



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Vyšetření laktóзовé intolerance metodou sekvenování**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Petra Javůrková

**Vedoucí práce:** Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2019

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Vyšetření laktózové intolerance metodou 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. 2019

.....

### **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnovala. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během studia.

# Vyšetření laktózové intolerance metodou sekvenování

## Abstrakt

Laktózová intolerance patří mezi nejčastější potravinové intolerance. Je způsobena úbytkem enzymu laktázy v epitelu tenkého střeva, což vede k nedostatečnému zpracování laktózy přijaté potravou a jejímu hromadění. Úbytek laktázy může být buď vrozený, primární nebo sekundární. První dva zmíněné typy jsou podmíněny geneticky. Velký zájem o tuto problematiku v posledních letech vedl k identifikaci polymorfismů, které jsou za laktózovou intoleranci zodpovědné.

V evropské populaci se vyskytují dva nejvýznamnější polymorfismy asociované s laktózovou intolerancí: C/T-13910 a G/A-22018. Patří tedy k prakticky jediným vyšetřovaným polymorfismům v naší populaci. Každý známý SNP je označen dle NCBI identifikačním číslem (ID), podle kterého může být identifikován a dohledán v genových databázích, odborných publikacích apod. Polymorfismus C/T-13910 je dle NCBI označován kódem rs4988235 a G/A-22018 kódem rs182549. Zatímco ale o dopadu homozygotního i heterozygotního genotypu na jedince v obou polymorfismech víme, v odborné literatuře se téměř nelze dočíst o kombinovaném genotypu.

V praktické části této bakalářské práce jsem se proto zaměřila mimo jiné na jedince, kteří jsou homozygotní pouze v jednom z polymorfismů. Všichni pacienti byli vybráni na základě předběžných výsledků získaných pomocí metody PCR-RFLP a byli znovu vyšetřeni druhou nezávislou metodou, sekvenováním. Soubor tvořilo celkem 20 vzorků s různými genotypy, z nichž poloviční zastoupení měl právě genotyp kombinovaný.

Na základě porovnání výsledků získaných metodou sekvenování a metodou PCR-RFLP byly zjištěny neshody u 20 % vzorků. Po porovnání obou výše zmíněných diagnostických přístupů v diskusi jsem zhodnotila metodu sekvenování jako spolehlivější, na straně druhé je tato metoda náročnější na technické vybavení laboratoře a je také nákladnější než metoda PCR-RFLP. Také z tohoto důvodu se sekvenování pro rutinní diagnostiku laktózové intolerance nepoužívá.

## Klíčová slova

Laktózová intolerance; *LCT*; *MCM6*; polymorfismus C/T-13910; polymorfismus G/A-22018; Sangerovo sekvenování; PCR-RFLP

## **Examination of lactose intolerance by DNA sequencing**

### **Abstract**

Lactose intolerance is one of the most common food intolerances. It is caused by decrease of lactase enzyme in the small intestine epithelium, which leads to insufficient lactose metabolism and its accumulation. Lactase loss may be congenital, primary or secondary. The first two types are genetically conditioned. Large interest of this issue in the last few years has led to identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) which are associated with lactose intolerance.

Within European population, two most significant polymorphisms keep occurring: C/T-13910 and G/A-22018. Owing to the fact, these are practically the only ones that are examined in European population. Each SNP is identified by NCBI and has its own identification number (ID), by which it can be identified and traced in gene databases, professional publications, etc. Polymorphism C/T-13910 is coded as rs4988235 and G/A-22018 as rs182549. While the impact of homozygous and heterozygous genotypes in both polymorphisms on individuals is widely known, there is very little information about the combined genotype in the professional literature.

In the practical part of the bachelor thesis I focused beside other analysis on individuals who are homozygous only in one of the polymorphisms. All patients were firstly selected based on preliminary results obtained by PCR-RFLP method and then re-examined by another independent method, known as sequencing. The final compilation consisted of 20 samples with different genotypes, in half of which combined genotypes were presented.

Based on comparison of sequencing results and PCR-RFLP results, some discrepancies were found in 20 % of presented samples. After comparing both mentioned diagnostic approaches in the discussion, I have evaluated the sequencing method more reliable. On the other hand, sequencing method is more demanding in terms of laboratory equipment and is also more expensive than the PCR-RFLP method. For this reason, sequencing is not used for routine diagnosis of lactose intolerance.

### **Key words**

Lactose intolerance; *LCT*; *MCM6*; polymorphism C/T-13910; polymorphism G/A-22018; Sanger sequencing; PCR-RFLP

## Obsah

1	Úvod .....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Charakteristika laktóзовé intolerance .....	10
2.1.1	Laktóza.....	10
2.1.2	Laktáza.....	11
2.1.3	Osud laktózy při laktóзовé toleranci .....	12
2.1.4	Osud laktózy při laktóзовé intoleranci .....	13
2.1.5	Laktóзовá intolerance vs. alergie na bílkovinu kravského mléka .....	15
2.1.6	Syndrom dráždivého střeva .....	15
2.2	Druhy laktóзовé intolerance .....	15
2.2.1	Vrozený deficit .....	15
2.2.2	Primární deficit .....	16
2.2.3	Sekundární deficit .....	16
2.3	Genetická podstata .....	16
2.3.1	Mutace v evropské populaci .....	17
2.3.2	Další varianty polymorfismů .....	18
2.4	Historie .....	19
2.5	Prevalence .....	19
2.6	Hypotézy vzniku laktóзовé tolerance .....	20
2.6.1	Kulturně-historická hypotéza.....	20
2.6.2	Koevoluce genově kulturní .....	21
2.6.3	Asimilace vápníku .....	21
2.7	Metody vyšetření LI .....	22
2.7.1	Expoziční test.....	22
2.7.2	Biopsie .....	22
2.7.3	Laktóзовý toleranční test.....	23
2.7.4	Dechový vodíkový test .....	23
2.8	Genetické testování .....	24
2.8.1	PCR.....	24
2.8.2	Reverzní hybridizace .....	27
2.8.3	Sekvenování.....	28
2.9	Léčba .....	30
2.9.1	Snížení příjmu laktózy .....	30
2.9.2	Náhrada mléčných výrobků a alternativní zdroje živin .....	30

2.9.3	Enzymová substituce .....	31
2.9.4	Dostatek vápníku a vitamínu D .....	31
2.9.5	Vliv probiotik.....	32
3	Cíle práce a hypotézy .....	33
4	Praktická část.....	34
4.1	Seznam použitých přístrojů.....	34
4.2	Izolace DNA.....	35
4.2.1	Pracovní postup izolace .....	36
4.3	Měření koncentrace.....	37
4.3.1	Pracovní postup.....	37
4.4	PCR reakce.....	38
4.4.1	Postup PCR reakce pomocí MyTaq DNA polymerase .....	38
4.4.2	Postup PCR reakce pomocí PCR BIO HS Taq Mix .....	40
4.5	Elektroforéza na gelu .....	41
4.5.1	Pracovní postup.....	42
4.5.2	Vyhodnocení PCR produktu .....	43
4.6	PCR-RFLP .....	43
4.6.1	Pracovní postup.....	44
4.6.2	Vyhodnocení .....	44
4.7	Sekvenování .....	46
4.7.1	Přečištění PCR produktu.....	46
4.7.2	Závěrečná příprava vzorků pro sekvenování .....	47
4.7.3	Vyhodnocení .....	48
5	Výsledky.....	51
5.1	Soubor vzorků .....	52
5.2	Vyhodnocení sekvencí .....	53
5.2.1	Polymorfismus C/T-13910 .....	53
5.2.2	Polymorfismus G/A-22018.....	54
5.2.3	Výsledky pro oba sledované polymorfismy .....	56
5.3	Výsledky jiných molekulárně-biologických metod a jejich porovnání .....	57
5.3.1	Výsledky pro oba sledované polymorfismy .....	58
6	Diskuse .....	61
7	Závěr.....	67
8	Seznam použitých zdrojů .....	69
9	Přílohy .....	76

10	Seznam obrázků.....	87
11	Seznam tabulek.....	88
12	Seznam zkratek.....	89



## 1 Úvod

Mezi nejvýznamnější potravinovou intoleranci patří intolerance laktózy (LI), která je způsobena nedostatkem, případně úplným chyběním enzymu laktázy v tenkém střevě. Podle toho, kdy v průběhu života k úbytku laktázy dochází, se LI rozděluje na primární, sekundární a vrozenou. Zatímco vrozený nedostatek laktázy je poměrně raritní, nejčastěji se lze setkat s intolerancí primární. Oba tyto typy jsou geneticky podmíněné. Sekundární intolerance vzniká v důsledku jiného onemocnění a po odstranění primární příčiny je možné její vymizení.

V současné době se k diagnostice využívá několik rozmanitých metod. Každá má jiné přednosti a samozřejmě téměř u všech lze nalézt okolnosti, které mohou vést k diskrepancím. Invazivní metodou je např. biopsie tenkého střeva, umožňující odhalení sekundární intolerance. Pro přesné stanovení hladiny enzymu v tenkém střevě však již spolehlivá není. Dechový vodíkový test je méně invazivní, nejčastěji používaný zejména pro jeho jednoduchost, avšak výsledek může být ovlivněn např. i kouřením před provedením testu. Genetické testování je sice dražší, ale umožňuje potvrdit či vyvrátit, o jaký typ intolerance se jedná.

V populaci je povědomí o intolerancích a jejich průběhu menší, než je tomu u alergií. Zatímco u alergií dochází k projevům velmi brzy po setkání s alergenem, u intolerancí tomu tak není. Příznaky se projevují až po delší době a jsou jiného charakteru než ty alergické. Nelze se pak divit, že většina mírnějších příznaků je během života přehlížena a vlastní intolerance je diagnostikována až později v životě, zdali vůbec.

Pro pacienty s laktózovou intolerancí je však současná doba příznivější než dříve. V souvislosti se stále více rozšířeným povědomím o této intoleranci jsou dostupné bezlaktózové produkty téměř ve všech supermarketech, a to v mnoha různých variantách. Laktózová intolerance není život ohrožující nemoc, a také není za nemoc považována. Kromě prvních pár týdnů po stanovení diagnózy není po zaběhnutí si vlastního režimu pacienta a dodržení vyváženosti stravy narušení běžného života nutné.

## 2 Teoretická část

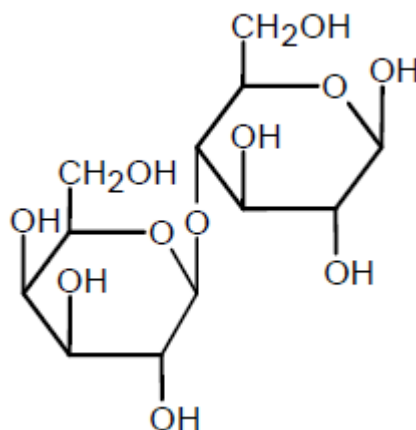
### 2.1 Charakteristika laktóзовé intolerance

Laktóзовá intolerance, jinak také označována jako nesnášenlivost mléčného cukru, hypolaktázie či laktázová malabsorbce, postihuje až 70 % světové populace a řadí se tak k nejčastějším potravinovým nesnášenlivostem (Fritzscheová, 2015; Fuchs, 2016).

Člověk, který trpí laktóзовou intolerancí, není schopen strávit mléčný cukr (laktóзу) a to vede k typickým zažívacím obtížím. Počet pacientů, kteří přicházejí k lékařům s diagnózou laktóзовé intolerance v posledních letech vzrostl. Jedním z důvodů může být fakt, že je laktóзовou intolerancí postiženo stále více lidí. Druhým, že roste informovanost jak lékařů, tak široké veřejnosti o laktóзовé intoleranci, a proto obě tyto skupiny věnují trávicím obtížím větší pozornost (Fritzscheová, 2015).

#### 2.1.1 Laktóза

Z chemického hlediska je laktóза (obr. 1) sacharid, který se přirozeně vyskytuje pouze v savčím mléce, jeho množství je zanedbatelné v mléce některých mořských savců (Lomer et al., 2007). Ve své původní podobě disacharidu je laktóза pro organismus bez užitku, pro kvalitní zužitkování je nutné její rozštěpení na jednoduché sacharidy – glukóзу a galaktóзу. To zajišťuje enzym laktáза, nacházející se v tenkém střevě (Fritzscheová, 2015). Po štěpení následuje transport jednotlivých monosacharidů skrz buněčnou membránu. Glukóза je využita jako zdroj energie, galaktóза tvoří základ glykolipidů a glykoproteinů. (Lomer et al., 2007).



**Obrázek 1:** Struktura laktóзы. Zdroj: vlastní

## Zdroje laktózy

Přirozeným zdrojem laktózy je savčí mléko a výrobky z něj (Fojík et al., 2013). Vzhledem k tomu, že mléko v prvních týdnech života tvoří jediný zdroj potravy pro kojence, je životně důležitým zdrojem energie. Kombinace různých živin je nastavena pro potřeby daného kojence (Fritzscheová, 2015). Složení vybraných savčích mlék je uvedeno v tabulce 1.

**Tabulka 1:** Druhy mlék a jejich složení (v %)

Druh mléka	Voda	Bílkovina	Tuk	Mléčný cukr	Minerální látky
<b>Mateřské mléko</b>	87,6	1,2	1,2	7,1	0,2
<b>Kravné mléko</b>	87,5	3,3	3,8	4,7	0,7
<b>Kozí mléko</b>	86,6	3,6	4,2	4,8	0,8
<b>Ovčí mléko</b>	83,9	5,2	6,2	4,2	0,9
<b>Kobylí mléko</b>	90,0	2,0	1,1	7,0	0,4
<b>Buvolí mléko</b>	82,7	4,5	8,0	4,7	0,8

Přepočováno podle Kopáčka (2014)

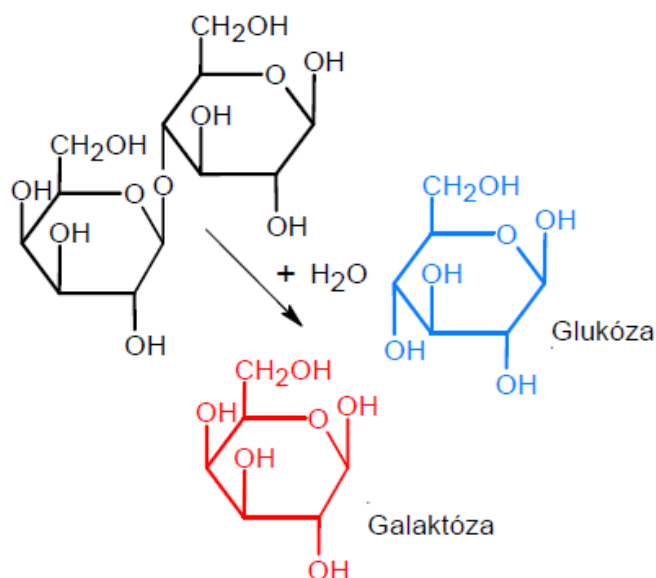
Podstatné rozdíly v obsahu laktózy mají jednak výše zmíněné druhy mlék, ale také mléčné výrobky vyrobené z nich (jogurt, máslo, kefír apod.). Velmi málo laktózy obsahují zejména fermentované mléčné výrobky jako je kefír, podmásli, jogurty, protože mléčný cukr v nich obsažený již zpracovaly bakterie mléčného kvašení (Kramer-Priesch a Kiefer, 2009).

Při dodržování dietních opatření je důležité zohlednit přítomnost laktózy i jinde než pouze tam, kde se vyskytuje přirozeně. Mimo jiné může být obsažena i v některých lécích jako plnidlo, případně se užívá v potravinářském průmyslu jako přísada ve zpracovávaných potravinách (Fojík et al., 2013).

### 2.1.2 Laktáza

Enzym laktáza, známý také jako laktáza-phlorizin hydroláza (LPH), patří mezi  $\beta$ -galaktosidázy (Lomer et al., 2007). Jedná se o jedinečný enzym, protože má dvě aktivní složky v rámci jednoho polypeptidového řetězce. Jedna hydrolyzuje laktózu (obr. 2), druhá phlorizin. Zatímco phlorizin je kompetitivním inhibitorem laktózy, naopak tomu tak není (Campbell et al., 2005).

Laktáza je přímo aktivována na sliznici tenkého střeva, kam se dostává procesem zrání z hlubších vrstev. Aktivaci zajišťuje pankreatický enzym trypsin (Zecca et al., 1998).



**Obrázek 2:** Štěpení laktózy na glukózu a galaktózu. Zdroj: vlastní

### **Aktivita laktázy během života**

Organismus nenarozených dětí je připravován na trávení laktózy již během těhotenství. Aktivita laktázy se rozvíjí už od 23. týdne těhotenství a v této době tvoří asi 10 % pozdějšího maxima (Fritzscheová, 2015). Toto maximum dle Fojíka et al. (2013) nastává ve 34. týdnu po narození.

Nezralé děti nemají absorpci laktózy kompletní, a proto, pokud vůbec jejich nezralost umožňuje enterální výživu, musí být dokrmovány přípravky, které obsahují snížené množství laktózy (Frühauf, 2010).

Aktivita laktázy zůstává vysoká během kojení, její produkce začíná klesat až po jeho ukončení (Fritzscheová, 2015). Během několika let po odstavení dojde průměrně ke ztrátě 75–90 % enzymu. Úroveň a časový průběh ztráty se však značně liší podle etnické skupiny. Číňané a Japonci ztrácejí 80–90 % enzymu během tří až čtyř let, Asiaté a Židé pouze 20–30 % během podstatně delší doby. Evropanům může dosažení nejnižší hladiny enzymu trvat v průměru 18–20 let (Matthews et al., 2005).

#### **2.1.3 Osud laktózy při laktózové toleranci**

Při laktózové toleranci dochází k účinné hydrolyze laktózy enzymem LPH již při průchodu tenkým stěvem v kartáčkovém lemu střevního epitelu. Pro hydrolyzu je nejpříjemnější prostředí jejunu, kde je malá koncentrace bakterií a existuje malá

pravděpodobnost fermentace laktózy. Štěpné produkty glukóza s galaktózou jsou efektivně odváděny do krevního oběhu společně s vodou (Lomer et al., 2007).

Jelikož je laktóza přirozeně těžko stravitelná, je běžné, že před vstřebáním může její část projít až do distální části tenkého střeva. Dokonce i u normálních jedinců může až 8 % laktózy přejít až do ilea bez předchozího strávení (Law et al., 2010).

Absorpci finálních monosacharidů skrze buněčnou membránu ovlivňuje několik faktorů. Zásadní úlohu hraje enzymová aktivita a doba průchodu laktózy skrze sliznici jejuna (Swagerty et al., 2002). Již poloviční hladina aktivity laktázy je dostačující pro strávení významného množství laktózy, jako je 50 g, což je ekvivalentní množství laktózy obsažené v litru mléka (Bayless et al., 2017).

Neméně důležitým faktorem je množství  $\text{Na}^+$  ve střevním lumen. Zatímco vysoká koncentrace  $\text{Na}^+$  na povrchu sliznic vstup monosacharidů do epitelových buněk usnadňuje, nízká koncentrace přestup tlumí. Za tento proces je zodpovědný vzájemný symport glukózy, galaktózy a  $\text{Na}^+$ , kde jako společný kontrtransportér funguje tzv. glukózový transportér závislý na sodíkovém iontu (SGLT). Po společném přenosu do mezibuněčných prostor jsou monosacharidy usnadněnou difuzí cestou GLUT 2 přenášeny do intersticia a poté do kapilár (Ganong, 2005).

#### **2.1.4 Osud laktózy při laktózové intoleranci**

Pokud následkem nedostatku laktázy nedojde ke štěpení laktózy, dostává se nestrávená z tenkého střeva do hlubších záhybů tlustého střeva, které jsou osídleny bakteriemi (Fritzscheová, 2015).

V prvním kroku dochází ke štěpení laktózy  $\beta$ -galaktosidázou přítomnou v bateriích mléčného kvašení na její monosacharidové podjednotky (Lomer et al., 2007). Bakterie mléčného kvašení jsou heterogenní skupinou grampozitivních bakterií, mezi něž patří např. rod *streptococcus*, *lactobacillus* a *bifidobacterium*. Významně se také podílejí na regulaci dysbalancí střevní flóry (Hove et al., 1999).

Štěpné produkty jsou dále k dispozici dalším bakteriím střevní flóry, které je fermentují na laktát a mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) za vzniku vedlejších produktů – oxidu uhličitého a vodíku. Oxid uhličitý může být dále určitými kmeny bakterií redukován na metan (Lomer et al., 2007). Tyto metabolické produkty a rychlost jejich

produkce se mohou významně podílet na příznacích laktóзовé intolerance (Szilagyi a Ishayek, 2018).

Doba vyprazdňování žaludku nebo průchod potravy střevem (zpomalený i zvýšený) mohou měnit rychlost fermentace neabsorbované laktózy. Tyto faktory mohou být ovlivněny dalšími fyziologickými podmínkami, jako jsou např. těhotenství, užívání léků nebo některé choroby (diabetes, poruchy štítné žlázy atd.) (Szilagyi a Ishayek, 2018).

Některé studie poukazují na to, že riziko vzniku symptomů po požití laktózy závisí na její dávce, expresi laktázy, střevní flóře a citlivosti gastrointestinálního traktu (Misselwitz et al., 2013). Různá míra tolerance liší se u jednotlivých pacientů je vysvětlována variabilní schopností mikroflóry tlustého střeva fermentovat laktózu. Zatímco v tenkém střevě je optimální prostředí pro aktivitu laktázy pH 6–8, v tlustém střevě pH klesá až na hodnoty kolem 4,6. Právě proto může být aktivita bakteriální laktázy snížena, laktóza zůstává nefermentována a příznaky poté vznikají spíše kvůli zvýšenému osmotickému zatížení, než vlivem metabolických produktů (Lomer et al., 2007).

### **Příznaky**

Hypolaktázie sama o sobě nezpůsobuje nepříjemnosti ani nevolnost. Ty se dostaví až tehdy, pokud je v požití potravě přítomna laktóza (Mattar et al., 2012). Potíže se dostaví 30 minut až 2 hodiny po konzumaci potravy obsahující laktózu (Kramer-Priesch a Kiefer, 2009). Původ symptomů není zatím dobře pochopený, ale osmotické zatížení způsobené nestrávenou laktózou nemůže být považováno za jediný mechanismus vyvolávající symptomy LI (He et al., 2006).

Běžnými příznaky jsou bolesti břicha a nadýmání, způsobené produkcí mastných kyselin a dalších organických látek v tlustém střevě, které prodlužují čas průchodu laktózy střevem a zvyšují tlak ve střevě. Okyselení střevního obsahu a zvýšený osmotický tlak vedou k lepší sekreci elektrolytů, a naopak průchod střevem urychlují a mají za následek průjemy. V ojedinělých případech může docházet vlivem snížené peristaltiky střev způsobené produkcí metanu k zácpě (Lomer et al., 2007).

Při přísunu velkého množství laktózy do odlehlejších oddílů střeva mohou vznikat toxické metabolické bakteriální produkty. Ty mohou zapříčinit vzácnější projevy laktóзовé intolerance, které svojí intenzitou překrývají intestinální obtíže. Patří mezi ně bolest hlavy, bolesti svalů, celková ochablost a tachykardie (Kasper, 2015).

### **2.1.5 Laktózová intolerance vs. alergie na bílkovinu kravského mléka**

Alergie na laktózu nebyla dosud popsána, existuje však alergie na bílkovinu kravského mléka (dále jako „ABKM“), se kterou může být laktózová intolerance často zaměňována (Fuchs, 2016). Při podezření na jeden z těchto stavů je třeba dbát na důsledné popsání příznaků pacientem. Zatímco některé z nich mohou být náhodné, jiné mohou být indikací pro ABKM, která postihuje kolem 20 % pacientů, jejichž symptomy zprvu naznačují intoleranci laktózy (Lomer et al., 2007). Není však také vyloučeno, že zvláště v případě nedůsledného dodržování léčby u alergií, tedy úplné eliminace zdrojů bílkoviny kravského mléka, může docházet k překrytí příznaků ABKM a sekundární laktózové intolerance, která se právě na základě nedodržení léčby může vyvinout (Fuchs, 2016).

Na rozdíl od laktózové intolerance, která se projevuje při nedostatku či úplném chybění enzymu laktázy ve střevě, je ABKM založena na imunologických reakcích proti některé z bílkovin kravského mléka (Frühauf a Szitányi, 2013). Potíže se vyskytují již po požití velmi malého množství mléčných výrobků a jedná se o kožní vyrážky, kopřivku, astma či bolest hlavy (Kramer-Priesch a Kiefer, 2009).

### **2.1.6 Syndrom dráždivého střeva**

Syndrom dráždivého střeva (IBS) postihuje 9–12 % populace. Pacienti s IBS mívají alespoň jeden z příznaků, které jsou shodné pro laktózovou intoleranci. Přestože se oba stavy mohou překrývat a u 24–27 % pacientů s IBS byla ve studiích prokázána také LI, bylo zjištěno, že laktózová intolerance sama o sobě nevede k syndromu dráždivého střeva (Phillips, 1999).

## **2.2 Druhy laktózové intolerance**

Asi dvě třetiny světové populace podstupují geneticky podmíněný úbytek laktázy po odstavení od mateřského mléka (primární laktázový deficit). U některých jedinců, přestože mají tvorbu laktázy zachovanou, může během života dojít k projevům laktózové intolerance, a to zejména z důvodu přítomnosti jiného, často střevního, onemocnění (sekundární laktázový deficit). Oba stavy se značně liší od vrozeného deficitu, který je extrémně vzácný (Deng et al., 2015).

### **2.2.1 Vrozený deficit**

Vrozený deficit laktázy neboli také alaktázie je vzácný stav, který se vyznačuje úplnou absencí laktázy (Fritzscheová, 2013). Jedná se o autozomálně recesivní poruchu s pouze asi čtyřiceti případy popsanými převážně ve Finsku a západním Rusku. K projevům

dochází již po prvním požití mateřského mléka, kdy dochází zejména k těžkým průjmům a k postupnému neprosívání novorozence (Lomer et al., 2007; Heine et al., 2017).

Projevy laktózové intolerance u novorozence mohou být způsobeny i přechodným stavem, a to při nedostatečném vyvinutí střeva v době narození (Fritzscheová, 2013).

### **2.2.2 Primární deficit**

Primární nedostatek laktázy lze považovat za genetickou chorobu s největší četností výskytu na světě, ačkoli ve skutečnosti ztráta exprese laktázy v dospělosti představuje normální, „wild type“ a laktázová perzistence abnormální, „mutantní“ stav (Deng et al., 2015). Vzhledem k tomu, že je tento stav vlastně normou, není vhodné užívat termín deficiencie, ani nazývat tuto situaci nemocí (Fuchs, 2016).

Primární deficit laktázy, způsobený geneticky podmíněným postupným úbytkem tohoto enzymu, postihuje zhruba 70 % světové populace. Věk, ve kterém se dostaví první příznaky primární hypolaktázie se značně liší napříč etnickými skupinami, obecně se ale primární hypolaktázie neprojevuje dříve než v pěti letech. Případů, kdy tomu tak nebylo, je zaznamenáno velmi málo (Mattar et al., 2012; Heine et al., 2017).

### **2.2.3 Sekundární deficit**

Sekundární neboli získaná hypolaktázie provází jiná, často gastrointestinální onemocnění, které způsobují poškození kartáčkového lemu nebo podstatně zvyšují transportní čas pro vstřebávání v tenkém střevě. Mezi nejčastější patří cystická fibróza, vážné gastroenteritidy, celiakie nebo také nádorová onemocnění s probíhající chemoterapií. Při léčbě je důležité zaměřit se na identifikaci primárního problému (Swagerty et al., 2002).

Při onemocněních, která zasahují tenké střevo s následným poškozením enterocytů, je laktáza ze všech střevních disacharidáz zasažena jako první. Spolu s vyléčením primárního onemocnění odeznívá také laktózová intolerance (Fojík et al., 2013).

