



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Laktózová intolerance a její genetická vyšetření

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Nikola Vyhlídalová

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Laktózová intolerance a její genetická vyšetření jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2018

.....

Nikola Vyhlídalová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za odbornou pomoc, ochotu a za čas, který věnoval tomu, aby mohla tato práce vzniknout. Dále bych ráda poděkovala týmu z genetické laboratoře GENLABS, s.r.o. v Českých Budějovicích za cenné rady a také za poskytnutí některých vzorků. V neposlední řadě děkuji celé své rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia.

Laktózová intolerance a její genetická vyšetření

Abstrakt

Intolerance laktózy bývá jednou z nejčastějších příčin zdravotních problémů souvisejících s konzumací mléka. Základní příčinou této malabsorpce je nedostatečná tvorba enzymu laktáza v tenkém střevě, což vede k neschopnosti štěpit mléčný cukr, tedy laktózu.

Nedostatečná tvorba laktázy může být geneticky podmíněná. V Evropské populaci byly nalezeny dva jednonukleotidové polymorfismy odpovědné za přetrvávání laktázové aktivity v dospělosti.

Cílem bakalářské práce bylo vyšetření těchto dvou polymorfismů dvěma molekulárně biologickými metodami a jejich vzájemné srovnání. Konkrétně se jednalo o techniku reverzní hybridizace na stripech a metodu PCR-RFLP.

V teoretické části práce je charakterizována laktózová intolerance, popsána je například základní patofyziologie, typy hypolaktázie, mechanismus a hypotézy vzniku laktózové intolerance. Také je zde uvedena genetická podstata vzniku hypolaktázie. Součástí teoretické části jsou i možnosti diagnostiky laktózové intolerance.

V praktické části jsou zpracovány vlastní výsledky práce. Vyšetřovaný soubor tvořilo 20 vzorků získaných od dobrovolníků s podezřením na laktózovou intoleranci. U 39 % vzorků se vyskytoval výsledný genotyp CC/GG, který souvisí s laktózovou intolerancí. Genotyp TT/AA, související s tolerancí laktózy, se ve vyšetřovaném souboru nacházel v 28 %. Heterozygotní genotyp CT/AG se vyskytoval ve 22 %. U zbylých 11 % byly prokázány jiné varianty.

Pro stanovení diagnózy laktózové intolerance jsou vhodné obě z použitých metod. Ačkoliv metoda reverzní hybridizace není standardně využívána pro stanovení diagnózy hypolaktázie, osvědčila se jako spolehlivější. Výsledky získané touto technikou vycházely přesněji než rutinně využívanou metodou PCR-RFLP.

Klíčová slova

Laktózová intolerance; polymorfismy C/T 13.910 a G/A 22.018; PCR-RFLP; reverzní hybridizace na stripech

Lactose intolerance and genetic testing

Abstract

Lactose intolerance tends to be one of the most frequent health conditions related to the intake of milk. The essential cause of this malabsorption is the inadequate production of the lactase enzyme by the small intestine, which leads to the inability to break down the disaccharide contained in milk – lactose.

The inadequate production of lactase may be conditioned genetically. Two single nucleotide polymorphisms were found in the European population that are responsible for the retention of lactase activity through adulthood.

The aim of the thesis was to use the methods of molecular biology to assess and compare the two polymorphisms. Specifically, the two methods were reverse hybridization on strips and PCR-RFLP method.

The theoretical part characterizes lactose intolerance, which includes the description of basic pathophysiology, the types of hypolactasia, the mechanisms of and hypotheses related to acquiring lactose intolerance.

The empirical part presents the results of the study. The studied population consisted of 20 samples obtained from volunteers with suspected lactose intolerance. The CC/GG genotype, which is connected to lactose intolerance, was found in 39 % of the population. The TT/AA genotype, connected to lactose tolerance, was found in 28 % of the samples. The heterozygote genotype CT/AG was identified in 22 % and other variants were found in the remaining 11 % of the population.

Both methods are appropriate for the assessment of lactose intolerance. Although the method of reverse hybridization is not commonly used for the diagnosis of hypolactasia, it proved to be more reliable. The results obtained by this technique were more consistent than results arrived at by the commonly used PCR-RFLP method.

Keywords

Lactose intolerance; polymorphisms C/T 13.910 and G/A 22.018; PCR-RFLP; reverse hybridization on strips

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část	9
2.1 Základní patofyziologie	9
2.1.1 Laktóza.....	9
2.1.2 Laktáza.....	11
2.2 Mechanismus laktózové intolerance	11
2.3 Typy laktózové intolerance	12
2.3.1 Vrozený nedostatek laktázy (alaktázie)	12
2.3.2 Primární nedostatek laktázy	13
2.3.3 Sekundární nedostatek laktázy.....	14
2.4 Prevalence	14
2.5 Hypotézy vzniku laktózové tolerance	15
2.5.1 Kulturně-historická hypotéza.....	16
2.5.2 Aridní klima a pouštní nomádi	16
2.5.3 Nedostatek vitamínu D	17
2.6 Genetická podstata laktózové intolerance	17
2.6.1 Gen LCT a MCM6.....	18
2.7 Určení diagnózy laktózové intolerance.....	19
2.7.1 Expoziční test.....	19
2.7.2 Dechové testy.....	19
2.7.3 Laktózový toleranční test.....	20
2.7.4 Jejunální biopsie	21
2.7.5 Genetické vyšetření laktózové intolerance	21
2.8 Genetické testování laktózové intolerance	22
2.8.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	22
2.8.2 PCR-RFLP	25

2.8.3	Reverzní hybridizace	26
3.	Cíle práce a hypotézy.....	28
3.1	Cíle práce	28
3.2	Hypotézy	28
4.	Praktická část	29
4.1	Izolace DNA.....	29
4.2	Precipitace DNA	31
4.3	Měření koncentrace DNA	31
4.4	Reverzní hybridizace na stripech	32
4.5	PCR-RFLP	36
5.	Výsledky	41
5.1	Reverzní hybridizace na stripech	41
5.2	PCR-RFLP	45
5.2.1	Polymorfismus G/A 22.018	45
5.2.2	Polymorfismus C/T 13.910.....	47
5.3	Srovnání výsledků.....	49
6.	Diskuse.....	50
7.	Závěr	54
8.	Seznam použitých zdrojů.....	55
9.	Seznam zkratk	61

1. Úvod

Potravinové intolerance jsou v současnosti velmi diskutovaným tématem, a to zejména z důvodu, že právě potravinové intolerance mají v patologii různých lidských nemocí a problémů významnou roli a často i snadné řešení.

Mezi nejčastější potravinové intolerance patří intolerance laktózy, kterou trpí asi 70 % světové populace (Fojík *et al*, 2013). Hlavní příčinou laktózové intolerance je enzymová deficience, konkrétně se jedná o nedostatečnou tvorbu enzymu laktáza v tenkém střevě. Tento deficit má za následek neschopnost štěpit laktózu na vstřebatelné monosacharidy – glukózu a galaktózu. U postižených osob vede uvedený nedostatek enzymu k žaludečním a střevním potížím, typické jsou bolesti břicha a nadýmání (Svačina *et al*, 2010, Fritzscheová, 2015). Důsledky hypolaktázie mohou vést v dospělosti až k rozvoji osteoporózy (Fojík *et al*, 2013).

