu *STAT6* u britské populace dosažené frekvence 0,67 pro G a 0,33 pro A. Nicméně, všechny homozygotní genotypy G/G byly prokázány právě u jedinců s alergií na arašídny, což odpovídá předpokladu ve studiu Amoli (2002) o tom, že alela G by mohla souviset s rizikem vzniku alergii na ořechy.

Diagnostika atopických onemocnění, včetně potravinových alergií, stále představuje vážný problém v oblasti alergologie. Alergie na ořechy patří k nejnebezpečnějším potravinovým alergiím s vysokým rizikem vzniku anafylaxi, která může pak vest k úmrtí, není-li pomoc poskytnuta včas. Proto je důležité provádět přesnou diagnostiku při nejmenším podezření na alergické onemocnění, a když je potřeba, zahájit další léčbu co nejdřív. Za „zlatý standard“ v diagnostice se stále používají imunochemické metody, a to jsou kožní testy a stanovení hladiny specifických IgE protilátek v séru pacienta (Bidat, 2005; Krejssek, 2016).

V této bakalářské práci byly prováděny jiné laboratorní postupy. Bylo zkoumáno, jak může přispět Sangerova metoda ke stanovení alergii na ořechy. Bohužel, vzhledem k současné epidemické situaci nebyl sledovaný soubor moc velký, a proto nebyla zjištěna určitá korelace mezi výskytem jednotlivých genotypu a alergií na ořechy. Z 11 lidí, které mají alergii na ořechy, byl prokázán homozygotní genotyp G/G jenom 2 lidí (18 %). Proto v rámci dosažených výsledků nelze stoprocentní říct, jestli může být používaná genetická metoda vhodná ke stanovení probíhajícího atopického onemocnění (respektive alergii na ořechy).

Pro hlubší pochopení problematiky byly porovnány vlastní získaná data s výsledky výzkumu bakalářské práce roku 2020; autorství Markéta Vadlejšová. Autorka

vyšetřovala polymorfismus G2964A genu *STAT6* jinou metodu. Ve svoje práci prováděla podobné postupy, avšak místo sekvenace úseku používala metodu PCR-RFLP: během praktické části prováděla izolaci DNA z bukálního stěru, stanovení koncentrace DNA v izolátu, amplifikaci DNA metodou PCR s následným restričním štěpením, kontrolu produktů restričního štěpení na gelu. Sekvenovala pouze pro kontrolu tři vzorky (od každého možného genotypu). Autorka vyšetřila 25 vzorků, z nichž 16 procházelo od osob alergických na ořechy. Během hodnocení dosažených výsledků prokázala všechny tři možné genotypy: heterozygotní genotyp G/A u 14 lidí (56 %), homozygotní genotypy G/G u 10 lidí (40 %) a A/A u 1 jedince (4 %). Frekvence jednotlivých alel byla tedy 0,68 pro G a 0,32 pro A. Výsledky se shodovaly s výzkumem Amoli (2002), kde přítomnost alel v britské populaci byla určena s frekvencí 0,67 pro G a 0,33 pro A a genotyp G/G byl spojen s větším výskytem u lidí s alergií na ořechy.

Spojením vlastních výsledků s výsledky Markéty Vadlejchové se trochu pozměnila statistická data, která jsou uvedena v tabulce 9. Celkový sledovaný soubor obsahuje 45 osob, 27 z nich mají alergii na ořechy. Nejčastější genotyp je heterozygotní genotyp G/A (69 %), přičemž u lidí s alergií na ořechy se objevil častěji než u osob bez alergie na ořechy ($f = 0,72$ a $0,67$). Homozygotní varianty genu *STAT6* byly prokázány u 30 % G/G a 3 % A/A jedinců s alergií na ořechy. U osob, které nemají alergii na ořechy, se vyskytovaly homozygotní varianty G/G u 72 % jedinců a A/A u 5 %. Frekvence přítomnosti jednotlivých alel v populaci u osob trpících alergií na ořechy je 0,63 pro alelu G a 0,37 pro alelu A. Poměr frekvencí u osob bez alergie na ořechy ve srovnání s poměrem frekvence alel u lidí s alergií na ořechy se trochu liší: je tedy 0,58 pro alelu G a 0,42 pro alelu A.

