



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Vyšetření polymorfismu genu *STAT6* metodou
PCR-RFLP**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Markéta Vadlejchová

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Vyšetření polymorfismu genu STAT6 metodou PCR-RFLP* 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 11. 8. 2020

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování této práce věnoval.

Vyšetření polymorfismu genu *STAT6* metodou PCR-RFLP

Abstrakt

Tato práce se zabývá problematikou alergií, především těch potravinových, které mají negativní dopad na celkovou kvalitu života a jejichž prevalence se ve vyspělých zemích neustále zvyšuje. Reakce na některé potravinové alergeny mohou dokonce ohrožovat život postižených osob. Mezi takové alergeny patří např. ořechy a arašídny. Na vznik alergií mají vliv nejen faktory vnějšího prostředí, ale také individuální genetická výbava konkrétního jedince.

Klíčovým regulátorem alergických onemocnění je lidský gen *STAT6*, který se nachází na 12. chromozomu. V tomto genu již bylo identifikováno mnoho polymorfismů, jedním z nich je SNP G/A na pozici 2964 nacházející se v 3'-netranslatované oblasti (rs324015).

Pro vyšetření tohoto polymorfismu byly odebrány vzorky DNA od celkem 25 osob z České republiky, z nichž 16 trpělo alergií na ořechy nebo arašídny. Z těchto vzorků byla provedena izolace DNA a následně PCR-RFLP. Poté byla provedena elektroforéza a byly zjištěny jednotlivé genotypy. Z některých izolátů bylo provedeno také sekvenování, které potvrdilo výsledky získané použitím PCR-RFLP. Genotyp A/A byl zjištěn u 4 %, A/G u 56 % a G/G u 40 % vyšetřených osob, frekvence alel tedy byla 0,32 pro A a 0,68 pro G. Frekvence alely G byla vyšší u osob, u nichž se alergie na ořechy a arašídny nevyskytovala.

Klíčová slova

STAT6; polymorfismus; PCR; PCR-RFLP; potravinová alergie; rs324015

Analysis of *STAT6* gene polymorphism by PCR-RFLP method

Abstract

This work deals with the issue of allergies, especially food allergies which have a negative impact on the overall quality of life and whose prevalence is constantly increasing in developed countries. Reactions to some food allergens can even be life-threatening. Such allergens include, for example, nuts and peanuts. The development of allergies is influenced not only by environmental factors, but also by the individual genetic makeup of a particular individual.

A key regulator of allergic diseases is the human *STAT6* gene that is located on chromosome 12. Many polymorphisms have already been identified in this gene, one of which is the G/A SNP at position 2964 located in the 3'-untranslated region (rs324015).

To analyze this polymorphism, DNA samples were taken from a total of 25 people from the Czech Republic, 16 of whom suffered from nut or peanut allergies. DNA isolation was performed from these samples and followed by PCR-RFLP. Electrophoresis was then performed, and individual genotypes were determined. DNA sequencing was also performed from some isolates to confirm the results obtained using PCR-RFLP. Genotype A/A was found in 4 %, A/G in 56 % and G/G in 40 % of examined persons; the frequency of alleles was 0.32 for A and 0.68 for G. The frequency of allele G was higher in people who had no allergies to nuts and peanuts.

Key words

STAT6; polymorphism; PCR; PCR-RFLP; food allergy; rs324015

Obsah

1	Úvod.....	8
2	STAT6	9
2.1	<i>Gen STAT6.....</i>	9
2.2	<i>Proteiny STAT.....</i>	9
2.3	<i>Struktura STAT proteinů</i>	10
2.4	<i>Funkce STAT6.....</i>	10
2.5	<i>Polymorfismy genu STAT6.....</i>	11
3	Laboratorní vyšetření polymorfismu genu	12
3.1	<i>Materiál a jeho odběr pro analýzu.....</i>	12
3.2	<i>Izolace DNA</i>	12
3.3	<i>Stanovení koncentrace DNA</i>	13
3.4	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR).....</i>	13
3.4.1	<i>Průběh PCR reakce.....</i>	14
3.4.2	<i>Taq-polymeráza.....</i>	15
3.4.3	<i>Význam a využití PCR.....</i>	16
3.4.4	<i>Nevýhody PCR</i>	16
3.5	<i>PCR-RFLP</i>	16
3.5.1	<i>Restrikční endonukleázy.....</i>	17
3.6	<i>Elektroforéza.....</i>	17
3.7	<i>Sekvenování DNA.....</i>	18
3.7.1	<i>Maxamovo-Gilbertovo sekvenování.....</i>	18
3.7.2	<i>Sangerovo sekvenování</i>	19
4	Alergie	21
4.1	<i>Alergie a atopie.....</i>	21
4.2	<i>Alergeny</i>	21
4.3	<i>Fáze alergické reakce</i>	22
4.3.1	<i>Fáze senzibilizace.....</i>	22

4.3.2	Časná fáze.....	22
4.3.3	Pozdní fáze.....	23
4.4	Potravinová alergie.....	23
4.4.1	Alergeny v potravě.....	24
4.4.2	Projevy potravinové alergie.....	24
4.4.3	Diagnostika a terapie potravinových alergií.....	26
4.4.4	Alergie na ořechy a arašídý.....	27
5	Cíl práce.....	29
6	Metodika vyšetření polymorfismu genu STAT6.....	30
6.1	Odběr materiálu.....	30
6.2	Izolace DNA.....	30
6.3	Stanovení koncentrace DNA v izolátu.....	32
6.4	PCR-RFLP.....	33
6.4.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	33
6.4.2	Kontrola produktů PCR.....	35
6.4.3	Štěpení DNA restrikční endonukleázou.....	37
6.4.4	Kontrola produktů restrikčního štěpení.....	38
6.4.5	Hodnocení výsledků restrikčního štěpení.....	40
6.5	Enzymatické čištění PCR produktů.....	40
6.6	Příprava vzorků k sekvenaci.....	41
7	Výsledky.....	43
7.1	Popis souboru.....	43
7.2	Výsledky PCR-RFLP.....	43
7.3	Výsledky sekvenování.....	45
8	Diskuze.....	48
9	Závěr.....	50
10	Seznam použité literatury.....	51
11	Seznam zkratk.....	56

1 Úvod

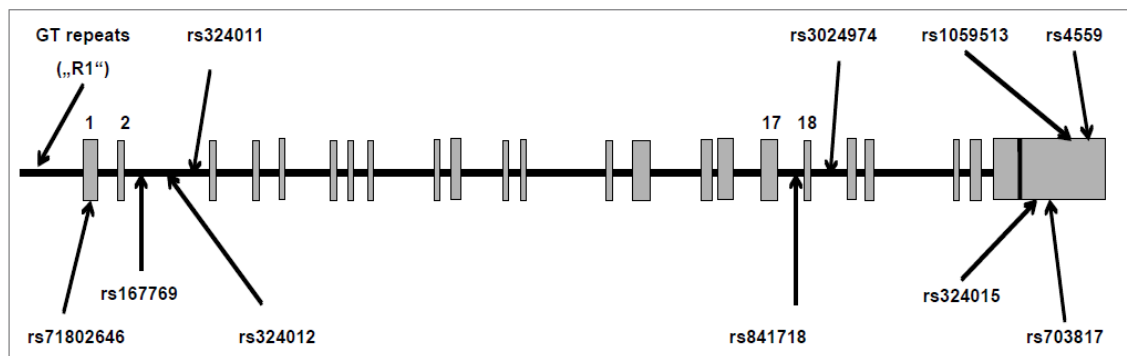
V současné době čím dál více lidí trpí různými druhy alergií. Alergie se projevuje neadekvátní reakcí imunitního systému na jinak neškodné antigeny. Mezi alergeny, které u mnoha lidí vyvolávají alergické reakce, se řadí také různé potraviny. Klinické projevy alergie na potraviny jsou u každého jedince velmi individuální. Často se projevují jako atopická dermatitida, gastroenteropatie, astma, rýma či kopřivka. U některých jedinců se může manifestovat anafylaktickým šokem. Mezi potraviny, které často způsobují tento život ohrožující stav, patří také ořechy a arašídy.

Výskyt alergií ovlivňují faktory vnějšího prostředí, ale důležitou roli hrají také genetické faktory. Oblast chromozomu 12q je zřejmě spojena s celkovou koncentrací IgE v séru. Významnou roli v alergické odpovědi hraje gen *STAT6*, který je klíčovým regulátorem alergické odpovědi a který se nachází právě v oblasti 12q. Jeden z polymorfismů tohoto genu se nachází na pozici 2964 (G/A) a potenciálně souvisí s rizikem vzniku alergie na ořechy a arašídy.

2 STAT6

2.1 Gen STAT6

Lidský gen *STAT6* (signal transducer and activator of transcription 6) je lokalizován na 12. chromozomu (12q13.3-14.1). Zahrnuje více než 19 kb a obsahuje 23 exonů a 22 intronů, jak je vidět na obr. 1. První, druhý a část třetího exonu patří do 5'-netranslatované oblasti (5'-UTR) a část posledního exonu je ve 3'-UTR (Patel *et al.*, 1998).



Obrázek 1: Struktura genu *STAT6* (Godava *et al.*, 2013).

2.2 Proteiny STAT

Proteiny STAT (signal transducer and activator of transcription) jsou skupinou transkripčních faktorů, které přenášejí signály z extracelulárního prostředí buněk do jádra. Jsou zásadní pro signalizaci mnoha cytokinů, které jsou mediátory alergického zánětu a které ovlivňují různé typy buněk důležitých pro alergii, např. epitelové buňky, žírné buňky (mastocyty), lymfocyty, dendritické buňky a eozinofily (Chen and Hershey, 2007).

Substrátové proteiny STAT jsou fosforylovány kinázami z rodiny Jak (Janus kinázy), které byly aktivovány interakcí INF-receptoru na buněčném povrchu s INF- α a INF- γ . Fosforylované proteiny STAT se pohybují do jádra, vážou specifické elementy DNA a řídí přímou transkripci (Darnell *et al.*, 1994).

Tyto proteiny jsou jedinečné v tom, že obsahují SH2, doménu vážící fosfotyrosin. Doména SH2 může interagovat s celou řadou signálních proteinů. Proteiny STAT tedy

mohou interferovat s více signálními cestami. Po fosforylaci tyrosinu dochází k dimerizaci mezi doménami SH2 a doménou obsahující fosfotyrosin (Ihle, 2001).

2.3 Struktura STAT proteinů

Všechny proteiny STAT sdílejí stejnou celkovou strukturu, která zahrnuje N-terminální doménu, stočenou doménu, doménu vázající DNA, spojovací doménu, SH2 doménu a C-terminální oblast, která usnadňuje aktivaci transkripce (Chen *et al.*, 2004).

Proteiny STAT jsou latentní cytoplazmatické monomery, dokud nedojde ke stimulaci cytokinů, poté se prostřednictvím svých konzervovaných domén SH2 ukotvují na fosforylované tyrosinové zbytky v receptorových řetězcích. Potom jsou fosforylovány Janus kinázami na konzervovaném tyrosinovém zbytku ve své C-terminální oblasti. Po fosforylaci se STAT disociuje z receptoru a tvoří dimery, nejčastěji homodimery. Dimer vzniká interakcí SH2 domény jednoho proteinu STAT s fosforylovaným tyrosinem v C-terminální oblasti druhého STAT proteinu, výsledkem je stabilní bivalentní interakce (Leonard a Lin, 2000).

2.4 Funkce STAT6

STAT6 je důležitý při provádění biologických odpovědí zprostředkovaných IL-4. *STAT6* je primárně aktivován interleukinem-4 (IL-4) a vysoce příbuzným interleukinem-13 (IL-13). *STAT6*-deficientním myším chybí většina fyziologických funkcí, které jsou spojené s IL-4, včetně diferenciaci pomocných T-lymfocytů Th2, exprese markerů buněčného povrchu a přechodu třídy imunoglobulinů na IgE. Naopak proliferace zprostředkovaná IL-4 je ovlivněna pouze částečně (Takeda *et al.*, 1996; Shimoda *et al.*, 1996).

STAT6 je klíčovým regulátorem alergického onemocnění, jeho aktivace hraje hlavní roli v patogenezi alergického zánětu dýchacích cest s eosinofilií (Myiata *et al.*, 1999).

STAT6 je také nezbytný pro indukci kontaktní přecitlivělosti, kterou zprostředkovává přes svou klíčovou úlohu v diferenciaci Th2, což má za následek stimulaci syntézy IgE a infiltraci eozinofilů nebo neutrofilů do kůže (Yokozeki *et al.*, 2000).

2.5 Polymorfismy genu *STAT6*

Nejvýznamnější polymorfismus genu *STAT6* se nachází v 3'-netranslatované oblasti (3'-UTR) na pozici 2964 (rs324015), jedná se o tranzici G/A. V britské bělošské populaci se alela A objevuje s frekvencí 0,33 a G s frekvencí 0,67. Genotyp A/A má 10 %, G/A 47 % a G/G 43 % lidí. Frekvence genotypů u japonských dětí byla zjištěna značně odlišná: A/A 49 %, G/A 42 % a G/G 9 % (Amoli *et al.*, 2000; Negoro *et al.*, 2006).