## **2.3 Genetická podstata**

Externí vlivy, jako jsou hormony nebo cukry, mají vliv na přítomnost laktózové intolerance pouze minimální. Dlouhodobá zátěž laktózou ani její úplná eliminace neovlivňuje u člověka laktázovou aktivitu a toto zjištění je považováno za jasný důkaz genetického vlivu na aktivitu enzymu (Frühauf, 2010).



Že je LPH geneticky kontrolován vědci potvrdili ve druhé polovině dvacátého století. Zároveň také zjistili, že perzistence laktázy v dospělosti je dominantním znakem, jelikož již poloviční hladina laktázy je dostačující k prokázání významného trávení laktózy. (Swallow, 2003; Szilagyí a Ishayek, 2018).

Gen *LCT* (lactase) se nachází na dlouhém raménku druhého chromozomu (2q21.3), je 49,3 kb dlouhý a je kontrolován oblastí promotoru přibližně 14,000 bp proti proudu translace od translačního iniciačního kodónu laktázového genu (*LCT*) (Mattar et al., 2012; Szilagyí a Ishayek, 2018).

V blízkosti promotoru *LCT* genu se vyskytuje gen *MCM6* (minichromosome maintenance complex component 6) působící jako cis-element ovlivňující jeho přepis (Lomer et al., 2007).

### **2.3.1 Mutace v evropské populaci**

Prvními objevenými mutacemi byly jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) nacházející se v intronech genu *MCM6*, a to C/T-13910 ve 13. intronu na pozici 13,910 bp od iniciačního kodónu *LCT* a v 9. intronu G/A-22018 na pozici 22,018 bp. Obě tyto mutace jsou asociovány s laktázovou perzistencí v evropské populaci (Mattar et al., 2012; Deng et al., 2015).

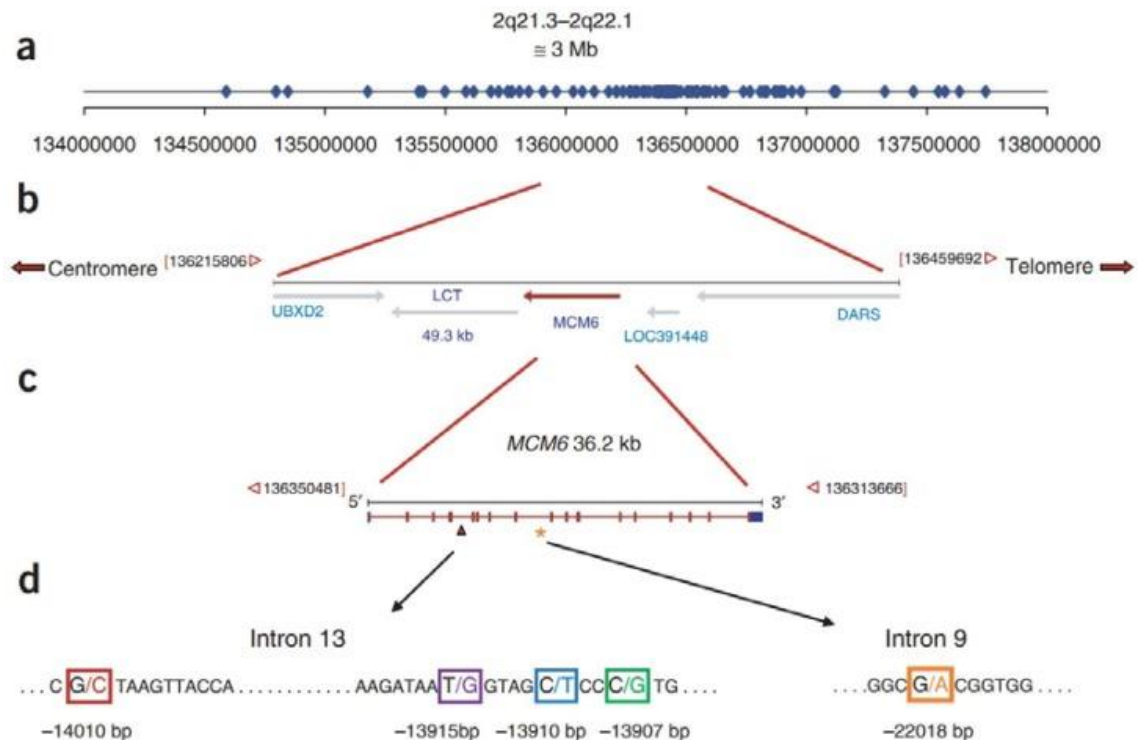
Přesné mechanismy regulace a kooperace *MCM6* genu s *LCT* nejsou zatím dobře známy, ale jisté je, že zahrnují epigenetický faktor metylace DNA. Dosavadní výzkumy většinou uvádějí SNP C/T-13910 jako důležitější pro celý mechanismus. Zatímco metylace C varianty DNA vede k utlumení transkripce, in vitro bylo prokázáno, že dominantní alela T působí jako silný enhancer. Při up-regulaci T varianty DNA dochází k vazbě několika transkripčních faktorů na tento enhancer, které se následně spojí s dalšími faktory TATA boxu v oblasti promotoru (Lomer et al., 2007; Szilagyí a Ishayek, 2018).

U homozygotních jedinců TT/AA se hladina laktázy v dospělosti prakticky nemění a může dosahovat až 10x vyšších hodnot než u intolerantních a heterozygotů. Naopak jedinci CC/GG mají hladinu tohoto enzymu téměř nedetekovatelnou. Heterozygoti v obou SNPs – CT/GA se většinou projevují jako perzistentní, ale mají vyšší pravděpodobnost laktózové intolerance v době stresu nebo při gastrointestinálních infekcích (Lomer et al., 2007; Deng et al., 2015).

### 2.3.2 Další varianty polymorfismů

Varianta C/T-13910 je považována za hlavní mutantní formu zodpovědnou za laktózovou intoleranci právě v evropské populaci, ale zároveň se také v malém procentu vyskytuje i v populacích jiných. Prevalence G/A-22018 je vyšší pouze v evropských rodinách (Enattah et al., 2002).

V dalších populacích bylo objeveno několik dalších SNPs, které by mohly být zodpovědné za sníženou expresi laktázy. Mezi alely, u kterých byla prokázána spojitost s laktózovou intolerancí, patří G-13915 v Saudské Arábii a G-14010, G-13915 a G-13907 u afrických kmenů (obr. 3). U těchto alelických variant byl popsán stejný mechanismus jejich působení jako enhancerů *in vitro*, jako u výše zmíněné alely T-13910 (Mattar et al., 2012; Deng et al., 2015).



**Obrázek 3:** Alely, u kterých byla prokázána spojitost s laktózovou intolerancí a jejich lokace na 2. chromozomu. Zdroj: Deng et al. (2015)

Rozlišnost genetických polymorfismů napříč různými etnickými skupinami vysvětluje fakt, že perzistence laktázy se vyvinula vícekrát v různých částech světa nezávisle na sobě (Misselwitz et al., 2013).

## 2.4 Historie

První zmínka o laktóзовé intoleranci se objevila již 400 let před naším letopočtem, kdy ji jako první popsal Hippokrates. Jako na klinickou jednotku je na ní však pohlíženo až od jejího objasnění na počátku 60. let 20. století. Do té doby nebyla genetická podmíněnost u laktóзовé intolerance známa a vysoké hladiny laktázy v dospělosti u Evropanů byly považovány za normální stav. Za posledních 50 let se výzkum laktóзовé intolerance značně posunul, a to jak v oblasti genetických mechanismů, tak i v diagnostických přístupech (Vesa et al., 2000; Ingram et al., 2009; Fojík et al., 2013).

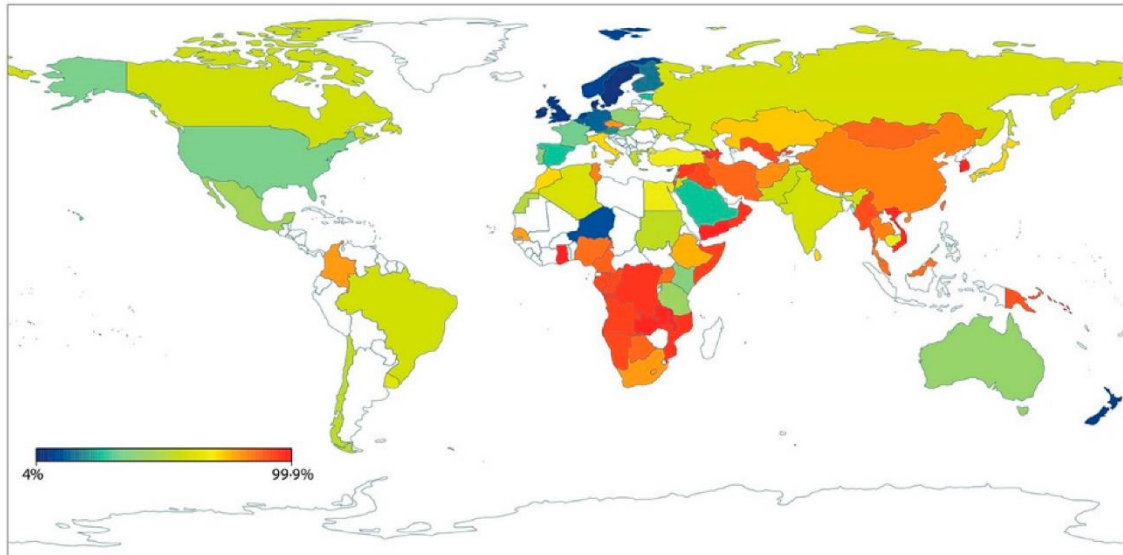
S laktóзовou intolerancí je spojován i Charles Darwin (1809–1882), který byl v letech 1831–1836 součástí expedice kolem světa na lodi Beagle. Po dvou až třech hodinách po konzumaci mléčných výrobků vykazoval typické příznaky LI jako břišní problémy, zvracení, i méně časté příznaky jako bolest hlavy a zvýšenou únavu. V té době byl ovšem jeho stav podhodnocen a Darwinova choroba byla označována za psychosomatickou, případně mu byly přisuzovány diagnózy jako otrava, alergie či hypochondrie. Přestože jako původ jeho zdravotních problémů byla zvažována i cesta kolem světa, spojená s možností nakažení některými neznámými chorobami, byla v rodinné anamnéze zjištěna predispozice pro hypolaktázii (Campbell a Matthews, 2005).

## 2.5 Prevalence

Zhodnocení celosvětového výskytu laktóзовé intolerance na základě sledování frekvencí fenotypů v mnoha populacích trvalo roky, avšak nyní je tato situace již poměrně dobře objasněna. Během dlouholetých průzkumů vyšlo najevo, že laktóзовá intolerance patří mezi nejčastější fenotyp u člověka, a to v zastoupení zhruba 70 % celosvětové populace (Ingram et al., 2009; Storhaug et al., 2017).

Hypolaktázie je rozšířena ve většině světa s velmi různorodým rozložením napříč světadíly, zeměmi, ale také v rámci jednotlivých zemí. Výskyt v Severní i Jižní Americe je poměrně jednotvárný, pohybuje se zde v rozmezí 36–42 %. Výjimku tvoří Kolumbie s výskytem 80 %. V rámci Evropy a Asie je zastoupení pestřejší, severní státy Evropy mají výskyt spíše nižší, kolem 4–20 %, v jižní a východní Evropě výskyt narůstá až k 47 %. V Asii postihuje laktóзовá intolerance kromě severní Asie 58–100 % obyvatelstva. V Africe je zastoupení laktóзовě intolerantních lidí největší, a to zejména v oblasti Subsaharské Afriky (77–100 %) s výjimkou Nigérie (13 %) (Storhaug et al., 2017).

Na obrázku 4 je přehledně znázorněno geografické rozložení populací s různou mírou laktóзовé intolerance, vycházející ze studie Storhauga et al. (2017). Pro tak nesourodé rozložení bylo hledáno vysvětlení, přičemž existuje více hypotéz, které zvažují různorodé faktory. Dá se říct, že v dnešní době převažuje genově-kulturní hypotéza, která bude spolu s dalšími popsána v následující kapitole (Szilagyi a Ishayek, 2018).



**Obrázek 4:** Celosvětová prevalence laktóзовé intolerance. Zdroj: Storhaug et al. (2017)

Povědomí o výskytu laktóзовé intolerance v různých geografických oblastech může být přínosné nejen z lékařského hlediska při zhodnocení stavu pacienta, ale také pro politické činitele, např. při volbě potravinové pomoci v reakci na hladomor (Storhaug et al., 2017).

## 2.6 Hypotézy vzniku laktóзовé tolerance

Rozložení laktóзовé intolerance, resp. tolerance po celém světě je velmi rozmanité a často tento jev nelze spojovat pouze se selekčním tlakem jako reakcí na příjem mléčných produktů. V souvislosti s tím vzniklo několik různých hypotéz, snažících se o vysvětlení geografického rozložení laktáзовé perzistence. Za současně nejpřínosnější je považována hypotéza kulturně-historická a hypotéza asimilace vápníku. Hypotézy nevyklučují jedna druhou, ale zároveň lze mezi nimi najít určité neshody (Gerbault et al., 2009).

### 2.6.1 Kulturně-historická hypotéza

Kulturně historická hypotéza vznikla před více jak třiceti lety poté, co Simoons (1970) a McCracken (1971) nezávisle na sobě formulovali myšlenku, že závislost na mléce tvoří silný selekční tlak na perzistenci laktázy (Ingram et al., 2009).

Statistické výpočty odhadly, že selekce pro perzistenci laktázy započala poměrně nedávno, a to během posledních 10 000 let. Pro naše předky laktózová tolerance zajistila další zdroj tekutin a bohatý zdroj bílkovin, tuků a sacharidů. Perzistence laktázy tedy znamenala selektivní výhodu a to 1,5–19 % v každé generaci. Tento silný selekční tlak je srovnatelný např. s rezistencí proti malárii v různých částech světa (Misselwitz et al., 2013).

Tato hypotéza tedy říká, že vzrůst perzistence laktázy se vyvíjel společně s kulturní adaptací na pití mléka a s rozšiřujícím se pastoralismem (chovem dobytka). Pastoralismus byl přínosný zejména díky nutričním benefitům, které mléko pro naše předky představovalo (Ingram et al., 2009). Pravdivost této hypotézy je zřejmá z obr. 4, kde jsou v Africe patrné oblasti, pro něž je typický chov dobytka, a tudíž nižší výskyt laktózové intolerance.

Další, avšak ne tak často diskutovanou, je hypotéza opírající se o kulturně historickou hypotézu. Ta říká, že laktázová perzistence je sice adaptací na pastoralismus, ale zároveň je upřednostňována ve vysoce suchém prostředí, kde místní lidé pili mléko jako prevenci proti dehydrataci. Tato hypotéza není podpořena žádnými dalšími důkazy (Gerbault et al., 2009).

### **2.6.2 Koevoluce genově kulturní**

Další hypotéza je také založena na myšlence, že perzistence laktázy se rozšířila v důsledku selekčního tlaku u populací konzumujících ve velké míře mléčné výrobky, zároveň se však zabývá tím, proč v rámci určitého území může docházet k výskytu rozmanitých genotypů.

Tato teorie naznačuje, že populace s historií chovu dobytka, u kterých se začala rozšiřovat perzistence laktázy, migrovali do různých částí světa, kde se usadili a začali vytvářet novou komunitu. Migrace započala již před objevením Nového světa a pokračuje dodnes, proto lze například odvodit současný stav v Americe a Austrálii, kdy do těchto oblastí migrovali hlavně Evropští předci (Storhaug et al., 2017; Szilagyi a Ishayek, 2018).

### **2.6.3 Asimilace vápníku**

Vápník, jakožto biogenní prvek, je pro člověka životně důležitý. Na jeho absorpci se ve střevě významně podílí laktóza, která tedy slouží jako činitel v prevenci osteomalacie. Ženy trpící osteomalacií měly často deformovanou pánev a rodily poté poškozené plody.

Jak je tedy patrné, dispozice přetrvávání laktázy je z tohoto důvodu velmi výhodná (Frühauf, 2010).

Kromě laktózy se na metabolismu vápníku podílí také vitamin D, který je syntetizován vlivem denního světla. Myšlenka hypotézy asimilace (neboli přizpůsobení se jedné situace jiné situaci) je taková, že v oblastech s nižším slunečním svitem, kde dochází k nedostatku vzniku vitamínu D, jsou zvýhodněni jedinci s laktázovou perzistencí, aby laktóza mohla nahradit funkci vitamínu D v souvislosti se vstřebáváním vápníku (Gerbault et al., 2009).

Pravdivost této hypotézy podporuje studie Storhauga et al. (2017) viz obr. 4, ze kterého je patrné, že severozápadní Evropu jednoznačně pokrývá pouze malé procento laktózově intolerantních jedinců.

## **2.7 Metody vyšetření LI**

Diagnostika laktózové intolerance je poměrně jednoduchá a nabízí mnoho možností, od základního expozičního testu až po genetické vyšetření (Fojík et al., 2013). V roce 1978 Lacassie et al. ve své studii prokázal, že diagnostika pouze na základě klinických příznaků je velmi nepřesná (Lacassie et al., 1978). Nepřímé testy (např. dechový vodíkový test a test laktózové tolerance) poskytují informaci o tom, zda dochází ke vstřebání laktózy ve střevě či nikoli, ale jejich pozitivita nerozlišuje primární či sekundární příčinu. Genetický test patří mezi testy přímé a jeho výsledek jednoznačně ukazuje genetickou podmíněnost (Fritzscheová, 2015).

### **2.7.1 Expoziční test**

Expoziční test je nejjednodušším ze všech testů. Pacient jej může při podezření na laktózovou intoleranci provést sám doma. Spočívá v podání 1 litru mléka obsahujícího 50 g laktózy. Sleduje se rozvoj gastrointestinálních příznaků do 4 hodin po požití (Fojík et al., 2013).

### **2.7.2 Biopsie**

Přítomnost laktázy lze vyšetřit histochemicky ze vzorku střeva, ale toto vyšetření však nepřináší uspokojivé výsledky. Vzorkem získaným při endoskopii je nejčastěji vzorek postpapilárního duodena, avšak maximum laktázy se nachází v duodenojejunálním přechodu. Běžný endoskopický vzorek tedy proto neposkytuje příliš přesné informace o množství enzymu (Frühauf, 2010). Nespornou výhodou ovšem zůstává možnost

vyločit jiné okolnosti způsobující sekundární intoleranci (např. celiakii nebo jiná střevní onemocnění) (Misselwitz et al., 2013).

V pediatrické gastroenterologii se dává přednost bioptickému vyšetření kapslí před endoskopickým odběrem, který musí být zvláště u menších dětí doprovázen celkovou anestezií. Kapsle je zavedena pod rentgenovou kontrolou až do duodenojejunálního přechodu a umožňuje tak přesnější výsledky, přičemž se jedná o méně invazivní postup (Frühauf, 2010).

### **2.7.3 Laktózový toleranční test**

Je lepší metodou než biopsie a pro tento účel byl i vyvinut. Umožňuje přímo potvrdit schopnost laktázy hydrolyzovat a absorbovat laktózu. Hladina glukózy je měřena ve stanovených časových intervalech v krvi před a po perorálním podání laktózy. Pro lepší vyhodnocení aktivity enzymu se může hodnotit nejenom koncentrace glukózy, ale také galaktózy. Tento způsob musí být podmíněn podáním etanolu před zahájením testování pro potlačení metabolismu galaktózy (Mattar et al., 2012). Nevýhodou tohoto testu je, že vrchol hladiny glukózy v krvi může být ovlivněn jinými faktory než je vstřebání ve střevě, a to rychlostí vyprazdňování žaludku nebo hormonálně (Law et al., 2010).

### **2.7.4 Dechový vodíkový test**

Dechový vodíkový test je neinvazivní a nejpoužívanější metodou testování pro stanovení laktózové intolerance (Law et al., 2010). Je nejčastěji prováděn pomocí ručního přístroje, do kterého se po hlubokém nádechu vydechne trubičkou celý obsah plic (Fritzscheová, 2015). Metoda je založena na principu plynové chromatografie a výsledek se uvádí v ppm (parts per million). Pacientovi je změřena hladina vodíku před začátkem testování a následně každých 15–20 minut po orálním podání dávky laktózy, která obvykle činí 25 g. U pacientů s laktózovou intolerancí dochází v tlustém střevě ke vzniku vodíku, který prochází střevní sliznicí a systémovou cirkulací se dostává až do plic, odkud je vydechován. O pozitivním výsledku mluvíme tehdy, je-li nárůst vyšší o 20 ppm oproti počáteční hodnotě (Law et al., 2010).

Zvýšené pH ve střevě, které může inhibovat aktivitu střevních bakterií, nebo jejich adaptace po dlouhodobé expozici laktózy, může způsobovat falešně negativní výsledky (Mattar et al., 2012). Některá antibiotika mohou pozměňovat střevní flóru a jejich užívání v době před testováním může taktéž ovlivnit výsledek testu (Joseph a Rosenberg, 1986).

Střevní flóra některých pacientů může obsahovat nevhodné bakterie vedoucí k tvorbě vodíku, a tedy k falešné pozitivitě tohoto testu. Naopak existuje asi 10 % „negativních respondentů“, tedy takových, jejichž střevo je osídleno bakteriemi, které nejsou schopny produkce žádného vodíku, nebo které se vodíkem žíví (Fritzscheová, 2015).

Další z příčin diskrepancí může být kouření během testování nebo až 12 hodin před ním a zvyšuje množství vydechnutého vodíku. Stejně tomu tak je u spánku v průběhu testování, kdy je příčina připisována hypoventilaci (Joseph a Rosenberg, 1986).

## **2.8 Genetické testování**

Identifikace alel zodpovědných za laktózovou intoleranci umožnilo zahájit používání genetických testů k její diagnostice. Oproti dechovému vodíkovému testu jsou genetické testy jednodušší a u pacientů není nutné pro vyhodnocení vyprovokovat příznaky podáním laktózy. Genetické testování je však také nákladnější, ve srovnání s předchozími metodami a v případě možné sekundární intolerance neumožňuje určit její příčinu (Mattar et al., 2012).

Pro vyšetření laktózové intolerance je možné využití mnoha genetických metod, jako jsou metoda PCR a restrikčního štěpení (PCR-RFLP) nebo reverzní hybridizace na stripech. Taktéž byly ve vědeckých studiích popsány postupy využívající pyrosekvenování (Nilsson a Olsson, 2008) nebo real-time PCR (Bodlaj et al., 2006). Zatímco metoda reverzní hybridizace byla shledána jako spolehlivější oproti real-time PCR, protože nedochází k interferencím způsobeným dalšími polymorfními variantami, cenově výhodnější bylo naopak pyrosekvenování (Mattar et al., 2012).

### **2.8.1 PCR**

Polymerázová řetězová reakce neboli PCR (z anglického „Polymerase Chain Reaction“) patří mezi nejznámější a nejvyužívanější molekulárně biologickou metodu současnosti, která umožňuje amplifikaci (zmnožení) určitých úseku DNA *in vitro* (Kočárek, 2007; Snustad a Simmons, 2015).

K jejímu provedení jsou zapotřebí krátké oligonukleotidové sekvence neboli primery, ohraničující vybraný úsek DNA, množství deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP), termostabilní DNA polymeráza a templátová DNA. Nejčastěji využívanou polymerázou, avšak ne jedinou, je Taq DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermophilus aquaticus*,



kteřá odolává vysokým teplotám právě díky tomu, že tato bakterie žije ve vývěřech horkých minerálních pramenů (Kočárek, 2007).

Reakce probíhá ve třech cyklicky se opakujících fázích v zařízení, které se nazývá termocykler. Ten umožňuje v naprogramovaných časových intervalech automatickou změnu teploty (Šmarda et al., 2005). První fází je denaturace DNA, probíhající při teplotě 92–95 °C. Následuje hybridizace (annealing) primerů na cílové sekvence za snížené teploty 50–60 °C. Tato teplota se odvíjí od struktury primerů, respektive od jejich nukleotidové sekvence. Poté se teplota opět zvýší, zhruba na 70–72 °C, DNA polymeráza nasedá na přítomné primery a dochází k syntéze nových vláken DNA (fáze prodlužování neboli elongace). V každém takto se opakujícím se cyklu dochází ke zdvojnásobení počtu molekul DNA (Snusnad a Simmons, 2009; Brdička a Didden, 2015).

Produkty PCR lze jednoduše analyzovat např. elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, případně elektroforézou kapilární, kdy je však již nutné fluorescenční značení. Elektroforéza je separační metoda, kdy se na základě působení elektrického proudu dělí různě velké fragmenty nukleových kyselin právě na základě své velikosti (Brdička a Didden, 2015).

Metodu PCR lze aplikovat v široké škále jejích modifikací. Ty se navzájem liší použitím dalších enzymatických reakcí, použitím specifických sekvencí primerů, přísností podmínek reakce a zejména způsoby detekce produktů PCR (Šmarda et al., 2005). Metody založené na PCR našly v molekulární biologii uplatnění např. při vyhledávání a klonování specifických sekvencí, pro detekci mutací nebo určení typů nádorů, a postupně nahradily řadu jiných metod (Rosypal et al., 2002).

Jako příklady metod založených na PCR uvádím varianty nejvíce využívané k diagnostice laktózy intolerance a to PCR-RFLP a real-time PCR. Je nutné neopomenout, že i u dalších zmiňovaných metod, které se neřadí mezi typické modifikace PCR, je jedním z prvních kroků analýzy amplifikační reakce.

### **PCR-RFLP**

Metoda PCR-RFLP se využívá pro typizaci cílové sekvence, ve které se s největší pravděpodobností vyskytuje sledovaný polymorfismus. Nejprve probíhá amplifikace požadované části DNA pomocí metody PCR popsané výše. Po ukončení reakce jsou

amplifikované vzorky detekovány elektroforézou a následně štěpeny restriční endonukleázou (Šmarda et al., 2005).

Restriční endonukleázy jsou hydrolytické enzymy rozpoznávající specifickou dvouřetězcovou sekvenci v molekule DNA, kterou štěpí v konkrétním místě, nebo poblíž něj. Sekvence místa štěpení je specifická pro různé restriční endonukleázy, které jsou produkty různých mikroorganismů. Název restričního enzymu je sestaven z prvního písmene rodu a prvních dvou písmen druhu mikroorganismu, dále se uvádí číslo, které určuje pořadí identifikace enzymu. Např. restriční endonukleáza, izolovaná z kmene RY13 druhu *Escherichia coli*, nese název EcoRI. V současné době je známo více jak 1 000 restričních enzymů (Nussbaum et al., 2004; Snusnad a Simmons, 2009).

Úseky DNA o definované délce, které vzniknou po štěpení, se nazývají restriční fragmenty a lze je detekovat pomocí gelové elektroforézy. Velikosti fragmentů mohou být u každého jedince jiné, a to v důsledku mutací, které vedou k vytvoření či ztrátě rozpoznávacích míst pro restriční endonukleázy. Rozdíly v délce a počtu těchto fragmentů se označují jako polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism) a odtud také pochází zkrácený název této metody, PCR-RFLP (Šmarda et al., 2005).

### **Real-Time PCR**

Real-Time PCR neboli PCR v reálném čase je další modifikací klasické PCR a umožňuje přímou kvantifikaci PCR produktů během reakce. Tato metoda našla uplatnění v klinické diagnostice pro analýzu bodových mutací, delecí nebo chromozomálních aberací (Šmarda et al., 2005; Brdička a Didden, 2015).

Princip je podobný, jako v případě klasické PCR, avšak u této metody je navíc syntéza nových vláken DNA provázena zvýšenou fluorescencí v reakční směsi. V nejjednodušším provedení je do reakce přidána fluorescenční látka, která po navázání na DNA fluoreskuje. Tento způsob je univerzální a lze ho využít s libovolnými primery. Jiné postupy využívají např. sondy označené fluorescenčním barvivem, které na jednom konci obsahují molekulu barviva a na druhém tzv. zhášeč (quencher), který blokuje fluorescenci. Taková sonda hybridizuje na denaturovanou DNA, avšak po setkání s DNA polymerázou dochází k jejímu odbourávání. Tím dojde také k přerušení kontaktu mezi barvivem a zhášečem a indukci fluorescence (Kočárek, 2007; Brdička a Didden, 2015).

