



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Vyšetření polymorfismů v genu *IFITM3* pomocí
sekvenace a jejich klinický význam pro průběh
virových onemocnění

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

Autor: Simona Trojáková

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

České Budějovice 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Vyšetření polymorfismů v genu *IFITM3* pomocí sekvenace a jejich klinický význam pro průběh virových onemocnění“ jsem vypracoval/a 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 24. 4. 2022

Podpis

Poděkování

Především děkuji své vedoucí práce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za její odborné vedení, za její trpělivost, vstřícnost, ochotu i čas, který mi při psaní mé bakalářské práce věnovala, a za poskytnutí cenných rad. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu při psaní mé bakalářské práce, ale i po celou dobu mého studia.

Vyšetření polymorfismů v genu *IFITM3* pomocí sekvenace a jejich klinický význam pro průběh virových onemocnění

Abstrakt

Interferonem indukovaný transmembránový protein 3 je protizánětlivý cytokin, který patří do skupiny interferonem stimulovaných genů. Topologie genu *IFITM3* byla objasněna analýzou elektronové paramagnetické a nukleární magnetické rezonance. Protein kódovaný tímto genem navozuje imunitu proti viru chřipky A a dalším virovým onemocněním. Dále také narušuje homeostázu intracelulárního cholesterolu, inhibuje vstup virů do cytoplazmy hostitelských buněk a inaktivuje nové obalené viry vycházející z infikované buňky. Proteiny IFITM omezují replikaci viru tak, že regulují expresi virového proteinu a snižují infekčnost vznikajících virů. Pro objasnění mechanismu účinku proteinu IFITM3 a jeho vlivu na závažnost průběhu virového onemocnění je analýza jednonukleotidových polymorfismů v genu *IFITM3* velmi významná.

Teoretická část se zabývá rodinou interferonem indukovaných transmembránových proteinů, dále především popisem a funkcí genu *IFITM3* včetně jeho polymorfismů. Tento gen je lokalizován na chromozomu 11 a jeho velikost je přibližně 18 Kb. Genová variabilita *IFITM3* může zásadně ovlivnit průběh chřipky i jiných virových onemocnění.

Praktická část bakalářské práce je zaměřena na detekci polymorfismů rs12252, rs34481144 a rs1136853 v genu *IFITM3* pomocí metody PCR a přímé sekvenace. V rámci této části bylo nutné zvládnout některé základní laboratorní metody jako je izolace DNA z primárních vzorků, metoda PCR, příprava PCR produktu pro sekvenaci, analýza sekvenačních dat, zpracování výsledků a určení konkrétních genotypů u testovaných jedinců.

Klíčová slova

IFITM3; polymorfismus; PCR reakce; sekvenace; virová onemocnění

Examination of polymorphisms in the IFITM3 gene using sequences and their clinical significance for the course of viral diseases.

Abstract

Interferon Induced Transmembrane Protein 3 is an anti-inflammatory cytokine that belongs to the group of interferon-stimulated genes. The topology of the *IFITM3* gene was clarified by the analysis of electron paramagnetic and nuclear magnetic resonance. The protein encoded by this gene induces immunity against influenza A virus and other viral diseases. It also disturbs the homeostasis of intracellular cholesterol, inhibits the entry of viruses into the cytoplasm of the host cells and inactivates new enveloped viruses originating from an infected cell. IFITM proteins reduce virus replication by regulating the expression of viral protein and by reducing the infectivity of developing viruses. The analysis of the single-nucleotide polymorphisms in the *IFITM3* gene is very significant to clarify the mechanism of the effect of the IFITM3 protein and its influence on the severity of the course of the viral diseases.

The theoretical part deals with the description of Interferon Induced Transmembrane Proteins, particularly the description and function of the *IFITM3* gene, including its polymorphisms. This gene is located on chromosome 11 and its size is approximately 18 Kb. The gene variability of the *IFITM3* can fundamentally affect the course of influenza and other viral diseases.

The practical part of the thesis focuses on the detection of polymorphisms rs12252, rs34481144 and rs1136853 in the *IFITM3* gene using the PCR method and Sanger sequencing method. It was necessary to master some basic laboratory methods such as DNA isolation from primary samples, PCR method, preparation of the PCR product for sequencing, sequencing data analysis, processing of results and determination of specific genotypes in tested individuals.

Key words

IFITM3; polymorphism; PCR reaction; sequencing; viral diseases

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Proteiny IFITM	9
2.2	Geny IFITM	12
2.2.1	Funkce IFITM3	14
2.2.2	Polymorfismy v genu IFITM3	14
2.3	IFITM3 a jeho spojitost s onemocněními u člověka	18
2.3.1	Virus chřipky H1N1	18
2.3.2	Západonilská horečka a Zika virus	24
2.3.3	Onemocnění způsobená filoviry a koronaviry	25
2.3.4	Proteiny IFITM podporují infekci SARS-CoV-2	25
2.3.5	Virus lidské imunitní nedostatečnosti	26
2.3.6	DNA viry	27
2.3.7	Neurologické poruchy v souvislosti s genem IFITM3	28
2.3.8	Nádorová onemocnění	29
3	Cíle práce	31
4	Praktická část	32
4.1	Popis souboru	32
4.2	Preanalytická část	32
4.2.1	Materiál	33
4.2.2	Bukální stěr	33
4.2.3	Periferní krev	33
4.3	Izolace DNA	34
4.3.1	Izolace DNA z bukálního stěru	34
4.3.2	Izolace DNA z periferní krve	35
4.4	Měření koncentrace DNA	36

4.5	PCR reakce.....	37
4.6	Gelová elektroforéza	39
4.6.1	Příprava gelu	39
4.6.2	Aplikace vzorků na gel	40
4.7	Sekvence.....	41
4.7.1	Přečištění PCR produktu.....	42
4.7.2	Příprava vzorků pro sekvenaci.....	42
4.7.3	Vyhodnocení sekvenačních reakcí.....	43
5	Výsledky.....	47
5.1	Zjištěné varianty v genu IFITM3	47
5.2	Frekvence jednotlivých genotypů v souboru 1 + 2	50
5.3	Dotazníkové šetření.....	52
6	Diskuze	56
7	Závěr	59
8	Přílohy	60
	Seznam použitých zdrojů.....	66
	Seznam obrázků.....	78
	Seznam tabulek.....	79
	Seznam zkratk.....	80

1 Úvod

Téma mé bakalářské práce, „Vyšetření polymorfismů v genu *IFITM3* pomocí sekvenace a jejich klinický význam pro průběh virových onemocnění“, jsem si vybrala díky aktuální zdravotnické situaci ve světě, která souvisí s výskytem viru *SARS-CoV-2*. Gen *IFITM3* je úzce spjat s chřipkou i jinými virovými onemocněními včetně COVID 19. Tomuto genu a jeho polymorfismům by, podle mého názoru, měla být věnována větší pozornost.

Genetické polymorfismy jsou definovány jako výskyt více různých alel v konkrétním lokusu s frekvencí vyšší než 1 % v populaci. Nejběžnější typ polymorfismu zahrnuje záměnu jediného páru bází. Polymorfismy mohou být také mnohem větší a mohou zahrnovat dlouhé úseky DNA. Mezi nejmenší možné změny v sekvenci DNA u jedinců dané populace patří záměna jednoho nukleotidu za jiný. Tyto změny označujeme jako jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphism – SNP). SNP se v genomu nachází v 1 z 1000 párů bází (bp) v libovolně vybraném úseku genomu, což vyplývá z různých sekvenačních projektů. Jednotlivé SNP se mohou, ale nemusí projevit ve struktuře a funkci proteinu. Příkladem SNP s fenotypovým projevem mohou být polymorfismy v genu *IFITM3*, které úzce souvisí s těžkým průběhem virových onemocnění jako je např. chřipka. Genetické riziko ovlivňující průběh virových onemocnění není v naší populaci dostatečně prozkoumán a není zohledněn ani jeho diagnostický význam. Jelikož ročně na chřipku i jiná virová onemocnění (aktuálně Covid-19) umírá velké množství lidí, bylo by vhodné této problematice věnovat větší pozornost.

Jednotlivé genotypy genu *IFITM3* určujeme na základě vyšetření DNA pacienta pomocí molekulárně-genetických metod. Pomocí sekvenace DNA dokážeme určit přesné pořadí bází, které tvoří molekulu DNA a daná sekvence bází DNA nese informaci, nezbytnou pro transkripci, syntézu RNA, translaci a sestavení molekuly proteinu. Metody, které bylo nutné použít, abychom získali vzorky pro sekvenaci byly izolace DNA, měření koncentrace DNA, PCR reakce a gelová elektroforéza.

V praktické části bakalářské práce jsou pomocí metody přímé sekvenace analyzovány vzorky pacientů z genetiké laboratoře GENLABS s.r.o, konkrétně polymorfismy rs12252, rs 34481144, rs1136853 v genu *IFITM3*. Tyto polymorfismy souvisejí s různě závažným průběhem některých virových onemocnění.

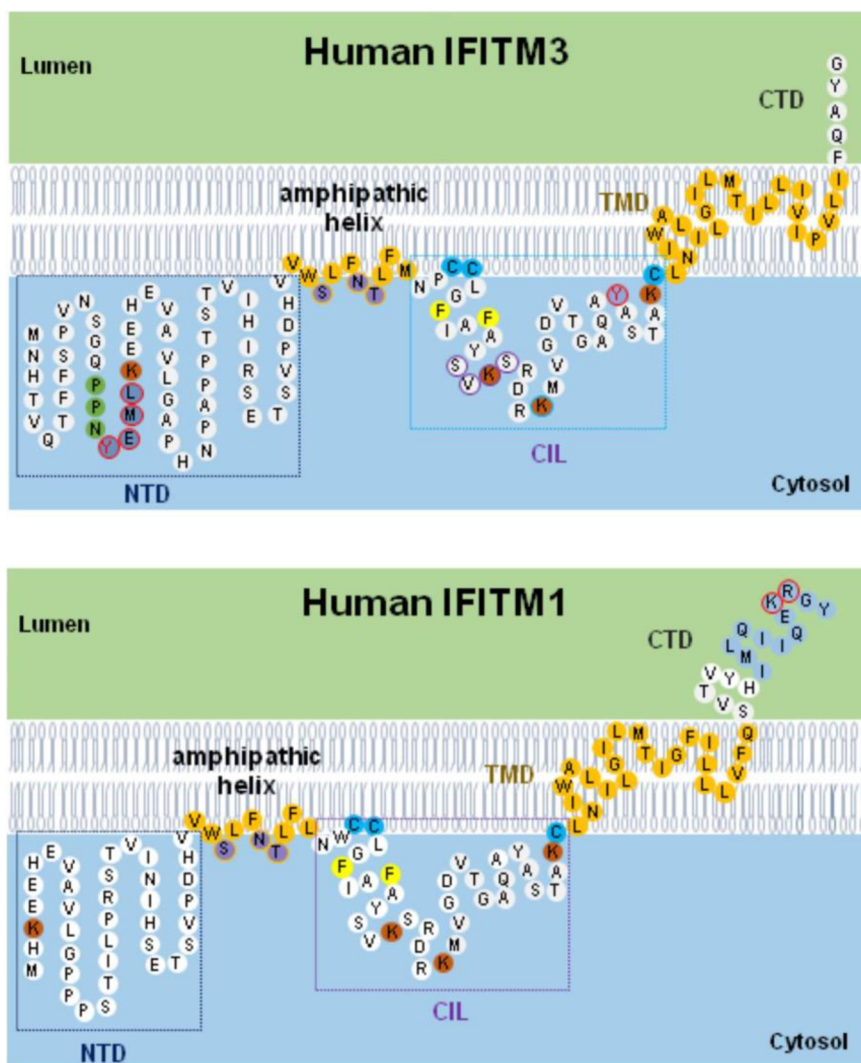
2 Teoretická část

2.1 Proteiny IFITM

V teoretické části se věnuji popisu interferonem indukovaných transmembránových proteinů (IFITM), zejména genu *IFITM3*, jeho funkci v lidském těle a také jeho genové variabilitě. Zabývám se nejen tím, jak *IFITM3* a jeho polymorfismy mohou ovlivňovat průběh chřipky a dalších virových onemocnění, ale také způsobům detekce polymorfismů v genu *IFITM3*.

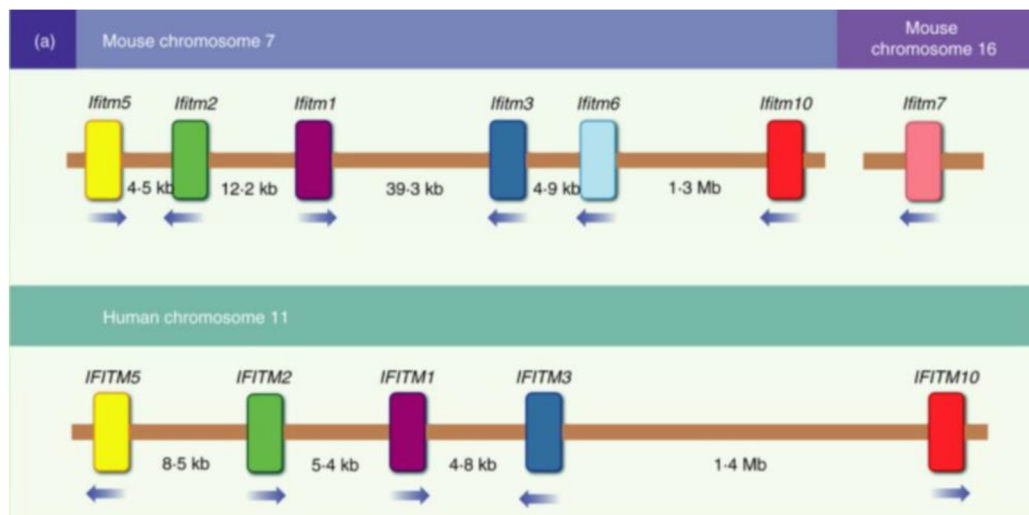
Interferonem indukované transmembránové proteiny (IFITM) patří do skupiny malých proteinů, které se vyskytují v plazmě a endozomálních membránách. Inhibují vstup viru do hostitelských buněk přerušením membránové fúze mezi virovým obalem a buněčnými membránami. Dále snižují produkci infekčních virionů nebo infekčnost virionů potomstva. Některé viry se mohou vyhnout omezení IFITM, dokonce mohou unést antivirové proteiny, aby usnadnily svůj infekční vstup do hostitelských buněk nebo podpořily sestavení virionů, pravděpodobně modulací membránové fúze. Geny *IFITM* se u obratlovců vyvinuly zrychleně a podobně tomu bylo i u mnoha jiných genů, které slouží k obraně hostitele. Zrychleně znamená pod selektivním tlakem infekcemi mikroorganismy. V lidské populaci bylo identifikováno mnoho jednonukleotidových polymorfismů (SNP), z nichž některé byly spojeny se závažností a prognózou virových infekcí (Zhao *et al.*, 2019).

IFITM proteiny jsou evolučně konzervovány a můžeme je nalézt v jednobuněčných organismech i u obratlovců (Siegrist *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Geny kódující IFN-indukované transmembránové proteiny 1, 2, a 3 patří mezi první identifikované IFN-stimulované geny (ISG) (Friedman *et al.*, 1984). Z počátku byly studovány z hlediska jejich významu při dělení a zrání zárodečných buněk. Proteiny IFITM mají délku přibližně 130 aminokyselin (AMK), nemají žádnou katalytickou podjednotku, ale sdílejí podobnou doménovou architekturu sestávající z krátké N-terminální domény, dvou antiparalelních domén, konzervované intracelulární smyčky a hydrofobní C-terminální domény (Poddar *et al.*, 2016). Topologie *IFITM3* (viz Obr. 1) byla objasněna pomocí elektronové paramagnetické a nukleární magnetické rezonance (Ling *et al.*, 2016).



Obrázek 1: Schématický diagram topologie IFITM1 a IFITM3 a strukturální determinanty podstatné pro modulaci virového vstupu. Na tomto obrázku je znázorněno pět strukturálních domén, včetně N-terminální domény (NTD), amfipatické helixové domény (AHD), intracelulární smyčky (CIL), transmembránové domény (TMD) a C-terminální domény (CTD). Dvě domény spojené s membránou (AHD a TMD) jsou označeny světle oranžovou barvou. V IFITM3 jsou přítomny tři hydrofilní zbytky (S61, N64 a T65) v amfipatické šroubovici označeny fialově. V doméně NTD je motivů YEML požadovaných pro endocytózu IFITM3 zobrazeno modře s červeným kroužkem a zeleně je zobrazeno motivů PPNY rekrutujících NEDD4 E3 ligázu. V doméně CIL, SVKS motiv požadovaný pro IFITM3 k inhibici infekce IAV, DNEV a LLOV je označen fialovým kroužkem. Na obrázku jsou vyznačeny také zbytky s posttranslační modifikací, včetně fosforylace (Y20 a Y99 označené červeným kroužkem), palmitoylace (C71, C72 a C105 označeny světle modrou barvou) a ubiktivace (zvýrazněny oranžově). Žlutě jsou označeny dva zbytky (F75 a F78) nezbytné pro oligomerizaci. Modře je v IFITM1 označeno C-koncových 12-aa zbytků kritických pro modulaci vstupu lidských koronaviřů a červeným kroužkem je znázorněn KR dibazický motiv vytvořený jako IFITM1 třídící signál (převzato dle Zhao et al., 2019).

V lidské populaci se vyskytuje pět členů IFITM genové rodiny. Do této rodiny patří IFITM1, IFITM2 a IFITM3, tyto souvisejí s imunitou a mají antivirovou funkci. Dalšími jsou proteiny IFITM5 a IFITM10, u nichž není známa žádná role v imunitě. Předpokládá se, že zabraňují splynutí virového obalu s membránou endozomu, ale přesný mechanismus je zatím nejasný (Diamond a Farzan; 2013).



Obrázek 2: Topologie proteinu IFITM v lidském a myším genomu (převzato a upraveno dle Yánez et al., 2019).

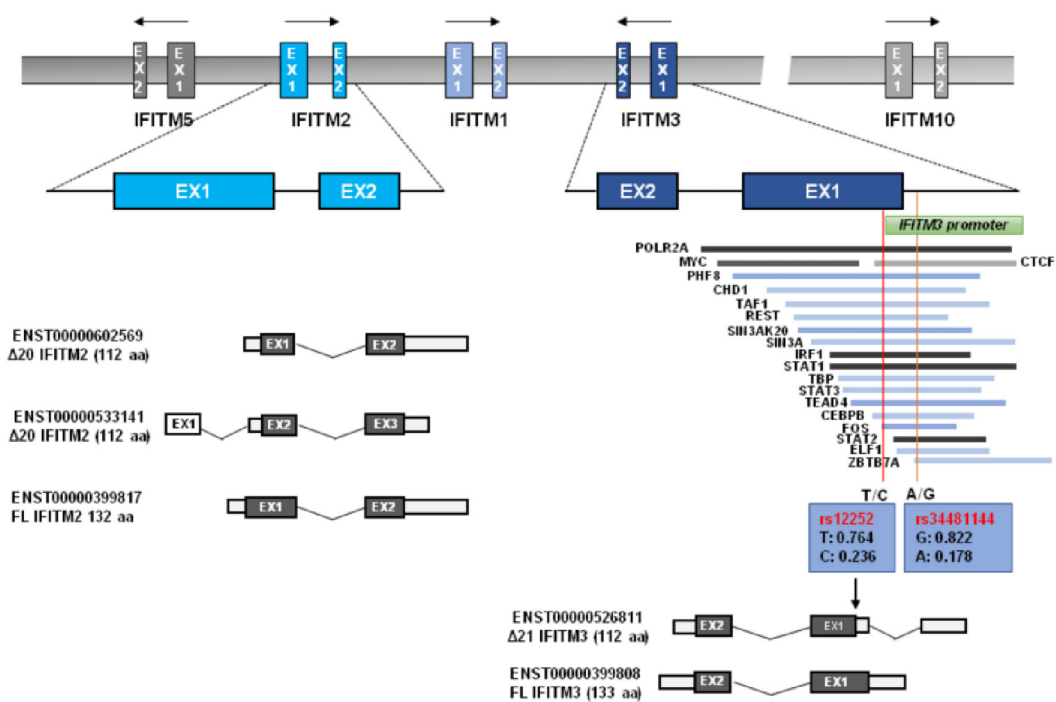
Proteiny IFITM se podílejí na mnoha aspektech interakce virus-hostitel a hrají důležitou roli ve virové patogenezi. Několik polymorfismů (SNP) v genu *IFITM3*, které byly identifikovány u lidí, je spojováno s různě závažným průběhem virového onemocnění včetně viru chřipky A (IAV), ale i jiných virových infekcí. Tyto SNP buď mění expresi *IFITM3*, nebo vedou k expresi N-koncové zkrácené izoformy *IFITM3*, *A21-IFITM3*, se sníženou antivirovou aktivitou proti různým virům (Everitt et al., 2012; Allen et al., 2017).

Odpověď na interferon typu I (IFN) je kritickým faktorem, který řídí vrozenou ochranu organismu proti virovým patogenům a indikuje expresi stovek genů. ISG mohou inhibovat více stádií životního cyklu viru (např. vstup, translaci proteinu, sestavení nebo výstup viru) nebo modulovat imunitní odpověď (např. zesílení nábory leukocytů nebo podpora zrání T a B buněk) (Diamond a Farzan; 2013). Přestože všechny *IFITM1*, *-2*, a *-3* vykazují antivirovou aktivitu, *IFITM3* vykazuje největší ochranu proti nejširšímu spektru virů, včetně viru chřipky A (IAV), flavivirů (virus Horečky Dengue, virus Západonilské horečky, virus japonské encefalitidy), hepacivirů (virus hepatitidy C), filovirů (viry Ebola a Marburg), bunyvirů (viry horečky Rift, Valley a La Crosse), rhabdovirů (virus vezikulární

stomatitidy), koronavirů (koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu – SARS-CoV), paramyxovirů (respirační syncytiální virus - RSV) a reovirů (Brass *et al.*, 2009; Narayana *et al.*, 2015).

2.2 Geny *IFITM*

Geny *IFITM* kódující proteiny IFITM 1, 2 a 3 patří mezi první identifikované IFN-stimulované geny (ISG) (Friedman *et al.*, 1984). Z počátku byly tyto geny studovány z hlediska jejich významu při navádění a zranění zárodečných buněk. Lidské homology tohoto genu včetně *IFITM1*, *IFITM2* a *IFITM3* jsou lokalizovány na chromosomu 11 v genové sekvenci o velikosti 18 Kb (Obrázek 3).



Obrázek 3: Struktura genu *IFITM*. Modrou barvou jsou označeny geny *IFITM1*, 2 a 3 lokalizované na chromosomu 11p15.5 a jejich exony těchto genů související s imunitou. Předpokládané přepisy *IFITM2* a *IFITM3* jsou uvedeny ve spodní části obrázku. Dvě červené svíslé čáry označují vazebná místa transkripčního faktoru a SNP spojené s chřipkou (rs12252 a rs34481144), u kterých jsou uvedeny také populační frekvence alel v daném pořadí. (převzato a upraveno dle Zhao *et al.* 2019).

IFITM1, 2 a 3 jsou exprimovány v široké škále tkání, zatímco exprese *IFITM5* je pravděpodobně omezena na kost. Pro objasnění molekulárního mechanismu, kterým *IFITM3* reguluje endozomální funkci, zkoumali Ibi *et al.*, 2008 protein-proteinové interakce *IFITM3* s uváděnými partnery, jako je visfatin a ATP6V0B. Zjevné interakce těchto molekul však nebyly pozorovány v mozkových extraktech z neonatálních myší ošetřených polyI:C (polyribonoinosin-polyribocytidylový kyselina) a v buňkách COS7 kotransfektovaných lidským RalA označeným HA (HA-RalA) a myc-*IFITM3* (Ibi *et al.*, 2008). Roli v regulaci endozomální funkce v astrocytech mohou hrát S-palmitoylace a ubiktivace genu *IFITM3* (Yount *et al.*, 2012). Různé studie a zjištění naznačují, že ačkoli gen *IFITM3* zprostředkovává buněčnou rezistenci vůči mnoha patogenním virům v periferních orgánech, mohl by narušit mozkové funkce a vývoj v nezralém mozku (Brass *et al.*, 2009; Everitt *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2011).