Tento polymorfismus byl asociován s hladinou IgE v japonské populaci, tato asociace však nebyla potvrzena u britských dětí. V populaci britských dětí však byla prokázána spojitost s alergií na ořechy, kde se alela G vyskytovala častěji u těžších případů. V japonské populaci je tento polymorfismus spojen s eozinofilií, atopickým ekzémem a potravinovou alergií (Gao *et al.*, 2000; Amoli *et al.*, 2002; Negoro *et al.*, 2006).

Bylo také zjištěno, že u dětí s alergií na bílkovinu kravského mléka s genotypem G/G dochází k rozvoji tolerance kravského mléka ve vyšším věku, než u ostatních dětí (Yavuz *et al.*, 2013).

Další polymorfismus v genu *STAT6* je stejně jako výše popsáný polymorfismus SNP (polymorfismus jediného nukleotidu) a je v oblasti rs167769. Tento polymorfismus je spojen s dysregulací celkové koncentrace IgE (Granada *et al.*, 2012).

3 Laboratorní vyšetření polymorfismu genu

3.1 *Materiál a jeho odběr pro analýzu*

K vyšetření polymorfismu genu je potřeba odebrat pacientovi vzorek tkáně. Může jít o jakýkoli materiál, který obsahuje buňky se zachovanými jádry, ale odběr nesmí představovat pro pacienta nadměrnou fyzickou nebo psychickou zátěž. Jednou z možností získání vzorku je odběr epitelových buněk z ústní sliznice, které získáme jemným seškrábnutím hleny z bukalních částí ústní sliznice, který tyto epitelové buňky obsahuje. Jedná se tedy o neinvazivní odběr. Z odebraného vzorku se následně izoluje DNA (Kočárek, 2007).

3.2 *Izolace DNA*

Nukleové kyseliny během života buňky interagují s různými typy proteinů, což do značné míry znemožňuje jejich laboratorní vyšetření. Z tohoto důvodu je výchozím materiálem pro většinu molekulárně genetických analýz vodný extrakt vyšetřované DNA zbavený podílu bílkovin (Beránek, 2016).

Izolace lidské DNA se provádí šetrnou extrakcí z buněčného jádra nebo mitochondrií. K extrakci mohou být použity nativní tkáně, tělesné tekutiny nebo buněčné kultury po mechanické homogenizaci biologického vzorku. Při vlastní extrakci jsou chemicky rozrušeny komplexy proteinů a DNA. V zásaditém prostředí lyzačního pufru dochází v přítomnosti detergentu ke zvýšení permeability buněčných membrán a k disociaci nukleoproteinových komplexů. Poté jsou uvolněné proteiny enzymově rozštěpeny. Další kroky se odvíjí podle konkrétní zvolené metody extrakce. Výběr metody izolace DNA závisí na způsobu její následné analýzy (Šmarda *et al.*, 2005; Beránek, 2016).

Jednou z metod izolace DNA je fenol-chloroformová extrakce. Tato metoda sice poskytuje velký výtěžek DNA i vysoký stupeň čistoty extraktu, ale nevýhodou je práce s organickými rozpouštědly, které představují možná zdravotní a bezpečnostní rizika pro pracovníky laboratoře (Beránek, 2016).

Další metoda využívá adsorpci nukleových kyselin na silikátový povrch. Molekuly DNA se v přítomnosti chaotropních solí připojují na povrch speciálně připraveného skla, které

má většinou formu drobných kuliček. DNA se po zředění roztoku znovu uvolňuje ze silikátových povrchů. Tato metoda je rychlejší a bezpečnější než fenol-chloroformová metoda, ale její nevýhodou jsou vyšší náklady na její realizaci (Kočárek, 2007).

Další technikou při izolaci DNA je použití vysolovací metody. Při ní se využívá velmi koncentrovaného roztoku soli, jehož působením se vysráží přítomné bílkoviny. Tato metoda je časově méně náročná oproti fenol-chloroformové extrakci (Beránek, 2016).

Izolaci DNA lze také provést pomocí různých typů separačních mikrokolonek, jako jsou např. iontoměničové, adsorpční, mikroafinitní kolonky, nebo extrakční kolonky na bázi ultrafiltrace a gelové filtrace (Beránek, 2016).

3.3 Stanovení koncentrace DNA

Současné metody měření koncentrace DNA ve vzorku většinou využívají spektrofotometrie v ultrafialové oblasti. Nukleové kyseliny absorbují nejvíce záření o vlnové délce 260 nm. Míra absorpce takového záření odpovídá koncentraci nukleových kyselin ve vzorku. Při využití přímého spektrofotometrického stanovení v UV světle se koncentrace počítá přímo z optické denzity měřeného vzorku. Používá se v případě, že vzorek neobsahuje významné množství nečistot a má dostatečnou koncentraci. V opačném případě je vhodnější použití fluorimetrické metody, kde se před měřením přidává do roztoku fluorescenční barvivo (nejčastěji ethidiumbromid), které se naváže na DNA. Koncentrace DNA se pak stanovuje z intenzity emitovaného záření. Nevýhodou je však nutnost přípravy celé řady standardních vzorků DNA se vzrůstající koncentrací, jejichž absorbance se proměřuje k sestavení kalibrační křivky. Hodnota optické denzity je také závislá na délce molekuly DNA a přítomnosti ssDNA (jednořetězcová DNA) nebo dsDNA (dvouřetězcová DNA) (Kočárek, 2007).

3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR – polymerase chain reaction) je základní molekulárně-genetická metoda pro přípravu dostatečného a v podstatě neomezeného množství vyšetřovaných sekvencí DNA pro další analýzy. V některých svých modifikacích může sloužit i přímo k identifikaci polymorfismů. Při PCR dochází

k amplifikaci cílové sekvence DNA, nacházející se mezi dvěma oligonukleotidovými primery. Ty jsou navrženy tak, aby jeden z nich byl komplementární k jednomu řetězci molekuly DNA na jedné straně cílové sekvence a druhý primer byl komplementární k druhému řetězci molekuly DNA na opačné straně cílové sekvence. Primery jsou prodlužovány syntézou řízenou DNA-polymerázou podle sekvence mezi nimi, čímž vznikají nové řetězce cílové sekvence DNA. Opakováním cyklů tepelné denaturace, hybridizace primerů a enzymové syntézy dochází k jejich exponenciálnímu zmnožování (Knoll a Vykoukalová, 2002; Nussbaum *et al.*, 2004).

3.4.1 Průběh PCR reakce

Prvním krokem je denaturace genomové DNA, která obsahuje sekvence, které mají být amplifikovány. Denaturace DNA probíhá zahřátím na teplotu 92-95 °C po dobu asi 30 sekund (Snustad a Simmons, 2009).

V druhém kroku, tzv. annealingu, dochází k hybridizaci denaturované DNA s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů. Inkubují se společně při teplotě většinou 50-60 °C po dobu 30 sekund (Snustad a Simmons, 2009).

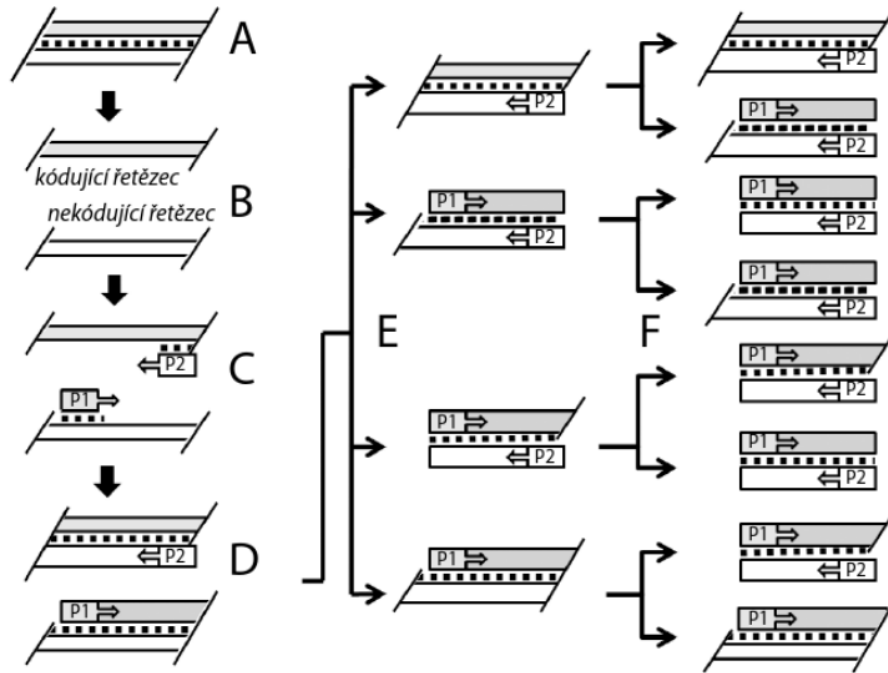
Ve třetím kroku, tzv. elongaci, dochází k replikaci úseku mezi místy, která jsou komplementární k oligonukleotidovým primerům, s pomocí DNA-polymerázy. K polymeraci dochází při teplotě cca. 70-72 °C po dobu 90 sekund (Snustad and Simmons, 2009).

Tyto tři kroky se cyklicky opakují. V každém z následujících cyklů se produkty z předchozích cyklů denaturují a po připojení primerů replikují DNA-polymerázou (viz obr. 2). Počet cyklů určuje stupeň amplifikace, která je exponenciální. Po 30 cyklech vzniká více než miliarda kopií požadované sekvence DNA (Snustad a Simmons, 2009).

Efektivitu PCR určuje struktura templátové DNA, struktura primerů, složení reakční směsi, teplotní profil PCR, tvorba nespecifických produktů a vlastnosti použité polymerázy (Beránek, 2016).

Přístroje pro PCR neboli termální cyklery mohou pojmout velké množství vzorků a teplotu mění automaticky. Při použití nadbytku termostabilní DNA-polymerázy (*Taq*-polymerázy) hned při přípravě směsi pro PCR je tedy amplifikace specifických sekvencí

DNA relativně jednoduchá, protože není potřeba v každém cyklu dodávat čerstvý enzym a jednotlivé kroky a cykly jsou řízeny pouze střídáním teploty (Snustad a Simmons, 2009).



Obrázek 2: Průběh amplifikace DNA během polymerázové řetězové reakce. DNA (A) je denaturována (B), poté probíhá annealing (C) a elongace (D). Tyto kroky se cyklicky opakují (E, F) (Beránek, 2016).

3.4.2 *Taq*-polymeráza

Taq-polymeráza patří mezi termostabilní DNA polymerázy. Poprvé byla objevena v polovině 80. let minulého století a izolována z bakteriálního kmene *Thermus aquaticus* YTI (*Taq*). Tato bakterie se vyskytuje v gejzírech Yellowstoneského národního parku v USA. Katalytická aktivita této polymerázy je inhibována heparinem, melaninem, chlorofylem, fenolem, alkoholy, porfyriny, detergenty a mnoha dalšími látkami. *Taq*-polymeráza nemá 3'-5' exonukleázovou aktivitu. Optimální teplota této polymerázy se pohybuje mezi 65-75 °C (Beránek, 2016).

3.4.3 Význam a využití PCR

PCR je významným nástrojem, který zjednodušuje celou řadu analýz prováděných v základním a aplikovaném výzkumu i v praxi. Tato metoda se využívá při diagnóze dědičných onemocnění u lidí, především v prenatalní diagnostice, kde je k dispozici velmi malé množství DNA. Také se používá k detekci a typizaci patogenních mikroorganismů, k identifikaci onkogenů a typizaci nádorů nebo k monitorování terapie rakoviny. V kriminalistice se využívá k poskytnutí důkazu totožnosti osob (Šmarda *et al.*, 2005; Snustad a Simmons, 2009).

3.4.4 Nevýhody PCR

Jednou z nevýhod PCR je, že nejčastěji používaná *Taq*-polymeráza nemá na rozdíl od většiny polymeráz 3'→5'-korekční aktivitu (3'-exonukleázovou aktivitu), takže s nízkou četností zařazuje do amplifikovaných kopií nekomplementární nukleotidy. Frekvence těchto chyb je závislá na vyváženosti jednotlivých složek reakce. Pokud je vyžadována vysoká přesnost, lze použít jinou termostabilní polymerázu s 3'→5'-korekční aktivitou, např. *Pfu*-polymerázu (*Pyrococcus furiosus*) nebo *Tli*-polymerázu (*Thermococcus litoralis*) (Šmarda *et al.*, 2005; Snustad a Simmons, 2009).

Další nevýhodou je neúčinnost amplifikace úseků DNA, které jsou delší než několik tisíc nukleotidových párů. Při amplifikaci delších úseků lze místo *Taq*-polymerázy použít *Tfl*-polymerázu (*Thermus flavus*), která amplifikuje fragmenty až do velikosti kolem 35 kb. Fragmenty, které jsou ještě delší, nelze touto metodou účinně amplifikovat (Snustad a Simmons, 2009).

