



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Genetické poruchy pigmentace kůže

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: [Specializace ve zdravotnictví](#)

Autor: Aneta Bláhová

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

[České Budějovice 2018](#)

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Genetické poruchy pigmentace kůže 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/diplomové 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/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 25. dubna 2019

.....

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Tomášovi Nixovi, Ph.D. za odbornou pomoc, pokyny a konzultace a že se se mnou vrhnul do tohoto náročného tématu. Zároveň bych chtěla poděkovat rodině za trpělivost, pevné nervy a podporu, bez které bych se neobešla.

Genetické poruchy pigmentace kůže

Abstrakt

Genetické poruchy kůže jsou jedny z nejčastěji vyskytujících se onemocnění. Avšak nemusí se striktně jednat přímo o choroby kůže. Existuje spousta onemocnění, která se manifestují na pokožce, ale z diagnostického hlediska nemají s kůží nic společného.

Tato bakalářská práce se zabývá kůží a jejími nejčastěji se vyskytujícími onemocněními. Dále pak se souvisejícími autoimunitními onemocněními a genetikou. Vitiligo je onemocnění, které je spojeno s poruchou melanocytů, ve kterých se vytváří pigment a v jeho důsledku se na kůži objevují bílé skvrny.

Morbus Darier je onemocnění kůže charakterizovaná bradavicovitými vřídky na těle. Vřídky jsou obvykle nažloutlé barvy, jsou citlivé na dotek, mírně mastné a mohou vydávat silný zápach.

V metodické části se tato bakalářská práce zabývá analýzou *FOXD3* genu pro Vitiligo, který má jeden rozsáhlý exon a analýzou dvanáctého exonu v *ATP2A2* genu pro Morbus Darier. Pro každé onemocnění byly k dispozici dva probandi. K analýze vzorku byla použita izolace DNA, následně PCR, Sangerovo sekvenování a vyhodnocení pomocí programu BioEdit a NCBI databáze.

Avšak ani u jednoho probanda nebyla zjištěna žádná mutace v žádném vyšetřovaném úseku.

Klíčová slova

Vitiligo; Morbus Darier; PCR; Sangerovo sekvenování; NCBI databáze

Genetic of skin pigmentation disorders

Abstract

Genetic skin disorders are one of the most common diseases. However, they may not be strictly related to skin diseases. There are many diseases that manifest on the skin, but from a diagnostic standpoint, they have nothing to do with the skin.

This bachelor thesis deals with the skin and its most frequent diseases. Furthermore, related autoimmune diseases and genetics.

Vitiligo is a disease that is associated with a melanocyte disorder in which pigment is formed and white spots appear on the skin.

Morbus Darier is a skin disease characterized by warts on the body. Sores are usually yellowish in color, are touch sensitive, slightly oily and can produce a strong odor.

In the methodological part, this bachelor thesis deals with the analysis of the FOXD3 gene for Vitiligo, which has one large exon and analysis of the twelfth exon in the ATP2A2 gene for Morbus Darier. Two probands were available for each disease. DNA analysis was used to analyze the sample, followed by PCR, Sanger sequencing and BioEdit and NCBI database evaluation.

However, no mutation in any of the investigated sections was detected in either proband.

Key words

Vitiligo; Morbus Darier; PCR; Sanger sequencing; NCBI database

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Kůže.....	10
2.1 Pigment	10
2.2 Nejznámější genetická onemocnění kůže	11
3. Genetika.....	12
3.1 Mutace.....	12
3.1.1 Genomové mutace (aberrace)	12
3.1.2 Chromozomální mutace strukturní	12
4. Autoimunitní reakce	13
4.1 Faktory vnitřní.....	13
4.2 Faktory vnější.....	13
4.3 Rozdělení autoimunitních onemocnění.....	14
4.3.1 Systémová autoimunitní onemocnění.....	14
4.3.2 Orgánově specifická autoimunitní onemocnění	14
4.3.3 Orgánově specifická autoimunitní onemocnění	14
5. Vitiligo.....	15
5.1 Frekvence	16
5.2 Příčiny	16
5.3 Dědičnost.....	17
5.4 Chromosomální umístění	17
6. Vitiligo – probandi.....	18
6.1 Proband číslo 3.....	18
6.1.1 Rodokmen.....	18
6.1.2 Příznaky	18
6.1.3 Léčba.....	18
6.2 Proband číslo 4.....	19
6.2.1 Rodokmen.....	19
6.2.2 Příznaky	19
6.2.3 Léčba.....	19
7. Morbus darier.....	20
7.1 Frekvence	20
7.2 Příčiny	20
7.3 Dědičnost.....	21
7.4 Chromosomální umístění	21

8.	Morbus darier – probandi	22
8.1	Rodokmen:	22
8.2	Příznaky:	22
8.3	Léčba:	23
8.4	Potvrzující příběh obecného teoretického popisu:	24
9.	Metodika	25
9.1	Izolace DNA.....	25
9.2	Precipitace DNA	25
9.3	Měření koncentrace DNA	26
9.4	Elektroforéza	26
9.5	Navržení primerů	27
9.6	PCR (Polymerázová řetězová reakce).....	33
9.7	Čištění PCR produktů za použití Enzymatic PCR cleanup using Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase	34
9.8	Sekvenace.....	35
10.	Výsledky	36
11.	Diskuze	38
12.	Závěr	40
13.	Citace	41

Seznam zkratek

ATP2A2	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ transporting 2 (gen pro Morbus Darier)
CNS	Centrální nervový systém
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNASE1L3	Deoxyribonuclease 1 like 3
dNTP	Deoxynukleotidy
EXO I	Exonukleáza I
F	Forward primer
FOXD3	forkhead box D3 (gen pro Vitiligo)
HLA	Hlavní histokompatibilní systém
NCBI	National Center for Biotechnology Information databáze
NLRP1	Family pyrin domain 1
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22
R	Revers primer
rSAP	Shrim alkalickou fosfatázu
SERCA2	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ enzym
SLE	Systémový lupus erythematoses
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
TE pufr	Tris/EDTA pufr
TBE pufr	Tris-borát-EDTA
UV	Ultrafialové

1. Úvod

Genetické poruchy kůže jsou jedny z nejčastěji vyskytujících se onemocnění. Avšak nemusí se striktně jednat přímo o choroby kůže. Existuje spousta onemocnění, která se manifestují na pokožce, ale z diagnostického hlediska nemají s kůží nic společného.

Pro naši práci jsme vybrali dvě kožní onemocnění. Prvním onemocněním je Vitiligo, protože mnozí z nás mají ať už ve svém okruhu přátel, rodiny nebo i dokonce sám na své kůži jednu bílou depigmentovanou skvrnu. Tudiž je Vitiligo dosti známé a jedno z nejčastěji vyskytovaných onemocnění, ať už získaným nebo vrozeným. Druhým onemocněním je Morbus Darier. Toto onemocnění není příliš časté. I přes to jsme měli možnost se setkat s probandy, díky kterým jsme mohli diagnostiku uskutečnit.

FOXD3 je gen, který zajišťuje melanogenezi, a tím zabarvuje pokožku. U Vitiliga je *FOXD3* porušen a tím vznikají depigmentované místa na kůži. Gen je umístěn na prvním chromozomu (1p31.1) a má velmi rozsáhlý exon, kde může vznikat řada mutací.

ATP2A2 je gen regulující produkci enzymu SERCA2, který je zodpovědný za řízení hladiny iontů vápníků uvnitř buněk. Nedostatek enzymu SERCA2 snižuje hladinu vápníku v endoplazmatickém retikulu, což způsobuje jeho dysfunkci. SERCA2 je vyplavován do celého těla, ale není však jasné, proč změny v tomto enzymu ovlivňují pouze pokožku a způsobují bolestivé vřídky. *ATP2A2* je umístěn na dvanáctém chromozomu (12q24.11) a má velký počet exonů.

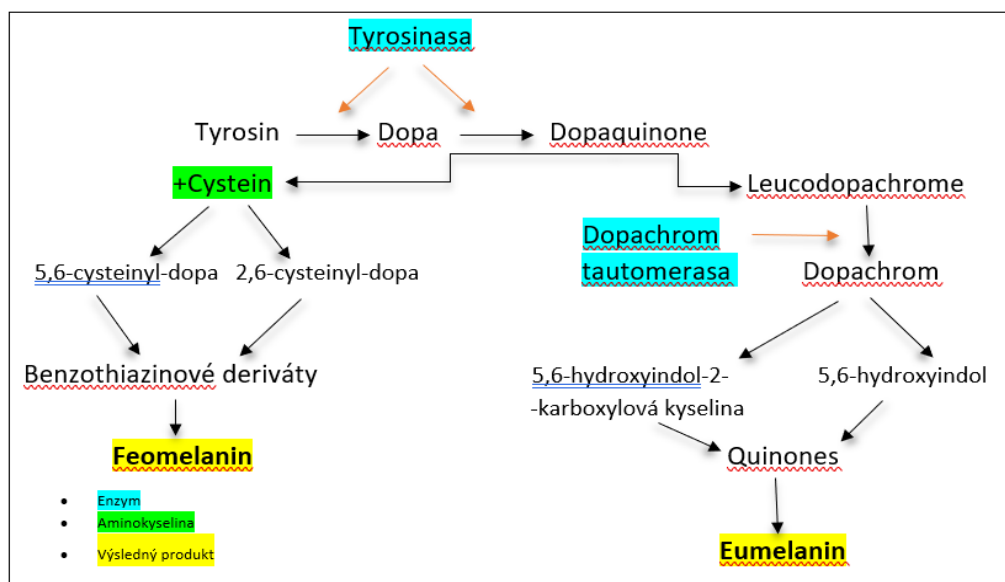
2. Kůže

Kůže (lat. cutis, řec. derma), je rozsáhlý plošný orgán tvořící zevní povrch těla a tím i bariéru organismu vůči okolí. Je účinnou ochranou proti fyzikálním, chemickým a mikrobiologickým jevům z okolí. Uspořádáním svého cévního řečiště a svými žlázami je kůže hlavním termoregulátorem těla. Kůže se též podílí na funkci imunitního systému organismu. Obsahuje imunokompetentní buňky a také se v ní mohou tvořit protilátky, bojující proti cizorodým organismům. (Čihák, 2016)

Kůže dospělého člověka dosahuje plochy téměř 2 m² (průměrně 1,6-1,8 m²). Tloušťka kůže činí od 0,5 mm do 4 mm (podle oblasti těla). Hmotnost dosahuje až 3 kg. Pokud je však kůže zesílena tukovým polštářem, může její hmotnost v extrémních případech dosáhnout až 20 kg. (Čihák, 2016)

2.1 Pigment

Pigment je ve formě drobných zrnčků obsažen v buňkách hlubších vrstev epidermis a dodává kůži až temně hnědou barvu. Vzniká v melanocytech bazální vrstvy epidermis z tyrosinu za katalytického působení enzymu tyrosinasy. Pigment (melanin) je v buňkách ve formě subcelulárních tělísek zvaných melanosomy. (Novotný, 1989)



Obrázek 1 Syntéza melaninu (zdroj: vlastní)

Na těle je pak pigmentace různá podle oblasti těla. Chodidla a dlaně jsou téměř bez pigmentace. Kůže zad je více pigmentovaná než břišní část. Některá místa mají však pigment nahromaděný a tím tmavší zabarvení (kůže na dvorci bradavek, na penisu, okolo řitního otvoru). (Novotný, 1989)

Množství pigmentu v kůži se zvyšuje vlivem slunečních paprsků a pigment pak chrání hlubší vrstvy kůže před jejich škodlivým účinkem. Množství pigmentu se mění i zvyšujícím se věkem. Množství melaninu se může zvyšovat a tím začít tvořit např. stařecké skvrny, senilní lentigo nebo melanóza coli. Koncentrace melaninu se může též snižovat a tím způsobit např. šedivění vlasů nebo bílé skvrny. (Scheie, 1981)

2.2 Nejznámější genetická onemocnění kůže

Jedním z nejznámějších onemocnění je rozhodně SLE – systémový lupus erythematoses. Je to komplexní autoimunitní onemocnění charakterizované produkcí autoprotilátek proti molekulám jaderného, cytoplazmatického a buněčného povrchu, které překračují hranice specifické pro určitý orgán. Protilátky indukují zánět a následné poškození více orgánů a vede ke konečným projevům SLE, včetně glomerulonefritidy, dermatitidy, trombózy, vaskulitidy a artritidy. Onemocnění se dědí autosomálně recesivně a je způsobena mutací např. v genu *DNASE1L3*. (Exner, 1980)