Proces indukce ISG začíná po fúzi virového obalu s buněčnou endozomální membránou, kdy je virový genetický materiál uvolněn do cytoplazmy a umožňuje jeho rozpoznání receptory pro rozpoznávání buněčných vzorů (PRR), které stimulují sekreci IFN typu I (Heil *et al.*, 2004; Kawai a Akira, 2010; Kim *et al.*, 2016).

Např. protein IFITM3 omezuje chřipku tím, že zabraňuje tvorbě fúzních pórů nezbytných pro uvolnění virového genetického materiálu do cytoplazmy, čímž ruší replikaci viru (Feeley *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Suddala *et al.*, 2019). Tento protein poskytuje imunitu proti viru chřipky A (H1N1), viru Západonilské horečky a viru Horečky Dengue. U genu *IFITM3* byly popsány dvě transkripční varianty, ale pouze jedna z nich kóduje proteiny. Dále byla popsána varianta kódující N-terminálně zkrácenou izoformu, ale charakter této varianty v plné délce nebyl stanoven. Protivirový protein indukovaný IFN narušuje homeostázu intracelulárního cholesterolu, inhibuje vstup virů do cytoplazmy hostitelských buněk tak, že brání fúzi viru s endozomy ochuzenými o cholesterol, inaktivuje nové obalené viry. Dále má zásadní význam ve strukturální stabilitě a funkci vakuolární ATPázy (v-ATPázy). Navazuje kontakt s v-ATPázou endozomů, což je zásadní pro správnou lokalizaci klatrinu a snížení pH ve fagocytických endozomech, čímž se navodí antivirový stav (Hu *et al.*, 2014).

2.2.1 *Funkce IFITM3*

Ačkoli většina vědců věří, že proteiny *IFITM* se omezují viry tím, že brání fúzi viru a buňky, nebylo v současné době dosaženo jasné shody ohledně integrovaného antivirového mechanismu *IFITM*. Dosavadní studie odhalily, že *IFITM* omezují replikaci viru regulací exprese virového proteinu a snížením infekčnosti vznikajících virů (Comton *et al.*, 2016; Tartouret *et al.*, 2017).

Mechanismus omezení virů genem *IFITM3* musí být ještě plně objasněn, ale je pravděpodobné, že *IFITM3* tvoří součást membránového složení endozomálních kompartmentů, kde brání vstupu viru do cytosolu. Důkazem je, že časná stádia chřipkové infekce, jako je vazba na receptor kyseliny sialové, endocytóza a transport do pozdního endozomu, jsou konzervovány v přítomnosti *IFITM3* (López-Rodriguez *et al.*, 2016; Weeet *et al.*, 2012). Předpokládalo se, že proteiny *IFITM* mohou snížit fluiditu membrány zvýšením endozomálního cholesterolu, který změní zakřivení membrány a brání hemifúzi (Amini-Bavil-Olyaeet *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2014).

I když je jasné, že *IFITM3* omezuje virovou infekci tím, že brání uvolňování virových částic do cytoplazmy, mechanismus, kterým toho dosahuje, není stále úplně objasněn. Objasnění významu SNP v genu *IFITM3*, které přispívají k variabilitě chřipkové infekce, má proto vysokou prioritu.

2.2.2 *Polymorfismy v genu IFITM3*

IFITM hrají klíčovou roli při omezování infekce více viry a jakákoli genetická variace, která ovlivňuje expresi nebo funkci *IFITM* může nakonec ovlivnit patogenezí viru. Přirozená variabilita v *IFITM* byla rozsáhle zkoumána. V současné době jsou hlášeny desítky SNP v *IFITM3*. Některé z nich mohou modulovat expresi *IFITM3*, ovlivnit sestřih RNA nebo se jedná o nesynonymní nebo synonymní polymorfismy. Několik SNP, které ovlivňují funkci *IFITM*, bylo zkoumáno pro jejich souvislost s morbiditou, závažností a prognózou onemocnění způsobených infekcí mikroorganismy (Zhao *et al.*, 2019).

Ve studii David *et al.*, 2018 bylo detekováno celkem sedm SNP v genu *IFITM3* v oblasti o velikosti 325 bp. Mezi nimi byly i čtyři již dříve popsány varianty a to SNP rs34481144, dvě synonymní SNP rs12252 a rs11553885, vzácná varianta missence rs1136853 a další tři synonymní varianty.

V tabulce jedna je uveden přehled nejvýznamnějších SNP v genu IFITM3 spolu s populačním zastoupením jednotlivých genotypů. Z uvedených dat jasně vyplývá, že některé SNP jsou vysoce populačně specifické, např. rs12252 CC se v evropské populaci nevyskytuje, zatímco ve východoasijské populaci je přítomen u 30 % jedinců. Naopak rs34481144 AA se vyskytuje u 22 % evropské populace, ačkoli není přítomen ve východoasijské ani africké populaci.

Tabulka 1: Výčet vybraných polymorfismů genu IFITM3 a jejich populační frekvence. (převzato a upraveno dle David et al., 2018).

Označení polymorfismu	Možné genotypy	Východní Asie (%)	Evropa (%)	Afrika (%)
rs34481144 c.-23G>A (5' UTR)	AA	0	22	0
	AG	0	49	10
	GG	99	29	89
rs12252 c.42T>C (p.Ser14Ser)	CC	30	0	6
	CT	38	7	36
	TT	32	93	58
rs11553885 c.165C>T (p.Pro55Pro)	TT	-	-	-
	TC	-	-	-
	CC	-	-	-
rs1136853 c.9C>A (p.His3Gln)	AA	0	0	0
	AC	0	4	12
	CC	100	95	87
SNP cd11 c.33T>C (p.Pro11Pro)	CC	-	-	-
	CT	-	-	-
	TT	-	-	-
rs56323507 c.51C>T (p.Pro17Pro)	TT	-	-	-
	TC	-	-	-
	CC	-	-	-
rs56020216 c.60T>C (p.Tyr20Tyr)	CC	-	-	-
	CT	-	-	-
	TT	-	-	-

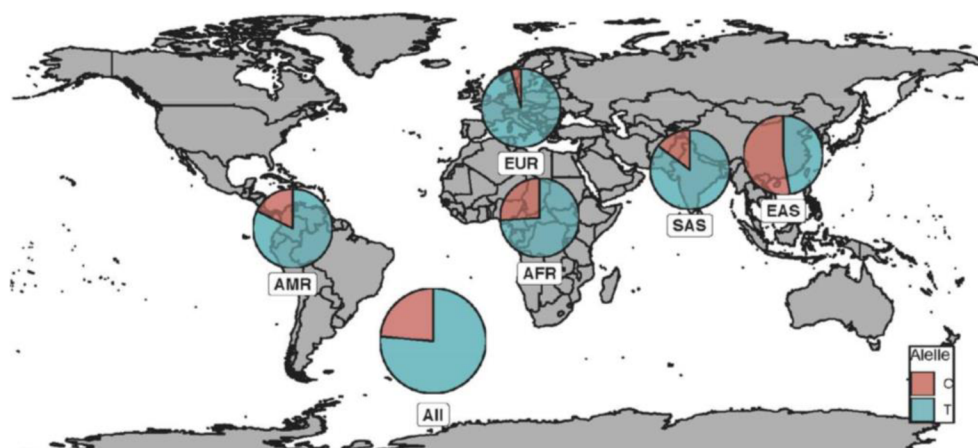
Polymorfismy, které mohou modulovat úroveň exprese nebo integritu proteinu *IFITM3*, jsou považovány za klíčové faktory antivirové kapacity. Nedávné studie poskytují důkazy o tom, že protein *IFITM3* také souvisí s adaptivní imunitou hostitele (Yánez *et al.*, 2020). Mimo to je spojován s protilátkovou odpovědí na vakcínu proti chřipce a zabraňuje infekci buněk (Lei *et al.*, 2020).

- ***IFITM3* SNP rs 12252**

Nejvíce studovaným SNP spojeným s vážnými následky infekce chřipkového viru A je SNP rs12252, což je nesynonymní varianta v prvním exonu *IFITM3* (Everitt *et al.*, 2012). Předpokládá se, že SNP rs12252-C způsobuje nesprávnou lokalizaci *IFITM3*, a tedy neschopnost inhibovat infekci virem chřipky (Everitt *et al.*, 2012; Chesarino *et al.*, 2014). Substituce hlavní alely T alternativní alelou C změní sestřih *IFITM3* mRNA a vytvoří N-koncově zkrácenou variantu *IFITM3* s delecí 21 aminokyselinových zbytků (A21-*IFITM3*) (Everitt *et al.*, 2012). Východní Asie má významně vyšší prevalenci SNP rs12252 ve srovnání s Evropskou populací a homozygotní genotyp CC i heterozygotní genotyp TC zde vykazuje významně vyšší frekvenci (Everitt *et al.*, 2012). Oblast enzymu *IFITM3*, která v tomto případě v důsledku mutace chybí (vzniká zkrácený protein), obsahuje regulační motiv YEML, který navádí *IFITM3* do pozdních endozomů, multivezikulárních tělísek a lyzozomů (Chesarino *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2014). Polymorfismus rs12252 modifikuje intracelulární lokalizaci a hladiny *IFITM3*, které následně interferují s restrikcí viru chřipky (Everitt *et al.*, 2013; Compton *et al.*, 2016). Navzdory tomu některé studie ukázaly, že pacienti s homozygotním genotypem CC v rs12252 vykazovali většinu transkriptů *IFITM3* jako kompletní izoformu. Je zajímavé, že přítomnost genotypu CC u polymorfismu rs12252, ale i rs5743313, kumulativně vedla ke zvýšenému riziku úmrtí u chřipkové infekce (Lee *et al.*, 2012). Dvě práce informovaly o tom, že tento polymorfismus predisponoval jedince k těžké až fatální infekci H1N1 IAV (Gounder a Boon, 2019). Jak už bylo výše zmíněno, polymorfismus rs12252-C ovlivňuje sestřih a zkrácení RNA proteinu *IFITM3*. Mechanismus, kterým tento SNP ovlivňuje náchylnost k onemocnění IAV zůstává neznámý (Gounder a Boon, 2019). Výskyt genotypů pro SNP rs12252 je uveden v tabulce 2 a celosvětová distribuce alel T a C je znátorněna na obrázku 4.

Tabulka 2: Výskyt genotypů pro SNP rs12252. Uvedené frekvence byly zjištěny na základě populační studie 1000 genomů. (převzato a upraveno dle Kim Et al., 2020).

	TT	TC	CC
Amerika	235	101	11
Afrika	363	252	46
Evropa	462	41	0
Jižní Asie	360	114	15
Východní Asie	123	230	151
Korea	61	103	41



Obrázek 4: Polymorfismus rs12252 genu *IFITM3*: celosvětová distribuce hlavní (T) a vedlejší (C) alely. Zkratky: EUR – Evropa; SAS – Jižní Asie; EAS – Východní Asie; AFR – Afrika; AMR – Amerika (převzato a upraveno dle Wellington Et al., 2019).

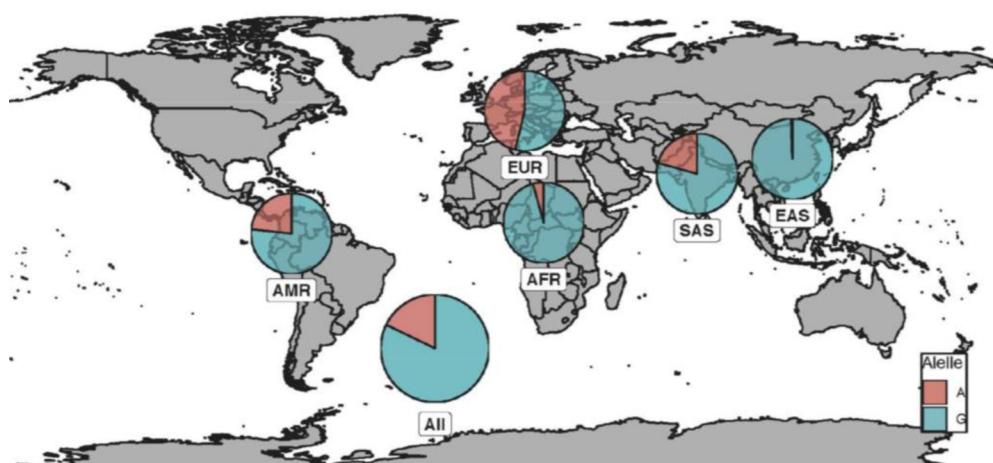
- ***IFITM3* SNP rs34481144**

SNP rs34481144, umístěný v oblasti promotoru, je spojován s těžkým průběhem chřipky v evropské, asijské a africké populaci (Allen Et al., 2017). Tento polymorfismus ovlivňuje hladinu exprese genu *IFITM3* v CD8+ T-buňkách. Dřívější studie na myších ukazují, že exprese *IFITM3* chrání tkáňové rezidentní paměťové T-buňky před infekcí IAV (Gounder a Boon, 2019). Většinová alela G řídí aktivitu promotoru *IFITM3* a určuje hladinu exprese *IFITM3*, zatímco minoritní alela A vykazuje nižší vazebnou aktivitu na IRF3 a vyšší vazebnou aktivitu na transkripční represor CTCF, což vede k nižší expresi *IFITM3*.

Frekvence alely rs34481144-G je vyšší v populaci východní Asie a Afriky ve srovnání s Evropou (Allen et al., 2017). Polymorfismus rs34481144 byl spojen s těžkým onemocněním IAV převážně u neasijských populací (Gounder a Boon, 2019). Výskyt genotypů pro SNP rs34481144 je uveden v tabulce 3 a celosvětová distribuce alel T a C je znátorněna na obrázku 5.

Tabulka 3: Výskyt genotypů pro SNP rs34481144. Uvedené frekvence byly zjištěny na základě populační studie 1000 genomů. (převzato a upraveno dle Kim *Et al.*, 2020).

	GG	GA	AA
Amerika	213	106	28
Afrika	605	55	1
Evropa	148	245	110
Jižní Asie	305	166	18
Východní Asie	498	6	0
Korea	205	0	0



Obrázek 5: Polymorfismus rs34481144 genu IFITM3: celosvětová distribuce hlavní (G) a vedlejší (A) alely genu. Zkratky: EUR – Evropa; SAS – Jižní Asie; EAS – Východní Asie; AFR – Afrika; AMR – Amerika (převzato a upraveno dle Wellington *Et al.*, 2019).

2.3 IFITM3 a jeho spojitost s onemocněními u člověka

2.3.1 Virus chřipky H1N1

Virus chřipky patří mezi 10 nejčastějších příčin úmrtí člověka. I přes to, že virus chřipky primárně infikuje plíce, jsou u této infekce zdokumentovány i srdeční komplikace (Kodama, 2010). Virus chřipky je kardiotropní virus, který se může šířit z plic a infikovat srdeční tkáň a to zejména během těžkých infekcí (Kenney *et al.*, 2019). Virus tedy může způsobit těžkou myokarditidu a srdeční dysfunkci i u jedinců bez preexistujícího kardiovaskulárního onemocnění. Příznaky myokarditidy byly pozorovány až u 13 % jedinců hospitalizovaných pro infekci virem chřipky (Kodama, 2010; Ukimura *et al.* 2013). Myokarditida byla dále hlášena po pitvě až u 48 % smrtelných případů sezónní chřipky a přelomová pitevní studie zaznamenala vážné poškození srdce u většiny ze 126 pacientů vyšetřovaných poté, co podleli infekci viru chřipky H1N1 při pandemii v roce 1918

(Kenney *et al.*, 2019). Ačkoli jsou závažné infekce virem chřipky spojeny s infekcí a patologií srdce, základní mechanismy vedoucí k těmto účinkům nejsou známy.

Přestože proteiny *IFITM* mohou omezit infekci mnoha virů v buněčné kultuře, jejich význam *in vivo* v kontextu komplexní odpovědi IFN se stovkami dalších ISG zůstává nejasný. Virus chřipky A je velký 50 – 100 nm, kóduje až 11 proteinů a obsahuje osm segmentů negativní jednovláknové genomické RNA. Infekce virem chřipky A začíná štěpením a aktivací obalového receptoru virového hemaglutininu (HA) proteázami hostitele (Mercer *et al.*, 2010; Lazarowitz a Coppin, 1975). HA se pak váže na sialylované proteiny na buněčném povrchu a vyvolává endocytózu virových částic. Endocytované viry jsou transportovány časnými a pozdními endozomy, přičemž pozdní endozomální acidifikace spouští konformační změnu v HA, která vede k fúzi viru k membráně hostitele (Mercer *et al.*, 2010). Fúze přechází z hemifúzního meziproductu do fúzního póru, kterým do cytosolu vstupuje osm virových ribonukleotidů (vRNA) nebo mRNA, které jsou následně vedeny karyoferiny hostitelské buňky do jádra, kde virová RNA – dependentní RNA polymeráza syntetizuje virové genomy (vRNA) a mRNA, které jsou exportovány do cytosolu (Feeley *et al.*, 2011).

Dvě publikace uvádějí, že homozygotní myši *IFITM3*^{-/-} jsou náchylnější k infekci virem chřipky (Bailey *et al.*, 2012; Everitt *et al.*, 2012). Tyto studie popsaly zvýšené titry IAV v plicích, zvýšenou patologii a snížené CD4⁺ T buňky, CD8⁺ T buňky a NK buňky u *IFITM3*^{-/-} myši ve srovnání s myšmi divokého typu (WT). Jedna z těchto studií popsala výše uvedený lidský polymorfismus *IFITM3* SNP-rs12252-C, který změní místo akceptoru sestříhu a zkrátí *IFITM3* o 21 N-koncových aminokyselin. Tento zkrácený protein *IFITM3* vykazuje změněnou buněčnou lokalizaci a sníženou antivirovou aktivitu proti IAV (Everitt *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2014). Druhá studie prokázala, že CD8⁺ T buňky exprimovaly vysoké hladiny *IFITM3* v plicích po infekci IAV a že exprese *IFITM3* byla důležitá pro přežití paměťových T buněk, které jsou schopny organismus ochránit při opětovném napadení virem (Wakim *et al.*, 2013).

Jednonukleotidové polymorfismy v genu *IFITM3* nebo jeho promotoru patří mezi jediné genetické faktory, které byly opakovaně spojeny s těžkým průběhem chřipky u lidí (Lucke, Wight a Kime, 1919). *IFITM3* přímo omezuje infekci virem chřipky inhibicí vstupu viru do buněk a také poskytuje sekundární funkci při tlumení zánětlivých cytokinových odpovědí, které poškozují tkáň (Kenney *et al.*, 2019).

- ***Demografie chřipkové infekce***

Závažnost onemocnění chřipky u lidí je vysoce variabilní a jedním z genetických determinantů těchto rozdílů je právě gen *IFITM3*. Jako efektor reakce na interferon *IFITM3* účinně blokuje cytosolický vstup viru chřipky A (IAV). Předpokládá se, že vnější faktory, jako je věk, pohlaví a etnický původ jedince ovlivňují závažnost virové infekce také (Wellington *et al.*, 2019).

- ***Stáří***

Věk byl popsán jako důležitý rizikový faktor závažnosti a morbidit chřipkové infekce (Mertz *et al.*, 2013). Zvláště ohroženi jsou lidé starší 65 let (Lemaitre *et al.*, 2012). Děti mladší 5 let jsou rovněž považovány za vysoce rizikové osoby (Mauskopf *et al.*, 2013). Metaanalýza z roku 2013 však ukázala, že tato skupina měla ve skutečnosti nižší riziko úmrtí a hospitalizace, ale vyšší riziko rozvoje pneumonie (Mertz *et al.*, 2013). Zajímavá je skutečnost, že velmi pravděpodobně existuje rozdíl v míře úmrtnosti v závislosti na tom, zda se jedná o epidemii (jedna nebo více komunit) nebo pandemii (celosvětově) s posunem k mladším věkovým skupinám během pandemií. Zatímco staří lidé jsou ohroženi spíše během epidemií (Lemaitre *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2009).

- ***Etnická příslušnost***

Citlivost k chřipkové infekci obecně nevykazuje žádnou souvislost s etnickým původem, protože tyto údaje jsou zkresleny socioekonomickými faktory. Byly provedeny výzkumy, ve kterých byly identifikovány rizikové skupiny. Ve studii provedené v Kanadě byla jako rizikový faktor se zvýšenou úmrtností nebo mírou hospitalizace ve srovnání s evropskými potomky popsána zejména původní etnicita (Wilson *et al.*, 2012). Zajímavým rysem pandemie z roku 1918 bylo to, že úmrtnost v čínské populaci byla relativně nízká. I když to může být důsledkem špatného vedení záznamů, je důležité mít na paměti, že některé populace mohou reagovat na různé kmeny chřipky lépe nebo hůře (Cheng *et al.*, 2007).

- ***Pohlaví***

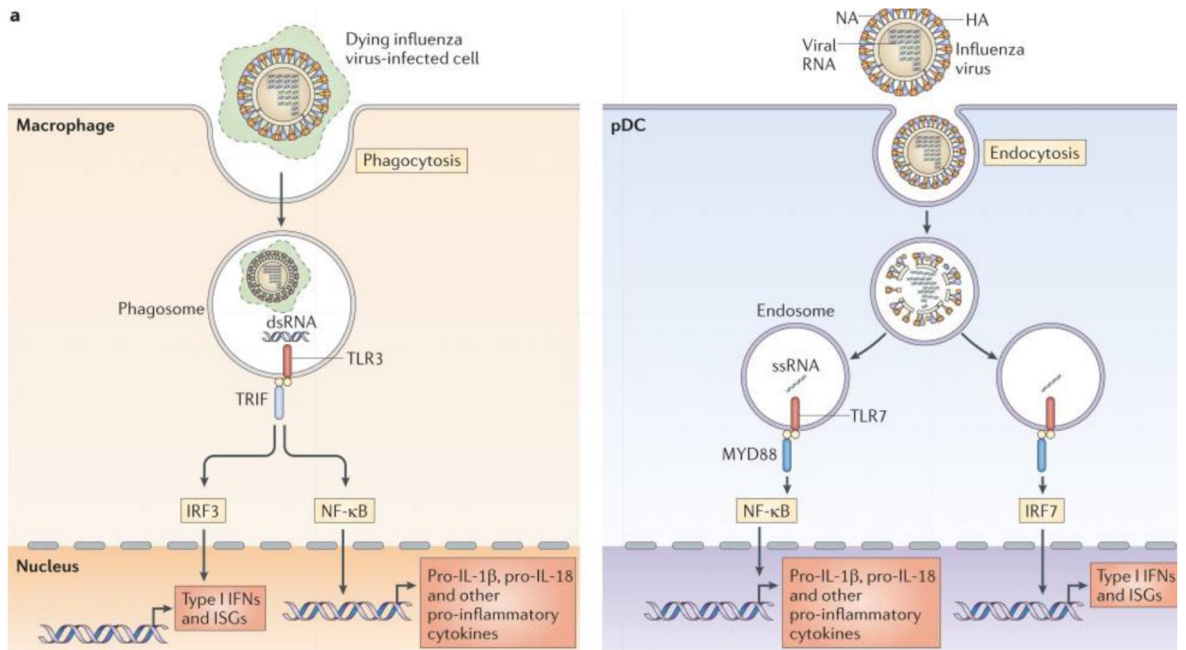
Předpokládá se, že i pohlaví jedince hraje roli v závažnosti chřipkové infekce (Jacobs *et al.*, 2012). V studii Quandelacy *et al.* (2014) byla již dříve prokázána vyšší nemocnost spojená s chřipkovou infekcí u mužů ve srovnání se ženami, ale obecně existuje jen málo

důkazů o významu pohlaví v souvislosti s chřipkovou infekcí. Pro určité věkové kategorie existují důkazy, že zde pohlaví představuje důležitý faktor vysvětlující závažnost onemocnění. Během pandemie H1N1 v roce 2009 bylo hospitalizováno celkově více žen než mužů. To může odrážet skutečnost, že ženy obecně mají závažnější imunitní reakce při virových infekcích ve srovnání s muži (Klein *et al.*, 2010). Vysvětlením může být faktické snížení funkce imunitního systému během těhotenství, protože mnoho hospitalizovaných pacientek bylo těhotných (Joseph *et al.*, 2011).