3.5 PCR-RFLP

PCR se používá ve velkém množství různých variant. Jednou z nich je stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů u produktů polymerázové řetězové reakce (PCR-RFLP) (Šmarda *et al.*, 2005).

PCR-RFLP se využívá k typizaci cílové sekvence, obvykle genu, který obsahuje sekvenční polymorfismus (Šmarda *et al.*, 2005).

Specifická sekvence genomové DNA se amplifikuje pomocí PCR. Tato sekvence je pomocí některé z restrikčních endonukleáz rozštěpena na restrikční fragmenty. V případě bodové mutace v restrikčním místě toto místo zaniká nebo naopak vzniká nové, což má za následek vznik fragmentů DNA různé velikosti. Ty jsou separovány na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Vizualizace DNA je prováděna např. pomocí ethidiumbromidu (Knoll a Vykoukalová, 2002; Beránek, 2016).

Tato metoda je relativně nenáročná a umožňuje určení místa mutace. Používá se pro přímou analýzu mutací, které podmiňují onemocnění, i pro nepřímou vazebnou analýzu (Knoll a Vykoukalová, 2002; Beránek, 2016).

3.5.1 Restrikční endonukleázy

Restrikční endonukleázy jsou bakteriální enzymy, které rozpoznávají specifickou dvouřetězcovou sekvenci v molekule DNA a zevnitř ji rozštěpí. Molekula DNA je rozštěpena přímo v rozpoznávacím místě, nebo v definované vzdálenosti za vzniku restrikčních fragmentů. Všechny restrikční enzymy jsou klasifikovány do tří základních tříd I-III, význam v molekulární biologii mají především restrikční enzymy typu II (Nussbaum *et al.*, 2004; Beránek, 2016).

Rozpoznávacím místem restrikčních endonukleáz ve vláknech DNA jsou tzv. palindromy, což jsou definované sekvence dlouhé 4-8 nukleotidů, které jsou shodné na obou komplementárních vláknech DNA při čtení od 5'-konce. Jsou tedy osově symetrické. Proces vlastního štěpení řetězců však symetrický být nemusí (Beránek, 2016).

3.6 Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která se používá na separaci, identifikaci a purifikaci látek (např. nukleových kyselin) ve stejnosměrném elektrickém poli na základě jejich rozdílného náboje, velikosti a prostorového uspořádání molekul. Zařízení se skládá z elektroforetické vany s anodou, katodou a pufrem, držáku gelu a externího zdroje stejnosměrného napětí. Molekuly DNA migrují separačním gelem v elektrickém poli směrem od katody k anodě. Na rychlost pohybu mají kromě vlastností DNA vliv také

vlastnosti gelu a pufru a přivedené napětí. Větší a prostorově složitější molekuly procházejí gelem pomaleji a zůstávají blíže místu nanesení vzorků. Po separaci molekul na jednotlivé proužky mohou být zviditelněny barvením např. ethidium bromidem, které způsobí fluorescenci DNA v UV světle (Griffiths *et al.*, 1996; Knoll a Vykoukalová, 2002; Beránek, 2016).

3.7 *Sekvenování DNA*

Pojmem sekvenování rozumíme stanovení primární struktury neboli sekvence nukleotidů v molekulách nukleových kyselin. Používá se pro mapování genomů nebo jako vyšetřovací metoda v klinické genetice, neboť umožňuje přímo identifikovat mutaci zodpovědnou za vznik geneticky podmíněné nemoci. Tuto technologii lze také využít ke spolehlivé confirmaci výsledků jiných molekulárně genetických metod, např. PCR-RFLP (Šmarda *et al.*, 2005; Kočárek, 2007; Beránek, 2016).

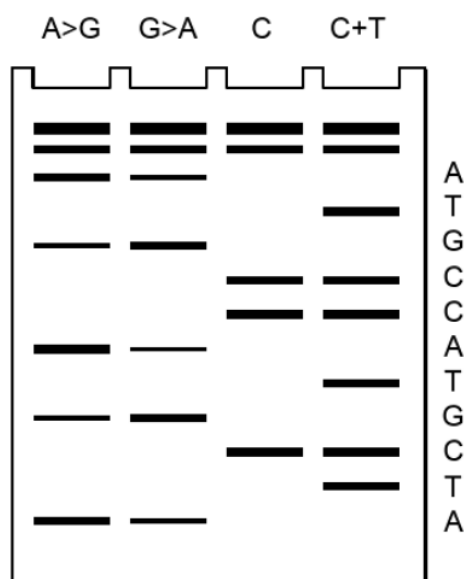
K sekvenování DNA se používají dvě různé metody, každá z nich je založena na jiném principu. Pro obě metody je nutné připravit soubor fragmentů DNA. Nejčastěji se používají naklonované restriční fragmenty nebo fragmenty získané PCR, které mají stejný začátek (na stejném nukleotidu) na 5'-konci. Na 3'-konci jsou zakončeny ve všech možných následných nukleotidech a tento konec obsahuje volnou OH skupinu, což je místo, kde dochází k prodlužování řetězce DNA-polymerázou. Fragmenty se poté separují v závislosti na délce svých řetězců pomocí gelové elektroforézy (Šmarda *et al.*, 2005; Snustad a Simmons, 2009).

V obou metodách jsou prováděny čtyři oddělené reakce najednou. V každé z těchto reakcí se tvoří soubor fragmentů DNA, které jsou zakončeny vždy jednou ze čtyř bází (A, G, C, T) (Snustad a Simmons, 2009).

3.7.1 *Maxamovo-Gilbertovo sekvenování*

Maxamovo-Gilbertovo sekvenování je také označováno jako chemická metoda, neboť je založena na specifickém rozštěpení řetězců nukleových kyselin pomocí chemických činidel. Výchozí materiál je rozdělen do čtyř vzorků, které se nechají reagovat se čtyřmi různými látkami, které rozštěpí fragmenty DNA v místě specifické báze. Fragmenty

DNA jsou potom rozděleny pomocí elektroforézy v denaturujícím polyakrylamidovém gelu (obr. 3). Jejich detekce probíhá autoradiograficky (Šmarda *et al.*, 2005).

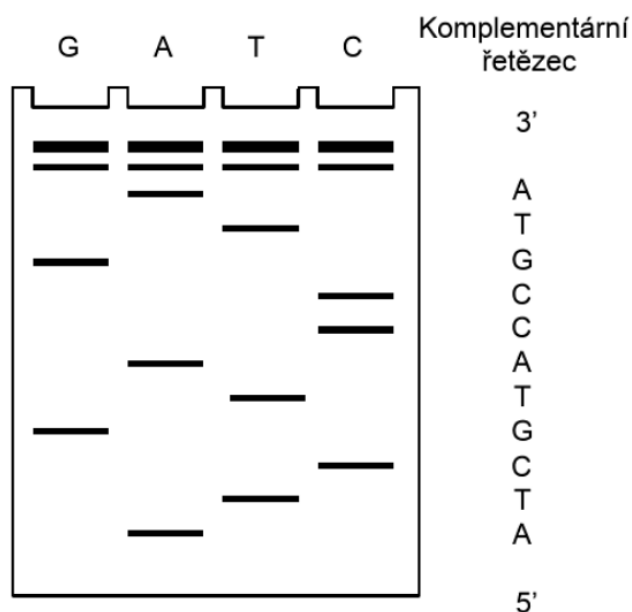


Obrázek 3: Výsledek Maxamova-Gilbertova sekvenování (Beránek, 2016).

Reaktivita používaných chemických činidel je však ovlivněna různými nečistotami, což může způsobovat nejednoznačnost výsledků. Výchozí materiál je navíc na jednom konci radioaktivně značen, což přináší nevýhodu relativně vysoké úrovně radioaktivity. Navíc v porovnání s enzymovou (Sangerovou) metodou sekvenování poskytuje relativně kratší sekvence a celkový postup je náročnější. Kvůli všem těmto nevýhodám se Maxamova-Gilbertova metoda dnes příliš nepoužívá (Šmarda *et al.*, 2005; Snustad a Simmons, 2009).

3.7.2 Sangerovo sekvenování

Sangerova neboli enzymová metoda sekvenování DNA je založena na principu replikace DNA, která je přerušena zařazením chemicky modifikovaného nukleotidu, tzv. dideoxyribonukleotidu. Původní provedení této metody bylo velmi pracné a zdlouhavé a využívalo se radioaktivně značených nukleotidů. Hodnocení výsledků (obr. 4) probíhalo po separaci fragmentů na denaturačním polyakrylamidovém gelu a po provedení záznamu radioaktivity na fotografický papír (Kočárek, 2007; Beránek, 2016).



Obrázek 4: Výsledek původní Sangerovy metody sekvenování (Beránek, 2016).

Dnes používaná modifikace Sangerovy metody sekvenování je založena na principu PCR. Metoda využívá schopnosti DNA-polymerázy vytvářet přesné kopie molekul DNA a schopnosti specifické syntézy řetězce DNA ve směru 3'→5' od primeru s volnou OH skupinou. Syntéza řetězce končí v místě, kde je do rostoucího řetězce zařazen dideoxyribonukleosidtrifosfát (ddNTP) místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu. Inkorporovaný ddNTP funguje jako koncový inhibitor syntézy DNA, protože mu chybí volná OH skupina na 3'-konci (Šmarda *et al.*, 2005).

Sekvenační reakce se dříve prováděly ve čtyřech oddělených vzorcích. Každá reakční směs obsahovala vždy jen jeden ze čtyř různých ddNTP. Po proběhnutí PCR se vzniklé produkty o různých velikostech denaturovaly a separovaly na polyakrylamidovém gelu (Šmarda *et al.*, 2005; Kočárek 2007).

V současné době je většina sekvenací prováděna na automatických sekvenátorech, které využívají různě modifikovanou Sangerovu metodu. Místo radioaktivních izotopů se používají čtyři různá fluorescenční barviva. Detekce produktů probíhá automaticky v průběhu elektroforézy pomocí laserového detektoru v jedné společné dráze nebo kapiláře (Šmarda *et al.*, 2005; Snustad a Simmons, 2009).

4 Alergie

Alergie jsou definovány jako skupina chorob, u kterých opakované vystavení neškodným antigenům zevního prostředí navozuje ve tkáních a různých orgánech zánětlivé změny, které následně vedou k poruchám jejich struktury a funkce (Hořejší *et al.*, 2017).

Alergická onemocnění dnes patří k velmi častým zdravotním problémům. V ekonomicky vyspělých zemích se jedná o nejčastější imunopatologický stav. Během posledních několika desetiletí se jejich výskyt začal velmi rychle zvyšovat, nyní postihuje asi 20 % obyvatel. Příčina tak rychlého nárůstu není zcela jasná. Na vzniku alergií se podílí v různé míře řada faktorů, jako jsou např. vrozené dispozice nebo faktory vnějšího prostředí (Litzman *et al.*, 2001; Hořejší *et al.*, 2017).

Alergie jen relativně vzácně ohrožují život člověka, mají však velmi negativní dopad na kvalitu života postižených jedinců (Litzman *et al.*, 2001).

4.1 Alergie a atopie

Pojem alergie a pojem atopie bývají často zaměňovány. Pojem atopie označuje geneticky podmíněnou tendenci jedinců odpovídat na expozici nízkým dávkám běžných alergenů z vnějšího prostředí nadměrnou tvorbou specifických protilátek IgE. Následná interakce protilátek s alergenem vede k rozvoji zánětu, který se klinicky manifestuje jako alergické onemocnění (Hořejší *et al.*, 2017).

4.2 Alergeny

Alergeny jsou vnější antigeny, které jsou zodpovědné za klinický průběh alergického onemocnění. Klinické příznaky alergie jsou projevem opakovaného setkání citlivého člověka s alergenem a následného spuštění kaskády buněčných pochodů s uvolněním mediátorů alergické reakce (Litzman *et al.*, 2001; Hořejší *et al.*, 2017).

Termín alergen může být použit pro zdroj alergenu, i pro konkrétní imunochemicky nebo molekulárně definované antigenní struktury. Obvykle jsou to proteiny nebo glykoproteiny s enzymatickou aktivitou. Komplexní organické sloučeniny vyvolávají

převážně protilátkovou odpověď, zatímco anorganické látky vyvolávají převážně buněčnou odpověď (Hořejší *et al.*, 2017).

4.3 Fáze alergické reakce

Během alergické reakce se rozlišují tři fáze: fáze senzibilizace, časná (akutní) fáze a pozdní fáze (Hořejší *et al.*, 2017).

4.3.1 Fáze senzibilizace

Ve fázi senzibilizace dochází k tvorbě specifických IgE při prvním kontaktu s určitým alergenem a k vazbě těchto protilátek na receptory na povrchu žírných buněk a bazofilů. K senzibilizaci dochází nejčastěji na sliznicích. Alergen proniká do hlenové vrstvy zažívacího traktu nebo dýchacích cest, a tím je umožněn jeho kontakt s epitelovými buňkami a buňkami prezentujícími antigen. Poté může být alergen transportován přes mízní cévy i do lymfatických uzlin. Antigenní prezentace je klíčová pro následnou aktivaci lymfocytů a rozvoj patologické reakce (Ferenčík *et al.*, 2005; Hořejší *et al.*, 2017).