Neschopnost těla štěpit laktózu může být způsobena několika činiteli. Z toho důvodu jsou popsány tři typy laktózové intolerance – kongenitální, primární a sekundární. Z těchto forem je nejčastější primární nedostatek laktázy, který je podmíněn geneticky (Mađry *et al*, 2010).

V Evropské populaci byly nalezeny dva jednonukleotidové polymorfismy (SNP) odpovědné za přetrvávání laktázové aktivity v dospělosti. Konkrétně se jedná o polymorfismy C/T 13.910 a G/A 22.018, které se vyskytují v intronech genu *MCM6* (Friedrich *et al*, 2012). Právě tyto SNP byly testovány v rámci praktické části této práce. Vyšetření bylo provedeno dvěma metodami, konkrétně se jednalo o techniky reverzní hybridizace na stripech a PCR-RFLP.

Jedním z cílů práce bylo srovnání těchto dvou použitých metod, přičemž bylo předpokládáno, že metodou reverzní hybridizace půjde výsledný genotyp určit lépe než metodou PCR-RFLP.

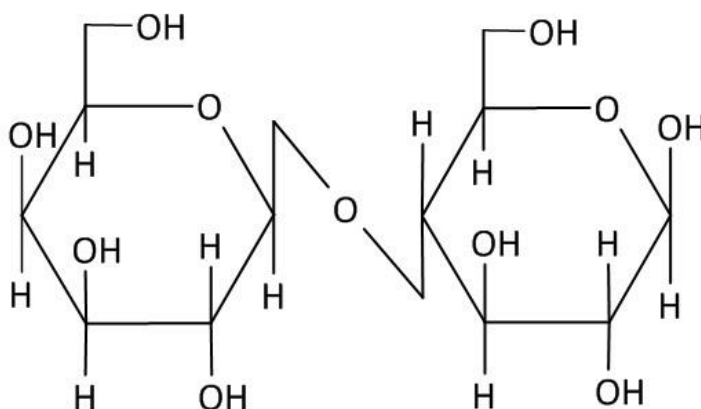
Laktózová intolerance je často zaměňována s alergií na bílkovinu kravského mléka. Tato alergie se však v populaci vyskytuje pouze zřídka. I když jsou projevy laktózové intolerance a alergie obdobné, podstata i řešení se velmi liší. Alergie je vyvolána imunitní reakcí na mléčné bílkoviny, nejčastěji na bílkovinu kasein, zatímco laktózová intolerance je enzymová deficience, které se neúčastní imunitní reakce (Lam *et al*, 2008).

2. Teoretická část

2.1 Základní patofyziologie

2.1.1 Laktóza

Laktóza (obr. 1), známá také jako mléčný cukr (*Saccharum lactis*), se řadí mezi disacharidy. Je tedy tvořena dvěma jednoduchými sacharidy, D-glukózou a D-galaktózou, které jsou navzájem spojeny β -1,4 glykosidickou vazbou (Stránský a Ryšavá, 2014).



Obrázek 1: Strukturní vzorec laktózy. Zdroj: vlastní.

První záznam o mléčném cukru se objevuje v díle „Encyclopaedia hermetico-dogmatica“, z roku 1615. Autorem je italský lékař Fabrizio Bartoletti. Další zmínku o laktóze nacházíme v lékařských knihách z 18. století, kde je doporučována jako prostředek proti bolestem a křečím (Stránský a Ryšavá, 2014).

Laktóza je ve své původní formě pro náš organismus zbytečná. Prospěšnou se nám stává teprve, když je rozštěpena na již zmíněné monosacharidy. Ke štěpení dochází až v tenkém střevě pomocí enzymu laktázy. Uvolněná glukóza i galaktóza jsou pak absorbovány do krevního oběhu pomocí střevních enterocytů (Fritzscheová, 2015). Galaktóza se stává součástí glykoproteinů a glykolipidů, glukóza je využita jako zdroj energie (Fojík *et al*, 2013).

Laktóza se vyskytuje v mléce téměř všech savců, výjimku tvoří lvoun kalifornský (*Zalophus californianus*), který patří do čeledi lachtanovitých (Otariidae) (Stránský a Ryšavá, 2014). Mléko je v prvních týdnech života savců jedinou potravou, a proto je životně důležitým zdrojem energie. Mléko různých druhů má však charakteristické koncentrace laktózy, bílkovin a tuku (tab. 1). Rozdílné poměry živin jsou nastaveny podle

potřeby daných kojenců. Lidské mateřské mléko obsahuje nejvyšší koncentraci laktózy mezi savci. A to hlavně z důvodu velké potřeby energie kojence na vývoj mozku (Mađdry *et al*, 2010, Fritzscheová, 2015).

Tabulka 1: Obsah látek v mléce u vybraných savců (g / 100 g)

Druh mléka	Laktóza	Bílkovina	Tuk
Lidské	4,9 - 9,5	1,0 - 1,4	3,5 - 4,6
Kobylí	6,2	2,1 - 2,3	1,3 - 2,0
Buvolí	4,9	4,0	8,0
Ovčí	4,3 - 5,2	5,0 - 11,6	2,0 - 13,0
Kravske	4,4 - 4,8	3,1 - 3,7	3,6 - 3,9
Kozí	4,0 - 4,9	2,9 - 4,7	3,4 - 5,1

(Fritzscheová, 2015)

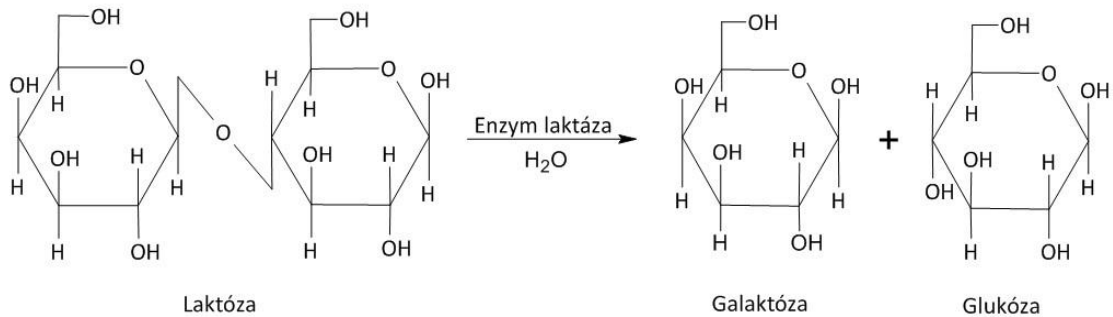
Jestliže se laktóza v tenkém střevě štěpí zcela, přispívá tělu stejně jako ostatní sacharidy kalorickou hodnotou 4 kcal/g. V mnoha případech zde však laktóza není štěpena vůbec nebo částečně. Pokud nemůže dojít ke štěpení, tak se nestrávená laktóza dostává z tenkého střeva do střeva tlustého, které je osídleno mnoha bakteriemi. Z bakteriální fermentace laktózy v tlustém střevě získá člověk přibližně 2 kcal/g (Schaafsma, 2008).