- ***Genetická souvislost s chřipkovou infekcí***

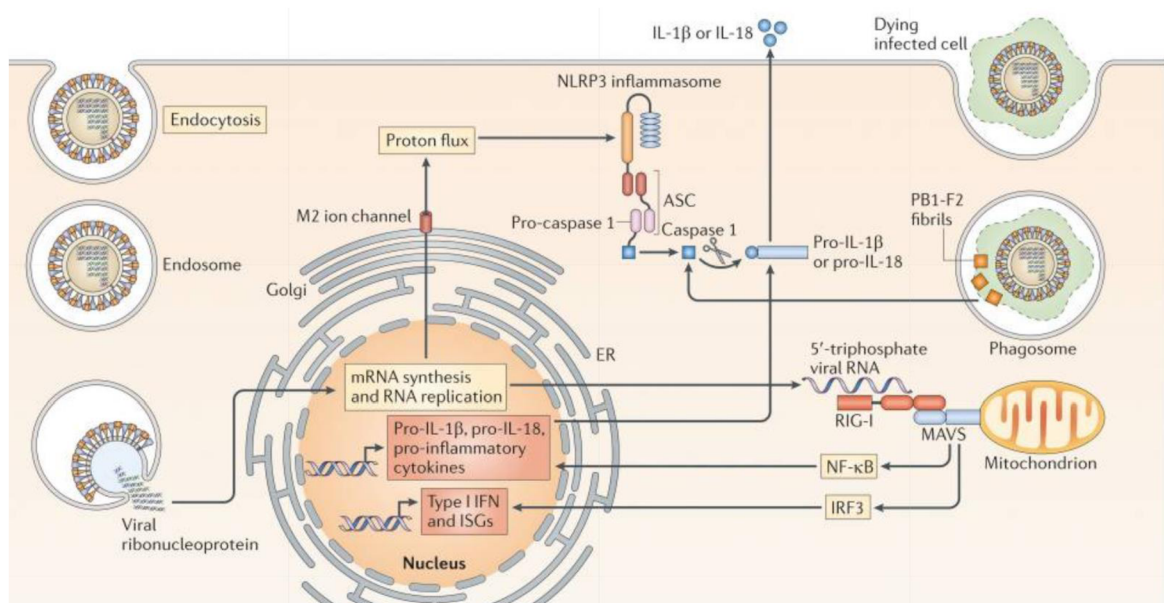
V posledních letech došlo k nárůstu důkazů o genetické asociaci mezi hostitelem a závažností chřipkové infekce. Několik desetiletí je známo, že různé kmeny myši reagují na stejnou chřipkovou infekci v různé míře závažnosti. To podporuje myšlenku, že genetická variabilita může ovlivnit chřipkovou infekci (Srivastava *Et al.*, 2009; Krug *Et al.*, 1985).

Infekce virem chřipky je detekována několika hostitelskými senzory, které rozpoznávají jedinečné vlastnosti spojené s takovou infekcí. Na obrázku 6 vidíme infikované buňky, které jsou během fagocytózy pohlceny makrofágy. Toll-like receptor 3 (TLR3) rozpoznává dvouvláknovou RNA (dsRNA), což vede k indukci exprese nukleárního faktoru- κ B (NF- κ B) závislého na prozánětlivých cytokinech a interferonu typu I (IFN) a genech stimulovaných IFN (ISG) ve směru od IFN-regulačního faktoru 3 (IRF3) (obrázek 6, vlevo). Příchozí genomická jednovláknová RNA (ssRNA), která je obsažena ve virionu, je uvolňována degradací virové membrány a kapsidy v acidifikovaných endozomech a ssRNA je rozpoznána TLR7 v plazmocytoidních dendritických buňkách (pDC) (obrázek 6, vpravo) (Iwasaki a Pillai, 2014).



Obrázek 6: Vrozené vnímání viru chřipky I (převzato a upraveno Iwasaki a Pillai, 2014).
 NA – neuramidáza, HA – hemagglutinin,
 TRIF – adaptorový protein obsahující doménu TIR indukující IFN α .

V infikovaných buňkách je virová RNA v cytosolu rozpoznávána genem *RIG-I*, který je indukovaný kyselinou retinovou. Tento gen prostřednictvím aktivace mitochondriálního antivirového signálního proteinu (MAVS) vede k indukci prozánětlivých cytokinů a IFN typu I. Aktivita iontového kanálu Matrix 2 (M2) v Golgiho aparátu stimuluje tvorbu NOD-, LRR- a pyrinové domény obsahující 3 (NLRP3) inflamatomy, což vede k aktivaci kaspázy 1 a uvolnění cytokinů interleukin-1 β (IL-1 β) a IL-18. PB1-F2 fibrily se hromadí ve fagosomu, což má za následek aktivaci NLRP3 a uvolnění IL-1 β a IL-18 (Iwasaki a Pillai, 2014). Celý mechanismus je uveden na obrázku 7.

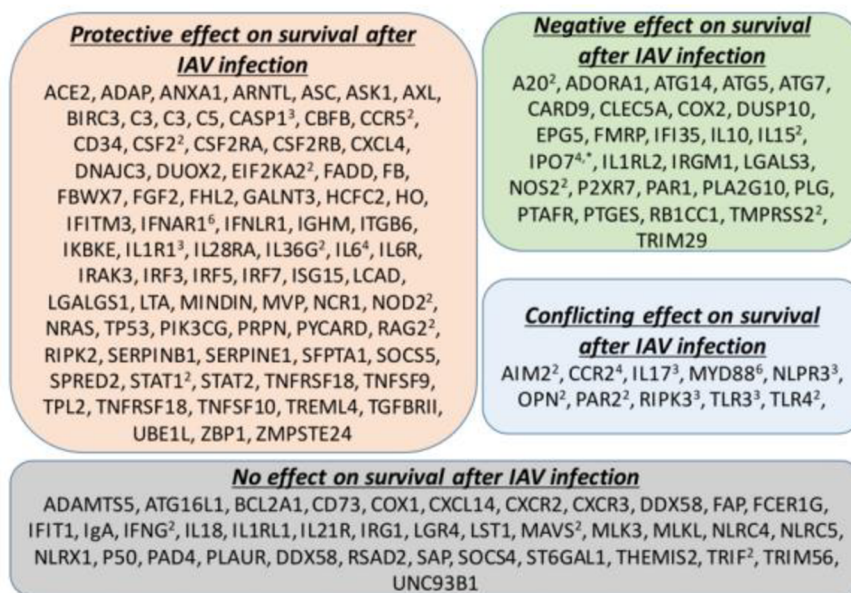


Obrázek 7: Vrozené vnímání viru chřipky II (převzato a upraveno Iwasaki a Pillai, 2014).
ER – endoplazmatické retikulum.

Antivirový faktor *MXA* (*Mxl* u myši) omezuje infekci virem chřipky A (IAV) kmenově specifickým způsobem, což naznačuje, že tato interakce může být více závislá na virové variabilitě než na genetice hostitele (Dittmann *et al.*, 2008). Mnoho běžných imbredních kmenů laboratorních myši, které jsou náchylné k chřipkové infekci, má neaktivní gen *Mxl* kvůli delecii exonu nebo nesmyslné mutaci, která je zodpovědná za vznik zkráceného proteinu (Lindemann *et al.*, 1962; Wellington *et al.*, 2019).

- **Další geny ovlivňující onemocnění IAV**

Dosud bylo studováno sto sedmdesát různých hostitelských genů, které ovlivňují různé kmeny IAV, ať už z hlediska rezistence nebo citlivosti vůči onemocnění IAV (obrázek 8, oranžová část). Mnoho hostitelských genů se podílí na vrozených a antivirových procesech imunitního systému potřebných pro přežití po infekci IAV. Těmito geny jsou například *IFNAR1*, *IFNL1*, *STAT1*, *IFITM3*, *SFPTA1*, *IRF7* (Gounder a Boon, 2019).



Obrázek 8: Různé hostitelské geny, které byly testovány u myši s *knokautovaným* genem v modelech patogeneze IAV (převzato od Gounder a Boon, 2019).

Nepřítomnost hostitelských genů zapojených do komplementové dráhy C3, C4 a C5 zvyšuje náchylnost k infekci. Druhá sada hostitelských genů (obrázek 8, zelená část) může exacerbovat (mohou zhoršovat nebo vyvolat nové vzplanutí nemoci) IAV onemocnění. Delece těchto genů chrání myši před těžkými a fatálními infekcemi IAV. Do třetí skupiny (obrázek 8, modrá část) patří geny *Ccr2*, *Tlr3*, *Tlr4*, *Myd88* jejichž role během patogeneze IAV je konfliktní. Čtvrtá skupina (obrázek 8, šedá část) jsou geny, které nemají vliv na přežití po prodělání IAV (Gounder a Boon, 2019).

Uvedená studie odhalila tyto skutečnosti: geny zapojené do přirozené a antivirové imunitní odpovědi jsou důležité pro ochranu před IAV. Ačkoli účinky jednotlivých genů mohou záviset na různých hostitelských a virových faktorech, ke kterým přispívá také imunitní stav zvířete, geny asociované se zánětlivou reakcí organismu však často zhoršují onemocnění (Gounder a Boon, 2019).

2.3.2 Západonilská horečka a Zika virus

Flaviviry, jako je Zika virus (ZIKV) nebo virus Západonilské horečky (WNV), pokud napadnou centrální nervový systém, mají potenciál způsobit závažnou neuropatologii. Gen *IFITM3* inhibuje infekci těmito viry díky své schopnosti omezit vstup a fúzi viru z pozdních endozomů. Některé studie prokázaly, že IFN signalizace a indukce downstream antivirových efektorových proteinů (např. *IFIT2*, viperin, proteinkináza R, RNáza L a

Ifi2712a) omezují tropismus a šíření WNV (Samuel *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2015). Knockout *IFITM3* u myši zvýšil mortalitu zvířat po subkutánní infekci WNV (Gorman *et al.*, 2016).

Replikace ZIKV může být inhibována jak *IFITM1*, tak *IFITM3*, ale *IFITM3* vykazuje účinnější inhibici než *IFITM1*, ke které dochází v rané fázi po virové fúzi před jeho časnou transkripcí RNA (Savidis *et al.*, 2016). Nadměrná exprese *IFITM3* je navíc schopna zabránit cytopatii zprostředkované ZIKV, jako je buněčná smrt (Monel *et al.*, 2017).

2.3.3 Onemocnění způsobená filoviry a koronaviry

Interferonem indukovatelné transmembránové proteiny mohou také účinně omezit filoviry a koronaviry. Ve srovnání s IAV jsou filoviry citlivější na *IFITM1*, myši *IFITM5* a *IFITM6*. Tyto viry mají společný pozdní endocytický enzymatický systém, kterým lysozomální cysteinová proteáza katepsin L zprostředkovává proteolytické štěpení fúzních proteinů za účelem infikování cílových buněk (Chandran *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006). *IFITM3*, ale i *IFITM1* a *IFITM2*, jsou schopny omezit *GP1*, 2-zprostředkovaný vstup a následně replikaci viru marburgské horečky (MARV) a viru Ebola (EBOV). Vstup filovirů může být také potlačen léčbou IFN. Souhrnně mohou *IFITM* a IFN inhibovat replikaci viru omezením vstupu viru do buňky (Huang *et al.*, 2011).

Vstup zprostředkovaný proteinem SARS-CoV S je také omezen *IFITM1*, *IFITM2* a *IFITM3*. Bylo zjištěno, že mutace ve zbytcích a strukturních motivech *IFITM* modulují vstup koronavirů. Například substituce Y20 alaninem nebo kyselinou asparagovou v *IFITM3* zvyšuje vstup SARS-CoV a mutanty *IFITM3* Y99A nebo Y99D vykazují sníženou antivirovou aktivitu (Zhao *et al.*, 2018).

2.3.4 Proteiny *IFITM* podporují infekci SARS-CoV-2

Interferonem indukované transmembránové proteiny mohou omezit virové patogeny, ale u koronavirů byly hlášeny pro- i protivirové aktivity. Umělá nadměrná exprese *IFITM* blokuje infekci SARS-CoV-2, ale endogenní exprese *IFITM* podporuje infekci SARS-CoV-2 v lidských plicních buňkách. Ve studii Prelli Bozzo, C., Nchioua, R., Volcic, M. *et al.* 2021 byly provedeny experimenty s proteiny *IFITM* a dále indukovány interferony v lidských plicích, střevě, srdci a mozkových buňkách. Peptidy odvozené od *IFITM* a specifické protilátky inhibovaly vstup a replikaci SARS-CoV-2 v plicních buňkách,

kardiomyocytech a střevních organoidech. Výsledky této studie ukazují, že proteiny *IFITM* mohou působit jako kofaktory účinné infekce tohoto onemocnění. SARS-CoV-2 se šíří velice rychle, ale v porovnání s koronaviry těžkého akutního respiračního syndromu (SARS-CoV) a blízkovýchodního respiračního syndromu (MERS-CoV) má nižší úmrtnost. Nejvyšší úmrtnost (z těchto tří koronavirů) vykazuje MERS-CoV a to ~ 40%, hned po něm následuje SARS-CoV ~ 10%, zatímco onemocnění virem SARS-CoV-2 má úmrtnost kolem 2 - 5 % (Ksiazek *et al.*, 2003; Bermingham *et al.* 2012; Al-Rohaimi a Al Otaibi, 2020)

První krok pro replikaci SARS-CoV-2 a tedy vstup do cílových buněk, je zásadní. *IFITM1* je lokalizován na plazmatické membráně, *IFITM2* a *IFITM3* se nacházejí uvnitř buňky na endo-lysozomálních membránách (Bailey *et al.*, 2014). Proto tyto proteiny mohou působit na různých úrovních vstupu a mohou omezovat některé třídy obalených virových patogenů, včetně virů chřipky A, flavivirů, rhabovirů a virů lidské imunodeficience (Diamond a Farzan, 2013; Huang *et al.*, 2011). Proteiny *IFITM* inhibují lidské koronaviry včetně MERS-CoV, SARS-CoV i SARS-CoV-2 (Huang *et al.*, 2011; Shi *et al.* 2011), to znamená, že tyto proteiny zabraňují množení viru v hostitelských buňkách.

Ve studii Prelli Bozzo, C., Nchioua, R., Volcic, M. *et al.* (2021) bylo zjištěno, že nadměrně exprimované interferonem indukované transmembránové proteiny blokují, ale endogenní *IFITM* podporují infekci SARS-CoV-2. Tedy nadměrná exprese proteinů *IFITM* zabraňuje vstupu virových částic pseudotypizovaných spike proteiny SARS- a MERS-CoV (Huang *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2011).

2.3.5 Virus lidské imunitní nedostatečnosti

Interferonem indukované transmembránové proteiny byly považovány za neschopné interferovat s infekcí HIV-1, později se však ukázalo, že *IFITM2* a *IFITM3* mohou vstup viru HIV-1 do buňky omezit (Brass *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2018). Infekce virem lidské imunodeficience typu 1 (HIV-1) také spouští produkci interferonu typu I. Plazmocytoidní dendritické buňky, hlavní producenti interferonu, uvolňují velká množství interferonu a to částečně díky rozpoznání RNA viru HIV-1 pomocí TLR7 (Francis a Meltzer, 1993; Heil *et al.* 2004). Infekce HIV-1 způsobuje postupný pokles počtu plazmocytoidních dendritických buněk a také sníženou kapacitu těchto buněk produkovat interferon. Infekce HIV-1 navíc způsobuje depleci interferonového regulačního faktoru 3 (IRF-3), který hraje klíčovou roli

v Toll-like receptor-a RIG-I zprostředkované vrozené imunitní signalizaci (Donaghy *et al.*, 2001; Doehle *et al.*, 2009; Okumura *et al.*, 2008). Neméně důležité je, že HIV-1 kóduje proteiny, které antagonizují jednotlivé ISG. Příkladem je virový protein U, který působí proti antigenu stromálních buněk kostní dřeně 2 (BST-2) a blokuje uvolňování viru z buněčného povrchu (Neil, Zang a Bieniasz, 2008). Dalším příkladem je faktor virové infekčnosti, který antagonizuje enzym 3G upravující mRNA apolipoproteinu B (APOBEC3G), cytidindeaminázu, která způsobuje hypermutaci HIV-1 cDNA (Sheehy *et al.*, 2002).

Inhibiční aktivity interferonu, který brání více krokům replikace HIV-1 v časně i pozdní fázi, jsou funkcemi odlišných ISG. Například proteinkináza R (PKR) inhibuje produkci HIV-1 potlačením translace proteinu (Nagai *et al.*, 1997). RNáza L degraduje HIV-1 RNA, čímž omezuje replikaci HIV-1 (Maitra a Silverman, 1998). Tripartitní motivový protein 22 (TRIM22) narušuje sestavu Gag (Barr *et al.*, 2008). BST-2 blokuje uvolňování částic HIV-1 z buněčného povrchu (Neil *et al.*, 2008). ISG15 brání produkci viru HIV-1 tím, že způsobuje ISGylaci virového proteinu Gag a buněčných faktorů, jako je CHMP5 (chromatin-modifikující protein 5). APOBEC3G omezuje replikaci tím, že způsobuje hypermutaci virové cDNA během reverzní transkripce. TRIM5 α z opic Starého světa se zaměřuje na virové jádro po vstupu HIV-1 a ničí virový reverzní transkripční komplex. Ačkoli jsou APOBEC3G a TRIM5 α konstitutivně exprimovány, jejich hladiny jsou zvýšeny interferonem, který zesiluje jejich antivirovou funkci (Malim a Emerman, 2008; Chen *et al.*, 2006).

2.3.6 DNA viry

Je známo, že proteiny *IFITM* omezují spektrum RNA virů, které způsobují výše uvedená onemocnění. Ovšem o jejich antivirových účincích na DNA viry je zatím známo jen málo. Ačkoli INF typu I mohou účinně snížit infekci lidského papilomaviru (HPV), nadměrná exprese *IFITM1*, *IFITM2* a *IFITM3* není schopna inhibovat infekci lidského papilomaviru (HPV), lidského cytomegaloviru (HCMV) a adenoviru typu 5 (Ad5) (Warren *et al.*, 2014). Munoz-Moreno *et al.* (2016) uvádí, že proteiny *IFITM* ovlivňují infekčnost viru afrického moru prasat (ASFV) a vstup ASFV zprostředkovaný endocytózou. Je možné, že *IFITM2* a *IFITM3* inhibují vstup ASFV změnou membránové fúze a endozomálního odtoku cholesterolu (Munoz-Moreno *et al.*, 2016). Nadměrná exprese proteinu *IFITM3* navíc

významně omezuje replikaci viru vakcínie (VACV) tím, že omezuje vazbu viru a interferuje s virovým vstupem ve fúzi závislé na nízkém pH (Li *et al.*, 2018).

2.3.7 Neurologické poruchy v souvislosti s genem *IFITM3*

Úloha genu *IFITM3* v centrálním nervovém systému je do značné míry neznámá, ačkoli byla popsána jeho zvýšená exprese v mozcích pacientů s neurologickými a neuropsychiatrickými onemocněními, jako je schizofrenie, autismus, bipolární porucha, Alzheimerova choroba (Ibi *et al.*, 2013).

- ***Alzheimerova choroba***

Alzheimerova choroba (AD) je nejběžnější formou demence. Existují dva patologické znaky AD, neurofibrilární klubka a amyloidní plaky. V patogenezi AD hraje kritickou roli neurozánět s aktivovanými astrocyty a mikroglie (Hur, 2021).

Expresí mRNA *IFITM3* koreluje s úrovní exprese lidského herpes viru 6B (HHV-6B) v mozcích u lidí s Alzheimerovou chorobou (Hur *et al.*, 2020). O tom, zda infekce mohou vést k rozvoji Alzheimerovy choroby, jsou vedeny rozsáhlé dlouhodobé debaty. Existují zprávy, které naznačují, že bakteriální nebo virové infekce mohou způsobit Alzheimerovu chorobu. S poruchou mozku způsobenou Alzheimerovou chorobou byly spojeny také herpes simplex virus typu 1 (HSV-1), lidský herpes virus 6A (HHV-6A) a lidský herpes virus 7 (HHV-7) (Itzhaki *et al.*, 1997; Readhead *et al.* 2018; Tzeng *et al.*, 2018). V případě bakteriální infekce bylo zjištěno, že s Alzheimerovou chorobou může souviset také onemocnění dásní (Beydoun *et al.*, 2020).

Hur a kolektiv ukázali nově identifikovanou roli *IFITM3* u Alzheimerovy choroby prostřednictvím aktivních komplexů s γ -sekretázou a to ukázalo přímou souvislost mezi vrozenou imunitou vůči produkci $A\beta$. Komplexy *IFITM3*- γ -sekretázy mají také aktivní γ -sekretázovou aktivitu. Hladiny $A\beta_{42}$ a $A\beta_{40}$ byly sníženy po vyřazení *IFITM3* a naopak se zvýšily, když byl *IFITM3* nadměrně exprimován (Hur *et al.*, 2020).

Hlavním rizikovým faktorem pro Alzheimerovu chorobu je stárnutí (Hou *et al.*, 2019). V mozcích stárnoucích myší (28 měsíců) WT byly naměřeny vyšší hladiny proteinu *IFITM3*, produkce $A\beta$ ($A\beta_{42}$ a $A\beta_{40}$) a množství aktivní *IFITM3*- γ -sekretázy ve srovnání s mozky 4 měsíčních myší (Hur *et al.*, 2020). Lidská kohorta Genotype-Tissue expression také

vykazovala významné pozitivní korelace mezi věkem (v rozmezí 20 až 70) a expresí mRNA IFITM3 v kůře a hipokampu (Hur *et al.*, 2020).

- ***Autismus u dětí***

Autismus je závažná porucha, která je ovlivněna nejen genetickými, ale i enviromentálními faktory. Garbett *et al.* (2008) zaznamenali kritické změny v transkriptech souvisejících s buněčnou komunikací, diferenciací, regulací buněčného cyklu a chaperonovými systémy. Metodou Real-Time PCR byly potvrzeny kritické změny exprese genů *BCL6*, *CHI3L1*, *CYR61*, *IFI16*, *IFITM3*, *MAP2K3*, *PTDSR*, *RFX4*, *SPP1*, *RELN*, *NOTCH2*, *RIT1*, *SFN*, *GADD45B*, *HSPA6*, *HSNH1PB8* a *SERPI*.

Porucha autistického spektra (ASD) je celoživotní pervazivní vývojová porucha, která se poprvé projevuje před třetím rokem věku. ASD je diagnostikována na základě několika behaviorálních dysfunkcí, jako je narušená sociální interakce, narušená komunikace, omezené a opakující se záznamy aktivity (Lord *et al.*, 2000). Přesná etiologie autismu není dosud známa, ačkoli vědci předpokládají, že je výsledkem komplexní kombinace genetických, environmentálních a imunologických faktorů (Persico a Bourgeron, 2006). Je pravděpodobné, že kromě genetických faktorů k riziku rozvoje onemocnění významně přispívají i faktory prostředí. Jedná se např. o prenatální infekce zarděnek, antikonvulziva, antiemetika užívaná během těhotenství, perinatální hypoxie a postnatální infekce, reprezentující faktory identifikované jako přispívající k rozvoji ASD (Gabett *et al.*, 2008). Studie dvojčat poskytly odhady dědičnosti pro ASD až na 90%, což naznačuje, že genetické rozdíly hrají klíčovou roli v etiologii tohoto onemocnění (Tandon *et al.*, 2008).

2.3.8 Nádorová onemocnění

Indukovaný transmembránový protein 3 (IFITM3) byl identifikován jako potenciální tumorový marker a byl upregulován v případě některých lidských onemocnění, včetně rakoviny tlustého střeva a prsu, astrocytomu a také u ulcerózní kolitidy. Funkce *IFITM* v tumorigenezi byla již dříve potvrzena. Například exprese *IFITM1* a *IFITM3* byla významně upregulována v astrocytomových buňkách ve srovnání s normálními astrocyty myši (Tanaka *et al.*, 2004; Seyfried *et al.*, 2008; Wylie, 2005). Konkrétní funkce a potenciální mechanismy *IFITM3* v patogenezi karcinomu žaludku (GC) jsou však nejasné. HU *et al.* 2014 ve své studii zjistili, že gen *IFITM3* je významně spojen s diferenciací

nádoru lymfatických uzlin a vzdálených metastáz. Během výzkumu exprese *IFITM3* pomocí imunohistochemie zjistil, že *IFITM3* byl pozitivně obarven v cytoplazmě u většiny vzorků pacientů s invazivním stádiem rakoviny a negativně nebo slabě obarven v sousedních zdravých tkáních. Kromě toho byly hladiny exprese *IFITM3* zvýšeny v případech patologických stádií karcinomu žaludku. Mezi expresí *IFITM3* a dalšími klinicko-patologickými charakteristikami jako je věk, pohlaví, lokalizace nádoru a hodnoty CEA, nebyla nalezena žádná významná korelace (Hu *et al.*, 2014).