Dosažené frekvence se prakticky shodují s výsledky studia Amoli (2002) - 0,61 pro G a 0,39 pro A oproti 0,67 pro G a 0,33 pro A (směrodatná odchylka se rovná 0,03 pro G a A). Nicméně, nelze říct, že frekvence výskytu jednotlivé alely G a homozygotního genotypu G/G byly spojeny s vyšším rizikem vzniku alergií na ořechy. U osob, které netrpí žádnou alergií na ořechy, frekvence výskytu alely G jenom o trochu nižší (0,05). U homozygotních genotypů G/G jedinců je rozdíl také malý: 0,3 u osob s alergií oproti 0,22 u osob nealergických na ořechy.

Co se týká používání metody sekvenování v rámci vyšetření alergií na ořechy, souhlasím s názorem, který byl vyjádřen na konci práce Markéty Vadlejchové. Tato metoda se

nemůže hodit k rutinnímu testování pacientů alergických na ořechy kvůli spotřebě vysokého množství chemikálií, ne vždy bezpečných a cenově dostupných, potřebného vybavení, které nejsou v každé laboratoři.

K diagnostice alergií na ořechy by nejlíp mohly přispět jiná laboratorní a přístrojová vyšetření, například kožní prick testy, stanovení koncentrace specifických IgE proti ořechům. V některých případech může být proveden dvojité slepý orální provokační test s placebem, který je považován za „zlatý standard“ (Žák, 2011).

Tabulka 9: Porovnávání statistických dat dosažených ve vlastní práci a v práci Markéty Vadlejchovy

Genotyp/ alela	Výsledky Markéty Vadlejchové	Vlastní data	Frekvence výskytu genotypu/alely v populaci celkem	Frekvence výskytu genotypu/alely v populaci u osob alergických na ořechy	Frekvence výskytu genotypu/alely v populaci u osob <u>ne</u> alergických na ořechy
G/A	14	17	0,69	0,67	0,72
G/G	10	2	0,27	0,3	0,22
A/A	1	1	0,04	0,03	0,05
G	34	21	0,61	0,63	0,58
A	16	19	0,39	0,37	0,42

Zdroj: vlastní

7 Závěr

V rámci této bakalářské práce došlo k osvojení základních molekulárně biologických metod a praktické zvládnutí těchto metod v laboratoři. Byl proveden postup izolace DNA z bukálního stěru, stanovení koncentrace DNA, amplifikace DNA metodou PCR, kontrola produktů amplifikace pomocí gelové elektroforézy, enzymatické přečištění PCR produktů a následná detekce polymorfismu genu G2964A *STAT6* po sekvenování.

Pro vyšetření polymorfismu G2964A genu *STAT6* bylo provedeno 20 sekvenací. U vyšetřovaných jedinců byly detekovány tři genotypy: 85 % G/A, 10 % G/G a 5 % A/A. Z 11 lidí s alergií na ořechy bylo nejvíce prokázáno heterozygotních genotypů G/A, jenom u dvou lidí byli zjištěni homozygotní genotypy G/G (18 %). Byl také nalezen jeden homozygotní genotyp A/A u člověka trpícím astmatem.

Získané výsledky byly probrány v diskuzi a porovnány s výzkumy minulých let. Byly dosaženy odpovědi na otázky, které byly stanovené na začátku práce.

I když vyšetřovaný soubor nebyl příliš velký, mohly by získané výsledky přispět k další případné práci na tomto tématu, například v rámci dalšího studia.