Pro kvantitativní PCR se využívají speciální termocyklery, které ve vzorku DNA indukují fluorescenci příslušného barviva ozářením excitačním UV zářením. Intenzita fluorescence je měřena detektorem a výsledky jsou převedeny do počítače, kde jsou dále zpracovány. Koncentrace fluorescenčního barviva odpovídá množství DNA a někdy lze výsledky vyhodnotit ještě před ukončením všech cyklů (Kočárek, 2007).

### **2.8.2 Reverzní hybridizace**

Hybridizací je označován proces spojení dvou komplementárních řetězců nukleových kyselin (NK), který lze využít k identifikaci specifických sekvencí DNA. Prvním vláknem je vyšetřovaná DNA či RNA a druhým sonda. Sonda je úsek nukleotidů komplementárních k vyšetřovanému vlákně a může být buď z přirozeného zdroje (RNA, fragmentovaná DNA) nebo uměle připravená. Jelikož cílem hybridizace je zhodnocení nálezu, zda se daná mutace ve vyšetřovaném vzorku nachází či ne, používají se různé typy značení – testované DNA nebo sondy. Pokud se sonda naváže ke komplementárnímu vlákně vyšetřované DNA, dochází k hybridizaci a vzniku hybridizačního signálu. Ten je podle povahy sondy buď fluorescenční, radioaktivní, nebo při použití enzymu doprovázen vznikem barevného nebo světélkujícího produktu (Kočárek, 2007; Beránek, 2016).

Postupy hybridizace lze rozdělit podle prostředí, ve kterém probíhají, na hybridizace v roztoku, na pevném podkladu a metody *in situ* hybridizace. Zatímco hybridizace v roztoku je základem vyšetřování na principu PCR nebo Sangerova sekvenování a umožňuje např. stanovení koncentrace hledaných sekvencí, nejčastěji používanou hybridizační technikou pro vyhledávání drobných mutací je v současné době hybridizace na pevném podkladu. Jako pevný podklad pro hybridizaci slouží nitrocelulóзовý filtr nebo nylonová membrána, na kterém je pevně fixována vyšetřovaná NK nebo neznačená sonda. Výhodou detekce na membránách je možnost opakované hybridizace až s dvaceti různými sondami sloužící k vyhledání dalších mutací. Tento proces se nazývá rehybridizace (Rosypal et al., 2002; Beránek, 2016).

Podtypem metod využívajících pevnou fázi je reverzní blotting neboli reverzní hybridizace. V tomto provedení je sonda předem komerčně připravena a ukotvena na membránovém podkladu a může obsahovat buď běžnou (wild type) sekvenci, nebo sekvenci obsahující analyzovanou mutaci. V tomto případě se nepoužívají sondy

značené, ale značená je vyšetřovaná NK, kdy dochází po úspěšné hybridizaci k detekci signálů, jejichž povaha záleží na typu značení, jako bylo popsáno výše (Beránek, 2016).

### **2.8.3 Sekvenování**

K přesnému zjištění pořadí nukleotidů v molekulách DNA slouží metoda přímého sekvenování. Tato metoda je známa už více než 40 let a znalost sekvencí pak umožnila rozvoj i dalších metod. Mezi ně patří např. metoda PCR, kdy je sekvenční znalost DNA pro provedení PCR často nezbytná (Šmarda et al., 2005; Brown, 2007).

V běžných laboratořích je cílem sekvenování získat informace o pořadí nukleotidů ve specifických úsecích DNA a jejich srovnání s referenčními sekvencemi v genových databázích. Porovnání umožňuje odhalení geneticky podmíněných chorob na základě výskytu mutací v daném úseku a sekvenování s tímto cílem se označuje jako komparativní sekvenování (Beránek, 2016).

Téměř současně byly vyvinuty dvě odlišné techniky sekvenování. První z nich je označována jako chemická a je založena na specifické degradaci řetězců NK pomocí chemických sloučenin. V USA ji vyvinuli A. Maxam a W. Gilbert, podle svých autorů se tedy také označuje jako Maxam-Gilbertova. Druhým typem je enzymatická metoda známá také jako Sangerovo sekvenování, podle svého autora F. Sangera z Velké Británie. Princip metody je založen na specifické inhibici enzymové syntézy DNA (Šmarda et al., 2005; Brown, 2007).

#### **Sangerovo sekvenování**

Sangerovu metodu si lze zjednodušeně představit jako reakci PCR, protože i při ní dochází k syntéze komplementárního řetězce podle matrice sekvenované DNA. Rozdíl je v druhu použité polymerázy, kdy polymerázy používané pro sekvenování nejsou totožné s těmi, které se používají pro klasickou PCR reakci a dále v přidání tzv. terminátorů polymerace. Těmi jsou molekuly téměř totožné s deoxyribonukleotidy (dNTPs), které se označují jako dideoxyribonukleotidy (ddNTPs). Na třetím uhlíku deoxyribosy jim chybí volná hydroxylová skupina. V důsledku této absence nedochází k dalšímu prodlužování řetězce a polymerázová reakce se zastaví (Beránek, 2016).

Významný pokrok v sekvenování nastal při zavedení automatických sekvenátorů. Tento přístup spočívá v kompletní automatizaci a je tedy na zpracování sekvencí časově méně

náročný než standardní postupy (Šmarda et al., 2005). Standardní postup sekvenování tak, jak ho představil F. Sanger, je popsán v následujícím odstavci.

Reakce probíhají ve čtyřech oddělených zkumavkách, kdy každá z nich obsahuje matrici DNA, DNA polymerázu, množství dNTPs a množství specifického ddNTPs (např. ddATPs). Poměr ddNTPs a dNTPs musí být optimalizován tak, aby pravděpodobnost zařazení ddNTPs do nové molekuly DNA byla stejná jako u běžných nukleotidů. Výsledkem reakce jsou různé dlouhé fragmenty v každé zkumavce, které se označí např. stříbrem či kolorimetricky a obsah zkumavek se nanese vedle sebe na gelovou elektroforézu. Na základě rozdělení fragmentů podle jejich velikosti je možné odečíst sekvenci komplementárního vlákna (Rosypal et al., 2002; Beránek, 2016).

Současným standardem moderních sekvenátorů je vyhodnocení na principu kapilární elektroforézy. Fluorescenčně značené primery nebo dideoxyribonukleotidy umožňují detekci a seřazení jednotlivých segmentů DNA a automatické odečtení výsledné sekvence. Výsledkem analýzy je graf, jehož jednotlivé vrcholy odpovídají příslušným nukleotidům. Pro zjednodušení procesu je výhodnější použití značených ddNTPs různými fluorofory, protože odpadá nutnost provádět reakci ve čtyřech různých reakčních zkumavkách. Reakce může probíhat pouze v jedné zkumavce a následně v jedné kapiláře (Kočárek, 2007; Beránek, 2016).

### **Maxam-Gilbertova metoda**

Principem chemického typu sekvenování je štěpení DNA v místě specifického nukleotidu působením chemického činidla. Jako výchozí materiál se používá jednovláknová i dvouvláknová DNA, která je na jednom konci radioaktivně značena. Zpracování dvouvláknové DNA začíná denaturací obou vláken pomocí vysoké teploty a jejich následné separaci gelovou elektroforézou. Vybere se pouze jedno vlákno, které se přečistí a směs se rozdělí na čtyři díly – vzorky. V první fázi se na každý vzorek působí chemickou látkou, která způsobí modifikaci nukleotidů, pro které je specifická. Ve druhé fázi, po přidání další chemikálie, dochází důsledkem předchozí modifikace ke štěpení fragmentu v tomto úseku. Výsledný soubor fragmentů o různé délce je nanesen na gelovou elektroforézu a po přenesení na nitrocelulózový filtr lze sekvenci odečíst autoradiograficky (Rosypal et al., 2002; Brown, 2007).

## **Pyrosekvenování**

Pyrosekvenování je vysoce přesné sekvenování spojené se syntézou DNA v reálném čase. Nevyžaduje značené primery či nukleotidy, emise světla je způsobena přítomností pyrofosfátu (PPi), který se uvolňuje každým připojením nukleotidu. Míra emise světla je úměrná množství zabudovaných nukleotidů (Šmarda et al., 2005).

V současnosti se používá technika pyrosekvenování buď v roztoku, anebo na pevné fázi využívající imobilizovanou DNA. Metoda je stále ve vývoji, prozatím lze její využití nalézt při ověření sekvencí krátkých fragmentů DNA nebo při identifikaci jednonukleotidových polymorfismů v genomech (Šmarda et al., 2005).

## **2.9 Léčba**

Laktózová intolerance není považována za onemocnění, ale obtíže, které způsobuje, lze regulovat dietním opatřením. Léčba se zaměřuje na čtyři oblasti, a to snížení příjmu laktózy, náhradu alternativními zdroji při zachování dostatečného příjmu energie a bílkovin, substituci enzymů a dostatečný příjem vápníku a vitamínu D (Fojík et al., 2013).

### **2.9.1 Snížení příjmu laktózy**

Obecně není doporučována úplná eliminace potravin obsahujících laktózu z jídelníčku, ale pouze jejich omezení. Kompletní vysazení je vhodné jen při zahájení dietního opatření, a to zhruba v úvodních 4 týdnech. Dávka přijímané laktózy pak individuálně záleží na pacientovi, většina pacientů je schopna dobře snášet 12–15 g laktózy denně. V jídelníčku by měly zůstat mléčné výrobky zejména kvůli jejich živinám, které obsahují, a jejich vyšší biologické dostupnosti (Fojík et al., 2013; Szilagyi a Ishayek, 2018).

### **2.9.2 Náhrada mléčných výrobků a alternativní zdroje živin**

Kvalita bílkovin je založena na složení aminokyselin, stravitelnosti a biologické dostupnosti a může být vyjádřena pomocí tzv. DIAAS, což v češtině znamená „skóre stravitelných nepostradatelných aminokyselin“. Proteiny kravského mléka dosahují DIAAS > 100 % a jsou proto vysoce kvalitními. Dříve bylo kvalitativně srovnatelné s kravským mlékem mléko sójové, nově se dostává do povědomí i mléko hráškové, vyrobené ze žluté hráškové mouky. Obsahem proteinů a vápníku se vyrovnává mléku kravskému, avšak jeho biologická dostupnost není ještě dobře známa (Szilagyi a Ishayek, 2018).

Zvýšená poptávka spotřebitelů po náhražkách mléčných výrobků vedla k současné dostupnosti a rozmanitosti bezlaktózových potravin v supermarketech. Setkat se můžeme jak s alternativami mléčných nápojů vyrobených z rýže, kokosu, mandlí, výše zmíněné sóji nebo hrášku, tak i s bezlaktózovými sýry, jogurty, smetanou či zmrzlinami. Sójové nápoje bývají pro nedostatek vápníku a minerálů uměle obohacovány, avšak nápoje z jiných surovin, např. z kokosu, obohacovány nejsou. Alternativní nápoje tedy nelze pokládat za plnohodnotnou náhradu mléka (Fritzscheová, 2015).

### **2.9.3 Enzymová substituce**

Dostupné preparáty obsahují beta galaktosidázu izolovanou z plísní nebo kvasinek a užívají se současně s potravou obsahující laktózu pro zmírnění příznaků (Szilagyí a Ishayek, 2018). Na trhu jsou dostupné různorodé přípravky, které však nemusí být vždy stejně efektivní. Montalto et al. (2005) ve své studii s laktózově intolerantními pacienty prokázal účinnost laktázy získané z kvasinky *Kluyveromyces lactis* a to bez prokázaných vedlejších účinků. V jiné studii byl úspěšný preparát obsahující laktázu z plísně *Aspergillus oryzae*. Podaný enzym štěpí laktózu na glukózu a galaktózu pro lepší absorpci, avšak pro některé konzumenty může být nepříjemná pozměněná chuť jídla způsobená větší sladkostí samotných monosacharidů (Misselwitz et al., 2013; Deng et al., 2015).

### **2.9.4 Dostatek vápníku a vitamínu D**

Mléčné výrobky jsou hlavním zdrojem vápníku pro velkou část populace. Běžná doporučená denní dávka pro dospělého jedince je 1000 mg/den, pro dospívajícího 1300 mg/den a pro člověka nad 50 let 1200 mg/den (Misselwitz et al., 2013). Pravidelný přísun vápníku zajišťuje prevenci a zpomalení progresu osteoporózy. Novější studie poukázali, že již příjem 1–1,5 g vápníku denně má zásadní zpomalující účinek (Ganong, 2005).

Omezení mléčných výrobků u pacientů s laktózovou intolerancí může často vést k nedostatečnému příjmu denní dávky vápníku a tím k vyššímu riziku osteoporózy a fraktur. Vápník lze doplnit medikamenty v kombinované formě s vitamínem D, nebo zařazením potravin bohatých na vápník do jídelníčku. Větší porce zeleniny může doplnit až 150 mg vápníku, konzumace lososa nebo sardinek až 300 mg vápníku (Matthews et al., 2005; Fojík et al., 2013).

### 2.9.5 Vliv probiotik

Jako probiotika se označují živé mikroorganismy, které příznivě ovlivňují zdraví člověka, zmírňují průběh některých chorob nebo působí preventivně. Zapojují se např. do produkce esenciálních živin sliznice tlustého střeva, zlepšují střevní imunitu a podílejí se na obnově poškozené střevní mukózní bariéry (Fric, 2002). Mohou se přirozeně vyskytovat během procesu fermentace mléčných výrobků (kefir a další) nebo k nim být dodatečně přidávány (Szilagyi a Ishayek, 2018).

Je prokázáno, že bakterie používané jako startovací kultura v jogurtech (*Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*) zlepšují trávení laktózy díky přítomnosti mikrobiální  $\beta$ -galaktosidázy (laktázy). Toto tvrzení je podloženo několika studiemi, ve kterých byla srovnávána konzumace tzv. čerstvých jogurtů (s živými jogurtovými kulturami) s konzumací produktů pasterizovaných (obsahujících tepelně usmrcené bakterie). Lepší průběh trávení a zároveň nižší výskyt gastrointestinálních symptomů bylo prokázáno při konzumaci jogurtů s živou kulturou (Gill a Guarner, 2004).

Laktáza přítomná v těchto bakteriích částečně odbourává laktózu již při zrání jogurtu za vzniku kyseliny mléčné. Zbylá laktáza je chráněna buněčnou stěnou a netknuta se dostává až do tenkého střeva, kde teprve zásahem žaludečních šťáv dochází k rozkladu bakterií a uvolnění tohoto enzymu. Při rozkladu zbytkové laktózy dochází k menšímu osmotickému zatížení, a tudíž k nižšímu vzniku plynů a slabší bolesti břicha. Bakterie různých bakteriálních kmenů, které zakysané výrobky obsahují, mají rozdílnou rezistenci vůči kyselině žlučové. Z tohoto důvodu dochází k uvolnění bakteriálního enzymu v různé míře a snášenlivost se u jednotlivých výrobků liší (Fritzscheová, 2015; Szilagyi a Ishayek, 2018).

Bohužel přínos přímé konzumace probiotik je stále nejasný a výsledky studií jsou různorodé (Szilagyi a Ishayek, 2018).



### **3 Cíle práce a hypotézy**

1. Seznámení se s problematikou laktóзовé intolerance a možnostmi jejího testování.
2. Analýza vzorků metodou Sangerova sekvenování.
3. Zpracování výsledků sekvenování a jejich srovnání s výsledky získanými jinými molekulárně biologickými metodami.

Pro vyšetření laktóзовé intolerance lze využít několika různých metod, např. PCR-RFLP, reverzní hybridizace na stripu, real-time PCR apod. V některých případech se vyskytují kombinované genotypy, tzn. nejsou čistě homozygotní či heterozygotní pro obě varianty evropských polymorfismů. Odborná literatura se takovým případům dostatečně nevěnuje.

V rámci mé bakalářské práce byly porovnány výsledky stanovení laktóзовé intolerance pomocí analýzy DNA získané různými molekulárně-genetickými přístupy. Předpokládám, že metoda sekvenování u smíšených vzorků definitivně potvrdí, zda se opravdu jedná o takové kombinované genotypy.

## 4 Praktická část

Praktická část bakalářské práce probíhala v genetické laboratoři GENLABS pod vedením Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D., ve spolupráci s firmou SEQme s.r.o. Soubor vzorků se skládal celkem z 20 vzorků získaných od pacientů, kteří byli na základě informovaného souhlasu testováni v genetické laboratoři GENLABS pro zjištění laktóзовé intolerance.

V genetické laboratoři se laktóзовá intolerance vyšetřuje rutinně pomocí metody PCR-RFLP, přičemž se vyšetřují dva nejvýznamnější polymorfismy vyskytující se v evropské populaci, C/T-13910 a G/A-22018. Vzorky pro sekvenaci byly vybrány na základě výsledků metody PCR-RFLP a byli vybráni pacienti s kombinovaným genotypem pro oba polymorfismy, tzn. pro jeden z polymorfismů byli heterozygotní a pro druhý homozygotní. Tento stav není v odborné literatuře téměř popisován. Z důvodů nejasných výsledků u některých vzorků bylo nutno metodu PCR-RFLP zopakovat.

### 4.1 Seznam použitých přístrojů

Primárním vzorkem pro vyšetření laktóзовé intolerance metodou PCR-RFLP i sekvenování byl ve všech případech bukální stěr. Z bukálního stěru byla izolována DNA a následně byla změřena její koncentrace. Pro sekvenaci bylo nutné amplifikovat specifický úsek genu *MCM6*, který obsahuje oba analyzované polymorfismy. DNA byla proto pomocí PCR amplifikována a její úspěšnost ověřena pomocí gelové elektroforézy. Pokud amplifikace u některých komplikovaných vzorků neproběhla, byla PCR zopakována s jiným master mixem. Následně byl výsledný PCR produkt přečištěn a v několika dalších krocích připraven pro sekvenování. Vzhledem k vybavení laboratoře byla vlastní sekvenační reakce provedena firmou SEQme s.r.o.

Celý tento proces by bylo nemožné zrealizovat bez dostupných laboratorních přístrojů, které jsou nezbytnou součástí práce v laboratoři. Pro praktickou část své bakalářské práce jsem využila tyto přístroje:

- Kombinovaná chladnička pro laboratorní použití
- Sada automatických pipet měřících v různém rozmezí od 0,2  $\mu$ l do 1000  $\mu$ l
- Centrifuga
- Mini centrifuga/vortex
- Termostat

- Miniinkubátor
- Mikrovlnná trouba
- Mupid®-One Electrophoresis System
- Mupid™ LED Illuminator
- FastGene® GelPic LED Box
- Laminární box ESCO PCR Vertical Laminar Flow Cabinet
- Fluorometr Quibit® 2.0 Fluorometer

Reagencie a spotřební materiál jsou specifické pro jednotlivé laboratorní metody a jsou proto popsány u každého postupu samostatně.

## **4.2 Izolace DNA**

Různé proteiny mohou interagovat s nukleovými kyselinami a těmito reakcemi znemožnit správný průběh laboratorního vyšetření. Přítomnost bílkovin je tedy pro většinu analýz nežádoucí, proto se pro většinu molekulárně genetických analýz jako výchozí materiál používá vodný extrakt vyšetřované DNA zbavený podílu bílkovin. Vlastní izolace DNA se provádí šetrnou extrakcí z buněčného jádra nebo mitochondrií buňky (Beránek, 2016).

Primárním materiálem nejčastěji bývá nesražená plná krev nebo bukální stěr. Pro potřeby vyšetření laktózové intolerance byl primárním vzorkem bukální stěr, který je méně invazivní než odběr plné krve a pacient jej může provést i samostatně v pohodlí domova.

Pro izolaci DNA z bukálního stěru jsem použila komerční set Exgene™ Clinic SV od firmy GeneAII®.

### Reagencie

- Proteináza K
- BL pufr
- 100% etanol
- BW pufr
- TW pufr
- AE pufr

### Spotřební materiál

- 1,5 ml mikrozkušavky
- 2 ml sběrné zkumavky
- Kolonky
- Špičky
- Rukavice

#### **4.2.1 Pracovní postup izolace**

Nejprve jsem si připravila všechny reagenty na pracovní stůl a nechala termostat vyhřát na 56 °C. Tamponek s bukláním stěrem bývá už v samostatné zkumavce, ve které lze zahájit izolaci. Zkušavku jsem proto pouze řádně označila a stranou připravila novou 1,5 ml mikrozkušavku, taktéž označenou, pro pozdější použití.

Do zkumavky s bukláním stěrem jsem napipetovala 40 µl proteinázy K a 400 µl BL pufru. Obsah jsem následně zvortexovala, zkumavku nechala inkubovat 10 min při 56 °C a po inkubaci krátce stočila. Přidala jsem 400 µl 100% etanolu, zkumavku v pulzech zvortexovala a opět stočila.

Veškerý obsah jsem přenesla do nové, předem označené zkumavky na kolonku. Opět jsem dala zkumavku centrifugovat, tentokrát na 1 min při 8 000 rpm (revolutions per minute). Původní sběrnou zkumavku jsem nahradila novou a přidala 600 µl BW pufru. Centrifugaci jsem zopakovala na 1 min při 8 000 rpm. Sběrnou zkumavku jsem opět vyměnila za čistou a napipetovala 700 µl TW pufru. Centrifugace se opakovala za stejných podmínek.

Následně jsem odstranila supernatant ze sběrné zkumavky, kolonku umístila zpět a centrifugovala 1 min při nejvyšších otáčkách pro dokonalé odstranění zbytkového pufru. Po stočení jsem oddělila kolonku od zkumavky a umístila jí do čisté 1,5 ml mikrozkušavky s víčkem. Na kolonku jsem napipetovala 50 µl AE pufru a obsah nechala inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Po minutové centrifugaci při nejvyšších otáčkách jsem odstředěný AE pufr znovu využila a aplikovala jej přímo na kolonku. Zkušavka se nechala inkubovat stejně jako v předchozím kroku 5 min při pokojové teplotě. V posledním kroku jsem zkumavku centrifugovala při nejvyšších otáčkách po dobu jedné minuty, vyjmula kolonku a výsledný izolát byl připraven ve sběrné zkumavce pro změření koncentrace a následné použití.

### 4.3 Měření koncentrace

Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na přístroji Qubit® 2.0 Fluorometer pomocí Qubit dsDNA BR Assay Kitu.

#### Reagencie

- Qubit™ dsDNA BR reagent (Component A)
- Qubit™ dsDNA BR buffer (Component B)
- Qubit™ dsDNA BR Standard #1 (Component C)
- Qubit™ dsDNA BR Standard #2 (Component D)

#### Spotřební materiál

- Mikrozkušavky Qubit™ assay tubes o objemu 0,5 ml
- 1,5 ml mikrozkušavky
- Špičky
- Rukavice

#### **4.3.1 Pracovní postup**

Všechny pufrы jsem před vlastním měřením nechala vytemperovat na pokojovou teplotu. Protože kalibrace byla provedena při nedávném měření, nebylo nutné ji opakovat. Označila jsem si 0,5 ml zkumavku určenou pro měření na fluorometru číslem vzorku a zároveň si připravila 1,5 ml zkumavku pro přípravu pracovního roztoku, který byl připraven pro měření více vzorků.

Pro jeden vzorek jsem připravila pracovní roztok napipetováním reagentů 199  $\mu$ l Qubit™ dsDNA BR buffer a 1  $\mu$ l Qubit™ dsDNA BR reagent tak, aby celkový objem v mikrozkušavce činil 200  $\mu$ l. Roztok jsem zvortexovala a stočila. Do připravené 0,5 ml zkumavky jsem odpipetovala 190  $\mu$ l pracovního roztoku a 10  $\mu$ l DNA izolátu. Zkumavku jsem krátce zvortexovala, zcentrifugovala a nechala po dobu 2 min inkubovat při pokojové teplotě.

Přístroj jsem zapojila zapojením do zásuvky a nastavila měření dsDNA. Protože kalibrační křivka byla již vytvořena při předchozí kalibraci, přešla jsem rovnou k měření vzorku. Zkumavku jsem vložila do přístroje a nechala proběhnout měření. Po přepočtu objemu jsem získala výslednou koncentraci DNA v izolátu.

## 4.4 PCR reakce

Metody PCR se využívá pro mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA. Výsledným produktem jsou PCR produkty, tzv. amplikony o různé velikosti, jejichž přítomnost se prokazuje gelovou elektroforézou. PCR produkt může být dále zpracován pro další analýzu (Šmarda et al., 2005).

PCR reakce byla provedena pomocí MyTaq<sup>TM</sup> DNA polymerase a PCR BIO HS Taq Mix. Master mixy pro obě reakce byly připraveny v laminárním boxu a spotřební materiál byl u obou reakcí stejný. Následně byly všechny PCR produkty zkontrolovány pomocí gelové elektroforézy. Všechny vzorky byly připraveny pro sekvenování, u vybraných vzorků bylo navíc provedeno restriční štěpení metodou PCR-RFLP.

### Spotřební materiál pro PCR reakci

- 1,5 ml mikrokumavky
- 0,2 ml mikrokumavky s rovným víčkem
- Špičky
- Rukavice

#### **4.4.1 Postup PCR reakce pomocí MyTaq DNA polymerase**

Pro přípravu PCR reakce jsem použila kit MyTaq<sup>TM</sup> DNA Polymerase od firmy Bioline. Kromě reagensií, které tento kit obsahuje, jsem navíc použila DMSO (dimethylsulfoxid) pro větší výtěžnost reakce. Seznam použitých reagensií pro přípravu reakčního mixu a jejich množství pro jednu reakci uvádí pro polymorfismus C/T-13910 tabulka 2 a pro polymorfismus G/A-22018 tabulka 3.

**Tabulka 2:** Složení PCR reakce pro polymorfismus C/T-13910

<b>C/T-13910</b>	
<b>Reagencie</b>	<b>Objem</b>
H <sub>2</sub> O	34,3 µl
5x MyTaq (Red) Reaction Buffer	10 µl
MyTaq DNA polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
DMSO (100 %)	2,5 µl
LAC 13910 C/T_for (20 pmol)	0,5 µl
LAC 13910 C/T_rev (20 pmol)	0,5 µl
<b>Celkem</b>	<b>48 µl</b>

**Tabulka 3:** Složení PCR reakce pro polymorfismus G/A-22018

<b>G/A-22018</b>	
<b>Reagencie</b>	<b>Objem</b>
H <sub>2</sub> O	34,3 µl
5x MyTaq (Red) Reaction Buffer	10 µl
MyTaq DNA polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
DMSO (100 %)	2,5 µl
LAC 22018 G/A_for (20 pmol)	0,5 µl
LAC 22018 G/A_rev (20 pmol)	0,5 µl
<b>Celkem</b>	48 µl

Sekvence primerů a reakční protokoly pro polymorfismus C/T-13910 byly převzaty z odborné práce Mattar et al. (2008) a pro polymorfismus G/A-22018 z článku Coelho et al. (2005). Použité primery jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 4:** Sekvence primerů

<b>Označení primerů</b>	<b>Sekvence</b>
LAC 13910 C/T forward	5_-GCTGGCAATACAGATAAGATAATGGA-3_
LAC 13910 C/T reverse	5_-CTGCTTTGGTTGAAGCGAAGAT-3_
LAC 22018 G/A forward	5_-CTCAGTGATCCTCCCACCTC-3_
LAC 22018 G/A reverse	5_-CCCCTACCCTATCAGTAAAGGC-3_

Všechny potřebné reagencie jsem si nejprve vyndala z mrazícího boxu a nechala je rozmraznout. Mezitím jsem si připravila do chladícího stojánku mikrozkušavky o objemu 0,2 ml a označila je čísly vzorku, včetně pozitivní a negativní kontroly. Pro přípravu reakčního mixu jsem použila zkumavku o objemu 1,5 ml.