3 Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce bylo naplnění těchto bodů:

- I. Vypracovat odbornou rešerši zaměřenou na strukturu a funkci genu *IFITM3* a popsat jeho klinický význam pro průběh virových onemocnění.
- II. Osvojit si základy správné laboratorní praxe a zvolit vhodné metody k detekci několika klinicky významných polymorfismů v genu *IFITM3*.
- III. Zpracovat výsledky genetických analýz a zhodnotit procentuální zastoupení zjištěných genotypů/haplotypů v testovaném souboru a porovnat je s publikovanými daty.

4 Praktická část

Praktickou část své bakalářské práce jsem provedla pod odborným dohledem vedoucí práce – Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. Po seznámení s laboratoří a řádném proškolení v laboratorních metodách jsem vykonávala praktickou část bakalářské práce. Součástí praktické části byla izolace DNA z bukálního stěru nebo periferní krve, stanovení koncentrace DNA, PCR reakce, elektroforéza PCR produktu a vlastní analýza polymorfismů genu *IFITM3* pomocí sekvenace.

4.1 Popis souboru

V rámci praktické části mé bakalářské práce bylo vyšetřeno celkem 110 vzorků (70 žen a 40 mužů). 27 vzorků pocházelo od pacientů s autismem, nebo jinou formou neurologických a neuropsychiatrických chorob, 83 vzorků pocházelo od pacientů, kteří netrpěli žádnou neurologickou poruchou.

4.2 Preanalytická část

Preanalytická fáze je jedním z nejdůležitějších bodů laboratorního vyšetření, protože může významně ovlivnit získání spolehlivého výsledku. Tato fáze zahrnuje veškeré procesy před vlastním analytickým stanovením, včetně správného odběru biologického materiálu, jeho transportu a identifikace vzorku.

V případě bukálního stěru, který si pacient provádí sám, je součástí preanalytické fáze poučení pacienta o správném provedení odběru. Správně odebraný a řádně označený vzorek s vyplněnou laboratorní žádankou a podepsaným informovným souhlasem s molekulárně-genetickým vyšetřením je přijat do laboratoře. Všechny zkumavky, které obsahují vzorek, musí být označeny datem odběru, jménem a příjmením pacienta, jeho rodným číslem a identifikačním číslem.

Odběr periferní byl realizován ve spolupráci s profesionálními odběrovými laboratořemi a je popsán v kapitole 4.2.3.

4.2.1 Materiál

Pro analýzu polymorfismů rs12252, rs34481144 a rs1136853 v genu *IFITM3* bylo použito 110 vzorků. Všichni pacienti byli poučeni o správném odběru vzorku z bukálního stěru a podepsali informovaný souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením.

4.2.2 Bukální stěr

Pro úspěšný průběh genetického vyšetření je třeba získat dostatečné množství materiálu k následné izolaci DNA, proto je důležitý správný odběr vzorku. Pacient spolu s odběrovou sadou obdrží instrukce k odběru. Je důležité, aby pacient 60 minut před odběrem neprováděl ústní hygienu, nejedl a pil pouze neslazenou vodu. Pacient by si před manipulací s odběrovou sadou měl umýt ruce, aby zabránil jakékoli kontaminaci vzorku. Dále musí pacient zamezit jakémukoli styku s jiným materiálem než je bukální sliznice a to po celou dobu manipulace s odběrovou sadou. DNA je získávána z epitelů přítomných v ústní dutině. Pacient uchopí odběrový tampon za nesterilní část, která je tvořena tyčkou a následně si vloží vatovou tyčinku do úst a důkladně otírá vnitřní stěny tváří. S tampónem je třeba otáčet, aby byla využita celá plocha odběrového tampónu. Aby pacient získal co největší množství materiálu je vhodné, aby vyvíjel tlak tampónem na povrch sliznice. Sliznici je třeba otírat minimálně po dobu 1 minuty. Po takto provedeném odběru pacient vloží tampon do sterilní zkumavky a označí ji osobními údaji pro následnou identifikaci.

4.2.3 Periferní krev

Odběr periferní krve provádí vyškolený pracovník ve zdravotnickém zařízení. Pro izolaci DNA je z loketní jamky pacienta odebíráno 5-10 ml venózní krve do zkumavky s 0,3 ml 0,5 molárním roztokem EDTA, která slouží jako antikoagulační činidlo. EDTA (etylendiaminotetraoctová kyselina) vyvazuje Ca^{2+} ionty, tím je zajištěna inaktivace nukleáz. Ty jsou přítomny v cytoplasmě buňky a štěpí nukleové kyseliny. To znamená, že pokud by nukleázy zůstaly v aktivním stavu, došlo by k rozštěpení DNA a RNA a tudíž by nebylo možné provést následnou analýzu DNA (Kočárek, 2007). Pro genetické vyšetření pacient nemusí být nalačno. V tomto případě je DNA izolována z leukocytů.

4.3 Izolace DNA

Prvním krokem pro molekulárně genetickou analýzu je izolace DNA, která se pro běžné diagnostické účely provádí z periferní krve nebo bukalního stěru. Tento krok genetického vyšetření je rutinní záležitostí používanou v molekulární biologii a genetice. Proce izolace DNA lze rozdělit na dva kroky. Prvním krokem je lyze buněk, kdy dochází k deformaci buněčné membrány a tím uvolnění DNA. Mechanicky pomocí homogenizace nebo pomocí enzymů (proteináza) docílíme rozbití buněčných membrán. Případně je možné kombinovat oba tyto postupy. Lyzí buněk se uvolní celý jejich obsah a vzniká směs, která obsahuje kromě samotné DNA i další komponenty jako jsou zbytky buněčných membrán, proteinů a polysacharidů. Druhou částí izolace je přečištění nukleových kyselin, kde jsou tyto komponenty odstraněny. Cílem izolace DNA je získání čisté DNA bez těchto kontaminantů. Izolovanou DNA i RNA je možné skladovat při -20°C

4.3.1 Izolace DNA z bukalního stěru

Pro izolaci DNA jsem použila komerční kit GeneAll ExGeneTM Clinic SV mini. Použité reagensie a jejich skladování jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Seznam použitých reagensií pro izolaci DNA z bukalního stěru.

Reagensie	Podmínky skladování
Proteináza K	-20°C
BL pufr	RT
BW pufr	
TW pufr	
AE pufr	
Ethanol (100%)	

Nejprve jsem z mrazicího boxu vyndala proteinázu K (PK), kterou jsem nechala rozmrazit při pokojové teplotě. Dále jsem zapnula suchou lázeň na 56°C a na konec izolace jsem pro každý vzorek připravila 1,5ml mikrozkušavku, kterou jsem popsala.

Do zkušavky, která obsahovala bukalní stěr pacienta jsem napipetovala 300 μl PBS pufru, 25 μl proteinázy K a 300 μl BL pufru. Pomocí vortexu jsem zkušavku důkladně promíchala a následně vložila na 10 minut do inkubátoru vyhřátého na 56°C . Pro odstranění kapek z vnitřní stěny víčka zkušavky jsem vzorek krátce stočila. Následně jsem přidala 300 μl 100% ethanolu, vortexovala v pulzech a znovu krátce stočila na

minicentrifuze. Všechnu směs z mikrozkušavky jsem postupně ve dvou krocích přenesla na kolonku. Pomocí mikropipety jsem nabrala maximálně 700 µl směsi, tento objem jsem napipetovala na kolonku. Kolonku jsem zavřela a centrifugovala při 8000 rpm po dobu 1 minuty. V druhém kroku jsem napipetovala zbytek směsi a opět přenesla na kolonku a centrifugovala. Obsah sběrné zkumavky jsem vylila a na kolonu napipetovala 600 µl BW pufru. Zkumavku jsem opět nechala centrifugovat po dobu 1 minuty při 8000 rpm. Sběrnou zkumavku jsem nahradila novou čistou zkumavkou. Na kolonku jsem přidala 700 µl TW pufru a centrifugovala po dobu 1 minuty při 8000 rpm. Ze sběrné zkumavky jsem odstranila supernatant a vrátila kolonku do sběrné zkumavky. Centrifugovala jsem při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty, aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru. Kolonku jsem následně umístila do nové předem popsané 1,5ml mikrozkušavky s víčkem. Přímo na střed filtru kolonky jsem přidala 50 µl AE pufru a nechala inkubovat při 56°C po dobu 5 minut. Poté jsem zkumavku nechala centrifugovat při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty. Následně jsem opakovala poslední krok a pipetovala získaný objem z předchozí centrifugace přímo na střed kolonky. Kolonku jsem centrifugovala ve stejné zkumavce při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty a otevřená víčka jsem nasměrovala po směru točení centrifugy. Nakonec jsem kolonku odstranila a zkumavku s izolátem uzavřela.

4.3.2 Izolace DNA z periferní krve.

Izolace DNA z periferní krve se provádí pomocí komerčního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV Mini. Reagencie, které jsem použila, jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5: Seznam použitých reagentů pro izolaci DNA z periferní krve.

Reagencie	Podmínky skladování
Proteináza K	-20°C
BL pufr	RT
BW pufr	
TW pufr	
AE pufr	
Ethanol (100%)	

Nejprve jsem nechala vytemperovat proteinázu K na pokojovou teplotu, následně jsem zapla suchou lázeň a nechala ji vyhřát na 56°C. Pro každý vzorek jsem si připravila 1,5 ml mikrozkušavku, kterou jsem řádně označila.

Do čisté a popsané 1,5 ml zkumavky jsem napipetovala 20 µl proteinázy K, k ní jsem následně přidala 200 µl vzorku. Dále jsem přidala 200 µl BL pufru, vzorek jsem důkladně promíchala pomocí vortexu. Následně jsem zkumavku umístila do předem vytemperované suché lázně a nechala vzorek po dobu 10 minut inkubovat. Abych odstranila zbytky kapek z vnitřní stěny zkumavky, stočila jsem vzorek na minicentrifuze. Do zkumavky jsem napipetovala 200 µl 100% ethanolu, vortexovala v pulzech a opět krátce centrifugovala. Vzniklou směs jsem v dalším kroku přenesla na kolonku a následně centrifugovala při 8000 rpm po dobu 1 minuty. V dalším kroku jsem starou sběrnou zkumavku nahradila novou, přidala 600 µl BW pufru a směs opět centrifugovala 1 minutu při 8000 rpm. Tento krok jsem opakovala dvakrát. Poté jsem zkontrolovala, zda je supernatant průhledný. Ke směsi jsem připipetovala 700 µl TW pufru a opět jsem vzorek centrifugovala při 8000 rpm po dobu 1 minuty. Ze sběrné zkumavky jsem odstranila supernatant a kolonku jsem do ní vrátila. Pro odstranění zbytkového promývacího pufru jsem směs centrifugovala při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty. Následně jsem přímo na střed kolonky napipetovala 50 µl AE pufru a tuto směs jsem po dobu 5 minut nechala inkubovat při 56°C, následně jsem vzorek 1 minutu inkubovala v suché lázni při 56 °C. Dále jsem opakovala poslední krok a získaný objem z předchozí centrifugace jsem napipetovala opět přímo na střed kolonky. Nakonec jsem centrifugovala vzorek ve stejné zkumavce při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty. Otevřená víčka jsem nasměrovala po směru točení centrifugy. Kolonku jsem odstranila a popsanou zkumavku s izolátem uzavřela.

4.4 Měření koncentrace DNA

U všech vzorků jsem ihned po izolaci měřila koncentraci DNA. Měření koncentrace izolované DNA jsem provedla pomocí AccuGreenTM Broad Range dsDNA Quantitation Solution (Biotum) a přístrojem Qubit® 2.0 Fluorometer. Součástí této sady jsou 0,5ml PCR mikrozkušavky, které jsou skladované při pokojové teplotě. Reagencie, které jsem použila, jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Reagencie použité pro měření koncentrace DNA ve vzorku.

Reagencie	Podmínky skladování
AccuGreen TM Broad Range dsDNA Quantitation Solution	Lednice (< 4 °C), ve tmě
AccuGreen TM Standard 1	Lednice (< 4 °C)
AccuGreen TM Standard 2	Lednice (< 4 °C)

Do 0,5ml zkumavky jsem napipetovala 198 μ l připraveného pracovního roztoku a k němu přidala 2 μ l izolované DNA ze vzorku. Směs jsem krátce zvortexovala a stočila na minicentrifuze, abych odstranila kapky z vnitřní stěny zkumavky. Vzorky jsem nechala inkubovat při pokojové teplotě po dobu 2 minut. Mezitím jsem si připravila přístroj pro měření koncentrace. Pomocí dotykového displeje jsem volila měření pro dsDNA. Dále jsem zvolila, že nebudu provádět kalibraci a použila jsem kalibrační křivku z předchozího měření. Po jedné jsem zkumavky vložila do přístroje a pomocí tlačítka Read provedla měření. Na fluometru jsem pomocí tlačítka Calculate Stock Cone nechala přepočítat výsledek na 2 μ l. Pomocí tlačítka „Read Next Sample“ jsem provedla měření dalšího vzorku a všechny výsledky jsem zaznamenala.

V případě, že bych prováděla kalibraci přístroje, bych nejprve nechala standardy a kvantifikační roztok vytemperovat na pokojovou teplotu. Přístroj Qubit 2.0 fluorometr se kalibruje pomocí směsi 190 μ l kvantifikačního roztoku a 10 μ l jednotlivých standardů I a II. Po kalibraci by následovalo měření koncentrace DNA ve vzorcích podle postupu, který je uveden výše.

4.5 PCR reakce

Pomocí metody PCR jsem u všech vzorků provedla amplifikaci, díky které jsem z DNA získala požadovaný úsek genu *IFITM3*. Oblast, která zahrnuje polymorfismy rs12252, rs34481144, rs1136853 v genu *IFTIM3* jsme amplifikovali pomocí PCR primerů a reakčního protokolu, který byl převzat z práce Zheng *et al.* (2017) a upraven vzhledem k použitému reakčnímu kitu pro PCR. Příslušné primery jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Přehled sekvencí použitých primerů.

Primer	Sekvence	Podmínky skladování
Forward	5'-GGAAACTGTTGAGAAACCGAA-3'	-20 °C
Reverse	5'-CATACGCACCTTCACGGAGT-3'	-20 °C

Pro přípravu PCR reakce jsem použila kit 2xPCRBIO Taq Mix Red (BioSystems) dle doporučení výrobce. Reakční mix obsahuje polymerázu, reakční pufr a nukleotidy. Seznam použitých reagentů, množství pro přípravu 1 reakce a přepočet pro přípravu 10 reakcí jsem uvedla v tabulce 8.

Tabulka 8: : Přehled reagensií a objemů použitých pro 1 reakci
a jejich přepočet pro 10 reakcí.

1 reakce		10 reakcí		Podmínky skladování
Reagencie	Objem (μl)	Reagencie	Objem (μl)	
Voda	8,25	Voda	82,5	RT
2x PCRBIO Mix	12,5	2x PCRBIO Mix	125	-20 °C
DMSO (100%)	1,25	DMSO	12,5	RT
Forward primer (20 pmol)	0,5	Forward primer (20 pmol)	0,5	-20 °C
Reverse primer (20 pmol)	0,5	Reverse primer (20 pmol)	0,5	-20 °C
DNA	2	DNA	2	-
Celkový objem	25	Celkový objem	250	

Příprava PCR reakce probíhala v laminárním boxu. Nejdříve jsem si z mrazicího boxu vyndala potřebné reagenty a nechala je rozmrazit. Do chladicího stojánku jsem si připravila 0,2 μl mikroskopické pipety, které jsem si označila identifikačními čísly vzorků a jednu mikroskopickou pipetu jsem určila pro negativní kontrolu. Připravila jsem si jednu zkumavku o objemu 1,5 ml, do které jsem připravila reakční mix pro příslušný počet vzorků. Nejdříve jsem přepočítala objem reagensií pro 1 reakci (viz tab. 5) na příslušný počet vzorků, které jsem zpracovávala. Rozmražené reagenty jsem zvortexovala a zcentrifugovala a následně po 23 μl rozpipetovala do označených mikroskopických zkumavek. Vzorky DNA jsem před použitím zvortexovala a stočila na minicentrifuze. V případě, že vzorky DNA byly uchovány v mrazicím boxu, bylo potřeba je předem nechat rozmrazit a zvortexovat a stočit. Následně jsem do mikroskopických zkumavek přidala 2 μl odpovídajícího vzorku DNA. K negativní kontrole jsem přidala 2 μl vody. Výslednou směs reakčního mixu a DNA, která měla výsledný objem 25 μl jsem zvortexovala a zcentrifugovala. Zkumavky, které jsem takto připravila, jsem umístila do termocycleru (MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler). Na termocycleru jsem zvolila předem nastavený PCR reakční protokol pro gen *IFITM3*, který jsem shrnula v tabulce 9.

Tabulka 9: Reakční protokol PCR reakce.

Krok programu	Denaturace	Amplifikace			Melting	Chlazení
Počet cyklů	1	35			1	1
Cílová teplota (°C)	95	95	60	72	72	4
Doba extenze	00:03:00	00:00:30	00:00:45	00:01:00	00:05:00	-

4.6 Gelová elektroforéza

Produkty PCR bylo potřeba zkontrolovat pomocí gelové elektroforézy. Díky gelové elektroforéze je možné ověřit, zda PCR produkty mají odpovídající délku 325 bp. Pro tuto metodu je nutné si nejprve připravit 4% agarózový gel.

4.6.1 Příprava gelu

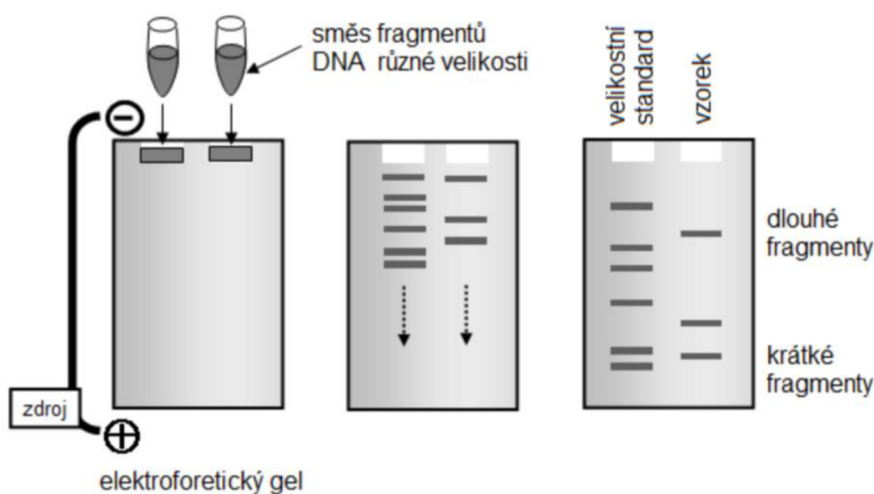
Před provedením samotné elektroforézy jsem si připravila 4% agarózový gel. Seznam reagensií je shrnut v tabulce 10.

Tabulka 10: Přehled použitých reagensií pro přípravu gelu.

Reagencie	Podmínky skladování
TBE pufr	RT
Agarózové tablety	RT
Barva EliDNA™ PS GREEN	RT

Do elektroforetické formy jsem umístila hřebeny pro vytvoření budoucích jamek pro vzorky. Do plastové kádinky jsem si odlila 50 ml předem připraveného 1xTBE pufru a k němu jsem přidala 4 agarózové tablety. Tablety jsem nechala rozpustit. Kádinku jsem umístila do mikrovlnné trouby, ve které jsem cca 3 minuty ohřívala roztok při maximálním výkonu. Při ohřevu jsem pozorovala a kontrolovala obsah kádinky, aby mi při vybublání nepřetekl její obsah, v případě potřeby jsem kádinku vyndala z mikrovlnné trouby a krouživým pohybem promíchala její obsah. Po provaření jsem tento průhledný gelový roztok nechala mírně zchladnout a poté jsem přidala 15 µl fluorescenční barvy EliDNA™ PS GREEN. Do předem připravené formy jsem nalila hotovou směs a špachtličkou jsem odstranila veškeré bubliny, které by mohly negativně ovlivnit průběh elektroforézy. Po ztuhnutí gelu jsem z něj vyndala hřebeny. Gel jsem umístila do elektroforetické vany

s 1xTBE puřrem, kterého jsem dolila tolik, aby byl gel celý ponořený. Schéma gelové elektroforézy je znázorněno na obrázku 9.



Obrázek 9: Schéma gelové elektroforézy (převzato z https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz).

4.6.2 Aplikace vzorků na gel

Seznam použitých reagentů pro průběh gelové elektroforézy je uveden v tabulce 11.

Tabulka 11: Přehled reagentů použitých pro gelovou elektroforézu.

Reagencie	Podmínky skladování
FastGene® 100 bp DNA Ladder H3 RTU	RT

Aby bylo možné odečíst velikost PCR produktů, jsem do první jamky gelu, který byl umístěný v elektroforetické vaně, napipetovala 5 µl markeru FastGene® 100 bp DNA Ladder H3 RTU. Vzorky jsem napipetovala do dalších jamek po 5 µl. Elektroforéza probíhala po dobu 15 minut při 135 V. Poté byl gel přenesen na UV detekční systém (FastGene® GelPic LED Box), kde jsem provedla kontrolu PCR produktů. Očekávaná délka PCR produktu byla 325 bp. V případě potřeby jsem gel vrátila zpět do elektroforetické vany, kde jsem nechala probíhat elektroforézu ještě několik minut. Pomocí detekčního systému jsem gel vyfotila a jeho fotografii uložila na paměťovou kartu. Příklad vyfoceního gelu je uveden na obrázku 10.



Obrázek 10: Příklad detekce PCR produktu amplifikovaného genu *IFITM3* na gelu. Na gelu vidíme hmotnostní marker s definovanými délkami jednotlivých fragmentů a PCR produkt o velikosti 325 bp.

4.7 Sekvence

Analýza polymorfismů v genu *IFITM3* byla provedena metodou přímé sekvenace PCR produktů. Sekvence byla realizována formou služby firmou SEQme s.r.o. Firma SEQme využívá sekvenátory od firmy Applied Biosystems.

Je důležité produkty před sekvenováním přechistit, abychom odstranili zbytky krátkých sekvencí, primerů a nevyužitých nukleotidů. Pokud bychom tento krok vynechali, příměsy by negativně ovlivňovaly proces sekvenování. Firma SEQme s.r.o. vyžaduje pro sekvenaci úseku o velikosti < 500 bází množství 50 ng přečištěného PCR produktu a 25 pmol příslušného primeru v celkovém objemu 10 μ l.

Ke vzorku vždy přidáváme pouze jeden z primerů, který zvolíme podle potřeby. Pokud je potřeba vzorek osekvenovat z obou stran, je nutné stejný PCR produkt sekvenovat z forward i reverse primeru ve dvou oddělených reakcích. V případě genu *IFITM3* stačí přidávat pouze reverse primer. Proto byla pro každý vzorek připravena a odeslána k sekvenaci pouze jedna zkumavka.

4.7.1 Přečištění PCR produktu

Pro přečištění PCR produktu jsem použila kit SAP-Exo DNA Cleanup dle doporučení výrobce Jena BioScience, Tento kit obsahuje dva hydrolytické enzymy, rekombinantní alkalickou fosfatázu (rSAP) a exonukleázu I (Exo I). Tyto enzymy zajišťují defosforylaci dNTP a degradaci zbytkových primerů. Reagencie použité k přečištění PCR produktu jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12: Seznam použitých reaglií pro přečištění PCR produktu.

