



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Sekvenování genu ALAS2

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ZDRAVOTNÍ
LABORANT**

Autor: Renata Holoubková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „**Sekvenování genu ALAS2**“ 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 jejich 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

.....
podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat touto cestou svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, poskytnutí cenných informací, literatury a konzultací při tvorbě mé práce. Dále bych chtěla poděkovat všem dobrovolníkům, kteří mi byli ochotni poskytnout vzorky pro tuto práci. Poděkování patří i Zdravotně sociální fakultě, kde jsem mohla vykonat praktickou část své práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za trpělivost a podporu.

Sekvenování genu *ALAS2*

Abstrakt

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala detekcí mutací v genu *ALAS2*. Výsledkem defektu recesivního genu vázaného na X je dědičná sideroblastická anémie. Tento gen vytváří enzym, který je nezbytný pro produkci hemu. Dalším onemocněním spojeným s výskytem mutací v tomto genu je erytroetická protoporfyrie, která je charakterizovaná abnormálně vysokou hladinou porfyrinů a jejich prekurzorů v důsledku nedostatku specifických enzymů nezbytných pro syntézu hemu (National Organization for Rare Disorders, 2021).

V teoretické části jsem se zabývala seznámením se s genetickými pojmy a samotným oborem genetika. Práce začíná od samotné buňky, po chromozomy, přes mutace. Dále jsem se zabývala přímo genem *ALAS2*. V následujících kapitolách jsem se zaměřila na hem, neboť gen *ALAS2* kóduje enzym, který je zodpovědný za produkci hemu. V neposlední řadě jsem popsala onemocnění erytroetickou protoporfyrii a sideroblastickou anémií, která vznikají právě kvůli mutacím v tomto genu.

V praktické části jsem se věnovala vyšetření genu *ALAS2* exonu 11. Vyšetřovala jsem 25 zanonymizovaných vzorků, ze kterých jsem izolovala DNA. Požadovaný úsek genu jsem poté metodou PCR naamplifkovala. Vzorky jsem připravila na metodu sekvenování, která proběhla u firmy GenSeq s.r.o.

V poslední části mé bakalářské práce jsem se zabývala jednak hodnocením sekvencí a zpracováním výsledků, ale také vyhodnocením sekvencí od dětí z Karvinska a Českobudějovicka, které jsem obdržela. Z celého vyšetřovaného souboru a souboru na zhodnocení nebyly nalezeny žádné mutace. Pro hodnocení z většího souboru dat byly přidány výsledky nalezených mutací z výzkumu.

Klíčová slova

ALAS2, Erytroetická protoporfyrie, Sideroblastická anémie, hem, izolace, PCR, Sangerovo sekvenování

***ALAS2* gene sequencing**

Abstract

In my bachelor thesis I dealt with the detection of mutations in the *ALAS2* gene. A defect in the X-linked recessive gene results in hereditary sideroblastic anemia. This gene produces an enzyme that is necessary for the production of heme. Another disease associated with mutations in this gene is erythropoietic protoporphyria, which is characterized by abnormally high levels of porphyrins and their precursors due to a lack of specific enzymes necessary for heme synthesis (National Organization for Rare Disorders, 2021).

In the theoretical part, I dealt with the introduction to genetic concepts and the field of genetics itself. The work begins from the cell itself, to the chromosomes, through mutations. I also dealt directly with the *ALAS2* gene. In the following chapters, I focused on heme, because the *ALAS2* gene encodes an enzyme that is responsible for heme production. Last but not least, I have described the disease erythropoietic protoporphyria and sideroblastic anemia, which arise precisely due to mutations in this gene.

In the practical part, I examined the *ALAS2* gene of exon 11. I examined 25 anonymized samples, from which I isolated DNA. I then amplified the desired section of the gene by PCR. I prepared the samples for the sequencing method, which took place at GenSeq s.r.o.

In the last part of my bachelor's thesis, I dealt with the evaluation of sequences and processing of results, but also with the evaluation of sequences from children from Karviná and České Budějovice, which I received. No mutations were found from the whole examined group and the group to be evaluated. For evaluation from a larger data set, the results of the mutations found in the research were added.

Key words

ALAS2, Erythropoietic protoporphyria, Sideroblastic anemia, heme, isolation, PCR, Sanger sequencing

Obsah

1	Úvod genetika.....	9
1.1	Historie.....	9
1.2	Chromozomy.....	10
1.2.1	Typy chromozomů	11
1.3	Obor genetika.....	13
1.4	Mutace.....	14
2	Gen ALAS2	16
2.1	Struktura.....	16
2.2	Funkce.....	17
2.3	Regulace.....	17
2.4	Nemoci	17
3	Hem.....	19
3.1	Struktura.....	19
3.2	Funkce.....	19
3.3	Patofyziologie hemu.....	19
3.4	Klinický význam.....	20
4	Erythropoetická Protoporfyrie.....	21
4.1	Onemocnění porfyrie	21
4.2	Erythropoetická protoporfyrie.....	21
4.2.1	Příčiny EPP	22
4.2.2	Příznaky	22
4.2.3	Diagnóza	23
4.2.4	Léčba.....	23
5	Sideroblastické anémie.....	24
5.1	Onemocnění sideroblastická anémie.....	24
5.1.1	Příčiny SA.....	25
5.1.2	Příznaky SA	25
5.1.3	Typy sideroblastických anémií.....	25
5.1.3.1	Dědičná sideroblastická anémie	25
5.1.3.2	Získaná sideroblastická anémie.....	26
5.1.3.3	Idiopatická sideroblastická anémie	26
5.1.4	Diagnóza SA	26
5.1.5	Léčba SA.....	26
6	Cíle práce.....	27
7	Metodika.....	28

7.1	Odběr vzorků.....	28
7.2	Izolace DNA	28
7.2.1.1	Reagencie	29
7.2.1.2	Pracovní pomůcky a spotřební materiál	29
7.2.2	Postup.....	29
7.3	Měření koncentrace.....	30
7.4	PCR.....	30
7.4.1.1	Reagencie	31
7.4.1.2	Pracovní pomůcky a přístroje.....	31
7.4.2	Navrhování primerů	31
7.4.3	Postup PCR	32
7.5	Gelová elektroforéza PCR produktů	33
7.5.1.1	Reagencie	33
7.5.1.2	Pracovní pomůcky a přístroje.....	33
7.5.2	Pracovní postup.....	33
7.6	Enzymatické přečištění PCR produktů	34
7.7	Příprava na sekvenaci.....	35
7.8	Sangerovo sekvenování.....	35
8	Výsledky	37
8.1	Izolace a měření koncentrace	37
8.2	PCR a elektroforéza	38
8.3	Hodnocení sekvencí	39
8.4	Hodnocení sekvencí od dětí z Karvinska a Českobudějovicka	45
9	Diskuse.....	49
10	Závěr	53
11	Seznam použitých zdrojů.....	54
12	Seznam tabulek, grafů a obrázků	61
13	Seznam použitých zkratk	63

Úvod

Poruchy či nemoci, které jsou spojené s chromozomem X jsou výsledkem mutovaných genů na X chromozomu. Muži mají pouze jeden chromozom X. Ženy mají dva chromozomy X. V případě X-vázané dominantní dědičnosti, mohou být zasaženy jak muži, tak i ženy. Stačilo by, aby došlo k poruše na jedné ze dvou kopií genu. U X-vázané recesivní mutace jsou postiženi častěji jen muži. Ženy jsou v tomto případě nositelky defektu, který bývá kompenzován druhým chromozomem. Aby u žen také došlo k projevu poruchy, musely by být zasaženy obě kopie genu (Trend, 2005).

Nejméně dvě mutace genu *ALAS2* byly nalezeny u lidí s formou porfyrie, jenž je označovaná jako X-vázaná dominantní erythropoetická protoporfyrie. Každá z těchto mutací blízko konce genu *ALAS2* odstraní malé množství genetického materiálu. Tyto změny zapříčiňují nadměrnou aktivaci enzymu ALA-syntázy, který zvyšuje produkci ALA v červených krvinkách. Jiné enzymy tento přebytek ALA převádí na sloučeniny zvané porfyriny. V genu *ALAS2* bylo dále identifikováno nejméně 50 mutací, které způsobují X-vázanou sideroblastickou anémii. Téměř všechny tyto mutace mění v erytroidní ALA-syntáze jednotlivé stavební kameny proteinu. Kvůli těmto změnám dochází ke zhoršení aktivity enzymu. To způsobuje narušení normální produkci hemu při vývoji červených krvinek (U. S. National Library of Medicine, 2020).

V teoretické části jsem se zabývala obecnými poznatky z oboru genetiky, na které navázal samotný gen *ALAS2*, který je úzce spjat s molekulou zvanou hem. Mutace v tomto genu zapříčiňují poruchy v syntéze hemu, které mohou vést k různým onemocněním. Následně jsem se zabývala erythropoetickou protoporfyrií a sideroblastickou anémií, které právě vznikají v důsledcích těchto poruch.

Cílem teoretické části mé bakalářské práce bylo seznámení s problematikou daného tématu a vypracovat odbornou rešerši. V praktické části bylo cílem osvojit si molekulárně biologické metody, kterými byly izolace, PCR, elektroforéza a příprava vzorků na metodu Sangerova sekvenování a následně zjištěná data analyzovat a vyhodnotit.

Pro tuto práci mi byly poskytnuty dále vyhotovené sekvence od dětí z Karvinska a Českobudějovicka, které jsem měla za úkol také zanalyzovat a vyhodnotit.

1 Úvod genetika

Než přejdu k samotnému vysvětlení a bližšímu seznámení s oborem genetika, pojmem geny a obdobně, nejprve bych začala svou práci od úplného začátku tohoto bádání, a to od samotné buňky.

1.1 Historie

Objev buňky je spojen s objevem mikroskopu, který vynalezl a sám složil Antony van Leeuwenhoek v roce 1671. Mikroskop byl ve své podstatě jen malou čočkou, která měla malou ohniskovou vzdálenost a také zvětšovala asi jen 270x. Avšak i přesto s tímto jednoduchým přístrojem pozoroval např. bakterie, prvoky, červené krvinky a další mikroskopické objevy (Kočárek, 2008).

O několik let dříve, než publikoval své první výsledky ze svých pozorování, objevil pojem buňka v odborné literatuře, který použil v roce 1665 anglický badatel Robert Hooke. Robert Hooke tehdy zkoumal pod mikroskopem korek, u kterého si povšiml, že je tvořený drobnými komůrkami, které označil pojmem buňky. Hooke ani nikdo jiný z tehdejších badatelů neuvažoval, že by komůrky mohly mít něco společného s krvinkami, spermii, nebo jinými buněčnými útvary (Kočárek, 2008).

Buněčná teorie bývá spojována se jménem Jana Evangelisty Purkyně, který v roce 1837 poprvé vyslovil myšlenku, která se týkala podobnosti ve stavbě živočichů a rostlin. Viděl mezi nimi určité rozdíly. Z tohoto důvodu za opravdové zakladatele buněčné teorie jsou považováni botanik Mathias Jacob Schleiden a zoolog Theodor Schwann, kteří zdůvodnili ve své knize podobnost ve struktuře a růstu živočichů a rostlin, a tím zdůvodnili jakousi představu o podobnosti rostlinného a živočišného těla (Parker, 2017).

Žádný z těchto uvedených badatelů však neobjasnil význam a funkci buněčného jádra (Kočárek, 2008).

Průběh buněčného dělení byl popsán německým průkopníkem cytologie Waltherem Flemmingem, který pod mikroskopem analyzoval struktury a procesy v buněčném jádře. Byl prvním člověkem, který provedl systematické studium chromozomů během dělení a nazval tento proces mitózou (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2019).

Tento objev objasnil spolu s Eduardem Adolfem Strasburgerem, který objasnil buněčné dělení a roli jádra a chromozomů v dědičnosti (Encyclopedia, 2019). Pojem mitóza je popsán jako proces, při kterém se jádro mateřské buňky na počátku tohoto děje rozpadá na jakési vláknité útvary, které se dále dělí a vytvářejí dvě dceřiná

jádra. Vlákňité útvary, které tvoří vnitřní obsah každého buněčného jádra, se nazývají chromozomy. Byly pojmenovány pro svou dobrou barvitelnost z řeckého *chroma* – barva a *soma* – tělo. Chromozomy jsou tvořeny jadernou hmotou, která se nazývá chromatin (Kočárek, 2008).

Genetik Thomas Hunt Morgan, z jehož vědeckých úspěchů je nejznámější jeho práce s ovocnou muškou *Drosophila melanogaster*. Kromě toho, že objevil dědičnost vázanou na pohlaví a také jeho předpovědi, že geny se vyskytují na chromozomech, dohlížel na objev křížení a genetické mapování a podílel se na něm (University of Kentucky, 2015).

1.2 Chromozomy

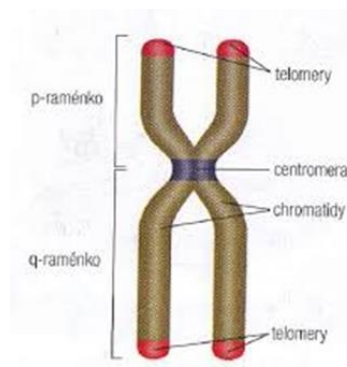
Chromozom je vláknitý útvar, který je rozdělen centromerou, která má význam při jaderném dělení (Kočárek, 2008).

Chromozomy jsou struktury, ve kterých je deoxyribonukleová kyselina neboli DNA pevně zabalena do jádra. DNA je stočena kolem proteinů, které se nazývají histony, a ty poskytují strukturální oporu. Chromozomy zajišťují to, aby se DNA během buněčného dělení správně replikovala (Healio All Rights Reserved, 2021).

DNA spolu s histony vytvářejí nukleohistonové vlákno (Otová, 2006).

Každý chromozom obsahuje centromeru, která rozděluje chromozom na dvě části – p (krátké) rameno a q (dlouhé) rameno. Centromera se nachází v zúženém bodě chromozomu, který však může být, ale nemusí být středem chromozomu. Na konci každého chromozomu je nukleotidová sekvence, která se nazývá telomera (Healio All Rights Reserved, 2021).

Každá chromatida obsahuje pouze jednu molekulu DNA (Ridley, 2001).



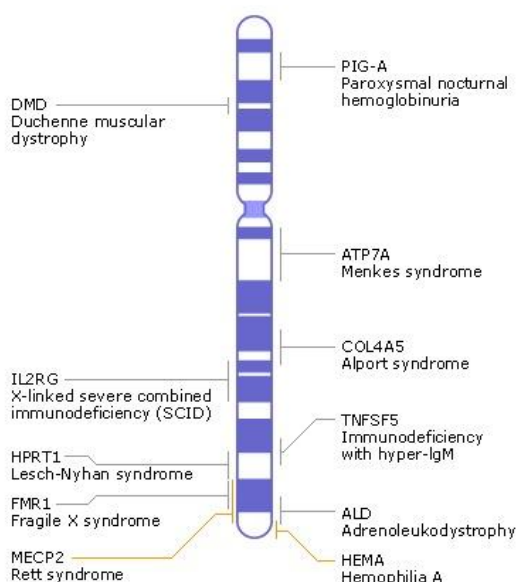
Obrázek 1: Stavba chromozomu.

Zdroj: Kočárek, 2008.

Chromozom může být složen z jedné nebo ze dvou chromatid. Obě chromatidy ve dvouchromatidovém chromozomu obsahují plně shodnou genetickou informaci (Otová, 2006).

Každý chromozom má viditelný pruhovaný vzor a každý tento pás je očíslován, aby pomohl určit konkrétní oblast na chromozomu. Tato metoda mapování genu na chromozomu se nazývá cytogenetické mapování (National Center for Biotechnology Information, 1998).

Například chromozom X obsahuje více než 1400 genů, více než 150 milionů párů bází, ze kterých bylo stanoveno přibližně 95 % (National Center for Biotechnology Information, 1998).



Obrázek 2: Stavba chromozomu X a nemoci s ním spojené.