Při senzibilizační fázi nedochází k žádným klinickým projevům, ty vznikají teprve při opakovaném setkání s příslušným alergenem (Hořejší *et al.*, 2017).

4.3.2 Časná fáze

K rozvoji časně fáze alergické reakce dochází ihned po opakovaném setkání s alergenem. Dochází při ní k navázání alergenu na IgE navázané na povrch žírných buněk. Z nich následně dojde k uvolnění preformovaných mediátorů alergické reakce, hlavně histaminu a heparinu, které mají především vazodilatační účinky, podporují sekreci hlenu a způsobují spazmus hladkých svalů průdušek. Také stimulují nervová zakončení v kůži, což se projevuje jako svědění (Jílek, 2004; Hořejší *et al.*, 2017).

4.3.3 Pozdní fáze

Po akutní fázi nastupuje fáze pozdní, která se projevuje až po několika hodinách. V průběhu pozdní fáze dochází k tvorbě prozánětlivých sekundárních mediátorů *de novo*. Tyto mediátory působí chemotakticky na eozinofily, trombocyty, neutrofilny i lymfocyty, které dále produkují cytotoxicky účinné mediátory. Ty mohou způsobit někdy až trvalé změny v postižených tkáních (Hořejší *et al.*, 2017).

Pozdní fáze alergické reakce může probíhat autonomně jako chronický zánět již bez závislosti na alergenu, který tuto reakci vyvolal. Hlavní roli zde hrají buněčné mechanismy imunity (Hořejší *et al.*, 2017).

4.4 Potravinová alergie

Termín potravinová alergie se používá pro reakce na složky potravy, kterých se účastní imunitní systém. Uplatňuje se zde především imunopatologická reakce I. typu, která je zprostředkována protilátkami třídy IgE. Tyto specifické protilátky interagují s alergeny obsaženými v potravě, čímž dochází k degranulaci mastocytů ve tkáních nebo bazofilních granulocytů v krvi pacienta. Mediátory uvolněné z těchto buněk způsobují akutní zánětlivou reakci. Klinické projevy mohou být u každého pacienta různé (Kvasničková, 1998; Krejsek a Kopecký, 2004; Ferenčík *et al.*, 2005).

Alergie na potravu často bývá zaměňována za potravinovou nesnášenlivost neboli intoleranci. Klinicky se velmi obtížně rozlišují. Intolerance potravy je stejně jako potravinová alergie nežádoucí reakce na jídlo, ale neúčastní se jí imunitní systém. Potravinová intolerance se může projevovat podobnými chorobnými stavy jako potravinová alergie, ale jejich nejčastější příčinou bývají enzymové defekty, které se projevují sníženou schopností metabolismu zpracovat určité složky potravy, nebo přítomnost např. histaminu v některých potravinách. Potravinová intolerance se u lidí vyskytuje mnohem častěji než potravinová alergie. Prevalence potravinových alergií se u dospělé populace pohybuje mezi 3-6 %, u kojenců je to asi 6-8 %. (Ferenčík *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2016).

4.4.1 Alergeny v potravě

Alergeny jsou většinou proteiny, nebo chemické sloučeniny na proteiny navázané. Některé působí jako kompletní antigeny, tzn. vyvolávají úplnou odezvu IgE, a některé alergeny naopak tuto schopnost samy o sobě nemají a obvykle konjugují s proteiny. Tyto konjugáty pak působí jako kompletní antigeny (Kvasničková, 1998).

Struktura potravních alergenů je dána různými faktory. Alergen musí mít dostatečnou velikost, aby byl schopen vytvořit můstek mezi dvěma molekulami IgE na povrchu žírných buněk, a musí mít více než jedno vazebné místo pro IgE. Molekulová hmotnost alergenu je také omezena intestinální permeabilitou, proteiny s molekulovou hmotností nad 70000 se budou méně účinně absorbovat přes mukózní membrány střev oproti menším proteinům. Se zvyšující se molekulovou hmotností proteinu roste také jeho imunogenita, spodní hranice molekulové hmotnosti pro imunogenní odezvu je 10000 (Kvasničková, 1998).

Alergenů v potravě je nespočetně, mnoho z nich je dnes již molekulárně definováno. Některé z nich jsou unikátní pro danou potravinu, jiné se naopak nacházejí v řadě různých potravin, které mohou být buď stejného původu (např. ovoce), nebo mohou reagovat zkříženě napříč mezi taxony. Častá je zkřížená reakce na alergeny potravy s pylovými alergeny (Krejsek *et al.*, 2016).

4.4.2 Projevy potravinové alergie

Projevy alergie na potraviny mohou být velmi různé, lokální i systémové, a jsou způsobeny kumulací účinků mediátorů žírných buněk na okolní tkáň. Tyto projevy se mohou měnit s anatomickým místem v závislosti na různých faktorech jako jsou např. citlivost tkání na mediátory žírných buněk, fenotyp lokálních žírných buněk nebo povaha či místo kontaktu s alergenem. Alergie na potraviny se často projevují atopickým ekzémem, kopřivkou, výskytem edémů či gastrointestinálními potížemi. Mohou se projevovat i jako alergická rýma, průduškové astma, sekretorická otitida, celková anafylaxe nebo jako migrény a poruchy soustředění. Klinické projevy potravinové alergie se mohou objevovat s různou intenzitou a často postupně mizí se vzrůstajícím věkem, a to především u dětí, což je způsobeno ontogenetickým vývojem reaktivity imunitního

systemu. U dětí je nejvyšší výskyt alergií na potraviny (Kvasničková, 1998; Litzman *et al.*, 2001; Bartůňková *et al.*, 2005; Krejsek *et al.*, 2016).

4.4.2.1 Urtikarie a angioedém

Kůže je při alergické reakci na potraviny jedním z nejčastěji postižených orgánů. Urtikarie neboli kopřivka je onemocnění, pro které je typická tvorba pomfů, které jsou svědivé a někdy také pálivé. Během 1-24 hodin tyto pomfy mizí. Angioedém vzniká ve spodních vrstvách kůže a charakteristický je pro něj náhle vzniklý otok, který však ustupuje někdy až po 72 hodinách. Nejčastěji se vyskytuje spolu s urtikarií. Arašidy a ořechy patří u dětí i dospělých mezi nejčastější potravinové spouštěče urtikarie a angioedému (Fuchs *et al.*, 2016).

4.4.2.2 Alergická rýma

Alergická rýma je nejčastější projev alergického onemocnění u nás i v Evropě, ve vyspělých zemích jí trpí více než 20 % populace. Je spojena především s přecitlivělostí na pylové alergeny, roztoče a zvířecí alergeny. Může být jak sezónní, tak i celoroční, podle druhu alergenu. Projevuje se vodnatou sekrecí z nosu, intermitentní obstrukcí, kýcháním, svěděním a zvýšenou produkcí slz. Chronická rýma může vést např. ke zhoršení až ztrátě čichu nebo rozvoji sekretorické otitidy. Asi u 10 % nemocných se rozvine *asthma bronchiale* (Krejsek a Kopecký, 2004; Bartůňková *et al.*, 2005).

4.4.2.3 Atopický ekzém

Atopický ekzém je zánětlivé onemocnění kůže. Je to druhé nejčastější alergické onemocnění u nás. Jeho incidence neustále narůstá. Často se vyskytuje u pacientů s jinými atopickými poruchami, např. alergickou rýmou nebo astmatem. Závažnost atopického ekzému je spojena s vysokou hladinou sérového IgE. 50 % atopiků s ekzémem trpí také nějakou potravinovou alergií. U 93 % dětí trpících potravinovou alergií se vyskytuje atopický ekzém (Bartůňková *et al.*, 2005; Negoro *et al.*, 2006).

4.4.2.4 Astma

Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest projevující se stavy reverzibilní obstrukce dýchacích cest. Jeho klinickými projevy jsou např. kašel, dušnost, hvízdavé dýchání a pocit tíže na hrudi. Astmatický záchvat zprostředkovaný IgE je vyvolán nejčastěji inhalačními alergeny. Spouštěcími mechanizmy jsou kromě alergenů také virové infekce, tělesná zátěž, chlad, tabákový kouř a dráždivé chemické látky. Akutní astmatický záchvat se obvykle dostaví během několika minut po expozici alergenu. Bronchiálním astmatem trpí ve světě více než 100 milionů obyvatel (Krejsek a Kopecký, 2004; Bartůňková *et al.*, 2005).

4.4.2.5 Anafylaxe

Anafylaxe je jednoznačně nejzávažnějším projevem alergie. Je to život ohrožující stav, který bez včasné a správné léčby může skončit smrtí postiženého jedince. Projevy anafylaktické reakce mohou být místní nebo celkové a mohou se lišit ve své intenzitě i v době do začátku prvních potíží. Rychlé rozvinutí příznaků od 5 do 30 minut většinou značí těžší průběh reakce než anafylaxe s pozdějším nástupem potíží. Místní příznaky se týkají jen jednotlivých orgánů, zatímco celkové projevy anafylaxe jsou závažnější a vznikají jejich kombinací a vystupňováním, což se označuje jako anafylaktický šok. U postiženého jedince typicky dochází k pocitu generalizovaného svědění, objevuje se kožní exantém nebo kopřivka, pocit staženého hrdla, úzkosti, následně tíže na hrudi, dušnost, a nakonec dochází ke ztrátě vědomí. (Litzman *et al.*, 2001)

4.4.3 Diagnostika a terapie potravinových alergií

Diagnostika potravinových alergií je velmi obtížná, a ne vždy je úspěšná. Základem je pečlivé vyšetření pacienta a zhodnocení jeho osobní i rodinné anamnézy. Je potřeba odlišit potravinovou alergii od intolerance potravy, ale také od jiných stavů. Jedním z diagnostických nástrojů jsou kožní expoziční testy. Alergické reakce na potravu však většinou nevedou k pozitivitě kožních testů, což komplikuje diagnostický postup. Další možností je testování *in vitro* v přítomnosti specifických IgE, které reagují s potravními

alergeny. Optimálně by měl být proveden dvojitě slepý placebem kontrolovaný provokační test (DBPCFC) (Krejsek a Kopecký, 2004; Krejsek *et al.*, 2016).

Terapie potravinových alergií je velmi individuální. Většinou spočívá v úplné eliminaci potravy obsahující dané alergeny. U některých pacientů je možné provést tzv. hyposenzibilizaci, která spočívá v postupném zavádění tepelně upravené potravy obsahující alergeny. Takto je možné postupně navodit toleranci k dané složce potravy. Pacienti s rizikem rozvoje život ohrožující anafylaktické reakce musí, kromě striktního dodržování eliminace alergenu v potravě, být vybaveni autoinjektorem s adrenalinem (Krejsek a Kopecký, 2004; Krejsek *et al.*, 2016).

4.4.4 Alergie na ořechy a arašídny

Alergické reakce na arašídny jsou téměř vždy zprostředkované IgE protilátkami a projevy této alergie jsou nejčastěji vyvolány jejich konzumací. Méně často se alergie projevuje po kontaktu s kůží nebo inhalaci prachu či aerosolu. Reakce se může projevit jak lokálně, tak i systémově. Arašídny patří mezi potraviny, které nejčastěji vyvolávají anafylaktické reakce (Fuchs *et al.*, 2016).

V podzemnici olejné existuje více než 20 alergenních proteinů, mezi ty hlavní patří např. Ara h 1 (vicilin), Ara h 2 (koglutin), peanut-1 a CARG. K vyvolání alergické reakce u citlivých jedinců stačí již několik mg proteinu z podzemnice (Kvasničková, 1998).

Jedinci alergičtí na arašídny jsou velmi často alergičtí i na ořechy, např. lískové ořechy, mandle, kešu nebo para ořechy. Jeden z hlavních arašídových alergenů Ara h 2 má podobné epitopy vázající IgE jako alergeny z para ořechů a z mandlí, což zřejmě přispívá k vysoké frekvenci výskytu alergie na ořechy v populaci, která je alergická na arašídny (de Leon *et al.*, 2003; de Leon *et al.*, 2007).

Významná je také spojitost alergií na ořechy s pylovými alergiemi. Tato zkřížená reaktivita se objevuje např. u alergiků citlivých na pyl břízy (Bet v 1), kteří mají častěji alergii na lískové ořechy (alergen Cor a 1). Homologie mezi alergeny Bet v 1 a Cor a 1 je totiž vyšší než 90 % (Krejsek *et al.*, 2006; Fuchs *et al.*, 2016).

V posledních letech se zvyšuje počet dětí, které trpí alergií na ořechy (včetně alergie na arašídny). Prevalence této potravinové alergie se mezi lety 1997 až 2008 zvedla z 0,6 %

na 2,1 % amerických dětí, zatímco u dospělých zůstává zhruba na stejné úrovni kolem 1,4 %. Průměrný věk jedince při vzniku alergie na ořechy se navíc snižuje, což je pravděpodobně způsobeno zvýšenou konzumací ořechů těhotnými matkami a dětmi v nízkém věku (Hourihane *et al.*, 1996; Sicherer *et al.*, 2010).