Připravené reagencie jsem zvortexovala a zcentrifugovala s výjimkou MyTaq DNA polymerázy. U té je vortex nežádoucí a je nezbytné ji pouze zcentrifugovat. Příslušné množství reagentů (viz tabulka 2 a tabulka 3), přepočítané na počet vzorků, jsem napipetovala do 1,5 ml zkumavky. Do každé 0,2 ml zkumavky pro vzorek a negativní kontrolu jsem přidala 48 µl master mixu a 2 µl DNA, v případě negativní kontroly 2 µl H<sub>2</sub>O. Zkumavky jsem krátce zvortexovala, stočila a umístila do termocyklu. Průběh reakce v termocyklu pro polymorfismus C/T-13910 popisuje tabulka 5 a pro polymorfismus G/A-22018 tabulka 6.

**Tabulka 5:** PCR reakční protokol pro polymorfismus C/T-13910

		<b>Čas</b>	<b>Teplota</b>
<b>1 cyklus</b>	Počáteční denaturace	5 min	95 °C
<b>35 cyklů</b>	Denaturace	60 s	95 °C
	Anealing	60 s	57,4 °C
	Extenze	60 s	72 °C
<b>1 cyklus</b>	Terminální extenze	5 min	72 °C

**Tabulka 6:** PCR reakční protokol pro polymorfismus G/A-22018

		<b>Čas</b>	<b>Teplota</b>
<b>1 cyklus</b>	Počáteční denaturace	5 min	95 °C
<b>35 cyklů</b>	Denaturace	60 s	95 °C
	Anealing	60 s	60,3 °C
	Extenze	60 s	72 °C
<b>1 cyklus</b>	Terminální extenze	5 min	72 °C

Po ukončení reakce proběhla kontrola produktu pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu.

#### 4.4.2 Postup PCR reakce pomocí PCRBIO HS Taq Mix

Část vzorků, zejména ty, u kterých se neosvědčila PCR s použitím MyTaq™ DNA Polymerase kitu, byla amplifikována pomocí jiného kitu. Pro přípravu master mixu k provedení PCR reakce byl použit PCRBIO HS Taq Mix kit od firmy PCR Biosystems. Seznam reagensií a jejich potřebné množství pro jeden vzorek uvádí pro polymorfismus C/T-13910 tabulka 7 a pro polymorfismus G/A-22018 tabulka 8. Sekvence primerů byly totožné jako u předchozího postupu a jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 7:** Složení PCR reakce pro polymorfismus C/T-13910

<b>C/T-13910</b>	
<b>Reagencie</b>	<b>Objem</b>
MasterMix	12,5 µl
H <sub>2</sub> O	5,25 µl
DMSO (100 %)	1,25 µl
LAC 13910 C/T_for (20 pmol)	0,5 µl
LAC 13910 C/T_rev (20 pmol)	0,5 µl
<b>Celkem</b>	20 µl



**Tabulka 8:** Složení PCR reakce pro polymorfismus G/A-22018

<b>G/A-22018</b>	
<b>Reagencie</b>	<b>Objem</b>
MasterMix	12,5 µl
H <sub>2</sub> O	5,25 µl
DMSO (100 %)	1,25 µl
LAC 22018 G/A_for (20 pmol)	0,5 µl
LAC 22018 G/A_rev (20 pmol)	0,5 µl
<b>Celkem</b>	<b>20 µl</b>

Reagencie bylo nutno před samotnou přípravou master mixu nechat rozmraznout při pokojové teplotě. Mezitím jsem si připravila 1,5 ml zkumavku pro přípravu master mixu a 0,2 ml mikrozukavky pro vzorky a negativní i pozitivní kontrolu.

Zkumavky jsem označila a připravené reagencie zvortexovala a stočila. Příslušný objem jednotlivých reagentů, uvedený v tabulce 7 a 8 pro dané polymorfismy, jsem napipetovala do 1,5 ml zkumavky. Objem reagentů byl předem přepočítán podle množství vzorků. Master mix jsem zvortexovala, zcentrifugovala a po 20 µl jej rozdělila do 0,2 ml mikrozukavek. Do každé mikrozukavky jsem přidala 5 µl DNA a pro negativní kontrolu do samostatné zkumavky 5 µl H<sub>2</sub>O. Všechny vzorky jsem zvortexovala, stočila a umístila do termocyklu. Reakční protokol byl stejný, jako při použití předchozího kitu (viz tabulka 5 a 6) a PCR produkty byly po proběhnutí reakce zkontrolovány na 4% agarózovém gelu elektroforeticky.

#### **4.5 Elektroforéza na gelu**

Pro kontrolu, zda PCR reakce proběhla a zjištění výsledků restrikčního štěpení, je nezbytné použít gelovou elektroforézu. Princip odečítání výsledků je pro oba polymorfismy stejný, pouze produkty restrikčního štěpení se liší svou délkou. Postup přípravy gelu a reagentů, které se používají, jsou taktéž totožné. Část reagentů je součástí kitu EastGene®Electrophoresis Reagent Kit, který dodává firma Elisabeth Pharmacon.

##### Reagencie

- 10x TBE – pufr pro přípravu pracovního roztoku 1xTBE
- Pracovní roztok 1x TBE

- Deionizovaná (aqua for injection) a destilovaná (aqua purificata) voda
- Agarózové tablety obsahující 0,5 g agarózy
- Midori Green Advanced DNA Stain
- 100 bp DNA LADDER H3RTU

#### Pomůcky a spotřební materiál

- Odměrný válec
- 0,5 l skleněná lahev
- Plastová kádinka
- Špachtlička
- Elektroforetická deska
- Hřebeny
- Špičky
- Rukavice

#### **4.5.1 Pracovní postup**

Nejprve jsem si připravila příslušné pomůcky s reagensy a elektroforetickou formu, do které jsem umístila hřebeny. Před samotnou přípravou gelu jsem si připravila 1x TBE pufr, který se uchovává k tvorbě dalších gelů. Pro jeho přípravu jsem do skleněné nádoby o objemu 500 ml odměřila 50 ml již připraveného 10x TBE pufru a nádobu jsem doplnila 450 ml destilované vody.

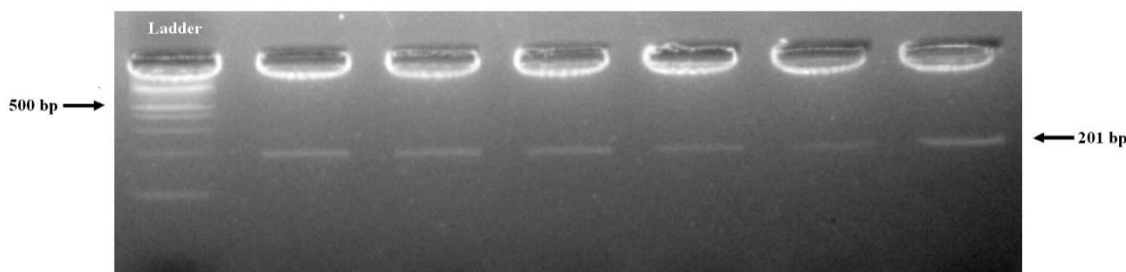
Po přípravě 1x TBE pufru jsem přešla na přípravu 4% agarózového gelu. Do plastové kádinky jsem umístila 4 agarózové tablety (2 g agarózy) a přidala k nim 50 ml 1x TBE pufru. Tablety jsem nechala rozpustit a kádinku jsem následně umístila do mikrovlnné trouby, kde jsem ji při maximálním ohřevu nechala zahřát po dobu 3 minut. Doba ohřevu byla případně upravena podle průběžné kontroly, dokud nevznikl tekutý gel. K hotovému gelu jsem napipetovala 15  $\mu$ l fluorescenční barvičky Midori Green Advanced DNA Stain a směs promíchala. Směs jsem nalila do elektroforetické formy s hřebeny a nechala gel ztuhnout v tmavém prostředí.

Z tuhého gelu jsem vyndala hřebeny a umístila gel do elektroforetické vany. K již přítomnému 1x TBE pufru ve vaně jsem dolila takové množství, aby byl gel úplně ponořen. Do první jamky gelu jsem napipetovala 5  $\mu$ l 100 bp DNA LADDER H3RTU markeru. Vzorke jsem poté napipetovala po 5  $\mu$ l do jamek a zapnula elektroforézu na

135 V po dobu 15 minut. Po ukončení procesu byl gel přenesen na detekční systém, foto gelu bylo uloženo na paměťovou kartu a následně přeneseno do PC.

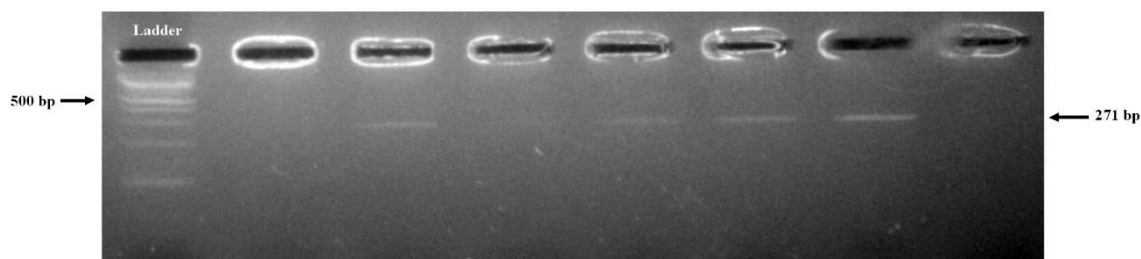
#### 4.5.2 Vyhodnocení PCR produktu

Velikost výsledného produktu PCR reakce u polymorfismu C/T-13910 je 201 bp (Mattar et al., 2008). Velikost PCR produktů polymorfismu C/T-13910 oproti hmotnostnímu markeru (ladder) lze vidět na obrázku 5.



**Obrázek 5:** PCR produkty velikosti 201 bp u polymorfismu C/T-13910. Zdroj: vlastní

Výsledkem amplifikační reakce u polymorfismu G/A-22018 je PCR produkt o velikosti 271 bp (Coelho et al., 2005). Velikost PCR produktů polymorfismu G/A-22018 oproti hmotnostnímu markeru lze vidět na obrázku 6.



**Obrázek 6:** PCR produkty o velikosti 271 bp u polymorfismu G/A-22018. Zdroj: vlastní

V případě pozitivního výsledku (úspěšné PCR reakce) byl vzorek dále zpracován metodou sekvenování, případně PCR-RFLP. Vyhodnocení této metody pomocí elektroforézy je popsáno v následující kapitole.

## 4.6 PCR-RFLP

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů je dvoustupňová metoda, kdy prvním krokem je amplifikační reakce s následným restrikčním štěpením amplifikovaných úseků. Ke štěpení se využívá enzymů restrikčních endonukleáz, které štěpí DNA molekulu ve specifickém místě. Jelikož je sekvence nukleotidů v těsné blízkosti každého

polymorfismu specifická, stejně jako restriční místo každého z enzymů, je nutný výběr správného enzymu. Pro oba polymorfismy vyšetřované v této bakalářské práci se využívá restriktázy izolované z bakterie *Hemophilus Influaenze*. U polymorfismu C/T-13910 se jedná konkrétně o enzym *Hinf I*, u G/A-22018 o *Hin6 I*.

#### Reagencie pro analýzu polymorfismu C/T-13910

- Restriční enzym *Hinf I*
- Restriční pufr CutSmart™ Buffer

#### Reagencie pro analýzu polymorfismu G/A-22018

- Restriční enzym *Hin6 I*
- Restriční pufr 10x Buffer Tango

#### Spotřební materiál

- 0,2 ml mikrozkušavka s rovným víčkem
- Špičky
- Rukavice

#### **4.6.1 Pracovní postup**

Oba restriční pufrы jsem nechala rozmraznout při pokojové teplotě a poté je zvortexovala a stočila. Nadepsala jsem si dvě skupiny zkumavek, pro každý polymorfismus zvlášť, čísla vzorků a do každé napipetovala 45 µl příslušného PCR produktu. V chladicím stojánku jsem do zkumavek se vzorky pro vyšetření polymorfismu C/T-13910 přidala 4 µl restričního pufru CutSmart™ Buffer a 1 µl enzymu *Hinf I*. Pro polymorfismus G/A-22018 jsem napipetovala 4 µl restričního pufru 10x Buffer Tango a 1 µl enzymu *Hin6 I*. Všechny zkumavky jsem nechala 1 hodinu inkubovat při teplotě 37 °C.

#### **4.6.2 Vyhodnocení**

Po ukončení inkubace bylo restriční štěpení vyhodnoceno elektroforeticky na 4% agarózovém gelu.

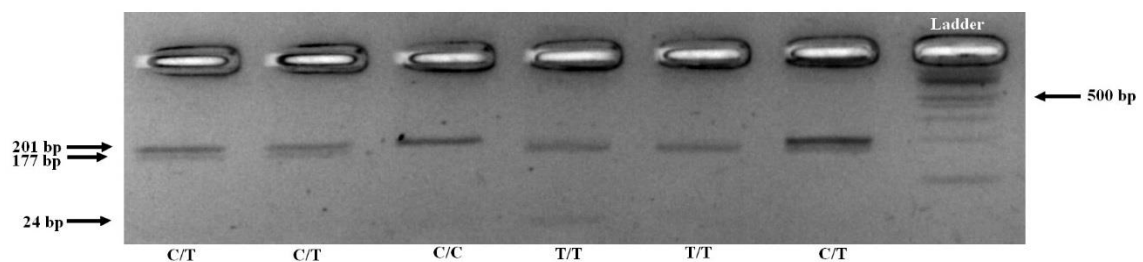
#### **Vyhodnocení polymorfismu C/T-13910**

PCR produkt velikost 201 bp byl štěpen restriční endonukleázou *HinfI*. Štěpné místo vzniká v přítomnosti mutantní alely T, která nahrazuje alelu C v pozici 13910. V blízkosti polymorfismu C/T-13910 se však nachází ještě další možné restriční místo pro *HinfI*, a to v oblasti nasednutí forward primeru. Mulcare et al. (2004) použili proto upravenou

sekvenci primeru, která spočívala v záměně nukleotidu T za nukleotid G (tato záměna je barevně vyznačena v tabulce 4). Tím došlo ke ztrátě nežádoucího restrikčního místa a umožnění restrikce pouze v místě polymorfismu C/T-13910.

V přítomnosti dvou alel T došlo ke štěpení PCR produktu na dva fragmenty o velikosti 177 bp a 24 bp. U homozygota CC ke štěpení nedochází, neboť restrikční místo není mutací vytvořeno. Na elektroforéze je poté vidět zachovalý fragment 201 bp. V přítomnosti mutantní i normální alely (heterozygot CT) vznikají tři fragmenty o velikostech 201 bp, 177 bp a 24 bp (Mattar et al., 2008). Krátký fragment 24 bp je vzhledem ke své velikosti na gelu hůře viditelný.

Výsledky restrikčního štěpení polymorfismu C/T-13910 jsou zobrazeny na obrázku 7.

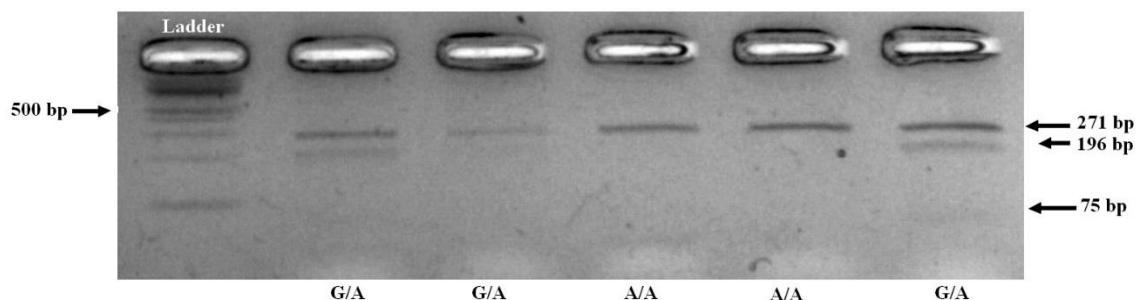


**Obrázek 7:** Výsledky restrikčního štěpení polymorfismu C/T-13910. Pod jednotlivými jamkami jsou označeny genotypy vyhodnocené na základě velikosti fragmentů, vpravo se nachází hmotnostní marker. Zdroj: vlastní

#### Vyhodnocení polymorfismu G/A-22018

PCR produkt velikosti 271 bp byl vystaven restrikčnímu štěpení endonukleázou *Hin6 I*. U tohoto polymorfismu je restrikční místo již vytvořeno přítomností normální alely G. V její přítomnosti dochází ke štěpení PCR produktu u homozygota GG na fragmenty 196 bp a 75 bp a u heterozygota GA vznikají tři fragmenty o velikosti 271 bp, 196 bp a 75 bp. Pokud jsou přítomny obě mutantní alely A, ke štěpení nedochází a je zachován původní fragment 271 bp (Coelho et al., 2005). Krátký fragment 75 bp je vzhledem ke své velikosti na gelu hůře viditelný.

Výsledky restrikčního štěpení polymorfismu G/A-22018 jsou zobrazeny na obrázku 8.



**Obrázek 8:** Výsledky restrikčního štěpení polymorfismu G/A-22018. Pod jednotlivými jamkami jsou označeny genotypy vyhodnocené na základě velikosti fragmentů, vlevo se nachází hmotnostní marker. Zdroj: vlastní

## 4.7 Sekvenování

Stěžejní metodou této bakalářské práce bylo právě sekvenování. Sekvenování umožňuje odečíst sekvenci DNA na úrovni nukleotidů v oblasti, kterou si vymezíme výběrem vhodných primerů. Kromě využití pro ověření různých genových polymorfismů např. pro účely kontroly správnosti měření, nebo primárně k jejich odhalení, může sloužit tato metoda i tam, kde výsledky jiné metody byly jinak sporné, nebo nemohly být odečteny. Ze stejných důvodů byla tato metoda zvolena i v této bakalářské práci.

Všechny vzorky byly zaslány firmě SEQme s.r.o. a vyšetřeny metodou Sangerova sekvenování. Princip metody je uveden v teoretické části této práce.

### 4.7.1 Přečištění PCR produktu

Jak již bylo zmíněno dříve, sekvenování si lze zjednodušeně představit jako PCR reakci. I zde dochází k tvorbě komplementárního řetězce DNA podle jednovláknového templátu, a je tedy zapotřebí primerů a nukleotidů. Jelikož je samotná PCR reakce nezbytným krokem v přípravě vzorku pro potřeby sekvenování, obsahuje PCR produkt zbytky primerů a nespotřebovaných nukleotidů. Ty by však mohly při sekvenování způsobit nežádoucí znečištění a ovlivnit tak sekvenaci. Je tedy nutné tyto zbytky odstranit ještě před dalším zpracováním vzorku. Pro přečištění PCR produktu jsem použila kit ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup od firmy ThermoFisher Scientific.

### Reagencie

- ExoSAP-IT™ reagent

## Spotřební materiál

- Mikrozkušavky
- Špičky
- Rukavice

## **Pracovní postup**

Připravila jsem mikrozkušavky podle počtu vzorků a popsala je. Do každé jsem napipetovala 5  $\mu$ l PCR produktu a 2  $\mu$ l ExoSAP-IT<sup>TM</sup> reagentu. Směs jsem zcentrifugovala a umístila do termocykleru. Průběh reakce je popsán v tabulce 9.

**Tabulka 9:** Protokol použitý pro přečištění PCR produktů

Teplota	Čas	Popis
37 °C	15 min	Degradace nukleotidů a primerů
80 °C	15 min	Inaktivace ExoSAP-IT <sup>TM</sup>

Po přečištění není žádná další úprava PCR produktu nutná a je připraven pro další použití.

### **4.7.2 Závěrečná příprava vzorků pro sekvenování**

Součástí laboratorní přípravy vzorku před odesláním na sekvenování bylo přidání primeru a naředění přečištěného PCR produktu na potřebnou koncentraci. Protože pro sekvenování je potřeba pouze jeden primer, volí se forward nebo reverse dle potřeby. V některých případech může být vzorek osekvenován z obou stran, ale pracuje se s ním jako s oddělenými vzorky, kdy je každý v oddělené zkumavce se specifickým primerem.

Vzorky pro tuto práci nebyly jednotně vyšetřeny oběma primery, avšak u polymorfismu C/T-13910 převažoval primer reverse a u polymorfismu G/A-22018 forward primer. Sekvence primerů musí být totožné s primery použitými pro reakci PCR a jsou uvedeny v tabulce 10. Byly taktéž převzaty z odborné práce Mattar et al. (2008) pro SNP 13910 a pro polymorfismus 22018 poté z Coelho et al. (2005).

**Tabulka 10:** Sekvence primerů

Označení primerů	Sekvence
LAC 13910 C/T forward	5_-GCTGGCAATACAGATAAGATAATGGA-3_
LAC 13910 C/T reverse	5_-CTGCTTTGGTTGAAGCGAAGAT-3_
LAC 22018 G/A forward	5_-CTCAGTGATCCTCCACCTC-3_
LAC 22018 G/A reverse	5_-CCCCTACCCTATCAGTAAAGGC-3_

## Reagencie

- Primery dle požadovaného vyšetření
- Deionizovaná voda (Aqua for injection)

Poměr všech reagensů je přepočítáván podle intenzity PCR produktu na elektroforéze a výsledný objem vzorku zasílaného na sekvenaci odpovídá 10 µl. Podle toho bylo také postupováno. Objem použitého primeru o koncentraci 20 pmol je vždy 0,5 µl a je neměnný, množství PCR produktu a H<sub>2</sub>O se dopočítával dle výtěžku PCR reakce tak, aby celkový objem byl 10 µl.

## Spotřební materiál

- 0,2 ml mikrozkušavky
- Špičky
- Rukavice

## **Pracovní postup**

Připravila jsem si množství mikrozkušavek úměrné k počtu vyšetřovaných vzorků a označila je pořadovými čísly. Do každé zkumavky jsem napipetovala 2,5–7,5 µl H<sub>2</sub>O a přidala 0,5 µl specifického primeru. Před použitím jsem veškeré PCR produkty zvortexovala, stočila a do příslušné zkumavky odpipetovala 2–7 µl přečištěného PCR produktu. Vzorky jsem zajistila proti znehodnocení a odeslala.

### **4.7.3 Vyhodnocení**

Výsledné sekvence byly zpracovány ve freewareovém programu Chromas. Poté, co byly upraveny a zkontrolovány ručně, byly vloženy do vyhledávacího nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), který umožňuje porovnání sekvence vzorku s genovou databází NCBI a upozorňuje na případné neshody. BLAST spadá pod Národní zdravotní instituty (National Institutes of Health – NIH). Na obrázku 9 lze vidět příklad spárování vzorku vyšetřovaného pro polymorfismus C/T-13910 s databází. Tento vzorek je homozygotní a byl u něj použit primer LAC 13910 C/T reverse. Jediná neshoda, kterou lze zpozorovat, vznikla z důvodu účelové záměny jednoho nukleotidu v oblasti primeru. Tato záměna tedy není chybou ani neznamená mutaci.



Homo sapiens isolate ANGH156 MCM6 gene, intron  
 Sequence ID: [KU661546.1](#) Length: 579 Number of Matches: 1

Range 1: 147 to 296 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

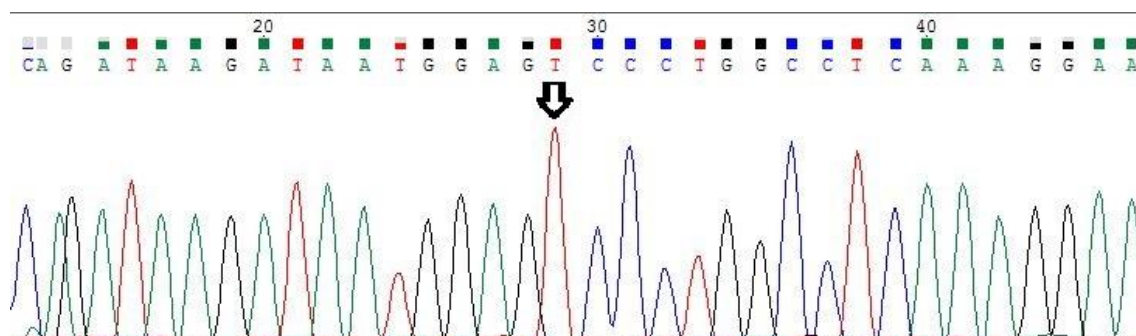
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
272 bits(147)	2e-69	149/150(99%)	0/150(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCTGGCAATACAGATAAGATAATGGAG	CCCTGGCCTCAAAGGAACTCTCCTCCTTAGGT	60	
Sbjct 147	GCTGGCAATACAGATAAGATAATGTAGTCCCTGGCCTCAAAGGAACTCTCCTCCTTAGGT		206	
Query 61	TGCATTTGTATAATGTTTGATTTTTAGATTGTTCTTTGAGCCCTGCATTCCACGAGGATA	120		
Sbjct 207	TGCATTTGTATAATGTTTGATTTTTAGATTGTTCTTTGAGCCCTGCATTCCACGAGGATA	266		
Query 121	GGTCAGTGGGTATTAACGAGGTA AAAAGGGG	150		
Sbjct 267	GGTCAGTGGGTATTAACGAGGTA AAAAGGGG	296		

**Obrázek 9:** Příklad spárování vzorku vyšetřovaného pro polymorfismus C/T-13910 s databází BLAST. Horní řádek značí sekvenci vzorku, spodní řádek je sekvence referenční. Žlutě zvýrazněná je pozice hledané alely. Zdroj: vlastní

Každý známý SNP nese své označení, podle kterého ho lze definovat a dohledávat další informace. Polymorfismus C/T-13910 se značí rs4988235 a G/A-22018 rs182549. Pomocí toho označení byla v databázi NCBI nalezena sekvence bezprostředního okolí SNP tak, aby bylo možné s úplnou jistotou potvrdit, že se jedná o hledaný polymorfismus.

### Vyhodnocení polymorfismu C/T-13910

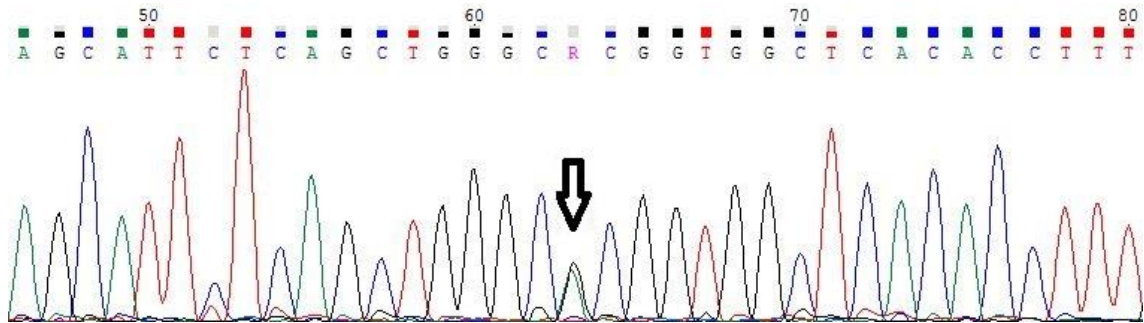
V sekvenci může dojít ke třem situacím. Pacient může být homozygot CC, homozygot TT, nebo heterozygot s alelami CT. Pokud je výsledek homozygotní, v sekvenci lze nalézt pouze jeden pík (viz obr. 10). U heterozygotního jedince dojde k překrytí dvou píků, a to jak pro alelu C, tak T. Tyto píky jsou většinou stejně velké a dle IUPAC codes (International Union of Pure and Applied Chemistry) se značí přítomnost C i T nukleotidu písmenem Y.



**Obrázek 10:** Část sekvence vyšetřovaného genu pro polymorfismus C/T-13910, šipkou zdůrazněno umístění hledané alely. Z tohoto sekvenačního grafu vyplývá, že se jedná o homozygota TT. Zdroj: vlastní

### Vyhodnocení polymorfismu G/A-22018

Stejně jako u předešlého polymorfismu i zde nastává obdobné zhodnocení sekvence. V případě, že je pacient homozygot s alelami GG nebo AA, lze vidět v grafu v oblasti polymorfismu pouze jeden pík. Pokud se jedná o heterozygota, překrývají se zde dva píky. Přítomnost nukleotidu G i A se opět dle IUPAC codes značí písmenem R, jak lze vidět na obrázku 11.