Zdroj: National Center for Biotechnology Information, 1998

1.2.1 Typy chromozomů

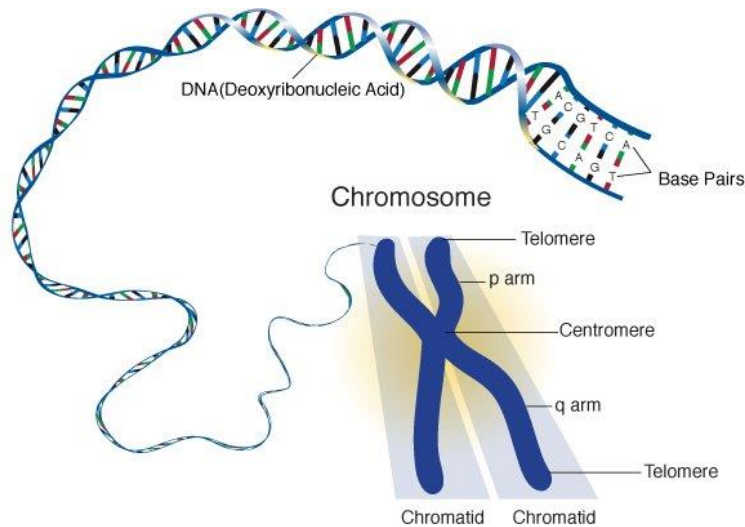
Jak již bylo, zmíněno chromozomy jsou rozděleny na dvě části. Na rameno *p* a na rameno *q* s úženým bodem zvaným centromera. Centromeru lze umístit do různých pozic a tvoří tak základ pro čtyři různé třídy chromozomů:

- Metacentrické, kdy se centromera nachází uprostřed, což znamená, že *p* a *q* ramena jsou stejně dlouhá
- Submetacentrické, zde se centromera nachází mimo střed, což vede ke kratšímu ramenu *p* ve srovnání s ramenem *q*
- Akrocentrické, kde je centromera silně odsazena od středu, což vede k mnohem kratšímu ramenu *p*

- d) Telocentrické, kdy centromera se nachází na konci chromozomu, což znamená, že *p* rameno neexistuje

(A Level Biology, 2015)

Na následujícím obrázku (viz. Obrázek 3) vidíme složení chromozomu již od samorných bází. Také jsou zde popsány části chromozomu.



Obrázek 3: Složení chromozomu a jeho části.

Zdroj: Národní institut pro výzkum lidského genomu, 2019

Na chromozomech jsou uspořádány geny. Geny jsou tedy vyrobeny z DNA a obsahují instrukce pro tvorbu bílkovin.

Lidé mají 46 chromozomů uspořádaných do 23 párů, z toho 22 párů chromozomů se nazývají autozomy. Které jsou značeny 1-22. Každý pár chromozomů se skládá z jednoho chromozomu zděděného od matky a jednoho od otce (Healio All Rights Reserved, 2021).

Výjimkou jsou pohlavní chromozomy neboli gonozomy, které se označují písmeny X a Y (Kočárek, 2008).

Podle velikosti a typických pruhů je tedy můžeme seřadit do souboru, který je nazýván karyotyp. Žena má dva pohlavní chromozomy X, muž má jeden pohlavní chromozom X a jeden pohlavní chromozom Y. Normální ženský karyotyp se tedy zapisuje 46, XX a normální mužský karyotyp 46, XY (Graham, 2003).

Dále bych zmínila pojem fenotyp, který označuje pozorovatelné fyzikální vlastnosti organismu. Mezi ně patří například vzhled, vývoj a chování organismu. Fenotyp je určen jeho genotypem. Což je tedy soubor genů, které organismus nese. Bývá ovlivňován také vlivy prostředí na tyto geny (Nature Education, 2014).

1.3 Obor genetika

Genetika je definována jako věda o dědičnosti a proměnlivosti živých organismů. Popisuje a vysvětluje pravidla, jimiž se řídí přenos dědičných znaků z rodičovské generace na potomstvo. Gen je základní informační jednotkou dědičnosti. Všechny geny podmiňují vytvoření určitého konkrétního znaku (Kočárek, 2008).

Gen je konkrétní úsek na molekule DNA, který nese informaci pro tvorbu bílkoviny nebo nukleové kyseliny. Geny jsou složeny z nukleových kyselin. Ty jsou tvořeny základními stavebními jednotkami, které se nazývají nukleotidy. Každý nukleotid obsahuje 3 základní složky: molekulu cukru, molekulu fosfátu a dusíkatou bázi. Rozlišujeme dva typy nukleových kyselin: RNA (ribonukleová kyselina) a DNA (deoxyribonukleová). V RNA je cukernou složkou ribóza, v DNA je cukernou složkou deoxyribóza (Snustad, Simmons, 2009).

DNA je polymer, což znamená, že dochází k opakování podobných chemických jednotek. Jednotky DNA se nazývají nukleotidy a v přírodě existují ve 4 formách: A, T, G a C. Sekvence nukleotidů ukládá informace v takzvané v genetickém kódu.

Jak uvádí společnost e-Zyvec (2021): "*tento kód definuje genetická slova, která se budou překládat v základních biologických funkcích, tato základní slova jsou známá jako geny*". Dohromady všechny geny vytváří genom (e-Zyvec, 2020).

Organismy se vyznačují nejen dědičností, ale i proměnlivostí neboli variabilitou, proto se také mnoho znaků objevuje v různých podobách. Proto například hrách vytváří červené či bílé květy, nebo octomilky mají červené oči nebo bílé. U lidí například rozeznáváme 4 různé krevní skupiny. Toto zapříčiňuje to, že gen se vyskytuje v různých konkrétních formách neboli alelách (Kočárek, 2008).

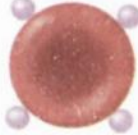
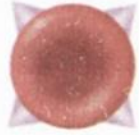
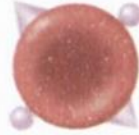

Geny podmiňují určité znaky, avšak alela obsahuje jakýsi návod k vytvoření určité konkrétní podoby znaku. Gen pro krevní skupiny ABO systému má 3 různé alely: pro skupinu A, pro skupinu B a pro skupinu 0 (Kočárek, 2008).

Alely se mohou i vzájemně kombinovat, protože chromozomy se zpravidla se vyskytují v párech. Krevní skupiny mají dominantní alely I^A a I^B , alela I^0 je recesivní. Je tedy možné, že na jednom z homologických chromozomů bude alela pro skupinu B a na druhém pro skupinu A. Výsledná krevní skupina bude tedy v tomto případě AB. Jedinec, který má rodiče skupiny A, kteří mají druhou alelu recesivní, však může zdědit tyto alely I^0 a tím získat skupinu nula. (Fiala, 2006).

Alely se tak mohou společně podílet na vytvoření konkrétní podoby příslušného znaku (Kočárek, 2008).

Každý jedinec může mít různý genotyp. Rozlišujeme dva typy genotypů podle alel na homozygoty a heterozygoty. Homozygoti mohou mít obě alely dominantní nebo recesivní. Heterozygoti mají jednu alelu dominantní a jednu recesivní. Toto hraje veliký význam při křížení ať už rostlin, živočichů, ale i lidí (Kočárek, 2008).

Na následujícím obrázku (viz. Obrázek 4) můžeme vidět alely pro krevní skupiny ABO systému a jejich výsledný fenotyp po zkřížení alel od otce a od matky.

Skupina A $I^A I^A$ $I^A i^0$	Skupina B $I^B I^B$ $I^B i^0$	Skupina AB $I^A I^B$	Skupina 0 $i^0 i^0$
antigen A 	antigen B 	antigen A  antigen B	

Obrázek 4: Vztah mezi genotypem a fenotypem u krevních skupin.

Zdroj: Kočárek, 2008

1.4 Mutace

Mutace jsou změny v genetické sekvenci a zapříčiňují hlavní rozmanitost mezi organismy. Tyto změny probíhají na mnoha různých úrovních a mohou mít velice odlišné důsledky (Loewe, 2008).

Mutace je změna v sekvenci DNA. Při kopírování DNA může docházet k chybám a mutace mohou být následkem těchto chyb, ke kterým došlo během dělení buněk, nebo při vystavení či kontaktu s ionizujícím zářením, s chemickými látkami zvanými mutageny nebo při infekci virem. Mutace zárodečné linie neboli dědičné mutace se vyskytují ve vajíčkách a spermiích, které mohou být přeneseny na potomky. Somatické mutace se vyskytují v buňkách těla a nejsou přenášeny na potomky (Collins, 2019)

Genové mutace lze klasifikovat tedy dvěma hlavními způsoby:

Dědičné mutace se dědí od rodičů na potomstvo a jsou přítomny prakticky ve všech buňkách těla, a to po celý život člověka. Tyto mutace se také nazývají zárodečné mutace, protože jsou přítomny v mateřských vajíčkách nebo spermatických buňkách. Poté, co se vajíčko a spermie spojí, výsledné oplodněné vajíčko obdrží DNA od obou rodičů. Pokud

má tato DNA mutaci, dítě bude mít mutaci v každé ze svých buněk (U. S. National Library of Medicine, 2020).

Získané neboli somatické mutace se vyskytují mnohdy během života člověka a jsou přítomny pouze v určitých buňkách v těle, nikoli v každé buňce v těle. Tyto změny mohou být zapříčiněny faktory vnějšího prostředí, jako je ultrafialové záření, nebo mohou nastat, pokud dojde k chybě v kopírování neboli replikaci DNA buněčného dělení. Získané mutace v somatických buňkách, což jsou buňky jiné než spermie a vajíčka, není možné předat další generaci (U. S. National Library of Medicine, 2020).

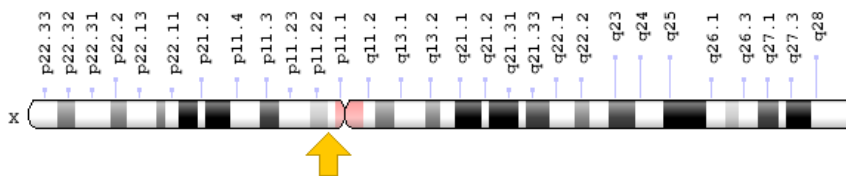
Rozlišujeme mutace recesivní a dominantní. Aktivita postiženého genu je potlačena recesivní mutací a vede ke ztrátě funkce genu. Tento typ mutace může vést k odstranění části genu, může narušit jeho expresi, změnit strukturu proteinu, který tento gen kóduje, a tím změnit jeho funkci nebo odstranit celý gen. Naopak je tomu u dominantní mutace, ve které dochází často k získání funkce. Tato mutace naopak může zvyšovat aktivitu určitého genového produktu nebo může vést k jeho nevhodné prostorové expresi (Lodish, Berk, Zipursky, et al. 2000).

2 Gen ALAS2

Gen *ALAS2* (DELTA-AMINOLEVULINATE SYNTHASE 2), synonyma *ALAS-E*, *ALASE*, *ANHI*, *ASB*, *SIDBA1*, *XLDPP*, *XLEPP*, *XLSA*, je lokalizován na chromozomu X v oblasti Xp11.21 (viz Obrázek 5), (*ALAS2*, 1966-2020).

Je dlouhý přibližně 35 tisíc párů bází a obsahuje 11 exonů (Surinya et al. 1998). Enzym, který je kódovaný genem *ALAS2* katalyzuje biosyntézu hemu (Astner et al., 2005).

V genu je popsáno poměrně velké množství škodlivých mutací, které mohou být zodpovědné za sideroblastickou anémii (Cotter et al., 1992) a erythropoetickou protoporfyrii (Whatley et al., 2008)



Obrázek 5: Lokace genu *ALAS2* na chromozomu X.

Zdroj: Molekulce, dostupné z: <https://molekulce.com/alas2-geni-nedir/>

2.1 Struktura

Existují dvě izoformy *ALAS*, které jsou kódovány dvěma různými geny u živočichů. První varianta enzymu je kódovaná provozním (housekeeping) genem *ALAS1* (5'-Aminolevulinate Synthase 1) na chromozomu 3p21 (Bishop et al., 1990). Byla to první celá nukleotidová sekvence genu *ALAS* a byla získána použitím jater kuřecího embrya. Druhou variantou je erytroidní tkáňově specifická forma, která je kódována genem *ALAS2* (Riddle, 1989; Bishop, 1990; Borthwick, 1985).

Struktura lidského genu vykazuje velkou podobnost s genem *ALAS2* u myši. Myší gen *ALAS2* se skládá z 11 exonů a 10 intronů o délce přibližně 24 kB. Podobně jako myší *ALAS2* se i lidský gen *ALAS2* skládá z 10 exonů kódujících proteiny a 5'-nepřekládaného exonu (Schoenhaut, 1989; Conboy, 1992; Cox, 1991).

2.2 Funkce

Enzym kódovaný genem *ALAS* katalyzuje první krok biosyntézy hemu, kterým je syntéza kyseliny 5- aminolevulinové. Je to první společný prekurzor všech tetrapyrrolů pro kondenzaci glycinu a sukcinyl-koenzymu A (sCoA), (Astner et al., 2005).

2.3 Regulace

Transkripce lidského genu *ALAS2* je regulována specifickými pro erytroid transkripčními faktory, které působí na promotorových a intronových místech. Po zjištění struktury myšního genu *ALAS2* v roce 1998 bylo zahájeno vyšetření významu intronů 1, 3 a 8 analýzou účinků jejich delecí. Bylo prokázáno, že intron 8 poskytuje nejsilnější stimulaci aktivity promotoru v buňkách lidské myelogenní leukémie (K562) a myši erytroleukémie (MEL), a introny 1 a 3 mají inhibiční aktivitu. Konkrétně byla, jako oblast udělující zesilovací aktivitu, identifikována oblast 239 bp umístěná v intronu 8, která je vysoce konzervovaná v lidských, myších a psích *ALAS2* genech (Surinya, 1998).

Velkou roli v transkripční regulaci myšního *ALAS2* hraje transkripční faktor GATA-1. Studia ukázali, že prvních 700 bp myšního *ALAS2* promotoru jsou nezbytné pro maximální expresi v buňkách MEL a buňkách K562. Kromě toho, v segmentu předcházející genu jsou během prvních 300 bp dvě kritická vazebná místa pro GATA1. Interakce GATA-1 se dvěma vazebnými místy GATA-1 v proximálním promotoru *ALAS2*, je také zásadní pro specifitu erytroidních buněk (Kramer, 2000; Vlaski, 2009).

Dalšími faktory, které se podílí na regulaci *ALAS2*, jsou hypoxie a hladiny kyslíku v krvi. Hypoxie nepřímo ovlivňuje produkci hemu indukci erytropoézy prostřednictvím erythropoetinu a transferinu. Faktor 1 indukovaný hypoxií (HIF-1) se podílí na transkripční regulaci erythropoetinu (EPO), transferinu a receptoru transferinu, a vede tak ke zvýšení erytropoézy a přísunu hematopoetického železa (Hofer, 2003; Vlaski, 2009).

Bylo také prokázáno, že butyrát sodný (NaBu) přímo reguluje transkripci *ALAS2*. Účinek NaBu byl prokázán nejen na transkripční aktivaci *ALAS2* v buňkách K562, ale také v nehematopoetických buněčných liniích lidské embryonální ledvinové epiteliální buňky a plicní adenokarcinomové buňky (Han, 2008).

2.4 Nemoci

Ačkoli nejsou známa žádná genetická onemocnění spojená s mutací genu kódujícího *ALAS1*, existují však dva chorobné stavy spojené s mutacemi genu kódujícího *ALAS2*. Nejčastější je dědičná sideroblastická anémie (SA) a erytropoetická protoporfyrie (EPP).

Objev mutací *ALAS2* vedoucích k porfyrii prokázal asociaci každého z osmi enzymů biosyntézy hemu s jedinečnou porfyrií:

Tabulka 1: druhy porfyrií v závislosti na mutacích v různých krocích biosyntézy hemu

Gene	Porphyria
ALAS2	X-linked erythropoietic protoporphyria (XLEPP)
ALAD	ALA dehydratase deficient porphyria (ALAD-P)
HMBS	Acute intermittent porphyria (AIP)
UROS	Congenital erythropoetic porphyria (CEP)
UROD	Porphyria cutanea tarda (PCT)
CPOX	Hereditary coproporphyria (HCP)
PPOX	Variegate porphyria (VP)
FECH	Erythropoietic protoporphyria (EPP)

Zdroj: vlastní

Bylo prokázáno, že X-vázaná sideroblastická anémie může být způsobena mutacemi v genu erytroidně specifické 5 -aminolevulinové kyseliny. Postižení muži mají obvykle v prvních dvaceti letech života příznaky anémie a ve středním věku projevy sekundárního přetížení železem. Fenotypová exprese SA se u mužů značně liší a částečně souvisí s typem mutace *ALAS2*, přičemž dosud bylo popsáno více než 25 mutací (Cazzola, 2002).