8 Použitá literatura

1. ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2005. *Základy buněčné biologie*. Praha: Espero. 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
2. AMOLI, M. M., HAND, S., HAJEER, A. H., JONES, K. P., ROLF, S., STING, C., DAVIES, B. H., OLLIER, W. E. R., 2002. Polymorphism in the STAT6 Gene Encodes Risk for Nut Allergy. *Genes and Immunity*, 3 (4), 220-224, doi: 10.1038/sj.gene.6363872.
3. AMOLI, M. M., OLLIER, W., HAJEER A., 2000. A novel PCR-RFLP assay for the detection of a polymorphism in the 3' of STAT6 gene. *Genes & Immunity*, 1(5), 349–350, doi:10.1038/sj.gene.6363684.
4. AMON, W., FARRELL, P. J., 2005. Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Reviews in Medical Virology*, 15(3), 149–156. doi:10.1002/rmv.456.
5. ANSEL, K. M., DJURETIC, I., TANASA, B., RAO A., 2006. Regulation Of Th2 Differentiation And IL-4 Locus Accessibility. *Annual Review of Immunology*, 24(1), 607–656, doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115821.
6. ARI, Ş., ARIKAN, M., 2016. Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future. *Plant Omics: Trends and Applications*, 109–135, doi:10.1007/978-3-319-31703-8_5.
7. ARONICA, M. A., GOENKA, S., BOOTHBY, M., 2000. IL-4-Dependent Induction of BCL-2 and BCL-XL in Activated T lymphocytes Through a STAT6- and PI 3-kinase-independent Pathway. *Cytokine*, 12(6), 578–587, doi:10.1006/cyto.1999.0603.
8. BANERJEE, K., RESAT, H., 2015. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *International Journal of Cancer*, 138(11), 2570–2578, doi:10.1002/ijc.29923.
9. BARBAZUK, W. B., EMRICH, S. J., CHEN, H. D., LI, L., SCHNABLE, P. S., 2007. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing. *The Plant Journal*, 51(5), 910–918. doi:10.1111/j.1365-3113x.2007.03193.x.
10. BEDNÁŘ, J., 2004. *Genetika rostlin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 146 s. ISBN 978-80-7157-814-7.

11. BEDNÁŘ, J., 2005. *Genetika*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 149 s. ISBN 978-80-7157-862-8.
12. BIDAT, É., LOIGEROT, C., 2005. *Alergie u dětí*. Praha: Portál. 148 s. ISBN 80-7178-936-4.
13. BLACKBURN, M. G., 2015. *Nucleid Acids in Chemistry And Biology*. 3rd edition. Great Britain: Royal Society of Chemistry. 503 p. ISBN 0-85404-654-2.
14. BRHEL, P., 2008. *Diagnostika, léčba a prevence průduškového astmatu v České republice*. 1. vydání. Praha: Česká iniciativa pro astma. 120 s. ISBN 978-80-86396-32-3.
15. CANADIAN AGENCY FOR DRUGS AND TECHNOLOGIES IN HEALTH, 2014. *Next Generation DNA Sequencing: A Review of the Cost Effectiveness and Guidelines* [online]. [cit. 2020-10-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK274072/>
16. CHEN, H., SUN, H., YOU, F., SUN, W., ZHOU, X., CHEN, L., YANG J., WANG Y., TANG H., GUAN Y., XIA W., GU J., ISHIKAWA H., GUTMAN D., BARBER G., QIN Z., JIANG, Z., 2011. Activation of STAT6 by STING Is Critical for Antiviral Innate Immunity. *Cell*, 147(2), 436–446, doi:10.1016/j.cell.2011.09.022.
17. FAKRUDDINI, M. D., CHOWDHURY, A., HOSSAIN, M. D. N., KHANJADA, S. B. M., MAZUMDAR, R. M., 2012. Pyrosequencing- Principles And Applications. *International Journal of Life science & Pharma Research*, 2 (2), 65-73, ISSN 2250-0480.
18. FLEISCHMANN, R., ADAMS, M., WHITE, O., CLAYTON, R., KIRKNESS, E., KERLAVAGE, A., MCKENNEY, K., SUTTON, G., FITZHUGH, W., FIELDS, C., GOCAYNE, J. D., SCOTT, J., SHIRLEY, R., LIU, L., GLODEK, A., KELLEY, J. M., WEIDMAN, J. F., PHILLIPS, C. A., SPRIGGS, T., HEDBLUM, E., COTTON, M. D., UTTERBACK, T. R., HANNA, M. C., NGUYEN, D. T., SAUDEK, D. M., BRANDON, R. C., FINE, L. D., FRITCHMAN, J. L., FUHRMANN, J. L., GEOGHAGEN, N. S. M., GNEHM, C. L., MCDONALD, L. A., SMALL, K. V., FRASER, C. M., SMITH, H. O., VENTERT, J. C., 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), 496–512, doi:10.1126/science.7542800.
19. GAO, P. S., 2004. Variation in dinucleotide (GT) repeat sequence in the first exon of the STAT6 gene is associated with atopic asthma and differentially regulates the