Hydrolýzou laktózy v tlustém střevě vzniká kyselina mléčná, která zde vytváří kyselé prostředí. Snížení pH posiluje růst potřebných mikrobiálních kmenů (např. laktobacilů). Toto prostředí zároveň brání množení nežádoucích parazitů i patogenních mikroorganismů. Tímto způsobem může mléčný cukr pomoci k znovuoobnovení fyziologické střevní mikroflóry, například po prodělané střevní infekci. Laktóza má tedy prebiotické vlastnosti (Stránský a Ryšavá 2014).

Mléčný cukr se také podílí na příjmu životně důležité minerální látky, vápníku. Za vstřebávání vápníku není zcela odpovědná laktóza, nýbrž produkt jejího štěpení, kyselina mléčná. Snížením pH ve střevě se zlepšuje rozpustnost a tím i využitelnost této minerální látky. Vápník má důležitou funkci v tvorbě a mineralizaci kostí a zubů. Dále se účastní procesu srážení krve, aktivaci enzymů a převodu nervových vzruchů (Stránský a Ryšavá 2014, Fritzscheová, 2015).

2.1.2 Laktáza

Laktáza-phlorizin hydroláza, běžně známá jako laktáza nebo také beta-galaktosidáza je enzym nacházející se v buňkách tenkého střeva. Jak již bylo řečeno, tento enzym je zodpovědný za štěpení laktózy na vstřebatelné monosacharidy glukózu a galaktózu (obr. 2) (Mađry *et al*, 2010).



Obrázek 2: Hydrolýza laktózy enzymem laktáza. Zdroj: vlastní.

Laktáza je přítomna na povrchu kartáčového lemu enterocytů v tenkém střevě. Největší exprese tohoto enzymu byla nalezena ve střední části jejunu. V jejunu je nízká koncentrace bakterií, proto je zde minimální šance zkvašení laktózy (Mađry *et al*, 2010).

Laktáza má dvě aktivní místa. V jednom místě probíhá hydrolýza laktózy a v dalším rozklad phlorizinu (aryl-alfa glukosid) a glykolipidů (Fojík *et al*, 2013).

Tvorba laktázy je podmíněna geneticky. Je přítomna již u plodu, kde postupně dozrává do aktivní formy, aktivita se zvyšuje až do 34. týdne těhotenství. Při narození je exprese laktázy na svém vrcholu. Nicméně během několika prvních měsíců života se aktivita laktázy snižuje. V rámci nižší konzumace mléka po odstavení od kojení klesá až na nedetekovatelné hladiny. Aktivita laktázy přetrvává v dospělosti asi u 30 % celkové světové populace (Lomer *et al*, 2007).

Aktivitu laktázy ovlivňuje i etnický původ. Například dospělá bílá populace se vyznačuje vysokou aktivitou v průběhu celého života (Fojík *et al*, 2013). Je-li důvodem nedostatečné aktivity laktázy její snížené množství ve střevní sliznici, nezvýšíme tuto aktivitu ani dostatečným přísunem laktózy (Stránský a Ryšavá, 2014).

2.2 Mechanismus laktózové intolerance

Jak již bylo zmíněno, laktózová intolerance je způsobena nedostatkem enzymu laktáza v klcích tenkého střeva. Nedostatek tohoto enzymu vede k hromadění nevstřebatelné

laktózy ve střevním traktu. Pokud není laktóza rozštěpena, dochází pomocí bakterií střeva k její fermentaci, což má za následek vznik mastných kyselin s krátkým řetězcem. Při tomto procesu dochází také k tvorbě plynů, zejména vodíku, oxidu uhličitého a methanu. Uvedené plyny pak způsobují typické příznaky laktózové intolerance (Deng *et al*, 2015). Vodík krví putuje do plic, odkud je odstraněn z těla vydechnutím. Toho se může využít při stanovení diagnózy jako jeden z ukazatelů hypolaktázie (Fritzscheová, 2015).

Nehydrolyzovaná laktóza v tenkém střevě také způsobuje zvýšené osmotické zatížení a zvyšuje obsah vody ve střevě, což je příčinou charakteristických průjmů (Deng *et al*, 2015).

I přes to může většina osob s nesnášenlivostí mléčného cukru tolerovat malé množství laktózy (méně než 12 g, což odpovídá jednomu šálku) (Deng *et al*, 2015). Někteří mohou dokonce konzumovat větší množství a nezaznamenají žádné negativní symptomy. Pro účinný metabolismus a využití laktózy je nezbytná alespoň 50% aktivita laktázy (Mađry *et al*, 2010).

Dalším faktorem, který může hrát roli při toleranci mléčného cukru, je jeho pravidelný příjem v potravě. Tolerance může být také vyvolána adaptací střevní flóry (Deng *et al*, 2015).

2.3 Typy laktózové intolerance

Neschopnost těla štěpit laktózu bývá způsobena několika činiteli. Z toho důvodu popisuje diagnóza laktózové intolerance několik druhů. Primární laktózová intolerance neboli primární nedostatek laktázy je pouze jednou z forem této poruchy. Dalším typem může být kongenitální laktózová intolerance. Jiná označení pro tuto formu jsou také vrozený nedostatek laktázy či alaktázie. Tato forma se vyskytuje jen zřídka. Jiným typem je sekundární laktózová intolerance, která je způsobena druhotně u pacientů, kteří trpí onemocněním trávicího ústrojí (Fritzscheová, 2015).

2.3.1 Vrozený nedostatek laktázy (alaktázie)

Jedná se o vzácný a závažný gastrointestinální defekt, který je způsoben minimální tvorbou laktázy již od narození (Fojík *et al*, 2013). Patří mezi monogenní poruchy s autosomálně recesivním typem dědičnosti. Nejčastější příčinou této formy laktózové intolerance jsou zkrácené proteiny, vzniklé v důsledku posunu čtecích rámců nebo chybných mutací v kódující oblasti *LCT* genu (Amiri *et al*, 2015).

Aktivita laktázy je ve střevní sliznici snížena na 0-10 U/g bílkoviny, což má již při prvním požití mateřského mléka za následek výskyt charakteristického, vodnatého průjmu. Jedná se o silný osmotický průjem následovaný dehydratací, acidózou a ztrátou hmotnosti. Navzdory těmto příznakům jsou kojenci s touto poruchou vitální a hladoví. Po dodržované bezlaktózové dietě symptomy rychle ustupují a děti normálně rostou a mají také normální psychomotorický vývoj (Kuokkanen *et al*, 2006).

Výskyt alaktázie se uvádí 1 : 60 000 a patří mezi 36 vzácných monogenních poruch (Kuokkanen *et al*, 2006). Celosvětově bylo popsáno asi jen 40 případů (Fojík *et al*, 2013).

2.3.2 Primární nedostatek laktázy

Tato forma laktózové intolerance postihuje přibližně 70 % celkové světové populace (Fojík *et al*, 2013). Primární nedostatek laktázy je běžná autosomálně recesivní porucha, která je způsobena fyziologickým poklesem aktivity laktázy během vývoje. Většinou se rozvíjí po ukončení kojení do pátého roku života (Enattah *et al*, 2007, Kuokkanen *et al*, 2003).