Lidé často zaměňují SLE s dalším velmi známým onemocněním – Lupénkou. Lupénka je porucha rohovatění kožních buněk. Proces rohovatění u nemocných se nestihne dokončit a nezrohovatělé buňky se pak na kůži vyskytují ve formě ložisek stříbřitých šupinek. Pod těmito ložisky je zarudlá kůže, která někdy svědí. Není známo, proč si porucha rohovatění u jednotlivých nemocných vybírá jen určitá místa. Tato místa pak mohou svědit, bolet a za následné tvorby puchýřů i popraskat. Nehty jsou barevně i vzhledově změněné. (Rocken, 2018)

Další známou chorobou je Xeroderma pigmentosum. Jedná se o skupinu onemocnění, která jsou heterogenně podmíněná a dědí se autosomálně recesivně. Postižení mají vadný gen zodpovědný za molekulární mechanismy opravy DNA a tím mají porušenou schopnost opravovat mutace. Častým projevem nemoci je hypersenzitivita vůči slunečním paprskům, a proto se po vystavení UV-paprskům objevují popáleniny. Velice často a brzo se u nich vyvíjejí kožní nádory. Dále se mohou objevit neurologické degenerace a projevy předčasného stárnutí. (Kočárek, 2010)

Dyskeratosis congenita je další známou chorobou s kožními projevy. Je to však vzácná genetická forma selhání kostní dřeně. Kostní dřeň není schopná produkovat dostatečné množství krvinek. Původní myšlenkou bylo, že Dyskeratosis congenita je kožní onemocnění, které ovlivňuje kůži, způsobuje dystrofii nehtů a bílé skvrny na sliznici úst. Existují i jedinci, kteří nesou mutaci, která se však nikdy nevyvine. Dědí se X-vázaně, a proto jsou postižení hlavně chlapci. (Sieff, 2003)

Acanthosis nigricans (Akantóza) je označení pro kožní změny charakterizované ztluštěním, zhrubnutím kůže, tmavou pigmentací a bradavičnatými výrůstky. Nejčastěji postihuje podpaží, třísla a krk. Velmi často je typický pro obézní lidi a diabetiky. Vyskytuje se zcela náhodně v jakémkoli věku z různých příčin. Avšak byla pozorována vyskytující se i v rodině, a tak se nevylučují dědičné vlivy. (Meyers, 1995)

3. Genetika

Geneticky podmíněné patologické stavy představují závažnou kapitolu lidské patologie. Primární podstatou jejich vzniku je změna (mutace) genetické informace (DNA), která se přenáší na další generace buněk vznikajících z původní mateřské buňky postihnuté mutací. To však neznamená, že každý genetický patologický stav je dědičný. (Sršeň, 1995)

3.1 Mutace

Mutace se podle **příčin** dělí na spontánní, při kterých není možno odhalit souvislost s exogenními faktory a indukované, u kterých se při diagnóze opíráme o prostředí, kde pacient žije nebo se v něm zdržoval. Dále se mutace dělí podle **druhu buněk**, ve které se vyskytuje poškozená DNA. Dělí se na gametické, kde se mutace nachází v gametách, a proto se přenáší na všechny buňky postiženého potomka a somatické, které vznikají v somatických buňkách na různé úrovni postzygotického vývinu jedince a přenášejí se na další generace dceřiných buněk. Výsledkem je genetická mozaika mutantních a normálních buněk. (Brdička, 2001)

Podle charakteru, respektive rozsahu poruchy DNA se rozpoznávají:

3.1.1 Genomové mutace (aberrace)

V případě těchto mutací je charakteristická změna počtu chromozomů, které jsou pro každý druh specifické. Tedy celkový počet chromozomů, u kterých se za fyziologických podmínek jedná o diploidii, je změněn v počtu sad, například triploidie, znamenající přítomnost tří sad místo dvou. (Brdička, 2001)

Dále jsou sem zařazovány chromozomální mutace numerické. Jedná se o odchylky v počtu jednotlivých chromozomů, při kterých se v karyotypu místo klasického páru vyskytují chromozomy tři – trizomie, nebo pouze jeden – monozomie. (Brdička, 2001)

3.1.2 Chromozomální mutace strukturní

Odehrávají se buď uvnitř jednotlivých chromozomů (intrachromozomálně), anebo i mezi chromozomy (interchromozomálně) a mohou, ale nemusí ovlivňovat jejich celkový počet. Klasicky třídíme chromozomální změny na delece, inserce, duplikace, translokace, transpozice a inverze. O významu chromozomální mutace rozhoduje mimo jiné i umístění mutace v chromozomu. Dále je důležitým aspektem umístění centromery. Centromera by se měla vyskytovat uprostřed chromozomu, ale nebývá tomu tak vždy. Za patologických stavů se může centromera vyskytovat na netypickém místě anebo může i chybět. Ke změnám v umístění centroméry vedou tzv. pericentrické inverze. Tyto inverze, které neobsahují centroméru, jsou pro odlišení označovány jako tzv. paracentrické. (Brdička, 2001)

Genomové a chromozomální aberrace jsou značnou odchylkou od fyziologického stavu. Pokud se jedná o gametický anebo raně postzygotický původ, vedou většinou k závažným poruchám vývoje plodu a omezují jeho životnost. Avšak některé chromozomální aberrace jsou dlouhodobě slučitelné se životem, dokonce nemusí být přímou odchylkou od normálního fenotypu. (Brdička, 2001)

4. Autoimunitní reakce

Základem autoimunitní imunopatologické reaktivity je narušení principu tolerance vlastních mechanismů s následným imunopatologickým zánětem, ve kterém dominují poškozující složky. Autoimunitní imunopatologické nemoci jsou významnou příčinou morbidity a mortality dnešní populace. Zahrnují několik desítek onemocnění a syndromů projevujících se možnou destrukcí jednotlivých orgánů, popřípadě destrukcí celkového systému. Pomocí rychlého pokroku v medicínských oblastech imunologie, molekulové biologie a genetiky nám dává poměrně solidní představy o imunopatogenetických mechanismech těchto nemocí. Dále také přináší zdokonalování laboratorních diagnostik těchto onemocnění. Avšak, i přes zdokonalování v těchto oblastech, se bohužel neobjevuje významný pokrok v léčbě. Ve většině případů nezbyvá než se pokoušet tlumit jen poškozující zánět. (Krejsek, 2004)

Na autoimunitní imunopatologickou reaktivitu nahlížíme v současné době jako na multifaktoriální, vícestupňový a dlouhodobý proces. Tedy k poruše autotolerance je potřeba několika faktorů, a to vnitřních či vnějších. (Lukešová, 2016)

Vedle genetické predispozice jedince, která je určena především polymorfismem některých genetických systémů, také velkou roli hrají infekční agens. Ty mohou působit cestou molekulových mimikrů¹ nebo ve větší míře uvolňovat autoantigeny. (Krejsek, 2004)

4.1 Faktory vnitřní

Pro účast genetických faktorů svědčí poměrně vysoká shoda výskytu choroby u jednovaječných dvojčat, která se vyskytuje mezi 25 a 70 % u různých autoimunitních onemocnění. (Hořejší, 2017)

Nejčastějším vnitřním faktorem ovlivňujícím vznik a průběh autoimunitních onemocnění patří asociace s HLA systémem. U řady chorob se vyskytuje asociace s určitým haplotypem nebo určitými alelami HLA I a II. třídy. U mnoha různých autoimunitních chorob je pozorována asociace se stejným alotypem HLA, což nasvědčuje tomu, že je dědičný pouze sklon k onemocnění, které je nadále vyvoláno jinými konkrétními podmínkami. (Hořejší, 2017)

Další možností bývá polymorfismus genů kódující cytokiny. Autoimunitní onemocnění v tomto případě může vyvolat nadbytek nebo deficit určitého cytokinu, nejspíše proto, že dojde k poruše regulace podtypů T lymfocytů.

Polymorfismy nebo genové mutace v genech regulujících apoptózu a aktivační práh buněk mohou být dalším důvodem. V tomto případě dochází k mutaci genu kódující molekuly, které jsou součástí procesu apoptózy (Fas, FasL,...) a tím dochází k nedostatečné regulaci a ukončení imunitní reakce. (Hořejší, 2017)

4.2 Faktory vnější

U dnešní populace nejvýznamnějším vnějším faktorem je hlavně stres, a však se dále nejvíce uplatňují infekce, léky, jiné chemikálie a UV záření. Infekcím je přisuzován největší podíl na indukci k autoimunitním poruchám, i když žádné konkrétní infekční agens nejsou zcela spojováni s určitou autoimunitní chorobou. (Hořejší, 2017)

¹ **Molekulární mimikry (antigenní mimikry)** je napodobování jedné molekuly molekulou jinou. To se může stát náhodou, ale mnohdy dochází k tomuto jevu u molekul některých parazitů kteří tak napodobují molekuly svého hostitele a unikají tím jeho imunitní obraně. (Cammack, 2006)

4.3 Rozdělení autoimunitních onemocnění

Autoimunitní onemocnění lze zhruba rozdělit na systémová, orgánově lokalizovaná a orgánově specifická autoimunitní onemocnění. Hranice mezi těmito skupinami není však ostrá. U jednoho jedince se v důsledku selhání mechanismů tolerance mohou manifestovat různá autoimunitní onemocnění (systémová, orgánově specifická i lokalizovaná) buď současně nebo postupně během vývoje onemocnění. Celkový výskyt autoimunitních onemocnění v populaci je kolem 5-7 %. (Hořejší, 2017)

4.3.1 Systémová autoimunitní onemocnění

U systémových autoimunitních onemocnění je autoimunitní reakce namířena proti konzervovaným strukturám jaderných a dalších orgánově nespecifických antigenů. Uplatňuje se zejména imunokomplexový typ poškození tkání a postihuje celé tělo. Typickým příkladem této skupiny je systémový lupus erythematoses, revmatoidní artritida nebo systémová sklerodermie. (Hořejší, 2017)

4.3.2 Orgánově specifická autoimunitní onemocnění

Jedná se o choroby, na nichž se podílejí imunopatologické mechanismy, které vedou k poškození většinou jednoho orgánu a jsou navíc provázeny řadou systémových příznaků a častým výskytem orgánově nespecifických autoprotilátek. Autoprotilátky mohou mít diagnostický, avšak obvykle nepatogenetický význam. Do této skupiny spadají nespecifické střevní záněty jako je například ulcerózní kolitida a Crohnova nemoc, dále pak celiakie, autoimunitní hepatitidy nebo fibróza plic. (Hořejší, 2017)

4.3.3 Orgánově specifická autoimunitní onemocnění

Tyto choroby způsobují poškození tkání, které vyvolávají autoreaktivní T lymfocyty, nebo autoprotilátky, které mají cytotoxický účinek nebo ovlivňují funkci cílové struktury. Ve většině případů se kombinují humorální i buněčné autoimunitní reakce. Přítomnost autoprotilátek se na rozdíl od autoreaktivních T lymfocytů určují laboratorně lépe, a proto jsou důležitým diagnostickým znakem. Však u některých chorob převažují buněčné mechanismy autoimunity bez výraznější produkce autoprotilátek jako například u demyelinizačních onemocnění CNS typu roztroušené sklerózy. Dalším typickým onemocněním spadající do této skupiny chorob je například Hashimotova thyreoiditida, Gravesova-Basedowova nemoc, autoimunitní polyglandulární syndromy nebo autoimunitní poruchy produkce a syndrom předčasného ovariálního selhání. (Hořejší, 2017)

5. Vitiligo

Vitiligo je onemocnění, které je spojeno s poruchou melanocytů, ve kterých se vytváří pigment. V důsledku se na kůži objevují bílé skvrny. Vitiligo se začíná projevovat nejčastěji v pubertě a mezi 20. – 30. rokem, ale může se objevit v jakémkoli věku. Má tendenci se postupem času zvětšovat, přičemž větší části kůže ztrácejí pigment. Někteří lidé s vitiligem mají ztráty pigmentu i v oblasti hlavy nebo na pokožce, což způsobuje ztrátu pigmentu vlasu. (Boissy, 2009) (obrázek 2)



Obrázek 2 Vitiligo ve vlasech (zdroj: vlastní)

Výzkumníci identifikovali několik forem vitiliga.