- promoter activity in vitro. *Journal of Medical Genetics*, 41(7), 535–539, doi:10.1136/jmg.2003.015842.
20. GAO, P-S., ROBERTS, M. H., ARINOBU, Y., AKAIWA M., ENOMOTO T., DAKE Y., KAWAI, M., SASAKI, S., HAMASAKI, N., IZUHARA, K., SHIRAKAWA, T., HOPKIN, J. M., 2000. Variants of STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma. *Journal of Medical Genetics*, 37(5), 380a–382, doi:10.1136/jmg.37.5.380a.
 21. GARCIA, R., JOVE, R., 1998. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *Journal of Biomedical Science*, 5(2), 79–85, doi:10.1007/bf02258360.
 22. GODAVA, M., VRTEL, R., VODICKA, R., 2013. STAT6 - Polymorphisms, Haplotypes and epistasis in relation to atopy and asthma. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 157(2), 172-180, doi: 10.5507/bp.2013.043.
 23. GOFFEAU, A., BARRELL, B. G., BUSSEY, H., DAVIS, R. W., DUJON, B., FELDMANN, H., F. GALIBERT, J. D. HOHEISEL, C., JACQ, M., JOHNSTON, E. J. LOUIS, H. W., MEWES, Y., MURAKAMI, P., PHILIPPSSEN, H., TETTELIN, OLIVER, S. G., 1996. Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546–567, doi:10.1126/science.274.5287.546.
 24. GOHARY, R. M. E., WAGIH, A. A., HAMOUDA, H. E., MELEGY, S. M. E., & ROWISHA, M. A., 2018. Association of STAT6 rs324011 Gene Polymorphism with Susceptibility of Atopic Bronchial Asthma in Egyptian Children. *Biochemistry & Molecular Biology Journal*, 04(01), 1-7, doi:10.21767/2471-8084.100055.
 25. HAROUN-DÍAZ, E., AZOFRA, J., GONZÁLEZ-MANCEBO, E., DE LAS HERAS, M., PASTOR-VARGAS, C., ESTEBAN, V., VILLALBA, M., DÍAZ-PERALES, A., CUESTA-HERRANZ, J., 2017. Nut Allergy in Two Different Areas of Spain: Differences in Clinical and Molecular Pattern. *Nutrients*, 9(8), 909, doi: 10.3390/nu9080909.
 26. HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., ŠPÍŠEK, R., 2017. *Základy imunologie*. 6. vydání. Praha: Juhaňák S. – Triton. 297 s. ISBN 978-80-7553-250-3.
 27. HRABÁK, 2017. *Seminář sekvenování komplikovaných úseků DNA technologií SMRT* [online]. [cit. 2020-10-18]. Dostupné z: <http://www.biomedic-plzen.cz/484-seminar-sekvenovani-komplikovanych-useku-dna-technologie-smrt>

28. ILLUMINA, INC., 2015. *Explore Illumina sequencing technology. Massively parallel sequencing with optimized SBS chemistry* [online]. [cit. 2020-10-23]. Dostupné z: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html>
29. JONES, M. K., ANKENY, R. A., COOK-DEEGAN, R., 2018. The Bermuda Triangle: The Pragmatics, Policies, and Principles for Data Sharing in the History of the Human Genome Project. *Journal of the History of Biology*, 51(4), 693–805, doi:10.1007/s10739-018-9538-7.
30. KOČÁREK, E., 2008. *Genetika*. Mníšek pod Brdy: Scientia. 212 s. ISBN 978-80-86960-36-4.
31. KOLÍSKO, M., 2017. Moderní metody sekvenování DNA. *Živa*, 3/2017, 73-76.
32. KREJSEK, J., 2004. *Klinická imunologie*. 1. vydání. Hradec Králové: Nucleus HK. 941 s. ISBN-80-86225-50-X.
33. KREJSEK, J., ANDRÝS, C., KRČMOVÁ, I., 2016. *Imunologie člověka*. 1. vydání. Hradec Králové: Garamon. 496 s. ISBN-13:978-80-86472-74-4.
34. KŘEMEN, J., 1998. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Praha: Karolinum. 177 s. ISBN 80-7184-504-3.
35. KUCIEL, J., BEDNÁŘ, J., URBAN, T., 2004. *Genetika zemědělských produktů (vybrané kapitoly k přednáškám)*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 135 s. ISBN 80-7157-767-7.
36. KUDR, J., RUTTKAY-NEDECKÝA, B., ADAMA, V., KIZEKA, R., 2014. *Nanopóry jako moderní nástroj pro DNA sekvenování* [online]. [cit. 2020-10-23]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/01-nanopores-as-a-modern-tool-for-DNA-sequencing.pdf
37. KULSKI, J. K., 2016. Next Generation Sequencing – Advances, Applications and Challenges, doi:10.5772/61964.
38. LEVY, D. E., DARNELL, J. E., 2002. STATs: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 651–662, doi:10.1038/nrm909.
39. LI, J., RODRIGUEZ, J. P., NIU, F., PU, M., WANG, J., HUNG, L.-W., SHAO, Q., ZHU, Y., DING, W., LIU, Y., DA, Y., YAO, Z., YANG, J., ZHAO, Y., WEI, G.-H., CHENG, G., LIU, Z.-J., OUYANG, S., 2016. Structural basis for DNA recognition by STAT6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(46), 13015–13020, doi:10.1073/pnas.1611228113.