EPP se na rozdíl od SA vyznačuje zvýšením funkce enzymu *ALAS2*. Všechny mutace, které byly charakterizovány u pacientů s EPP, se nacházejí na C-konci proteinu *ALAS2*, který je u savců vysoce konzervativní, což znamená, že C-terminální oblast *ALAS* hraje zásadní roli v jeho regulaci, aktivitě a stabilitě. Mutace EPP v *ALAS2* produkovaly enzymové varianty se zvýšenou katalytickou účinností a afinitou substrátu aktivnější než *ALAS2* u zdravých jedinců (Watley, 2008; Ducamp, 2013)

3 Hem

3.1 Struktura

Tato organická molekula má červené zbarvení a tvar prstence (Kodíček, 2004). V jejímž středu je pevně koordinačně-kovalentními vazbami vázán ion železa. Hem je složen ze 4 pyrrolů, což jsou malé molekuly, které mají tvar pětiúhelníku a jsou složené ze 4 atomů uhlíku a 1 dusíku. Čtyři pyrroly dohromady vytváří tetrapyrrol. Pokud má tetrapyrrol substituce na postranních řetězcích, které mu umožňují držet iont kovu, nazývá se porfyrin. Hem je tedy porfyrin obsahující železo. Existuje v mnoha různých formách, které odpovídají mnoha funkcím, kterým musí v organismu sloužit. Specifické proteiny používají k připojení různé postranní řetězce. Tím mění vlastnosti hemu. Základní struktura je vždy stejná (BD Editors, 2018).

V hemoglobinu a myoglobinu se hem tedy vyskytuje ve formě Fe^{2+} a může na sebe vratně vázat molekulu kyslíku O_2 . V cytochromech se vyskytuje převážně v trojmočné podobě (Fe^{3+}) a je schopen přenášet elektrony tím, že se střídavě redukuje na formu Fe^{2+} a poté opět oxiduje zpět na Fe^{3+} (Kodíček, 2004).

3.2 Funkce

Hem má zásadní význam pro základní metabolické procesy, jako je například přenos elektronů během dýchání, fotosyntézy a enzymové katalýzy. V této souvislosti plní tedy hem velmi rozmanité biologické funkce. Slouží tedy jako protetická skupina pro mnoho enzymů, transportérů a receptorů ve většině živých organismů (Layer et., 2010).

Může vázat plyny, jako je kyslík, a transportovat je v celém organismu. Speciální proteiny pak hem nutí, aby ve vhodný čas kyslík uvolnily. Příkladem proteinu tohoto typu je hemoglobin. Hemoglobin se nachází ve všech krevních buňkách, je připojený k buněčné membráně a vystavuje tak hemovou skupinu krevní plazmě (BD Editors, 2018).

3.3 Patofyziologie hemu

Hem je vytvářen ve většině tkání těla, ale nejvíce v erytroidních buňkách a hepatocytech. Na syntéze hemu se celkem podílí osm enzymů, přičemž polovina těchto enzymů se nachází v mitochondriích a cytosolu. Tento proces probíhá v mitochondriích v několika krocích. Enzym kyseliny aminolevulové (ALA) syntáza katalyzuje první krok, ve kterém dochází napojení glycinu na sukcinyl-CoA za vzniku ALA a CO_2 v mitochondriální matrix (Greenwood, 2021).

Mutace či porucha syntázy 2'-aminolevulinové kyseliny 2 (ALAS2) přispívá k onemocnění zvané X-vázaná sideroblastická anémie, která snižuje produkci protoporfyrinu a snižuje též produkci hemu. Avšak železo i přesto vstupuje do erytroblastu, což vede k hromadění železa v mitochondriích, a tím k projevu onemocnění (Ogun et al., 2021).

3.4 Klinický význam

Při syntéze hemu je zapotřebí řada kroků, substrátů a enzymů. V případě nedostatku enzymu nebo substrátu dochází k hromadění těchto meziproduktů v krvi, moči, tkáních a tím i k významným poruchám nazývaných porfyrie (Joy et al., 2020).

Mezi příznaky porfyrie patří dýchací potíže a neurologická dysfunkce. Avšak záleží na meziproduktu, který se hromadí v těle. Například nedostatek enzymu ferrochelátázy vede k nahromadění protoporfyrinu IX v erythrocytech. Toto způsobuje extrémní fotocitlivost, pokožka, jež je vystavená na slunci, bývá podrážděná a oteklá (Greenwood, 2021).

4 Erytropoetická Protoporfyrie

4.1 Onemocnění porfyrie

Porfyrie je skupina poruch, které jsou způsobeny abnormalitami v chemických krocích, které vedou k produkci hemu. Hem je životně důležitá molekula pro všechny orgány v těle, avšak nejhojnější je v krvi, kostní dřeni a játrech. Je také složkou mnoha proteinů obsahujících železo nazývaných hemoproteiny, včetně hemoglobinu. (U. S. National Library of Medicine, 2020).

Tyto poruchy jsou výsledkem hromadění přírodních chemikálií, které produkují porfyrin v těle. Jak už bylo již výše uvedeno, porfyriny jsou nezbytné pro funkci hemoglobinu. Jedná se o protein v červených krvinkách, který se váže na porfyrin, váže železo a přenáší kyslík do orgánů a tkání v těle (Mayo Foundation for Medical Education and Research, 1998-2021).

Pokud se tyto chemikálie hromadí v těle, způsobují onemocnění. V závislosti na typu porfyrie se mohou v játrech nebo v kostní dřeni hromadit porfyriny nebo jeho prekurzory. Poruchy postihují hlavně kůži nebo nervový systém. Tyto poruchy jsou často dědičné, což tedy znamená, že jsou způsobeny genovými mutacemi a jsou přenášeny z rodičů na potomky (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 2020).

Pojmy porfyrin a porfyrie jsou odvozené z řeckého slova *porphyrus*, který znamená fialová. Díky přítomnosti přebytečných porfyrinů a příbuzných látek může moč u některých pacientů mít červenofialovou barvu, a po vystavení moče na světlu může tato barva ztmavnout (American Porphyria Foundation, 2020).

4.2 Erytropoetická protoporfyrie

Jedná se o vzácnou dědičnou metabolickou poruchu, která je způsobená nedostatkem enzymu ferochelatázy (FECH). Tento nedostatek je důsledkem mutací v genu *FECH*. Někteří pacienti s příznaky erytropoetické protoporfyrie (EPP) mají genetickou změnu či mutaci v jiném genu zvaném *ALAS2*. Kvůli abnormálně nízkým hladinám enzymu FECH se nadměrné množství protoporfyrinu hromadí v kostní dřeni, krevní plazmě a červených krvinkách (National Organization for Rare Disorder, Balwani, 2016).

Pacienti s EPP mohou pociťovat silné bolesti, když jsou vystaveny slunečnímu záření či vystaveni intenzivnímu umělému osvětlení. Tyto příznaky přetrvávají po celý život pacienta a zpravidla začínají v dětství. EPP se řadí mezi 3. nejčastější typ porfyrie a odhaduje se na asi 1 z asi 74 300 jedinců (Norman, 2020).

4.2.1 Příčiny EPP

Při nedostatku enzymu FECH, tělo není schopné přeměnit sloučeninu protoporfyrin na hem, který umožňuje v krvi přenášet kyslík. Proto se protoporfyrin hromadí v krevních cévách pod kůží (Bell, 2020).

Když krev prochází kůží, protoporfyrin může absorbovat energii ze slunečního záření. Tímto se spustí chemická reakce. Tato reakce může i mírně poškodit okolní tkáň. Tento proces je nervovými zakončeními interpretován jako svědění či jako pálivá bolest (European Porphyria Network, 2016).

4.2.2 Příznaky

Projevy erythropoetické protoporfyrie se objevují již v raném dětství (American Porphyria Foundation, 2020).

I po krátké expozici na slunečním záření může způsobit silnou bolest, pálení, zarudnutí a otoky exponované kůže (Bonkovsky, Rudnick 2020).

Další příznaky mohou být například citlivost na některé umělé zdroje světla, svědění, brnění a přetrvávající záněty kůže (Bell, 2020).

Pokud jedinec je vystaven záření, a projeví se u něj tyto příznaky, také se to někdy označuje jako sluneční kopřivka (Bissonnette et al., 2006).

Příznaky se obvykle objevují po vystavení pokožky přímému slunečnímu záření během několika minut. Tyto příznaky často mohou trvat řádově hodiny až dny, než úplně vymizí. Světlo však nemusí být přímé, jedinec s EPP může reagovat i na odražené světlo od vody, sněhu a skrz okna, včetně čelních skel automobilů (European Porphyria Network, 2021).

Mezi charakteristické chronické změny patří zhrubění kůže, kožovité puchýře (viz. Obrázek. 6), labiální rýhy a změny nehtů (Goldman, Schafer, 2012).

U EPP se mohou objevit i další onemocnění jako například onemocnění jater, žlučové kameny a anémie (Bell, 2020).

4.2.3 *Diagnóza*

Při diagnóze EPP se prokazují zvýšené hladiny protoporfyrinu ve stolici a červených krvinkách. Zvýšené hladiny jsou patrné u protoporfyrinu erytrocytů, plazmatického protoporfyrinu a protoporfyrinu ve stolici. Hladina porfyrinu v moči je obvykle normální, protože protoporfyrin se nevylučuje močí (Thapar, Bonkovsky, 2008).

U pacientů, kteří uvažují o plánování rodiny je doporučeno genetické testování, které může odhalit specifické mutace v genu *FECH* nebo *ALAS 2* (Bonkovsky, 2020).

4.2.4 *Léčba*

Na EPP neexistuje definitivní léčba, aby se snížily hladiny cirkulujícího porfyrinu. Pacienti by se však měli vyhýbat slunečnímu záření nebo fluorescenčnímu světlu. Při pobývání venku musí pacienti nosit ochranný oděv, pokrývky hlavy a pobývat spíše ve stinných oblastech. Dále je důležité užívání širokospektrálního opalovacího krému. Auta i okna domu by měla být vybavena ochranným sklem. (Ahmed, Masood, 2020).

Existuje však lék na předpis, který obsahuje účinnou látku afamelanotid. Tato látka se používá ke zvýšení tolerance ke slunci a světlu u dospělých s potvrzenou diagnózou EPP (American Porphyria Foundation 2020).



Obrázek 6: Fotocitlivá reakce běžně pozorovaná u lidí s EPP.

Zdroj: Lecha, 2009

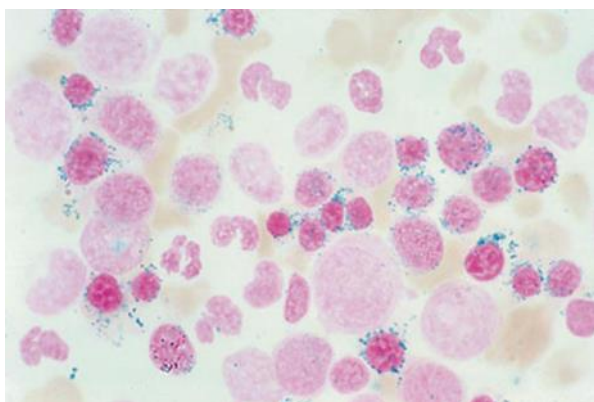
5 Sideroblastické anémie

5.1 Onemocnění sideroblastická anémie

Sideroblastické anémie též označovány SA patří do skupiny dědičných a získaných poruch kostní dřeně, které se projevují charakteristickým ukládáním železa v mitochondriích prekursorových červených krvinek zvaných erytroblasty (Mohan, 2021).

Erytroblast neboli nukleová buňka je předchůdce červené krvinky, která vzniká v kostní dřeni a neobsahuje žádný hemoglobin. Během erytropoézy dochází k proliferaci v důsledku několika po sobě jdoucích buněčných dělení. Během zrání se v buňce objevuje hemoglobin a jádro se zmenšuje. V průběhu několika dnů buňka ztrácí jádro a vstupuje do krevního řečiště (Encyclopædia Britannica, 2021).

Sideroblastická anémie způsobuje, že železo, které je uvnitř červených krvinek se účinně nevyužívá k produkování hemoglobinu, který pomáhá červeným krvinkám roznášet kyslík po celém těle. Následkem toho se železo může hromadit v červených krvinkách a kolem jádra buňky vytvářet prstencový vzhled, z tohoto důvodu sideroblast (Viz. Obrázek. 7), (Roland, 2020).



Obrázek 7: Nátěr kostní dřeně s prstencovitými sideroblasty.

Zdroj: Tefferi, 2004

Nedostatek železa v krevních buňkách nutí kostní dřeň právě k produkci těchto abnormálních červených krvinek, které obsahují příliš mnoho železa, tudíž nemohou správně a účinně vytvářet hemoglobin (WebMD Medical Reference, 2017).

5.1.1 Příčiny SA

Sideroblastická anémie X-vázaná je způsobená mutacemi v genu *ALAS2*. Tento gen poskytuje návod pro výrobu enzymu nazývaného ALA-syntáza, který má zásadní funkci v produkci hemu v kostní dřeni (U. S. National Library of Medicine, 2020).

První krok v syntéze hemu je napojení glycinu se sukcinyl-koenzymem A, přičemž v mitochondriích vzniká kyselina aminolevulinová (ALA). Ta je syntetizována enzymem ALA-syntáza. Následně je ALA transportována do cytosolu. Defekt v enzymu *ALAS2* vede k neschopnosti tvořit ALA, který katalyzuje reakci, a tímto vede k deficitu hemu a sideroblastické anémii (Ashorobi, 2020).

Nezbytným kofaktorem pro enzym produkovaný *ALAS2* je vitamín B (pyridoxin), takže pacienti mohou na doplnění tohoto vitamínu reagovat (Braunstein, 2020).

5.1.2 Příznaky SA

Jelikož při SA se neprodukuje hemoglobin, který zajišťuje dodání kyslíku po celém těle, lidé se nemusí energeticky cítit tak jak by měli. Například může docházet k pocitu únavy, ke špatnému usínání a také k motání hlavy. Příznaky SA jsou obdobné jako u jiných typů anemií. Lidé jsou unavení, podráždění, dochází k obtížnému dýchání. Mezi další příznaky patří například bušení srdce, bolesti hlavy, bolesti na hrudi, slabost a únava, rychlá srdeční frekvence nebo tachykardie a bledá barva kůže (WebMD Medical Reference, 2017).

Při nedostatku kyslíku orgány jako mozek, plíce nebo játra mohou začít méně efektivně pracovat, což má za následek různé příznaky, ale i potencionálně dlouhodobé zdravotní problémy (Ronald, 2020).

Také může docházet i k zvětšení sleziny a jater. V závažných případech může zvýšená hladina železa v krvi způsobovat srdeční onemocnění, poškození jater a může docházet až k selhání ledvin (National Organization for Rare Disorders, 2021).

5.1.3 Typy sideroblastických anemií

Sideroblastické anémie se dělí do tří skupin: na dědičnou též genetickou SA, získanou SA a idiopatickou SA (Roland, 2020).

5.1.3.1 Dědičná sideroblastická anémie

Mezi nejčastější zděděné sideroblastické anémie patří již zmiňovaná sideroblastická anémie vázaná na X, jež je způsobená mutacemi genu *ALAS2*, který je erytroidně specifický pro syntézu delta-aminolevulinové kyseliny (Knott, 2016).

Zmíněný pojem X vázaný nám napovídá, že je tedy lokalizován na chromozomu X, což znamená, že tato nemoc se projeví pouze u mužů (National Organization for Rare Disorders, 2021).

Při zděděné SA se snaží naše tělo kompenzovat nedostatku hemoglobinu zvýšenou absorpcí železa z potravy. V nejtěžších případech může zděděná SA způsobovat poškození orgánů zejména jater (WebMD Medical Reference, 2017).

5.1.3.2 Získaná sideroblastická anémie

Tento typ anémie je mnohem častější než dědičné formy anémie. Vada se někdy objevuje v souvislosti s myelodysplastickým syndromem. Jiné případy získaných sideroblastických anémií mohou vznikat po expozici toxiny nebo kvůli nedostatkům nutričních faktorů. Dědičné SA se často projevují již v dětství. Naproti tomu získané formy, zejména formy, které jsou spojené s myelodysplasií, se zpravidla vyskytují u starších dospělých (Alcindor, Bridges, 2001).