**Obrázek 11:** Část sekvence vyšetřovaného genu pro polymorfismus G/A-22018, šipkou zdůrazněno umístění hledané alely. Výsledkem této sekvenační reakce je heterozygot GA. Zdroj: vlastní

## 5 Výsledky

Cílem práce bylo osekvenování několika vzorků a následné porovnání výsledků s dalšími molekulárně-biologickými metodami. Pro účel sekvenování byly vybrány ty vzorky, u nichž byl pacient metodou PCR-RFLP alespoň v jedné mutaci (tedy C/T-13910 nebo G/A-22018) zhodnocen jako heterozygotní. Současně bylo vyšetřena část vzorků, u kterých byl pacient vyhodnocen v obou polymorfismech jako homozygot či heterozygot, a to zejména z důvodu ověření obou metodických přístupů. Součástí souboru byl také jeden vzorek, u kterého nemohla být metoda PCR-RFLP použita z důvodu špatné kvality DNA pro tuto metodu a tento vzorek byl pouze osekvenován. Přehled vzorků a genotypy vyhodnocené na základě této metody jsou shrnuty v tabulce 11.

**Tabulka 11:** Genotypy vzorků vyhodnocené metodou PCR-RFLP

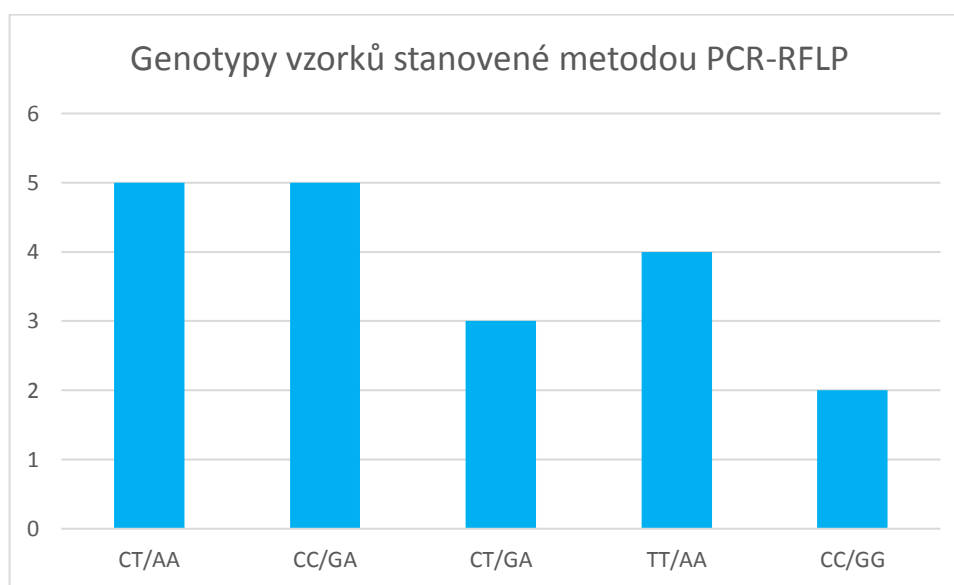
Č. vzorku	Genotyp	Č. vzorku	Genotyp
1	CT/AA	11	CT/GA
2	CT/AA	12	CT/GA
3	CT/AA	13	CT/GA
4	CT/AA	14	TT/AA
5	CT/AA	15	TT/AA
6	CC/GA	16	TT/AA
7	CC/GA	17	TT/AA
8	CC/GA	18	CC/GG
9	CC/GA	19	CC/GG
10	CC/GA	20	neznámý

Vyhodnocení praktické části této bakalářské práce se opírá jednak o výsledky získané metodou PCR-RFLP poskytnuté genetickou laboratoří GENLABS, ale také o výsledky získané z jiné bakalářské práce. Vyhlídalová (2018) se zabývala vyšetřením laktózové intolerance metodami PCR-RFLP a reverzní hybridizací na stripech a v jejím souborů vzorků bylo několik totožných v rámci spolupráce s genetickou laboratoří GENLABS.

Po vyhodnocení sekvencí, které byly získány v rámci této bakalářské práce, byly všechny výsledky porovnány. Důraz byl kladen na zhodnocení počtu špatně určených výsledků a zjištění možné příčiny vzniku neshodných výsledků.

## 5.1 Soubor vzorků

Soubor tvořilo 20 vzorků, vybraných na základě výsledků metody PCR-RFLP. Výběr nebyl ovlivněn pohlavím, věkem jedince ani žádnými jinými parametry. Kombinovaný genotyp mělo 10 vzorků v různých variantách, 9 vzorků bylo jednotných, a to v obou polymorfismech buď homozygotní, nebo heterozygotní jedinec. U jednoho vzorku nebyl genotyp metodou PCR-RFLP stanoven a tento vzorek byl pouze osekvenován. Podrobnější přehled zastoupení vzorků podle jejich genotypů určených metodou PCR-RFLP lze vidět na obrázku 12. Koncentrace vzorků jsou uvedeny v tabulce 12.



**Obrázek 12:** Četnost genotypů dle výsledků metody PCR-RFLP

**Tabulka 12:** Koncentrace vzorků

Č. vzorku	Koncentrace [ng/μl]	Č. vzorku	Koncentrace [ng/μl]
1	20,4	11	18,7
2	18,3	12	19,7
3	54	13	29,3
4	16,6	14	10,9
5	19	15	30,6
6	7,56	16	21,7
7	17	17	108
8	15,7	18	46,6
9	5,01	19	354
10	11,3	20	27,3

## 5.2 Vyhodnocení sekvencí

Všechny vzorky byly osekvenovány v rámci spolupráce s firmou SEQme s.r.o. a následně vyhodnoceny v programu Chromas. V této kapitole se věnuji pouze vyhodnocení sekvencí nezávisle na výsledcích jiných metod, srovnání s nimi bude podrobně popsáno v dalších kapitolách.

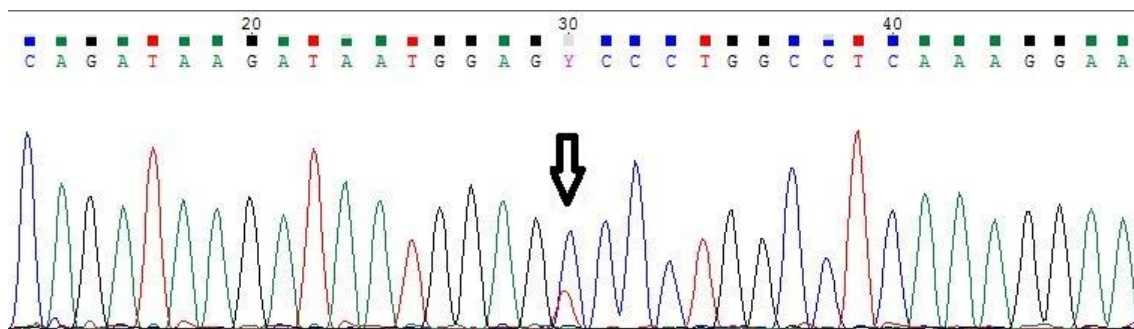
Sekvenování nebylo u všech vzorků jednotné. Bylo tomu tak hlavně z důvodu upřednostnění zisku sekvence v heterozygotní formě polymorfismu. U některých vzorků nebylo možné sekvenování v druhém polymorfismu zopakovat z důvodu nedostatku materiálu. Celkem bylo provedeno 37 sekvenací, z toho 21 pro polymorfismus C/T-13910 a 16 pro G/A-22018.

### 5.2.1 *Polymorfismus C/T-13910*

U polymorfismu C/T-13910 byl přednostně používán primer reverse. Tento SNP se nachází v těsné blízkosti sekvence primeru forward a při sekvenování s tímto primerem tedy nedochází k pokrytí úseku příslušného polymorfismu. To bylo potvrzeno sekvenací dvou vzorků, provedených s forward primerem.

Pro tento polymorfismus bylo vyšetřeno 18 vzorků, z nichž u dvou byly použity oba primery a u jednoho vzorku bylo sekvenování zopakováno. Při vyhodnocení bylo možné setkat se se třemi situacemi. Vzorek s výsledkem TT v případě jednoho píku T a se sklony k laktázové perzistenci, homozygot CC s předpokladem laktázové intolerance, nebo heterozygot CT, pokud by v grafu byly dva souměrné překrývající se píky.

S jistotou lze říci, že v případě 15 sekvencí, u kterých byl použit primer reverse, bylo odečtení výsledků jednoznačné. Přítomnost jednoho píku značícího homozygota byla jasná, stejně tak dva píky v případě heterozygota se souměrně překrývaly. Současně však byly nalezeny čtyři případy, kdy se velikost obou píků lišila. Tento rozdíl lze vidět na obrázku 13.



**Obrázek 13:** Znárodnění odlišně velikých píkú u polymorfismu C/T-13910, konkrétně u vzorku č. 9

Ve fázi vyhodnocení sekvencí byly tyto vzorky vyhodnoceny podle poměrú velikosti píkú. Jednalo se o vzorky č. 4, 9, 12 a 15. Jeden z nich byl vyhodnocen jako homozygotní TT a tři jako heterozygotní.

Výsledné zastoupení genotypú je uvedeno v tabulce 13.

**Tabulka 13:** Zastoupení genotypú polymorfismu C/T-13910 na základě metody sekvenování

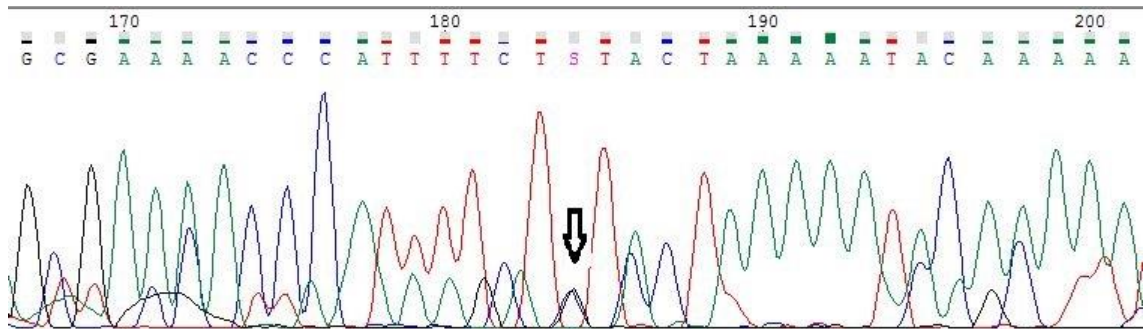
	<b>Genotyp</b>	<b>Počet jedincú</b>
<b>Laktózová intolerance</b>	CC	5
<b>Laktózová perzistence</b>	TT	4
<b>Heterozygot</b>	CT	9

### 5.2.2 Polymorfismus G/A-22018

Pro polymorfismus G/A-22018 bylo vyšetřeno celkem 16 vzorkú. Prvořadě byl použit primer forward, se kterým bylo osekvenováno 14 vzorkú. Jeden vzorek byl vyšetřen duplicitně s tímto primerem, jeden vzorek byl vyšetřen s oběma primery a další pouze s primerem reverse. Z grafu bylo možné vyhodnotit genotyp AA, pokud byl přítomen pouze jeden pík A, jednalo by se o jedince s laktázovou perzistencí, genotyp GG s laktázovou intolerancí nebo heterozygot GA v přítomnosti dvou píkú.

Při vyhodnocení sekvencí byla kromě hledaného polymorfismu nalezena ještě jiná mutace. Tato mutace se nacházela na pozici 21.909. V daném úseku se standardně nachází alela C, u vzorkú byla však nalezena alela C a G. Dle IUPAC codes se přítomnost obou těchto alel značí písmenem S. Souvislost této mutace s polymorfismem pro laktázovou aktivitu nebyla prokázána, vzhledem k tomu, že se vyskytovala u všech

sekvencí nezávisle na genotypu. Vyšlo najevo, že tato mutace byla nalezena ve většině případů s přesným překrytím obou píků. Pouze malé množství vzorků mělo tyto píky nestejně velké a dalo by se spíše uvažovat o homozygotovi CC. Umístění mutace je znázorněno na obrázku 14.



**Obrázek 14:** Umístění mutace nalezené v souvislosti s použitím primeru forward u vyšetření polymorfismu G/A-22018

Po kontrolním osekvenování dvou vzorků primerem reverse nebyla tato mutace prokázána. Naopak, na hledané pozici se nacházela standardní alela C, bez náznaku přítomnosti alely G. Bylo tedy prokázáno, že tato mutace se vyskytuje pouze při použití primeru forward a jedná se nejspíše o chybu vzniklou během sekvenování.

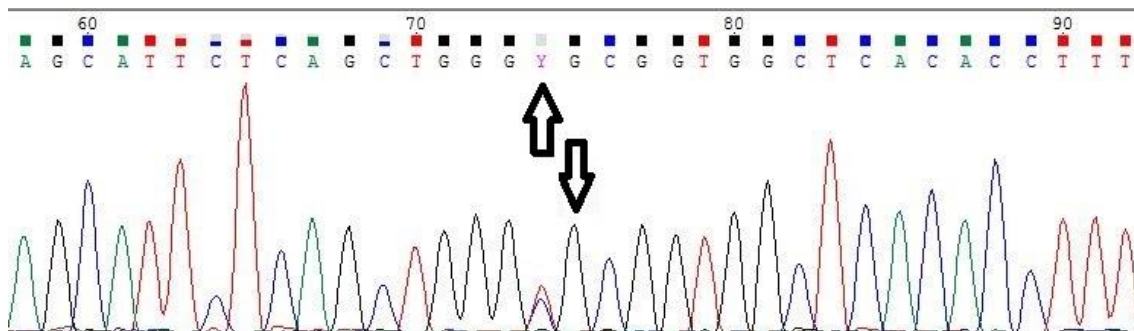
Genotypy vzorků pro polymorfismus G/A-22018 a jejich zastoupení je uvedeno v tabulce 14.

**Tabulka 14:** Zastoupení genotypů polymorfismu G/A-22018 dle sekvenace

	<b>Genotyp</b>	<b>Počet jedinců</b>
<b>Laktózová intolerance</b>	GG	3
<b>Laktázová perzistence</b>	AA	7
<b>Heterozygot</b>	GA	6

Zajímavostí je, že v případě vyhodnocení tohoto polymorfismu byla u všech vzorků evidentní stejná výška píků a v případě heterozygota nebyla žádná výjimka shledána, jako tomu bylo u vyšetření polymorfismu C/T-13910.

Výjimka byla ovšem nalezena u vzorku č. 4, a to ve vedlejší lokusu sledovaného polymorfismu na pozici 22.017. V tomto místě se za normálních okolností nachází pouze alela C, avšak zde byla patrná heterozygotní alela CT, jak je vidět na obrázku 15.



**Obrázek 15:** Přítomnost mutace v lokusu 22.017 u vzorku č. 4

Důsledek této mutace ve vztahu k vyšetření laktóзовé intolerance byl prokázán a je vysvětlen v následující kapitole.

### 5.2.3 Výsledky pro oba sledované polymorfismy

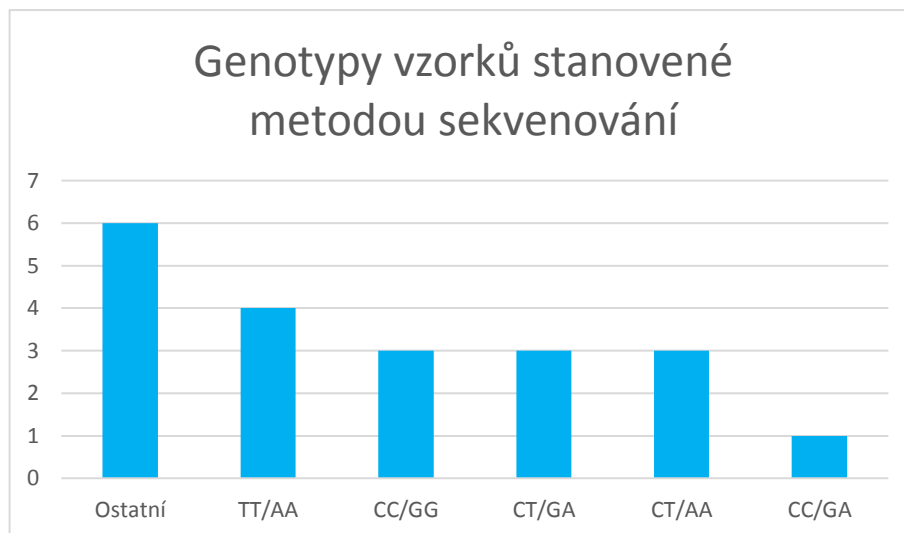
Genotypy všech vyšetřených vzorků pro polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018 odečtené ze sekvencí jsou shrnuty v tabulce 15. U vzorků s neúplnými výsledky nebyl druhý polymorfismus došetřen zejména kvůli nedostatku materiálu.

**Tabulka 15:** Genotypy obou polymorfismů vyhodnocené na základě sekvenace

Č. vzorku	Genotyp	Č. vzorku	Genotyp
1	CT/-	11	CT/GA
2	CT/-	12	CT/AA
3	CT/AA	13	CC/-
4	CT/-	14	TT/AA
5	CT/AA	15	TT/AA
6	CC/GA	16	TT/AA
7	-/GA	17	TT/AA
8	-/GA	18	CC/GG
9	CT/GA	19	CC/GG
10	CC/GG	20	CT/GA

Zastoupení jedinců s ohledem na jejich genotyp vyjadřuje obrázek 16. Jako „ostatní“ jsou označeny vzorky, jejichž genotyp nebyl vyšetřen kompletně pro oba polymorfismy.





**Obrázek 16:** Četnost genotypů vyhodnocených metodou sekvenování

Z grafu je patrné, že nejvíce zastoupeny jsou homozygotní genotypy TT/AA a CC/GG, a to celkem v sedmi případech. Hned za nimi jsou jedinci heterozygotní. Pouze 20 % z vyšetřovaného souboru jsou po zhodnocení metodou sekvenování jedinci s prokázaným kombinovaným genotypem. Je nutné předpokládat, že počet výše zmíněných jedinců s kombinovaným genotypem by se mohl po provedení kompletní analýzy obou polymorfismů ještě navýšit.

### 5.3 Výsledky jiných molekulárně-biologických metod a jejich porovnání

V tabulce 16 jsou uvedeny výsledky získané metodou sekvenování spolu s výsledky stanovenými metodou PCR-RFLP, které byly vyšetřeny genetickou laboratoří GENLABS. V další části práce jsou výstupy obou metod porovnány a zároveň jsou použity výsledky třetí metody, reverzní hybridizace na stripech. Jelikož tato metoda nebyla aplikována u všech vzorků, je toto porovnání spíše doplňující. I přes to byly některé neshodné výsledky podnětem pro zajímavou diskusi.

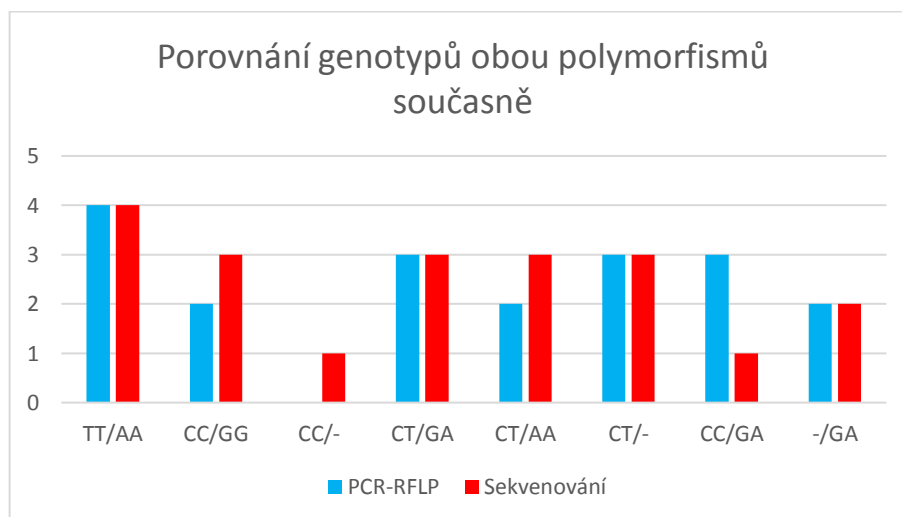
U vybraných vzorků byla metoda PCR-RFLP zopakována zejména pro ověření původní analýzy PCR-RFLP. Ve většině případů výsledky opakovaných restričních štěpení souhlasily, a není jim proto věnována další pozornost.

**Tabulka 16:** Porovnání genotypů vyhodnocených na základě metod PCR-RFLP a sekvenování

Č. vzorku	Genotyp		Č. vzorku	Genotyp	
	PCR-RFLP	Sekvenování		PCR-RFLP	Sekvenování
1	CT/AA	CT/-	11	CT/GA	CT/GA
2	CT/AA	CT/-	12	CT/GA	CT/AA
3	CT/AA	CT/AA	13	CT/GA	CC/-
4	CT/AA	CT/-	14	TT/AA	TT/AA
5	CT/AA	CT/AA	15	TT/AA	TT/AA
6	CC/GA	CC/GA	16	TT/AA	TT/AA
7	CC/GA	-/GA	17	TT/AA	TT/AA
8	CC/GA	-/GA	18	CC/GG	CC/GG
9	CC/GA	CT/GA	19	CC/GG	CC/GG
10	CC/GA	CC/GG	20	neznámý	CT/GA

### 5.3.1 Výsledky pro oba sledované polymorfismy

Na obrázku 17 je porovnáno zastoupení genotypů stanovených metodou PCR-RFLP s novými výsledky získanými sekvenováním. Protože jsou genotypy získané metodou PCR-RFLP známy u všech vzorků, s výjimkou jednoho, avšak všechny vzorky nebyly osekvenovány pro oba polymorfismy, jsou genotypy ve třech případech upraveny tak, aby bylo možné v grafu porovnat všechny získané výsledky. Vzorek č. 20, u něhož byl genotyp vyšetřen pouze sekvenováním, je v grafu taktéž zařazen.



**Obrázek 17:** Porovnání četnosti genotypů obou polymorfismů na základě metod PCR-RFLP a sekvenování

Jak je patrné z výsledků tabulky 16 a obrázku 17, byly čtyři vzorky (20 %) metodou PCR-RFLP vyhodnoceny špatně. Konkrétně se jednalo o vzorky č. 9, 10, 12 a 13. Z těchto uvedených byly dva vyhodnoceny špatně v polymorfismu C/T-13910, další dva vzorky poté v polymorfismu G/A-22018.

Mezi vzorky, u kterých byla prokázána neshoda, byli metodou PCR-RFLP definováni dva jedinci s genotypem kombinovaným a dva heterozygoti. Po zjištění sekvencí se tento počet v jednotlivých kategoriích změnil. Pokud se podíváme na původní zastoupení genotypů vzorků v celém souboru (výčet genotypů viz tabulka 11 a obrázek 12) a situaci po vyhodnocení metodou sekvenování, lze tento stav shrnout do tabulky 17. Z původního počtu deseti kombinovaných genotypů byly vyřazeny vzorky, které byly osekvenovány pouze v jednom polymorfismu. Tato kategorie je v tabulce 17 označena jako „ostatní“ spolu se vzorkem, který byl pouze osekvenován.

**Tabulka 17:** Srovnání počtu výsledných genotypů získaných uvedenými metodami

	<b>PCR-RFLP</b>	<b>Sekvenování</b>
<b>Kombinovaný genotyp</b>	5	4
<b>Laktózová intolerance</b>	2	3
<b>Laktázová perzistence</b>	4	4
<b>Heterozygot</b>	2	2
<b>Ostatní</b>	7	7

Nutno však podotknout, že u vzorků, u nichž nebyly vyšetřeny oba polymorfismy, byly výsledky stanovené oběma metodami stejné, s výjimkou jednoho (konkrétně vzorek č. 13), a žádná další neshoda zjištěna nebyla.

### **Výsledky reverzní hybridizace**

Ve čtyřech případech byly dostupné výsledky získané metodou reverzní hybridizace na stripech. V tabulce 18 lze vidět přehled těchto výsledků získaných třemi různými genetickými analýzami. Výsledky reverzní hybridizace byly díky shodným vzorkům převzaty z práce Vyhliďalové (2018).

**Tabulka 18:** Výsledné genotypy stanovené metodou PCR-RFLP, reverzní hybridizací na stripech a sekvenováním

<b>Č. vzorku</b>	<b>PCR-RFLP</b>	<b>Reverzní hybridizace</b>	<b>Sekvenování</b>
<b>3</b>	CT/AA	/AA	CT/AA
<b>10</b>	CC/GA	CC/GG	CC/GG
<b>15</b>	TT/AA	TT/AA	TT/AA
<b>16</b>	TT/AA	TT/AA	TT/AA

Z tabulky 18 lze vyčíst, že všechny genotypy stanovené metodou reverzní hybridizace na stripech korelují s výsledky sekvenování, avšak u vzorku č. 10 se neshodují s metodou PCR-RFLP.

## 6 Diskuse

V praktické části této bakalářské práce bylo zpracováno celkem 20 vzorků metodou Sangerova sekvenování. Zastoupení genotypů v souboru vzorků bylo různorodé s upřednostněním výběru jedinců s kombinovaným genotypem. Ostatní vzorky byly buď homozygotní nebo heterozygotní v obou polymorfismech a byly zařazeny zejména z důvodu ověření obou metodických přístupů.

Porovnáním výsledků získaných touto metodou s výsledky získanými metodou PCR-RFLP byly odhaleny čtyři neshody. Z deseti kombinovaných genotypů, které byly původně stanoveny metodou PCR-RFLP, byly potvrzeny po zpracování metodou sekvenace čtyři, a to na základě analýzy obou polymorfismů. Pokud bychom předpokládali, že u pěti vzorků, u kterých byl sekvenací vyšetřen pouze jeden polymorfismus, by při vyšetření druhého polymorfismu došlo k potvrzení kombinovaného genotypu na základě předpokladu výsledků metody PCR-RFLP, činil by celkový počet takových genotypů devět.

Autoři vědeckých prací ve výzkumech volí často odlišný soubor vzorků s jiným zastoupením jedinců, u nichž vyšetřují laktózovou intoleranci buď prvně, a to zejména pro získání dat prevalence v dané oblasti, nebo pro výzkum konkrétních alel a jejich působení. Přítomnost kombinovaných genotypů v souboru vzorků jakožto cíl zkoumání není popisována.

Enattah et al. (2002) poprvé definoval dva polymorfismy spojené s perzistencí laktázy, C/T-13910 a G/A-22018. Následně jsou popisovány tři možné varianty genotypů, CC/GG, TT/AA a CT/GA. Teprve několik let poté Bulhões et al. (2007) ve své studii poprvé uvedl genotyp čtvrtý, CT/AA. V souboru deseti jedinců, kteří u sebe předpokládali perzistenci laktázy, byl takový genotyp nalezen pouze jednou. V mém souboru 20 pacientů se vyskytovali s tímto genotypem tři jedinci. Jelikož není osud těchto jedinců znám, nelze získat jejich subjektivní poznatky o individuální toleranci laktózy. Ve výše zmíněné práci byl pacient vyšetřen dechovým vodíkovým testem, jehož výsledek byl negativní. Na základě těchto poznatků by se dalo předpokládat, že fenotypovým projevem tohoto genotypu je perzistence laktázy.

Pacienty s kombinovaným genotypem lze rozdělit na jedince s genotypem CT/AA, CT/GG, CC/GA a TT/GA. Výskyt prvního genotypu byl již popsán výše, genotypy

CT/GG a TT/GA nejsou v odborných publikacích vůbec popisovány a nevyskytovaly se ani v mém souboru vzorků.