Generalizované vitiligo (nazývané též nesegmentální vitiligo) je nejčastější formou zahrnující ztrátu pigmentu (depigmentace) v částech pokožky po celém těle. Depigmentace se obvykle vyskytuje na obličeji, krku a pokožce hlavy a kolem tělních otvorů, jako jsou ústa a genitálie. Někdy se pigment ztrácí i ve sliznicích, jako například na rtech. Ztráta pigmentace je také často pozorována v oblastech, které mají tendenci zažívat tření, nárazy nebo jiné trauma, jako jsou například ruce, paže a místa, kde jsou kosti blízko k povrchu kůže (kostnaté prominence). (Richmond, 2013)

Další forma nazývaná segmentální vitiligo je spojena s malými ložisky depigmentované kůže, která se objevují jen na jedné straně těla v omezeném prostoru. Tento typ se vyskytuje u asi 10 % postižených jedinců. (Richmond, 2013)

Vitiligo je obecně považováno za autoimunní poruchu. Autoimunitní poruchy znamenají, že imunitní systém napadá vlastní tkáň a orgány těla. U lidí s vitiligem imunitní systém napadá pigmentové buňky (melanocyty) v kůži. Asi 15 až 25 % lidí s vitiligem je také postiženo alespoň jednou další autoimunitní poruchou, zejména

autoimunitní poruchou štítné žlázy, revmatoidní artritidou, diabetem 1. typu, psoriázou, perniciózní anémií nebo systémovým lupusem erythematoidem. (Richmond, 2013)

Při absenci jiných autoimunitních onemocnění nemá vitiligo vliv na celkové zdraví nebo fyzickou funkci. Avšak obavy týkající se vzhledu a etnické identity jsou pro mnohé postižené osoby po psychické stránce nebezpečnější. (Richmond, 2013)

5.1 Frekvence

Vitiligo je běžná porucha, která postihuje 0,5 až 1 % obyvatelstva po celém světě. Zatímco tento stav může být výraznější u lidí s tmavou pletí, vyskytuje se s podobnou frekvencí ve všech etnických skupinách. (Boissy, 2009)

5.2 Příčiny

Rozdíly ve více než 30 genech vyskytujících se v různých kombinacích byly spojeny se zvýšeným rizikem vzniku vitiliga. Nejčastější z těchto genů jsou *FOXD3*, *NLRP1* a *PTPN22*. (JIN, 2012)

FOXD3 gen je regulátorem diferenciací melanoblastů a naznačuje, že zvýšená transkripční aktivita poskytovaná variantou promotoru může potlačit nebo změnit diferenciaci melanoblastů u těchto pacientů. (Alkhateeb, 2005)

NLRP1 gen poskytuje instrukce pro syntézu proteinu, který se podílí na imunitní systému a pomáhá regulovat proces zánětu. Zánět nastává, když imunitní systém vyše signalizační molekuly a bílé krvinky do místa zranění nebo nemoci, kde bojují proti mikrobiálním útočnickům a usnadňují regeneraci tkání. Tělo pak inhibuje zánětlivou odpověď, aby zabránila poškození vlastních buněk a tkání. (Spritz, 2011)

PTPN22 gen poskytuje instrukce pro syntézu proteinu, který pomáhá kontrolovat aktivitu buněk imunitního systému. (Spritz, 2011)

Studie naznačují, že varianty řady dalších genů také ovlivňují zvýšený výskyt vitiliga. Mnoho z těchto genů se také podílí na funkci imunitního systému nebo na funkci a variaci melanocytů. Některé z genových změn spojené se zvýšeným rizikem vitiliga byly také spojeny se zvýšeným rizikem dalších autoimunitních stavů. (JIN, 2012)

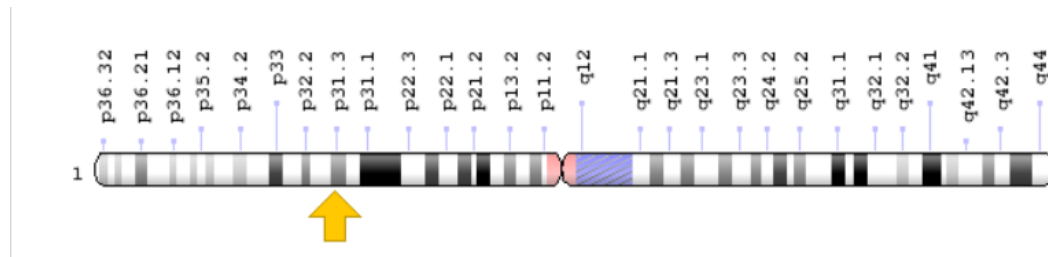
Není jasné, jaké konkrétní okolnosti způsobují, že imunitní systém napadá melanocyty v kůži. Výzkum naznačuje, že imunitní systém postižených jedinců může abnormálně reagovat na melanocyty, které jsou zdůrazněny faktory, jako jsou chemické látky nebo ultrafialové záření. Navíc melanocyty lidí s vitiligem mohou být více náchylné na stres než melanocyty zdravé populace, a proto mohou být pravděpodobněji napadeny imunitním systémem. Stav je pravděpodobně výsledkem kombinace genetických a environmentálních faktorů, z nichž většina nebyla identifikována. (JIN, 2012)

5.3 Dědičnost

Bylo zjištěno, že 20–30 % pacientů s diagnózou vitiliga má k nemoci genetické predispozice. Statistiky však ukazují, že pouhých 5–7 % osob, jejichž rodiče trpí depigmentací, touto chorobou trpí také. Vzhledem k tomu, že depigmentace se vyskytuje hlavně u osob, v jejichž rodinách tyto tendence vysledovat nelze, tedy není možné jednoznačně prohlásit, že se jedná o chorobu dědičnou. (Spritz, 2011)

5.4 Chromosomální umístění

Cytogenetická lokace: 1p31.1



Obrázek 3 Umístění FOXD3 genu na chromosomu (zdroj: omim.org)

6. Vitiligo – probandi

6.1 Proband číslo 3

6.1.1 Rodokmen

V rodině probanda číslo 3 se nevyskytoval žádný člen rodiny, který by trpěl tímto onemocněním. Tudíž se vylučuje přímá dědičnost.

6.1.2 Příznaky

Od útlého dětství jako pravou ruku jí naopak doprovázela nadměrná pigmentace po celém těle. Kolem 50. roku nastal tzv. přechod a tím spousty doprovázejících příznaků. Jako první se začala objevovat ustupující pigmentace na ruku i nohou, po čase pigmentace ustoupila na celém těle. Kvůli rychlému nabírání váhy ji doktor poslal na endokrinologii a nakonec se potvrdila hypofunkce štítné žlázy. To potvrzuje teoretickou část (viz. výše), ve které se píše, že vitiligo často doprovází i jiné autoimunitní onemocnění.



Obrázek 4 Proband č.3 (zdroj: vlastní)

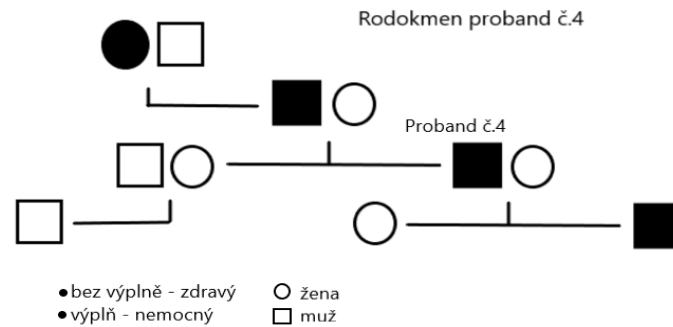
6.1.3 Léčba

Užívá Euthyrox na štítnou žlázu, ale u dermatologa nebyla, a tak skvrny nikdy nijak neléčila. Léčba štítné žlázy nijak rychlost ztráty pigmentu neovlivnila.

6.2 Proband číslo 4

6.2.1 Rodokmen

V rodině probanda číslo 4 vitiligem trpěl jeho otec, který onemocnění zdědil po své matce. Proband má dvě děti. První dítě (5 let) zatím žádné projevení onemocnění nemá. Druhému dítěti (2 roky) se vitiligo již objevilo.



Obrázek 5 Rodokmen proband č.4 (zdroj: vlastní)

6.2.2 Příznaky

Od narození má bílé skvrny po celém těle. Od 6 let do 15 let skvrny byly stabilní.

Od dospívání se depigmentace začala rozšiřovat.

Před několika lety se probandovi stala nehoda, kdy mu vybuchl kanystr s benzínem do obličeje. Od zahojení popálenin, vlasy dorostly barevné, ale na kůži se mu depigmentované skvrny stále rozšiřují.



Obrázek 6 Proband č.4 (zdroj: vlastní)

6.2.3 Léčba

Už od dětství chodil k dermatoložce, která předepisovala různé masti. Avšak léčba nebyla úspěšná.

7. Morbus darier

Choroba kůže je charakterizovaná bradavicovitými vřidky na těle. Vřidky jsou obvykle nažloutlé barvy, jsou citlivé na dotek, mírně mastné a mohou vydávat silný zápach. Nejčastějšími místy pro postižení jsou čelo, paže, hrudník, záda, kolena a lokty. Sliznice mohou být také postiženy, nejčastěji na jazyku, tvářích, dásních a v krku. Dalšími znaky Darierovy choroby jsou abnormality nehtů, jako jsou červené a bílé pruhy s nepravidelnou strukturou, suché loupavé dlaně a chodidla. (Burge, 1992)

Bradavicové vřidky se obvykle objevují v pozdním dětství až do rané dospělosti. Závažnost onemocnění se mění časem. Množství vřidků se mění.

U postižených lidí se střídá období, kdy mají vřidků méně či více. Vzhled vřidků je ovlivněn faktory okolního prostředí. Většina lidí s Darierovou chorobou v létě má horší průběh, když jsou vystaveni teplu a vlhkosti. UV světlo, drobné zranění, tření i požití některých léků také může způsobit nárůst. (Castory, 2009)

Příležitostně mohou mít lidé s Darierovou chorobou neurologické poruchy, jako je mírná intelektuální porucha, epilepsie nebo deprese. Zjištěny byly i poruchy učení a chování. Vědci však nevědí, zda jsou tyto poruchy, které jsou běžné i u obecné populace, spojeny s genetickými změnami způsobující Darierovu chorobu, nebo jsou-li náhodné. Někteří vědci se domnívají, že problémy s chováním mohou být spojeny se společenským stigmatem lidí s četnými poškozeními na kůži. (Kennedy, 1995)

Onemocnění má více známých forem.

Lineární (segmentální) forma je charakterizována vadami na lokalizovaných oblastech pokožky. Vřidky nejsou tak rozšířené jako u typické Darierově nemoci. Někteří lidé s lineární formou, mají abnormality nehtů, které se vyskytují u lidí s klasickou Darierovou chorobou, ale tyto abnormality se vyskytují pouze na jedné straně těla. Avšak lineární forma je způsobena genovými mutacemi *ATP2A2*, které jsou získány během života člověka a jsou přítomny pouze v určitých buňkách. Tyto somatické mutace nejsou děděny. Domníváme se tak, protože nejsou známy žádné případy lidí s lineární formou, která by byla děděna. (Castory, 2009)

7.1 Frekvence

Celosvětová prevalence Darierovy choroby není známa. Prevalence Darierovy choroby se odhaduje na 1 z 30 000 lidí ve Skotsku, 1 ze 36 000 lidí v severním Anglii a 1 ze 100 000 lidí v Dánsku. (Kennedy, 1995)

7.2 Příčiny

Mutace v genu *ATP2A2* způsobují Darierovu chorobu. *ATP2A2* gen reguluje produkci enzymu, který má zkratku SERCA2. Tento enzym působí jako čerpadlo, které pomáhá řídit hladinu iontů vápníku uvnitř buněk, zejména v endoplazmatickém retikulu a sarkoplazmatickém retikulu. Endoplazmatické retikulum je struktura uvnitř buňky, která

se zabývá zpracováním a transportem bílkovin. Sarkoplasmatické retikulum je struktura ve svalových buňkách, která pomáhá se svalovou kontrakcí, uvolňováním a ukládáním vápenatých iontů. Ionty vápníku působí jako signály pro velké množství aktivit, které jsou důležité pro normální vývoj a funkci buněk. SERCA2 umožňuje iontům vápníku proniknout do buňky a vystupovat z buňky v reakci na signály buňky. (Burge, 1992)