5.1.3.3 Idiopatická sideroblastická anémie

Jak už nám napovídá název, tento typ anémie nelze určit. Někteří lidé mají příznaky sideroblastické anémie, ale nelze u nich prokázat genetická ani získaná příčina (Roland, 2020).

5.1.4 Diagnóza SA

Sideroblastickou anémií můžeme diagnostikovat pomocí kompletního krevního obrazu. Kdy uděláme krevní nátěr a sledujeme počet retikulocytů. Dále studií železa, kdy sledujeme hladinu sérového železa, sérového ferritinu a saturaci transferinu. Další vyšetření může být vyšetření kostní dřeně a genetické testování pro zjištění původu anémie, jestli se jedná o genetickou či získanou anémií (Braunstein, 2020).

5.1.5 Léčba SA

Podávání pyridoxinu a folátu je základem pro léčbu sideroblastické anémie. Prvotní dávka pyridoxinu je 100-300 mg/den, která je později snížena a udržována při 100 mg/den.

Další metodou léčby je flebotomie, kdy dochází odstranění nadbytku železa, a tím k prevenci před poškozením orgánů, které je primární příčinou morbidit. Ale také může zvýšit citlivost na pyridoxin (Fernandes, 2008).

6 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo:

- ✓ Seznámení se s odbornou literaturou na téma gen *ALAS2* včetně s nemocemi způsobené mutací tohoto genu a vypracování rešerše
- ✓ Osvojení molekulárně biologických metod: izolace DNA, PCR, elektroforéza a přípravy vzorků na metodu Sangerova sekvenování
- ✓ Analyzovat sekvence a hodnotit získaná data s databází

7 Metodika

Praktická část bakalářské práce byla vykonána v laboratoři Zdravotně sociální fakulty Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích pod vedením Ing. Tomáše Nixe Ph.D. Bylo analyzováno 25 vzorků, které byly následně zanonymizovány. Vzorky byly získány bukalním stěrem. Nejprve byla ze vzorků vyizolována DNA, následně změřena její koncentraci. Poté byl pomocí metody PCR namnožen daný úsek genu a následně zkontrolována jeho přítomnost a správné provedení amplifikace prostřednictvím elektroforézy. Poté byl získaný vzorek pročištěn, připraven a odeslán k sekvenaci.

7.1 Odběr vzorků

Před zahájením samotné praktické části byly od vybraných jedinců odebrány vzorky DNA, které byly následně zanonymizovány. Všichni jedinci byli před odběrem informováni o pravidlech správného odběru. Vzorky byly získány výtěrem z bukalní sliznice pomocí sterilního výtěrového tamponu (Plain Swab Sterile Plastic Applicator Rayon Tipped, COPAN). Výtěr byl proveden po dobu jedné minuty z jedné strany úst a následně dalším výtěrovým tamponem na straně druhé. Během výtěru bylo tamponem opatrně otáčeno, aby bylo využito co nejvíce plochy tamponu pro získání co nejvíce kvalitního vzorku. Poté byl tampon vložen do zkumavky a označen.

7.2 Izolace DNA

Metoda izolace DNA souží k očištění DNA pomocí fyzikálních anebo chemických metod. Ve vzorku se DNA oddělí od buněčných membrán, proteinů a dalších buněčných složek. Použití této metody by mělo vést k efektivnímu vyizolování čisté a kvalitní DNA, která neobsahuje kontaminující látky, jako je RNA a proteiny. K izolaci se používají manuální metody i komerčně dostupné soupravy. Pro tuto metodu lze použít různé tkáně včetně krve a tělních tekutin. Tato metoda zahrnuje lýzu buněk a solubilizaci DNA, po které následují enzymatické nebo chemické metody, které vedou k odstranění makromolekul, RNA, lipidů, nebo proteinů (Gupta, 2019).

K izolaci byl použit komerčně dodávaný kit od firmy Generi Biotech dodávaný pod názvem „Kit for isolation of DNA from body fluids“. Tento kit je založený na principu speciálních mikrokolon. Využívá schopnosti DNA vázat se v přítomnosti chaotropních solí na silikátový povrch.

V prvních krocích probíhá lýza buněk a uvolnění DNA, která je pak vysrážena ethanolem. Vzniklá směs – buněčný lyzát se přenesse na kolonku se silikátovou

membránou, která slouží jako jakýsi „cedník“, kde se zachytí DNA (naváže se na silikagel). Ostatní složky, které nejsou kolonkou zadrženy, po odstředění protečou.

Pak následuje promývání zachycené DNA speciálními roztoky, které vždy obsahují ethanol a chaotropní soli. Tím se odstraní zbytky nežádoucích látek. Na silikátové kolence pak zůstává pouze čistá, vysrážená DNA, kterou uvolníme rozpuštěním ve vodě nebo ve speciálním elučním pufu.

Množství a kvalita získané DNA závisí zejména na použitém typu a množství primárního vzorku. Ze stěru bukalní sliznice jsme většinou schopni získat cca 500 ng lehce fragmentované DNA průměrné čistoty.

7.2.1.1 Reagencie

- PBS
- Buffer BL1
- Proteinkináza K
- Ethanol 96%
- Wash Buffer BL2
- Wash Buffer BL3
- Buffer BL4 (eluční)

7.2.1.2 Pracovní pomůcky a spotřební materiál

- Pipety, špičky
- Mikrozkuhavky (Ependorf)
- Vortex
- Centrifuga
- Tepelná vodní lázeň

7.2.2 Postup

Nejprve byla vodní lázeň vyhřáta na 70°C, do které byl vložen eluční pufr BL4. Následně byly výtěrové tampony sterilně odstříhány a vloženy do mikrozkuhovek o objemu 1,5 ml a řádně označeny, aby nedošlo k neúmyslné záměně vzorků.

Do těchto zkuhovek bylo napipetováno 200 µl PBS, 200 µl lyzačního pufu BL1 (lysis buffer), 20 µl proteinázy K a obsah byl řádně zvortexován a stočen. Následně byly vzorky vloženy do vodní lázně vyhřáté na 70 °C a ponechané 15 minut inkubovat. Během inkubace byly pro každý vzorek připraveny dvě sběrné mikrozkuhavky a jedna kolonka.

Kolonky byly popsány čísly podle daných vzorků a dále byl nalepen štítek na mikrozkušavku pro konečný izolát. Po inkubaci byly vzorky krátce zvortexovány a stočeny. Následně bylo do vzorku napipetováno 210 μ l 96 % ethanolu a opět byl vzorek krátce zvortexován a stočen.

Dále byl lyzát přepipetován do předem připravených kolonek a až následně byl tampon odstraněn, aby došlo k získání co nejvíce materiálu. Vzorky byly dále nechané zcentrifugovat na 90 s při 13.400 otáčkách na jednu minutu. Poté byl získaný filtrát i se zkumavkou vyhozen a kolonky byly vloženy do nových sběrných zkumavek. Následně bylo přidáno 500 μ l pufru BL2 a opět byl vzorek stočen po dobu 90 s. Získaný filtrát byl opět vylit a kolonka byla vrácena zpět. Dále bylo přidáno 600 μ l promývacího pufru BL3 a vzorek nechtán zcentrifugovat po dobu 90 sekund. Poté byl opět filtrát vylit a nechtán znovu stočit. DNA zůstala navázána na silikagel v kolonce, proto byla následně sběrná zkumavka i s filtrátem vyhozena.

Kolonka byla opatrně přendána do předem připravené a označené zkumavky pro konečnou DNA. Do středu kolonky bylo napipetováno 25 μ l předem předeštěného elučního pufru BL4 a ponecháno inkubovat při pokojové teplotě 5 minut. Následně byly vzorky opět stočeny po dobu 90 sekund. Tento krok byl proveden dvakrát. Ve zkumavce byla získaná čistá DNA, která již z kolonky protékla a kolonka byla následně vyhozená.

7.3 Měření koncentrace

Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru Colibri Microvolume Spectrometer (Berthold Detection Systems GmbH). Do kapiláry na přístroji byla nejprve nakapána destilovaná voda, aby nedošlo k případné kontaminaci nečistotami. Do přístroje byl nakapán 1 μ l vyizolované DNA. Měření proběhlo proti pufru BL4, neboť má nulovou koncentraci.

7.4 PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je jednoduchý enzymatický test, který umožňuje amplifikaci specifického fragmentu DNA ze složité zásoby DNA. PCR lze provést pomocí zdrojové DNA z různých tkání a organismů, jako je například z periferní krve, kůže, vlasů, slin a mikrobů (Garibyan, 2014).

7.4.1.1 Reagencie

- DNA
- Mastermix Combi PPP obsahující Taq DNA polymerázu a nukleotidy (firma Top-Bio)
- Primer reverse
- Primer forward
- PCR voda
- Pufr TBE

7.4.1.2 Pracovní pomůcky a přístroje

- Mikropipety, špičky
- 0,2 ml mikrozkušavky
- Vortex, minicentrifuga
- Termocykler MJ Mini Gradient Thermal Cycler, BIO-RAD

7.4.2 Navrhování primerů

Primery potřebné k amplifikaci daného úseku byly navrženy v laboratoři za pomoci speciálního software Primer-BLAST, který je volně dostupný na stránkách NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Primery byly syntetizovány na zakázku firmou Generi Biotech a byly navrženy tak, aby bylo zajištěno osekvenování celého požadovaného exonu 11 genu *ALAS2* (viz. Obrázek 8), který čítá 289 páru bází. Celkový produkt obsahoval 448 bází, samotný exon 11- 369 bází.

Na následujícím obrázku (viz. Obrázek 8) je modře znázorněna sekvence exonu 11 a červeně primery, které ohraničují amplifikovanou oblast genu. Černě jsou označeny sousedící intronové oblasti.

```
attggaagatctagtctaaccatttttccctccccccccctaccactcagaaagctgctgctgctgactgcggtgggctgccctccaggatgtgtctgtgctgctgcaatttctgtcgcgt  
cctgtacactttgagctcatgagtgagtggaacgttctacttcggaacatggggcccgatgtaccacctatgctgagaagccagctgctaggattcacacccaccctgccttcaactgggtcc  
aggcctactcctgtcttctgttgtgtgccttagctgaattgagcctaaaaataaagcacaaccacagcattgtgaagcctttattggacaggggaacagacaagtgcattctgactccctcagacaa  
gtggcagatctatgaggtaacataggtcacttgttgggtcaccatt
```

Obrázek 8: Sekvence exonu 11.

Zdroj: vlastní

Do následující tabulky byly vloženy navrhované sekvence primerů.

Tabulka 2: sekvence primerů

gen <i>ALAS2</i> (exon 11)	
Sekvence primaru forward	5'-TCCCCCTACCACCTTCAGAG-3'
Sekvence primaru revers	5'-GCCACTTGTCTGAGGGAGTC-3'

Zdroj: vlastní

7.4.3 Postup PCR

Nejprve byly připraveny mikrozkušavky a řádně označeny. Do každé mikrozkušavky bylo napipetováno 1,5 μ l primeru forward o koncentraci 10 pmol/ μ l, 1,5 μ l primeru revers o koncentraci 10 pmol/ μ l, 7,5 μ l PCR MasterMixu a 3 μ l DNA. Dále byly mikrozkušavky doplněny PCR vodou do objemu o 15 μ l. Následně byly mikrozkušavky zvortexovány a stočeny. Poté byly vloženy do cycleru a byl spuštěn předem nastavený příslušný program podle teplotního profilu. (viz. tabulka 3) Optimalizace PCR byla již předem provedena v laboratoři.

Tabulka 3: Přehled teplotních profilů reakce PCR.

	FÁZE	TEPLOTA	ČAS	POČET CYKLŮ
1.	počáteční denaturace	95°C	10min	1
2.	denaturace	95°C	30s	35
3.	annealing	60°C	30s	35
4.	extenze	72°C	1min	35
5.	konečná extenze	72°C	10min	1
6.	chlazení	12°C	10h	1

Zdroj: vlastní

7.5 Gelová elektroforéza PCR produktů

Tato technika je používána k oddělení částí neboli fragmentů DNA nebo i jiných makromolekul, jako je například RNA či bílkoviny. Princip oddělování je na základě velikosti a náboje zkoumaných makromolekul. Tato metoda zahrnuje protékání proudu gelem. Na základě velikosti a náboje budou molekuly cestovat gelem různou rychlostí a různým směrem, což vede k oddělení částí od sebe. Molekuly DNA mají stejný náboj, z tohoto důvodů se DNA fragmenty oddělují pouze na základě velikosti. Pomocí elektroforézy můžeme zjistit kolik fragmentů DNA je přítomných ve vzorku a jak jsou vzájemně vůči sobě velké (Khan Academy, 2021).

7.5.1.1 Reagencie

- Agaróza (SERVA)
- TBE pufer
- Ethidium Bromid (SERVA)

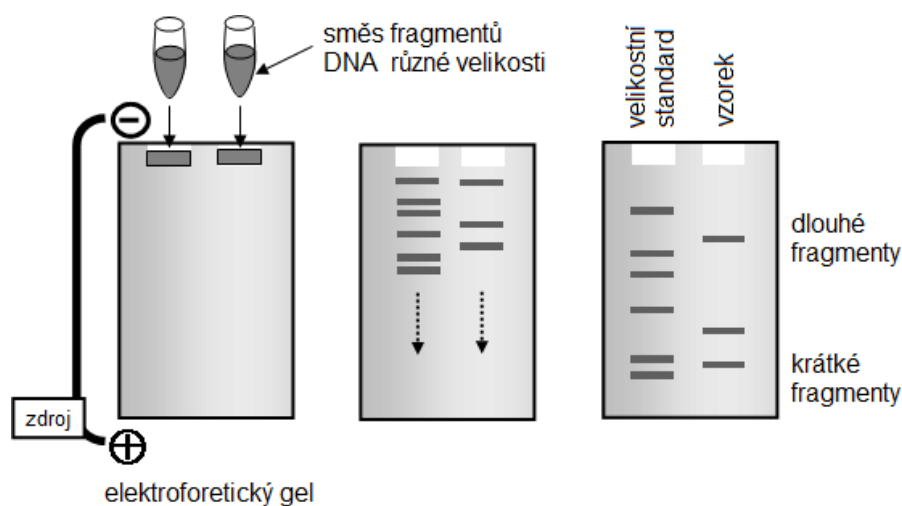
7.5.1.2 Pracovní pomůcky a přístroje

- Laboratorní předvážky
- Mikropipety, špičky
- Mikrovlnná trouba
- Elektroforetická vana (MajorSciences)
- UVIsave HD5 Uvitec Cambridge)

7.5.2 Pracovní postup

Nejprve byl připraven 3 % agarózový gel, kdy pro jeho přípravu byly do Erlenmeyerovy baňky naváženy na předvážkách 3 g agarózy a k nim přilito 100ml pufru TBE. Poté byla baňka zahřívána v mikrovlnné troubě do té doby, dokud se agaróza úplně nerozpustila a nezmizely všechny bubliny. Obsah baňky byl během zahřívání průběžně promícháván. Po získání čistého gelu bez bublin byl zahřátý gel ochlazen proudem studené vody. Dále bylo do baňky velice opatrně napipetováno 5 μ l ethidium bromidu (s touto chemikálií bylo zacházeno velice opatrně, neboť se jedná o nebezpečný karcinogen) a obsah byl promíchán. Poté byl gel nalit do formy, do kterého byl vzápětí umístěn hřebínek, který vytvořil v gelu jamky pro vzorky a následně byl gel ponechán ztuhnout. Mezitím byl do elektroforetické vany nalit pufr TBE, aby byl gel po vložení zcela ponořený. Po ztuhnutí byl z gelu vyňat hřebínek a gel byl umístěn do elektroforetické

vany. Následně bylo do první jamky napipetováno 5 μ l 100bp DNA ladderu, tzv. žebříku a do dalších jamek 5 μ l jednotlivých PCR produktů. Po napipetování vzorků bylo víko na elektroforetickou vanu uzavřeno, následně byly připojeny elektrody. Proud gelem postupoval od katody směrem k anodě. Elektroforéza probíhala 35 minut při 110 V. Po ukončení procesu elektroforézy byly elektrody odpojeny a víko bylo sundáno. Dále byl gel přemístěn na UV transluminátor, kde byl prosvícen UV zářením. Barvivo ethidium bromid, které se navázalo na DNA fragmenty, při prosvícení gelu zviditelnilo PCR produkty. Kamerou byl obraz přenesen na LCD displej a díky USB disku byl elektroforegram přenesený do počítače, a tak byla získaná fotografie. Z fotografie bylo následně určeno, zda PCR proběhla správně. Na následujícím obrázku (viz. Obrázek 9) je znázorněn průběh elektroforézy.