Za stálost laktázy v průběhu života odpovídají autosomálně dominantní alely genu *LCT*. S perzistencí laktázy v kavkazské populaci přímo souvisí dva jednonukleotidové polymorfismy, C/T 13.910 a G/A 22.018. Zvláštností je, že se tyto polymorfismy nevyskytují přímo v genu *LCT*, ale byly nalezeny v intronech sousedního genu *MCM6* (Friedrich *et al*, 2012). Zajímavé také je, že v africké populaci byly objeveny odlišné polymorfismy související se snášenlivostí laktózy, polymorfismus C/T 13.910 se zde vyskytuje pouze s malou četností (Amiri *et al*, 2015). Genetická podstata laktózové intolerance je více rozebrána v jiné kapitole.

Symptomy lidí trpících primárním nedostatkem laktázy se pohybují od mírných příznaků až po těžký průjem, který později působí úbytek hmotnosti. Ne všichni postižení tímto typem laktózové intolerance vykazují stejné příznaky. Obecně platí, že intenzita symptomů souvisí s konzumovaným množstvím laktózy a potravin, které obsahují mléčný cukr (Amiri *et al*, 2015).

Ukázalo se, že pacienti, kteří mají minimální laktázovou aktivitu jsou více náchylní k některým gastrointestinálním onemocněním. Příkladem může být syndrom dráždivého tračníku (Amiri *et al*, 2015).

2.3.3 Sekundární nedostatek laktázy

Na rozdíl od předchozích popsanych forem není sekundární nedostatek laktázy podmíněn geneticky (Fritzscheová, 2015). Tento typ intolerance vzniká v důsledku snížené produkce laktázy v tenkém střevě v souvislosti s gastrointestinálním onemocněním, úrazem nebo chirurgickým zákrokem (Mađry *et al*, 2010).

Mezi onemocnění spojená s tímto druhem hypolaktázie patří například Crohnova nemoc a celiakie. Dalším viníkem sekundárního nedostatku laktázy může být parazitární infekce či jiná infekční onemocnění trávicího traktu spojená například s užíváním některých léků. Tato forma laktózové intolerance může také vzniknout následkem chemoterapie či ozařování (Amiri *et al*, 2015). Z tohoto důvodu se tento typ intolerance označuje také jako získaný nedostatek laktázy.

Po odeznění gastrointestinálního onemocnění, či po jeho úspěšném залечení je střevní sliznice ve většině případů opět schopná produkovat dostatečné množství laktázy. Proto je obvykle sekundární nedostatek laktázy pouze přechodným stavem (Fojík *et al*, 2013).

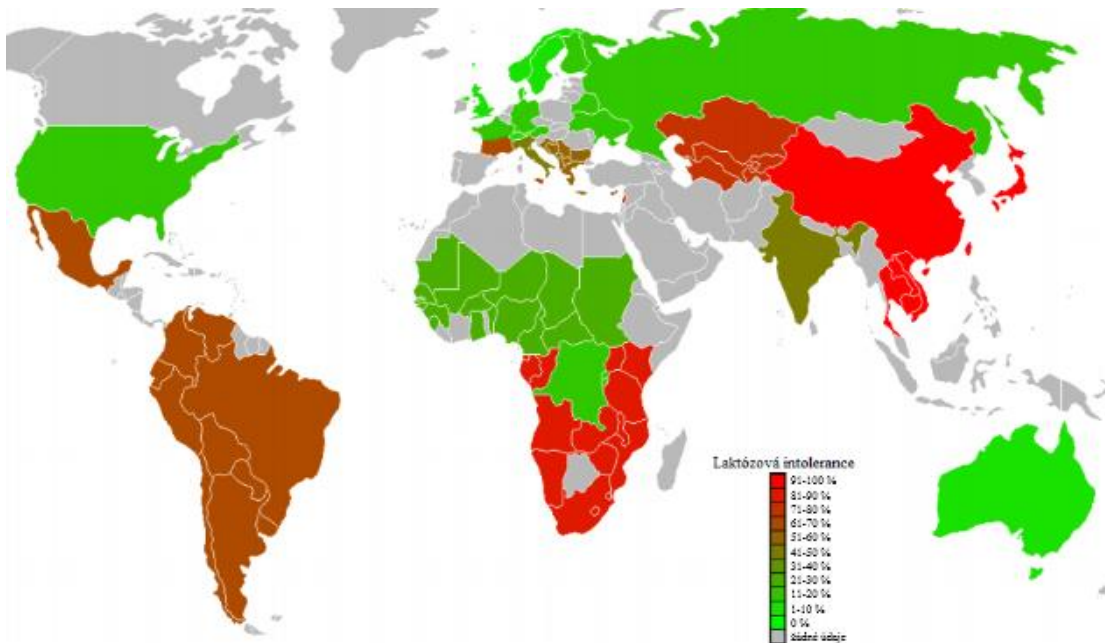
2.4 Prevalence

V průběhu několika let byly prováděny průzkumy výskytu fenotypů laktázové perzistence v mnoha populacích po celém světě. Výzkum odhalil, že nestálá hladina laktázy je nejčastěji se vyskytující fenotyp u člověka a asi 70 % světové populace trpí laktózovou intolerancí. Dalším výsledkem popisovaného průzkumu je tvrzení, že vznik laktázové intolerance výrazně ovlivňuje etnický původ. Přičemž stálá hladina laktázy v průběhu života je běžná pouze u populací s dlouhou historií pastevectví a chovem dobytka. Na základě toho byla vytvořena „Kulturně – historická hypotéza“, které je věnována část následující kapitoly (Ingram *et al*, 2009).

Stálost laktázy má největší četnost v severozápadní Evropě. Směrem na jih a východ postupně klesá (obr. 3). V některých zemích Asie dosahuje prevalence primární laktázové intolerance až 100 %. U jedinců bílé populace severní Evropy, severní Ameriky a Austrálie je prevalence pouze od 5 do 17 % (Fojík *et al*, 2013).

V Africe je četnost fenotypů laktázové perzistence nepravidelná. Byly totiž nalezeny některé kočovné, pastevecké kmeny, které měly vysokou hladinu laktázy, ve srovnání s jinými sociálními skupinami žijícími ve stejné zemi (Ingram *et al*, 2009).

Zajímavé je, že u osob se smíšeným etnickým původem je sledován nižší výskyt intolerance (Fojík *et al*, 2013).



Obrázek 3: Prevalence laktózové intolerance u dospělých osob ve světě. Zdroj: Kocna a Dvořák, 2010.

2.5 Hypotézy vzniku laktózové tolerance

Víme, že pokles aktivity laktázy je podmíněn geneticky. Proč se tedy prevalence hypolaktázie v jednotlivých populacích tolik liší? Jediné vysvětlení na položenou otázku je, že musely a stále musí existovat určité faktory, které k tomuto rozdílu prevalencí vedou několik tisíc let. Tyto faktory se mohou u různých populací lišit, ale zároveň musí nějakým způsobem souviset s konzumací mléka nebo výrobků z něj vytvořených.

Mléko bylo v některých populacích z různých důvodů důležitou složkou potravy. Proto je jasné, že u členů těchto populací byla tolerance laktózy velkou výhodou. Lidé snášející mléčný cukr museli tedy nést ve svém genotypu mutaci pro laktózovou perzistenci. V průběhu několika generací pak došlo k selekci těchto prospěšných mutací a ty byly dále předávány potomkům.