Mutace v genu *ATP2A2* vedou k nedostatečnému množství funkčního enzymu SERCA2. Nedostatek enzymu SERCA2 snižuje hladinu vápníku v endoplazmatickém retikulu, což způsobuje jeho dysfunkci. SERCA2 je vyplavován do celého těla, není však jasné, proč změny v tomto enzymu ovlivňují pouze pokožku. Někteří výzkumníci poznamenávají, že kožní buňky jsou jedinými typy buněk, které exprimuje SERCA2, ale nemají "záložní" enzym pro transport vápníku. Tato závislost na enzymu SERCA2 může způsobit, že kožní buňky jsou obzvláště citlivé na změny v tomto enzymu. (Sakuntabhai, 2000)

7.3 Dědičnost

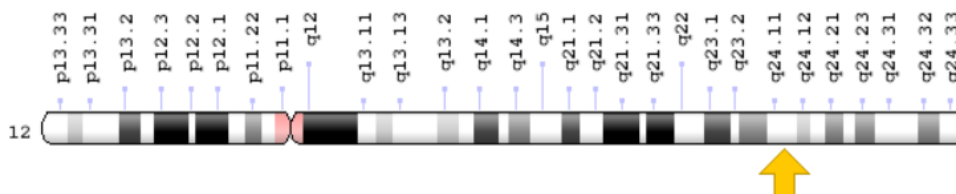
Onemocnění se dědí autozomálně dominantně vázané na X. To znamená, že jedna kopie změněného genu v každé buňce je dostatečná k tomu, aby způsobila poruchu a může onemocnět, jak žena, tak i muž. (Burge, 1992)

V některých případech postižená osoba dědí mutaci jednoho postiženého rodiče. Jiné příčiny mohou být důsledkem nových mutací v genu. Tyto případy se vyskytují u osob, které nemají v rodině poruchu. (Burge, 1992)

Lineární forma onemocnění Darier není obecně dědičná, ale vychází z mutací v buňkách těla, které se objevují po počátečním pohledu. Tyto změny se nazývají somatické mutace. (Castory, 2009)

7.4 Chromosomální umístění

Cytogenetická poloha: 12q24.11



Obrázek 7 umístění *ATP2A2* genu na chromosomu (zdroj: Omim.org)

8. Morbus darier – probandi

8.1 Rodokmen:

Proband číslo 1 zdědil toto kožní onemocnění po svém otci, který onemocnění získal od své matky. Onemocnění se dědí dominantně vázané na X. Dle Mendela (viz. Tabulka 1)

Tabulka 1 X-vázaná dědičnost

	X	Y
X	XX	XY
x	XX	XY

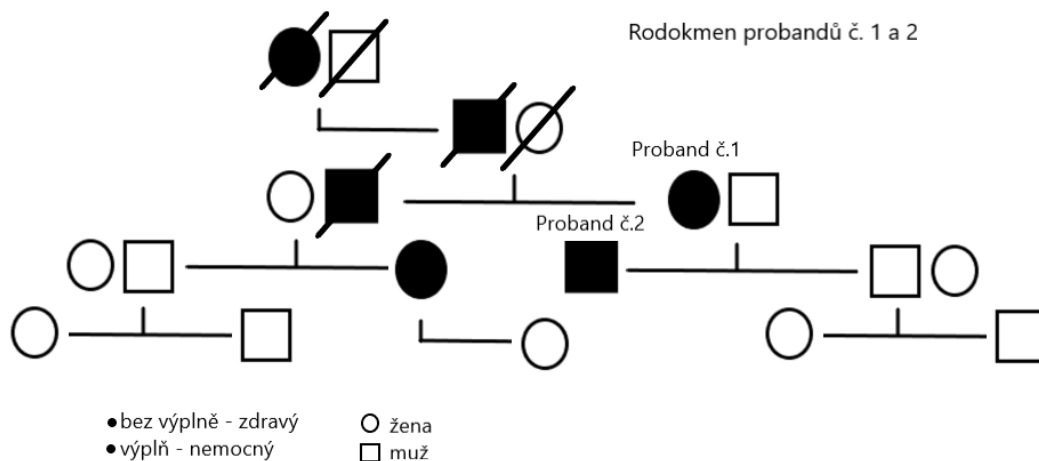
(zdroj: vlastní)

X – Dominantní alela
x – recesivní alela

Je 50 % pravděpodobnost, že onemocní jeden syn/dcera ze dvou.

Proband číslo 1 má dva syny. Jeden syn je zdravý a druhý je probandem číslo 2, který onemocněním trpí.

Po delším zkoumání rodiny, tudíž i osob zemřelých, jsme zjistili, že Proband číslo 1, měl i bratra postiženého tímto onemocněním. Bratr měl dceru a syna. Onemocnění zdědila jen dcera, která má dceru, ta je však bez příznaků.



Obrázek 8 Rodokmen proband č.1, 2 (zdroj: vlastní)

8.2 Příznaky:

Prvním příznakem je zarudnutí postiženého místa, kde se vytvoří pupínek podobný akné, který následně praskne a rozšíří se do okolí kůže. Rozšiřování vrádků také napomáhá pocení a obyčejné mytí.

Proband číslo 1: První známky podivných útvarů na kůži zpozorovala ve svých 17 letech, kdy si myslela, že jde o obyčejnou bradavici (jako v mnoha případech). Až druhý lékař ji potvrdil toto onemocnění a připravil ji na to, že ji to bude doprovázet celý život. Po 30. roce se začalo onemocnění zhoršovat a tím rozšiřovat po těle. Takovouto mírou onemocnění trpí do teď.

Proband číslo 2: Na rozdíl od své matky začal své příznaky pozorovat už v 6 letech. Přes pubertu měl onemocnění stále v malé míře. Po 30 roce se vřídky rozšířili už po celém těle jako u matky a trvá to do teď.



Obrázek 9 Proband č.1 oblast zad a břicha (zdroj: vlastní)

8.3 Léčba:

Vřídky často hnisají a také zapáchají, proto lékaři často volí léčbu pomocí antibiotik rozpuštěných v masti. Vřídky začínají pomalu usychat a stávají se z nich strupy, které po čase odpadnou. I přes to, že se rána zcela zahojí, zčervenání neustupuje.



Obrázek 10 postižená x zahojená oblast (zdroj: vlastní)

8.4 Potvrzující příběh obecného teoretického popisu:

„Jednoho horkého dne, jsme se s přáteli vydali k vodě. Celý den jsem strávila na sluníčku a už po několika hodinách jsem se necítila dobře. Kůži už jsem měla zčervenalou a začínala svědit. Kvůli přátelům jsem ještě vydržela nějakou chvíli a potom jsme se vydali domu. Během cesty svědění a bolest byli velmi nepříjemné. Cestou jsme míjeli teplé léčivé prameny a kamarádka dostala nápad, abychom se tam zastavili. Prý bude dobré pro moji pokožku a uleví se mi, souhlasila jsem. Z pramenů už jsme automaticky jeli na pohotovost do nemocnice, kde mi dali infuzi s antibiotiky a analgetika. Naštěstí do druhého dne zabrali a mně se ulevilo.“

Její příběh potvrzuje špatný vliv slunce a horké vody na poškozenou pokožku.

9. Metodika

Pro naši praktickou část jsme nejprve potřebovali získat DNA probanda, kterou jsme získali z bukálního stěru.

9.1 Izolace DNA

Před samotnou izolací jsme si připravili 12 mikrozkušavek o objemu 2 ml, které jsme vložili do laminárního boxu a nechali sterilizovat UV světlem. Dále jsme si nahřáli vodní lázeň na 56 °C, rozpustili proteinázu a přidali ethanol do promývacího roztoku (AW1 a AW2).

Do sterilních mikrozkušavek jsme pomocí sterilních nůžek odstříhli výtěrový tampón z bukálního stěru probanda, přidali 200 ul PBS a krátce zvortexovali, stočili.

Dále jsme přidali 20 ul QIAGEN proteinázy K a 360 ul pufru AL a opět jsme mikrozkušavku zvortexovali a stočili. Vzorek jsme dali inkubovat při teplotě 56 °C po dobu 15 minut a krátce jsme ho stočili. Sterilně jsme vyndali tampón a přidali k němu 180 ul 96 % ethanolu. Dále zvortexovali a stočili alespoň 3x za sebou.

Vzorek jsme z mikrozkušavky přepipetovali do označené QIAamp spin kolonky, uzavřeli jsme ji víčkem. V Centrifuze jsme točili kolonku 1 minutu při 8000 rpm a filtrát i se zkumavkou jsme vyhodili. (Do jedné kolonky jsme přelili 3 vzorky od jednoho pacienta pro větší konečnou koncentraci DNA).

Kolonku jsme vložili do nové kolekční zkumavky a přidali k ní 500 ul promývacího pufru AW1, centrifugovali po dobu 1 minuty při 8000 rpm. Filtrát jsme vylili a kolonku vložili zpět do kolekční zkumavky. Dále jsme na kolonku přidali 500 ul AW2 pufru a centrifugovali 3 minuty při 14 000 rpm. Filtrát jsme vylili a kolonku vložili zpět do kolekční zkumavky. Zkumavku jsme vložili do centrifugy a stočili ji 1 minutu na maximální otáčky.

Kolonku jsme přesunuli do 1,5 ml zkumavky označené štítkem s číslem vzorku a kolekční zkumavku s filtrátem jsme vyhodili. Přidali jsme 50 ul AE a inkubovali 5 minut při pokojové teplotě. Vzorek jsme centrifugovali při 8000 rpm 2 minuty. Nakonec jsme roztok DNA znovu přepipetovali na kolonku, 5 minut inkubovali a 2 minuty centrifugovali při 8000 rpm.

Zkumavku s vyizolovanou DNA jsme skladovali při teplotě -20 °C.

9.2 Precipitace DNA

Do izolované DNA jsme napipetovali 40 ul octanu sodného (3 M) a 900 ul předchlazeného absolutního ethanolu. Zkumavky jsme následně zvortexovali a krátce stočili v centrifuze. Pro zvýšení účinnosti jsme zkumavky inkubovali nejméně 1 hodinu v -20 °C. Zkumavky jsme poté stočili v centrifuze při 13 000 rpm po dobu 20 minut.

Po stočení jsme vylili supernatant a přidali stejný objem 75 % ethanolu. Zkumavky jsme opět centrifugovali při 13 000 rpm po dobu 5 minut. Opět jsme vylili supernatant a zbytek ethanolu jsme odpipetovali pipetou. Pro lepší odpaření ethanolu jsme zkumavky vložili do předem vyhřátého inkubátoru. Inkubátor jsme nastavili na 37 °C a zkumavky jsme inkubovali po dobu 30 minut. Do každé zkumavky jsme pipetou přidali 15 ul

vody, tím jsme rozpustili získaný sediment. Důkladně jsem zkumavky zvortexovali a krátce stočili v centrifuze.

9.3 Měření koncentrace DNA

Koncentraci DNA jsme měřili na Colibri Microvolume Spectrometer. Měřili jsme 1 ul DNA proti TE pufru.

Tabulka 2 Koncentrace DNA

Proband	č.1	č.2	č.3	č.4
koncentrace (ng/ul)	113,40	159,02	61,30	57,75

(zdroj: vlastní)

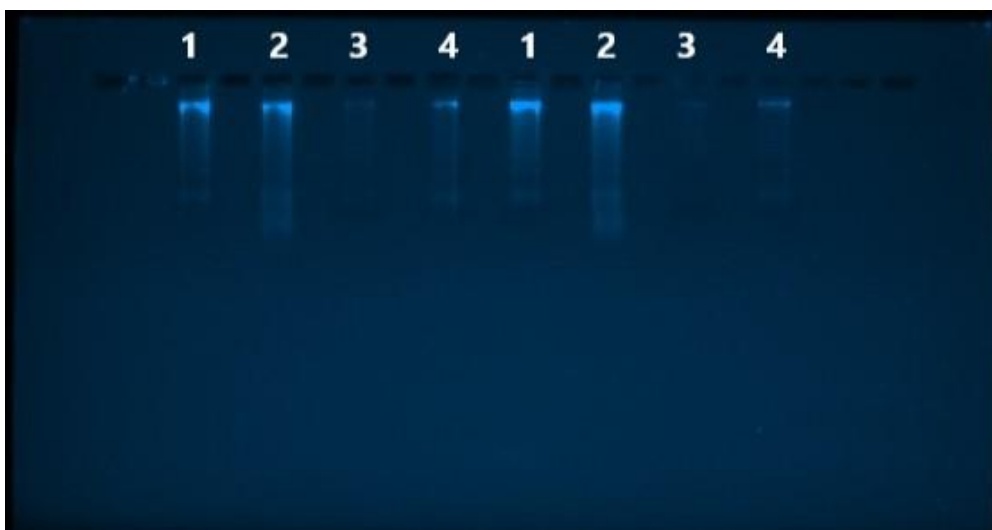
9.4 Elektroforéza

Separální metoda založená na rozdílné pohyblivosti složek vzorku v elektrickém poli. Vzorek se separuje do gelu na základě jeho molekulární hmotnosti.