Reagencie	Podmínky skladování
SAP-Exo DNA Cleanup Jena BioScience	-20 °C

Pro každý PCR produkt jsem si připravila 0,2 ml mikrozkušavky, které jsem stejně jako v předchozích krocích popsala identifikačními čísly vzorků. Do mikrozkušavky jsem napipetovala 2 µl PCR produktu a 5 µl SAP-Exo DNA Cleanup reagentu. Zkušavky jsem nechala stočit na centrifuze a následně je umístila do termocycleru a spustila příslušný reakční protokol uvedený v tabulce 13.

Tabulka 13: Reakční protokol pro přečištění PCR produktu.

Krok programu	Degradace primerů a nukleotidů	Inaktivace reagentu	Chlazení
Cílová teplota (°C)	37	80	4
Doba extenze	00:10:00	00:10:00	-

4.7.2 Příprava vzorků pro sekvenaci

Ještě před tím než je přečištěný PCR produkt odeslán na sekvenaci do firmy SEQme s.r.o., musí být připraven dle instrukcí firmy SEQme s.r.o. Je nutné k vzorkům o požadované koncentraci přidat příslušný primer a vodu. V případě genu *IFITM3* byl použit reverse primer. Reagencie, které jsem použila, jsou uvedeny v tabulce 14.

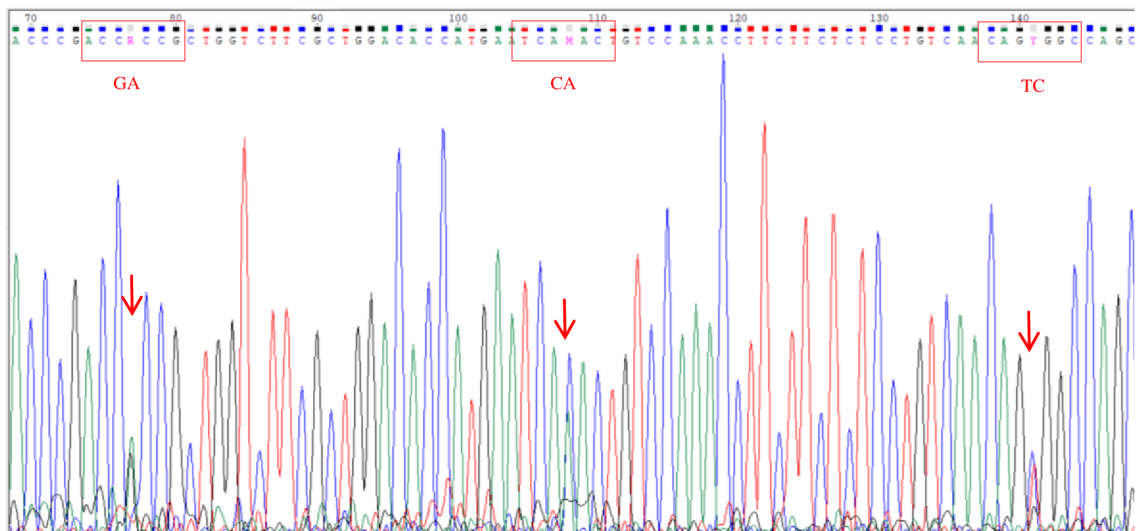
Tabulka 14: Seznam použitých reaglií pro přípravu vzorku pro sekvenaci.

Reagencie	Podmínky skladování
Deionizovaná voda	RT
<i>IFITM3</i> reverse primer (20 pmol)	-20 °C

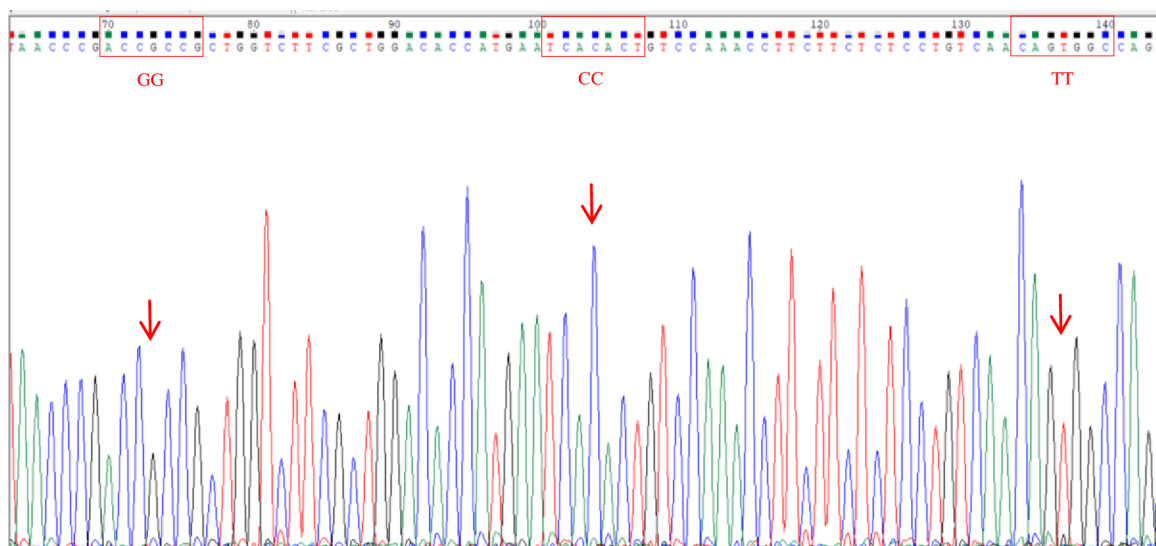
Do laminárního boxu jsem si připravila 0,2 ml mikrozkušavky, které jsem si opět označila identifikačními čísly vzorků. Protože pruhy na gelu při gelové elektroforéze byly většinou dobře viditelné, stačilo zvolit menší množství reagensů. Pro každý vzorek jsem použila 8,5 µl injekční vody, 0,5 µl reverse primeru a 1 µl PCR produktu. Výsledný objem reakce byl 10 µl. Sekvenování firmou SEQme s.r.o. bylo velmi rychlé a výsledky sekvenace byly dodány do dvou pracovních dnů.

4.7.3 Vyhodnocení sekvenačních reakcí

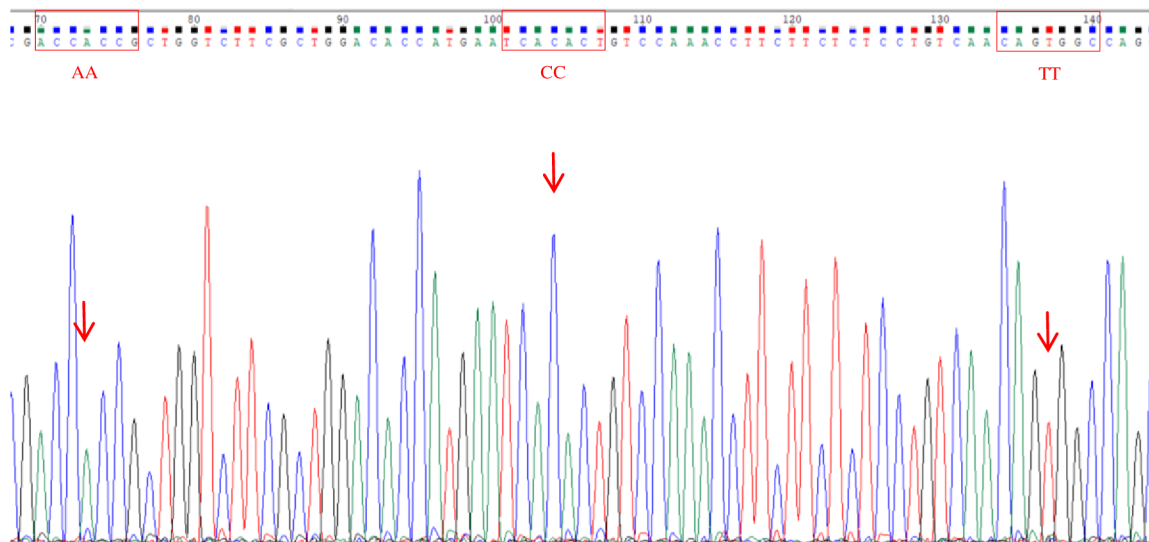
Pomocí freewarového programu Chromas jsem mohla v počítači analyzovat výsledné sekvenační reakce. Pro hodnocení jsem nejprve převedla výsledné sekvence na reverzní komplementární sekvence (příkaz reverse + complement). V programu jsem vymazala nečitelné šumy ze začátku a konce každé sekvence, tu jsem následně prohlédla a zkontrolovala z hlediska čitelnosti. Soubor jsem exportovala a uložila ve formátu FASTA. Takto upravené sekvence jsem mohla porovnat s genovou databází NCBI (National Center for Biotechnology Information). Sekvence jsem porovnávala pomocí nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Žádný z vyšetřovaných jedinců neměl mutace na jiných místech genu, než v analyzovaných polymorfismech rs34481144, rs1336853 a rs12252, tyto sekvenační shody a zjištěné genotypy jsem zaznamenala do tabulky 22 v příloze 1. Na obrázcích 11, 12, 13, 14 a 15 jsou uvedeny sekvence elektroforetogramů, v nichž jsou uvedeny příklady výsledků sekvenace v polymorfismech genu *IFITM3* pro všechny haplotypy, které se v analyzované skupině vyskytovaly. V červených rámečcích jsou vyznačeny obklopující sekvence a šipkou jsou označeny konkrétní pozice. Mezi 70 bp a 80 bp leží polymorfismus rs34481144, který se vyskytuje mezi triplety ACC a CCG. Missence polymorfismus rs1136853 se vyskytuje kolem 100 bp mezi triplety TCA a ACT. Poslední polymorfismus vyskytující se v délce 140 bp, je rs12252 a nachází se mezi triplety CAG a GGC.



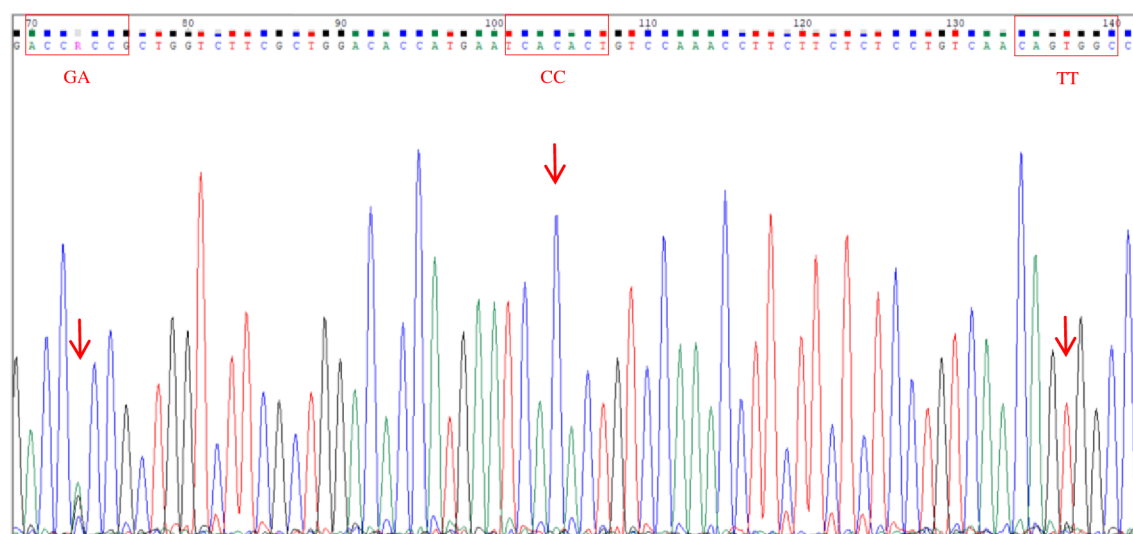
Obrázek 11: Výsledek sekvenace ukazující přítomnost alel G/A, C/A a T/C v polymorfismech rs34481144, rs1136853 a rs12252 (zdroj: vlastní).



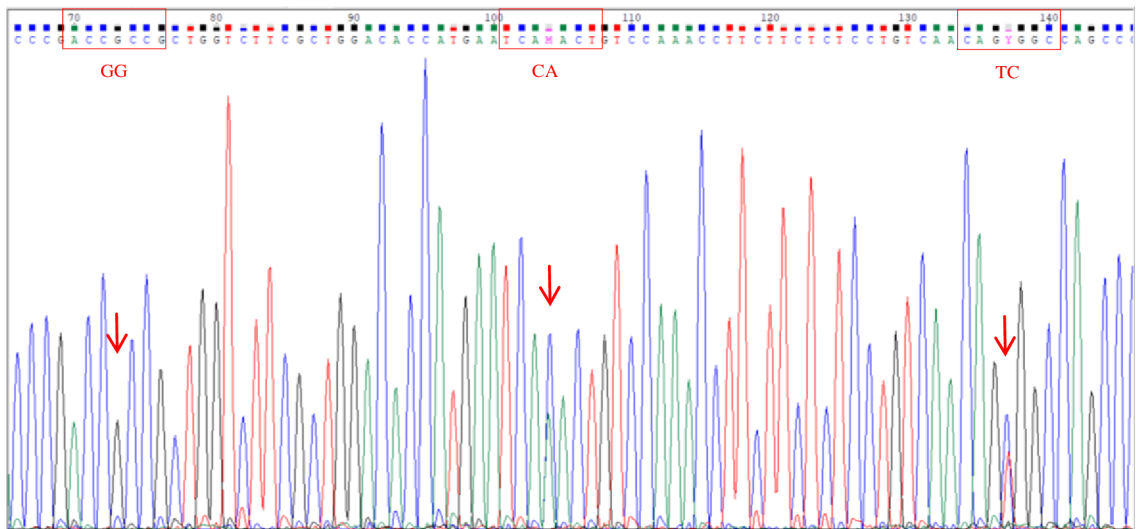
Obrázek 12: Výsledek sekvenace ukazující přítomnost wild type alel G/G, C/C a T/T v polymorfismech rs34481144, rs1136853 a rs12252 (zdroj: vlastní).



Obrázek 13: Výsledek sekvenace ukazující přítomnost alel A/A, C/C a T/T v polymorfismech rs34481144, rs1136853 a rs12252 (zdroj: vlastní).



Obrázek 14: Výsledek sekvenace ukazující nejčastější haplotyp ve vyšetřované skupině G/A, C/C a T/T v polymorfismech rs34481144, rs1136853 a rs12252 (zdroj: vlastní).



Obrázek 15: Výsledek sekvenace ukazující přítomnost alel G/G, C/A a T/C v polymorfismech rs34481144, rs1136853 a rs12252 (zdroj: vlastní).

5 Výsledky

Pro experimentální část mé bakalářské práce jsem použila vybraný soubor pacientů z genetické laboratoře GENLABS s.r.o. V období od března 2018 do konce roku 2021 bylo v této laboratoři analyzováno celkem 110 vzorků na přítomnost polymorfismů rs34481144, rs1136853, rs12252 v genu *IFITM3*. Z tohoto počtu respondentů bylo 70 žen a 40 mužů (příloha 1; tabulka 22).

5.1 Zjištěné varianty v genu *IFITM3*

Celkem bylo analyzováno 110 sekvenačních reakcí a byly vyhodnoceny jednotlivé genotypy pro vybrané SNP. Soubor byl zhodnocen celkově a v další fázi jsem tento soubor rozdělila na dvě skupiny klientů, bez diagnózy (převážně dospělí klienti; soubor 1) a dětští pacienti s diagnózou typu ADHD, PAS apod. (soubor 2; tabulka 23). Rozdělení analyzovaného souboru podle stavu pacienta je uvedeno v tabulce 15.

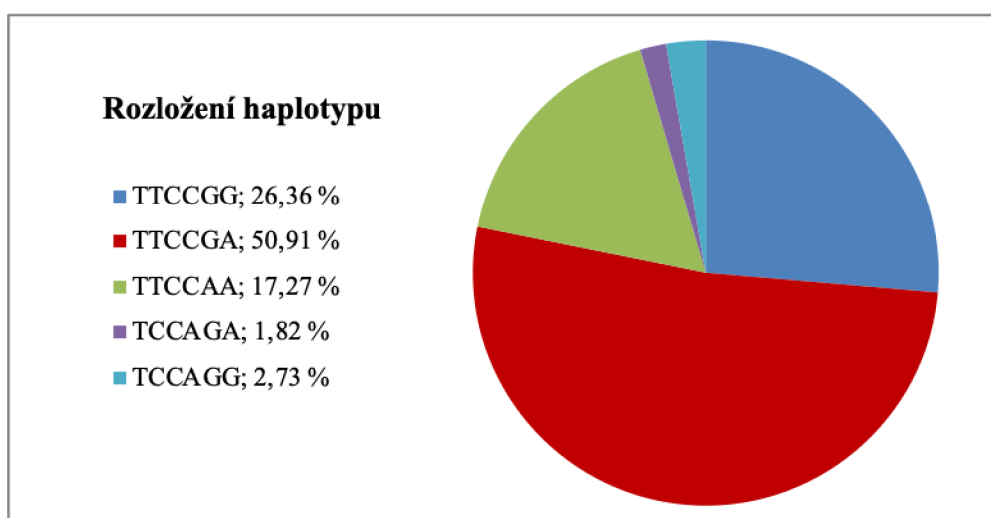
Tabulka 15: Rozdělení analyzovaného souboru podle stavu pacienta.

Soubor	Pacientova diagnóza	Počet vzorků	Tabulka
Soubor 1	Pacienti bez diagnózy	83	Tabulka 22
Soubor 2	Pacienti s diagnózou	27	Tabulka 23
Soubor 1 + 2	Všichni pacienti	110	Tabulka 22

V souboru všech respondentů bylo zjištěno celkem 26,36 % pacientů, kterým nebyla zjištěna žádná mutace v tomto genu a měli haplotyp TTCCGG. Nejčetnější haplotyp v této skupině byl TTCCGA, celkem 51,82 % respondentů mělo variantní alelu G/A v polymorfismu rs34481144. Další skupina 17,27 % pacientů měla haplotyp TTCCAA, u nich se vyskytovala homozygotní variantní alel A/A. Jen 1,82 % respondentů mělo vysoce variantní haplotyp pro všechny sledované alely: TCCAGA (variantním heterozygoti T/C pro rs12252, variantní heterozygoti C/A pro rs1136853 a variantní heterozygoti pro rs34481144 G/A). Posledním nalezeným haplotypem, byl haplotyp TCCAGG zastoupen v 2,73 % případů. Tito respondenti měli variantní alelu T/C v rs 12252 a C/A v rs1136853. Jednotlivé četnosti haplotypů jsou uvedeny v tabulce 16 a graficky znázorněny na obrázku 16.

Tabulka 16: Tabulka četnosti haplotypů pro SNP rs34481144, rs1136853 a rs12252 genu *IFITM3* v souboru 1 + 2, variantní alely jsou označeny červeně.

Haplotyp	Počet	Procentuální zastoupení	Riziko
TTCCGG	29/110	26,36%	Bez rizika.
TTCCGA	57/110	51,82%	Mírné riziko, 1 variantní alela.
TTCCAA	19/110	17,27%	Vysoké riziko, 2 variantní alely.
TCCAGG	3/110	2,73%	Vysoké riziko, 2 variantní alely.
TCCAGA	2/110	1,82%	Vysoké riziko, 3 variantní alely.

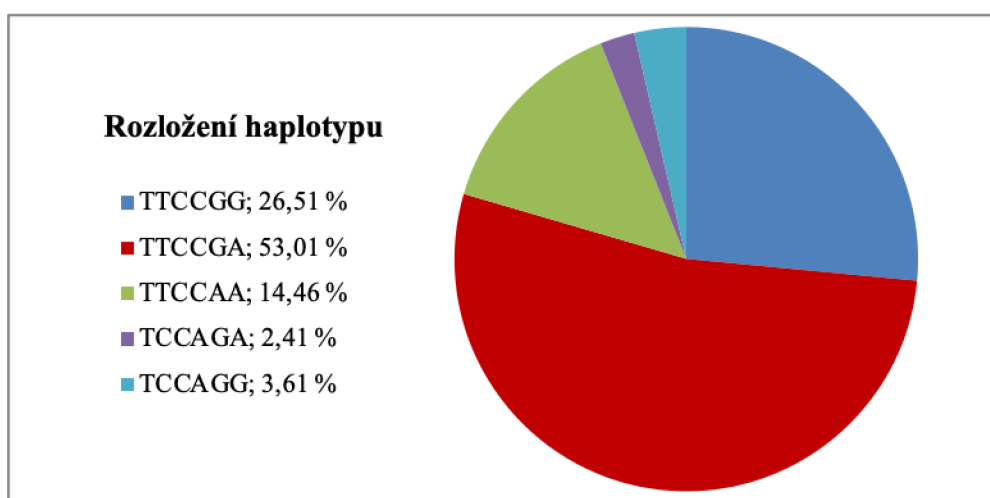


Obrázek 16: Rozložení jednotlivých haplotypů pro SNP rs34481144, rs1136853 a rs12252 genu *IFITM3* v souboru 1 + 2 (všichni testovaní jedinci).

Po odstranění pacientů s autismem ze základního souboru, bylo možné spočítat četnosti genotypů u pacientů bez neurologického onemocnění (soubor 1). V tomto souboru se vyskytovalo 26,51 % haplotypem TTCCGG, kterým nebyla zjištěna žádná variantní alela. I v tomto případě byl haplotyp TTCCGA nejčetnější a vyskytoval se u 53,01 % pacientů. Třetí nejpočetnější haplotyp TTCCAA mělo 14,46 % pacientů. Variantní alelu v rs34481144 C, rs1136853 A i rs12252 A v heterozygotním stavu mělo 2,41 % pacientů s haplotypem TCCAGA. Haplotyp TCCAGG byl zastoupen u 3,61 % pacientů. Tyto četnosti genotypů jsou uvedeny v tabulce 17 a graficky znázorněny na obrázku 17.

Tabulka 17: Tabulka četnosti haplotypů pro SNP rs34481144, rs1136853 a rs12252 genu IFITM3 v souboru 1 (pacienti bez neurologické diagnózy), variální alely jsou označeny červeně.

Haplotyp	Počet	Procentuální zastoupení	Riziko
TTCCGG	22/83	26,51%	Bez rizika.
TTCCGA	44/83	53,01%	Mírné riziko, 1 variantní alela.
TTCCAA	12/83	14,46%	Vysoké riziko, 2 variantní alely.
TCCAGG	3/83	3,61%	Vysoké riziko, 2 variantní alely.
TCCAGA	2/83	2,41%	Vysoké riziko, 3 variální alely.



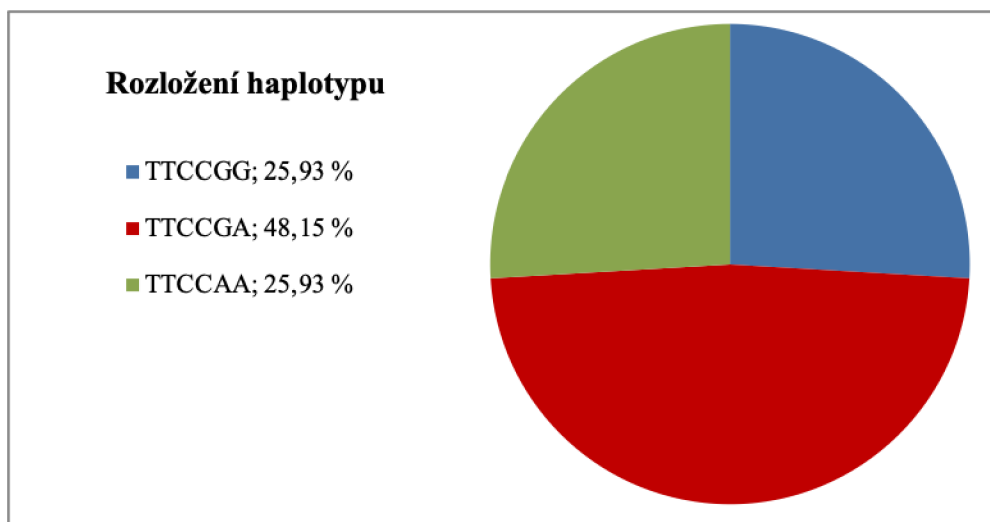
Obrázek 17: Rozložení jednotlivých haplotypů pro SNP rs34481144, rs1136853 a rs12252 genu IFITM3 v souboru 1.