O genotypu CC/GA se prvně zmínil Santonocito et al. (2015). Na základě analýzy 1426 pacientů popsal 38 jedinců (2,7 %) s tímto genotypem. Z celého souboru prošlo 64 jedinců dechovým vodíkovým testem, mezi nimiž byl pouze jeden s genotypem CC/GA. Výsledek dechového testu byl negativní. Přesto byl v závěru této práce tento genotyp spojen s laktózovou intolerancí. Jelikož bylo procento provedených dechových testů a množství dostupných informací o tomto genotypu nedostatečné, nelze hodnotit význam negativity tohoto testu. Jak zmiňuje Santonocito et al. (2015) i další autoři, je právě polymorfismus C/T-13910 považován za dominantní a významnější než polymorfismus G/A-22018. Protože 18 pacientů vyšetřených dechovým testem mělo dle genotypu předpoklad pro laktózovou intoleranci, ale vodíkový test vyšel přesto jako negativní, předpokládám, že právě proto byl i genotyp CC/GA ve výše uvedeném článku takto vyhodnocen.

V rámci získání objektivnějších výsledků o zastoupení kombinovaných genotypů v širším souboru, byly jako součást této práce vyhodnoceny výsledky vyšetření laktózové intolerance získané v rozmezí let 2014–2018 genetickou laboratoří GENLABS. V těchto letech bylo provedeno celkem 231 vyšetření laktózové intolerance metodou PCR-RFLP, z nichž 21 jedinců (9,1 %) mělo ve výsledku kombinovaný genotyp. Nejčastěji zjištěným kombinovaným genotypem byl CT/AA v jedenácti případech (4,8 %), druhým CC/GA u osmi vzorků (3,5 %). Zajímavostí je, že se zde vyskytoval i genotyp TT/GA, a to ve dvou případech (0,9 %). Vzorky s tímto genotypem nemohly být bohužel osekvenovány z důvodu nedostatku DNA izolátu.

Tabulka shrnující výsledky stanovení laktózové intolerance genetickou laboratoří GENLABS je uvedena v příloze 1. Celkem bylo hodnoceno 231 jedinců, přičemž nejčastějším genotypem vyskytujícím se v tomto souboru byl genotyp CT/GA u 124 jedinců (53,7 %), hned po něm genotyp CC/GG u 61 vzorků (26,4 %). Hubáček et al. (2017) se zabýval frekvencí alel polymorfismu C/T-13910 na území České republiky. Z 288 jedinců se slovanskými kořeny (článek porovnával frekvenci genotypů Slovanů a romské populace) mělo 146 (50,7 %) genotyp heterozygotní a 68 jedinců (23,6 %) genotyp CC. I přes to, že výzkum se zabýval pouze jedním polymorfismem, lze mezi frekvencemi těchto dvou zmíněných souborů nalézt shodu. V čem se data

rozcházejí, je zastoupení jedinců s genotypem TT/AA, kdy Hubáček et al. (2017) uvádí 74 jedinců (24,7 %), zatímco soubor laboratoře 25 (10,8 %). Hubáček et al. (2017) naopak neuvádí přítomnost kombinovaných genotypů.

Jak již bylo zmíněno výše, byly čtyři vzorky vyhodnoceny metodou PCR-RFLP neshodně. První z nich, vzorek č. 9, vykazoval neshodu v polymorfismu C/T-13910. Jak je vidět na obrázku 13, jedná se o jeden ze vzorků, u kterých byla patrná rozdílná výška píků zastupujících alelu C a T. Tento rozdíl může být příčinou rozdílného zastoupení buněk nesoucích ve své DNA alelu C a/nebo T, tzv. klonalitou, nebo možnou kontaminací, ke které mohlo dojít během provedení buklárního stěru.

Náznak klonality byl nalezen u dalších třech vzorků, konkrétně u vzorku č. 4, 12 a 15. Sekvence těchto vzorků jsou v příloze 2. Jelikož u těchto vzorků nebyla shledána neshoda a výsledky obou metod se shodovaly, předpokládám, že výsledné vyhodnocení sekvencí programem záleží na poměru obou píků.

Vzorek č. 10, který byl dalším rozdílně vyhodnoceným vzorkem, byl nesprávně určen v polymorfismu G/A-22018. Původ této chyby byl objasněn právě sekvenováním, kdy byla v sousedním lokusu 22.017 objevena jiná mutace. V tomto místě se za normálních okolností nachází pouze alela C, avšak zde byla patrná heterozygotní alela CT, jak je vidět na obrázku 11. Tato záměna způsobila vytvoření nového restrikčního místa a došlo tedy k restrikčnímu štěpení i přes to, že pro hledaný polymorfismus byl homozygotní jedinec GG. Současně s výsledkem PCR-RFLP byl u vzorku č. 10 dostupný výsledek získaný metodou reverzní hybridizace na stripech. Genotyp vzorku byl touto metodou vyhodnocen správně, přestože Vyhliďalová (2018) popisuje slabou reakci na testovacím hybridizačním stripu, kdy kvůli této záměně nemohla být hybridizace ke stripu zcela specifická.

U vzorku č. 13, s neshodou v polymorfismu C/T-13910 a vzorku č. 12, s neshodou v polymorfismu G/A-22018, nebyly neshody bohužel vysvětleny. Sekvence obou vzorků, které však značí pro jednoznačné výsledky, lze nalézt v příloze 2. V obou případech mohlo jít o nesprávné odečtení výsledků po první analýze provedené metodou PCR-RFLP. Analýzu však nebylo možné z důvodu vyčerpání vzorku zopakovat.

V souvislosti s vyšetřením polymorfismu G/A-22018 metodou sekvenování byla při odečítání výsledků opakovaně (celkem u jedenácti sekvencí) nalezena přítomnost nové

mutace v heterozygotním stavu v lokusu 21.909. Nalezená mutace byla pokaždé prokázána pouze sekvenací s použitím primeru forward, a to v části sekvence, která nebyla příliš kvalitní. Jelikož sekvenací s primerem reverse nebyla tato mutace nalezena, domnívám se, že se jedná o artefakt metody vznikající během sekvenování. Domněnku může potvrdit fakt, že o této mutaci nelze najít zmínku v odborných člancích, a taktéž není zařazena v databázi SNP. S největší pravděpodobností se tedy nejedná o klinicky významný SNP ale pouze o chybu nejasného původu vzniklou během vyšetření.

Poslední část diskuse bych ráda věnovala srovnání všech použitých metod. Výsledky metody reverzní hybridizace na stripech byly dostupné u čtyř vzorků. Přestože byly tyto výsledky převzaté, kladně hodnotím shodu s výsledky sekvenování a s výjimkou jednoho vzorku také metodou PCR-RFLP. U jednoho vzorku nebyl z neznámého důvodu dostupný výsledek polymorfismu C/T-13910, ale metodou sekvenování se tento polymorfismus podařilo zpětně vyšetřit. Zároveň hodnotím pozitivně správné vyhodnocení vzorku č. 10, u kterého metoda PCR-RFLP bohužel ani nemohla poskytnout správný výsledek, což se dá vzhledem k okolnostem, které byly výše uvedeny, předpokládat. Díky nesprávně zjištěnému kombinovanému genotypu se naopak podařilo odhalit zcela novou variantu či mutaci, která zatím nebyla nikde v literatuře popsána a nejsou tedy známy ani její dopady z hlediska tolerance laktózy.

U metody restrikčního štěpení oceňuji zejména jednoduchost přípravy. Nevýhodou bohužel může být nedostatečná citlivost k určitým nečekaným situacím, jako právě třeba přítomnost jiné mutace, kterou tato metoda není schopna odhalit. Současně si myslím, že odečítání výsledků z gelu není vždy snadné a subjektivní hodnocení výzkumníka hraje velkou roli. Koncentrace PCR produktu může mít taktéž vliv na odečítání výsledků. Důvodem jsou slabé, nebo téměř nedekovatelné produkty PCR, popř. slabé restrikční fragmenty. Lze se domnívat, že některé vzorky mohou být na základě obtížného odečtení z gelu vyhodnoceny nesprávně.

V případech, kdy odečítání z gelu není jednoznačné, nebo byl vyhodnocen kombinovaný genotyp, volila bych jako druhou metodu pro ověření výsledků metodu sekvenování. Sekvenování se jeví na základě získaných poznatků taktéž jako vhodné i pro občasné referenční ověření jednoznačných výsledků. Jak se však ukázalo v této práci, i výsledky sekvenování mohou být někdy nejasné. V případě možné klonality vzorku by bylo



vhodné měření zopakovat, případně použít jinou metodu pro stanovení laktózové intolerance, nebo si vyžádat nový odběr.

U sekvenování je bohužel nutné zohlednit, že ne každá laboratoř vlastní sekvenátor. Možností je buď nákladné pořízení sekvenátoru, či využití jiné firmy, která nabízí sekvenování komerčně. Je poté už na zvážení laboratoře, který způsob bude preferovat, nejen vzhledem k objemu analyzovaných vzorků. Kromě zmíněné ne/dostupnosti přístrojového vybavení je nutné ještě zmínit další důležitý faktor, a to vlastní hodnocení výsledků. Vyhodnocení sekvenací se může zdát jako složitější proces, jelikož je potřeba sekvence upravit, zkontrolovat a řádně projít. Ne všechny programy umožňující práci se sekvencemi jsou freewarové a pořízení kvalitnějšího programu může představovat další náklady.

Další možností testování může být využití certifikovaného kitu, který pracuje na principu reverzní hybridizace na stripu či real-time PCR. Tyto metody jsou více robustní a méně náročné na koncentraci a kvalitu DNA, která zásadně ovlivňuje výsledky PCR-RFLP. Výhodou PCR-RFLP ovšem zůstává její cena a také doba potřebná pro analýzu. Sekvence, real-time PCR i reverzní hybridizace jsou vždy finančně i časově náročnější.

I přes složitější přípravu vzorku, kterou sekvenování zahrnuje, však na základě získaných poznatků hodnotím metodu sekvenování jako spolehlivější. Pokud bych zohlednila fakt, že ne každá laboratoř vlastní sekvenátor, přiklání bych se k metodě reverzní hybridizace. Je však samozřejmostí, že počet zkoumaných vzorků touto metodu byl malý a pro detailnější porovnání metod reverzní hybridizace a PCR-RFLP by byla potřeba větší soubor vzorků.

Při hodnocení sekvenačních dat mě překvapil fakt, že ačkoliv se myslím, že je téma laktózové intolerance aktuální a výzkum se během poslední desetiletí významně posunul dopředu, není označení genu pro laktázu často jednotné. Jednalo se především o program BLAST. Víme, že mutace se nenachází přímo v oblasti genu pro laktázu, ale v *MCM6* genu, který ovlivňuje translaci genu *LCT*. V programu BLAST se však v názvu polymorfismu C/T-13910 lze setkat s pojmenováním „Homo sapiens isolate ANGH156 MCM6 gene, intron“ Zatímco SNP G/A-22018 je označen jako „Homo sapiens lactase (LCT), RefSeqGene (LRG\_338) on chromosome 2“.

Myslím si, že problematika laktóзовé intolerance přináší stále nové možnosti pro další výzkum, jako jsou právě např. kombinované genotypy, detailnější objasnění kooperace genů *MCM6* a *LCT* nebo existence dalších alel zodpovědných za laktóзовou intoleranci, resp. laktóзовou perzistenci.

Současně by bylo vhodné nepodceňovat edukaci široké veřejnosti ani osvětu lékařů a šířit tak povědomí o laktóзовé intoleranci. To by mohlo vést k urychlení celého diagnostického procesu, jakožto pacienta, který by při znalosti příznaků neodkládal návštěvu lékaře a lékař, který by mohl dříve zahájit léčbu. I přes to, že se nejedná o smrtelnou nemoc, mohou potíže významně ovlivňovat spokojenost pacienta a jeho kvalitu života. I z tohoto hlediska je výhodné zahájit léčbu co nejdříve. Pak je jen věcí lékaře, jakou metodu pro vyšetření laktóзовé intolerance zvolí. Přestože genetické testování nepatří mezi rutinní, je v některých případech nenahraditelné.

## 7 Závěr

V odborné rešerši této bakalářské práce se snažím poskytnout komplexní informace o laktóзовé intoleranci, o jejím průběhu, diagnostice, i možnostech léčby.

Na část teoretickou navazuje část praktická, ve které jsem některé metody zmíněné v možnostech diagnostiky přenesla do praxe. Z 231 pacientů vyšetřených genetickou laboratoří GENLABS v období let 2014–2018 na přítomnost laktóзовé intolerance metodou PCR-RFLP bylo do této bakalářské práce vybráno a vyšetřeno 20 vzorků. Pro opětovné vyšetření těchto vzorků byla konkrétně zvolena metoda Sangerova sekvenování, jejíž výsledky byly srovnány s metodami PCR-RFLP a částečně také s reverzní hybridizací na stripech.

Výsledky mé studie ukázaly, že 4 vzorky (20 %) byly na základě metody PCR-RFLP vyhodnoceny nesprávně. Dvě neshody byly nalezeny u polymorfismu C/T-13910, kde však byla u jednoho vzorku zároveň odhalena možná příčina. Jednalo se o jedince, jehož alely C a T nebyly zastoupeny rovnoměrně a metoda PCR-RFLP proto nebyla zřejmě dostatečně citlivá, aby došlo k rozštěpení PCR produktu. U polymorfismu G/A-22018 byla příčina jedné neshody konkrétně objasněna výskytem nové mutace, jejíž přítomnost tvořila nové restrikční místo pro štěpení a v důsledku toho se amplifikační produkt rozštěpil. Příčiny dalších neshod nemohly být objasněny z důvodu nedostatku DNA izolátu.

Z deseti kombinovaných genotypů byly sekvenováním obou polymorfismů nalezeny čtyři. Počet by mohl být vyšší po sekvenaci druhého polymorfismu u vzorků, u nichž byl vyšetřen pouze jeden polymorfismus. Výskyt kombinovaných genotypů by za předpokladu kompletní analýzy a shody s výsledky metody PCR-RFLP činil 9 jedinců. Ze čtyř možných kombinovaných genotypů se v této práci vyskytovaly dva typy, a to CT/AA a CC/GA. Genotyp TT/GA se sice vyskytoval v souboru vzorků genetické laboratoře GENLABS, ale přestože byl výběr vzorků do této práce cílený, vzorky s tímto genotypem nemohly být zařazeny opět z důvodu nedostatku DNA.

Všechny cíle práce byly naplněny a hypotéza (předpokládám, že metodou sekvenování lze potvrdit přítomnost kombinovaných genotypů) byla částečně potvrzena. Metodou sekvenování byly potvrzeny kombinované genotypy, avšak u výsledků, které byly metodou PCR-RFLP vyhodnoceny neshodně, byl původ chyby objasněn pouze v některých případech. Detailnější analýze obou metod se věnuji v diskusi.

Z metod uvedených v této bakalářské práci sledávám na základě výsledků metodu sekvenování jako nejspolehlivější, přestože tato metoda není vhodná do rutinních provozů, zejména menších laboratoří. S přihlédnutím na absenci sekvenátoru v laboratoři bych jako druhou možnost genetického testování volila metodu reverzní hybridizace na stripu. Přestože tato metoda nebyla v této práci prakticky použita, hodnotím kladně správné určení rozporuplných výsledků.

V průběhu této práce bylo sice odhaleno několik chybně stanovených výsledků získaných analýzou PCR-RFLP, zároveň nám ale odhalení chyby umožňuje zamyslet se nad metodickými nedostatky tohoto testování a ty postupně eliminovat. V případě nejasností je možné doplnit analýzu jinou citlivější analytickou metodou tak, abychom získali vždy pravdivé výsledky.

## 8 Seznam použitých zdrojů

1. BAYLESS, T. M., BROWN, E., PAIGE, D. M., 2017. Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance. *Current Gastroenterology Reports* [online]. 19(23), [cit. 2019-01-22], doi: 10.1007/s11894-017-0558-9. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11894-017-0558-9>
2. BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 194 s. ISBN 978-80-246-3224-7.
3. BODLAJ, G., STÖCHER, M., HUFNAGL, P., HUBMANN, R., BIESENBACH, G., STEKEL, H., BERG, J., 2006. Genotyping of the lactase-phlorizin hydrolase -13910 polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. *Clinical Chemistry*. 52(1), 148-151., doi: 10.1373/clinchem.2005.057240.
4. BRDIČKA, R., DIDDEN, W., 2015. *Genetika v klinické praxi III*. Praha: Galén. 189 s. ISBN 978-80-7492-226-8.
5. BROWN, T. A., 2007. *Klonování genů a analýza DNA*. Olomouc: Univerzita Palackého. 408 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
6. BULHÕES, A. C., GOLDANI, H. A., OLIVEIRA, F. S., MATTE, U. S., MAZZUCA R. B., SILVEIRA, T. R., 2007. Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40 (11), 1441-6. ISSN 0100-879X.
7. CAMPBELL, A. K., MATTHEWS, S. B., 2005. Darwin's illness revealed. *Postgraduate Medical Journal*. 81(954), 248-251, doi: 10.1136/pgmj.2004.025569.
8. CAMPBELL, A. K., WAUD, J. P., MATTHEWS, S. B., 2005. The molecular basis of lactose intolerance. *Science Progress*. 88(3), 157-202. ISSN 0036-8504.
9. COELHO, M., LUISELLI, D., BERTORELLE, G., LOPES, A. I., SEIXAS, S., DESTRO-BISOL, G., ROCHA, J., 2005. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. *Human Genetics*. 117(4), 329-39, doi: 10.1007/s00439-005-1322-z.

10. DENG, Y., MISSELWITZ, B., DAI, N., FOX, M., 2015. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. *Nutrients* [online]. 7(9), 8020-35, [cit. 2019-01-15], doi: 10.3390/nu7095380. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4586575/>
11. ENATTAH, N. S., SAHI, T., SAVILAHTI, E., TERWILLIGER, J. D., PELTONEN, L., JÄRVELÄ, I., 2002. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature genetics*. 30 (2), 233-7, doi: 10.1038/ng826.
12. FOJÍK, P., FALT, P., URBAN, O., NOVOSAD, P., RICHTEROVÁ, L., BÓDAY, A., 2013. Laktózová intolerance. *Practicus*. 12(5), 712. ISSN 1213-8711.
13. FRIC, P., 2002. Probiotics in Gastroenterology. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 40(3), 197-201, doi: 10.1055/s-2002-22328.
14. FRITZSCHEOVÁ, D., 2015. *Intolerance laktózy*. Bratislava: Noxi. 125 s. ISBN 978-80-8111-258-4.
15. FRÜHAUF, P., 2010. Laktózová Intolerance. *Československá Pediatrie*. 65(3), 126-131. ISSN 0069-2328.
16. FRÜHAUF, P., SZITÁNYI, P., 2013. *Výživa v pediatrii*. Praha: Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví. 64 s. ISBN: 978-80-87023-26-6.
17. FUCHS, M., 2016. *Potravinová alergie a intolerance*. Praha: Mladá fronta. 447 s. ISBN 978-80-204-3757-0.
18. GANONG, W. F., 2005. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vydání. Praha: Galén. 890 s. ISBN 80-7262-311-7.
19. GERBAULT, P., MORET, C., CURRAT, M., SANCHEZ-MAZAS, A., 2009. Impact of Selection and Demography on the Diffusion of Lactase Persistence. *PLoS ONE* [online]. 4(7), [cit. 2019-02-02], doi: 10.1371/journal.pone.0006369. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0006369>

20. GILL, H. S., GUARNER, F., 2004. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal*. 80(947), 516-526, doi: 10.1136/pgmj.2003.008664.
21. HE, T., PRIEBE, M. G., HARMSSEN, H. J., STELLAARD, F., SUN, X., WELLING, G. W., VONK, R. J., 2006. Colonic Fermentation May Play a Role in Lactose Intolerance in Humans. *The Journal of Nutrition*. 136(1), 58-63, doi: 10.1093/jn/136.1.58.
22. HEINE, R. G., ALREFAEE, F., BACHINA, P., DE LEON, J. C., GENG, L., GONG, S., MADRAZO, J. A., NGAMPHAIBOON, J., ONG, C., ROGACION, J. M., 2017. Lactose intolerance and gastrointestinal cow's milk allergy in infants and children – common misconceptions revisited. *World Allergy Organization Journal* [online]. 10(1), [cit. 2019-01-15], doi: 10.1186/s40413-017-0173-0. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5726035/>
23. HOVE, H., NØRGAARD, H., MORTENSEN, P. B., 1999. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *European Journal of Clinical Nutrition*. 53(5), 339-50. ISSN 0954-3007.
24. HUBÁČEK, J. A., ADÁMKOVÁ, V., ŠEDOVÁ, L., OLÍŠAROVÁ, V., ADÁMEK, V., TÓTHOVÁ, V., 2017. Frequency of adult type-associated lactase persistence LCT-13910C/T genotypes in the Czech/Slav and Czech Roma/Gypsy populations. *Genetics and Molecular Biology* [online] 40(2), 450-452, [cit. 2019-04-08], doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0071. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5488455/>
25. INGRAM, C. J. E., MULCARE, C. A., ITAN, Y., THOMAS, M. G., SWALLOW, D. M., 2009. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human Genetics*. 124(6), 579-91, doi: 10.1007/s00439-008-0593-6.
26. JOSEPH, F., ROSENBERG, A. J., 1986. Identifying Lactose Malabsorbers Through Breath Hydrogen Measurements. *Laboratory Medicine*. 17(2), 85–86, doi:10.1093/labmed/17.2.85.

27. KASPER, H., 2015. *Výživa v medicíně a dietetika*. Překlad 11. vydání. Praha: Grada. 572 s. ISBN 978-80-247-4533-6.
28. KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
29. KOPÁČEK, J., 2014. *Mléko a mléčné výrobky: Jak poznáme kvalitu?* [online]. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, Potravinářská komora ČR [cit. 2019-01-11]. 31 s. ISBN 978-80-87719-18-3. Dostupné z: [https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace/2014\\_SCS\\_Mleko\\_web.pdf](https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace/2014_SCS_Mleko_web.pdf)
30. KRAMER-PRIESCH, H., KIEFER, I., 2009. *Laktóza a fruktóza*. Praha: Grada. 126 s. ISBN 978-80-247-2487-4.
31. LACASSIE, Y., WEINBERG, R., MÖNCKEBERG, F., 1978. Poor predictability of lactose malabsorption from clinical symptoms for Chilean populations. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 31(5), 799-804, doi: 10.1093/ajcn/31.5.799.
32. LAW, D., CONKLIN, J., PIMENTEL, M., 2010. Lactose Intolerance and the Role of the Lactose Breath Test. *The American Journal of Gastroenterology*. 105(8), 1726–8, doi:10.1038/ajg.2010.146.
33. LOMER, M. C. E., PARKES, G. C., SANDERSON, J. D., 2007. Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 27(2), 93-103, doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x.
34. MATTAR, R., MONTEIRO, M. D. S., VILLARES, C. A., DOS SANTOS, A. F., CARRILHO, F. J., 2008. Single nucleotide polymorphism C/T-13910, located upstream of the lactase gene, associated with adult-type hypolactasia: Validation for clinical practice. *Clinical Biochemistry* [online]. 41 (7-8), 628-30, [cit. 2019-01-15], doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.01.006. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912008000143>



35. MATTAR, R., DE CAMPOS MAZO, D. F., CARRILHO F. J., 2012. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clinical and Experimental Gastroenterology* [online]. 5, 113-121, [cit. 2019-02-12], doi: 10.2147/CEG.S32368. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3401057/>
36. MATTHEWS, S. B., WAUD, J. P., ROBERTS, A. G., CAMPBELL, A.K., 2005. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgraduate Medical Journal*. 81(953), 167-173, doi: 10.1136/pgmj.2004.025551.
37. MISSELWITZ, B., POHL, D., FRÜHAUF, H., FRIED, M., VAVRICKA, S. R., FOX, M., 2013. Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. *United European Gastroenterology Journal*. 1(3), 151-159, doi: 10.1177/2050640613484463.
38. MONTALTO, M., NUCERA, G., SANTORO, L., CURIGLIANO, V., VASTOLA, M., COVINO, M., CUOCO, L., MANNA, R., GASBARRINI, A., GASBARRINI, G., 2005. Effect of exogenous beta-galactosidase in patients with lactose malabsorption and intolerance: a crossover double-blind placebo-controlled study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 59(4), 489-93, doi: 10.1038/sj.ejcn.1602098.
39. MULCARE, C. A., WEALE, M. E., JONES, A. L., CONNELL, B., ZEITLYN, D., TAREKEGN, A., SWALLOW, D. M., BRADMAN, N., THOMAS, M. G., 2004. The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C-13.9kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 74(6), 1102-10, [cit. 2019-03-18], doi: 10.1086/421050. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707628377>
40. NILSSON, T. K., OLSSON, L. A., 2008. Simultaneous genotyping of the three lactose tolerance-linked polymorphisms LCT -13907C>G, LCT -13910C>T and LCT -13915T>G with Pyrosequencing technology. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 46(1), 80-4, doi: 10.1515/CCLM.2008.015.
41. NUSSBAUM, R. L., McINNES, R. E., WILLARD, H. F., 2004. *Klinická genetika*. Praha: Triton. 426 s. ISBN 80-7254-475-6

42. PHILLIPS, S. F., 1999. Irritable bowel syndrome: making sense of it all. *Baillieres Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* [online]. 13(3), 489-503, [cit. 2018-11-25], doi: 10.1053/bega.1999.0042. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521691899900422>
43. ROSYPAL, S., DOŠKAŘ, J., PETRZIK, K., ŘŮŽIČKOVÁ, V., 2002. *Úvod do molekulární biologie, IV*. 3. vydání. Brno: Grafex. 300 s. ISBN 80-902562-4-4
44. SANTONOCITO, C., SCAPATICCI, M., GUARINO, D., ANNICCHIARICO, E. B., LISCI, R., PENITENTE, R., GASBARRINI, A., ZUPPI, C., CAPOLUONGO, E., 2015. Lactose intolerance genetic testing: is it useful as routine screening? Results on 1426 south-central Italy patients. *Clinica Chimica Acta* [online]. 439, 14-17, [cit-2019-04-08], doi: 10.1016/j.cca.2014.09.026. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898114004227>
45. SNUSNAD, D. P., SIMMONS, M. J., 2009. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita. 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2
46. STORHAUG, C. L., FOSSE, S. K., FADNESS, L. T., 2017. Country, regional, and global estimates for lactose malabsorption in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterology & Hepatology* [online]. 2(10), 738-746, [cit. 2019-01-11], doi: 10.1016/S2468-1253(17)30154-1. Dostupné z: [https://www.thelancet.com/pdfs/journals/langas/PIIS2468-1253\(17\)30154-1.pdf](https://www.thelancet.com/pdfs/journals/langas/PIIS2468-1253(17)30154-1.pdf)
47. SWAGERTY, D. L., WALLING, A. D., KLEIN, R. M., 2002. Lactose Intolerance. *American Family Physician*. 65(9), 1845-50. ISSN 0002-838X.
48. SWALLOW, D. M., 2003. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Review of Genetics*. 37, 197-219, doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143820
49. SZILAGYI, A., ISHAYEK, N., 2018. Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. *Nutrients* [online]. 10(12), [cit. 2019-01-22], doi: 10.3390/nu10121994. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6316316/>

50. ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
51. VESA, T. H., MARTEAU, P., KORPELA, R., 2000. Lactose intolerance. *Journal of the American College of Nutrition*. 19(2), 165-175, doi: 10.1080/07315724.2000.10718086.
52. VYHLÍDALOVÁ, N., 2018. *Laktózová intolerance a její genetická vyšetření*. České Budějovice. Bakalářská práce. ZSF JU.
53. ZECCA, L., MESONERO, J. E., STUTZ, A., POIRÉE, J. C., GIUDICELLI, J., CURSIO, R., GLOOR, S. M., SEMENZA, G., 1998. Intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH): the two catalytic sites; the role of the pancreas in pro-LPH maturation. *FEBS Letters*. 435(2-3), 225-8, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01076-X.