Zředili jsme TBE pufr v poměru 9:1 destilovanou vodou, abychom získali 1 % pufr. Pro naše účely jsme naředili 0,5 l pufru. Navázili jsme si 1,5 g agarózy a kvantitativně převedli do earlenovy baňky spolu se 100 ml pufru. Roztok jsme zahřívali v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza plně nerozpustila. Zahřátý gel jsme schladili pod tekoucí vodou na 70 °C a přidali do něj 4 ul ethyidium bromid (pracovali jsme v rukavicích a s pečlivostí, protože ethyidium bromid je vysoce karcinogenní látka). Tekutý gel jsme vytili do formy na gel s hřebínkem pro vytvoření určitých pozic pro umístění vzorku.

Rozmraženou DNA jsme párkrát za sebou zvortexovali a stočili. Na parafinový papír jsme napipetovali 4 ul Loading buffer a k ní 4 ul vzorku DNA. Pomocí pipety jsme modř a DNA smíchali opětovným nasátím a vypuštěním a poté napipetovali na gel. Gel jsme přesunuli do elektroforetické vany a nalili do ní dostatečné množství pufru. Vanu jsme zavřeli víkem a napojili elektrody. Zdroj jsme nastavili na 80 V a 30 minut.

Hotový gel jsme přesunuli na UV lampu, vyfotografovali a upravili pomocí počítačového programu UVITEC.



Obrázek 11 Elektroforeogram DNA (zdroj: vlastní)

9.5 Navržení primerů

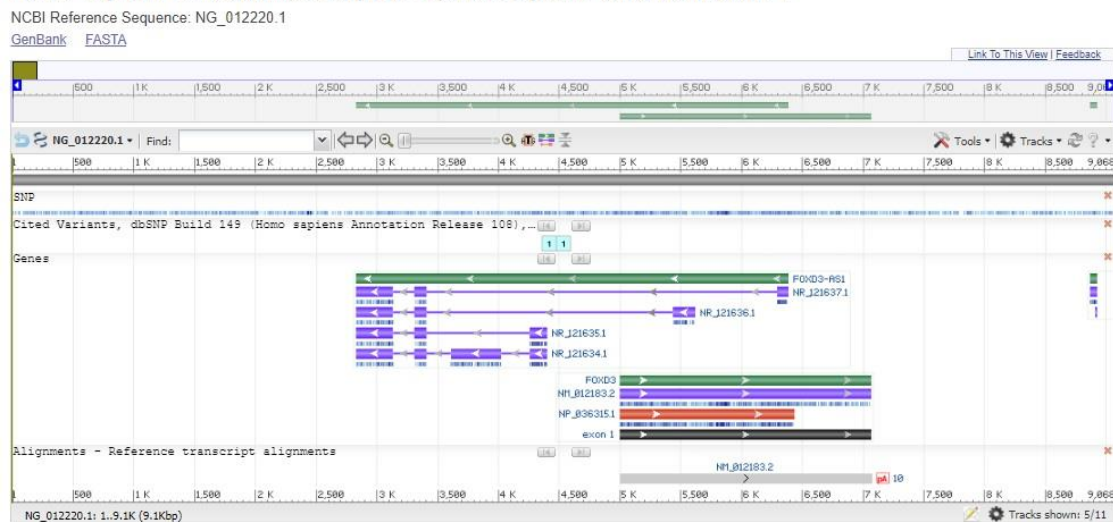
Nejprve jsme museli najít vyšetřovaný gen v internetové databázi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. V našem případě se jednalo o 2 geny.

FOXD3 - pro vyšetření možné mutace v tomto genu kvůli genetické poruše vitiligo

ATP2A2 - pro vyšetření možné mutace v tomto genu kvůli genetické poruše Morbus Darier

Do vyhledávače v internetové databázi jsme zadali vyhledávaný gen s podmínkou, že hledáme „nukleotid“ a zjišťujeme ho u „homo sapiens“. Nalezený gen jsme si zobrazili v grafické podobě, abychom lépe viděli velikost exonu, se kterým budeme nadále pracovat. (Exon je na grafu vyznačený černou barvou).

Homo sapiens forkhead box D3 (FOXD3), RefSeqGene on chromosome 1



Obrázek 12 Grafická podoba genu FOXD3 (zdroj: vlastní)

Dále jsme si zobrazili sekvenci exonu. Celou sekvenci jsme si zkopírovali do programu Microsoft Word a dusíkaté báze jsme rozdělili na menší části. Ke každé části jsme přidali část sekvence z předešlé části exonu (označeny žlutě) kvůli následnému postupu získání primerů (viz. níže). U první a poslední části jsme přidávali dusíkaté báze z intronové části genu (označeny malými písmeny).

FOXD3 – exon 1

1. část

ccctgagctccgtggcagccccgaacacctcatcgcccetgccccctccccgcgcgctaccaaccccaggagggATGA
CCCTCTCCGGCGGCGGCAGCGCCAGCGACATGTCCGGCCAGACGGTGCTGACGGCC
GAGGACGTGGACATCGATGTGGTGGGCGAGGGCGACGACGGGCTGGAAGAGAAGG
ACAGCGACGCAGGTTGCGATAGCCCCGCGGGGCCCGGAGCTGCGCCTGGACGA
GGCGGACGAGGTGCCCCGCGGCACCCATCACGGACAGCCTCAGCCGCCCCACC
AGCAGCCCCTGACATTGCCAAGGAGGCGGCCGGAGCCGGGGCCGGACCGGGGGG
CGACGTGGGCGCGCCGGAGGCGGACGGCTGCAAGGGCGGTGTTGGCGGCGAGGAG
GGCGGCGCGAGC
GGCGGCGGGCCTGGCGGCGGGCAGCGGTTCCGGCGGGAGGCCTGGCCCCGAGCAAGC
CCAAGAACAGCCTAGT

2. část

GGCCCCGAGCAAGCCCAAGAACAGCCTAGTGAAGCCGCCTTACTCGTACATCGCGC
TCATCACCATGGCCATCCTGCAGAGCCCGCAGAAGAAGCTGACCCTGAGCGGCATC
TGCGAGTTCATCAGCAACCGCTTCCCCTACTACAGGGAGAAGTTCCCCGCCTGGCA
GAACAGCATCCGCCACAACCTTCTACT

3. část

ACAGCATCCGCCACAACCTTCTACTCAACGACTGCTTCGTCAAGATCCCCCGCGAG
CCGGGCAACCCGGGCAAGGGCAACTACTGGACCCTGGACCCGCAGTCCGAGGACA
TGTTTCGACAACGGCAGCTTCCTGCGGCGCCGAAACGCTTCAAGCGCCACCAGCAG
GAGCACCTGCGCGAGCAGACGGCGCTCATGATGCAGAGCTTCGGCGCTTA

4. část

ATGCAGAGCTTCGGGCGCTTACAGCCTGGCGGCGGCGGCCGGCGCCGCGGGACCCTA
CGGCCGCCCTACGGCCTGCACCCTGCGGCGGCGGCCGGTGCCTATTCGCACCCGG
CAGCGGCGGCGGCCGCGGCTGCTGCGGCGGCGCTCCAGTACCCGTACGCGCTGCCG
CCGGTGGCACCGGTGCTGCCTCCCGCTGTGCCGCTGCTGCCCTCGGGCGAGCTGGG
CCGCAAAGCGGCCGCCTTCGGCTCACAGCTCGGCCCGGGCCTGCAGCTGCAGCTCA
ATAGCCTGGGCGCCGCGGCGGCTGCGGGCACAGCGGGCGCCGCGGGCACCCAC
CGCGTCGCTCATCAAGTCCGAGCCAAGCGCGCGGCCGTCGTTACGCATCGAG

5. část

CCGTCGTTACGCATCGAGAACATCATAGGTGGGGGCCCGCGGCTCCTGGGGGCTC
GGCGGTGGGCGCTGGGGTCGCCGGCGGCACTGGGGGTTACGGGGGCGGCAGCACG
GCGCAGTCGTTTCTGCGGCCACCCGGGACCGTGCAGTCGGCAGCGCTCATGGCCAC
CCACCAACCGCTGTCGCTGAGCCGGACGACTGCCACCATCGCGCCCATTCTTAGCG
TGCCACTCTCCGGACAGTTTCTGCAGCCCGCAGCCTCGGCCGCGCCGCTGCTGCG
GCCGCGCTCAAGCCAAATGGCCGGCGCAATAGGGACGCGCCAATGGCCGGGACC
CAGGGTCCGGCGGCGGCCTCGAGCAACAAATGCACCTCCAGGCTGCGCGCCCTGTC
CCAAGCCCGGTCCCGGTCCCGCTGCCAATCCTGGACTCTGCCTCTCCCCAATTTCC
TTTCCCCTGAGCCCCAACGCCTACCTTCCGCGGCCTCCATCCCCTCGCGCACACCT
AAGCTGGTCGAGCAAACCT

6. část

AAGCTGGTTCGAGCAAACCTCACCCGCGCGCCCGCGGGGATAGCTTTCCATACAGGTA
AAACCGAAAACCGAATTTTCCA AAAAATGCACCCCGACGGCGCCTGCTCTTAGTACC
GTGGGGATGGGAGGGAAATTTTGTATATATTTGTAAAAAAATTATTGACTTTCTT
TTTGGGGTTTTTATTTTTTTAAGAAAAACAATTCGTAGATTTAGAGCTCTGAAC
TTTCATTTTTTTGAAGGTTCACTCTCCGAAGTTTTATCTGAGAAAAGAATGTATAG
AGACGTTGGGAGATTTTAAATATAAAAAATTTTCAAAAAGGCAAAAAGTGTCAATC
TATTATAAAAGTCTGTTTATATATGAATGAATATATATGGTATTCTAAATGTTATTC
CATCGTGTGTACACAACCTTTGTAAATAAATTTTTAAAATGCCcagcctagtgttttatttagttgtct
gaagtaaatggcaagattttfaaatggtatttttgcctttctc

Každou část jsme zkopírovali do programu Primer-BLAST, který jsme našli ve stejné internetové databázi.

Primer-BLAST

Je veřejný program, který pomáhá uživatelům navrhnout své cílově specifické primery. Primer-BLAST nabízí flexibilitu pro přizpůsobení potřebám různých návrhů vlastních primerů. Uživatelé mohou buď navrhnout nové primery nebo zkontrolovat specifičnost již existujících primerů. Má schopnost umístit primery na základě hranic exonů / intronů a umístění SNP. (Jian Ye et al., 2012)

Program Primer-BLAST se skládá z modulu pro generování dvojic kandidátských primerů a modulu pro kontrolu cílové specifičnosti generovaných párů primerů. Používá se k vytvoření kandidátních párů primerů pro danou templátovou sekvenci. (Jian Ye et al., 2012)

Postup pro navržení primerů v Primer-BLAST

Hlavní strana se skládá z několika sekcí, kde uživatelé mohou vložit šablonu PCR nebo již existující primery, stejně tak, jako mohou nastavit další parametry např. velikost PCR produktu, teplotu primerů atd. Sekvenci můžeme vkládat buď ve formátu surové DNA, FASTA nebo NCBI kódu. Délka šablony je omezena na 50 000 bází. V našem případě jsme použili sekvenci z formátu FASTA s maximální velikostí 522 bází. (Obrázek 13).

The image shows the web interface of the Primer-BLAST tool. At the top, there are logos for NIH and NCBI. The main heading is 'Primer-BLAST' with the subtitle 'A tool for finding specific primers'. Below this, there are navigation links: 'Reset page', 'Save search parameters', 'Retrieve recent results', 'Publication', and 'Tips for finding specific primers'. The 'PCR Template' section contains a text area with a FASTA sequence, a 'Range' selector (From/To), and fields for 'Forward primer' and 'Reverse primer'. The 'Primer Parameters' section includes checkboxes for 'Use my own forward primer' and 'Use my own reverse primer', a 'PCR product size' range (70-1000), '# of primers to return' (10), and 'Primer melting temperatures (Tm)' (57.0-63.0). The 'Exon/intron selection' section has a dropdown for 'Exon junction span' (No preference) and 'Exon junction match' (7-4).