40. LIU, L., LI, Y., LI, S., HU, N., HE, Y., PONG, R., LIN, D., LU, L., LAW, M., 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–11, doi:10.1155/2012/251364.
41. MARDIS, E. R., 2013. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6(1), 287–303, doi:10.1146/annurev-anchem-062012-092628.
42. MARTINEZ, F. O., HELMING, L., GORDON, S., 2009. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 451–483, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132532.
43. MENDEL, Y., KAISERMANN, J., PAWLOWSKI, M., 2020. *Techniky molekulární biologie I*. Spain: Cambridge Stanford Books. 302 p.
44. MOREY, M., FERNÁNDEZ-MARMIESSE, A., CASTIÑEIRAS, D., FRAGA, J. M., COUCE, M. L., COCHO, J. A., 2013. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Molecular Genetics and Metabolism*, 110 (1-2), 3–24, doi:10.1016/j.ymgme.2013.04.024.
45. MUDR. VERNEROVÁ, E., 2012. *Alergie a astma, současný stav poznání a léčby* [online]. [cit. 2020-10-27]. *Interní medicína pro praxi*, 14(2), 55-58. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/02/03.pdf>
46. NEČAS, O., 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. Jinočany: H&H. 554 s. ISBN 80-86022-46-3.
47. NOBEL MEDIA AB, 2020. *The Nobel Prize in Chemistry* [online]. [cit. 2020-10-6]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1980/press-release/>
48. NOVÁK, J., NOVÁKOVÁ, H., 2010. *Alergenní rostliny*. Praha: Knižní klub. 264 s. ISBN 978-80-242-2591-3.
49. PAPOUŠEK, I., 2018. *Sekvenování příští generace (Next Generation Sequencing, NGS). Molekulární biologie v hygieně potravin – Molekulárně biologická analýza potravin* [online]. [cit. 2020-10-15]. Dostupné z: https://fvhe.vfu.cz/files/MBHP_2019_07.pdf
50. PATEL, B. K. R., KECK, C. L., O'LEARY, R. S., POPESCU, N. C., & LAROCHELLE, W. J., 1998. Localization of the Human Stat6 Gene to Chromosome 12q13.3–q14.1, a Region Implicated in Multiple Solid Tumors. *Genomics*, 52(2), 192–200, doi:10.1006/geno.1998.5436.
51. PAZDERNIK, N., 2017. *Storing oligos: 7 things you should know* [online]. [cit. 2020-12-18]. Dostupné z:

- <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/storing-oligos-7-things-you-should-know>
52. POLLACK, A., 2003. *Company Says It Mapped Genes of Virus in One Day* [online]. [cit. 2020-10-13]. Dostupné z: <https://www.nytimes.com/2003/08/22/business/company-says-it-mapped-genes-of-virus-in-one-day.html>
 53. POSPIŠILOVÁ, Š., TICHÝ, B., MAYER, J., 2009. Sekvenování lidského genomu – technologie nové generace aneb budeme rutinně sekvenovat lidské genomy? [online]. [cit. 2020-10-23]. *Časopis lékařů českých 2009*, 148 (7). Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/podzim2010/C7188/um/CLC-2009-7-296.pdf>
 54. PROBER, J., TRAINOR, G., DAM, R., HOBBS, F., ROBERTSON, C., ZAGURSKY, R., COCUZZA, A. J., JENSEN, M. A., BAUMEISTER, K., 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, 238(4825), 336–341, doi:10.1126/science.2443975.
 55. QUAIL, M. A., KOZAREWA, I., SMITH, F., SCALLY, A., STEPHENS, P. J., DURBIN, R., SWERDLOW, H., TURNER, D. J., 2008. A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nature Methods*, 5(12), 1005–1010, doi:10.1038/nmeth.1270.
 56. QUAIL, M., SMITH, M. E., COUPLAND, P., OTTO, T. D., HARRIS, S. R., CONNOR, T. R., BERTONI, A., SWERDLOW, H., P., GU, Y., 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13(1), 341, doi:10.1186/1471-2164-13-341.
 57. RAVISHANKAR, B. V., 2017. *Gene Cloning and Genomics (Principles and Applications)*. USA: John Wiley & Sons. 336 p. ISBN 9781387155927.
 58. ROSYPAL, S., 2003. *Nový přehled biologie*. Mníšek pod Brdy: Scientia. 797 s. ISBN 978-80-86960-23-4.
 59. SACCONI, C., PESOLE, G., 2005. *Handbook of Comparative Genomics: Principles and Methodology*. Italy: Wiley-Liss. 442 p. ISBN 978-0-471-32641-0.
 60. SAIKI, R., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K., HORN, G., ERLICH, H., ARNHEIM, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350–1354, doi:10.1126/science.2999980.

61. SANGER, F., AIR, G. M., BARRELL, B. G., BROWN, N. L., COULSON, A. R., FIDDES, J. C., HUTCHISON, C. A., SLOCOMBE, P. M., SMITH, M., 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*, 265(5596), 687–695, doi:10.1038/265687a0.
62. SANGER, F., COULSON, A. R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94 (3), 441–8, doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2.
63. SHIMODA, K., VAN DEURSEN, J., SANGSTER, M. Y., SARAWAR, S. R., CARSON, R. T., TRIPP, R. A., CHU, C., QUELLE, F. W., NOSAKA, T., VIGNALI, D. A., DOHERTY, P. C., GROSVELD, G., PAUL, W. E., IHLE, J. N., 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*, (380), 630–633, doi:10.1038/380630a0.
64. SMITH, L. M., SANDERS, J. Z., KAISER, R. J., HUGHES, P., DODD, C., CONNELL, C. R., HEINER, C., KENT, S. B. H., HOOD, L. E., 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321(6071), 674–679, doi:10.1038/321674a0.
65. SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J., 2017. *Genetika*. 2. vydání. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-8613-5.
66. ŠPIČÁK, H., PANZNER, P., 2004. *Alergologie*. Praha: Galén. 348 s. ISBN 80-7262-265-X.
67. STRAITON, J., FREE, T., SAWYER, A., MARTIN, J., 2019. From Sanger sequencing to genome databases and beyond. *Future Science*, 66 (2), 60–63, doi:10.2144/btn-2019-0011.
68. SUZUKI, M., ARAKAWA, H., KOBAYASHI, Y., TAMURA, K., MOCHIZUKI, H., TOKUYAMA, K., TAMARI, M., MAO, X.-Q., SHIRAKAWA, T., IZUHARA, K. AND MORIKAWA, A., 2004. Signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6) variants in childhood and adult asthma. *Allergology International*, 53(3), 241–244, doi.org/10.1111/j.1440-1592.2004.00340.x.
69. SZANTO, A., BALINT, B. L., NAGY, Z. S., BARTA, E., DEZSO, B., PAP, A., SZELES, L., POLISKA, S., OROS, M., EVANS, R.M., BARAK, Y., SCHWABE, J., NAGY, L., 2010. STAT6 Transcription Factor Is a Facilitator of the Nuclear Receptor PPAR γ -Regulated Gene Expression in Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*, 33(5), 699–712, doi:10.1016/j.immuni.2010.11.009.