Z důvodu velkého množství mutací, které zvýhodňují trávení laktózy existuje několik hypotéz vzniku laktózové tolerance. Jednotlivé teorie se navzájem svým způsobem nevyklučují, naopak se doplňují, protože ani jedna sama neobjasní vznik tolerance laktózy v celosvětovém měřítku.

2.5.1 Kulturně-historická hypotéza

Více než před čtyřiceti lety Simoons a McCracken nezávisle na sobě vypracovali "kulturně-historickou hypotézu", která je v dnešní době nejvíce podporovanou teorií vzniku laktóзовé tolerance. Hlavní myšlenkou této hypotézy je, že vzrůst laktázové perzistence se vyvíjel společně s počátkem konzumace mléka (Sahi, 2001, Ingram *et al*, 2009).

Tato hypotéza tudíž úzce souvisí s počátkem chovu mléčného skotu, tedy s dobou přibližně před 10 000 lety. Kulturně-historická hypotéza tvrdí, že u populací, které chovaly mléčný skot a pravidelně konzumovaly mléko a mléčné výrobky, se postupně začala zvyšovat schopnost produkovat laktázu i v dospělosti (Khabarova *et al*, 2012). Lidé, u kterých přetrvala aktivita laktázy, získávali selektivní výhody oproti lidem, kteří trpěli laktózovou intolerancí. Tito lidé mohli lépe využívat živiny a vitaminy z mléka, bez zažívacích obtíží. Také v době oslabení organismu, například v období epidemie cholery, trávicí obtíže zbytečně nezatěžovaly organismus, tím měli lidé, kteří byli tolerantní vůči laktóze, vyšší možnost přežití. Nejspíš měli i více potomků než jedinci trpící laktózovou intolerancí. Tato mutace začala být nutričně prospěšná a postupně začala získávat i lepší pozici v lidském genomu (Swallow, 2003, Khabarova *et al*, 2012).

Tato hypotéza však nevysvětluje původ hypolaktázie po celém světě. Například v Etiopii, kde je hojně využíváno kravské i velbloudí mléko, je vysoká prevalence laktózové intolerance. Jedním z vysvětlení vysokého podílu malabsorpce v této zemi je, že historie pastevectví zde není tak dlouhá, aby se mutace pevně začlenily do genomu (Swallow, 2003).

2.5.2 Aridní klima a pouštní nomádi

Jedna z dalších hypotéz vzniku laktóзовé tolerance byla vyslovena autory Cookem a Al-Torkim v roce 1975. Tito autoři popsali vznik laktóзовé perzistence u pouštních nomádů.

V pouštních podmínkách, kde jsou voda i jídlo velmi vzácné, používaly kočovné kmeny své velbloudy nejen jako dopravní prostředek, ale využívaly také jejich mléko, jako zdroj živin. Tato zvířata jsou schopna přežít i více než dva týdny bez jídla a vody, a to díky zásobám tuku obsažených v jejich hrbech.

Lidé, kteří tolerují laktózu, mají v pouštních podmínkách značnou výhodu. Mohou využívat velbloudí mléko jako zdroj živin.

Tato hypotéza však nevysvětluje vysoké rozšíření mutací v severní Evropě, proto jsou upřednostňovány jiné teorie vzniku laktóзовé tolerance (Ingram *et al*, 2009).

2.5.3 *Nedostatek vitamínu D*

Tuto hypotézu navrhli roku 1973 autoři Flatz a Rotthauwe, kteří studovali vznik laktóзовé tolerance v severní Evropě, kde je právě tato mutace nejvíce rozšířena.

Nízká úroveň slunečního záření je ve vysokých zeměpisných šířkách spojována se zvýšeným rizikem vzniku křivice a osteomalacie pro nedostatečnou tvorbu vitamínu D. Právě tento vitamin je výchozí látkou pro syntézu kalcitriolu, což je hormon, který významně ovlivňuje metabolismus vápníku a fosforu. Za normálních okolností se vitamin D syntetizuje v kůži, působením slunečního záření. Při nízké sluneční expozici může být jeho příjem nahrazen z mléka, kde se v malém množství nachází (Ingram *et al*, 2009, Khabarova *et al*, 2012).

Z toho vyplývá, že jedinci, kteří jsou tolerantní vůči laktóze, lépe vstřebávají vápník, tím pádem mají podstatně méně potíží s křivicí a kostními deformitami než lidé intolerantní vůči mléčnému cukru. Ti sice mohou získat vápník z mléčných výrobků se sníženým obsahem laktózy, ale schopnost pít čerstvé mléko je výhodnější. Mléko totiž obsahuje mnohé další důležité složky (Ingram *et al*, 2009).

2.6 **Genetická podstata laktóзовé intolerance**

Již na počátku sedmdesátých let bylo zjištěno, že tolerance laktózy má genetický původ. Za stálost laktázy v průběhu života odpovídají autosomálně dominantní alely genu *LCT*. Exprese genu *LCT* je regulována jak transkripčními, tak posttranskripčními mechanismy. Regulace zahrnuje i cis-působící prvky, které řídí podobu laktázy ještě před narozením (Waud *et al*, 2008).

První objevenou mutací, spojovanou s laktóзовou tolerancí, byla alela T 13.910. Velmi dlouhou dobu byla tato alela považována za jedinou možnou mutaci. Právě kvůli tomu, že výzkumy mutací laktóзовé tolerance probíhaly zpočátku hlavně v severní Evropě, kde je výskyt této alely nejčetnější. Například v Africe se alela T 13.910 vyskytuje pouze v malém množství (Ingram *et al*, 2009).

Další alelické varianty, spojované s laktóзовou tolerancí, byly nalezeny během screeningu sekvence enhanceru *LCT* genu. V prvních studiích probíhajících v populacích Středního východu a Afriky, byly objeveny tři jednonukleotidové polymorfismy spojené

s laktázovou perzistencí: C/G 13.907, T/G 13.915 a G/C 14.010. Z nich se v Africe nejčastěji vyskytuje polymorfismus T/G 13.915 (Liebert *et al*, 2016).

V oblasti enhanceru bylo nalezeno ještě několik dalších alelických variant. U některých byla spojitost s laktázovou tolerancí prokázána, u jiných nikoliv (Liebert *et al*, 2016).