5 Cíl práce

Cíle:

1. vyšetření polymorfismu 2964 G/A v genu *STAT6* metodou PCR-RFLP u dvaceti pěti vzorků, ověření tří vzorků metodou sekvenování formou služby
2. analýza získaných výsledků a jejich vyhodnocení v kontextu přítomnosti alergie na ořechy a arašídy

6 Metodika vyšetření polymorfismu genu *STAT6*

Prvním krokem před analýzou polymorfismu genu *STAT6* byl odběr materiálu, který byl získán pomocí bukálního stěru vyšetřovaných osob. Následně byla ze stěrů provedena izolace DNA, poté stanovení koncentrace DNA. Vlastní vyšetření polymorfismu genu bylo provedeno metodou PCR-RFLP s použitím gelové elektroforézy.

Vyšetřeno bylo celkem 25 osob ve věku od 2 do 64 let, z nichž 16 trpí alergií na ořechy nebo arašídy. Všechny osoby poskytly vzorky své DNA anonymně. Zároveň vyplnily krátké dotazníky, které byly spolu s odebranými vzorky dále vedeny pouze pod identifikačními čísly.

Následná analýza všech odebraných vzorků byla provedena v laboratoři Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Některé z odebraných vzorků byly navíc po provedení PCR enzymaticky přečištěny a po přípravě sekvenčních reakcí zaslány do firmy GenSeq s.r.o. k osekvenování.

6.1 Odběr materiálu

Materiál pro analýzu DNA byl získán provedením bukálního stěru, který si vyšetřované osoby provedly samy pomocí sterilního tampónu. Tento stěr obsahoval epitelální buňky sliznice ústní dutiny, z jejichž jader byla následně izolována DNA. Před samotnou izolací byly vzorky uchovány při teplotě 4 stupně Celsia.

6.2 Izolace DNA

Použité přístroje a pomůcky:

Vodní lázeň, centrifuga, vortex, sada automatických pipet, špičky, rukavice, nůžky, mikrozkmavky (1,5 ml), mikrozkmavky s kolonkami (NucleoBond® od firmy Macherey-Nagel).

Použité reagensie a jejich skladování:

- proteináza K – skladování v mrazicím boxu (-20 °C)
- PBS – skladování při pokojové teplotě
- ethanol (96%) – skladování při pokojové teplotě
- pufr B3 (z kitu NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel) – skladování při pokojové teplotě
- pufr B5 (z kitu NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel) – skladování při pokojové teplotě
- pufr BE (z kitu NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel) – skladování při pokojové teplotě
- pufr BW (z kitu NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel) – skladování při pokojové teplotě

Pracovní postup:

Nejprve byl do předem označené mikrozkušavky sterilně odstřížen tampón, kterým byl proveden bukalní stěr. Do mikrozkušavky s tampónem bylo pipetou přidáno 25 µl proteinázy K, 200 µl PBS a 200 µl pufru B3. Vzorek byl zvortexován a krátce stočen v centrifuze. Poté byl inkubován v předem připravené vodní lázni 10 minut při teplotě 70 °C.

Po inkubaci byl vzorek zvortexován a stočen v centrifuze. Potom byl tampón vyjmut z mikrozkušavky. Do mikrozkušavky bylo pipetou přidáno 200 µl 96% ethanolu. Pak byl vzorek znovu zvortexován a stočen v centrifuze. Obsah této mikrozkušavky byl přepipetován na kolonku nové kolečkové mikrozkušavky a nechal se stočit v centrifuze při 11 000 rpm po dobu 1 minuty. Kolonka byla přesunuta do nové kolečkové mikrozkušavky, mikrozkušavka s filtrátem byla odstraněna.

Do kolonky v nové kolečkové mikrozkušavce bylo přidáno 500 µl pufru BW. Vzorek byl stočen v centrifuze při 11 000 rpm po dobu 1 minuty. Poté byl z mikrozkušavky odstraněn filtrát a do kolonky bylo pipetou přidáno 600 µl pufru B5. Vzorek v mikrozkušavce s kolonkou byl pak stočen v centrifuze při 11 000 rpm po dobu 2 minut a filtrát z mikrozkušavky byl odstraněn. Potom byl vzorek v mikrozkušavce s kolonkou

znovu stočen v centrifuze, tentokrát při 13 400 rpm po dobu 1 minuty. Mikrozkušavka s filtrátem byla odstraněna a kolonka byla přendána do další mikrozkušavky.

Přímo na kolonku v nové mikrozkušavce bylo přidáno 25 µl pufru EB a vzorek se nechal inkubovat při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Následně byl stočen v centrifuze při 11 000 rpm po dobu 1 minuty. Obsah mikrozkušavky byl přepipetován zpět do kolonky a nechal se inkubovat při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Na závěr byl vzorek v mikrozkušavce s kolonkou stočen v centrifuze při 13 400 rpm po dobu 2 minut. Po odstranění kolonky byl vzorek v mikrozkušavce zvortexován a krátce stočen v centrifuze.

6.3 Stanovení koncentrace DNA v izolátu

Použité přístroje a pomůcky:

Spektrofotometr (Colibri od firmy Titertek Berthold), automatická pipeta, špičky, rukavice.

Použité reagenty a jejich skladování:

- pufr BE (z kitu NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel) – skladování při pokojové teplotě

Pracovní postup:

Spektrofotometr byl nejdříve nakalibrován pomocí 1,5 µl pufru BE. Koncentrace DNA byla měřena z 1,5 µl vzorku, který byl automatickou pipetou nanesen na čočku spektrofotometru. Měření probíhalo při pokojové teplotě.

Po stanovení koncentrace izolované genomové DNA byly vzorky skladovány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C. Naměřené koncentrace DNA v jednotlivých izolátech jsou uvedeny v tab. 1.

Tabulka 1: Naměřené koncentrace DNA v izolátech.

č. vzorku	koncentrace	č. vzorku	koncentrace
1.	5,48 ng/μl	14.	2,43 ng/μl
2.	7,91 ng/μl	15.	51,01 ng/μl
3.	25,69 ng/μl	16.	38,29 ng/μl
4.	42,09 ng/μl	17.	31,09 ng/μl
5.	22,26 ng/μl	18.	130,73 ng/μl
6.	52,35 ng/μl	19.	40,63 ng/μl
7.	30,73 ng/μl	20.	75,27 ng/μl
8.	26,55 ng/μl	21.	66,28 ng/μl
9.	120,28 ng/μl	22.	42,73 ng/μl
10.	16,21 ng/μl	23.	35,85 ng/μl
11.	39,54 ng/μl	24.	32,27 ng/μl
12.	28,46 ng/μl	25.	48,61 ng/μl
13.	11,75 ng/μl		

6.4 PCR-RFLP

6.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Použité přístroje a pomůcky:

Termocykler (MJ Mini od firmy Bio-Rad Laboratories), sada automatických pipet, špičky, mikrozumavky (0,2 ml), mikrozumavka (1,5 ml), rukavice.

Použité reagensie a jejich skladování:

- mastermix (OneTaq® Quick-Load® 2x MM w/Std Buffer od firmy New England BioLabs) – skladování v mrazicím boxu (-20 °C)
- voda – skladování při pokojové teplotě
- primery STAT6_F (forward) a STAT6_R (reverse) (od firmy Generi Biotech) – skladování v mrazicím boxu (-20 °C)

Sekvence použitých primerů:

forward primer: 5'-GAA GTT CAG GCT CTG AGA GAC-3'

reverse primer: 5'-CCA TCA CCC TCA GAG AGC-3'

Pracovní postup:

Vzorky s izolovanou DNA a ostatní reagensie byly rozmrazeny při pokojové teplotě. Poté byly zvortexovány a krátce stočeny v centrifuze. Následně byla do jedné mikrozkušavky (1,5 ml) připravena reakční směs podle tab. 2.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro PCR.

reagensie	objem pro 1 vzorek
PCR mastermix	12,5 µl
forward primer	3 µl
reverse primer	3 µl
voda	3 µl

Takto připravená směs byla rozpipetována do mikrozkušavek (0,2 ml) po 21,5 µl. Do každé mikrozkušavky s reakční směsí bylo přidáno 3,5 µl izolované DNA. Množství přidané DNA a vody se přizpůsobovalo podle naměřené koncentrace DNA v každém

izolátu tak, aby každá vzniklá směs měla objem 25 μ l. Tyto reakční směsi s DNA byly zvortexovány a krátce stočeny v centrifuze. Poté byly vloženy do termocykleru, kde proběhla PCR. Reakční profil této reakce je uveden v tab. 3.

Tabulka 3: Reakční profil PCR.

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
denaturace	95 °C	45 s	40
annealing	55 °C	45 s	
extenze	72 °C	45 s	
terminální extenze	72 °C	2 min	1

Výsledné PCR produkty by měly mít velikost 93 bp.

6.4.2 *Kontrola produktů PCR*

Po dokončení PCR byla provedena kontrola její úspěšnosti, a to pomocí gelové elektroforézy na 3% agarózovém gelu. Produkty PCR byly vizualizovány pomocí ethidiumbromidu pod UV světlem a na detekčním systému byly pořízeny fotografie.

Vzhledem k tomu, že ethidiumbromid je silný mutagen, je při práci s ním vyžadována zvýšená bezpečnost práce, je potřeba vyhradit místo pro práci s ním, a také ho likvidovat jako nebezpečný odpad.

Použité přístroje a pomůcky:

Mikrovlnná trouba, elektroforetický systém, automatická pipeta a špičky, rukavice, skleněná kádinka, laboratorní předvážky, odměrný válec, detekční systém s fotoaparátem.

Použité reagensie a jejich skladování:

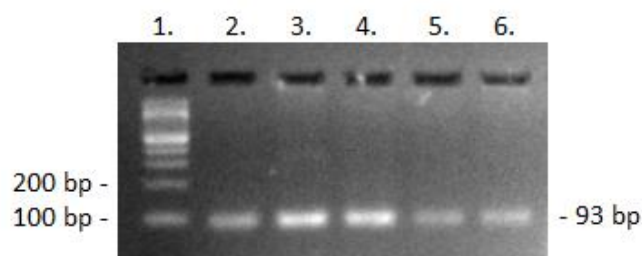
- prášková agaróza (od firmy Serva) – skladování při pokojové teplotě
- 1x TBE pufr (připravený z Rotiphorese® 10x TBE Buffer od firmy Carl Roth) – skladování při pokojové teplotě
- ethidiumbromid (od firmy Serva) – skladování v lednici (4 °C)
- DNA ladder (Quick-Loaded® 100 bp DNA Ladder od firmy New England BioLabs) – skladování v lednici (4 °C)

Pracovní postup:

Při přípravě 150 ml 3% agarózového gelu do skleněné kádinky bylo na laboratorních předvážkách odváženo 4,5 g práškové agarózy. V odměrném válci bylo odměřeno 145,5 ml pufru 1x TBE, který byl následně přidán do kádinky k navážené agaróze. Poté byla kádinka vložena do mikrovlnné trouby, kde byla směs ohřáta tak, aby se agaróza v roztoku úplně rozpustila a vytvořil se tak agarózový gel. Po částečném zchladnutí bylo do gelu pipetou přidáno 5 µl ethidiumbromidu. Po dostatečném rozmíchání byl agarózový gel vylit do připravené elektroforetické formy, kam byl vložen elektroforetický hřeben. Pomocí špičky byly ze vzniklého gelu odstraněny vzniklé bublinky a gel se nechal tuhnout po dobu asi 15 minut.

Po úplném ztuhnutí agarózového gelu byl z formy vyjmut hřeben, který v gelu vytvořil jamky (sloty). Do jedné jamky bylo napipetováno 5 µl DNA ladderu a do dalších jamek byly napipetovány produkty PCR po 10 µl. Celá forma byla vložena do elektroforetické vany naplněné pufrem 1x TBE tak, aby byl agarózový gel v pufru úplně ponořen. Elektroforéza byla spuštěna na 40 minut při napětí 110 V.

Po doběhnutí elektroforézy byl gel opatrně vyjmut a přenesen na detekční systém, kde byla pořízena fotodokumentace (viz obr. 5), díky které mohla být provedena kontrola úspěšnosti amplifikace DNA při PCR.



Obrázek 5: Kontrola produktů PCR pomocí gelové elektroforézy. Do jamky č. 1 byl napipetován DNA ladder (100 bp), do jamkek č. 2-6 produkty PCR.

6.4.3 Štěpení DNA restrikční endonukleázou

Použité přístroje a pomůcky:

Termocykler (MJ Mini od firmy Bio-Rad Laboratories), automatická pipeta a špičky, mikrozumavka (1,5 ml), rukavice.