## 9 Přílohy

### Příloha 1

Tabulka zastoupení genotypů ze souboru vzorků vyšetřených genetickou laboratoří GENLABS v období let 2014–2018.

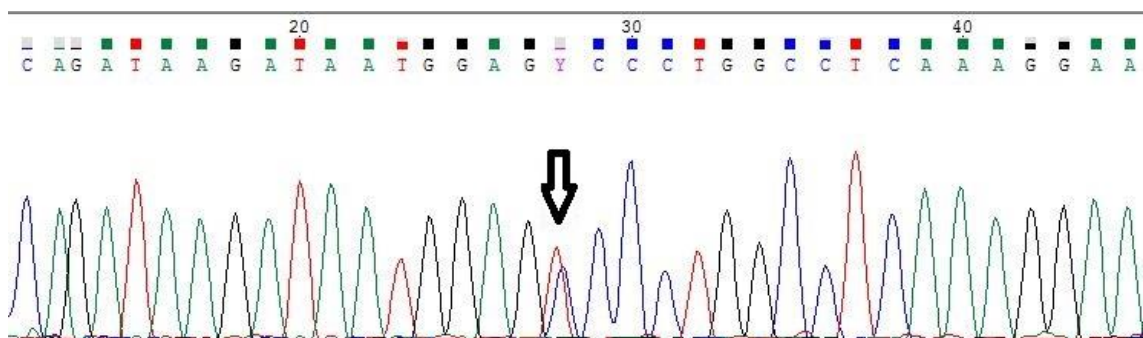
<b>Genotyp</b>	<b>Počet jedinců</b>		<b>Celkový počet</b>	
<b>TT/AA</b>	25	10,8 %	86	37,2 %
<b>CC/GG</b>	61	26,4 %		
<b>CT/GA</b>	124	53,7 %	124	53,7 %
<b>CT/AA</b>	11	4,8 %	21	9,1 %
<b>TT/GA</b>	2	0,9 %		
<b>CC/GA</b>	8	3,5 %		
<b>Celkem</b>	231			

## Příloha 2

V této příloze jsou uvedeny všechny získané sekvence. Pod číslem vzorku je vždy uveden použitý primer, tzv. „13910r“ je označení pro primer reverse u polymorfismu C/T-13910, „22018r“ je označení pro primer reverse u polymorfismu G/A-22018 a „22018f“ poté značí primer forward u stejného polymorfismu. Za pomlčkou, která následuje po označení primeru, je stručný popis výsledku sekvenačního grafu.

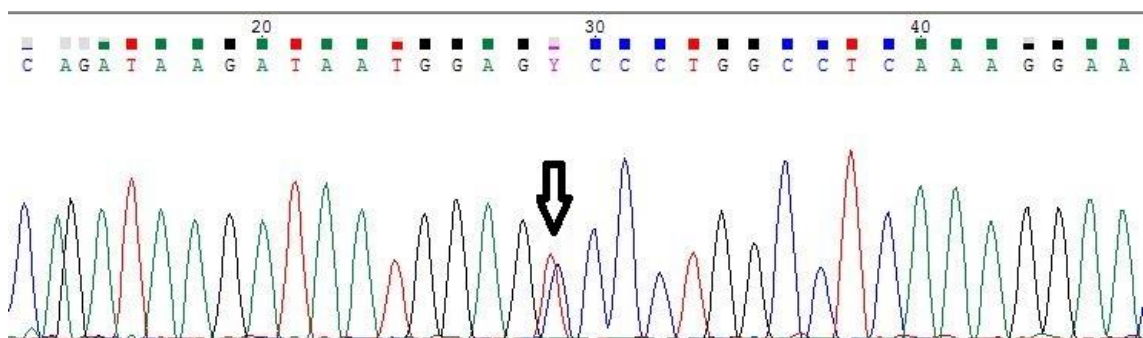
### Vzorek č. 1

13910r – Na obrázku lze vidět dle IUPAC codes písmeno Y, které značí přítomnost alely C i alely T, tzv. heterozygota 13910 C/T.



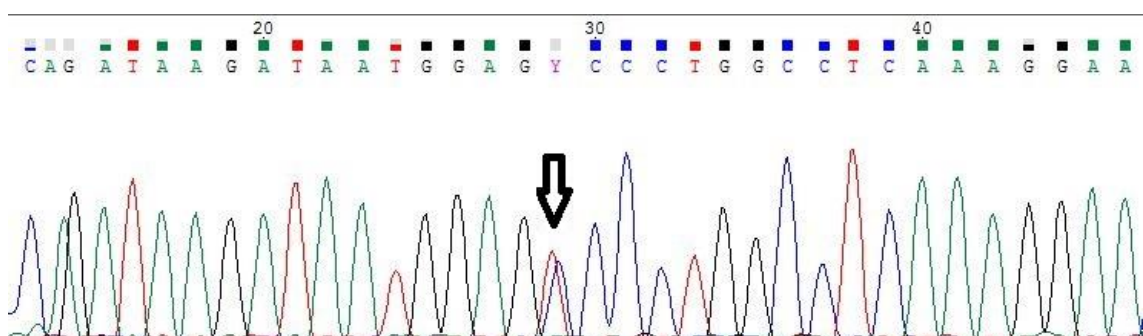
### Vzorek č. 2

13910r – Jedná se o heterozygota 13910 C/T.

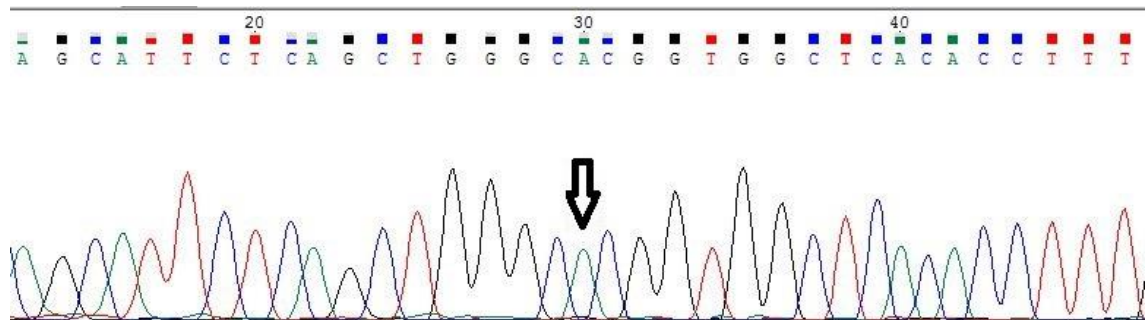


### Vzorek č. 3

13910r – Jedná se o heterozygota 13910 C/T.

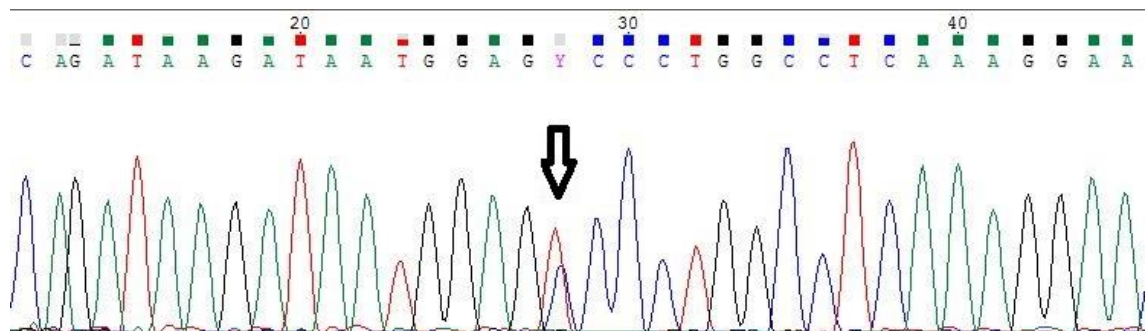


22018r – Zde se jedná o homozygota 22018 A/A, protože na grafu je patrný pouze jeden pík A



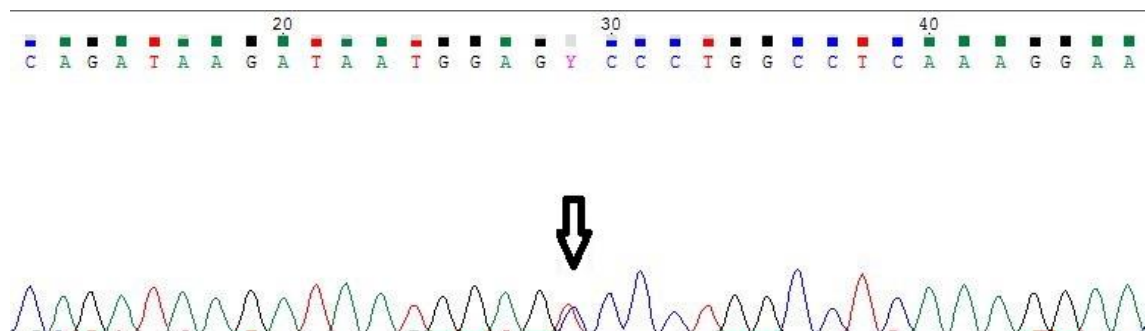
Vzorek č. 4

13910r – Jedná se o heterozygota 13910 C/T. Zde je patrný náznak klonality, který ovšem vzhledem ke shodě výsledků obou metod není v tomto případě považován za relevantní.

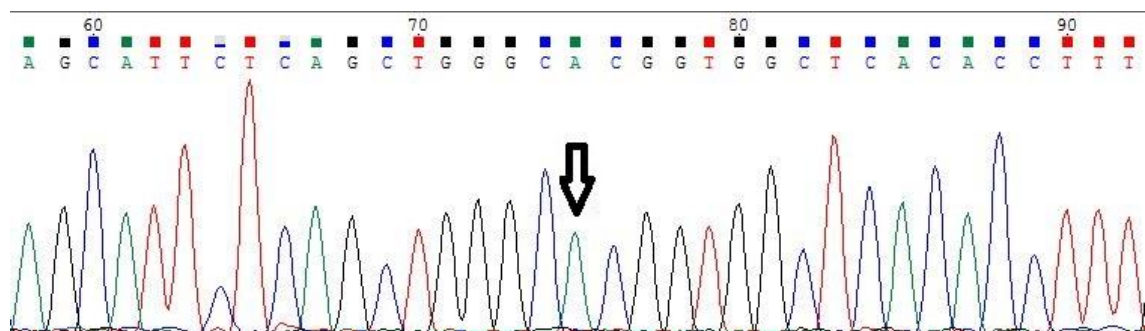


Vzorek č. 5

13910r – Jedná se o heterozygota 13910 C/T.

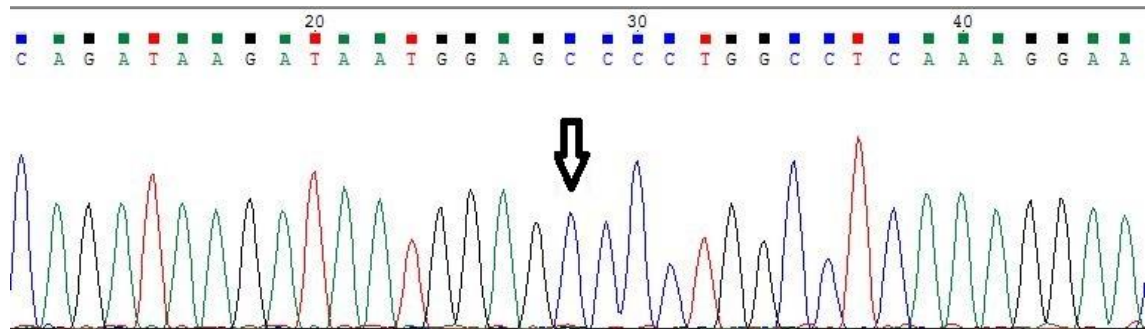


22018f – Jedná se o homozygota 22018 A/A.

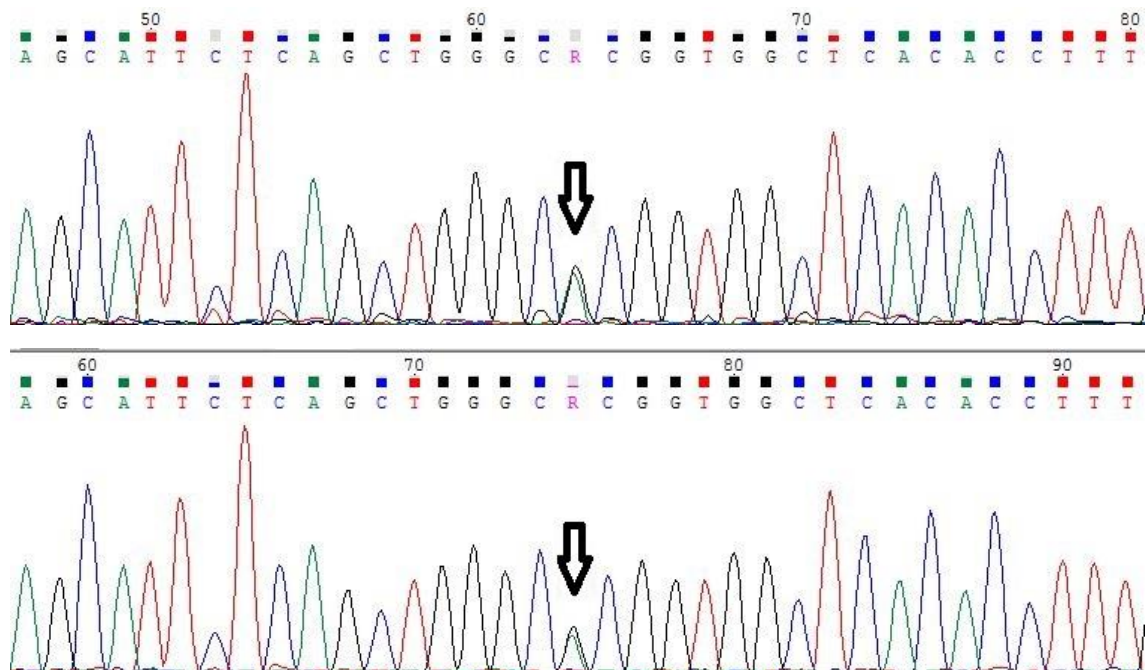


Vzorek č. 6

13910r – Jedná se o homozygota 13910 C/C.

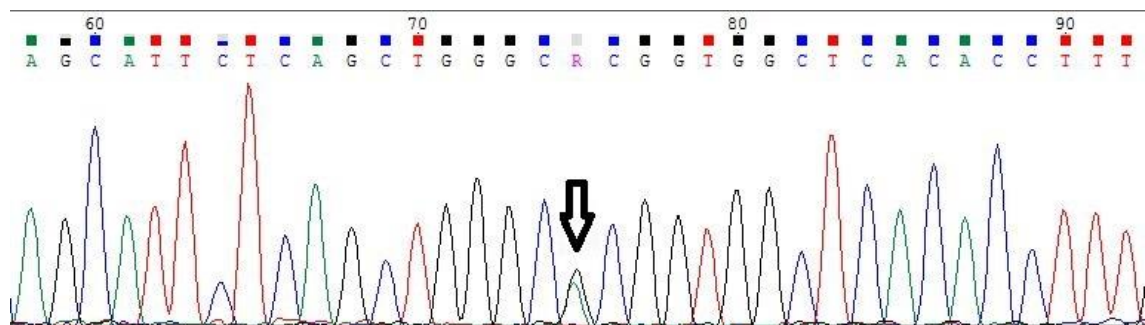


22018f – Na obrázku lze vidět dle IUPAC codes písmeno R, které značí přítomnost alely G i alely A, tzv. heterozygota 22018 G/A. U tohoto vzorku jsou dostupné dvě sekvence.



Vzorek č. 7

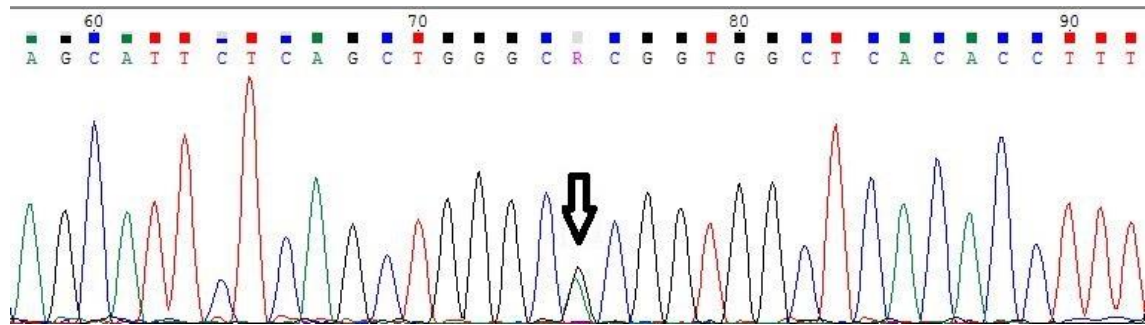
22018f – Jedná se o heterozygota 22018 G/A.





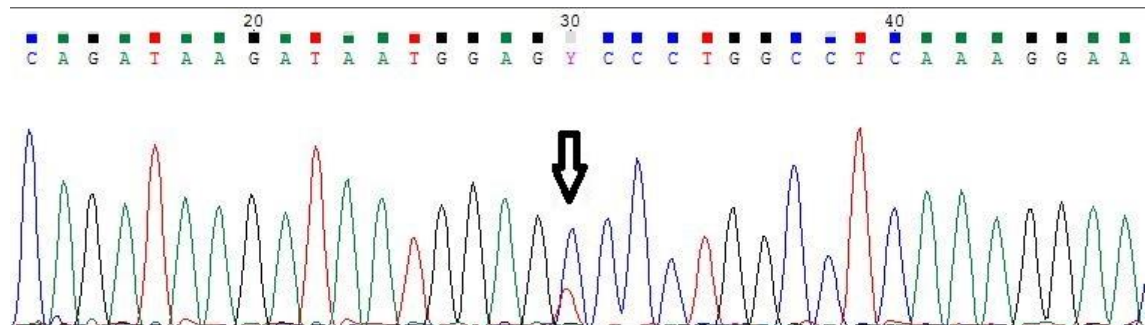
Vzorek č. 8

22018f – Jedná se o heterozygota 22018 G/A.

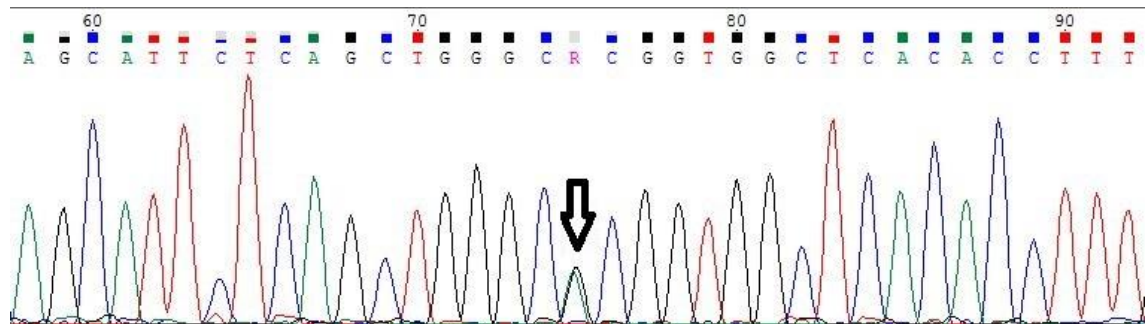


Vzorek č. 9

13910r – Dle sekvence se jedná o heterozygota 13910 C/T, zatímco metodou PCR-RFLP byl tento vzorek vyhodnocen jako homozygot 13910 C/C. Jeden z důvodu neshody by mohla být právě možná klonalita.



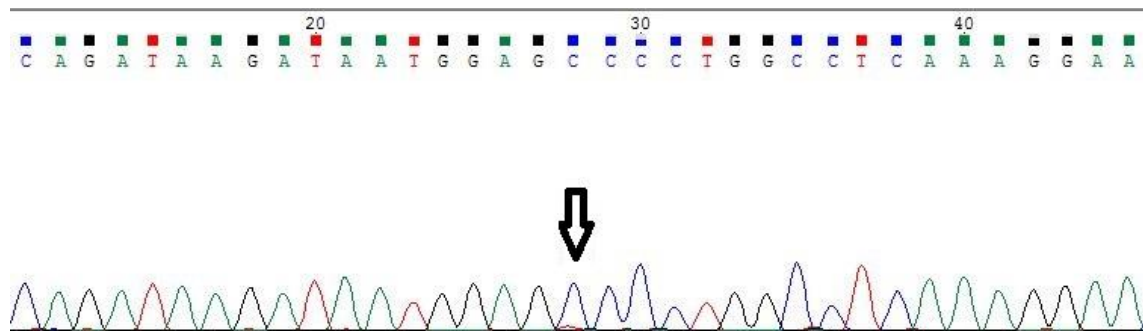
22018f – Jedná se o heterozygota 22018 G/A.



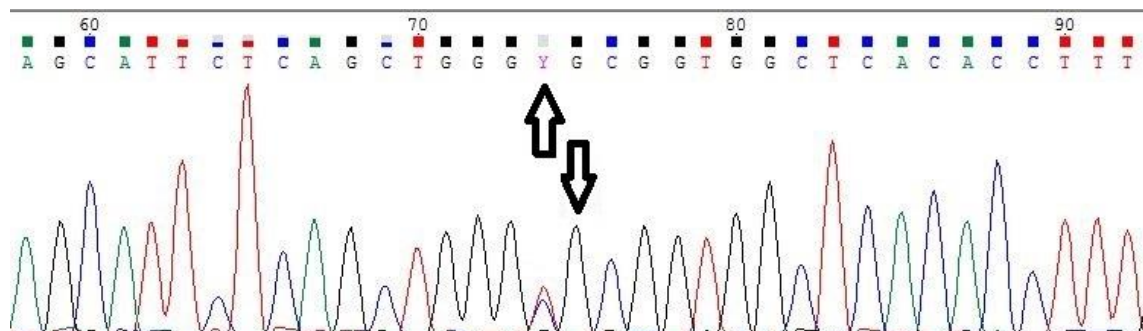


Vzorek č. 10

13910r – Jedná se o homozygota 13910 C/C.

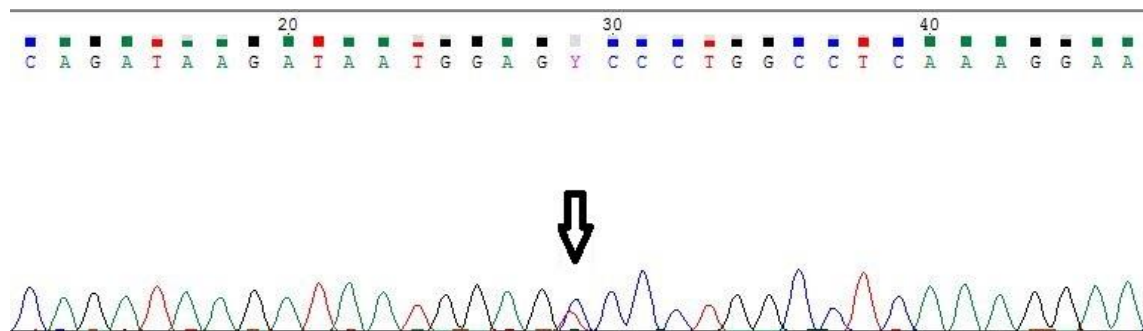


22018f – V případě laktózy intolerance se jedná o homozygota 22018 G/G, avšak ve vedlejším lokusu na pozici 22.017 je patrná nová mutace, kdy je přítomna alela C i T.

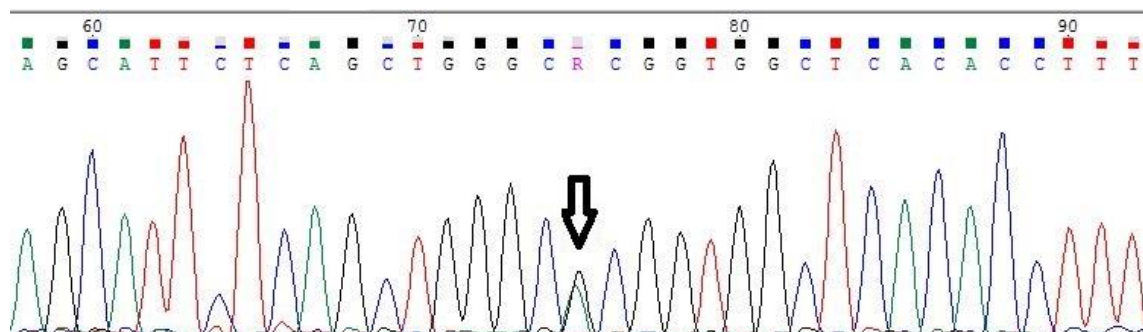


Vzorek č. 11

13910r – Jedná se o heterozygota 13910 C/T.

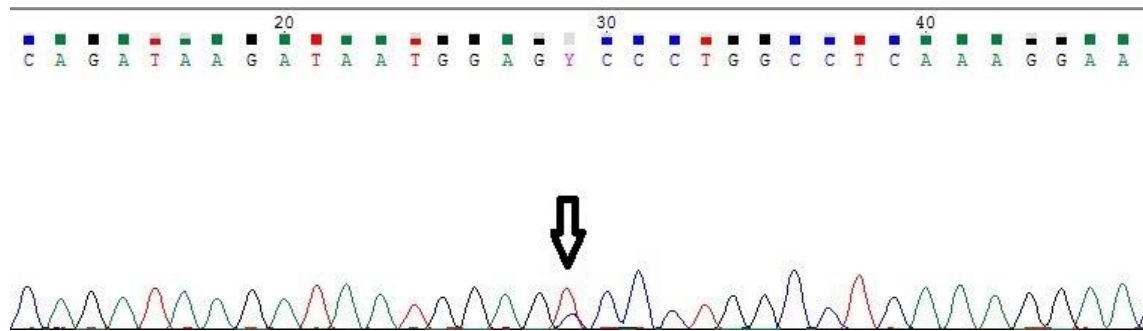


22018f – Jedná se o heterozygota 22018 G/A.

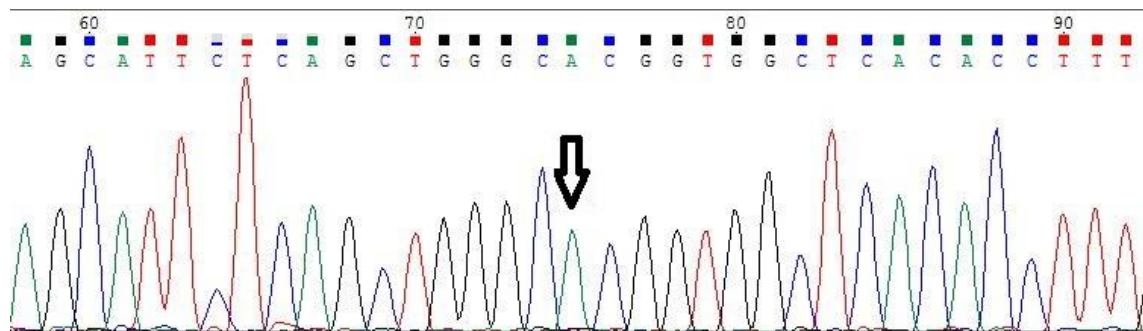


Vzorek č. 12

13910r – Jedná se o heterozygota 13910 C/T. Zde je patrný náznak klonality, který ovšem vzhledem ke shodě výsledků obou metod není v tomto případě považován za relevantní.