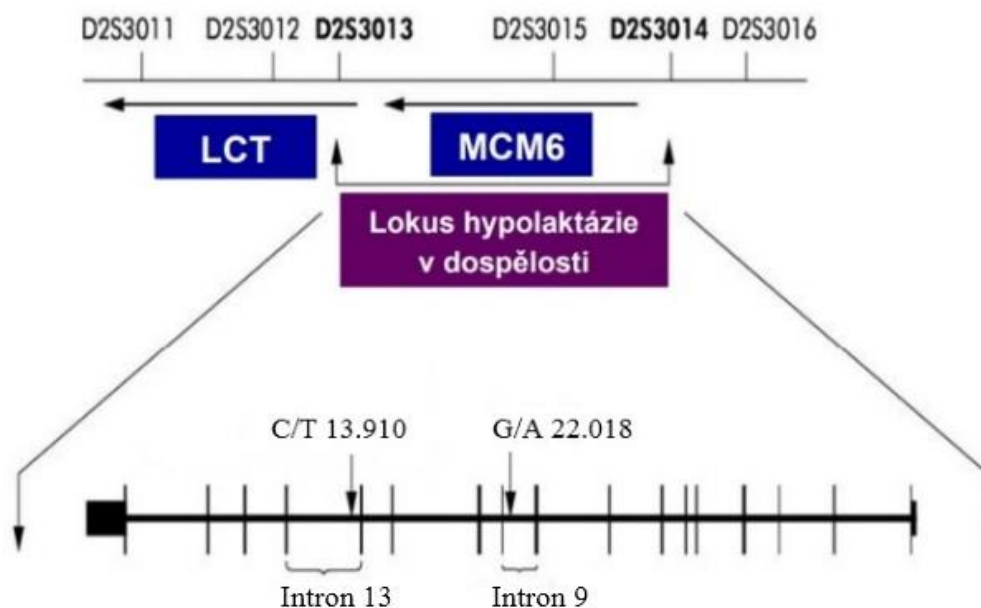
V kavkazské populaci je přetrvávání aktivity laktázy spojeno zejména se dvěma polymorfismy, C/T 13.910 a G/A 22.018. Zvláštností je, že se tyto polymorfismy nevyskytují přímo v genu *LCT*, ale nacházejí se v devátém a třináctém intronu genu *MCM6*, přibližně 14 kb (13.910) a 22 kb (22.018) proti směru transkripce (*upstream*) od promotoru genu *LCT* (Friedrich *et al*, 2012). Bylo dokázáno, že polymorfismus C/T 13.910 je dominantní s alelou C, přičemž tato alela souvisí s poklesem exprese mRNA, bez které se nevytvoří enzym laktáza (Fojík *et al*, 2013).

Osoby s homozygotní formou CC a GG prakticky nemají v dospělosti zjištěnou hladinu laktázy ve střevním epitelu, zatímco homozygoti s TT nebo AA mají aktivitu laktázy celoživotně stálou. Jedinci s heterozygotní formou obou mutací vykazují střední hladiny laktázy, jsou více náchylní k rozvoji intolerance v době stresu a po gastrointestinální infekci. Důkaz popisovaného jevu můžeme najít v in vitro experimentech, které ukazují silnou vazbu transkripčního faktoru na variantu T 13.910, což může mít za následek zvýšení aktivity promotoru genu *LCT* a také může zvýšit hladinu exprese laktázy ve střevní sliznici. Varianta T 13.910 je spojena s laktázovou perzistencí, a to většinou u jedinců evropského původu (Amiri *et al*, 2015).

2.6.1 Gen *LCT* a *MCM6*

Gen *LCT* odpovídá za stálost laktázy v průběhu života. *LCT* gen je složen ze 17 exonů, je přibližně 49 kb velký a nachází se na dlouhém raménku druhého chromozomu. Je umístěn na pozici 2q21.3 poblíž genu *MCM6* (Al-Abri a Bayoumi, 2013).

Gen *MCM6* (*minichromosome maintenance complex component 6*) se také skládá ze 17 exonů. Tento gen řídí transkripci genu *LCT*. V intronech genu *MCM6* byla objevena dvě polymorfnní místa, která se ukázala jako důležitá pro regulaci exprese *LCT* genu. Konkrétně se jedná o introny 13 a 9. V intronu 13 byl identifikován polymorfismus C/T 13.910 a v devátém intronu se vyskytuje polymorfismus G/A 22.018 (obr. 4). Bylo dokázáno, že polymorfismus C/T 13.910 funguje jako zesilující prvek, schopný aktivovat transkripci promotoru genu *LCT*. (Enattah *et al*, 2002).



Obrázek 4: Lokalizace polymorfismů asociovaných s aktivitou enzymu laktázy. Zdroj: Kocna a Dvořák, 2010.

2.7 Určení diagnózy laktózové intolerance

Existuje více způsobů stanovení diagnózy laktózové intolerance, které můžeme rozdělit do dvou skupin, na testy přímé a nepřímé. Mezi přímé testy řadíme vyšetření vzorků získaných jejunální biopsií (Usai-Satta *et al*, 2012). Nepřímé metody zahrnují mnoho typů testů, které mají různý stupeň náročnosti. Od základního expozičního testu, který si může provést každý sám až po genetické vyšetření (Fojík *et al*, 2013).

2.7.1 Expoziční test

Expoziční test probíhá podáním jednoho litru mléka obsahujícího 50 g laktózy. Pokud se do čtyř hodin projeví gastrointestinální příznaky, má pacient vysokou pravděpodobnost intolerance (Fojík *et al*, 2013).

Expoziční test lze provést jednoduše i doma požitím jednoho hrnku mléka (250 ml mléka obsahující 12 g laktózy) (Fojík *et al*, 2013).

2.7.2 Dechové testy

Dechové testy se řadí mezi nepřímé, neinvazivní metody. Používají se zejména v diagnostice v oblasti gastroenterologie. Rozlišujeme dva základní typy dechových testů, vodíkový a uhlíkový. Jsou založené na měření koncentrace vodíku (H₂) nebo uhlíku (¹³C) ve vydechovaném vzduchu. Po určení poměru jednotlivých vydechovaných plynů

můžeme zjistit mnoho důležitých faktorů týkajících se trávicího ústrojí. Jejich výhodou je rychlé provedení a bezpečná aplikace pro děti i těhotné ženy (Kocna, 2006).

2.7.2.1 Vodíkový dechový test

Pro stanovení laktóзовé intolerance se již v 70. letech využíval vodíkový dechový test. Jeho principem je přímo úměrně stoupající koncentrace vodíku ve vydechovaném vzduchu k hydrolýze laktózy (Kocna, 2006).

Provedení vodíkového dechového testu je jednoduché. Po vypití testovacího roztoku se měří množství vodíku ve vydechovaném vzduchu v třicetiminutových intervalech po dobu tří hodin (Fojík *et al*, 2013). Koncentrace vodíku v dechu je stanovována metodou plynové chromatografie nebo pomocí jednoduchých ručních analyzátorů (Kocna, 2006).

Bohužel u popisovaného testu nacházíme jak falešně negativní, tak falešně pozitivní výsledky. Příčinou falešně negativního výsledku může být neschopnost střevní flóry produkovat vodík po požití neabsorbovatelných sacharidů nebo po nedávném užití antibiotik. Falešně negativní výsledek můžeme najít i u pacientů s plicními poruchami. Falešně pozitivní výsledek je méně častý. Objevuje se hlavně, když pacient nedodrží doporučené postupy před vyšetřením. A to zejména nedodržení hladovky nebo porušení zákazu kouření (Usai-Satta *et al*, 2012).

2.7.2.2 ¹³C izotopový dechový test

I u tohoto typu testu jsou odebírány vzorky vydechovaného vzduchu. V těchto vzorcích je stanovováno množství izotopu uhlíku ¹³C, což je marker podávaného vzorku laktózy. V podávaném množství laktózy je přesně stanovena hodnota uvedeného izotopu. Tato hodnota je posléze porovnávána s množstvím stejného izotopu ve vydechovaném vzduchu (Kocna, 2006).