V druhém analyzovaném souboru byli testováni převážně dětské pacienty s autismem či jinými neurologickými poruchami. Diagnózy těchto pacientů jsou uvedeny v tabulce 23 v příloze 2. Tabulka 23 obsahuje identifikační číslo pacienta, které odpovídá číslu z tabulky všech vyšetřovaných pacientů (příloha 2, tabulka 23), dále pohlaví pacienta, diagnózu a genotypy pro polymorfismy rs34481144, rs 1136853 a rs12252.

V této skupině se bylo 25,93 % pacientů bez variální alely, kteří měli haplotyp TTCCGG. Genotyp TTCCGA byl i v této skupině nejpočetnější a vyskytoval se u 48,15 % jedinců. Posledním vyskytujícím se haplotypem ve skupině pacientů s autismem byl v 25,93 % haplotyp TTCCAA. Další haplotypy se v tomto souboru nevyskytovaly. Četnosti genotypů pacientů s autismem. Jsou uvedeny v tabulce 18 a graficky znázorněny na obrázku 18.

Tabulka 18: Tabulka četnosti haplotypů SNP rs34481144, rs1136853 a rs12252 genu IFITM3 v souboru 2 (pacienti s autismem).

Haplotyp	Počet	Procentuální zastoupení	Riziko
TTCCGG	7/27	25,93 %	Bez rizika.
TTCCGA	13/27	48,15 %	Mírné riziko, 1 variantní alela.
TTCCAA	7/27	25,93 %	Vysoké riziko, 2 variantní alely.



Obrázek 18: Rozložení jednotlivých haplotypů pro SNP rs34481144, rs1136853 a rs12252 genu IFITM3 v souboru 2.

5.2 Frekvence jednotlivých genotypů v souboru 1 + 2

Ze všech vyhodnocených dat jsem posuzovala frekvence genotypů pro jednotlivé polymorfismy. V analyzovaném souboru všech vyšetřovaných pacientů (soubor 1 + 2) byla pro polymorfismus rs34481144 zjištěna frekvence alel wild type homozygotů G/G u celkem 29,09 % pacientů. Dalších 52,73 % pacientů bylo určených jako variantní heterozygoti G/A a frekvence alel variantních homozygotů A/A se vyskytovala u 17,27 % pacientů. Frekvence alel a jejich procentuální zastoupení je uvedeno v tabulce 19 a graficky znázorněno na obrázku 19.

Tabulka 19: Tabulka frekvence genotypů pro rs 34481144 genu IFITM3 v souboru 1 + 2.

Polymorfismus	Alela	Počet	Procentuální zastoupení
rs34481144	GG	32	29,09
	GA	59	52,73
	AA	19	17,27

Pro polymorfismus rs1136853 byla zjištěna frekvence alel wild type homozygotů C/C celkem u 94,55 % respondentů. V souboru pacientů laboratoře se vyskytlo 4,55 % variantních heterozygotů C/A. Homozygotní jedinci A/A se v testovaném souboru nevyskytovali. Frekvence alel a jejich procentuální zastoupení je uvedeno v tabulce 20 a graficky znázorněno na obrázku 19.

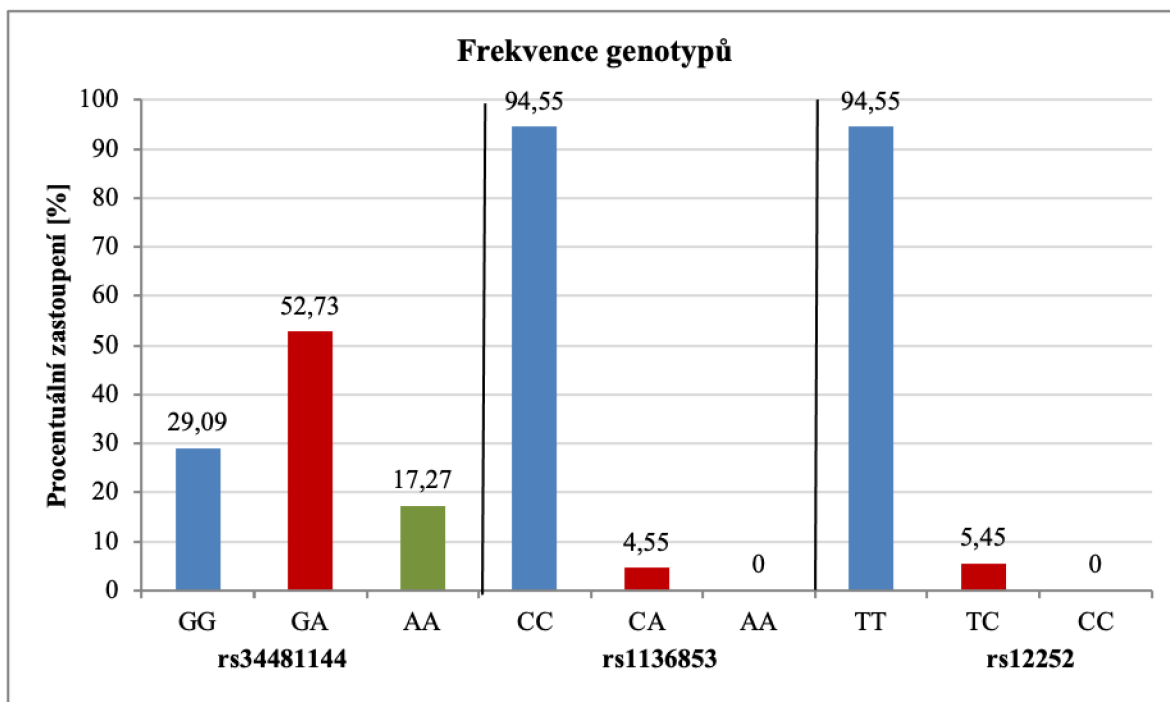
Tabulka 20: Tabulka frekvence genotypů pro rs 1136853 genu IFITM3 v souboru 1 + 2.

Polymorfismus	Alela	Počet	Procentuální zastoupení
rs1136853	CC	104	94,55
	CA	5	4,55
	AA	0	0

Pro polymorfismus rs12252 byla zjištěna frekvence alel wild type homozygotů T/T celkem u 94,55 % pacientů, frekvence variantních heterozygotů T/C u 5,45% pacientů, homozygotní jedinci AA se v analyzovaném souboru nevyskytovali. Frekvence alel a jejich procentuální zastoupení je uvedeno v tabulce 21 a graficky znázorněno na obrázku 19.

Tabulka 21: Tabulka frekvence genotypů pro rs 12252 genu IFITM3 souboru 1 + 2.

Polymorfismus	Alela	Počet	Procentuální zastoupení
rs12252	TT	104	94,55
	TC	6	5,45
	CC	0	0



Obrázek 19: Grafické znázornění frekvencí jednotlivých genotypů pro polymorfismy rs34481144, rs1136853 a rs12252 genu *IFITM3* v testovaném souboru 1 + 2.

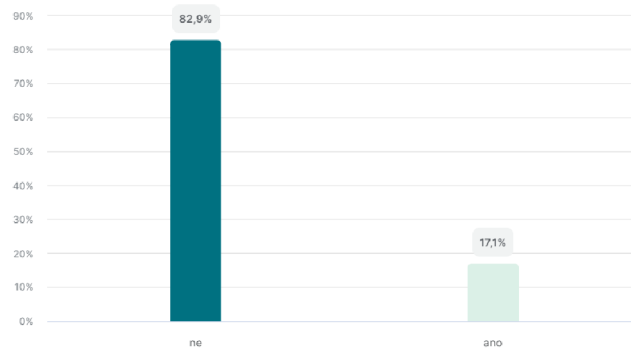
5.3 Dotazníkové šetření

U pacientů vyšetřovaných na polymorfismy v genu *IFITM3* bylo provedeno dotazníkové šetření, ve kterém bylo respondentům položeno celkem 12 otázek. Struktura dotazníku je uvedena v příloze 3, obrázek 26. Toto šetření bylo provedeno pomocí internetového serveru SURVIO. K identifikaci pacienta sloužila první otázka. Zbýlých 11 otázek se týkalo průběhu prodělaných virových onemocnění typu sezónní chřipka a Covid-19, očkování atd. Z celkového počtu 110 oslovených pacientů se podařilo získat celkem 35 vyplněných dotazníků. Následující část bude zaměřena na vyhodnocení a rozbor výsledků dotazníkového šetření. Z důvodu malého počtu respondentů nebylo možné získaná data statisticky zhodnotit.

V případě otázek ohledně virového onemocnění sezónní chřipky se v grafech neukázala žádná zajímavá data, jelikož většina respondentů tvrdila, že sezónní chřipku neprodělala. U virového onemocnění Covid-19 to bylo zajímavější, protože všichni odpovídající jedinci díky plošnému testování věděli, zda toto onemocnění prodělali nebo ne. Jednotlivé příznaky průběhu onemocnění Covid-19 jsou procentuálně zaznamenány v grafu na obrázku 24. Dokonce se u některých jedinců projevy i příznaky postinfekčního

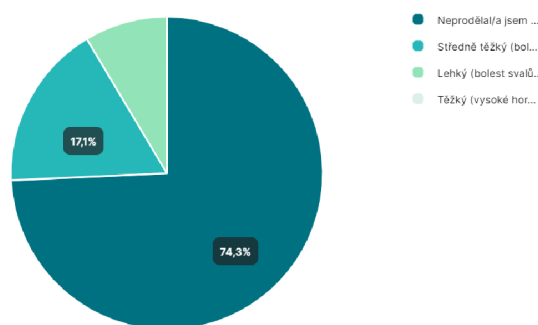
syndromu, nejčastěji to byly poruchy soustředění, únava a celková slabost. Příklady hodnocení jednotlivých odpovědí jsou uvedeny na obrázcích 20 – 25.

2. Prodělal/a jste sezónní chřipku?



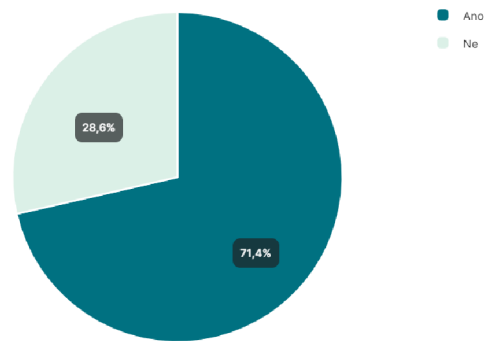
Obrázek 20: Grafické znázornění odpovědí na druhou otázku dotazníkového šetření (zdroj: <https://www.surveo.com/cs/>).

3. Jak závažný byl průběh sezónní chřipky?



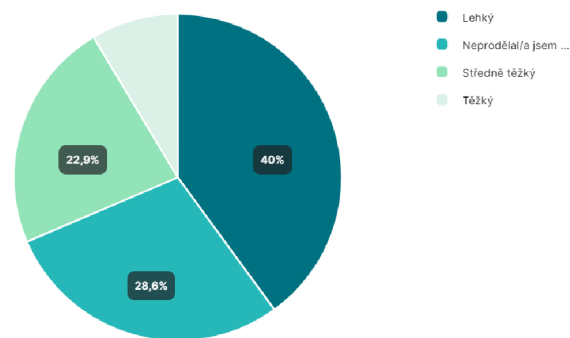
Obrázek 21: Grafické znázornění odpovědí na třetí otázku dotazníkového šetření (zdroj: <https://www.surveo.com/cs/>).

8. Prodělal/a jste onemocnění Covid-19?



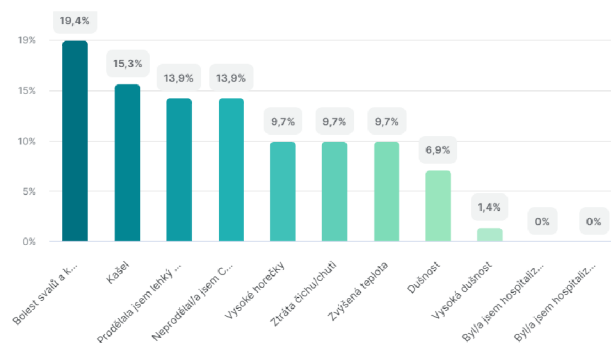
Obrázek 22: Grafické znázornění odpovědi na osmou otázku dotazníkového šetření (zdroj: <https://www.surveio.com/cs/>).

9. Jak závažný byl průběh onemocnění Covid-19?



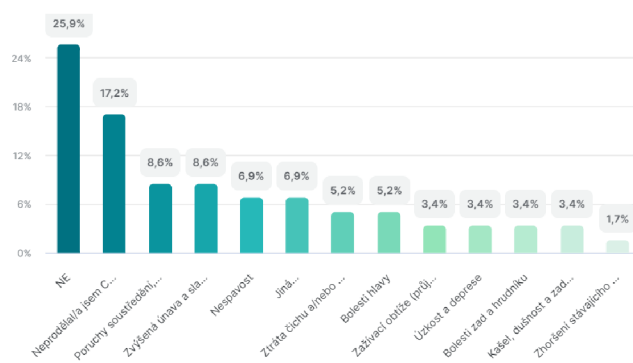
Obrázek 23: Grafické znázornění odpovědi na devátou otázku dotazníkového šetření (zdroj: <https://www.surveio.com/cs/>).

10. Jak u vás probíhalo onemocnění Covid-19?



Obrázek 24: Grafické znázornění odpovědi na desátou otázku dotazníkového šetření (zdroj: <https://www.surveio.com/cs/>).

11. Trpíte postinfekčním syndromem?



Obrázek 25: Grafické znázornění odpovědí na jedenáctou otázku dotazníkového šetření (zdroj: <https://www.surveo.com/cs/>).

6 Diskuze

Jednonukleotidové polymorfismy genu *IFITM3* jsou považovány za klíčové faktory antivirové kapacity a mohou modulovat úroveň exprese nebo integritu proteinu *IFITM3* (Yanéž *et al.*, 2020). Tyto polymorfismy jsou také spojovány s protilátkovou odpovědí na vakcínu proti chřipce a mohou bránit infekci buněk (Lei *et al.*, 2020). Genetické polymorfismy jsou definovány jako výskyt více alel v lokusu a mohou se projevit ve struktuře a funkci proteinu. V naší populaci není dostatečně prozkoumáno genetické riziko ovlivňující průběh virových onemocnění, což by se podle mého názoru mělo změnit a tomuto genu by mělo být věnováno více pozornosti.

V genu *IFITM3* bylo detekováno celkem třináct polymorfismů, z nichž pro sedm již byly provedeny výzkumy (David *et al.*, 2018). Frekvence variantní alely A v SNP rs34481144 je v asijské a africké populaci téměř nulová. Naopak v evropské populaci se frekvence alel A/A vyskytuje u 22 %. Kombinace alel G/A se nejvíce vyskytuje v evropské populaci, a to u 49 % jedinců. Podobné frekvence genotypu G/A jsme zaznamenali i v našem souboru (52,73 %). Přítomnost genotypu G/A je v Asii 0 % a v Africe 10 %. Frekvence výskytu alel G/G v rs34481144 je v Evropě překvapivě nízká a tento genotyp byl detekován u 29 %, stejně jako v našem souboru (29,09 %). Naopak v africké a asijské populaci se jeho výskyt pohybuje od 90% do 100 % (David *et al.*, 2018). V Americe je zaznamenán také vyšší výskyt genotypu rs34481144 G/G (Wellington *et al.*, 2019). Genotyp A/A se v našem souboru vyskytoval u 17 % pacientů, v evropské populaci je zastoupen u 22 % (David *et al.*, 2018).

Rs12252 je nejvíce prostudovaným jednonukleotidovým polymorfismem, protože je často spojován s vážnými následky infekce viru chřipky A. Z výzkumů vyplývá, že variantní genotyp způsobuje neschopnost inhibovat infekci virem chřipky A (Everitt *et al.*, 2012). Everitt *et al.*, 2012 ve své studii uvádí, že homozygotní genotyp C/C a heterozygotní genotyp C/T mají významně vyšší frekvenci v asijské než v evropské populaci. Toto tvrzení potvrzuje výzkum David *et al.* (2018), který uvádí 30% výskyt genotypu C/C v Asii, asi 6% výskyt v africké populaci a nulový výskyt v evropské populaci. Pro genotyp C/T je uvedena frekvence v Asii 38 % a v Evropě pouze 7 %. V Africe se tyto alely vyskytují u 36 % (David *et al.*, 2018). V Americe je stejně jako v Evropě nejvyšší výskyt genotypu T/T (Wellington *et al.*, 2019), v Evropě je to konkrétně 93 %. V Africe se tyto

alely vyskytují u 36 % jedinců. Velmi podobné frekvence genotypů jsme detekovali i v našem souboru (94,55% TT; 5,45% TC a 0% C/C).

Výskyt genotypu A/A v rs1136853 je ve všech populacích studie Davit *et al.* (2018) nulový. Pro genotyp A/C je frekvence výskytu 4 % v Evropě, 12 % v Africe a v Asii se tato varianta nevyskytuje. Výskyt wild type genotypu C/C je v Asii 100 %, v evropské populaci se vyskytuje u 95 % a v Africe u 87 % jedinců (David *et al.*, 2018). I přes to, že se výsledky populační genetiky výzkumu Wellington *et al.*, 2019 o pár procent liší od výsledků David *et al.* 2018, je možné vyvodit stejné závěry. V případě rs1136853 jsme v našem souboru opět zaznamenali velmi podobné frekvence genotypů (CC v 94,55 %; CA v 4,55 % a AA v 0 % případech). Výsledné frekvence všech testovaných genotypů v našem souboru téměř přesně odpovídali publikovaným populačním studiím. Jiné mutace nebo polymorfismy s možným funkčním vlivem na produkci enzymu IFITM3 se v analyzované části genu nevyskytovali ani u jednoho pacienta.

Cílem mé bakalářské práce bylo pomocí metod molekulární biologie vyšetřit zastoupení haplotypu a genotypové frekvence vyšetřovaných polymorfismů u pacientů genetické laboratoře GENLABS s.r.o. Pro tuto práci bylo pomocí PCR reakce a metody Sangerovy sekvenace zpracováno 110 vzorků, z nichž se u 27 pacientů vyskytoval autismus nebo jiná neurologická porucha. Výsledné genotypy pro jednotlivé SNP jsem převedla na haplotypy, z důvodu lepšího pochopení souběžného výskytu více variantních alel, které mohou funkci genu IFITM3 ovlivňovat komplexně. V celém analyzovaném souboru se vyskytovalo 5 různých haplotypů. Ve všech souborech byl nejvíce zastoupen haplotyp TTCCGA, druhý nejčastější byl wild type haplotyp TTCCGG. Haplotyp TTCCAA mělo 17,27 % pacientů. Haplotypy TCCAGA a TCCAGG byly zastoupeny ve všech souborech nejméně. Přes malý počet pacientů v souboru 2 – dětských pacientů s neurologickou diagnózou se objevily zajímavé výsledky. U autistických pacientů se nevyskytovaly genotypy TTCAGA, TCCAGA a TCCAGG, ale byl zde významněji zastoupen haplotyp TTCCAA (25,93%) se dvěma variantními alelami a vysokým rizikem pro těžký průběh virových onemocnění, což může souviset s jejich diagnózou autismu.

Přes malý počet respondentů (pouze 35), jsem se pokusila zpracovat výše uvedené dotazníkové šetření, které mělo být zaměřeno na souvislost polymorfismů genu *IFITM3* s průběhem virových onemocnění. V rámci vyhodnocení odpovědí z dotazníků jsem zjistila, že pacienti, kteří se nechali očkovat proti onemocnění Covid-19, toto onemocnění

neprodělali anebo měli pouze lehký průběh. Vliv jednotlivých genotypů nebo přímo haplotypů na průběh virových onemocnění nebylo možné hodnotit pro malý počet odpovědí.

Výsledky získané v praktické části této práce zcela odpovídají jinými světovými studiím, ze kterých jsem čerpala data nejen pro porovnání frekvencí jednotlivých genotypů, ale i pro vypracování teoretické části této práce. Gen *IFITM3* a jeho genetická variabilita by měly být dále zkoumány, nejen protože do značné míry svými mechanismy ovlivňuje průběh virových, ale zřejmě i neurologických a dalších onemocnění. Význam genetické analýzy tohoto genu by mohl spočívat především v lepší ochraně predisponovaných jedinců a také ve výběru vhodných preventivních opatření, především v období virových epidemií či pandemií.

7 Závěr

Jedním z cílů mé bakalářské práce bylo vypracovat odbornou rešerši týkající se struktury, funkce a klinického významu genu *IFITM3* a jeho nejvýznamnějších polymorfismů. Vybrané polymorfismy mohou zásadně ovlivnit průběh virového onemocnění. Tato rešerše je zpracována v rámci úvodu a teoretické části této bakalářské práce.

V praktické části byl analyzovaný soubor (110 pacientů) otestován metodou PCR a následně osekvenován Sangerovým sekvenováním. Díky této metodě bylo možné vyhodnotit jednotlivé genotypové frekvence ve vyšetřovaných polymorfismech. Všechny sekvenační reakce byly hodnotitelné u všech pacientů byly získány genotypy i haplotypy pro tři vybrané SNP. Následně bylo zjištěno procentuální zastoupení genotypů/haplotypů a výsledná data byla porovnána s jinými populačními daty, kdy byla nalezena průkazná shoda v genotypových frekvencích ve všech polymorfismech. Pacienti byli také retrospektivně požádáni o vyplnění on-line dotazníku. Dotazníkového šetření se zúčastilo pouze 35 respondentů a proto nebylo možné statisticky zhodnotit dotazníková a tomu odpovídající genetická data, která by nám pomohla objasnit vliv genových polymorfismů na těžký průběh virových onemocnění.

Na závěr je třeba podotknout, že vyšetření genu *IFITM3* nepatří mezi rutinní vyšetření, jelikož mechanismy omezení virů tímto genem musí být ještě plně objasněny. Jsem zastáncem toho názoru, že by tomuto genu a jeho polymorfismům měla být věnována větší pozornost, ačkoli mutace v polymorfismech tohoto genu mají stále nejasný diagnostický význam a jsou předmětem mnoha studií.

8 Přílohy

Příloha 1; Tabulka 22:

Tabulka pacientů genetické laboratoře GENLABS s.r.o. vyšetřených na polymorfismy v genu IFITM3 a jejich zjištěné haplotypy.