Použité reagensy a jejich skladování:

- pufr G (od firmy Thermo Scientific) – skladování v mrazicím boxu (-20 °C)
- restrikční endonukleáza *Hin1I* (*BsaHI* od firmy Thermo Scientific) – skladování v mrazicím boxu (-20 °C)
- voda – skladování při pokojové teplotě

Pracovní postup:

Do jedné mikrozumavky byla připravena směs pufru G, vody a restrikční endonukleázy *Hin1I* o koncentraci 10 U/μl podle tab. 4. Reakční směs byla připravována v chladicím boxu.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro restriční štěpení DNA.

reagencie	objem pro 1 produkt PCR
pufr G	2 μ l
<i>Hin</i> 1I (<i>Bsa</i> HI) – 5 U	0,5 μ l
voda	8 μ l

Tato směs byla napipetována po 10,5 μ l do každé mikrozkušavky obsahující produkt PCR. Tyto mikrozkušavky byly zvortexovány a krátce stočeny v centrifuze. Následně byly vloženy do termocyklu, kde se nechaly inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 3 hodin.

6.4.4 *Kontrola produktů restričního štěpení*

Kontrola proběhlého restričního štěpení DNA byla provedena pomocí gelové elektroforézy. Vzorky rozštěpené DNA byly vizualizovány pomocí ethidiumbromidu pod UV světlem detekčního systému, kde byla pořízena fotodokumentace.

Použité přístroje a pomůcky:

Mikrovlnná trouba, elektroforetický systém, automatická pipeta a špičky, rukavice, skleněná kádinka, laboratorní předvážky, odměrný válec, detekční systém s fotoaparátem.

Použité reagenty a jejich skladování:

- prášková agaróza (od firmy Serva) – skladování při pokojové teplotě
- 1x TBE pufr (připravený z Rotiphorese® 10x TBE Buffer od firmy Carl Roth) – skladování při pokojové teplotě
- ethidiumbromid (od firmy Serva) – skladování v lednici (4 °C)

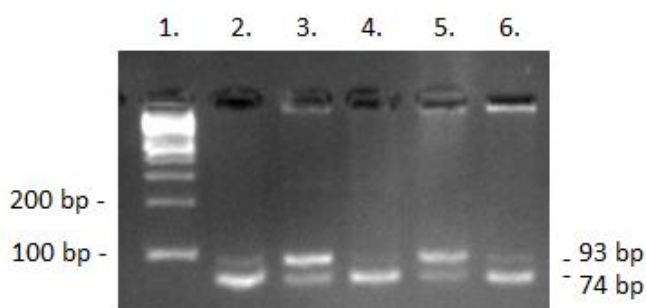
- DNA ladder (Quick-Loaded® 100 bp DNA Ladder od firmy New England BioLabs) – skladování v lednici (4 °C)

Pracovní postup:

Nejdříve byl připraven 4% agarózový gel o objemu 150 ml. Na laboratorních předvážkách bylo odváženo 6 g práškové agarózy. V odměrném válci bylo odměřeno 139 ml pufru 1x TBE. Poté byly tyto dvě reagentie smíchány ve skleněné kádince, která byla vložena do mikrovlnné trouby a ohřívala se tak dlouho, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarózy a nevznikl tak gel. Po krátkém zchladnutí tohoto gelu bylo do něj napipetováno 5 μ l ethidiumbromidu, který byl v gelu rozmíchán. Takto připravený gel byl následně vylit do elektroforetické formy, kam byl přidán také elektroforetický hřeben. Po odstranění bublinek z agarózového gelu pomocí pipetovací špičky se gel nechal tuhnout asi 15 minut.

Po ztuhnutí agarózového gelu byl vyndán hřeben, kterým byly vytvořeny jamky. Do těchto jamek byly napipetovány vzorky naštěpených DNA po 10 μ l. Do jedné jamky bylo napipetováno 5 μ l DNA ladderu. Následně byla forma s gelem vložena do elektroforetické vany, která byla naplněna pufrem x TBE. Celý gel byl ponořen v tomto pufru. Elektroforéza byla spuštěna na 45 minut při napětí 110 V.

Po 45 minutách byla elektroforéza vypnuta a gel byl přenesen na detekční systém pod UV světlo, kde byl gel vyfotografován. Z pořízených fotografií (viz obr. 6) byly vyhodnoceny výsledky jednotlivých vzorků.



Obrázek 6: Rozdělení produktů PCR po restričním štěpení pomocí gelové elektroforézy. Do 9. jamky byl napipetován DNA ladder, v jamkách 2-6 produkty restričního štěpení.

6.4.5 Hodnocení výsledků restrikčního štěpení

Výsledky restrikčního štěpení fragmentů PCR byly hodnoceny podle pozice proužků v agarózovém gelu, které vznikly provedením elektroforézy. Proužky představují jednotlivé úseky DNA o různé velikosti, která je určena tím, zda došlo k rozštěpení enzymem. Restrikční endonukleáza *Hin1I* (*BsaHI*) rozštěpila jen ty produkty PCR, které obsahují alelu G (wild-type), a to na dva fragmenty o velikosti 74 bp a 19 bp. Produkty PCR, které obsahovaly mutantní alelu A a byly dlouhé 93 bp, rozštěpeny nebyly (viz tab. 4). Produkty o velikosti 19 kb v gelu nejsou patrné, protože kvůli své malé velikosti splývají s primery.

Tabulka 4: Velikosti fragmentů pro hodnocení polymorfismu na pozici 2964 v genu *STAT6*.

velikost fragmentů DNA	genotyp
2x (74 bp + 19 bp)	wild-type homozygot G/G
93 bp + 74 bp + 19 bp	heterozygot A/G
2x 93 bp	mutantní homozygot A/A

6.5 Enzymatické čištění PCR produktů

Použité přístroje a pomůcky:

Termocykler (MJ Mini od firmy Bio-Rad Laboratories), automatická pipeta a špičky, mikrozkušavky (0,2 ml), rukavice.

Použité reagenty a jejich skladování:

- exonukleáza Exo I (Exonuclease I od firmy New England BioLabs) – skladování v mrazicím boxu (-20 °C)
- alkalická fosfatáza rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase od firmy New England BioLabs) – skladování v mrazicím boxu (-20 °C)

Pracovní postup:

Do mikrozkušavky byly postupně napipetovány exonukleáza, alkalická fosfatáza a PCR produkt v množství podle tab. 5.

Tabulka 5: Složení směsi při enzymatickém čištění PCR produktů.

reagencie	objem
exonukleáza	0,5 µl
alkalická fosfatáza	1 µl
PCR produkt	5 µl

Takto připravené směsi byly vloženy do termocykleru, kde probíhala inkubace při teplotě 37 °C po dobu 15 minut k degradaci přebytečných primerů a defosforylaci zbytkových deoxynukleotidů. Následná inaktivace enzymů probíhala při teplotě 80 °C po dobu 15 minut.

6.6 Příprava vzorků k sekvenaci

Použité přístroje a pomůcky:

Automatická pipeta a špičky, mikrozkušavky (1,5 ml), rukavice.

Použité reagenty a jejich skladování:

- primery STAT6_F (forward) a STAT6_R (reverse) (od firmy Generi Biotech) – skladování v mrazicím boxu (-20 °C)
- voda – skladování při pokojové teplotě

Pracovní postup:

Příprava směsí na sekvenaci byla provedena pro každý vzorek dvakrát, zvlášť s forward primerem a zvlášť s reverse primerem.

Do mikrozkuřavky byly napipetovány primery, PCR produkty a voda podle tab. 6.

Tabulka 6: Složení směsi pro sekvenaci DNA.

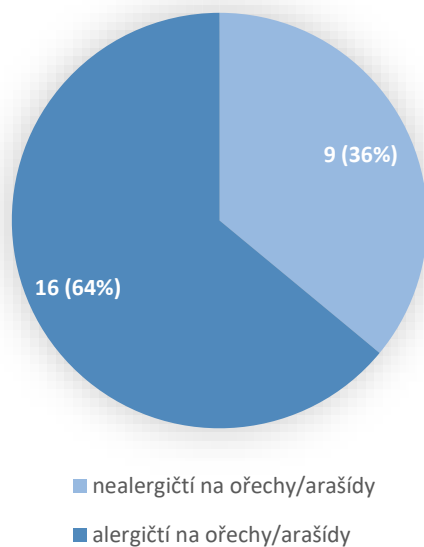
reagencie	objem
PCR produkt	1,5 μ l
forward/reverse primer	5 μ l
voda	3,5 μ l

Mikrozkuřavky se vzniklou reakční směsí byly označeny identifikačními čárovými kódy a zaslány do firmy GenSeq, s.r.o., jejímž prostřednictvím proběhlo samotné sekvenování.

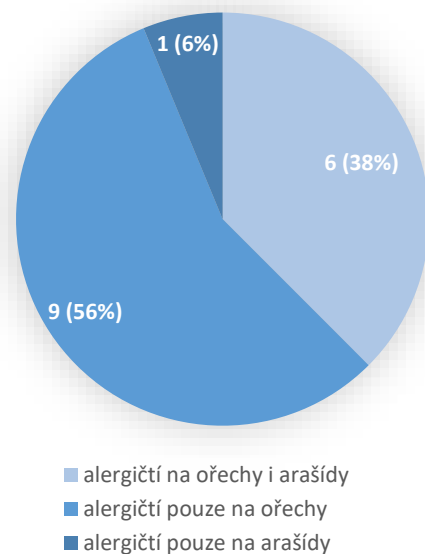
7 Výsledky

7.1 Popis souboru

Na přítomnost mutace 2964 G/A v genu *STAT6* bylo testováno celkem 25 osob (10 mužů a 15 žen) z České republiky ve věku od 2 do 64 let. Jak je vidět na obr. 7 a 8, 16 z nich trpělo alergií na ořechy nebo arašídý; alergií na ořechy trpělo 15 a alergií na arašídý 7 z těchto vyšetřených osob.



Obrázek 7: Podíl osob alergických a nealergických na ořechy/arašídý ve vyšetřeném souboru.



Obrázek 8: Rozdělení osob alergických na ořechy/arašídý.

7.2 Výsledky PCR-RFLP

Přítomnost či nepřítomnost mutace na pozici 2964 v genu *STAT6* byla pomocí metody PCR-RFLP vyšetřena u všech 25 osob (tab. 7).

Tabulka 7: Genotypy osob vyšetřených metodou PCR-RFLP.

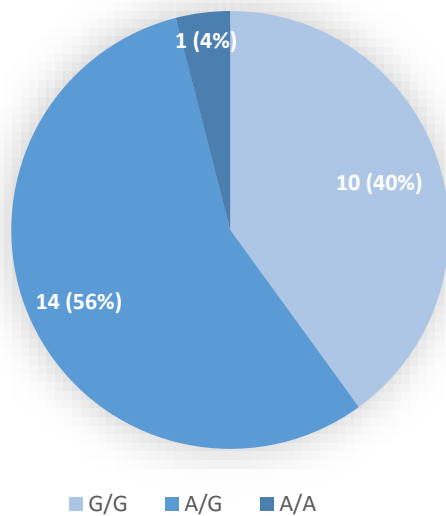
č. vzorku	genotyp	č. vzorku	genotyp
1.	A/G	14.	A/G
2.	A/G	15.	G/G
3.	A/G	16.	A/G
4.	G/G	17.	A/G
5.	A/G	18.	A/G
6.	A/G	19.	G/G
7.	G/G	20.	A/G
8.	G/G	21.	A/G
9.	G/G	22.	G/G
10.	A/G	23.	G/G
11.	G/G	24.	A/G
12.	A/A	25.	G/G
13.	A/G		

Přítomnost mutantní alely A byla prokázána u 15 osob. Frekvence alely A byla zjištěna 0,32 a frekvence alely G 0,68. Jak je vidět v tab. 8, jedinci alergičtí na ořechy/arašídý měli frekvenci alely A vyšší a frekvenci alely G nižší než ti, kteří touto alergií netrpěli.

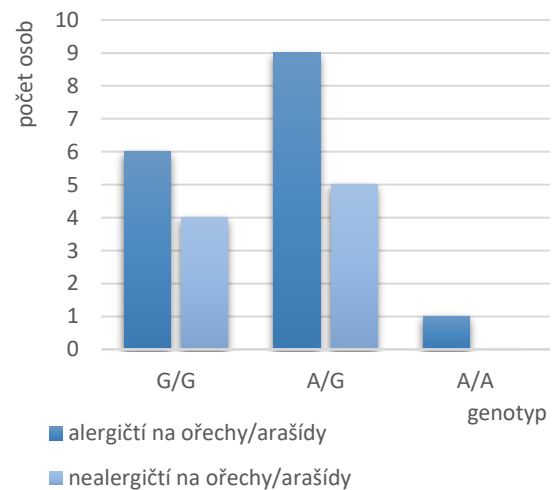
Zastoupení genotypů a podíl osob alergických či nealergických na ořechy nebo arašídý v rámci jednotlivých genotypů je znázorněno na obr. 9 a 10. Genotyp G/G byl prokázán u 10 a genotyp A/G u 14 vyšetřených osob. Genotyp A/A se vyskytl pouze u 1 osoby, která trpí alergií na ořechy i arašídý. Podíl osob alergických na ořechy/arašídý byl mírně vyšší u genotypu A/G než u genotypu G/G.