Dříve se k uvedenému testu používaly substráty značené radioaktivním izotopem uhlíku ¹⁴C. Ten je dnes ale plně nahrazen stabilním izotopem uhlíku ¹³C (Kocna, 2006).

2.7.3 Laktóзовý toleranční test

Další nepřímou metodou stanovení diagnózy laktóзовé malabsorpce je laktóзовý toleranční test. Principem uvedeného testu je srovnání hodnoty krevního cukru před a po podání zkušebního roztoku. Zkušební roztok se skládá z padesáti gramů laktózy rozpuštěné v půl litru vody. Po podání zkušebního roztoku se sleduje hladina glukózy v krvi po 15, 30, 60 a 90 minutách. Vzestup glykemie větší než 1,4 mmol/l značí správné

štěpení laktózy. Nižší hladina glukózy znamená nedostatečné štěpení mléčného cukru a tím pádem značí laktózovou intoleranci (Di Rienzo, *et al* 2013).

Nevýhodou tohoto testu je nutnost několikanásobného odebírání krve pacienta.

Laktózový toleranční test má senzitivitu 75 % a specifitu 96 %. Falešně negativní výsledky můžeme sledovat u pacientů trpících diabetem (Rasinperä *et al*, 2004, Fojík *et al*, 2013).

2.7.4 Jejunalní biopsie

Biopsie sliznice tenkého střeva s imunohistochemickým vyšetřením patří mezi přímé metody stanovení diagnózy laktózové intolerance. Při tomto vyšetření se stanovuje aktivita laktázy ve sliznici tenkého střeva, a to ve stupnici: normální aktivita, lehký, střední a těžký deficit. Po odběru se vzorky zkoumají pod mikroskopem a hledají se změny na střevní sliznici (Swallow, 2003, Mađdry *et al*, 2010, Fojík *et al*, 2013).

Problémem popisovaného vyšetření je ale samotný odběr vzorku. Biopstický vzorek se totiž musí odebrat při endoskopickém vyšetření, kdy je pacient při vědomí. Celý proces odběru vzorku je pracný a pro pacienta nepříjemný (Swallow, 2003, Fojík *et al*, 2013).

Výhodou této metody je odlišení sekundárních příčin deficitu při postižení sliznice, což je nejčastěji při celiakii (Fojík, *et al*, 2013).

Jelikož se jedná o invazivní postup pro diagnózu tak mírného stavu, při kterém mohou být výsledky ovlivněny diseminací aktivity laktázy ve sliznici tenkého střeva, postupně se od této metody ustupuje (Usai-Satta *et al*, 2012).

2.7.5 Genetické vyšetření laktózové intolerance

Jak již bylo řečeno, v kavkazské populaci je stálost laktázy spojena zejména se dvěma polymorfismy, C/T 13.910 a G/A 22.018. Při genetickém vyšetření laktózové intolerance se tedy určuje, zda je v genu *MCM6* přítomna mutace vedoucí ke snížené tvorbě laktázy, či nikoliv (Rasinperä *et al*, 2004).

Vhodným materiálem pro genetické vyšetření této malabsorpce je nesražená periferní krev nebo bukální stěr.

Pro detekci mutací souvisejících s laktózovou intolerancí se dá využít mnoha molekulárně biologických metod. V následující kapitole jsou uvedeny principy metod PCR-RFLP a

reverzní hybridizace. Právě těmito metodami vyšetření laktóзовé intolerance jsem se zabývala v praktické části bakalářské práce. Další možnosti vyšetření této malabsorpce mohou být například metoda Sangerova sekvenování, Real-time PCR a další.

Genetický test je ve srovnání s ostatními testy jednoduchý, neinvazivní a nevyvolává příznaky intolerance laktózy. Je přesnou a spolehlivou metodou při potvrzení nebo vyloučení hypolaktázie u dospělých osob (Mađry *et al*, 2010).

2.8 Genetické testování laktóзовé intolerance

2.8.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla poprvé provedena v roce 1983. O dva roky později byla zavedena do praxe, což znamenalo pro obor molekulární biologie obrovský přínos srovnatelný například s objevem restrikčních endonukleáz. O tento objev se zasloužil americký vědec Kary B. Mullis (Šmarda *et al*, 2005).

Polymerázová řetězová reakce, z anglického Polymerase Chain Reaction (PCR), je metoda rychlého a snadného zmnožení vybraného úseku DNA, založena na principu replikace nukleových kyselin.

2.8.1.1 Princip metody

Principem polymerázové řetězové reakce je replikace nukleových kyselin *in vitro*. Podstatou PCR je selektivní amplifikace studovaných úseků analyzovaného genu prostřednictvím enzymu DNA polymerázy. Vybraný úsek DNA je ohraničen oligonukleotidovými primery, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'konce směřují k sobě. Od těchto primerů je zahájena syntéza DNA. Po přidání nukleotidů a DNA polymerázy probíhá enzymová syntéza nových vláken na obou řetězcích protisměrně (Šmarda *et al*, 2005).

2.8.1.2 DNA polymeráza

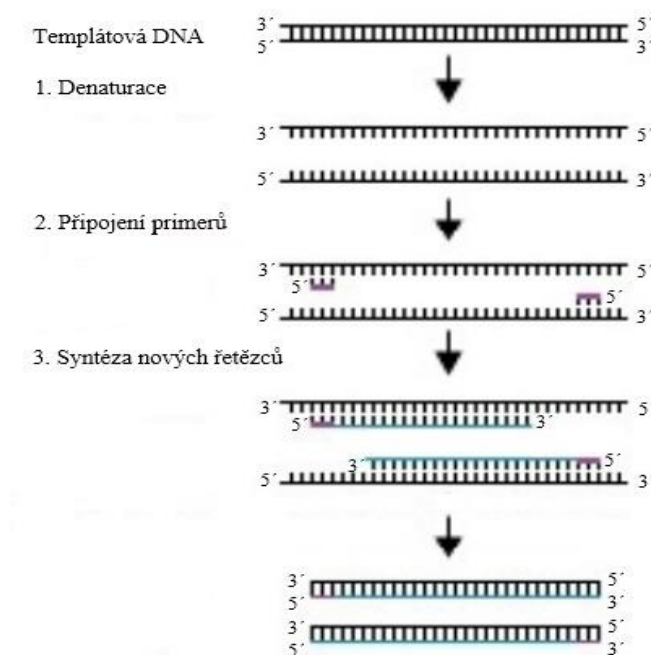
Funkci replikázy plnila zpočátku DNA polymeráza I izolovaná z *E. coli*. Uvedený enzym se však inaktivuje teplotou během denaturačního kroku PCR. Proto se musel ve třetím kroku každého cyklu opětovně přidávat čerstvý enzym. Hlavní vylepšení PCR proto přišlo s objevem termostabilní DNA polymerázy v termofilní bakterii *Thermus aquaticus*. Tato polymeráza, nazvaná *Taq*-polymeráza zůstává během denaturačního kroku PCR aktivní, proto se nemusí po každém takovém kroku znovu přidávat (Snustad *et al*, 2009).