Pacient	Pohlaví	rs12252 wtT/mut C	rs1136853 wtC/mutA	rs34481144 wtG/mutA	Sekvenční shoda
1	Ž	TT	CC	GA	99%
2	Ž	TC	CA	GA	99%
3	Ž	TT	CC	GA	99%
4	Ž	TC	CC	GA	99%
5	Ž	TT	CC	GG	99%
6	Ž	TT	CC	GG	99%
7	Ž	TT	CC	AA	99%
8	Ž	TT	CC	GA	99%
9	Ž	TT	CC	GA	99%
10	Ž	TT	CC	AA	99%
11	Ž	TT	CC	GA	99%
12	Ž	TT	CC	AA	99%
13	Ž	TT	CC	GA	99%
14	Ž	TT	CC	GA	99%
15	M	TT	CC	GA	99%
16	Ž	TC	CA	GG	99%
17	Ž	TT	CC	GG	99%
18	Ž	TT	CC	GG	99%
19	Ž	TT	CC	GA	99%
20	Ž	TT	CC	GA	99%
21	Ž	TT	CC	GA	99%
22	Ž	TT	CC	GA	99%
23	Ž	TT	CA	GA	99%
24	Ž	TC	CA	GG	99%
25	Ž	TT	CC	GG	99%
26	Ž	TT	CC	GA	99%
27	M	TT	CC	GG	99%
28	Ž	TT	CC	GA	99%
29	Ž	TT	CC	GA	99%
30	Ž	TT	CC	GA	99%
31	M	TT	CC	GG	99%
32	M	TT	CC	GA	99%
33	M	TT	CC	GA	99%
34	M	TT	CC	GA	99%
35	M	TT	CC	GA	99%

36	M	TT	CC	GG	99%
37	M	TT	CC	GA	99%
38	Ž	TT	CC	GA	99%
39	M	TT	CC	GG	99%
40	Ž	TT	CC	GA	99%
41	Ž	TT	CC	GG	99%
42	Ž	TT	CC	GA	99%
43	M	TT	CC	GG	99%
44	Ž	TT	CC	GA	99%
45	Ž	TT	CC	AA	99%
46	M	TT	CC	GG	99%
47	Ž	TT	CC	GA	99%
48	M	TT	CC	GA	99%
49	Ž	TT	CC	AA	99%
50	Ž	TT	CC	GG	99%
51	M	TT	CC	GA	99%
52	Ž	TT	CC	GG	99%
53	M	TT	CC	GG	99%
54	Ž	TT	CC	GA	99%
55	M	TT	CC	GA	99%
56	Ž	TT	CC	AA	99%
57	Ž	TT	CC	GG	99%
58	M	TT	CC	GA	99%
59	Ž	TT	CC	GA	99%
60	Ž	TT	CC	GG	99%
61	Ž	TT	CC	GA	99%
62	Ž	TT	CC	GA	99%
63	Ž	TT	CC	GG	99%
64	Ž	TT	CC	GG	99%
65	M	TT	CC	GA	99%
66	M	TT	CC	AA	99%
67	Ž	TT	CC	GA	99%
68	Ž	TT	CC	GA	99%
69	M	TT	CC	GA	99%
70	Ž	TT	CC	GA	99%
71	Ž	TT	CC	GA	99%
72	Ž	TT	CC	AA	99%
73	M	TT	CC	GA	99%
74	Ž	TT	CC	GG	99%
75	Ž	TT	CC	GG	99%
76	Ž	TT	CC	AA	99%
77	Ž	TT	CC	GA	99%
78	M	TT	CC	GG	99%

79	Ž	TC	CA	GG	99%
80	Ž	TT	CC	GA	99%
81	Ž	TT	CC	AA	99%
82	M	TT	CC	GG	99%
83	M	TT	CC	GG	99%
84	Ž	TT	CC	AA	99%
85	Ž	TT	CC	GA	99%
86	M	TT	CC	GA	99%
87	M	TT	CC	GA	99%
88	Ž	TT	CC	AA	99%
89	M	TT	CC	GG	99%
90	Ž	TT	CC	GA	99%
91	Ž	TT	CC	AA	99%
92	M	TT	CC	GA	99%
93	Ž	TC	CA	GA	99%
94	Ž	TT	CC	AA	99%
95	M	TT	CC	GG	99%
96	Ž	TT	CC	GA	99%
97	M	TT	CC	AA	99%
98	M	TT	CC	AA	99%
99	M	TT	CC	AA	99%
100	Ž	TT	CC	GG	99%
101	M	TT	CC	AA	99%
102	Ž	TT	CC	AA	99%
103	M	TT	CC	GA	99%
104	M	TT	CC	GA	99%
105	Ž	TT	CC	GA	99%
106	M	TT	CC	GA	99%
107	M	TT	CC	GA	99%
108	M	TT	CC	GA	99%
109	M	TT	CC	GG	99%
110	M	TT	CC	GG	99%

Příloha 2; Tabulka 23:

Tabulka autistických pacientů genetické laboratoře GENLABS s.r.o. vyšetřených na polymorfismy v genu IFITM3 a jejich zjištěné haplotypy. Tabulka obsahuje diagnózu a popis stavu pacienta. Čísla pacientů odpovídají číslům z přílohy 1.

Pacient	Pohlaví	Diagnóza/stručný popis stavu pacienta	IFITM3 haplotyp
97	M	ADHD, dětský autismus, regres po HEXA a MMR, po fekální transplantaci	TT/CC/AA
98	M	F-90, F-84, ADHD, ADD, vady řeči, ment. omezení, poškození HEXA, MMR	TT/ CC/AA
66	M	diagnóza nebyla k dispozici	TT/ CC/AA
72	Ž	diagnóza nebyla k dispozici	TT/ CC/AA
99	M	dětský autismus, ADHD, po HEXA a MMR regres	TT/ CC/AA
101	M	ADHD, PAS, DYsfazie, SPD-sensory processing disorder	TT/ CC/AA
102	Ž	diagnóza nebyla k dispozici	TT/ CC/AA
103	M	ADHD, ADD, těžká forma autismu, poškození po vakcinaci MMR	TT/ CC/GA
48	M	Fragilní X syndrom, ADHD, ADD	TT/ CC/GA
55	M	ment. retardace, ADHD, ADD, poškození z HEXA	TT/ CC/GA
104	M	dětský autismus, ADHD, ADD, poškození HEXA, MMR	TT/ CC/GA
71	Ž	ADHD, dysfazie, vady řeči	TT/ CC/GA
73	M	lehká forma ADHD	TT/ CC/GA
86	M	ADHD, dětský autismus, nemluví, F-90, F-84, poškození po HEXA a MMR	TT/ CC/GA
87	M	Genopaterální syndrom, mentální retardace, F-90, regres po MMR	TT/ CC/GA
92	M	ADHD, Autismus, ment. retr., poškození po MMR	TT/ CC/GA
105	Ž	dětský autismus, ADHD, po HEXA a MMR regres	TT/ CC/GA
106	M	PAS, zpožděný vývoj	TT/ CC/GA
107	M	podezření na PAS a ADHD	TT/ CC/GA
108	M	diagnóza nebyla k dispozici	TT/ CC/GA
63	Ž	Dětský autismus, ADHD, nemluví, histamin, Histony.	TT/ CC/GG
82	M	ADHD, dětský autismus, nemluví, F-90, F-84	TT/ CC/GG
83	M	mentální retardace, ADHD, nemluví, gastro potíže.	TT/ CC/GG
89	M	ADHD, dětský autismus, regres po HEXA a MMR, těžká forma autismu, nemluví	TT/ CC/GG
109	M	diagnóza nebyla k dispozici	TT/ CC/GG
46	M	NGS, dětský autismus, ADHD, neočkován	TT/ CC/GG
110	M	PAS, Velké zažívací potíže, zpožděný vývoj, fekální transplantace	TT/ CC/GG

Příloha 3; Obrázek 26: Struktura dotazníku.

1 Prosím vyplňte Vaše jméno a příjmení:

:

2 Prodělal/a jste sezónní chřipku?

Nápověda k otázce: *Vyberte jednu odpověď*

- ano ne

3 Jak závažný byl průběh sezónní chřipky?

Nápověda k otázce: *Vyberte jednu odpověď*

- Neprodělal/a jsem sezónní chřipku. Lehký (bolest svalů, kloubů, hlavy; rýma; kašel) Středně těžký (bolest svalů, kloubů, hlavy; únava; zvýšená teplota; rýma; kašel) Těžký (vysoké horečky, déle než týden; křeče; dušnost; silné bolesti hlavy)

4 Necháváte se očkovat proti sezónní chřipce?

Nápověda k otázce: *Vyberte jednu odpověď*

- Ne Ano - každý rok Ano - ne každý rok

5 Jak u Vás probíhalo onemocnění sezónní chřipky?

Nápověda k otázce: *Vyberte jednu nebo více odpovědí*

- | | | | | |
|--|--|--|---|---|
| <input type="checkbox"/> Neprodělal/a jsem sezónní chřipku | <input type="checkbox"/> Únava | <input type="checkbox"/> Bolest svalů a kloubů | <input type="checkbox"/> Bolest hlavy | <input type="checkbox"/> Rýma, ucpaný nos |
| <input type="checkbox"/> Bolest v krku | <input type="checkbox"/> Kašel | <input type="checkbox"/> Dušnost | <input type="checkbox"/> Zimnice/pocení/dehydratace | <input type="checkbox"/> Zvýšená teplota |
| <input type="checkbox"/> Vysoké horečky | <input type="checkbox"/> Zažívací potíže (průjem, zvracení, malátnost, nechutenství) | <input type="checkbox"/> Onemocnění trvalo 5-7 dní | <input type="checkbox"/> Onemocnění trvalo déle než týden | <input type="checkbox"/> Zánět průdušek |
| <input type="checkbox"/> Zápal plic | <input type="checkbox"/> Zánět dutin | <input type="checkbox"/> Byl/a jsem hospitalizován/a | | |

6 Trpíte postinfekčním syndromem?

Nápověda k otázce: *Vyberte jednu nebo více odpovědí*

- | | | | |
|--|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> Neprodělal/a jsem sezónní chřipku | <input type="checkbox"/> NE | <input type="checkbox"/> Kašel, dušnost a zadýchávání | <input type="checkbox"/> Zvýšená únava a slabost |
| <input type="checkbox"/> Bolesti hlavy | <input type="checkbox"/> Bolesti zad a hrudníku | <input type="checkbox"/> Ztráta čichu a/nebo chuti | <input type="checkbox"/> Nespavost |
| <input type="checkbox"/> Poruchy soustředění, zapomnětlivost | <input type="checkbox"/> Úzkost a deprese | <input type="checkbox"/> Zažívací obtíže (průjem, zácpa, nechutenství) | <input type="checkbox"/> Zhoršení stávajícího onemocnění (hypertenze, diabetes, ...) |
| <input type="checkbox"/> Jiná... <input type="text"/> | | | |

7 Jste očkovan/a proti onemocnění Covid-19?

Nápověda k otázce: *Vyberte jednu odpověď*

- Ne Ano - 1 dávka Ano - 2 dávky Ano - 3 dávky Ano - 4 dávky

8 Prodělal/a jste onemocnění Covid-19?

Nápověda k otázce: *Vyberte jednu odpověď*

- Ano Ne

9 Jak závažný byl průběh onemocnění Covid-19?

Nápověda k otázce: *Vyberte jednu odpověď*

- Neprodělal/a jsem Covid-19 Lehký Středně těžký Těžký

10 Jak u vás probíhalo onemocnění Covid-19?

Nápověda k otázce: *Vyberte jednu nebo více odpovědí*

- | | | | | |
|---|--|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> Neprodělal/a jsem Covid-19 | <input type="checkbox"/> Zvýšená teplota | <input type="checkbox"/> Kašel | <input type="checkbox"/> Dušnost | <input type="checkbox"/> Bolest svalů a kloubů |
| <input type="checkbox"/> Ztráta čichu/chuti | <input type="checkbox"/> Vysoké horečky | <input type="checkbox"/> Vysoká dušnost | <input type="checkbox"/> Byl/a jsem hospitalizován/a | <input type="checkbox"/> Byl/a jsem hospitalizován/a a napojen/a na podpůrné přístroje |
| <input type="checkbox"/> Prodělala jsem lehký průběh Covid-19 | | | | |

11 Trpíte postinfekčním syndromem?

Nápověda k otázce: *Vyberte jednu nebo více odpovědí*

- | | | | |
|--|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> Neprodělal/a jsem Covid-19 | <input type="checkbox"/> NE | <input type="checkbox"/> Kašel, dušnost a zadýchávání | <input type="checkbox"/> Zvýšená únava a slabost |
| <input type="checkbox"/> Bolesti hlavy | <input type="checkbox"/> Bolesti zad a hrudníku | <input type="checkbox"/> Ztráta čichu a/nebo chuti | <input type="checkbox"/> Nespavost |
| <input type="checkbox"/> Poruchy soustředění, zapomnětlivost | <input type="checkbox"/> Úzkost a deprese | <input type="checkbox"/> Zažívací obtíže (průjem, zácpa, nechutenství) | <input type="checkbox"/> Zhoršení stávajícího onemocnění (hypertenze, diabetes, ...) |
| <input type="checkbox"/> Jiná... <input type="text"/> | | | |

12 Trpíte autoimunitním onemocněním?

Nápověda k otázce: *Vyberte jednu nebo více odpovědí*

- Ne Ano
- Pokud ano, jakým onemocněním?

Seznam použitých zdrojů

1. ALLEN, E. Kaitlynn, Adrienne G. RANDOLPH, Tushar BHANGALE, et al. SNP-mediated disruption of CTCF binding at the IFITM3 promoter is associated with risk of severe influenza in humans. *Nat Med.* 2017, **23**(8), 975-983. Dostupné z: doi:10.1038/nm.4370.
2. AL-ROHAIMI, Abdulmohsen H. a Fasiel Al OTAIBI. Novel SARS-CoV-2 outbreak and COVID19 disease; a systemic review on the global pandemic. *Review.* 2020, **7**(4), 491-501. Dostupné z: doi:10.1016/j.gendis.2020.06.004.
3. AMINI-BAVIL-OLYAEI, Samad, Youn Jung CHOI, Jun Han LEE, Mude SHI, I-Chueh HUANG, Michael FARZAN a Jae U. JUNG. The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry. *Cell Host Microbe.* 2013, **13**(4), 452-464. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2013.03.006.
4. BAILEY, Charles C., Guocai ZHONG, I-Chueh HUANG a Michael FARZAN. IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense. *Annu Rev Virol.* 2014, **1**, 261-283. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-virology-031413-085537.
5. BAILEY, Charles C., I-Chueh HUANG, Christina KAM a Michael FARZAN. Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice. *PLoS Pathog.* 2012, **8**(9), e1002909. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1002909.
6. BARR, Stephen D., James R. SMILEY a Frederic D. BUSHMAN. The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. *PLoS Pathog.* 2008, **4**(2), e1000007. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.ppat.1000007.
7. BERMINGHAM, A., M. A. CHAND, C.S. BROWN, et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Case Reports.* 2012, **17**(40), 20290.
8. BEYDOUN, May A., Hind A. BEYDOUN, Sharmin HOSSAIN, Zaid W. EL-HAJJ, Jordan WEISS a Alan B. ZONDERMAN. Clinical and Bacterial Markers of Periodontitis and Their Association with Incident All-Cause and Alzheimer's Disease Dementia in a Large National Survey. *J. Alzheimers Dis.* 2020, **75**(1), 157-172. Dostupné z: doi:doi: 10.3233/JAD-200064.
9. BOZZO, Caterina Prelli, Rayhane NCHIOUA, Meta VOLCIC, et al. IFITM proteins promote SARS-CoV-2 infection and are targets for virus inhibition in vitro. *Nat Commun.* 2021, **12**(4584), 4584. Dostupné z: doi:doi.org/10.1038/s41467-021-24817-y.

10. BRASS, Abraham L., I-Chueh HUANG, Yair BENITA, et al. IFITM Proteins Mediate the Innate Immune Response to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus and Dengue Virus. *Cell*. 2010, **139**(7), 1243-1254. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.12.017
11. BRASS, Abraham L., I-Chueh HUANG, Yair BENITA, et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*. 2009, **139**(7), 1243-1254. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.12.017.
12. COMPTON, Alex A., Nicolas ROY, Francoise PORROT, Anne BILLET, Nicoletta CASARTELLI, Jacob S. YOUNT, Chen LIANG a Olivier SCHWARTZ. Natural mutations in IFITM3 modulate post-translational regulation and toggle antiviral specificity. *EMBO Rep*. 2016, **17**(11), 1657-1671. Dostupné z: doi:10.15252/embr.201642771.
13. DAVID, Susana, Vanessa CORREIA, Liliana ANTUNES, et al. Population genetics of IFITM3 in Portugal and Central Africa reveals a potential modifier of influenza severity. *Immunogenetics*. 2018, **70**, 169-177. Dostupné z: doi:10.1007/s00251-017-1026-2.
14. DIAMOND, Michael S. a Michael FARZAN. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Review.: Nat Rev Immunol*. 2013, **13**(1), 46-57. Dostupné z: doi:10.1038/nri3344.
15. DITTMANN, Jan, Silke STRETZ, Daniel GRIMM, John STEEL, Adolfo GARCÍA-SASTRE, Otto HALLER a Georg KOCHS. Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *J. Virol*. 2008, **82**(7), 3624-3631. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.01753-07.
16. DOEHLE, Brian P., Florian HLADIK, John P. MCNEVIN, M. Juliana MCEL RATH a Michael GALE JR. Human immunodeficiency virus type 1 mediates global disruption of innate antiviral signaling and immune defenses within infected cells. *J. Virol*. 2009, **83**(20), 10395-405. Dostupné z: doi: 10.1128/JVI.00849-09.
17. DONAGHY, D., A. POZNIAK, B. GAZZARD, N. QAZI, J. GILMOUR, F. GOTCH a S. PATTERSON. Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood*. 2001, **98**(8), 2574-2576. Dostupné z: doi: 10.1182/blood.v98.8.2574.

18. EVERITT, Aaron R., Simon CLARE, Thomas PERTEL, et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature*. 2012, **484**(7395), 519-523. Dostupné z: doi:10.1038/nature10921.
19. FEELEY, Eric M., Jennifer S. SMIS, Sinu P. JOHN, et al. IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry. *PLoS Pathog*. 2011, **7**(10), e1002337. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1002337.
20. FRANCIS, M. L. a M. S. MELTZER. Induction of IFN-alpha by HIV-1 in monocyte-enriched PBMC requires gp120-CD4 interaction but not virus replication. *J. Immunol*. 1993, **151**(4), 2208-2216.
21. FRIEDMAN, R.L., S.P. MANLY, M. MCMAHON, I.M. KERR a G.R. STARK. Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell*. 1984, **38**(3), 745-755. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(84)90270-8.
22. GARBETT, Krassimira, Philip J. EBERT, Amanda MITCHELL, Carla LINTAS, Barbara MANZI, Károly MIRNICS a Antonio M. PERSICO. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Comparative Study: Neurobiol Dis*. 2008, **30**(3), 303-311. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbd.2008.01.012.
23. GORMAN, Matthew J., Subhajit PODDAR, Michael FARZAN a Michel S. DIAMOND. The Interferon-Stimulated Gene Ifitm3 Restricts West Nile Virus Infection and Pathogenesis. *J. Virol*. 2016, **90**(18), 8212-8225. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00581-16.
24. GOUNDER, Anshu P. a Adrianus C. M. BOON. Influenza Pathogenesis: The role of host factors on severity of disease. *J. Immunol*. 2019, **202**(2), 341-350. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1801010.
25. HEIL, Florain, Hiroaki HEMMI, Hubertus HOCHREIN, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.: Epub*. 2004, **303**(5663), 1526-1529. Dostupné z: doi:doi: 10.1126/science.1093620.
26. HEMLING, Niina, Matias RÖYTTÄ, Juha RINNE, Paju PÖLLÄNEN, Eeva BROBERG, Virpi TAPIO a Veijo VAHLBERG. Herpesviruses in brains in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann Neurol*. 2003, **54**(2), 267-271. Dostupné z: doi:10.1002/ana.10662.
27. HEMMI, Hiroaki, Francizka AMPENBERGER, Taro KAWAI a Shizuo AKIRA. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like

- receptors. *Review.:* *Nat Immunol.* 2015, **11**(5), 373-384. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1863.
28. HOU, Yujun, Xiuli DAN, Mansi BABBAR, Yong WEI, Steen G. HASSELBALCH, Deborah L. CROTEAU a Vilhelm A. BOHR. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Review.:* *Nat Rev Neurol.* 2019, **15**(10), 565-581. Dostupné z: doi:10.1038/s41582-019-0244-7.
29. HU, Jun, Shuwei WANG, Yan ZHAO, et al. Mechanism and Biological Significance of the Overexpression of IFITM3 in Gastric Cancer. *Spandidos publications: Oncology Reports.* 2014, **32**(6), 2648-2656. ISSN 1791-2431. Dostupné z: doi: doi.org/10.3892/or.2014.3522
30. HUANG, I.Chueh, Charles C. BAILEY, Jessica L. WEYER, et al. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2011, **7**(1), e1001258. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1001258.
31. HUANG, I-Chueh, Berend Jan BOSCH, Fang LI, et al. SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *J. Biol. Chem.* 2006, **281**(6), 3198-3203. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M508381200.
32. HUR, Ji-Yeun, Georgia R. FROST, Xianzhong WU, et al. The innate immunity protein IFITM3 modulates γ -secretase in Alzheimer's disease. *Nature.* 2020, **586**(7831), 735-740. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2681-2.
33. HUR, Ji-Yeun. Innate Immunity Protein IFITM3 in Alzheimer's Disease. *Liebert Pub: DNA and Cell Biology.* 2021, **40**(11). Dostupné z: doi.org/10.1089/dna.2021.0585
34. CHANDRAN, Kartik, Nancy J. SULLIVAN, Ute FELBOR, Sean P. WHELAN a James M. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science.* 2005, **308**(5728), 1643-1645. Dostupné z: doi:10.1126/science.1110656.
35. CHEN, Keyang, Jialing HUANG, Chune ZHANG, et al. Alpha interferon potently enhances the anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of APOBEC3G in resting primary CD4 T cells. *J. Virol.* 2006, **80**(15), 7645-7657. Dostupné z: doi: 10.1128/JVI.00206-06.
36. CHENG, K.F. a P.C. LUNG. What happened in China during the 1918 influenza pandemic?. *Review.:* *Int J Infect Dis.* 2007, **11**(4), 360-364. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijid.2006.07.009.

37. CHESARINO, Nicholas M., Temet M. MCMICHAEL a Jacob S. YOUNT. Regulation of the trafficking and antiviral activity of IFITM3 by post-translational modifications. *Review.: Future Microbiol.* 2014, **9**(10), 1151-1163. Dostupné z: doi:10.2217/fmb.14.65.
38. CHESARINO, Nicholas M., Temet M. MCMICHAEL, Jocelyn C. HACH a Jacob S. YOUNT. Phosphorylation of the antiviral protein interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) dually regulates its endocytosis and ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 2014, **289**(17), 11986-11992. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M114.557694.
39. IBI, Daisuke, Taku NAGAI, Akira NAKAJIMA, et al. Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. *Glia.* 2013, **61**(5), 679-693. Dostupné z: doi:10.1002/glia.22461.
40. ITZHAKI, R. F., W. R. LIN, G. K. WILCOCK, B. FARAGHER a G. A. JAMIESON. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet.* 1997, **349**(9047), 241-244. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(96)10149-5.
41. IWASAKI, Akiko a Padmini S. PILLAI. Innate immunity to influenza virus infection. *J. Immunol.* 2014, **14**(2), 315-328. Dostupné z: doi:10.1038/nri3665.
42. IWATSUKI-HORIMOTO, Kiyoko, Noriko NAKAJIMA, Maki KISO, et al. The Marmoset as an Animal Model of Influenza: Infection With A(H1N1)pdm09 and Highly Pathogenic A(H5N1) Viruses via the Conventional or Tracheal Spray Route. *Frontiers in Microbiology.* 2018, **9**, 844. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.00844.
43. JACOBS, Jessica Hartman, Brett Nicholas ARCHER, Michael G. BAKER, et al. Searching for Sharp Drops in the Incidence of Pandemic A/H1N1 Influenza by Single Year of Age. *PLoS One.* 2012., **7**(8), e42328. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0042328
44. JIA, Rui, Fengwen XU, Jin QIAN, et al. Identification of an endocytic signal essential for the antiviral action of IFITM3. *Cell Microbiol.* 2014, **16**(7), 1080-1093. Dostupné z: doi:10.1111/cmi.12262.
45. JIA, Rui, Qinghua PAN, Shilei DING, Liwei RONG, Shan-Lu LIU, Yunqi GENG, Wentao QIAO a Chen LIANG. The N-terminal region of IFITM3 modulates its antiviral activity by regulating IFITM3 cellular localization. *J. Virol.* 2012, **86**(24), 13697-13707. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.01828-12.
46. JOSEPH, K.S. a LISTON, Robert M. H1N1 influenza in pregnant women. *BMJ.* 2011, **342**(1), d3237. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.d3237.