Obrázek 13 Primer-BLAST část 1. (zdroj: vlastní)

Po vyplnění naší požadované sekvence jsme si zkontrolovali nastavení volitelných parametrů a odškrtnuli jsme políčko vyznačené na Obrázek 14 proto, aby nám program nehledal specifickou šablonu PCR, ale navrhl zcela nové primery. Nakonec jsme použili políčko „Get Primer“ pro zobrazení výsledků.

Exon junction span: No preference

Exon junction match: Exon at 5' side: 7, Exon at 3' side: 4

Intron inclusion: Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range: Min: 1000, Max: 1000000

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check: Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode: Automatic

Database: Refseq mRNA

Exclusion: Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix), Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism: Homo sapiens

Entrez query (optional):

Primer specificity stringency: Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

Max target size: 4000

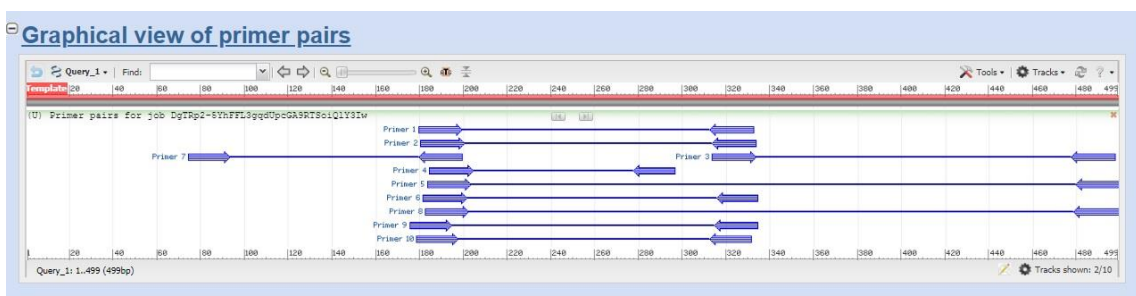
Allow splice variants: Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers

Show results in a new window Use new graphic view

Obrázek 14 Primer-BLAST část 2 (zdroj: vlastní)

Program nám navrhl nejvhodnější primery. U některých částí našeho exonu, nám program nenavrhl vhodný primer, který by označoval celou požadovanou část. Proto jsme museli vybrat dva nejvhodnější předložené primery. Tento případ se nám stal i u uváděného příkladu (Obrázek 15). Dva primery, které tedy pokrývají největší část předložené sekvence jsou primer číslo 5 a číslo 7.



Obrázek 15 Primer-BLAST grafické zobrazení primerů (zdroj: vlastní)

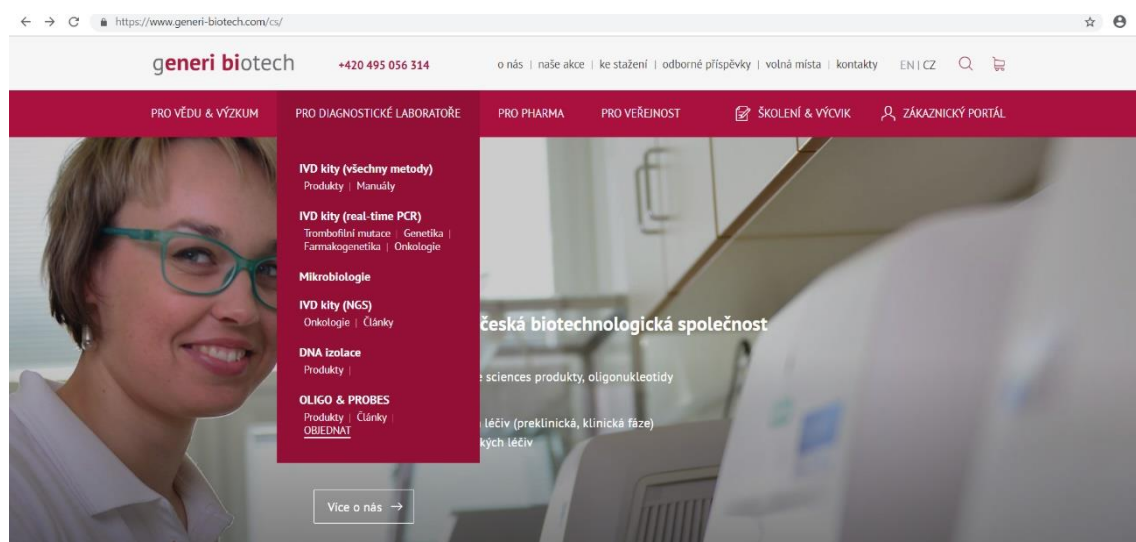
Pod grafickým zobrazením se nachází podrobnosti ohledně vybraných primerů. Jak můžeme vidět na Obrázek 16, v podrobnostech se nachází informace o teplotě, délce sekvence a pořadí dusíkatých bází ve Forward a Reverse primeru, se kterými budeme nadále pracovat.

Primer pair 4									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGAAGAGAAAGGACAGCGAGG	Plus	20	185	204	60.46	60.00	3.00	3.00
Reverse primer	CTGAGGCTGTCCGTGATGG	Minus	19	296	278	60.15	63.16	3.00	3.00
Product length	112								
Primer pair 5									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGGAAAGAGAAAGGACAGCGAC	Plus	20	184	203	59.40	55.00	2.00	1.00
Reverse primer	ACTAGGCTGTTCTTGGGCTT	Minus	20	499	480	58.93	50.00	4.00	0.00
Product length	316								
Primer pair 6									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCTGGAAAGAGAAAGGACAGCGG	Plus	20	182	201	60.74	60.00	4.00	2.00
Reverse primer	GCCTCCTTGGCAATGTCA	Minus	19	334	316	60.30	57.89	4.00	3.00
Product length	153								
Primer pair 7									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGAGGGATGACCCCTCTCCG	Plus	19	75	93	60.83	68.42	7.00	3.00
Reverse primer	CTGTCTTCTTCCAGCCC	Minus	20	199	180	59.75	60.00	3.00	0.00
Product length	125								
Primer pair 8									

Obrázek 16 Primer-BLAST podrobnosti o primeru (zdroj: vlastní)

Získali jsme konečnou formu Forward a Reverse primeru a tím jsme se mohli přesunout k poslední části získávání všech potřebných primerů k práci.

Pokračovali jsme na webové stránce <http://www.generi-biotech.com/cs/>, která slouží pro objednávání hotových primerů. (Obrázek 17).



Obrázek 17 Generi-biotech hlavní stránka (zdroj: vlastní)

Přes účet mého vedoucího jsme se přihlásili do Generi-biotech. Do objednávacího formuláře (Obrázek 18) jsme vyplnili název sekvence, který jsme si sami navrhli. Tvar sekvence, který jsme získali z předešlých kroků v programu primer-blast. Uložili jsme a zadali zbytek primerů.

Obrázek 18 Generi-biotech objednávací formulář (zdroj: vlastní)

Objednávku jsme zaslali k vyřízení. Na Obrázek 19 jsou všechny objednané primery pro důkaz vitiliga u našich probandů.

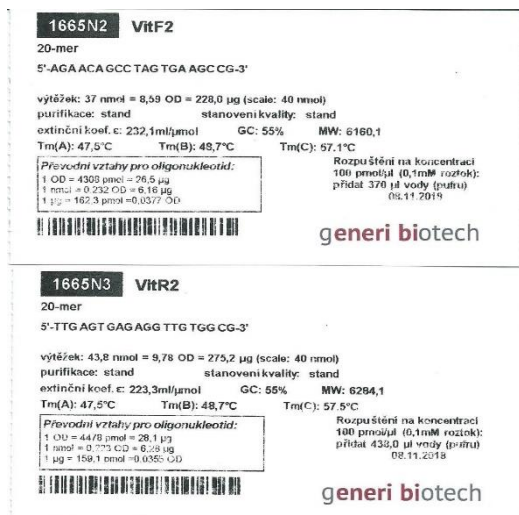
Přidej oligo/sondu	Hromadně vložit	Uprav vybrané	Kopíř do notuzu	Vložit z notuzu	Vypočti cenu	Duplicity barevně	Oligo NOTES	MOJE OLIGO				
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Počet položek: 20	Počet vybraných záznamů: 0				
<input type="checkbox"/>	1	VhrF1.1	TGGGAAGAGAAGGACAGCGAC	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665M8		
<input type="checkbox"/>	2	Vhr1.1	ACTAGGCTGTCTTGGGCTT	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665M9		
<input type="checkbox"/>	3	Vhr1.2	GGAGGATGACCTCCCG	19	40 nmol	stand	B	stand	269	1665N0		
<input type="checkbox"/>	4	Vhr1.2	CTGTCTTCTTCCAGCCC	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665N1		
<input type="checkbox"/>	5	Vhr2	AGAACAGCTAGTGAAGCCG	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665N2		
<input type="checkbox"/>	6	Vhr2	TTGAGTGAAGGTTGTGGG	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665N3		
<input type="checkbox"/>	7	Vhr3.1	GCAACTACTGACCTTGAC	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665N4		
<input type="checkbox"/>	8	Vhr3.1	CTGAAGCGCCAGCTCTC	19	40 nmol	stand	B	stand	269	1665N5		
<input type="checkbox"/>	9	Vhr3.2	CATCCGCCACACCTCTC	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665N6		
<input type="checkbox"/>	10	Vhr3.2	GGTCCAGGTCAGTAGTTG	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665N7		
<input type="checkbox"/>	11	Vhr4	CAGAGCTCCGGGCTTACAG	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665N8		
<input type="checkbox"/>	12	Vhr4	TCTGATCTGACACGACGG	19	40 nmol	stand	B	stand	269	1665N9		
<input type="checkbox"/>	13	Vhr5.1	CCGTGTTTCAGCATGAGAA	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665P0		
<input type="checkbox"/>	14	Vhr5.1	AGCTTGAGGTGATTGTT	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665P1		
<input type="checkbox"/>	15	Vhr5.2	CAGAAATGACCTCCAGCG	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665P2		
<input type="checkbox"/>	16	Vhr5.2	TGATTTGCTCCAGCAGTT	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665P3		
<input type="checkbox"/>	17	Vhr6.1	AACTGCTGAGCAACTCA	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665P4		
<input type="checkbox"/>	18	Vhr6.1	TCCCCAGCTACTAAGACCA	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665P5		
<input type="checkbox"/>	19	Vhr6.2	TAGTACCTGGGATGGGAG	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665P6		
<input type="checkbox"/>	20	Vhr6.2	AAACACTAGGCTGGGATTT	20	40 nmol	stand	B	stand	269	1665P7		

Obrázek 19 Generi-biotech výsledná objednávka (zdroj: vlastní)

Hotové primery byly dodány během týdne (Obrázek 20). Ke každému primeru přišla informační kartička (Obrázek 21). Na kartičce je název sekvence, informace o sekvenci, teplotách, koncentracích a množství vody potřebné ke správnému rozpuštění primeru (pravý dolní roh kartičky).



Obrázek 20 Hotové primery (zdroj: vlastní)



Obrázek 21 Informační kartičky (zdroj: vlastní)

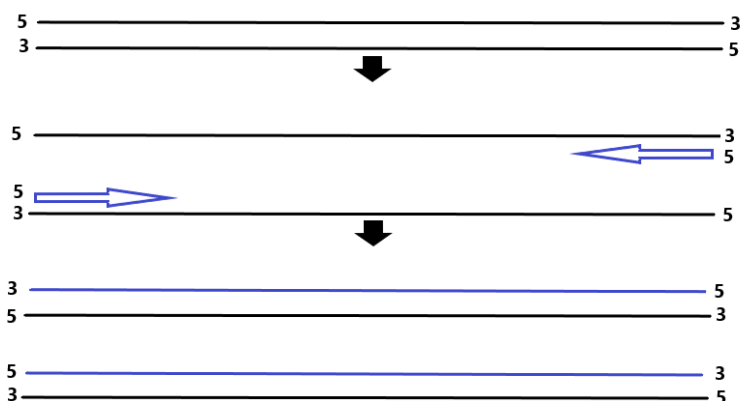
Do každé zkumavky primeru jsme napipetovali předepsané množství injekční vody, zvortexovali a krátce stočili. Nechali přes noc rozpouštět. Každý primer jsme museli zředit, abychom získali koncentraci 10 pmol/ul. Do nových stejně označených mikrozkuvek jsme primer naředili injekční vodou v poměru 1:9 do 100 ul.