70. TAKEDA, K., TANAKA, T., SHI, W., MATSUMOTO, M., MINAMI, M., KASHIWAMURA, S., NAKANISHI K., YOSHIDA N., KISHIMOTO T., AKIRA, S., 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*, 380(6575), 627–630, doi:10.1038/380627a0.
71. THOMPSON, J. F., STEINMANN, K. E., 2010. Single Molecule Sequencing with a HeliScope Genetic Analysis System. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 7, Unit 7.10, doi:10.1002/0471142727.mb0710s92.
72. TURNER, P. J., GOWLAND, M. H., SHARMA, V., IERODIAKONOU, D., HARPER, N., GARCEZ, T., PUMPHREY, R., BOYLE, R. J., 2015. Increase in anaphylaxis-related hospitalizations but no increase in fatalities: An analysis of United Kingdom national anaphylaxis data, 1992-2012. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(4), 956-963, doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.021.
73. ÚSTAV BIOLOGIE LF UP, 2020. *Sekvenování DNA* [online]. [cit. 2020-10-20]. Dostupné z: <https://biologie.upol.cz/metody/Sekvenovani%20DNA.html>
74. VOELKERDING, K., DAMES, S. A., DURTSCHI, J. D., 2009. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry*, 55 (4), 641–658, doi:10.1373/clinchem.2008.112789.
75. XUE, C., XIE, J., ZHAO, D., LIN, S., ZHOU, T., SHI, S., SHAO, X., LIN, Y., ZHU, B., CAI, X., 2016. The JAK/STAT3 signalling pathway regulated angiogenesis in an endothelial cell/adipose-derived stromal cell co-culture, 3D gel model. *Cell Proliferation*, 50(1), 1-10. e12307, doi:10.1111/cpr.12307.
76. YAO, Y., LI, W., KAPLAN, M. H., CHANG C. H., 2005. Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(12), 1899–1903, doi:10.1084/jem.20050324.
77. YU, W., FREELAND, D. M. H., NADEAU, K. C., 2016. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 16(12), 751–765, doi: 10.1038/nri.2016.111.
78. ŽÁK, A., PETRÁŠEK, J., 2011. *Základy vnitřního lékařství*. Praha: Galen. 523 s. ISBN 978-80-7262-697-7.
79. ZHU, L., ZHU, Q., ZHANG, X., WANG, H., 2013. The Correlation Analysis of Two Common Polymorphisms in STAT6 Gene and the Risk of Asthma: A Meta Analysis. *PLoS ONE*, 8(7), 1-7, p.e67657.

9 Seznam zkratek

AAM	alternativně aktivované makrofagy
ATP	adenosintrifosfát
BCL2L1	Bcl-2-like protein 1
BCL-X	B-cell lymphoma antiapoptotic protein
BE pufr	Borate EDTA pufr
bp	base pair
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxyadenosintrifosfát
ddATP	dideoxycytidintrifosfát
ddCTP	dideoxycytidintrifosfát
ddGTP	dideoxyguanosintrifosfát
ddTTP	dideoxythymidintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfáty
dTTP	dideoxyribunukleosidové trifosfáty
EGF	epidermální růstový faktor
FGF	fibroblastový růstový faktor
Gb	gigabyte
HLA	lidský leukocytární antigen
IgE	imunoglobulin třídy E
IgG	imunoglobulin třídy G
IgM	imunoglobulin třídy M
IL	interleukin
JAK	Janus-kináza
kbp	kilo-base pair
lysU	lysine-tRNA ligase
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MHC	hlavní histokompatibilní komplex

N/A	not available (nedostupné)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	next generation sequencing
p	frekvence
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	platelet derived growth factor
pH	vodíkový exponent
PPAR- γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPi	pyrofosfát
PyMT	the polyomavirus middle T antigen
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
rSAP	shrimp alkaline phosphatase
SMRT	sekvenování jedné molekuly DNA v reálném čase
SOLiD	sequencing by oligonucleotide ligation and detection
ssDNA	jednovláknová DNA
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tb	terabáze
TE pufr	Tris / EDTA pufr
Th	pomocný T lymfocyt
tRNA	transferová RNA
UV	ultrafialové
v-Abl	oncogene transduced by Abelson murine leukemia virus
v-Fps	tyrosine-protein kinase transforming protein Fps
v-Sis	PDGF-related-transforming protein sis
v-Src	tyrosine-protein kinase transforming protein Src
ZMWs	zero-mode waveguides