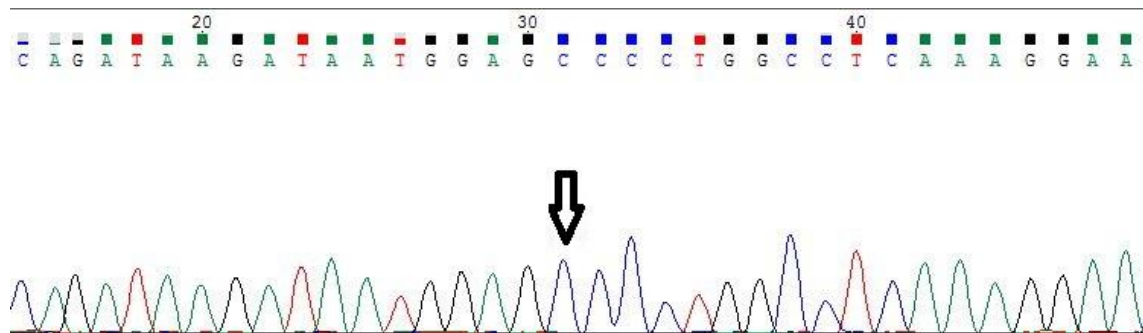


22018f – Jedná se o homozygota 22018 A/A.



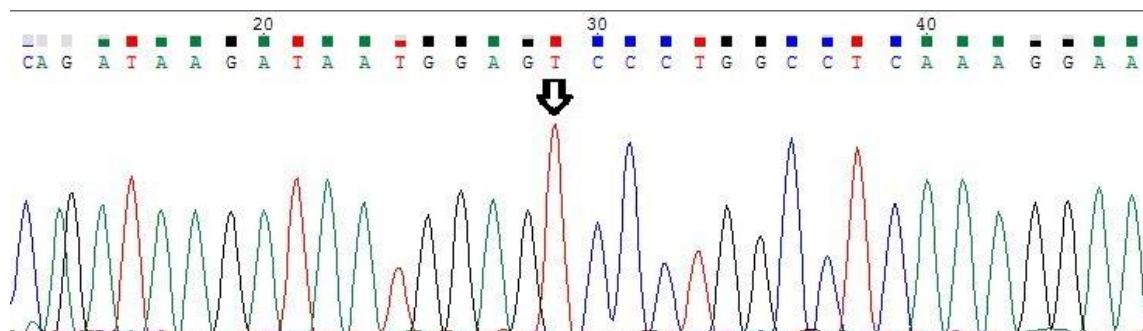
Vzorek č. 13

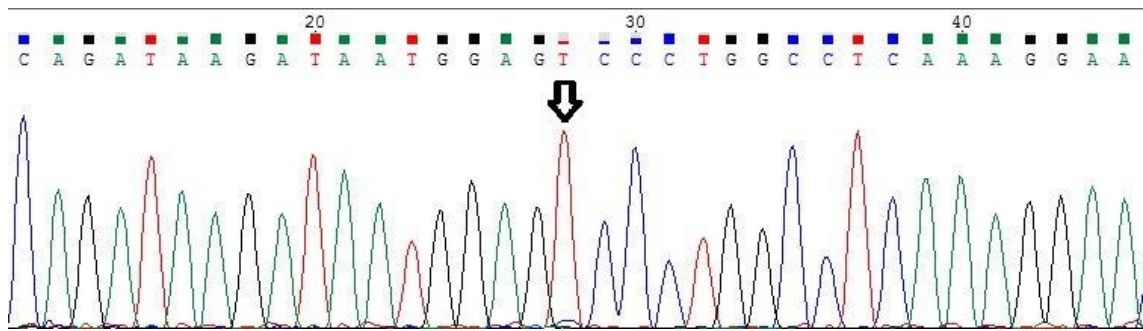
13910r – Jedná se o homozygota 13910 C/C.



Vzorek č. 14

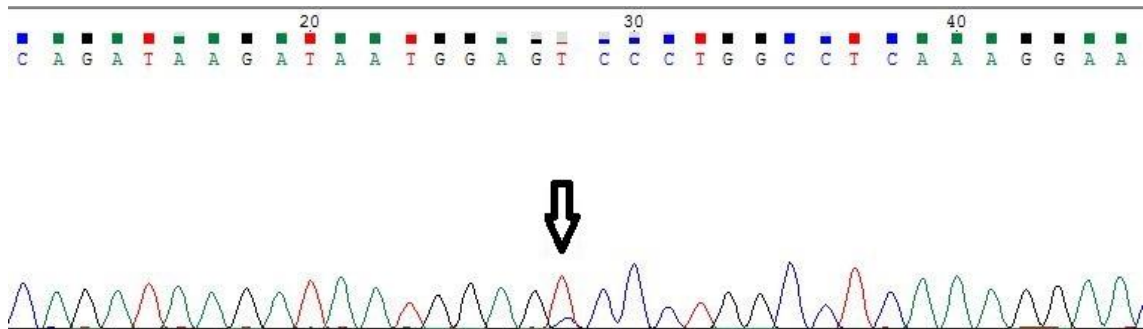
13910r – Jedná se o homozygota 13910 T/T. U tohoto vzorku jsou dostupné dvě sekvence.



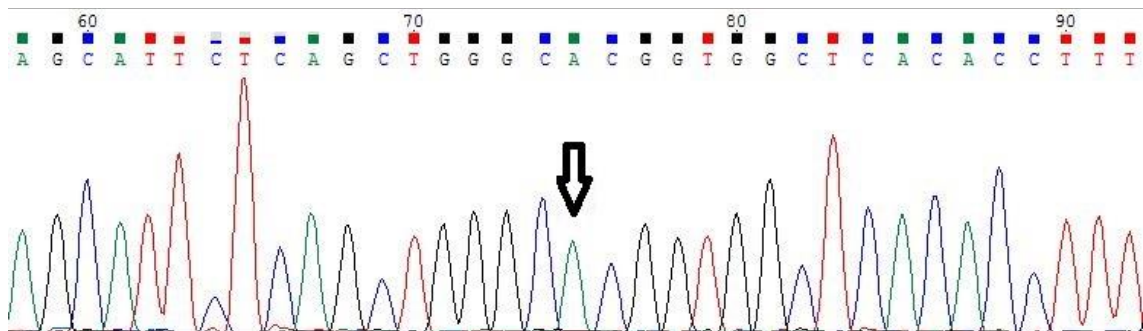


Vzorek č. 15

13910r – Jedná se o homozygota 13910 T/T. Zde je patrný náznak klonality, který ovšem vzhledem ke shodě výsledků obou metod není v tomto případě považován za relevantní.

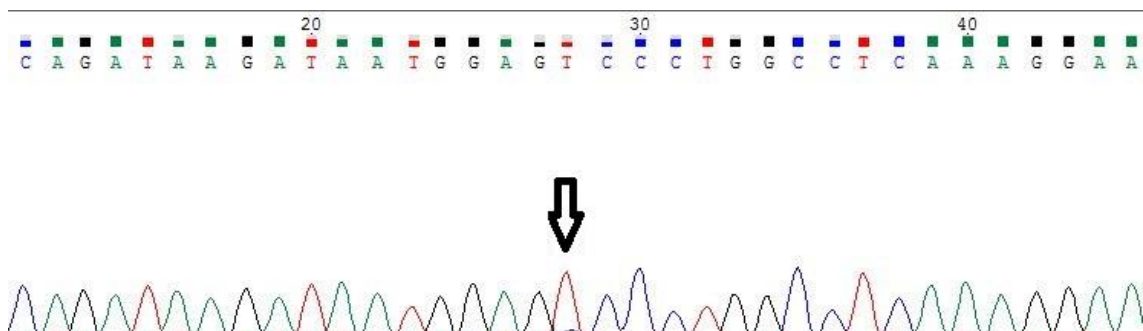


22018f – Jedná se o homozygota 22018 A/A.

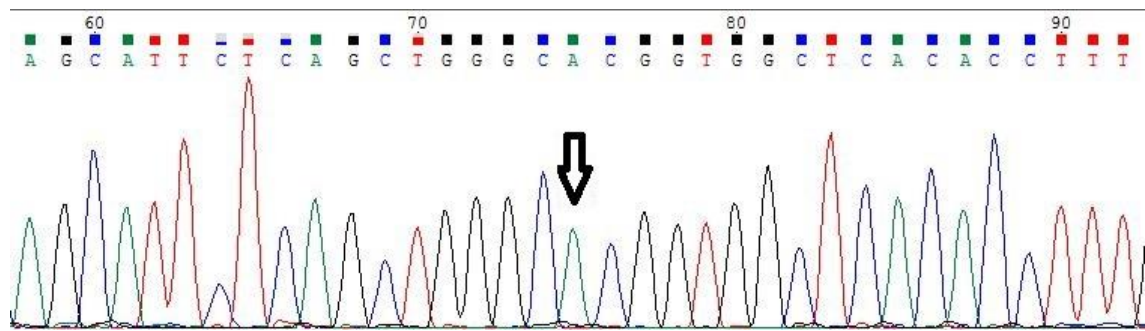


Vzorek č. 16

13910r – Jedná se o homozygota 13910 T/T.

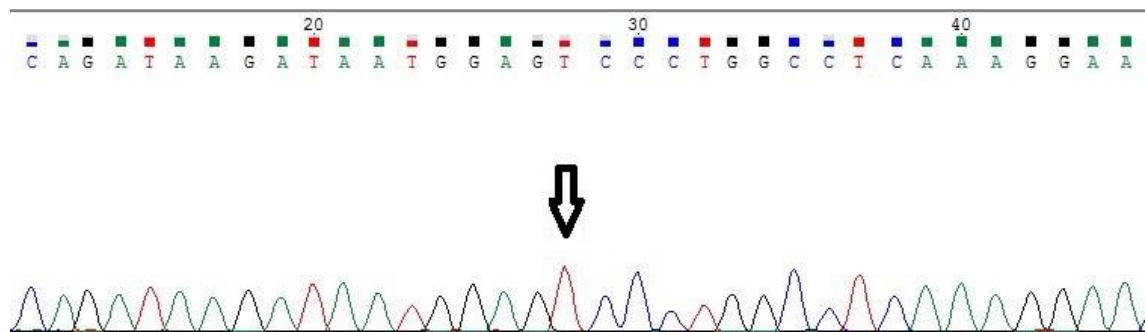


22018f – Jedná se o homozygota 22018 A/A.

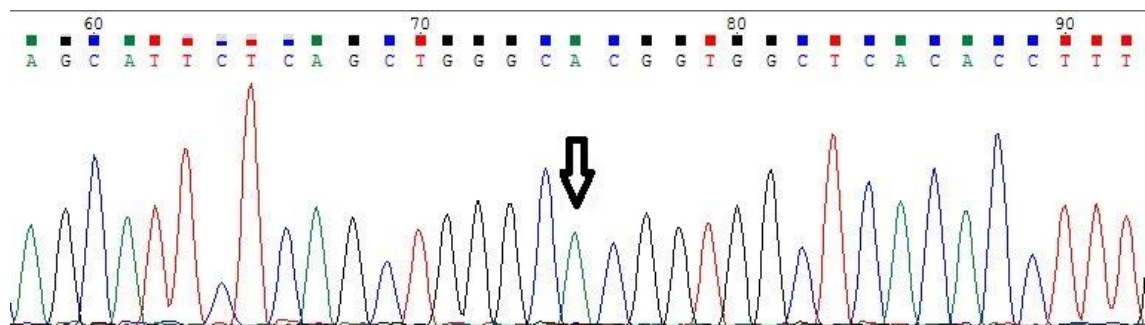


Vzorek č. 17

13910r – Jedná se o homozygota 13910 T/T.

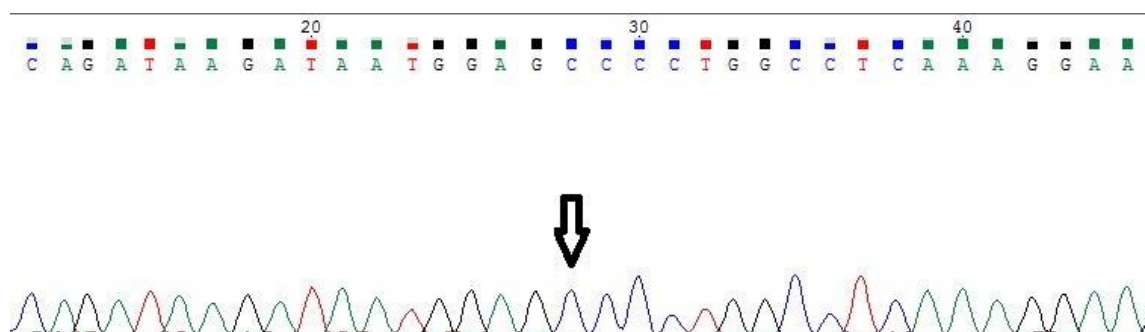


22018f – Jedná se o homozygota 22018 A/A.



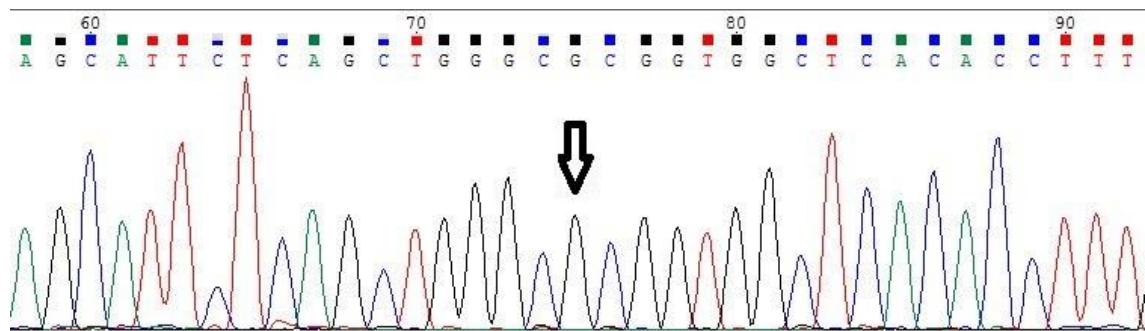
Vzorek č. 18

13910r – Jedná se o homozygota 13910 C/C.



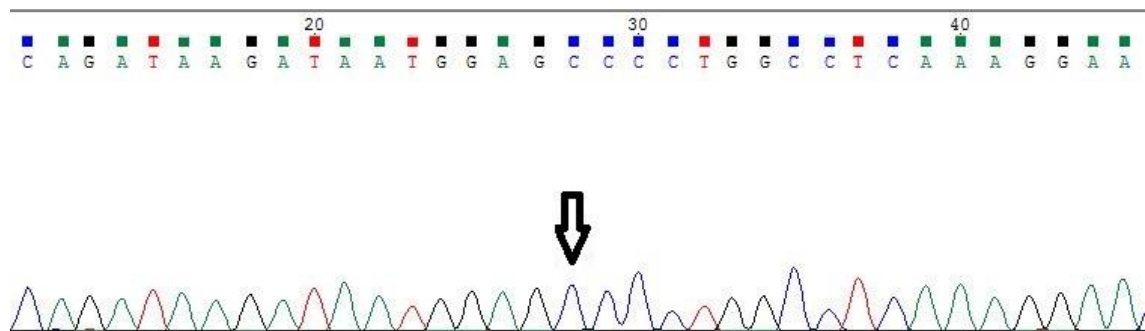


22018f – Jedná se o homozygota 22018 G/G.

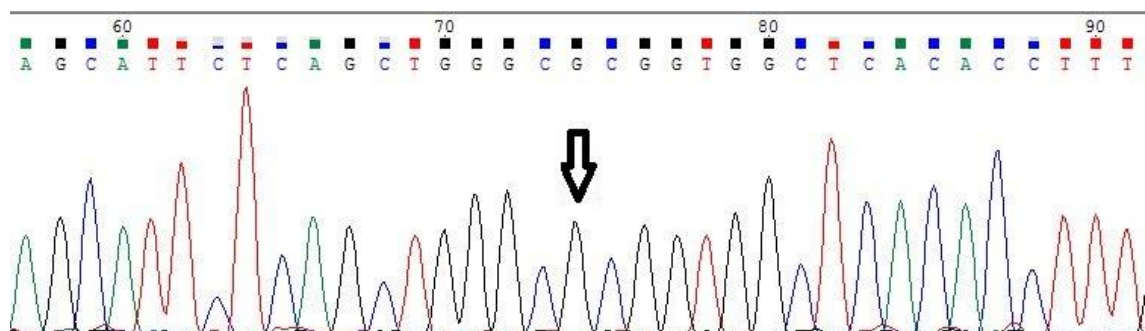


Vzorek č. 19

13910r – Jedná se o homozygota 13910 C/C.

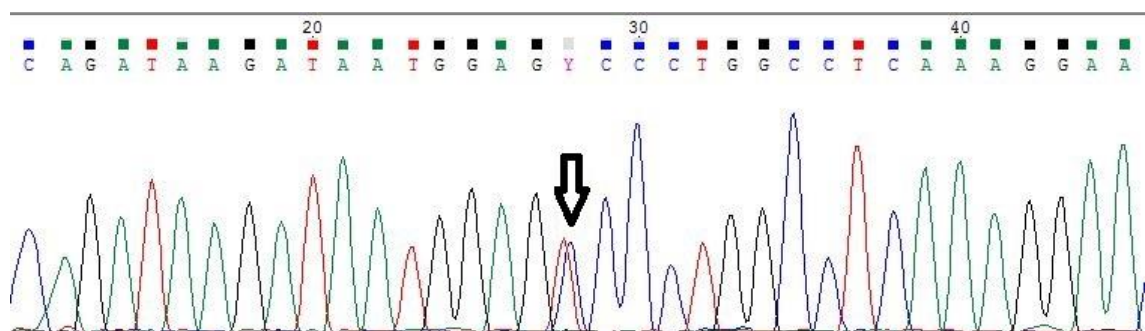


22018f – Jedná se o homozygota 22018 G/G.

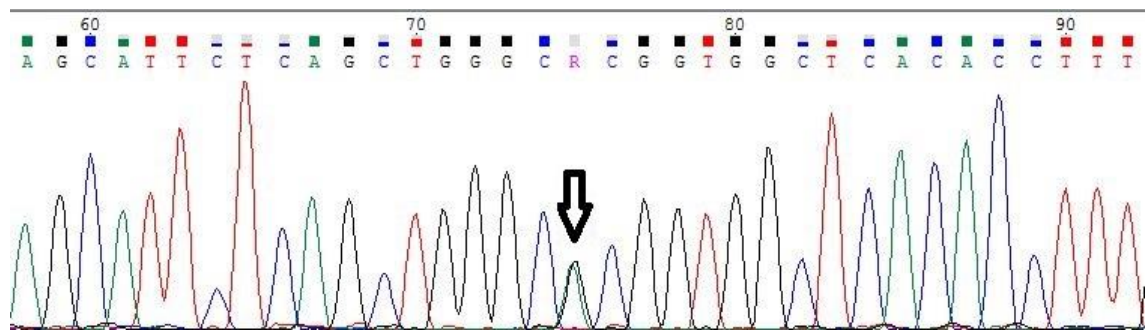


Vzorek č. 20

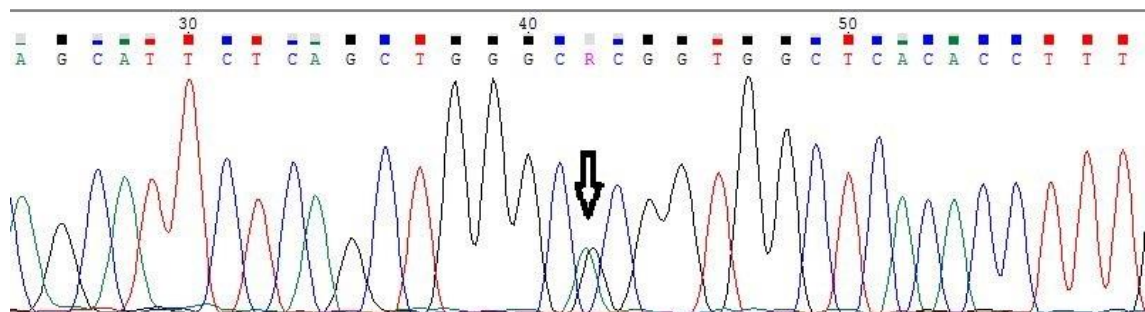
13910r – Jedná se o heterozygota 13910 C/T.



22018f – Jedná se o heterozygota 22018 G/A.

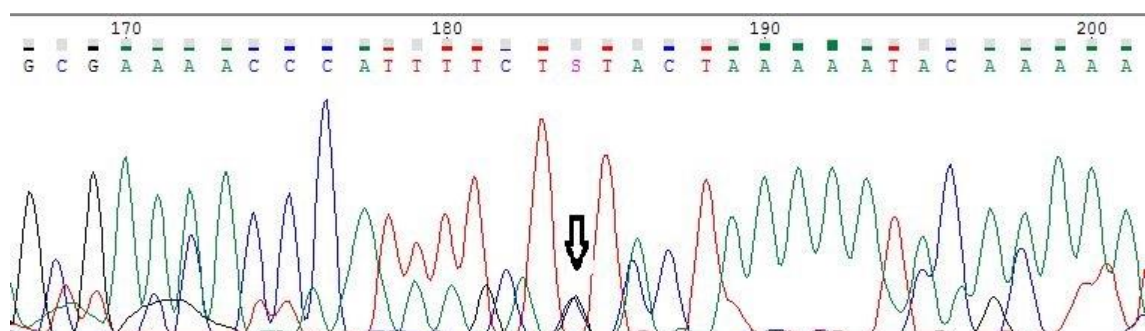


22018r – Jedná se o heterozygota 22018 G/A, jak bylo již potvrzeno u předchozí sekvence s použitím primeru forward.



#### Výskyt artefaktu

Výskyt artefaktu, který se nacházel u většiny vzorků při sekvenování polymorfismu G/A-22018 s použitím primeru forward. Toto místo je dle IUPAC codes označeno písmenem S na základě přítomnosti alely C i G.



## 10 Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Struktura laktózy.....	10
<b>Obrázek 2:</b> Štěpení laktózy na glukózu a galaktózu.....	12
<b>Obrázek 3:</b> Alely, u kterých byla prokázána spojitost s laktózovou intolerancí a jejich lokace na 2. chromozomu. ....	18
<b>Obrázek 4:</b> Celosvětová prevalence laktózové intolerance.....	20
<b>Obrázek 5:</b> PCR produkty velikosti 201 bp u polymorfismu C/T-13910 .....	43
<b>Obrázek 6:</b> PCR produkty o velikosti 271 bp u polymorfismu G/A-22018.....	43
<b>Obrázek 7:</b> Výsledky restriční štěpení polymorfismu C/T-13910. Pod jednotlivými jamkami jsou označeny genotypy vyhodnocené na základě velikosti fragmentů, vpravo se nachází hmotnostní marker.....	45
<b>Obrázek 8:</b> Výsledky restriční štěpení polymorfismu G/A-22018. Pod jednotlivými jamkami jsou označeny genotypy vyhodnocené na základě velikosti fragmentů, vlevo se nachází hmotnostní marker.....	46
<b>Obrázek 9:</b> Příklad spárování vzorku vyšetřovaného pro polymorfismus C/T-13910 s databází BLAST. Horní řádek značí sekvenci vzorku, spodní řádek je sekvence referenční. Žlutě zvýrazněná je pozice hledané alely. ....	49
<b>Obrázek 10:</b> Část sekvence vyšetřovaného genu pro polymorfismus C/T-13910, šipkou zdůrazněno umístění hledané alely. Z tohoto sekvenačního grafu vyplývá, že se jedná o homozygota TT.....	49
<b>Obrázek 11:</b> Část sekvence vyšetřovaného genu pro polymorfismus G/A-22018, šipkou zdůrazněno umístění hledané alely. Výsledkem této sekvenační reakce je heterozygot GA .....	50
<b>Obrázek 12:</b> Četnost genotypů dle výsledků metody PCR-RFLP .....	52
<b>Obrázek 13:</b> Znárodnění odlišně velikých píků u polymorfismu C/T-13910, konkrétně u vzorku č. 9.....	54
<b>Obrázek 14:</b> Umístění mutace nalezené v souvislosti s použitím primeru forward u vyšetření polymorfismu G/A-22018 .....	55
<b>Obrázek 15:</b> Přítomnost mutace v lokusu 22.017 u vzorku č. 4.....	56
<b>Obrázek 16:</b> Četnost genotypů vyhodnocených metodou sekvenování.....	57
<b>Obrázek 17:</b> Porovnání četnosti genotypů obou polymorfismů na základě metod PCR-RFLP a sekvenování .....	58

## 11 Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Druhy mlék a jejich složení (v %) .....	11
<b>Tabulka 2:</b> Složení PCR reakce pro polymorfismus C/T-13910.....	38
<b>Tabulka 3:</b> Složení PCR reakce pro polymorfismus G/A-22018 .....	39
<b>Tabulka 4:</b> Sekvence primerů.....	39
<b>Tabulka 5:</b> PCR reakční protokol pro polymorfismus C/T-13910.....	40
<b>Tabulka 6:</b> PCR reakční protokol pro polymorfismus G/A-22018 .....	40
<b>Tabulka 7:</b> Složení PCR reakce pro polymorfismus C/T-13910.....	40
<b>Tabulka 8:</b> Složení PCR reakce pro polymorfismus G/A-22018 .....	41
<b>Tabulka 9:</b> Protokol použitý pro přečištění PCR produktů .....	47
<b>Tabulka 10:</b> Sekvence primerů.....	47
<b>Tabulka 11:</b> Genotypy vzorků vyhodnocené metodou PCR-RFLP .....	51
<b>Tabulka 12:</b> Koncentrace vzorků .....	52
<b>Tabulka 13:</b> Zastoupení genotypů polymorfismu C/T-13910 na základě metody sekvenování .....	54
<b>Tabulka 14:</b> Zastoupení genotypů polymorfismu G/A-22018 dle sekvenace.....	55
<b>Tabulka 15:</b> Genotypy obou polymorfismů vyhodnocené na základě sekvenace.....	56
<b>Tabulka 16:</b> Porovnání genotypů vyhodnocených na základě metod PCR-RFLP a sekvenování .....	58
<b>Tabulka 17:</b> Srovnání počtu výsledných genotypů získaných uvedenými metodami ..	59
<b>Tabulka 18:</b> Výsledné genotypy stanovené metodou PCR-RFLP, reverzní hybridizací na stripech a sekvenováním .....	60



## 12 Seznam zkratek

A – adenin

ABKM – alergie na bílkovinu kravského mléka

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool – nástroj pro porovnání výsledných sekvencí s databází

C – cytosin

dNTP – deoxynukleosid trifosfát

ddNTP – dideoxynukleosid trifosfát

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DIAAS – Digestible Indispensable Amino Acid Score – skóre stravitelných nepostradatelných aminokyselin

*EcoRI* – restriční endonukleáza izolovaná z kmene RY13 bakterie *Escherichia coli*

G – guanin

GLUT – glucose transporters – přenašeči glukózy umožňující přestup glukózy z resorpčních epitelů do krve

*Hinfl* – restriční endonukleáza izolována z bakterie *Hemophilus influenzae*

*Hin6 I* – restriční endonukleáza izolována z bakterie *Hemophilus influenzae*

IBS – irritable bowel syndrome – syndrom dráždivého tračníku

ID – identifikační číslo

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii

*LCT* – gen pro laktázu

LI – laktózová intolerance

LPH – laktóza-phlorizin hydroláza

*MCM6* – gen *minichromosome maintenance complex component 6*

NCBI – National Center for Biotechnology Information – Národní centrum pro biotechnologické informace

NK – nukleová kyselina

NIH – National Institutes of Health – Národní zdravotní instituty

PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR-RFLP – polymerázová řetězová reakce – polymorfismus délky restričních fragmentů

PPi – pyrofosfát

ppm – parts per million – jedna miliontina celku

RFLP – restriction fragment length polymorphism – polymorfismus délky restričních fragmentů

RNA – ribonukleová kyselina

rpm – revolutions per minute – otáčky za minutu

SCFA – short chain fatty acids – mastné kyseliny s krátkým řetězcem

SGTL – sodium glucose cotransporter – glukózový transportér závislý na sodíkovém iontu

SNP – single nucleotide polymorphism – jednonukleotidový polymorfismus

T – thymin

Taq DNA polymeráza – enzym izolovaný z termolabilní bakterie *Thermus aquaticus*