9.6 PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Princip:

Využívá termostabilních polymeráz, které snáší denaturační teplotu, aniž by ztrácely příliš mnoho ze své aktivity. Lze tedy v jejich přítomnosti teplotu zvyšovat tak, že se dvouřetězcové molekuly DNA (dsDNA) rozpadnou na jednořetězcové (ssDNA) – Denaturační fáze.

Ve fázi anealingu při snížení teploty dojde k navázání námi vybraných a uměle syntetizovaných oligonukleotidů (primerů). Dále začíná fáze Syntetická, při které polymeráza podle templátu sestavuje nový řetězec, jehož součástí je námi dodaný primer. Účelem PCR je namnožení námi vybraného úseku DNA molekuly, a proto používáme primery dva, které jsou umístěny proti sobě svými 3' konci, každý na jednom z řetězců DNA. Střídání těchto teplotních kroků se cyklicky opakují (20-35x). (viz. Obrázek 22 Schéma PCR reakce Obrázek 22) (Brdička, 2001)



Obrázek 22 Schéma PCR reakce (zdroj: vlastní)

Účelem PCR reakce je většinou připravit dostatek amplifikátů, aby mohl být dále analyzován. PCR reakce ale dokáže také určit výsledek tím, zda amplifikát vůbec vzniká, a někdy již pozitivita nebo negativita výsledku je dostačující odpovědí. (Brdička, 2001)

Pracovní postup:

V laminárním boxu jsme si do stojánku připravili mikrozkušavky o objemu 0,2 ml, které jsme si nechali sterilizovat UV světlem. Mikrozkušavky jsme si pečlivě popsali lihovým fixem na víčko i po straně, protože v termocycleru je časté smazání čísel vlivem tepla.

Do každé označené mikrozkušavky jsme napipetovali 12,5 ul PCR mixu (od výrobce růžově zabarvený, pro snadnou manipulaci s PCR produktem při elektroforéze). Dále jsme přidali 1 ul forward i reverse primeru, 1 ul DNA a nakonec 9,5 ul injekční vody, abychom doplnili celkový objem do 25 ul.

Na termocycleru jsme nastavili nový program podle přiloženého návodu. Před začátkem samotného PCR jsme do každého rohu vyhřívaného bloku vložili prázdné mikrozkušavky, aby na naše malé množství vzorku nepůsobil přílišný tlak a mikrozkušavky se vzorkem nerozbitly.

9.7 Čištění PCR produktů za použití Enzymatic PCR cleanup using Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase

Metoda Enzymatic PCR cleanup nabízí snadný způsob, jak odstranit zbývající primery a dNTP z předešlé PCR reakce. K vyčištění PCR produktu jsou potřeba dva enzymy: Exonukleáza I (Exo I), která degraduje zbytkové PCR primery a Shrim alkalickou fosfatázu (rSAP), která defosforuluje zbývající dNTP.

Pracovní postup:

Do mikrozkušavky jsme k 5 ul PCR produktu přidali 0,5 ul Exo I a 1 ul rSAP. Mikrozkušavku jsme vložili do termocycleru, kde jsme směs inkubovali při 37 °C po dobu 15 minut. Dále jsme zvýšili teplotu na 80 °C, aby se inaktivovali oba enzymy. Po 15 minutách inkubace byly PCR připraveny pro následnou analýzu.

9.8 Sekvenace

Sekvenování DNA je souhrnný termín pro biochemické metody, kterými zjišťujeme pořadí nukleových bází (adenin, cytosin, guanin, thymin) v sekvencích DNA. Tyto sekvenace jsou hlavní součástí dědičné informace v jádru buňky. (Raclavský, 2003)

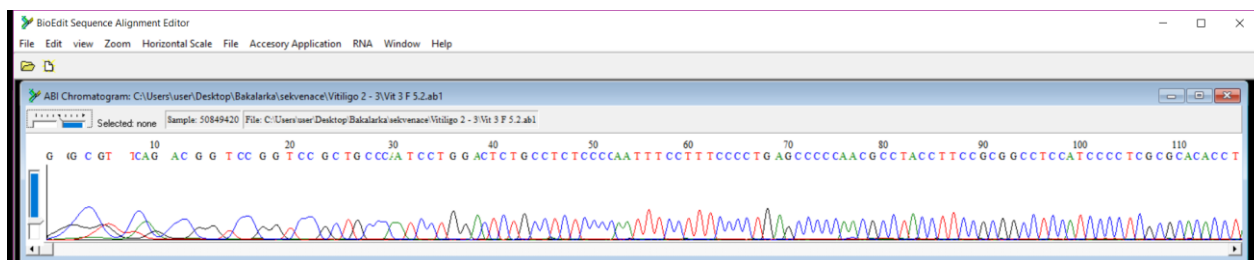
Pracovní postup:

V laminárním boxu jsme si do stojánku připravili mikrozkušavky o objemu 1,5 ml, které jsme si nechali sterilizovat UV světlem. Mikrozkušavky jsme si označili lihovým fixem na víčka.

Do mikrozkušavek jsme napipetovali 5 ul přečištěného PCR produktu, 5 ul primeru ($c=10$ pmol/ul) a 17,5 ul vody. Vzorek jsme nevertexovali a nestáčeli. Zavřenou mikrozkušavku jsme polepili příslušným štítkem zaslaným od firmy Genseq s.r.o., který se skládal ze dvou částí. První část přišla na vzorek a druhou část jsme si nalepili do sešitu k nadepsaným vzorkům. Vzorky jsme následně vložili do schránky firmy Genseq s.r.o. na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity.

Do dvou dnů byly sekvenace k dispozici na internetových stránkách firmy ve formátu PDF, FASTA a ab1., která slouží k otevření sekvenace v počítačovém programu BioEdit.

Sekvenaci jsme si otevřeli v programu BioEdit a vyhodnotili, zda ji můžeme použít (**Error! Reference source not found.**). Pokud ano, zkopírovali jsme ji do internetové databáze NCBI. Databáze porovnála vyšetřovanou sekvenaci se zdravou sekvenací a vyhodnotila procentuální schodu v pořadí nukleotidů a mutaci (Obrázek 24).



Obrázek 23 Sekvenace v BioEdit (zdroj:vlastní)

Alignments

Download ▾ GenBank Graphics

Homo sapiens forkhead box D3 (FOXO3), RefSeqGene on chromosome 1
Sequence ID: [NG_012220.1](#) Length: 9068 Number of Matches: 1

Range 1: 6483 to 6599 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(117)	2e-55	117/117(100%)	0/117(0%)	Plus/Minus
Query 1	AGGTAGGCCTTGGGGCTCAGGGGAAAGGAAATTGGGGAGAGGCAGAGTCCAGGATTGGG	60		
Sbjct 6599	AGGTAGGCCTTGGGGCTCAGGGGAAAGGAAATTGGGGAGAGGCAGAGTCCAGGATTGGG	6540		
Query 61	CAGCGGGACCGGGACCGGGCTTGGGACAGGGCGCGAGCCTGGAGGTGCATTTGTTG	117		
Sbjct 6539	CAGCGGGACCGGGACCGGGCTTGGGACAGGGCGCGAGCCTGGAGGTGCATTTGTTG	6483		

Obrázek 24 Sekvence v NCBI databázi (zdroj: vlastní)

10. Výsledky

Vitiligo

Tabulka 3 Výsledky probandů č.3 a č.4

Vitiligo - Proband č. 3	
Název sekvence	Výsledek
F 1.1	Neproběhla PCR
R 1.1	Neproběhla PCR
F 1.2	Bez mutace
R 1.2	Bez mutace
F 2	Bez mutace
R 2	Bez mutace
F 3.1	Bez mutace
R 3.1	Bez mutace
F 3.2	Bez mutace
R 3.2	Bez mutace
F 4	Neproběhla PCR
R 4	Neproběhla PCR
F 5.1	Bez mutace
R 5.1	Bez mutace
F 5.2	Bez mutace
R 5.2	Bez mutace
F 6.1	Bez mutace
R 6.1	Bez mutace
F 6.2	Bez mutace
R 6.2	Bez mutace

(zdroj: vlastní)

Vitiligo - Proband č. 4	
Název sekvence	Výsledek
F 1.1	Neproběhla PCR
R 1.2	Neproběhla PCR
F 1.2	Bez mutace
R 1.2	Bez mutace
F 2	Bez mutace
R 2	Bez mutace
F 3.1	Bez mutace
R 3.1	Bez mutace
F 3.2	Bez mutace
R 3.2	Bez mutace
F 4	Neproběhla PCR
R 4	Neproběhla PCR
F 5.1	Bez mutace
R 5.1	Bez mutace
F 5.2	Bez mutace
R 5.2	Bez mutace
F 6.1	Bez mutace
R 6.1	Bez mutace
F 6.2	Bez mutace
R 6.2	Bez mutace

Ani u jednoho z probandů se neprokázala mutace ve *FOXD3* genu. Pro optimalizaci primerů jsme zkoušely použít 4 programy PCR (podle návodu od firmy dodávající PCR Master Mix – Combi PPP Master Mix Top-Bio s.r.o., Touch down, Gradient a podle návodu z Tomayerovi nemocnice). Primer 1.1 a 4 se nenavázal ani při jednom programu PCR.

Morbus Darier

Tabulka 4 Výsledky probandů č.1 a č.2

Morbus Darier - Proband č. 1	
Název sekvence	Výsledek
F 1	Bez mutace
R 1	Bez mutace
F 2	Bez mutace
R 2	Bez mutace

(zdroj: vlastní)

Morbus Darier - Proband č. 2	
Název sekvence	Výsledek
F 1	Bez mutace
R 1	Bez mutace
F 2	Bez mutace
R 2	Bez mutace

U probandů č.1 a č.2 se nezjistila žádná mutace v ATP2A2 genu ve 12. exonu.

11. Diskuze

1) Vitiligo a štítná žláza

U probanda číslo 3 jsme nepotvrdili žádnou mutaci. Možností je, že je mutace v jiném genu. Ale podle přečtených článků můžeme předpokládat, že endokrinologické onemocnění štítné žlázy hraje velkou roli ve vytváření vitiliga na kůži. Podle výpovědi probanda číslo 3, který přiznal, že vitiligo se mu začalo vytvářet až po menopauze, při kterém vzniklo i endokrinologické onemocnění štítné žlázy, jsme usoudili, že se o tento jev jedná.

2) Potvrzení příznaků Morbus Darier – slunce

Ve člancích o onemocnění Morbus Darier jsme se dozvěděli, že postižená kůže je velice citlivá. Citlivá nebude však jen na masti, chlad nebo teplo. Jako ve většině onemocnění kůže je citlivá na UV-záření ze slunečních paprsků. Proband číslo 1 nám tuto možnost potvrdil vlastním příběhem, kdy při dlouhém vystavení na sluníčku a následném ponoření těla do teplých léčivých pramenů, skončila na pohotovosti, kde byla léčená kortikoidy na utlumení přehnané reakce.

3) Dědičnost Morbus Darier

Ve všech člancích, které jsme pro tuto práci použili, jasně píšou, že se choroba Morbus Darier dědí X-vázaně. V rodině našeho probanda se však vyskytla zvláštní dědičnost. Podle skládaného rodokmenu zdědil onemocnění syn po otci. Z hlediska X-vázaných chorob je to nemožné. Vyskytuje se možnost, že onemocnění není striktně děděno X-vázaně, i když podle dalších členů rodiny, tato dědičnost je dodržena. A dále se vyskytuje možnost, že syn toto onemocnění neměl, to my se však dozvědět nemůžeme, protože již zemřel. Ale pokud by jím netrpěl, nemohla by ho zdědit jeho dcera.

4) Metodika

Pro stanovení mutací jsme museli sami navrhnout nové primery, protože molekulárně genetické analýzy pro tato onemocnění se standardně v nemocnici nestanovují, a i kdyby ano, do nemocnice jsme neměli přístup. Proto jsme začínali s prací úplně od začátku. Pro nově navržené primery trvá dlouho optimalizace PCR. Při naší práci jsme nastavili program podle návodu od firmy dodávající PCR Master Mix (Combi PPP Master Mix Top-Bio s.r.o.), avšak neúspěšně pro větší polovinu primerů. Dále jsme vyzkoušeli program Touch down, který byl také neúspěšný. Poté nás napadlo použít Gradient, díky kterému jsme zjistili teplotu, při které by primery nasedly (55,0-55,8 °C). V rozsahu odpovídajících teplot se pohyboval program z Tomayerovi nemocnice, při kterém nám následně primery nasedly. Avšak primery pro vitiligo označeny 1.1 a 4 nenedly ani u jednoho programu. Protože už nezbyl čas optimalizovat PCR z důvodu velkého množství vzorku, budeme v ní pokračovat v navazující magisterské práci.