Obrázek 9: Fotografie průběhu gelové elektroforézy

Zdroj: Bártová, 2011

7.6 Enzymatické přečištění PCR produktů

Před zahájením čištění byly nejprve PCR produkty zvortexovány a stočeny. Poté do předem připravených mikrokumavek o objemu 0,2 μ l bylo napipetováno 5 μ l PCR produktu, 0,5 μ l enzymu EXO1 a 1 μ l enzymu rSAP. Následně byl celý obsah opět promíchán a stočen. Takto připravené mikrokumavky byly vloženy do cycleru a po jeho uzavření byl nastaven program EXO (viz. Tabulka 4) a cycler byl zapnut.

Tabulka 4: Program EXO na přečištění PCR produktů.

proces	teplota	čas
inkubace	37 °C	15 min
Inaktivace enzymů	80 °C	15 min
chlazení	4 °C	24 h

Zdroj: vlastní

7.7 Příprava na sekvenaci

Nejprve byly připraveny mikrozkušavky o objemu 1,5 µl na které byl následně přilepen barcode od firmy Genseq. Druhá část kódu byla vlepena do vlastního poznámkového bloku. Do takto připravených mikrozkušavek bylo napipetováno 5 µl primeru. Do jedné mikrozkušavky primer forward a do druhé primer revers. Následně 1 µl přečištěného PCR produktu (v případě, že byly pruhy DNA na elektroforegramu slabé, bylo napipetováno o 0,5 µl více PCR produktu). Dále byla do mikrozkušavky doplněna PCR voda, která tak vyplnila celkový objem 10 µl. Následně byly zkušavky uzavřeny.

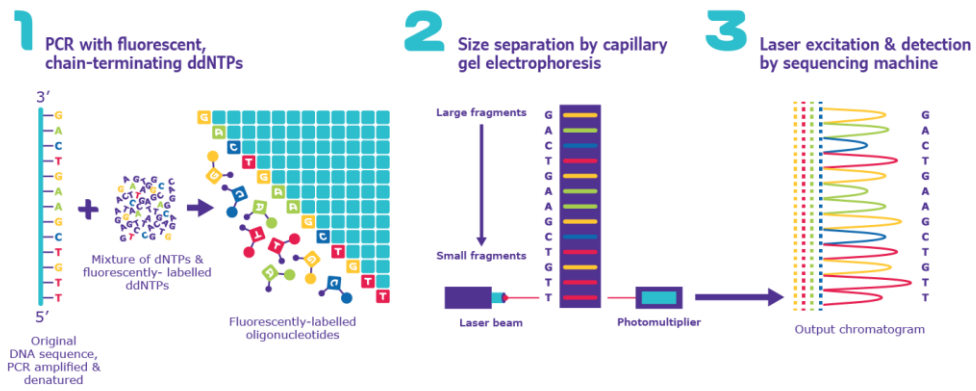
Takto připravené mikrozkušavky byly vloženy do schránky zmiňované firmy Genseq na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity. Výsledky sekvenace byly v následujících dnech dostupné na stránkách firmy.

7.8 Sangerovo sekvenování

Tato metoda je známá také jako „metoda ukončení řetězce“, která slouží ke stanovení nukleotidové sekvence DNA. Metodu vyvinul v roce 1977 Frederick Sanger, dvojnásobný držitel Nobelovy ceny a jeho kolegové. Odtud pochází název Sangerova sekvence (MERCK, 2021).

Vzorek DNA, který je určen k sekvenaci se smíchá ve zkušavce s primerem, DNA polymerázou a DNA nukleotidy (dATP, dTTP, dGTP a dCTP). Dále jsou do zkušavky přidány čtyři fluorescenčně značené dideoxynukleotidy, které při navázání ukončují syntézu řetězce. Tato směs se nejprve zahřeje, aby došlo k denaturaci templátové DNA. Při procesu denaturace se od sebe oddělí vlákna DNA. Následně se směs ochladí, aby došlo k navázání primeru na jednořetězový templát. Poté, co dojde k navázání primeru, se teplota opět zvýší, což umožňuje DNA polymeráze syntetizovat novou DNA (Nature Education, 2014).

Výsledkem této metody je směs různě dlouhých sekvencí DNA. Tyto sekvence začínají primerem a končí určitým dideoxynukleotidem (Bártová, 2011).



Obrázek 10: Metoda Sangerova sekvenování.

Zdroj: MERCK, dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html>

8 Výsledky

Bylo vyšetřeno 25 vybraných jedinců z Jihočeského kraje, od kterých byl získán a osekvenován exon 11 genu *ALAS2*. Tato práce zahrnovala odběr vzorku, izolaci DNA, měření koncentrací, PCR, elektroforézu, enzymatické přečištění a přípravu vzorku k sekvenaci. Druhým cílem praktické části bylo porovnat 40 sekvencí genu *ALAS2* (20 sekvencí forward a 20 sekvencí revers) mezi dětmi z Karvinska a Českobudějovicka a zhodnotit případné nalezené mutace v tomto genu.

8.1 Izolace a měření koncentrace

Nejprve byl proveden odběr vzorku z bukální sliznice, ze kterého byla vyizolována DNA a následně tak byl získán čistý izolát DNA. Po získání čistého izolátu a před zahájením metody PCR byla změřena koncentrace jednotlivých vzorků. Vzorky byly změřeny proti pufru BL4, který má nulovou koncentraci. Pro přesnější stanovení koncentrace byly všechny vzorky změřeny dvakrát. Vzorky 21-25 nemohly být dále analyzovány, neboť se u nich změřili velice nízké koncentrace. Pravděpodobně došlo k chybnému postupu při izolaci DNA. Tyto vzorky již ve výsledcích nejsou dále uvedeny.

V následující tabulce je uvedena koncentrace vyizolované DNA dvaceti vyšetřovaných vzorků.

Tabulka 5: Měření koncentrace DNA (1/2).

	První měření (ng/μl)	Kontrolní měření (ng/μl)	Výsledná koncentrace (ng/μl)
1.	96,26	100	98,13
2.	45,80	50,25	48,03
3.	113,33	114,59	113,96
4.	61,47	65,17	63,32
5.	135,08	136,26	135,67
6.	86,10	89,30	87,7
7.	88,54	89,14	88,84
8.	47,9	51,24	49,57
9.	78,20	79,54	78,87
10.	115,33	114,85	115,09

Zdroj: vlastní

Tabulka 6: Měření koncentrace DNA (2/2).

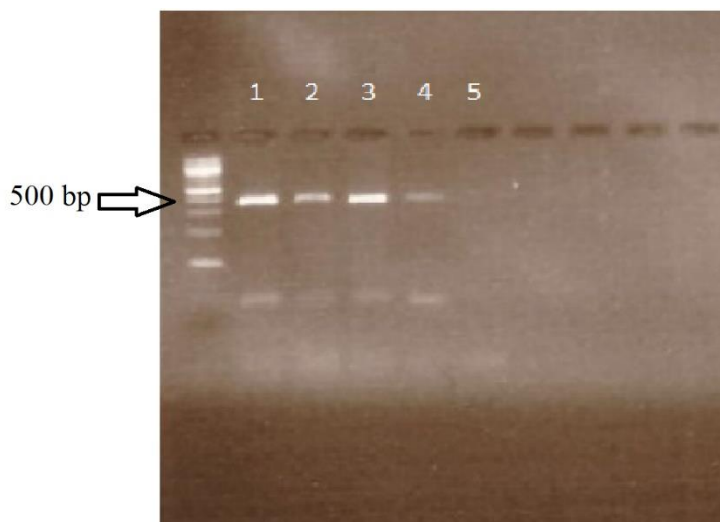
	První měření (ng/μl)	Kontrolní měření (ng/μl)	Výsledná koncentrace (ng/μl)
11.	113,64	112,56	113,1
12.	96,85	95	95,925
13.	136,70	131,20	133,95
14.	109,72	111,81	114,265
15.	45,63	44,96	45,295
16.	68,96	71,33	70,145
17.	94,66	99,23	96,945
18.	112,79	113,42	113,105
19.	106,82	104,44	105,63
20.	49,87	54,10	51,985

Zdroj: vlastní

8.2 PCR a elektroforéza

Po změření koncentrací se vzorky připravily na metodu PCR, ještě před provedením této metody byly dopředu navrženy primery pro gen *ALAS2*, které pro tuto metodu byly následně použity. Po ukončení PCR následovala elektroforéza, kde byl připraven agarózový gel, ve kterém se díky procházejícímu elektrickému náboji mohly fragmenty DNA v gelu pohybovat. Pro vizualizaci DNA byl do gelu přidán ethidium bromid. Pro odhad velikostí produktů amplifikace se do prvního slutu gelu vložil tzv. "žebřík" (100 bp DNA ladder).

Elektroforéza slouží jako kontrola, zda proběhla správně amplifikace genů v PCR metodě. Na níže přidané fotografii můžeme vidět snímek gelu z elektroforézy, kde můžeme pozorovat zdařilou amplifikaci DNA.



Obrázek 11: Fotografie gelu PCR produktů po proběhlé elektroforéze.

Zdroj: vlastní

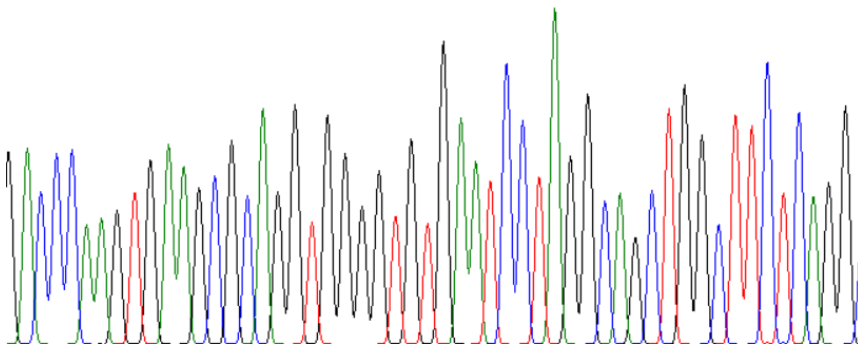
8.3 Hodnocení sekvencí

Vzorky byly následně po elektroforéze enzymaticky přečištěny, připraveny a odeslány k sekvenaci. Osekvenované vzorky byly dostupné na stránkách firmy v následujících dnech. Vyhotovené sekvence byly snadno vyhledány díky barcodu. Sekvence byly hodnoceny ve formátu PDF nebo ve formátu ABI v programu BioEdit. Po prozkoumání jednotlivých sekvencí, byla sekvence genu zkopírována do programu NCBI BLAST, který pomohl zkontrolovat, zda se opravdu jedná o požadovaný gen, zda byl osekvenován celý exon 11 a jestli zde není přítomna mutace v homozygotní formě.

Vyšetřovaný soubor obsahoval 20 vzorků, ve kterém se sekvenoval gen *ALAS2*-exon 11. Nejprve byla v počítačovém programu BioEdit otevřena příslušná sekvence. Po otevření byly pozorovány nukleotidy a sekvence, které se zobrazovaly ve formě píků. Takto připravená sekvence byla nejprve hodnocena „okometricky“. Byla sledována čitelnost sekvence, velikosti píků a jejich překryvy, které by mohly znamenat heterogenní mutaci (nelze takto určit mutaci homogenní, BioEdit k tomu není úplně vhodný). Jelikož gen je osekvenován z obou směrů primery forward a revers, lze si otevřít sekvenci opačnou a podívat se, zda ve stejném místě došlo k překryvu. Překryv však nemusí znamenat pouze mutaci, ale může jít také o kontaminaci či chybné osekvenování. Abychom zjistili, zda se jedná opravdu o mutaci, použijeme již zmiňovaný program NCBI BLAST, do kterého se sekvence zkopíruje a vloží. Program vyhodnotí, zda se jedná opravdu o hledaný gen a jestli se v něm nevyskytuje mutace. Výsledek vyhodnotí v procentech shody, který je podpořen fotografií osekvenovaného genu s nukleotidy a

grafem. Fotografie zobrazuje, zda v genu není homozygoní mutace. Graf zobrazuje exon 11 a náš osekvenovaný gen, kde lze pozorovat celé osekvenování či nikoli.

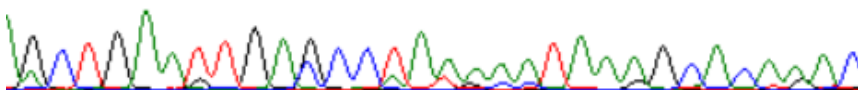
Na následujících dvou fotografiích jsou znázorněny sekvence v programu BioEdit. Na první fotografii (viz. Obrázek 12) je část osekvenovaného genu primerem forward. Tato sekvence je velice dobře čitelná. Po vložení do programu NCBI BLAST byla nalezena 100% shoda bez mutace. Na druhé fotografii (viz. Obrázek 13) je gen osekvenovaný druhým směrem, tedy primerem revers. Při prvním pohledu se tato sekvence nemusí jevit čitelně, avšak v programu si lze píky přiblížit a blíže pozorovat. Tato sekvence byla také vložena do NCBI BLASTU s nalezenou 100 % shodou bez mutace. Obě sekvence se shodují, ale kvalita obou sekvencí je jiná. Toto je pravděpodobně zapříčiněno chybným osekvenováním.



Obrázek 12: Ukázka části sekvence genu *ALAS2* pro F v programu BioEdit.

Zdroj: vlastní

V této sekvenci Modré píky označují bázi C, zelené píky bázi A, červené píky bázi T a černé píky bázi G.

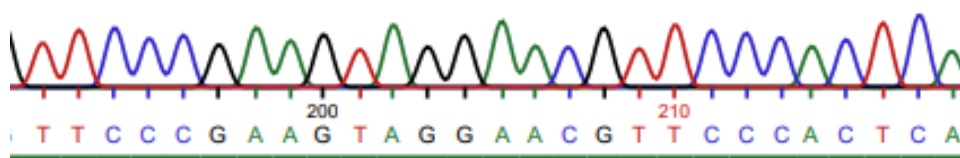


Obrázek 13: Ukázka části sekvence genu *ALAS2* pro R v programu BioEdit.

Zdroj: vlastní

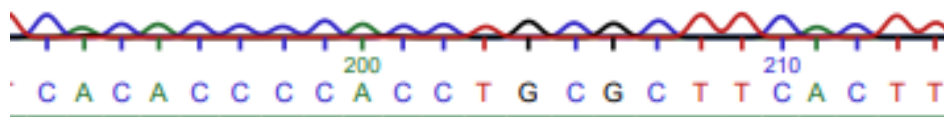
Jak již bylo v úvodu této kapitoly zmíněno, sekvence lze hodnotit i ve formátu PDF. Po otevření lze opět „okometricky“ hodnotit čitelnost, píky a překryvy. I v tomto formátu lze přibližovat snímek pro lepší viditelnost případných pochybností.

Výše byly porovnány sekvence pro forward a revers ve formátu BioEdit, kde již na první pohled bylo patrné, že sekvence nejsou stejně dobře čitelné. I ve formátu PDF lze na první pohled spatřit, že se vyskytla pravděpodobně chyba v sekvenování (viz. Obrázek 15).



Obrázek 14: Ukázka sekvence genu ALAS2 F, mezi bázemi 100-300 ve formátu PDF.

Zdroj: vlastní



Obrázek 15: Ukázka sekvence genu ALAS2 R, mezi bázemi 100-300 ve formátu PDF.

Zdroj: vlastní

Sekvence v NCBI BLASTU byly porovnány s těmito referenčními sekvencemi:
1. Homo sapiens 5'-aminolevulinate synthase 2 (ALAS2), RefSeqGene (LRG_1163) on chromosome X; Sequence ID: NG_008983.1.