47. KENNEY, Adam D., Temet M. MCMICHAEL, Alexander IMAS, et al. IFITM3 protects the heart during influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019, **116**(37), 18607-18612. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1900784116.
48. KIM, N., H. NOW, N.T.H. NGUYEN, J.Y. YOO a Aline R. MATOS. Multilayered regulations of RIG-I in the anti-viral signaling pathway. *J. Microbiol.* 2016, **54**(6), 583-587. Dostupné z: doi:10.1007/s12275-016-6322-2.
49. KIM, Yong-Chan, Min-Ju JEONG a Byung-Hoon; JEONG. Strong association of regulatory single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the IFITM3 gene with influenza H1N1 2009 pandemic virus infection. *Cell Mol Immunol.* 2020, **17**(6), 662-664. Dostupné z: doi:10.1038/s41423-019-0322-1.
50. KLEIN, Sabra L., Catherine PASSARETTI, Martha ANKER, Peju OLUKOYA a Andrew PEKOSZ. The impact of sex, gender and pregnancy on 2009 H1N1 disease. *Biol Sex Differ.* 2010, **1**(1), 5. Dostupné z: doi:10.1186/2042-6410-1-5.
51. KOČÁREK, E., 2007. Molekulární biologie v medicíně. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. ISBN 978-80-7013450-4.
52. KRUG, R.M., M. SHAW, B. BRONI, G. SHAPIRO a O. HALLER. Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *J. Virol.* 1985, **56**(1), 201-106. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.56.1.201-206.1985.
53. KSIAZEK, Thomas G., Dean ERDMAN, Sherif R. ZAKI, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003, **348**(20), 1953-1966. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa030781.
54. LAZAROWITZ, S.G. a P.W. CHOPPIN. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology.* 1975, **68**(2), 440-454. Dostupné z: doi:10.1016/0042-6822(75)90285-8.
55. LEE, N., B. CAO, C. KE, et al. IFITM3, TLR3, and CD55 Gene SNPs and Cumulative Genetic Risks for Severe Outcomes in Chinese Patients With H7N9/H1N1pdm09 Influenza. *J. Infect Dis.* 2017, **216**(1), 97-104. Dostupné z: doi:10.1093/infdis/jix235
56. LEE, Wing-Yiu Jason, Rebecca Menhua FU, Chen LIANG a Richard D. SLOAN. IFITM proteins inhibit HIV-1 protein synthesis. *Sci Rep.* 2018, **8**(1), 14551. Dostupné z: doi: 10.1038/s41598-018-32785-5.

57. LEI, N., Y. LI, Q. SUN, et al. IFITM3 affects the level of antibody response after influenza vaccination. *Emerg Microbes Infect.* 2020, **9**(1), 976-987. Dostupné z: doi:10.1080/22221751.2020.1756696.
58. LEMAITRE, Magali, Fabrice CARRAT, Greoge REY, Mark MILLER, Lone SIMONSEN a Cécile VIBOUD. Mortality Burden of the 2009 A/H1N1 Influenza Pandemic in France: Comparison to Seasonal Influenza and the A/H3N2 Pandemic. *PLoS One.* 2012, **7**(9), e45051. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0045051
59. LI, Chang, Shouwen DU, Mingyao TIAN, et al. The Host Restriction Factor Interferon-Inducible Transmembrane Protein 3 Inhibits Vaccinia Virus Infection. *Frontiers in Microbiology: Molecular Innate Immunity.* 2018, **228**(9). Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.00228.
60. LICHTNER, M., R. ROSSI, F. MENGONI, et al. Circulating dendritic cells and interferon-alpha production in patients with tuberculosis: correlation with clinical outcome and treatment response. *Clin Exp Immunol.* 2006, **143**(2), 329-337. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02994.x.
61. LINDENMANN, J. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology.* 1962, 203-104. Dostupné z: doi:10.1016/0042-6822(62)90297-0.
62. LING, Shenglong, Chengwei ZHANG, Wei WANG, Xiaoying CAI, Lu YU, Fangming WU, Longhua ZHANG a Changlin TIAN. Combined approaches of EPR and NMR illustrate only one transmembrane helix in the human IFITM3. *Sci Rep.* 2016, **6**, 24029. Dostupné z: doi:10.1038/srep24029.
63. LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M., E. HERRERA-RAMOS, J. SOLÉ-VIOLÁN, et al. IFITM3 and severe influenza virus infection. No evidence of genetic association. *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis.* 2016, **35**(11), 1811-1817. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-016-2732-7.
64. LORD, C., E.H. COOK a D.G. AMARAL. Autism spectrum disorders. *Review.: Neuron.* 2000, **28**(2), 355-363. Dostupné z: doi:0.1016/s0896-6273(00)00115-x.
65. LUCAS, Tiffany M., Justin M. RICHNER a Michael S. The Interferon-Stimulated Gene Ifi2712a Restricts West Nile Virus Infection and Pathogenesis in a Cell-Type- and Region-Specific Manner. *J. Virol.* 2015., **90**(5), 2600-2615. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.02463-15.
66. LUCKÉ, B., T. WIGHT a E. KIME. PATHOLOGIC ANATOMY AND BACTERIOLOGY OF INFLUENZA: EPIDEMIC OF AUTUMN, 1918. *JAMA*

- Internal Medicine*. 1919, (24), 154-237. Dostupné z: doi:10.1001/ARCHINTE.1919.00090250027002
67. MAUSKOPF, Josephine, Mario KLESSE, Seina LEE a Guillermo HERRERA-TARACENA. The burden of influenza complications in different high-risk groups: a targeted literature review. *J. Med Econ*. 2013, **16**(2), 264-277. Dostupné z: doi:10.3111/13696998.2012.752376.
68. MERCER, Jason, Mario SCHELHAAS a Ari HELENIUS. Virus entry by endocytosis. *Review.: Annu Rev Biochem*. 2010, **79**, 803-833. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-060208-104626.
69. MERTZ, Dominik, Tae Hyong KIM, Jennie JOHNSTONE, et al. Populations at risk for severe or complicated influenza illness: systematic review and meta-analysis. *Review.: BMJ*. 2013, **347**, f5061. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.f5061.
70. MILLER, Mark, Cecile VIBOUD, Lone SIMONSEN, Donald R. OLSON a Colin RUSSELL. Mortality and morbidity burden associated with A/H1N1pdm influenza virus: Who is likely to be infected, experience clinical symptoms, or die from the H1N1pdm 2009 pandemic virus ?. *PLoS One*. 2009, **26**(1), RRN1013. Dostupné z: doi:10.1371/currents.RRN1013.
71. *Molekulární biologie, Gelová elektroforéza*, © Eva Bártová, 2011. [online]. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat. [cit. 2022-04-17]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz
72. MONEL, Blandine, Alex A. COMPTON, Timothee BRUEL, et al. Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *EMBO J*. 2017, **36**(12), 1653-1668. Dostupné z: doi:10.15252/embj.201695597.
73. MUÑOZ-MORENO, Raquel, Miguel Ángel CUESTA-GEIO, Carles MARTINEZ-ROMERO, Lucia BARRADO-GILL, Adolfo GARCIA-SASTRE a Covadonga ALONSO. Antiviral Role of IFITM Proteins in African Swine Fever Virus Infection. *PLoS One*. 2016. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0154366.
74. NAGAI, K., A. H. WONG, S. LI, et al. Induction of CD4 expression and human immunodeficiency virus type 1 replication by mutants of the interferon-inducible protein kinase PKR. *J. Virol*. 1997, **71**(2), 1718-1725. Dostupné z: doi: 10.1128/JVI.71.2.1718-1725.1997.

75. NARAYANA, Sumudu K., Karla J. HELBIG, Erin M. MCCARTNEY, Nicholas S. EYRE, Rowena A. BULL, Auda ELTAHLA, Andrew R. LLOYD a Michael R. BEARD. The Interferon-induced Transmembrane Proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3 Inhibit Hepatitis C Virus Entry*. *J. Biol. Chem.* 2015, **290**(43), 25946-25959. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M115.657346.
76. NEIL, Stuart J. D., Trinity ZANG a Paul D. BIENIASZ. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature.* 2008, **24**(451), 425-430. Dostupné z: doi: 10.1038/nature06553.
77. OKUMURA, Atsushi, Tim ALCE, Barbora LUBYOVA, Heather EZELLE, Klaus STREBEL a Paula M. PITHA. HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. *Virology.* 2008, **373**(1), 85-97. Dostupné z: doi: 10.1016/j.virol.2007.10.042.
78. PERSICO, Antonio M. a Thomas BOURGERON. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Review.: Trends Neurosci.* 2006, **29**(7), 349-388. Dostupné z: doi:10.1038/sj.mp.4000850.
79. PODDAR, Subhajit, Jennifer L. HYDE, Matthew J. GORMAN, Michael FARZAN a Michael S. DIAMOND. The Interferon-Stimulated Gene IFITM3 Restricts Infection and Pathogenesis of Arthritogenic and Encephalitic Alphaviruses. *American Society for Microbiology: Journal of Virology.* 2016, **90**(19), 8780-8794. Dostupné z: doi:doi.org/10.1128/JVI.00655-16
80. QUANDELACY, Taila M., Cecile VIBOUD, Vivek CHARU a Edward GOLDSTEIN. Age- and sex-related risk factors for influenza-associated mortality in the United States between 1997-2007. *Am J Epidemiol.* 2014, **156-157**(2), 156-157. Dostupné z: doi:10.1093/aje/kwt235.
81. READHEAD, Ben, Jean-Vianney HAURE-MIRANDE, Cory C. FUNK, et al. Multiscale Analysis of Independent Alzheimer's Cohorts Finds Disruption of Molecular, Genetic, and Clinical Networks by Human Herpesvirus. *Neuron.* 2018, **99**(1), 64-82. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2018.05.023.
82. SAMUEL, Melanie A., Kevin WHITBY, Brian C. KELLER, et al. PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *J. Virol.* 2006, **80**(14), 7009-7019. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00489-06.
83. SAVIDIS, George, Jill M. PERREIRA, Jocelyn M. PORTMAN, Paul MARANER, Zhiru GUO, Sharone GREEN a Abraham L. BRASS. The IFITMs Inhibit Zika Virus

- Replication. *Cell Rep.* 2016, **15**(11), 2323-2330. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2016.05.074.
84. SEYFRIED, Nicholas T., Leane C. HUYSENTRUYT, James A ATWOOD 3RD, Qiangwei XIA, Thomas N. SEYFRIED a Ron ORNALDO. Up-regulation of NG2 proteoglycan and interferon-induced transmembrane proteins 1 and 3 in mouse astrocytoma: a membrane proteomics approach. *Epub.* 2008, **263**(2), 243 - 242. Dostupné z: doi:doi: 10.1016/j.canlet.2008.01.007
85. SHEEHY, Ann M., Nathan C. GADDIS a Michael H. MALIM. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.* 2002, **418**(6898), 646-650. Dostupné z: doi: 10.1038/nature00939.
86. SHI, Guoli, Adam D. KENNEY, Elena KUDRYASHOVA, et al. Opposing activities of IFITM proteins in SARS-CoV-2 infection. *EMBO J.* 2021, **40**(3), e106501. Dostupné z: doi:10.15252/embj.2020106501.
87. SIEGRIST, Fredy, Martin EBELING a Ulrich CERTA. The small interferon-induced transmembrane genes and proteins. *Review.: J. Interferon Cytokine Res.* 2011, **31**(1), 183-197. Dostupné z: doi:10.1089/jir.2010.0112.
88. SMITH, R.A., J. YOUNG, J.J. WEIS a J.H. WEIS. Expression of the mouse fragilis gene products in immune cells and association with receptor signaling complexes. *Genes Immun.* 2006, **7**(2), 113-121. Dostupné z: doi:10.1038/sj.gene.6364278.
89. SMITH, Se, S. WESTON, P. KELLAM a M. MARSH. IFITM proteins-cellular inhibitors of viral entry. *Review.: Curr Opin Virol.* 2014, 71-77. Dostupné z: doi:10.1016/j.coviro.2013.11.004.
90. SRIVASTAVA, Barkha, Paulina BLAZEJEWSKA, Manuela HESSMANN, Dunja BRUDER, Robert GEFFERS, Susanne MAUEL, Achim D. GRUBER a Klaus SCHUGHART. Host genetic background strongly influences the response to influenza a virus infections. *PLoS One.* 2009, **4**(3), e4857. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0004857.
91. SUDDALA, Krishna C., Christine C. LEE, Paul MERANER, et al. Interferon-induced transmembrane protein 3 blocks fusion of sensitive but not resistant viruses by partitioning into virus-carrying endosomes. *PLoS Pathog.* 2019, **15**(1), e1007532. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1007532.
92. TANAKA, Satomi S., Go NAGAMATSU, Yuko TOKITAKE, Miyuki KASA, Patrick P. L. TAM a Yasuhisa MATSUI. Regulation of expression of mouse interferon-

- induced transmembrane protein like gene-3, Ifitm3 (mil-1, fragilis), in germ cells. *Dev Dyn.* 2004, **230**(4), 651 - 659. Dostupné z: doi: 10.1002/dvdy.20085.
93. TANDON, Rajiv, Matcheri S. KESHAVAN a Henry A. NASRALLAH. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Epub.* 2008, **102**(1-3), 1-18. Dostupné z: doi:10.1016/j.schres.2008.04.011.
94. TARTOUR, Kevin, Xuan-Nhi NGUYEN, Romain APOUCHAUX, et al. Interference with the production of infectious viral particles and bimodal inhibition of replication are broadly conserved antiviral properties of IFITMs. *PLoS Pathog.* 2017, **13**(9), e1006610. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1006610.
95. TAUBENBERGER, Jeffery K. a David M. MORENS. The pathology of influenza virus infections. *Review.: Annu Rev Patol.* 2008, **3**(1), 499-522. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pathmechdis.KODAMA, Makoto. Influenza myocarditis. *Editorial.: Circ J.* 2010, **74**(10), 2060-2061. Dostupné z: doi:10.1253/circj.cj-10-0833.
96. TZENG, Nian-Sheng, Chi-Hsiang CHUNG, Fu-Huang LIN, et al. Anti-herpetic Medications and Reduced Risk of Dementia in Patients with Herpes Simplex Virus Infections-a Nationwide, Population-Based Cohort Study in Taiwan. *Neurotherapeutics.* 2018, **15**(2), 417-429. Dostupné z: doi:10.1007/s13311-018-0611-x.
97. UKIMURA, Akira, Tohru IZUMI a Akira MATSUMORI. A national survey on myocarditis associated with the 2009 influenza A (H1N1) pandemic in Japan. *Circ J.* 2010, **74**(10), 2193-2199. Dostupné z: doi:10.1253/circj.cj-10-0452.
98. WAKIM, Linda M., Nishma GUPTA, Justine D. MINTERN a Jose A. VILLADANGOS. Enhanced survival of lung tissue-resident memory CD8⁺ T cells during infection with influenza virus due to selective expression of IFITM3. *Nat Immunol.* 2013, **14**(3), 238-245. Dostupné z: doi:10.1038/ni.2525.
99. WARREN, Cody J., Laura M. GRIFFIN, Alexander S. LITTLE, I-Chueh HUANG, Michael FARZAN a Dohun PYEON. The Antiviral Restriction Factors IFITM1, 2 and 3 Do Not Inhibit Infection of Human Papillomavirus, Cytomegalovirus and Adenovirus. *PLoS One.* 2014, **9**(5), e96579. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0096579
100. WEE, Yin Shen, Kirstin M. ROUNDY, Janis J. WEIS a John H. WEIS. Interferon-inducible transmembrane proteins of the innate immune response act as membrane

- organizers by influencing clathrin and v-ATPase localization and function. *Innate Immun.* 2012, **18**(6), 834-845. Dostupné z: doi:10.1177/1753425912443392.
101. WELLINGTON, Danielle, Henry LAURENSEN-SCHAFFER, Adi ABDEL-HAG a Tao DONG. IFITM3: How genetics influence influenza infection demographically. *PubMed Central.* 2019, **42**(1), 19–26. Dostupné z: doi:doi:10.1016/j.bj.2019.01.004
 102. WILSON, Nick, Lucy Telfar BARNARD, Jennifer A. SUMMERS, G. Dennis SHANKS a Michael G. BAKER. Differential mortality rates by ethnicity in 3 influenza pandemics over a century, New Zealand. *Emerg Infect Dis.* 2012, **18**(1), 71-77. Dostupné z: doi:10.3201/eid1801.110035.
 103. WYLIE, C. IFITM1-mediated cell repulsion controls the initial steps of germ cell migration in the mouse. *Dev Cell.* 2005, **9**(6), 723-4. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2005.11.009
 104. YÁNEZ, Diana C., Susan ROSS a Tessa CROMPTON. The IFITM protein family in adaptive immunity. *Review.: Immunology.* 2020, **159**(4), 365-372. Dostupné z: doi:10.1111/imm.13163.
 105. YOUNT, Jacob S., Roos A. KARSSEMEIJER a Howard C. HANG. S-palmitoylation and ubiquitination differentially regulate interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3)-mediated resistance to influenza virus. *J. Biol. Chem.* 2012, **287**(23), 19631-41. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112.362095.
 106. ZHANG, Zhao, Jun LIU, Meng LI, Hui YANG a Chiyu ZHANG. Evolutionary dynamics of the interferon-induced transmembrane gene family in vertebrates. *PLoS One.* 2012, **7**(11), e49265. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0049265.
 107. ZHAO, Xuesen, Jiarui LI, Cheryl A. WINKLER, Ping AN a Ju-Tao GUO. IFITM Genes, Variants, and Their Roles in the Control and Pathogenesis of Viral Infections. *Frontiers.* 2019, **12**(1). doi.org/10.3389/fmicb.2018.03228.
 108. ZHAO, Xuesen, Mohit SEHGAL, Zhifei HOU, et al. Identification of Residues Controlling Restriction versus Enhancing Activities of IFITM Proteins on Entry of Human Coronaviruses. *J. Virol.* 2018, **92**(6), e01535-17. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.01535-17.

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1: Schématický diagram topologie IFITM1 a IFITM3).</i>	10
<i>Obrázek 2: Topologie proteinu IFITM v lidském a myším genomu</i>	11
<i>Obrázek 3: Struktura genu IFITM</i>	12
<i>Obrázek 4: Polymorfismus rs12252 genu IFITM3.</i>	17
<i>Obrázek 5: Polymorfismus rs34481144 genu IFITM3</i>	18
<i>Obrázek 6: Vrozené vnímání viru chřipky I</i>	22
<i>Obrázek 7: Vrozené vnímání viru chřipky II</i>	23
<i>Obrázek 8: Různé hostitelské geny</i>	24
<i>Obrázek 9: Schéma gelové elektroforézy (převzato z https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz).</i>	40
<i>Obrázek 10: Příklad detekce PCR produktu amplifikovaného genu IFITM3 na gelu41</i>	
<i>Obrázek 11: Výsledek sekvenace ukazující přítomnost alel G/A, C/A a T/C.</i>	44
<i>Obrázek 12: Výsledek sekvenace ukazující přítomnost wild type alel G/G, C/C a T/T</i>	44
<i>Obrázek 13: Výsledek sekvenace ukazující přítomnost alel A/A, C/C a T/T</i>	45
<i>Obrázek 14: Výsledek sekvenace ukazující nejčastější haplotyp ve vyšetřované skupině</i>	45
<i>Obrázek 15: Výsledek sekvenace ukazující přítomnost alel G/G, C/A a T/C</i>	46
<i>Obrázek 16: Rozložení jednotlivých haplotypů pro SNP</i>	48
<i>Obrázek 17: Rozložení jednotlivých haplotypů pro SNP.</i>	49
<i>Obrázek 18: Rozložení jednotlivých haplotypů pro SNP</i>	50
<i>Obrázek 19: Grafické znázornění frekvencí jednotlivých genotypů</i>	52
<i>Obrázek 20: Grafické znázornění odpovědí na druhou otázku dotazníkového šetření</i>	53
<i>Obrázek 21: Grafické znázornění odpovědí na třetí otázku dotazníkového šetření.</i>	53
<i>Obrázek 22: Grafické znázornění odpovědí na osmou otázku dotazníkového šetření</i>	54
<i>Obrázek 23: Grafické znázornění odpovědí na devátou otázku dotazníkového šetření</i>	54
<i>Obrázek 24: Grafické znázornění odpovědí na desátou otázku dotazníkového šetření</i>	54
<i>Obrázek 25: Grafické znázornění odpovědí na jedenáctou otázku dotazníkového šetření</i>	55
<i>Obrázek 26: Příloha 3; Struktura dotazníku</i>	64

Seznam tabulek

<i>Tabulka 1: Výčet vybraných polymorfismů genu IFITM3 a jejich populační frekvence ...</i>	15
<i>Tabulka 2: Výskyt genotypů pro SNP rs34481144</i>	17
<i>Tabulka 3: Výskyt genotypů pro SNP rs34481144</i>	18
<i>Tabulka 4: Seznam použitých reagensií pro izolaci DNA z bukalního stěru.....</i>	34
<i>Tabulka 5: Seznam použitých reagensií pro izolaci DNA z periferní krve.....</i>	35
<i>Tabulka 6: Reagencie použité pro měřené koncentrace DNA ve vzorku.....</i>	36
<i>Tabulka 7: Přehled sekvencí použitých primerů.....</i>	37
<i>Tabulka 8: : Přehled reagensií a objemů</i>	38
<i>Tabulka 9: Reakční protokol PCR reakce.....</i>	39
<i>Tabulka 10: Přehled použitých reagensií pro přípravu gelu.....</i>	39
<i>Tabulka 11: Přehled reagensií použitých pro gelovou elektroforézu.....</i>	40
<i>Tabulka 12: Seznam použitých reagensií pro přečištění PCR produktu.....</i>	42
<i>Tabulka 13: Reakční protokol pro přečištění PCR produktu.....</i>	42
<i>Tabulka 14: Seznam použitých reagensií pro přípravu vzorku pro sekvenaci.....</i>	42
<i>Tabulka 15: Rozdělení analyzovaného souboru podle stavu pacienta.....</i>	47
<i>Tabulka 16: Tabulka četnosti haplotypů pro SNP.....</i>	48
<i>Tabulka 17: Tabulka četnosti haplotypů pro SNP.....</i>	49
<i>Tabulka 18: Tabulka četnosti haplotypů pro SNP.....</i>	50
<i>Tabulka 19: Tabulka frekvence genotypů.....</i>	50
<i>Tabulka 20: Tabulka frekvence genotypů.....</i>	51
<i>Tabulka 21: Tabulka frekvence genotypů.....</i>	51
<i>Tabulka 22: Příloha 1;</i>	60
<i>Tabulka 23: Příloha 2;</i>	63

Seznam zkratek

AD	Alzheimerova choroba
Ad5	Adenovirus 5
AFR	Afrika
AMK	Aminokyselina
AMR	Amerika
ASD	Porucha autistického spektra
ASFV	Virus afrického moru prasat
A β	Amyloid β
BLAST	Basic Local Aligantment Search Tool
BP	Páry bazí
cDNA	Komplementární DNA
CEA	Karcinoembryonický antigen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxyribonukleosidtrifosfát
DNV	Dengue virus
dsRNA	Dvouvláknová RNA
EAS	Východní Asie
EBOV	Ebola virus
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EUR	Evropa
Exo I	Exonukleáza I
GC	Karcinom žaludku
H1N1	Virus chřipky A subtypu H1N1
HA	Hemaglutinin

HCMV	Lidský cytomegalovirus
HHV	Lidský herpes virus
HIV-A	Virus lidské imunitní nedostatečnosti typu A
HPV	Papilomavirus
HSV-1	Herpes simplex virus typu A
CHMP5	Chromatin-modifikující protein 5
IAV	Virus chřipky A
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-alfa/beta receptor
IL-18	Interleukin 18
IL-1 β	Interleukin 1 β
IRF3	Interferonem regulační faktor 3
IRF-3	Interferonový regulační faktor 3
ISG	Interferonem stimulované geny
ISG15	Interferonem stimulovaný gen 15
MARV	Marburg virus
MAVS	Mitochondriální antivirový signální protein
MERS-CoV	Blízkovýchodní respirační syndrom
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	Nukleárního faktor- κ B
NLRP3	Cytoplazmatický senzor mikrobiálních produktů i endogenních signálů nebezpečí
PCR	Polymerázová řetězová reakce
pDC	Plazmocytoidní dendritické buňky
PK	Proteináza K
PKR	Proteinkináza R
PRR	Receptory pro prozpoznávání buněčných vzorů

PS1	Anti-presenilin 1
RNA	Ribonukleoidová kyselina
rs	Reference SNP
rSAP	Rekombinantní fosfatáza
RSV	Respirační syncytiální virus
RT	Pokojová teplota
SARS-Co-V	Koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu
SAS	Jižní Asie
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
ssRNA	Jednovláknová RNA
TLR3	Toll-like receptor
TLR7	Toll-like receptor 7
TRIM22	Tripartitní motivový protein 22
VACV	Vaccinia virus
v-ATPázy	Vakuolární ATPázy
vRNA	Virové ribonukleotidy
VSV	Virus vezikulární stomatitidy
VZV	Varicella zoster virus
WNV	Virus západonilské horečky
WT	Wild type
ZIKV	Zika virus