K práci jsme použili čtyři probandy, pro každé onemocnění dva. Potřebné množství DNA bylo z důvodů optimalizace primerů tak veliké, že jsme nakonec museli DNA probandů izolovat 2x.

Pro získání konečného výsledků mutace v genu jsme použili Sangerovo sekvenování od firmy Genseq s.r.o. PCR produkty jsme museli vyčistit pomocí Exo sapu a mikrozkuhavky označit příslušným štítkem zaslaným od firmy. Při prvním sekvenování jsme osekvenovali vzorky od probandů s Morbus Darier. Sekvence byly čisté a bez mutace, tím jsme vyloučili mutaci v exonu dvanáct v *ATP2A2* genu. Při druhém sekvenování jsme odeslali všechny vzorky od probandů s Vitiligem. Avšak jen polovina sekvencí byla čistá, aby se dala vyhodnotit. U sekvencí, které se vyhodnotit dali, jsme zjistili, že se v nich žádná mutace nevyskytuje. Protože jsme měli druhou polovinu znehodnocenou, museli jsme sekvenování opakovat. Při třetím pokusu se opět neuchytily primery, které se nám nepodařilo optimalizovat. Zbytek vzorků jsme odeslali osekvenovat. Všechny zbylé sekvence byly čisté a mohli jsme je vyhodnotit. Však ani u zbylých sekvencí jsme žádnou mutaci nezjistili. Probandi s vitiligem nemají žádnou mutaci na exonu ve *FOXD3* genu.

Morbus Darier je X-vázaná choroba, my jsme se na internetové stránce omim.org dočetli, že může být poškozený gen *ATP2A2* pro enzym SERCA2, který je však umístěn na dvanáctém chromozomu, nikoli na chromozomu X. *ATP2A2* má 21 exonů, na kterých by se mohla mutace vyskytovat. Z článků od lékařů, kteří tyto mutace zkoumali, jsme se dočetli, že nejčastěji našli mutaci na dvanáctém exonu, proto jsme tento exon vybrali. Onemocnění se tedy může vyskytovat na jiném exonu v tomto genu, nebo se vyskytuje na chromozomu X.

Na stejné internetové stránce jsme hledali, který gen může být zodpovědný za onemocnění Vitiligo. *FOXD3* byl tím nejčastějším. Tento gen má jen jeden velmi rozsáhlý exon. Mutace se nám však nepodařila na tomto exonu prokázat. Mutace by se mohla vyskytovat na dvou úsecích, které se nám nepodařilo optimalizovat pro PCR, nebo na jiném genu.

12. Závěr

Pro tuto práci jsme vybrali Vitiligo jako jedno z nejčastěji se vyskytujících se onemocnění pigmentace kůže a Morbus Darier jako jednu z málo častých onemocnění. Pro každé onemocnění jsme měli dva probandy. U probandů s Vitiligem jsme osekvenovali exon v genu *FOXD3*. Ani u jednoho probanda jsme nezjistili mutaci na exonu v tomto genu. U probandů trpících onemocněním Morbus Darier jsme osekvenovali dvanáctý exon v *ATP2A2* genu. A však ani u těchto probandů v tomto exonu jsme mutaci nezjistili.

Díky této bakalářské práci jsem se naučila pracovat se základními molekulárně genetickými metodami, základy sekvenování genů, velké trpělivosti s PCR optimalizací a práci s genetickými databázemi.

13. Citace

- 1) ALKHATEEB, A., Fain PR, Thody T, Bennett DC, Spritz RA: Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. *Pigment Cell Res* 16:208–214, 2003
- 2) ALKHATEEB, A., Fain, P. R., Spritz, R. A. Candidate functional promoter variant in the FOXD3 melanoblast developmental regulator gene in autosomal dominant vitiligo. (Letter) *J. Invest. Derm.* 125: 388-391, 2005.
[PubMed: [16098053](#), [related citations](#)]
- 3) BOISSY, R. E., SPRITZ, A. R., Frontiers and controversies in the pathobiology of vitiligo: separating the wheat from the chaff. *Experimental Dermatology* [online]. 2009, **18**(7), 583-585 [cit. 2019-01-15]. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00826.x. ISSN 09066705. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0625.2008.00826.x>
- 4) BRDIČKA, R., *Lidský genom na rozhraní tisíciletí*. Praha: Grada, 2001. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-0118-9.
- 5) BRYŠOVÁ, V., *Základy klinické genetiky pro studující 4. ročníku lékařské fakulty*. Brno: Masarykova univerzita, 1995. ISBN 80-210-1150-5.
- 6) BUC, M., Sršeň, Š., Sršňová, K., *Základy klinické genetiky a její molekulární podstata. Medicínsky monitor*. 2000, **6**(3), 37. ISSN 1335-0951.
- 7) BURGE, S.M., Wilkinson, D.J., Darier-White disease: a review of the clinical features in 163 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **27**; 40–50, 1992.
- 8) BUXTON, R.S., Yet another skin defect, Darier's disease, maps to chromosome 12q. *Hum. Molec. Genet.* 2: 1763-1764, 1993.
- 9) CAMMACK, R., *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Rev. ed. New York: Oxford University Press, 2006. ISBN isbn0-19-852917-1.
- 10) CASTORY, M., Barboni, L., Duncan, P. J., Paradisi, M., Laino, L., De Bernardo, C., Robinson, D.O., Grammatico, P. Darier disease, multiple bone cysts, and aniridia due to double de novo heterozygous mutations in ATP2A2 and PAX6. *Am. J. Med. Genet.* 149A: 1768-1772, 2009.
- 11) ČIHÁK, R., *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-5636-3.
- 12) DILLON, J., REID, A., Issues in case-study methodology in investigating environmental and sustainability issues in higher education: towards a problem-based approach?. *Environmental Education Research* [online]. 2004, **10**(1), 23-37 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1080/1350462032000173689. ISSN 1350-4622. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1350462032000173689>

- 13) HATINA, J., SYKES, D. B., *Lékařská genetika: problémy a přístupy*. Praha: Academia, 1999. ISBN 80-200-0700-8.
- 14) HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., ŠPÍŠEK, R., *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
- 15) JIN, Y., BIRLEA, S., FAIN, P., et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. *Nature Genetics* [online]. 2012, **44**(6), 676-680 [cit. 2019-01-15]. DOI: 10.1038/ng.2272. ISSN 1061-4036. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ng.2272>
- 16) KENNEDY, J. L., Berg, D., Bassett, A. S., Roy, R., King, N., Perkins, M. Genetic linkage for Darier disease (keratosis follicularis). *Am. J. Med. Genet.* 55: 307-310, 1995.
- 17) KOČÁREK, E., PÁNEK, M., *Klinická cytogenetika I : úvod do klinické cytogenetiky*. 2. vydání. Praha : Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1880-7.
- 18) KOVÁCS, L., Sršeň Š., Sršňová K.: *Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata*. *Bratislavské lekárske listy: international journal for biomedical sciences and clinical medicine*. 2000, **101**(5), 314-315. ISSN 0006-9248.
- 19) KREJSEK, J., KOPECKÝ, O., *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-86225-50-X.
- 20) NOVOTNÝ, F., *Obecná dermatologie*. Praha: Avicenum, 1989.
- 21) MEDICÍNA PRO PRAXI / *Med. praxi* 2016; 13(4): 171–174
- 22) MEYERS, G. A., Orlow, SJ, Munro, IR, Przylepa, KA, Jabs . *Nature Genet.* 11: 462-464, 1995.
- 23) MURPHY, K., *Janeway's immunobiology*. 8th ed. London: Garland Science, c2012. ISBN 978-0-8153-4530-5.
- 24) RACLAVSKÝ, V., *Metody molekulární genetiky* [online]. Ústav biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, 2003 [cit. 2009-06-20]. Kapitola 8. Sekvenování DNA.
- 25) RICHMOND, J. M., Michael L FRISOLI a John E HARRIS. Innate immune mechanisms in vitiligo: danger from within. *Current Opinion in Immunology* [online]. 2013, **25**(6), 676-682 [cit. 2019-01-15]. DOI: 10.1016/j.coi.2013.10.010. ISSN 09527915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791513001994>
- 26) RÖCKEN, M., SCHALLER M., SATTLER E., Walter H. C. BURGDORF. *Kapesní atlas dermatologie*. Přeložil Marta CETKOVSKÁ, přeložil Pavel CHALOUPKA. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0106-1.
- 27) SAKUNTABHAI, A., Dhitavat, J., Burge, S., Hovnanian, A. Mosaicism for ATP2A2 mutations causes segmental Darier's disease. *J. Invest. Derm.* 115: 1144-1147, 2000.

- 28) SCHEIE, H. G., Cameron, J. D. Pigment dispersion syndrome: a clinical study. *Brit. J. Ophthal.* 65: 264-269, 1981.
- 29) SIEFF, C.A., Dyskeratosis Congenita. *NORD Guide to Rare Disorders*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA. 2003:104-5
- 30) SPRITZ, R. A., Recent progress in the genetics of generalized vitiligo. *Journal of Genetics and Genomics* [online]. 2011, **38**(7), 271-278 [cit. 2019-01-15]. DOI: 10.1016/j.jgg.2011.05.005. ISSN 16738527. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1673852711000907>
- 31) SRŠEŇ, Š., SRŠŇOVÁ, K., *Základy klinickej genetiky*. Martin: COALA, 1992. ISBN 80-900441-3-1.
- 32) YIN, Robert K. *Case study research: design and methods*. 3rd ed. Thousand Oaks, Calif.: Sage Publications, 2003. ISBN 978-0761925538.

Seznam obrázků

Obrázek 1 Syntéza melaninu (zdroj: vlastní).....	10
Obrázek 2 Vitiligo ve vlasech (zdroj: vlastní)	15
Obrázek 3 Umístění FOXD3 genu na chromosomu (zdroj: omim.org)	17
Obrázek 4 Proband č.3 (zdroj: vlastní)	18
Obrázek 5 Rodokmen proband č.4 (zdroj: vlastní).....	19
Obrázek 6 Proband č.4 (zdroj: vlastní)	19
Obrázek 7 umístění ATP2A2 genu na chromosomu (zdroj: Omim.org).....	21
Obrázek 8 Rodokmen proband č.1, 2 (zdroj: vlastní).....	22
Obrázek 9 Proband č.1 oblast zad a břicha (zdroj: vlastní)	23
Obrázek 10 postižená x zahojená oblast (zdroj: vlastní)	23
Obrázek 11 Elektroforeogram DNA (zdroj: vlastní)	26
Obrázek 12 Grafická podoba genu FOXD3 (zdroj: vlastní).....	27
Obrázek 13 Primer-BLAST část 1. (zdroj: vlastní)	29
Obrázek 14 Primer-BLAST část 2 (zdroj: vlastní)	30
Obrázek 15 Primer-BLAST grafické zobrazení primerů (zdroj: vlastní).....	30
Obrázek 16 Primer-BLAST podrobnosti o primeru (zdroj: vlastní).....	31
Obrázek 17 Generi-biotech hlavní stránka (zdroj: vlastní).....	31
Obrázek 18 Generi-biotech objednávací formulář (zdroj: vlastní).....	32
Obrázek 19 Generi-biotech výsledná objednávka (zdroj: vlastní).....	32
Obrázek 20 Hotové primery (zdroj: vlastní).....	33
Obrázek 21 Informační kartičky (zdroj: vlastní)	33
Obrázek 22 Schéma PCR reakce (zdroj: vlastní).....	34
Obrázek 23 Sekvence v BioEdit (zdroj:vlastní).....	35
Obrázek 24 Sekvence v NCBI databázi (zdroj: vlastní)	35

Seznam tabulek

Tabulka 1 X-vázaná dědičnost.....	22
Tabulka 2 Koncentrace DNA	26
Tabulka 3 Výsledky probandů č.3 a č.4.....	36
Tabulka 4 Výsledky probandů č.1 a č.2.....	37