Po vložení sekvence do programu se zobrazí tedy shoda v procentech, fotografie a graf. Na níže uvedeném obrázku (viz. Obrázek 16) lze vidět, že tato sekvence dosáhla 100 % shodu a nebyla zde nalezena žádná homozygotní mutace.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
499 bits(270)	6e-140	270/270(100%)	0/270(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTAGAGGCACACAACAAGCAGAAGACAGGAGTAGGCCTGGACCCCAAGTGAAGCGCAGGT			60
Sbjct 13746	CTAGAGGCACACAACAAGCAGAAGACAGGAGTAGGCCTGGACCCCAAGTGAAGCGCAGGT			13805
Query 61	GGGGTGTGAATCCTAGGCAGCTGGCTTCTCAGGCATAGGTGGTGACATACTGGGGCCCCA			120
Sbjct 13806	GGGGTGTGAATCCTAGGCAGCTGGCTTCTCAGGCATAGGTGGTGACATACTGGGGCCCCA			13865
Query 121	TGTTCCCGAAGTAGGAACGTTCCCACTCACTCATGAGCTCAAAGTGTACAGGACGGCGAC			180
Sbjct 13866	TGTTCCCGAAGTAGGAACGTTCCCACTCACTCATGAGCTCAAAGTGTACAGGACGGCGAC			13925
Query 181	AGAAATTGCAGGCAGCCACAGACACATCCTGGAGGGGCAGCCCCACCGCAGTCCAAGCCA			240
Sbjct 13926	AGAAATTGCAGGCAGCCACAGACACATCCTGGAGGGGCAGCCCCACCGCAGTCCAAGCCA			13985
Query 241	GCAGCAGCTTCTCTGAAGGTGGTAGGGGGA	270		
Sbjct 13986	GCAGCAGCTTCTCTGAAGGTGGTAGGGGGA	14015		

Obrázek 16: Příklad 100% shody vyšetřovaného vzorku s databází NCBI.

Zdroj: NCBI

Do následujících dvou tabulek byly vloženy výsledky vzorků dvaceti vyšetřovaných jedinců z Jihočeského kraje.

Tabulka 7: Shoda vyšetřovaných sekvencí s databází NCBI (1/2).

vzorek	Vlákno F/R	Shoda s NCBI	Lokace (lokace exonu 11 26,722-27,010)
1.	Forward	100%	26766 - 27073
	Revers	-	-
2.	Forward	91%	26768-27002
	Revers	-	-
3.	Forward	100%	26754 to 27073
	Revers	-	-
4.	Forward	97%	26756 - 27072
	Revers	-	-
5.	Forward	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
	Revers	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
6.	Forward	100%	26760 - 27069
	Revers	100%	26704 - 27020
7.	Forward	100%	26756 - 27073
	Revers	100%	26704 - 27021
8.	Forward	100%	26755 - 27073
	Revers	100%	26704 - 27013

9.	Forward	100%	26753 - 26974
	Revers	100%	26704 - 27013
10.	Forward	98%	26767 - 26855
	Revers	100%	26704 - 27011

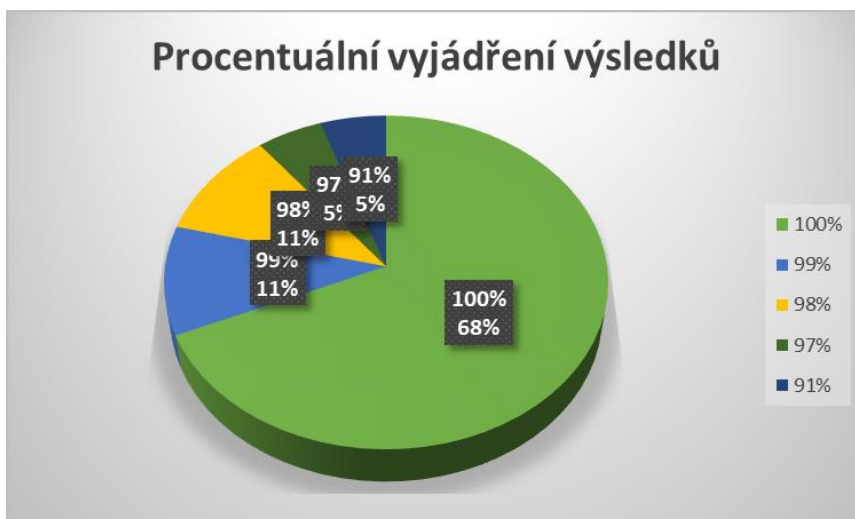
Zdroj: vlastní

Tabulka 8: Shoda vyšetřovaných sekvencí s databází NCBI (2/2).

<i>vzorek</i>	<i>Vlákno F/R</i>	<i>Shoda s NCBI</i>	<i>Lokace (lokace exonu 11 26,722-27,010)</i>
11.	Forward	100%	26753 - 27073
	Revers	100%	26704 - 27020
12.	Forward	100%	26755 - 26972
	Revers	100%	26704 - 27014
13.	Forward	100%	26756 - 27074
	Revers	100%	26706 - 27021
14.	Forward	99%	26756 - 27072
	Revers	100%	26704 - 27020
15.	Forward	99%	26753 - 26973
	Revers	100%	26704 - 27012
16.	Forward	100%	26755 - 26974
	Revers	100%	26704 - 27021
17.	Forward	100%	26751 - 27071
	Revers	100%	26706 - 27020
18.	Forward	100%	26704 - 27009
	Revers	100%	26770 - 27072
19.	Forward	100%	26773 - 27072
	Revers	100%	26754 - 27073
20.	Forward	98%	26702 - 27009
	Revers	100%	26705-26721

Zdroj: vlastní

V následujícím grafu jsou zobrazeny výsledky v procentech.



Obrázek 17: Graf s procentuálními výsledky.

Zdroj: vlastní

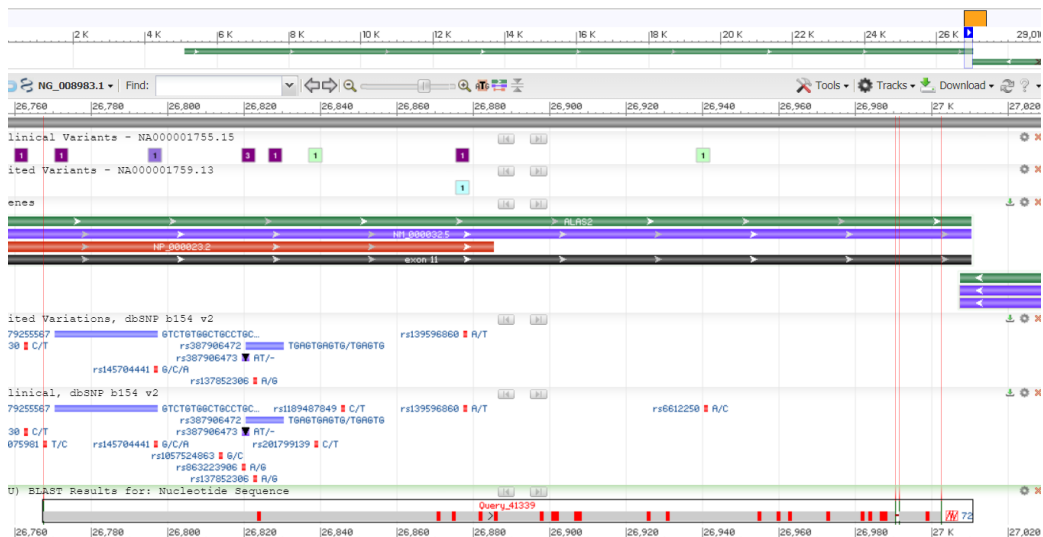
Z dvaceti vyšetřovaných vzorků bylo 13. vzorků ve 100 % shodě s NCBI. Vzorky č. 1 a 15 byly nalezeny s 99 %, vzorky s č. 10 a 20 s 98 % shodou. Vzorek č. 4 s 97 %, a vzorek č. 2 s 91 % shodou. Na následující fotografii je snímek z NCBI vzorku č. 2. (viz. Obrázek 18)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
311 bits(168)	3e-83	213/235(91%)	1/235(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGTGTCTGTGGCTGCCTGCAATTTCTGTCGCCGTCCTGTACACTTTGAGCTCATGACTGA	60		
Sbjct 26768	TGTGTCTGTGGCTGCCTGCAATTTCTGTCGCCGTCCTGTACACTTTGAGCTCATGAGTGA	26827		
Query 61	GTGGGAACGTTCTACTTCGGGAACATGGGGCCCCAGTATGTCTCCAACATATGCATGATA	120		
Sbjct 26828	GTGGGAACGTTCTACTTCGGGAACATGGGGCCCCAGTATGTCACCACCTATGCCTGAGA	26887		
Query 121	AGCCAGCTGCTTAAAATTTCGGACCCACCTGCGCTTCAATTGGCTCCAGGCCTACTCCTG	180		
Sbjct 26888	AGCCAGCTGCCTAGGATTCACACCCACCTGCGCTTCAATTGGGTCCAGGCCTACTCCTG	26947		
Query 181	TCTTCTGTTTTGGTGCCTCTATCTGAATTGCGACTTCAA-TAAAGCATAAA	234		
Sbjct 26948	TCTTCTGCTTTGTTGTGTCCTCTAGCTGAATTGAGCCTAAAAATAAAGCACAAA	27002		

Obrázek 18: Příklad 91% shody vyšetřovaného vzorku č. 2 s databází NCBI.

Zdroj: NCBI

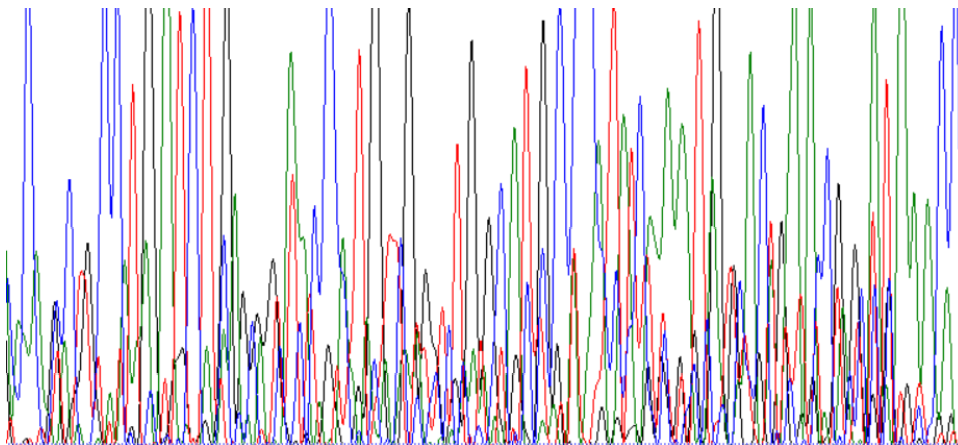
Při pohledu na tuto sekvenci by bylo zřejmé ji označit jako sekvenci s mutacemi, avšak v tomto případě nejde o mutace, ale o nečitelnou sekvenci, která byla označena sice jako gen *ALAS2*, ale špatná čitelnost způsobila chybu správného přečtení v databázi. Niže je vložena fotografie stejného vzorku v grafické podobě. Také lze vidět, že tento vzorek nebyl osekvenován úplně celý, neboť tento vzorek začíná při 26,760, zatímco exon 11 při 26,722.



Obrázek 19: Grafické zobrazení vzorku č. 2.

Zdroj: NCBI

Z celého vyšetřovaného souboru nebyla nalezena žádná mutace. Vzorky s nižší shodou než 100 % byly vyhodnoceny stejně jako vzorek č. 2. Pravděpodobně došlo k chybnému osekvenování, a tím ke špatné čitelnosti a vyhodnocení. U vzorků 1-5 byly odeslány k sekvenaci pouze vzorky s forward, z tohoto důvodu nejsou v tabulce uvedeny hodnoty pro revers. U vzorku č. 5 došlo patrně ke kontaminaci (viz. Obrázek 20), neboť tento vzorek nebyl viditelný již na elektroforéze (viz. Obrázek. 11).



Obrázek 20: Nečitelná sekvence vzorku č. 5 v programu BioEdit.

Zdroj: vlastní

8.4 Hodnocení sekvencí od dětí z Karvinska a Českobudějovicka

Součástí praktické části v této bakalářské práci bylo vyhodnotit a porovnat sekvence a případně nalezené mutace v genu *ALAS2* mezi dětmi z Karvinska a Českobudějovicka. K dispozici pro tuto práci bylo 20 již osekvenovaných vzorků, které bylo potřeba vyhodnotit. Výsledky těchto vzorků jsou zapsány v tabulkách 9 a 10.

Tabulka 9: Výsledky sekvencí dětí z oblasti Karviná.

Výsledky sekvencí - Karviná

vzorek	Vlákno F/R	Shoda s NCBI	Lokace
			(lokace exonu 11 26,722-27,010)
1.	Forward	99%	26762 - 27071
	Revers	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
2.	Forward	99%	26775 - 27072
	Revers	100%	26704 - 27010
3.	Forward	99%	26771 - 27072
	Revers	99%	26704 - 27009
4.	Forward	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
	Revers	100%	26704 - 27005
5.	Forward	100%	26769 - 27072
	Revers	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
6.	Forward	100%	26771 - 27072
	Revers	99%	26704 - 27009
7.	Forward	99%	26752 - 27073
	Revers	99%	26704 to 27007
8.	Forward	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
	Revers	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
9.	Forward	99%	26751 - 27073
	Revers	100%	26705 - 27009
10.	Forward	100%	26769 - 27071
	Revers	100%	26704 - 27017

Zdroj: vlastní

Z 10 hodnocených vzorků sekvencí od dětí z Karvinska nebyly nalezeny žádné mutace. Vzorky, u kterých namísto výsledku bylo uvedeno " nelze hodnotit ", nebyly hodny k hodnocení. Jednalo se o nečitelné sekvence. V případě 99% shody se však nejednalo o mutaci. Tyto vzorky byly osekvenovány chybně a přesahovaly hraniční mez exonu 11. Procento této shody je zapříčiněno šumem koncové části sekvence, která však již nebyla v rozmezí tohoto exonu.

Tabulka 10: Výsledky sekvencí dětí z oblasti Českobudějovicka.

Výsledky sekvencí - Českobudějovicko

vzorek	Vlákno F/R	Shoda s NCBI	Lokace
			(lokace exonu 11 26,722-27,010)
1.	Forward	99%	26752 - 27073
	Revers	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
2.	Forward	100%	26767 - 27072
	Revers	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
3.	Forward	99%	26766 - 27072
	Revers	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
4.	Forward	99%	26752 - 27073
	Revers	100%	26704 - 27011
5.	Forward	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
	Revers	100%	26704 - 27011
6.	Forward	99%	26766 - 27072
	Revers	99%	26705 - 27011
7.	Forward	100%	26771 - 27072
	Revers	99%	26704 - 27009
8.	Forward	99%	26768 - 27072
	Revers	99%	26704 - 27011
9.	Forward	99%	26764 - 27072
	Revers	99%	26704 - 27014
10.	Forward	99%	26767 - 27072
	Revers	99%	26704 - 27014

Zdroj: vlastní

Ze sekvencí od dětí z Českobudějovicka nebyla nalezena žádná homozygotní či heterozygotní mutace. Avšak ve vzorku č. 7 v revers bylo podezření na homozygotní mutaci (viz obrázek 21a 22), avšak v tomto případě šlo o špatnou vizualizaci v programu BioEdit. Shoda u následujících vzorků s 99 % byla zapříčiněna nekompletním osekvenováním obdobně jako u výsledků z okolí Karvinska. V některých případech byla sekvence za rozmezím exonu 11 a podobně tak v některých případech před hranicí

rozmezí. To také vysvětluje, že v některých případech vyšla sekvence forward 99 % a revers 100 % a opačně.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
560 bits(303)	3e-158	305/306(99%)	0/306(0%)	Plus/Minus
Query 1	GCTGTGGTTTGTGCTTTATTTTAAAGGCTCAATTCAGCTAGAGGCACACAACAAAGCAGAA	60		
Sbjct 27009	GCTGTGGTTTGTGCTTTATTTTAAAGGCTCAATTCAGCTAGAGGCACACAACAAAGCAGAA	26950		
Query 61	GACAGGAGTAGGCCTGGACCAAGTGAAGCGCAGGTGGGGTGTGCATCCTAGGCAGCTGG	120		
Sbjct 26949	GACAGGAGTAGGCCTGGACCAAGTGAAGCGCAGGTGGGGTGTGAATCCTAGGCAGCTGG	26890		
Query 121	CTTCTCAGGCATAGGTGGTACATACTGGGGCCCCATGTTCCCGAAGTAGGAACGTTCCC	180		
Sbjct 26889	CTTCTCAGGCATAGGTGGTACATACTGGGGCCCCATGTTCCCGAAGTAGGAACGTTCCC	26830		
Query 181	ACTCACTCATGAGCTCAAAGTGTACAGGACGGCGACAGAAATTGCAGGCAGCCACAGACA	240		
Sbjct 26829	ACTCACTCATGAGCTCAAAGTGTACAGGACGGCGACAGAAATTGCAGGCAGCCACAGACA	26770		
Query 241	CATCCTGGAGGGGACGCCACCAGTCCAAGCCAGCAGCAGCTTCTCTGAAGGTGGTA	300		
Sbjct 26769	CATCCTGGAGGGGACGCCACCAGTCCAAGCCAGCAGCAGCTTCTCTGAAGGTGGTA	26710		
Query 301	GGGGGA	306		
Sbjct 26709	GGGGGA	26704		

Obrázek 21: Podezření na homozygotní mutaci vzorku č. 7.