Tabulka 8: Frekvence alel a genotypů u vyšetřených osob.

	celkem	alergičtí na ořechy/arašídý	nealergičtí na ořechy/arašídý
A	0,32	0,34	0,28
G	0,68	0,66	0,72
A/A	0,04	0,06	0
A/G	0,56	0,56	0,56
G/G	0,40	0,38	0,44



Obrázek 9: Podíl zjištěných genotypů vyšetřených osob.

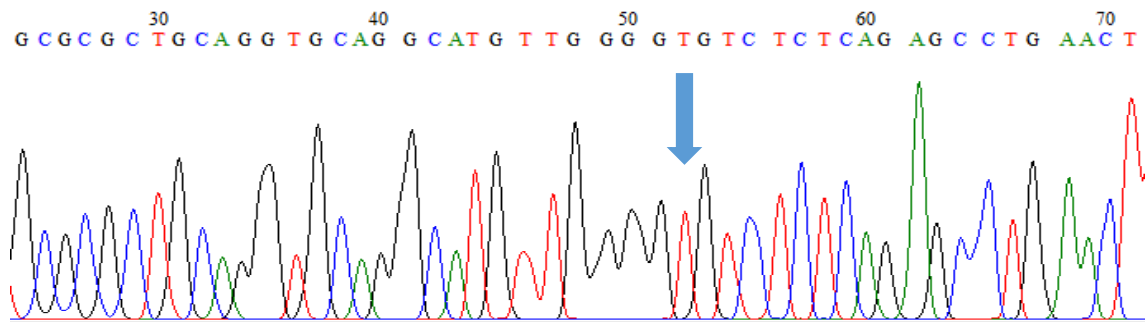


Obrázek 10: Počty osob alergických a nealergických na ořechy/arašídý v rámci jednotlivých genotypů.

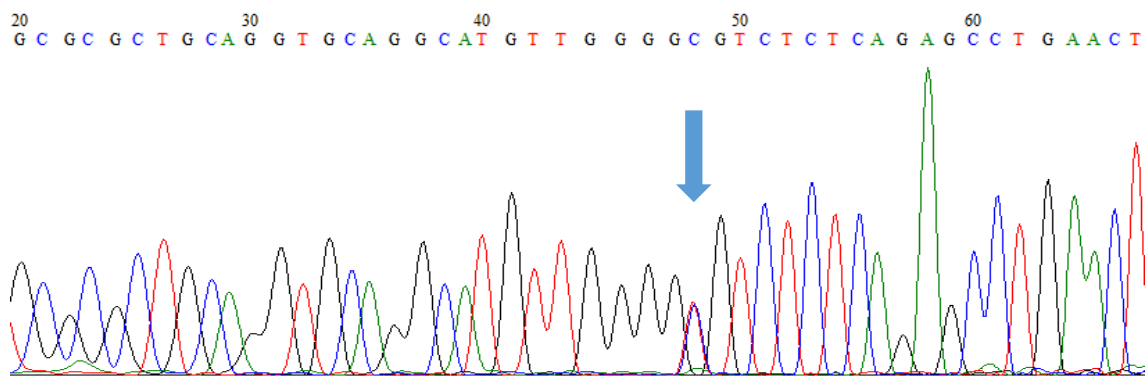
Výsledky nebyly více statisticky analyzovány, neboť by kvůli nízkému počtu vzorků neměly ze statistického hlediska téměř žádnou vypovídající hodnotu.

7.3 Výsledky sekvenování

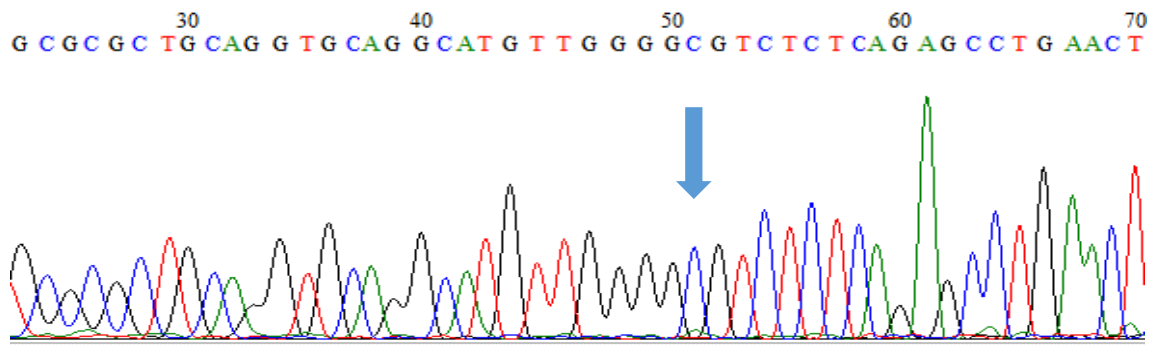
Sekvenovány byly úseky genu *STAT6* celkem 3 osob, u nichž bylo dříve provedeno také vyšetření metodou PCR-RFLP. Zjištěné genotypy byly 1 x A/A (obr. 11), 1 x A/G (obr. 12) a 1 x G/G (obr. 13).



Obrázek 11: Sekvence úseku genu *STAT6* (reverse primer) u vzorku č. 12 (A/A), polymorfismus je označen šipkou.

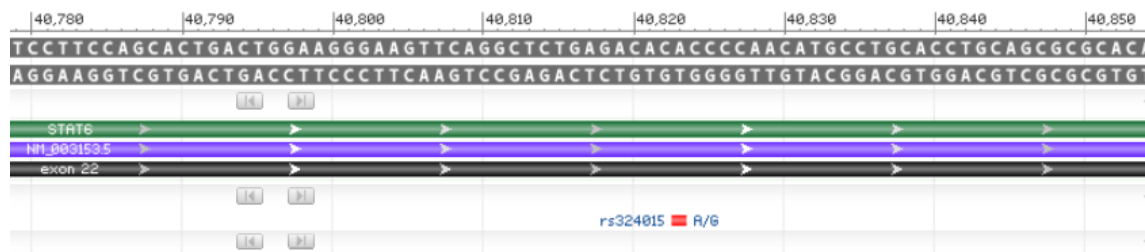


Obrázek 12: Sekvence úseku genu *STAT6* (reverse primer) u vzorku č. 10 (A/G), polymorfismus je označen šipkou.



Obrázek 13: Sekvence úseku genu *STAT6* (reverse primer) u vzorku č. 15 (G/G), polymorfismus je označen šipkou.

Výsledky sekvenování byly vyhodnoceny pomocí programu BioEdit a databáze NCBI, kde byla vyhledána referenční sekvence NG_021272.2 (na obr. 14) pro srovnání se sekvencemi, které byly získány sekvenováním.



Obrázek 14: Část referenční sekvence: *Homo sapiens* signal transducer and activator of transcription 6 (*STAT6*), RefSeqGene (LRG_1369) on chromosome 12; NCBI Reference Sequence: NG_021272.2; umístění polymorfismu je znázorněno červeně (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_021272.2?report=graph).

Výsledky sekvenování se ve všech případech shodovaly s výše popsány výsledky vyšetření pomocí metody PCR-RFLP.

8 Diskuze

Pro praktickou část této práce bylo odebráno 25 vzorků, všechny z nich byly vyšetřeny metodou PCR-RFLP v laboratoři Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Několik vzorků bylo také osekvenováno, a to ve firmě GenSeq, s.r.o., neboť fakultní laboratoř nedisponuje sekvenátorem. Tato metoda je relativně rychlá a levná, i samotná příprava vzorků před jejich odesláním byla jednoduchá. Nevýhodou využití služeb komerční laboratoře byla nemožnost individuální úpravy nastavení parametrů sekvenátoru.

Výsledky sekvenování se shodovaly s výsledky PCR-RFLP, což bylo potvrzením, že zde popsáný a provedený postup přinesl správné výsledky. Tyto sekvence byly hodnoceny pomocí programu BioEdit a databáze NCBI, která umožňuje celkově zhodnotit sekvence a klasifikovat nalezené mutace. Práce s databází byla zpočátku komplikovaná, ale po dalším prozkoumání svůj účel splnila.

Izolace DNA ze stěrů bukální sliznice proběhla bez komplikací. Naměřená koncentrace DNA se ale v jednotlivých vzorcích velmi lišila, přestože byl u všech vzorků použit stejný postup. Koncentrace se pohybovala v rozmezí od 2,43 do 130,73 ng/μl. Tyto velké rozdíly mohly být způsobeny lehce odlišnou technikou stěru bukálních buněk, který si vyšetřování prováděli pod dohledem sami. Vzorky s velmi nízkou koncentrací byly odebrány více než týden před izolací. Naopak nejvyšší koncentraci měl vzorek, který byl odebrán bezprostředně před izolací. Různá délka času, po který byly vzorky skladovány před provedením izolace DNA, by však neměla mít na toto žádný vliv (van Wieren-de Wijer *et al.*, 2009).

PCR-RFLP je relativně levná metoda vhodná k vyšetření SNP v genu. Příprava vzorků do termocykleru byla relativně rychlá, nejvíce času zabrala samotná amplifikace a štěpení DNA v termocykleru. Při jeho používání však často docházelo ke zmenšení objemu některých vzorků, což bylo zřejmě způsobeno kvalitou použitých mikrozkmavek, jejichž víčka v některých případech netěsnila ani po jejich pečlivém a opakovaném uzavření.

Kontroly úspěšnosti amplifikace DNA a poté také restričního štěpení byly provedeny pomocí gelové elektroforézy. Při přípravě 4% agarózového gelu nebylo snadné nastavit

mikrovlnnou troubu tak, aby nedošlo k vytečení gelu z nádoby, a zároveň byl gel bez bublinek. Samotná elektroforéza pak proběhla bez problémů. Použití elektroforézy pro kontrolu úspěšnosti amplifikace sice není nutností, ale vždy se vyplatí ji provést, aby nedocházelo ke zbytečným nákladům i ztrátě času při dalším laboratorním postupu s nevyhovujícími vzorky. Odečítání výsledků z agarózového gelu po restričním štěpení vzorků může být do značné míry subjektivní, pokud nejsou pruhy zcela zřejmé, a proto bylo potřeba u některých vzorků upravit množství enzymu použitého při restričním štěpení, aby došlo k dostatečnému rozštěpení daného úseku DNA a pruhy v gelu tak byly jasně patrné a výsledky jednoznačné.

Tyto drobné komplikace však neměly žádný vliv na konečné výsledky této analýzy.

Zjištěné frekvence alel byly pro A 0,32 a pro G 0,68, což odpovídá tomu, co bylo zjištěno dříve na vzorku 100 britských bělochů, u nichž byla frekvence alel 0,33 A a 0,67 G (Amoli *et al.*, 2000).

Frekvence alely G zde byla vyšší u osob bez alergie na ořechy či arašídy. To se shoduje s předchozím zjištěním, kde byly testovány děti a bylo prokázáno spojení mezi alelou A a alergií na arašídy, vyšší úrovní IgE a těžšími projevy této alergie. Alela A byla taktéž spojena s vyšší hladinou IgE u alergie na kravské mléko (van Ginkel *et al.*, 2018).

Je to však v rozporu s tím, co bylo zjištěno dříve, kde byla zjištěna frekvence alely G naopak vyšší u lidí s alergií na ořechy a genotyp G/G byl spojen s těžšími projevy této alergie (Amoli *et al.*, 2002).

Souvislost mezi genotypy a závažností projevů alergie zde nebyla zkoumána, neboť ani jedna ze zde vyšetřených osob netrpěla těžkými projevy této alergie.

Kvůli nízkému počtu zde vyšetřených vzorků nelze z těchto výsledků vyvozovat obecně platný závěr, zda různé varianty rs324015 genu *STAT6* mají i různý vliv na výskyt alergií na ořechy a arašídy. Navíc vzhledem k protichůdným závěrům předchozích studií lze předpokládat, že polymorfismus rs324015 genu *STAT6* je sice zapojen do patofyziologie potravinových alergií, ale není spojen s konkrétní potravinou představující alergen.

K rutinnímu testování pacientů s alergií na ořechy a arašídy se tedy toto vyšetření v praxi příliš nehodí. Pro pacienty s touto alergií by bylo přínosnější využít jiné testy, např. kožní prick testy nebo stanovení hladiny specifických protilátek v séru.

9 Závěr

V této práci byla představena problematika alergií na potraviny. Také zde byl popsán gen *STAT6*, jehož polymorfismus 2964 G/A (rs324015) má spojitost s alergií na ořechy a arašídů, a bioanalytické metody, které byly následně použity při vyšetření tohoto polymorfismu metodou PCR-RFLP, což bylo hlavním cílem této bakalářské práce. Celý postup tohoto vyšetření byl podrobně popsán, od získání vzorků, přes izolaci DNA z bukálních stěrů, PCR-RFLP, až po způsob hodnocení výsledků. Vyšetřeno bylo celkem 25 vzorků, z nichž 16 pocházelo od osob alergických na ořechy nebo arašídů. Několik vzorků bylo navíc připraveno a posláno k osekvenování, čímž byly výsledky předchozího vyšetření ověřeny. Na závěr byly tyto výsledky vyhodnoceny pomocí programu BioEdit a databáze NCBI.