Zdroj: NCBI



Obrázek 22: Podezření na homozygotní mutaci vzorku č. 7 v grafické podobě.

Zdroj: NCBI

9 Diskuse

Tato bakalářská práce byla zaměřena na gen *ALAS2* a jeho osekvenování (exon 11), které bylo provedeno firmou GenSeq. s.r.o. Nejprve bylo vyšetřeno 25 vzorků, které následně byly odeslány k sekvenaci a poté hodnoceny. Dále následovalo zhodnocení sekvencí od dětí z Karvinska a Českobudějovicka.

Na začátku kapitoly "výsledky" bylo zmíněno pět vzorků (vzorky 20-25), které byly vyřazeny z celkového hodnocení. U těchto vzorků nastala chyba již během izolace. Pracovalo se s návodem, kde byla od výrobce doporučena eluce do 100 μl . V posledním kroku při izolaci DNA v promývání izolátu pufrem BL4 bylo tedy tohoto pufru napipetováno 100 μl . Podle zkušeností laboratoře je vhodné z jednoho vzorku buklárního stěru eluovat do 25 μl . Tímto krokem došlo k naředění DNA, a tím tedy k velmi nízké celkové koncentraci, které se potvrdilo po změření. Změřené koncentrace vycházely mezi 4-6 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Ostatní vzorky byly naměřeny v rozmezích od 40-120 $\text{ng}/\mu\text{l}$. V tomto případě by připadalo v úvahu vzorek zakoncentrovat, avšak laboratoř, kde byla provedena praktická část, na to nemá potřebné vybavení. Tyto vzorky byly následně vyřazeny.

Po prohlédnutí všech výsledků z měření koncentrace bylo patrné, že záleží na správném odběru vzorku. I při použití stejného postupu a reagentů se koncentrace velmi odlišovaly. Také je důležité, aby jedinec byl před výtěrem informován o pravidlech správného odběru. Jak uvádí Narayanan (2000), je důležité, aby jedinec před odběrem nekouřil, nekonzumoval jídlo, kofein či alkohol, neboť by mohlo dojít k ovlivnění kvality vzorku. Jeden jedinec po odběru přiznal, že těsně před odběrem jedl, tímto mohlo dojít ke kontaminaci jídlem, proto výsledná koncentrace jeho DNA byla v porovnání s ostatními jedinci daného vyšetřovaného souboru 40,03 $\text{ng}/\mu\text{l}$. V ostatních případech nižších koncentrací mohlo dojít ke špatnému odběru, který nebyl proveden po dostatečně dlouhou dobu či pod správným tlakem, aby se na výtěrový tampon dostalo co nejvíce buněk. Podle mého názoru odběr vzorku a izolace jsou velice důležité kroky pro následující metody. Mělo by se dbát na správný odběr i správné a přesné postupování dle návodu při izolaci. Neboť při hodnocení, několik sekvencí nebylo možné vyhodnotit, i přesto, že byl vzorek osekvenován správně a celý. V těchto případech mohlo dojít právě ke kontaminaci během laboratorní práce. Důraz při provádění praktické části byl kladen na správné pipetování, které musí být na μl přesné.

Kontaminace při pipetování, či nedostatečné odstranění nečistot či etanolu během promývací fáze izolace v několika případech mohla způsobit špatnou amplifikaci DNA.

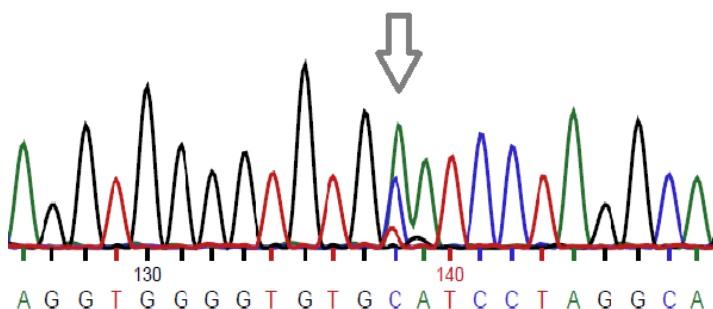
Chyba však mohla vzniknout i na základě špatné přípravy MasterMixu. Vzorky, které tedy nebyly správně amplifikovány, byly vyřazeny. Pouze v jednom případě byl jeden vzorek z jiné části vyšetřovaných vzorků odeslán k sekvenaci (vzorek č. 5).

Elektroforéza, která je provedena po PCR, jež slouží ke kontrole je podle mého názoru velice užitečná, cenově dostupná, a i přes to, že tato metoda nemusí být provedena, určitě bych jí doporučila. Neboť vzorky, které se špatně naamplifikovaly se na gelu neobjeví. Takové vzorky je zbytečné odesílat k sekvenaci, neboť špatně namnožený gen, by měl sekvenci s velkou pravděpodobností nečitelnou. U elektroforézy je třeba dbát na správnou přípravu gelu, jak uvádí Suico (2017), aby nedocházelo k chybám, gel musí mít správnou koncentraci. Pokud je koncentrace příliš vysoká, nebo příliš nízká fragmenty DNA se pohybují příliš pomalu či příliš rychle. Dále je třeba dbát na to, aby bylo napětí stabilní. Jakékoli kolísání by mělo za následek nestabilní pohybování fragmentů DNA, a tím by docházelo ke špatnému přečtení pruhů. Nejdůležitější je však správná vizualizace. Pokud by byla koncentrace barviva použité k vizualizaci vzorků příliš vysoká, výsledný obraz by byl velmi chaotický, protože by byly zobrazeny také zbytkové fragmenty. Naopak pokud by byla koncentrace gelu příliš nízká, vizualizace by vůbec neproběhla (Suico, 2017).

Vzorky byly již zmíněnou firmou GenSeq s.r.o., osekvenovány metodou Sangerova sekvenování a vyhotovené sekvence nám byly zaslány do 2-3 dnů. Sekvence byly hodnoceny v programu BioEdit, který mi vyhovoval více než formát PDF. Nevýhoda tohoto programu je však neschopnost rozeznat heterozygotní mutace i přes jeho bohaté funkce. Proto hodnocení těchto mutací bylo velice obtížné, ale díky možnému přiblížení sekvence to mnohokrát šlo hezky rozpoznat. Ve vyšetřovaném souboru 20 vzorků žádná heterogenní mutace nebyla nalezena. Homozygotní mutace byly vyhledávány databází NCBI blast, která mi zpočátku připadala velice nepřehledná, ale díky mému vedoucímu Ing. Tomášovi Nixovi Ph.D., jsem se v této databázi lépe orientovala. Po přezkoumání všech 20 vzorků žádná homozygotní mutace nalezena nebyla.

Při hodnocení dětí z Karvinska a Českobudějovicka také nebyla nalezena žádná homozygotní, ani heterozygotní mutace. Avšak u vzorku č. 7 ze souboru z Českobudějovicka jsem měla podezření na homozygotní mutaci. V tomto případě to vypadalo, že došlo k záměně bází. Kdyby se jednalo o mutaci heterozygotní program NCBI BLAST by ji nedokázal ukázat. Avšak při prohlédnutí sekvence v BioEditu jsem zvážila možnost mutace heterozygotní, neboť došlo ke špatnému označení báze. Pík A je vyšší, ale program BioEdit označil pík jako C. V případě špatně čitelné sekvence by to

mohlo být pochopitelné, avšak tato sekvence byla hezky čitelná. Toto je pravděpodobně způsobené tím, že program hodnotí spíše plochu než výšku, tudíž tento vzorek byl tak to označen. V případě klinické praxe bych tento vzorek nechala osekvenovat znovu.



Obrázek 23: Příklad špatně označené báze v programu BioEdit

Zdroj: vlastní

Výskyt mutací z Českobudějovicka a Karvinska se neliší, neboť nebyly nalezeny žádné mutace. Je nutné podotknout, že se jedná o poměrně malý soubor vzorků, na jejichž základě lze poměrně těžko data statisticky vyhodnotit.

Z toho důvodu jsem použila ještě výsledky sekvenování *ALAS2* genu, které byly sekvenovány v rámci projektu (viz. Tabulka 11). Nalezené mutace nebyly v této práci klasifikovány, byla použita pouze informace o počtu nalezených mutací.

Tabulka 11: Porovnání nalezených mutací mezi Karvinskem a Českobudějovickem

	počet analyzovaných vzorků	počet hodnotitelných sekvencí	počet nalezených mutací
České Budějovice	50 F + 50 R	50	3
Karviná	50 F + 50 R	42	2

Zdroj: vlastní

Co se týká kvality sekvence, je nápadný rozdíl mezi Karvinou a Českobudějovickým okresem. Vzorky z Českých Budějovic byly odebrány, odvezeny a následně hned byla provedena izolace a amplifikace. Poté byly vzorky osekvenovány. Vzorky z Karviné po odběru nebyly ihned zpracovány, ale shromažďovaly se na biochemickém oddělení nemocnice a až následně se odvezly a poté teprve izolovaly a amplifikovaly. Podle hodnot,

kteře jsem měla k dispozici pro přehled, naměřených koncentrací mezi Karvinou a ČB byl značný rozdíl. Koncentrace DNA v Karvině byly velice nízké. To mohlo být zapřičiněno právě tím, že vzorky nebyly hned zpracovány. Jak uvádí McMichael et al. (2009), vzorky DNA by měly být zpracovány do 72 h od odběru, přesažením tohoto času by mohlo dojít k degradaci DNA. Dále záleží na prostředí, kde jsou vzorky uchovány. Měly by být v chladném a suchém prostředí (McMichael et al, 2009).

Karvinsko, které spadá do Moravskoslezského kraje, patří mezi nejvíce znečištěnou oblast v České republice. Proto pro porovnání byly vybrány děti z Českobudějovicka (Šrám et al. 2017).

Mutace vznikají následkem působení mutagenů, které mohou být fyzikální či chemické povahy. Toto je podle mě velice individuální, neboť na každého mají jiný vliv. Ne u každého může mutace vzniknout a také ne všechny mutace znamenají vážné následky. Mutace mohou být dědičné. V potaz by se měla brát i rodinná anamnéza, kterou jsem pro tuto práci neměla k dispozici. Ačkoli Karvinsko spadá do nejvíce znečištěné oblasti v ČR, výsledky nebyly výrazně odlišné, a proto vliv životního prostředí na mutace v této práci nebyl prokazatelný.

Využití odběru z bukální sliznice v klinické praxi podle mého názoru funguje. Ačkoli se musí velmi dbát na preanalytickou fázi. Také na správné a celé osekvenování vzorku. Hodnocení z neúplné sekvence by mohlo být zavádějící, neboť by se mutace mohly nacházet v právě neosekvenované části, a tím poskytovat falešný výsledek. Toto je ovšem také individuální, záleží, v jaké části na genu byly mutace nalezeny a popsány. V případě genu, u kterého by se nejčastěji mutace vyskytovaly v počátečních a koncových částech, by mohly být výsledky velice zavádějící. I přesto u genu, kde se mutace nacházejí spíše v prostřední oblasti, je třeba brát zřetel na celé osekvenování, aby se zamezilo nesprávným výsledkům.

10 Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem vypracovala odbornou rešerši. Seznámila jsem se s genem *ALAS2* a s nemocemi, které vznikají mutacemi v tomto genu. Teoretická část byla zpracovaná od základů genetiky pro lepší orientaci a pochopení této práce. Seznámila jsem se s funkcemi hemu, který zastupuje důležitou roli spojenou s genem *ALAS2*. Erythropoetická protoporfyrie a sideroblastická anémie jsou onemocnění, které jsou způsobeny mutacemi tohoto genu. Tyto nemoci jsem popsala od příznaků po léčbu, a jakožto studentka zdravotního laboranta jsem se krátce zabývala i diagnostikou.

Dále jsem odebrala 25 vzorků, ze kterých jsem získala čistý izolát DNA, který jsem metodou PCR naamplifikovala, následně jsem si ověřila správné namnožení pomocí elektroforézy a následně připravila na metodu Sangerova sekvenování a nechala osekvenovat firmou GenSeq s.r.o.

V poslední části mé bakalářské práce bylo vyhodnotit sekvence vzorků, které jsem samostatně pomocí již zmíněných metod připravila a sekvence které jsem obdržela od dětí z Karvinska a Českobudějovicka. Získané data byly hodnoceny v programu BioEdit a databázi NCBI.

Cílem práce bylo seznámení se s odbornou literaturou na téma gen *ALAS2* a osvojit si molekulárně biologické metody: izolaci, PCR, elektroforéza a hodnocení sekvencí. Dále porovnat výskyt nalezených mutací v genu *ALAS2* mezi populacemi dětí z Karvinska a Českobudějovicka. Všechny výše zmíněné cíle byly naplněny.

Ze všech vyhotovených a hodnocených vzorků nebyla nalezena žádná homozygotní, ani heterozygotní mutace. Mezi dětmi z Karvinska a Českobudějovicka také nebyla nalezena žádná mutace. Proto jsem do své práce vložila výsledky dalších vzorků od dětí z Karvinska a Českobudějovicka pro porovnání ve větším souboru dat. Data, které mnou byly obdrženy, nebyly více klasifikovány, pouze zde byly informace o počtu nalezených mutací.

Hlavním přínosem této práce bylo seznámení se s genem *ALAS2*, který pro mnoho lidí není příliš známý, spolu s nemocemi s ním spojené. Další velký přínos byl naučit se samostatně pracovat v laboratoři.

11 Seznam použitých zdrojů

1. AHMED, N., MASOOD, S., 2020. Erythropoietic Protoporphyria [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563141/>
2. A-LEVEL BIOLOGY, 2015. Chromosomes – Introduction, Structure & Types [online]. Dostupné z: <https://alevelbiology.co.uk/notes/chromosomes-introduction-structure-types/>
3. AMERICAN PORPHYRIA FOUNDATION, 2020. About Porphyria [online]. Dostupné z: <https://porphyriafoundation.org/for-patients/about-porphyria/>
4. ASHOROBI, D., 2020. Sideroblastic Anemia [online]. Dostupné z: <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/29019#>
5. BD EDITORS, 2018. Heme Defenition. [online]. Dostupné z: <https://biologydictionary.net/heme/>
6. BELL, A., 2020. What is erythropoietic protoporphyria? [online]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/erythropoietic-protoporphyria>
7. BISHOP, D. F., HENDERSON, A. S., AND ASTRIN, K. H. (1990) Human – aminolevulinate synthase: assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromozome. *Genomics* 7, 207–214.
8. BISSONNETTE B., LUGINBUEHL I., MARCINIAK B., DALENS B., 2006. *Syndromes: Rapid Recognition and Perioperative Implications*. New York: McGraw-Hill, 852 p. ISBN 0-07-135455-7.
9. BONKOVSKY, H. L., RUDNICK, S. R., 2020. Erythropoietic Protoporphyria and X-linked Protoporphyria Dostupné z: <https://www.msmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/porphyrias/erythropoietic-protoporphyria-and-x-linked-protoporphyria>
10. BORTHWICK, I. A., SRIVASTAVA, G., DAY, A. R., PIROLA, B. A., SNOSWELL, M. A., MAY, B. K., AND ELLIOTT, W. H. (1985) Complete nucleotide sequence of hepatic 5 -aminolaevulinate synthase precursor. *Eur. J. Biochem.* 150, 481-484.
11. CAZZOLA, M., MAY, A., BERGAMASCHI, G., CERANI, P., FERRILLO, S., BISHOP D. F., 2002. Absent phenotypic expression of X-linked sideroblastic anemia in one of 2 brothers with a novel ALAS2 mutation [online]. Dostupné

- z: <https://ashpublications.org/blood/article/100/12/4236/88304/Absent-phenotypic-expression-of-X-linked>
12. CONBOY, J. G., COX, T. C., BOTTOMLEY, S. S., BAWDEN, M. J., AND MAY, B. K. (1992) Human erythroid 5 -aminolevulinate synthase. Gene structure and species-specific differences in alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.* 267, 18753-18758.
 13. COTTER, P. D., WILLARD, H. F., GORSKI, J. L., BISHOP, D. F., 1992. Assignment of human erythroid δ -aminolevulinate synthase (ALAS2) to a distal subregion of band Xp11.21 by PCR analysis of somatic cell hybrids containing X;Autosome translocations [online]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/088875439290223F>
 14. COX, T. C., BAWDEN, M. J., MARTIN, A., AND MAY, B. K. (1991) Human erythroid 5 -aminolevulinate synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA. *EMBO J.* 10, 1891-1902.
 15. DR. KNOTT, L., 2016. Sideroblastic Anaemia [online]. Dostupné z: <https://patient.info/doctor/sideroblastic-anaemia>
 16. DR. LOEWE, L., 2008. Genetic Mutation [online]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/genetic-mutation-1127/>
 17. DUCAMP, S., SCHNEIDER-YIN, X., DE ROOIJ, F., CLAYTON, J., FRATZ, E. J., RUDD, A., OSTAPOWICZ, G., VARIGOS, G., LEFEBVRE, T., DEYBACH, J.-C., GOUYA, L., WILSON, P., FERREIRA, G. C., MINDER, E. I., AND PUY, H. (2013) Molecular and functional analysis of the C-terminal region of human erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase associated with X-linked dominant protoporphyria (XLDPP). *Hum. Mol. Genet.* 22, 1280-1288.
 18. ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA, INC., 2021. Production of red blood cells (erythropoiesis) [online]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/blood-biochemistry/Production-of-red-blood-cells-erythropoiesis>
 19. ENCYCLOPEDIA. COM, 2019. Strasburger, Eduard Adolf [online]. Dostupné z: <https://www.encyclopedia.com/science/dictionaries-thesauruses-pictures-and-press-releases/strasburger-eduard-adolf>
 20. EUROPEAN PORPHYRIA NETWORK, 2021. Erythropoietic Protoporphyria (EPP) [online]. Dostupné z: <https://porphyria.eu/en/content/erythropoietic-protoporphyria-epp>

21. E-ZYVEC, 2020. Basic concepts of genetics [online]. Dostupné z: https://www.ezyvec.com/fields-of-application/dna-genes-genomes/?Utm_campaign=11534217343&adgroupid=111993987546&utm_content=476795150159&utm_term=&adp=&gclid=EAIAIQobChMI1ObB_o2R7QIVBIfVCh2GhgorEAAYASAAEgIyiPD_BwE
22. FERNANDES, J., 2008. *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*. 4. vydání. Praha: Triton, 607 s. ISBN 978-80-7387-096-6.
23. FIALA, J., 2006. *Biologie IV genetika*. Boskovice: Albert, 92 s. ISBN 80-7326-097-2.
24. GARIBYAN, L., AVASHIA, N., 2013. *Polymerase Chain Reaction*. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. doi:10.1038/jid.2013.1.
25. GOLDMAN, L., SCHAFER, A. I., 2012. *Goldman's Cecil Medicine*. 24th edition. Philadelphia: Saunders, 2704 p. ISBN 978-1-4377-1604-7.
26. GRAHAM, I., 2003. *Genetika*. Brno: Computer Press, 29 s. ISBN 80-7226-941-0.
27. GUPTA, N., 2019. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of cytology*, 36(2): 116–117, doi: 10.4103/JOC.JOC_110_18.
28. HAN, L., ZHONG, Y., HUANG, B., PAN, L., XU, X., WANG, X., AND LU, J. (2008) Sodium butyrate activates erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase gene through Sp1 elements at its promoter. *Blood. Cells. Mol. Dis.* 41, 148-153.
29. HEALIO ALL RIGHTS RESERVED, 2021. What are chromozomes? [online]. Dostupné z: <https://www.healio.com/hematology-oncology/learn-genomics/genomics-primer/what-are-chromosomes>
30. HOFER, T., WENGER, R. H., KRAMER, M. F., FERREIRA, G. C., AND GASSMANN, M. (2003) Hypoxic up-regulation of erythroid 5-aminolevulinate synthase. *Blood* 101, 348-350.
31. CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL, 2019. Walther Flemming [online]. Dostupné z: <https://www.uni-kiel.de/grosseforscher/index.php?nid=flemming&lang=e>
32. KHAN ACADEMY, 2021. Gel electrophoresis [online]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
33. KOČÁREK E., 2004. *Genetika*. Scientia: Praha. 211 s. ISBN 978-80-86960-36-4.

34. KODÍČEK, M., 2004. *Biochemické pojmy*. 1. vydání. VŠCHT: Praha. 171 s. ISBN 978-80-7080-551-0.
35. LAYER, G., REICHEL, J., JAHN, D., HEINZ, D. W., 2010. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Science*, 19(6), 1137–1161, doi: 10.1002/pro.405.
36. LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J., 2000. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. W.H. Freeman: New York. 1184 p. ISBN-10: 0-7167-3136-3.
37. M. SC. GREENWOOD, M., 2020. An Overview of Heme Biosynthesis [online]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/An-Overview-of-Heme-Biosynthesis.aspx>
38. MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH, 1998-2021. Porphyrin [online]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/porphyria/symptoms-causes/syc-20356066>
39. MCMICHAEL, G. L., GIBSON, C. S., O'CALLAGHAN, M. E., GOLDWATER, P. N., DEKKER, G. A., HAAN, E. A., MACLENNAN, A. H., 2009. DNA from Buccal Swabs Suitable for High-Throughput SNP Multiplex Analysis [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2777348/?fbclid=IwAR1xvzvOMzvcSiAGXuEQLhaRRvbyDs9sQmK3OwVzCJrPTb8SnZ1A88SNVOc>
40. MD. ALCINDOR, T., MD. BRIDGES, K. R., 2001. Sideroblastic anemias [online]. Dostupné z: <https://sickle.bwh.harvard.edu/sideroblastic.html>
41. MD. PH.D. BRAUNSTEIN, E. M., 2020. Sideroblastic Anemias [online]. Dostupné z: <https://www.msmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/anemias-caused-by-deficient-erythropoiesis/sideroblastic-anemias>
42. MERCK, 2021. Sanger DNA Sequencing Steps and Method [online]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html>
43. NARAYANAN, S. (2000). The Preanalytic Phase. *American Journal of Clinical Pathology*, 113(3), 429–452. doi:10.1309/c0nm-q7r0-112e-b3uy.
44. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (US), 1998. Genes and disease [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22266/>

45. NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2016. Porphyrin [online]. Dostupné z: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/liver-disease/porphyria>
46. NATIONAL ORGANIZATION FOR RARE DISORDER, BALWANI, 2016. Erythropoietic Protoporphyria and X-Linked Protoporphyria [online]. Dostupné z: <https://rarediseases.org/rare-diseases/erythropoietic-protoporphyria/>
47. NATIONAL ORGANIZATION FOR RARE DISORDERS, 2015. Anemias, Sideroblastic [online]. Dostupné z: <https://rarediseases.org/rare-diseases/anemias-sideroblastic/>
48. NATIONAL ORGANIZATION FOR RARE DISORDERS, 2015. X-Linked Protoporphyria [online]. Dostupné z: <https://rarediseases.org/rare-diseases/x-linked-protoporphyria/>
49. NATIONAL ORGANIZATION FOR RARE DISORDERS, 2021. Anemias, Sideroblastic [online]. Dostupné z: <https://rarediseases.org/rare-diseases/anemias-sideroblastic/>
50. NATURE EDUCATION, 2014. DNA sequencing [online]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/definition/dna-sequencing-205/>
51. NATURE EDUCATION, 2014. Phenotype/Phenotypes [online]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/definition/phenotype-phenotypes-35/>
52. NORMAN, A., 2020. An Overview of Erythropoietic Protoporphyria [online]. Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/erythropoietic-protoporphyria-overview-4174220>
53. OGUN, A. S., JOY, N. V., VALENTINE, M., 2021. Biochemistry, Heme Synthesis [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537329/>
54. OTOVÁ, B., 2006. *Základy biologie a genetiky*. Praha: Karolinum, 181 s. ISBN 80-246-1100-7.
55. PARKER, S., 2017. Matthias Jacob Schleiden (1804–1881) [online]. Dostupné z: <https://embryo.asu.edu/pages/matthias-jacob-schleiden-1804-1881>
56. PH.D. COLLINS, F. S., 2019. Mutation [online]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mutation>
57. PH.D. EVAN M. BRAUNSTEIN, E. M., 2020. Sideroblastic Anemia [online]. Dostupné z: <https://www.msmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/anemias-caused-by-deficient-erythropoiesis/sideroblastic-anemias>

58. RIDDLE, R. D., YAMAMOTO, M., AND ENGEL, J. D. (1989) Expression of – aminolevulinate synthase in avian cells: separate genes encode erythroid-specific and nonspecific isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 792–796.
59. RIDLEY, M., 2001. *Genom.* Praha: Portál, 103 s. ISBN 80-7178-507-5.
60. ROLAND, J., 2020. What is sideroblastic anemia? [online]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/sideroblastic-anemia>
61. SCHOENHAUT, D. S., AND CURTIS, P. J. (1989) Structure of a mouse erythroid 5-aminolevulinate synthase gene and mapping of erythroid-specific DNase I hypersensitive sites. *Nucleic. Acids. Res.* 17, 7013-7028.
62. SNUSTAD, D. P., SIMMONS M. J., 2009. *Genetika*. 1. vydání. Masarykova Univerzita: Brno, 894 s. ISBN 978-80-210-4852-2.
63. SUICO, J., 2017. Sources of Error in Gel Electrophoresis [online]. Dostupné z: <https://sciencing.com/calculate-length-dna-fragments-8618578.html>
64. SURINYA, K. H., COX, T. C., AND MAY, B. K. (1998) Identification and characterization of a conserved erythroid-specific enhancer located in 38 intron 8 of the human 5-aminolevulinate synthase 2 gene. *J. Biol. Chem.* 273, 16798-16809.
65. ŠRÁM, R., 2017. Jak znečištěné ovzduší ovlivňuje lidské zdraví [online]. Dostupné z: https://www.avcr.cz/cs/o-nas/aktuality/Jak-znecistene-ovzdusi-ovlivnuje-lidske-zdravi?fbclid=IwAR0_70ncuEwjL4Fogn0yl8AuufxUXW6ry11FVRyMk4YbuByq359lzuIIMMI
66. THAPAR, M., BONKOVSKY, H. L., 2008. The Diagnosis and Management of Erythropoietic Protoporphyrinemia [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3096108/>
67. TREND, R. J., 2005. *Molecular medicine*. 3rd edition. Amsterdam:Elsevier. 320p. ISBN 978-0-12-699057-7.
68. U. S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2020. Porphyria [online]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/porphyria/>
69. U. S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2020. What is a gene mutation and how do mutations occur? [online]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/mutationsanddisorders/genemutation/>

70. U. S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2020. X-linked sideroblastic anemia [online]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/x-linked-sideroblastic-anemia/#resources>
71. UNIVERSITY OF KENTUCKY, 2015. Legacy of Thomas H. Morgan [online]. Dostupné z: <https://bio.as.uky.edu/legacy-thomas-h-morgan>
72. VLASKI, M., LAFARGE, X., CHEVALEYRE, J., DUCHEZ, P., BOIRON, J. M., AND IVANOVIC, Z. (2009) Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production ex vivo. *Exp. Hematol.* 37, 573-584.
73. WEBMD LLC, 2009. Sideroblastic Anemias [online]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/1389794-overview>
74. WEBMD LLC., 2017. Sideroblastic Anemia [online]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/a-to-z-guides/sideroblastic-anemia#1>
75. WHATLEY, S. D., DUCAMP, S., GOUYA, L., GRANDCHAMP, B., BEAUMONT, C., BADMINTON, M. N., ELDER, G. H., HOLME, S. A., ANSTEY, A. V., PARKER, M., 46 CORRIGALL, A. V., MEISSNER, P. N., HIFT, R. J., MARSDEN, J. T., MA, Y., MIELIVERGANI, G., DEYBACH, J. C., AND PUY, H. (2008) C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 408-414.

12 Seznam tabulek, grafů a obrázků

Obrázek 1: Stavba chromozomu.....	10
Obrázek 2: Stavba chromozomu X a nemoci s ním spojené.	11
Obrázek 3: Složení chromozomu a jeho části.....	12
Obrázek 4: Vztah mezi genotypem a fenotypem u krevních skupin.	14
Obrázek 5: Lokace genu ALAS2 na chromozomu X.	16
Obrázek 6: Fotocitlivá reakce běžně pozorovaná u lidí s EPP.	23
Obrázek 7:Nátěr kostní dřeně s prstencovitými sideroblasty.	24
Obrázek 8: Sekvence exonu 11.....	31
Obrázek 9: Fotografie průběhu gelové elektroforézy.....	34
Obrázek 10: Metoda Sangerova sekvenování.....	36
Obrázek 11: Fotografie gelu PCR produktů po proběhlé elektroforéze.	39
Obrázek 12: Ukázka části sekvence genu ALAS2 pro F v programu BioEdit.....	40
Obrázek 13: Ukázka části sekvence genu ALAS2 pro R v programu BioEdit.	40
Obrázek 14: Ukázka sekvence genu ALAS2 F, mezi bázemi 100-300 ve formátu PDF.	41
Obrázek 15: Ukázka sekvence genu ALAS2 R, mezi bázemi 100-300 ve formátu PDF.	41
Obrázek 16: Příklad 100% shody vyšetřovaného vzorku s databází NCBI.	42
Obrázek 17: Graf s procentuálními výsledky.	44
Obrázek 18: Příklad 91% shody vyšetřovaného vzorku č. 2 s databází NCBI.....	44
Obrázek 19: Grafické zobrazení vzorku č. 2.	45
Obrázek 20: Nečitelná sekvence vzorku č. 5 v programu BioEdit.....	45
Obrázek 21: Podezření na homozygotní mutaci vzorku č. 7.	48
Obrázek 22: Podezření na homozygotní mutaci vzorku č. 7 v grafické podobě.	48
Obrázek 23: Příklad špatně označené báze v programu BioEdit.....	51
Tabulka 1: druhy porfyrií v závislosti na mutacích v různých krocích biosyntézy hemu	18
Tabulka 2: sekvence primerů.....	32
Tabulka 3: Přehled teplotních profilů reakce PCR.	32
Tabulka 4: Program EXO na přečištění PCR produktů.....	35
Tabulka 5: Měření koncentrace DNA (1/2).....	37

Tabulka 6: Měření koncentrace DNA (2/2).....	38
Tabulka 7: Shoda vyšetřovaných sekvencí s databází NCBI (1/2).....	42
Tabulka 8: Shoda vyšetřovaných sekvencí s databází NCBI (2/2).....	43
Tabulka 9: Výsledky sekvencí dětí z oblasti Karviná.....	46
Tabulka 10: Výsledky sekvencí dětí z oblasti Českobudějovicka.....	47
Tabulka 11: Porovnání nalezených mutací mezi Karvinskem a Českobudějovickem ...	51

13 Seznam použitých zkratk

BL Buffer – Bass/Lead buffer

bp – párů bází (base pair)

ČB – České budějovice

ČR – Česká republika

ddATP – dideoxyadenosintrifosfát

ddCTP – dideoxycytosintrifosfát

ddGTP – dideoxyguanosintrifostát

ddNTP – dideoxyribonukleotid

ddTTP – dideoxythymosintrifosfát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EPO – erytropoetin

EPP – Erytropoetická protoporfyrie

K562 – lidská myelogenní leukémie

GATA – 1 – transkripční faktor

HIF – 1 – faktor 1 indukovaný hipoxií

LCD – displej z kapalných krystalů (Liquid crystal display)

LED – light-emitting diode

MEL – myší erytroleukémie

NaBu – butyryl sodný

NCBI – National Centre for Biotechnology Information

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

PDF – formát přeneseného dokumentu (Portable document format)

SA – Sideroblastická anémie

SCoA – sukcinyl koenzym A

USB – univerzální sériová sběrnice (Universal serial bus)

UV záření – ultrafialové záření