Zastoupení genotypů ve vyšetřovaném souboru bylo 4 % A/A, 56 % A/G a 40 % G/G a frekvence alely A byla tedy 0,32 a frekvence alely G 0,68. Tyto výsledky se nijak významně nelišily od analýz provedených dříve v evropské populaci.

Tato práce je spíše pilotní studií, jejímž cílem bylo především osvojení si některých metod molekulární biologie, vyšetření polymorfismu 2964 G/A v genu *STAT6* metodou PCR-RFLP u dvaceti pěti vzorků, ověření tří vzorků metodou sekvenování formou služby, analýza získaných výsledků a jejich vyhodnocení v kontextu přítomnosti alergie na ořechy a arašídů. Tyto cíle tedy byly naplněny.

V dalším výzkumu by bylo vhodné vyšetřit genotypy u většího souboru osob a zaměřit se, kromě alergie na ořechy a arašídů, na více parametrů, např. i jiné alergie, a zároveň také vyšetřit hladinu těchto specifických IgE v séru.

10 Seznam použité literatury

AMOLI, M. M., HAND, S., HAJEER, A. H., JONES, K. P., ROLF, S., STING, C., DAVIES, B. H., OLLIER, W. E. R., 2002. Polymorphism in the *STAT6* Gene Encodes Risk for Nut Allergy. *Genes and Immunity*, 3 (4), 220-224, doi: 10.1038/sj.gene.6363872.

AMOLI, M., WER, O., HAJEER, A. H., 2000. A Novel PCR-RFLP Assay for the Detection of a Polymorphism in the 3' of *STAT6* Gene. *Genes and Immunity*, 1, 349-350, doi: 10.1038/sj.gene.6363684.

BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., HÖLZELOVÁ, E., HRUŠÁK, O., SMETANA, K., ŠEDIVÁ, A., ŠPÍŠEK, R., ŠPRONGL, L., VERNEROVÁ, E., 2005. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada. 176 s. ISBN 80-247-0691-1.

BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum. 194 s. ISBN 978-80-246-3224-7.

CHEN, W., DAINES, M. O., HERSHEY, G. K. K., 2004. Turning off Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT): The Negative Regulation of STAT Signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114 (3), 476-489, doi: 10.1016/j.jaci.2004.06.042.

CHEN, W., HERSHEY, G. K. K., 2007. Signal Transducer and Activator of Transcription Signals in Allergic Disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119 (3), 529-541, doi: 10.1016/j.jaci.2007.01.004.

DARNELL, J. E., KERR, I. M., STARK, G. R., 1994. Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activations in Response to INFs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science*, 264 (5164), 1415-1421, doi: 10.1126/science.8197455.

DE LEON, M. P., DREW, A. C., GLASPOLE, I. N., SUPHIOGLU, C., O'HEHIR, R. E., ROLLAND, J. M., 2007. IgE Cross-reactivity between the Major Peanut Allergen Ara h 2 and Tree Nut Allergens. *Molecular Immunology*, 44 (4), 463-471, doi: 10.1016/j.molimm.2006.02.016.

DE LEON, M. P., GLASPOLE, I. N., DREW, A. C., ROLLAND, J. M., O'HEHIR, R. E., SUPHIOGLU, 2003. Immunological Analysis of Allergenic Cross-reactivity between

Peanut and Tree Nuts. *Clinical & Experimental Allergy*, 33 (9), 1273-1280, doi: 10.1046/j.1365-2222.2003.01761.x.

FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J., SHOENFELD, Y., MAŤHA, V., 2005. *Imunitní systém: informace pro každého*. Praha: Grada. 236 s. ISBN 80-247-1196-6.

FUCHS, M., BĚLOHLÁVKOVÁ, S., FRŮHAUF, P., GVOZDIAKOVÁ, T., HAVLÁSEK, J., HORÁKOVÁ, V., JEŘÁBKOVÁ, M., KOPECKÁ, K., KOPELTOVÁ, E., KOPŘIVA, F., LIŠKA, M., MIKULOVÁ, Š., NOVOBÍLSKÁ, J., PEŠÁK, S., PONČÁKOVÁ, I., SOLAŘOVÁ, V., ŠETINOVÁ I., THON, V., VÍŠEK, P., 2016. *Potravinová alergie a intolerance*. Praha: Mladá fronta. 447 s. ISBN 978-80-204-3757-0.

GAO, P. S., MAO, X. Q., ROBERTS, M. H., ARINOBU, Y., AKAIWA, M., ENOMOTO, T., DAKE, Y., KAWAI, M., SASAKI, S., HAMASAKI, N., IZUHARA, K., SHIRAKAWA, T., HOPKIN, J. M., 2000. Variants of *STAT6* (Signal Transducer and Activator of Transcription 6) in Atopic Asthma. *Journal of Medical Genetics*, 37 (5), 380-382, doi: 10.1136/jmg.37.5.380a.

GRANADA, M., WILK, J. B., TUZOVA, M., STRACHAN, D. P., WEIDINGER, S., ALBRECHT, E., GIEGER, C., HEINRICH, J., HIMES, B. E., HUNNINGHAKE, G. M., CELEDÓN, J. C., WEISS, S. T., CRUIKSHANK, W. W., FARRER, L. A., CENTER, D. M., O'CONNOR, G. T., 2012. A Genome-wide Association Study of Plasma Total IgE Concentrations in the Framingham Heart Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129 (3), 840-845, doi: 10.1016/j.jaci.2011.09.029.

GODAVA, M., VRTEL, R., VODICKA, R., 2013. *STAT6*-polymorphism, Haplotypes and Epistasis in Relation to Atopy and Asthma. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 157 (2), 172-180, doi: 10.5507/bp.2013.043.

GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D. T., LEWONTIN, R. C., GELBART, W. M., 1996. *An Introduction to Genetic Analysis*. 6. issue. New York: W. H. Freeman and Company. 916 p. ISBN 0-7167-2604-1.

HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., ŠPÍŠEK, R., 2017. *Základy imunologie*. 6 vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton. 297 s. ISBN 978-80-7553-250-3.

- HOURIHANE, J. O. B., DEAN, T. P., WARNER, J. O., 1996. Peanut Allergy in Relation to Heredity, Maternal Diet, and Other Atopic Diseases: Results of a Questionnaire Survey, Skin Prick Testing, and Food Challenges. *BMJ*, 313 (7056), 518-521, doi: 10.1136/bmj.313.7056.518.
- IHLE, J. N., 2001. The Stat Family in Cytokine Signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 13 (2), 211-217, doi: 10.1016/S0955-0674(00)00199-X.
- JÍLEK, P., 2014. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 4. vydání. Praha: Grada. 96 s. ISBN 978-80-247-4822-1.
- KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z., 2002. *Molekulární genetiky zvířat: (metody detekce polymorfizmů DNA genů)*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 168 s. ISBN 80-7157-616-6.
- KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
- KOTANIDES, H., REICH, N. C., 1996. Interleukin-4-induced STAT6 Recognizes and Activates a Target Site in the Promoter of the Interleukin-4 Receptor Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (41), 25555-25561, doi: 10.1074/jbc.271.41.25555.
- KREJSEK, J., ANDRÝS, C., KRČMOVÁ, I., 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon. 496 s. ISBN 978-80-86472-74-4.
- KREJSEK, J., KOPECKÝ, O., 2004. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK. 968 s. ISBN 80-86225-50-X.
- KVASNIČKOVÁ, A., 1998. *Alergie z potravin*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací. 60 s. ISBN 80-85120-93-3.
- LEONARD, W. J., LIN, J. X., 2000. Cytokine Receptor Signaling Pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105 (5), 877-888, doi: 10.1067/mai.2000.106899.
- LITZMAN, J., KUKLÍNEK, P., RYBNÍČEK, O., 2001. *Alergologie a klinická imunologie*. Brno: Vydavatelství IDVPZ. 144 s. ISBN 80-7013-345-7.
- MIYATA, S., MATSUYAMA, T., KODAMA, T., NISHIOKA, Y., KURIBAYASHI, K., TAKEDA, K., AKIRA, S., SUGITA, M., 1999. STAT6 Deficiency in a Mouse Model

of Allergen-induced Airways Inflammation Abolishes Eosinophilia but Induces Infiltration of CD8+ T Cells. *Clinical and Experimental Allergy*, 29, 114-123, doi: 10.1046/j.1365-2222.1999.00405.x.

NEGORO, T., ORIHARA, K., IRAHARA, T., NISHIYAMA, H., HAGIWARA, K., NISHIDA, R., TAKAGI, H., SATOH, K., YAMAMOTO, Y., SHIMIZU, S., HAGIWARA, T., ISHII, M., TANIOKA, T., NAKANO, Y., TAKEDA, K., YOSHIMURA, I., IIKURA, Y., TOBE, T., 2006. Influence of SNPs in Cytokine-related Genes on the Severity of Food Allergy and Atopic Eczema in Children. *Pediatric Allergy and Immunology*, 17, 583-590, doi: 10.1111/j.1399-3038.2006.00463.x.

NUSSBAUM, R. L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F., 2004. *Klinická genetika*. 6. vydání. Praha: Triton. 426 s. ISBN 80-7254-475-6.

PATEL., B. K. R., KECK, C. L., O'LEARY, R. S., POPESCU, N. C., LAROCHELLE, W. J., 1998. Localization of the Human *STAT6* Gene to Chromosome 12q13.3-q14.1, a Region Implicated in Multiple Solid Tumors. *Genomics*, 52 (2), 192-200, doi: 10.1006/geno.1998.5436.

SHIMODA, K., VAN DEURSENT, J., SANGSTER, M. Y., SARAWAR, S. R., CARSON, R. T., TRIPP, R. A., CHU, C., QUELLE, F. W., NOSAKA, T., VIGNALI, D. A. A., DOHERTY, P. C., GROSVELD, G., PAUL, W. E., IHLE, J. N., 1996. Lack of IL-4-induced Th2 Response and IgE Class Switching in Mice with Disrupted *State6* Gene. *Nature*, 380 (6575), 630-633, doi: 10.1038/380630a0.

SICHERER, S. H., MUNOZ-FURLONG, A., GODBOLD, J. H., SAMPSON, H. A., 2010. US Prevalence of Self-reported Peanut, Tree Nut, and Sesame Allergy: 11-year Follow-up. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125 (6), 1322-1326, doi: 10/1016/j.jaci.2010.03.029.

SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J., 2009. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita. 869 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

TAKEDA, K., TANAKA, T., SHI, W., MATSUMOTO, M., MINAMI, M., KASHIWAMURA, S., NAKANISHI, K., YOSHIDA, N., KISHIMOTO, T., AKIRA, S., 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*, 380 (6575), 627-630, doi: 10.1038/380627a0.

VAN GINKEL, C. D., PETTERSSON, M. E., DUBOIS, A. E. J., KOPPELMAN, G. H., 2018. Association of *STAT6* Gene Variants with Food Allergy Diagnosed by Double-blind Placebo-controlled Food Challenges. *Allergy*, 73 (6), 1337-1341, doi: 10.1111/all.13432.

VAN WIEREN-DE WIJER, D. B. M. A., MAITLAND-VAN DER ZEE, A. H., DE BOER, A., BELITSER, S. V., KROON, A. A., DE LEEUW, P. W., SCHIFFERS, P., JANSSEN, R. G. J. H., VAN DUIJN, C. M., STRICKER, B. H. C. H., KLUNGEL, O. H., 2009. Determinants of DNA Yield and Purity Collected with Buccal Cell Samples. *European Journal of Epidemiology*, 24 (11), 677-682, doi: 10.1007/s10654-009-9388-x.

YAVUZ, S. T., BUYUKTIRYAKI, B., SAHINER, U. M., BIRBEN, E., TUNCER, A., YAKARISIK, S., KARABULUT, E., KALAYCI, O., SACKESEN, C., 2013. Factors That Predicts the Clinical Reactivity and Tolerance in Children with Cow's Milk Allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 110 (4), 284-289, doi: 10.1016/j.anai.2013.01.018.

YOKOZEKI, H., GHOREISHI, M., TAKAGAWA, S., TAKAYAMA, K., SATOH, T., KATAYAMA, I., TAKEDA, K., AKIRA, S., NISHIOKA, K., 2000. Signal Transducer and Activator of Transcription 6 Is Essential in the Induction of Contact Hypersensitivity. *Journal of Experimental Medicine*, 191 (6), 995-1004, doi: 10.1084/jem.191.6.995.

11 Seznam zkratek

DBPCFC	dvojitě slepý placebem kontrolovaný provokační test
ddNTP	dideoxyribonukleosidtrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvoušroubovice DNA
IgE	imunoglobulin třídy E
IL-4	interleukin-4
IL-13	interleukin-13
INF- α	interferon-alfa
INF- γ	interferon-gama
PCR	polymerázová řetězová reakce
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
ssDNA	jednořetězcová DNA
STAT	signal transducer and activator of transcription
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6
UTR	netranslatovaná oblast (untranslated region)
UV	ultrafialové