2.8.1.3 Průběh PCR

V průběhu PCR se pravidelně střídají tři kroky, během kterých probíhají tři odlišné děje s rozdílnými teplotními nároky. Polymerázová řetězová reakce je zahájena počáteční denaturací, která probíhá při teplotách 92-95 °C. V následujícím kroku dochází k připojení primerů k odděleným řetězcům DNA, tzv. annealing. Teplota při tomto ději je individuální, záleží na složení použitých primerů. Hodnoty se pohybují v rozmezí 30-65 °C. Ve třetím kroku dochází k syntéze nových řetězců DNA prostřednictvím DNA polymerázy (obr. 5). Teplota posledního kroku se pohybuje v rozmezí 65-75 °C (Snustad *et al*, 2009).

Reakční směs pro PCR obsahuje pufr udržující stabilní pH po celou dobu reakce, dále DNA sloužící jako templát, termostabilní DNA polymerázu a směs všech čtyř deoxyribonukleotidů. Reakční směs musí také obsahovat minimálně jeden pár oligonukleotidových primerů komplementárních k 3'koncovým sekvencím určeného úseku na obou vláknách templátové DNA (Ruml *et al*, 2002).

PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler, ve kterém se teplota mění automaticky. Postupným opakováním jednotlivých kroků se exponenciálně vytváří až miliarda kopií vybraného úseku. Výsledná koncentrace produktu tedy závisí na množství cyklů (Šmarda *et al*, 2005).



Obrázek 5: Průběh polymerázové řetězové reakce. Zdroj: vlastní.

2.8.1.4 Výhody a nevýhody PCR

Pro využití PCR v praxi jsou výhodné její následující přednosti. Vysoká citlivost v úvodu reakce postačuje velmi malé množství nukleové kyseliny. Další předností PCR je vysoká výnosnost, po 30 amplifikačních cyklech vznikne více než miliarda kopií vybraného úseku DNA. Další výhodou PCR je relativně krátké trvání celého procesu (Ruml *et al*, 2002).

Vysoká citlivost PCR je spíše řazena mezi přednosti této metody, ale tato vlastnost může být i velkou nevýhodou. A to zejména při kontaminaci vzorku. I jediná exogenní molekula postačuje pro získání falešně pozitivního výsledku (Šmarda *et al*, 2005).

Primery musí být komplementární ke svému templátovému vlákně v místech, které lemují cílový úsek. Proto na jejich přípravu potřebujeme znát přesnou sekvenci bází amplifikovaného úseku DNA. Tudíž nemůžeme PCR použít u genů s neznámou sekvencí. Tuto skutečnost můžeme také označit jako nevýhodnou (Brown, 2007).

2.8.1.5 Analýza PCR produktů

Na PCR navazuje celá řada dalších experimentů. Ty se zaměřují na studium výsledného produktu PCR a snaží se získat informace o původní molekule DNA, která byla použita jako templát (Brown, 2007).

Výsledky PCR produktů se ověřují nebo rovnou hodnotí pomocí agarózové elektroforézy. Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám. Principem této metody je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli, přičemž hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny. Proto se nukleové kyseliny pohybují v elektrickém poli ke kladně nabitě anodě (Šmarda *et al*, 2005).

2.8.1.6 Modifikace PCR

Existuje mnoho různých modifikací PCR, které se od sebe navzájem liší. Ať už se jedná o odlišnost v užití specifických sekvencí primerů, rozdílnost v přísnosti podmínek pro amplifikaci nebo způsob detekce produktů PCR a mnohé další (Šmarda *et al*, 2005).

Pro stanovení diagnózy laktóзовé intolerance se z těchto variant nejčastěji využívá PCR-RFLP, které je věnována následující kapitola.

2.8.2 PCR-RFLP

Lidský genom obsahuje více než tři miliony malých genetických variací, zejména se jedná o jednonukleotidové polymorfismy (SNP). Polymorfismus je variací v jedné pozici v sekvenci DNA mezi jednotlivci. S některými SNP se pojí určitá onemocnění, na druhé straně jsou známé jednonukleotidové polymorfismy, které nezpůsobují žádnou poruchu. Kvůli potřebě vyhledat polymorfismy bylo nezbytné vyvinout techniku, pomocí které by bylo možné tyto malé genetické variace dohledat. Pro tento účel vzniklo několik metod. Jednou z nich je právě PCR-RFLP (Rasmussen, 2012).

Zkratka RFLP pochází z anglického označení molekulárně biologické metody, Restriction Fragment-Length Polymorphisms, což se do češtiny překládá jako polymorfismus délky restrikčních fragmentů. Právě díky této metodě můžeme identifikovat alely na základě přítomnosti či absence specifického restrikčního místa (Snustad *et al*, 2009).

V závislosti na volbě primerů a na výběru vhodné restrikční endonukleázy můžeme provést analýzu jakéhokoliv genu (Šmarda *et al*, 2005).

Pomocí zvolených primerů amplifikujeme studovanou sekvenci daného genu, za přísných podmínek, pomocí PCR. Výsledné PCR produkty, které mají stejnou délku se kontrolují elektroforézou v agarózovém gelu. V dalším kroku jsou amplifikované PCR produkty štěpeny zvolenou restrikční endonukleázou. V případě bodové mutace v restrikčním místě toto místo zaniká nebo naopak vzniká nové. To má za následek vznik fragmentů DNA různé velikosti, ty jsou poté znovu elektroforeticky zanalyzovány (Šmarda *et al*, 2005).

Za pomoci enzymů restriktáz dochází k rozštěpení izolované DNA na fragmenty rozdílné délky. Restrikční endonukleázy či restriktázy jsou enzymy, které štěpí DNA na specifických místech. Popisované enzymy jsou izolovány z bakterií, jimž slouží jako ochrana před nežádoucími viry či plazmidy (Knoll a Vykoukalová, 2002).

Mezi výhody této metody patří možnost přesného určení místa mutace. Další výhodou je nenáročný provedení a snadná interpretace výsledků. Nevýhodou RFLP je relativně nízká pravděpodobnost detekce polymorfismu, která závisí na počtu použitých enzymů a velikosti daného polymorfismu. Tato metoda je tedy vhodnější pro geny s větším

polymorfismem. Vyšší účinnosti můžeme dosáhnout kombinací se sekvenováním PCR produktu a následným vyhledáním vhodné restriktázy (Knoll a Vykoukalová, 2002).

Zajímavostí na RFLP je, že právě tato metoda se ukázala jako neocenitelná při konstrukci podrobných genetických map (Snustad *et al*, 2009).

2.8.3 Reverzní hybridizace

Další metodou detekce bodových mutací a SNP je reverzní hybridizace. Tato metoda je postavena na principu hybridizace jednořetězcových molekul nukleových kyselin na základě jejich komplementarity za vzniku molekuly dvouřetězcové. Přičemž jedno vlákno tvoří vyšetřovaná DNA. Druhé vlákno představuje referenční úsek DNA o známé sekvenci, označovaný jako sonda (Beránek, 2016).

Proces reverzní hybridizace se skládá z několika částí. Prvním krokem této metody je izolace DNA ze vzorku. Poté dochází pomocí PCR k amplifikaci cílových genových sekvencí. Následně jsou získané amplifikační produkty denaturovány, například pomocí chemických činidel. Jednotlivá denaturovaná vlákna jsou poté hybridizována s referenčními sondami (Zima, 2007).

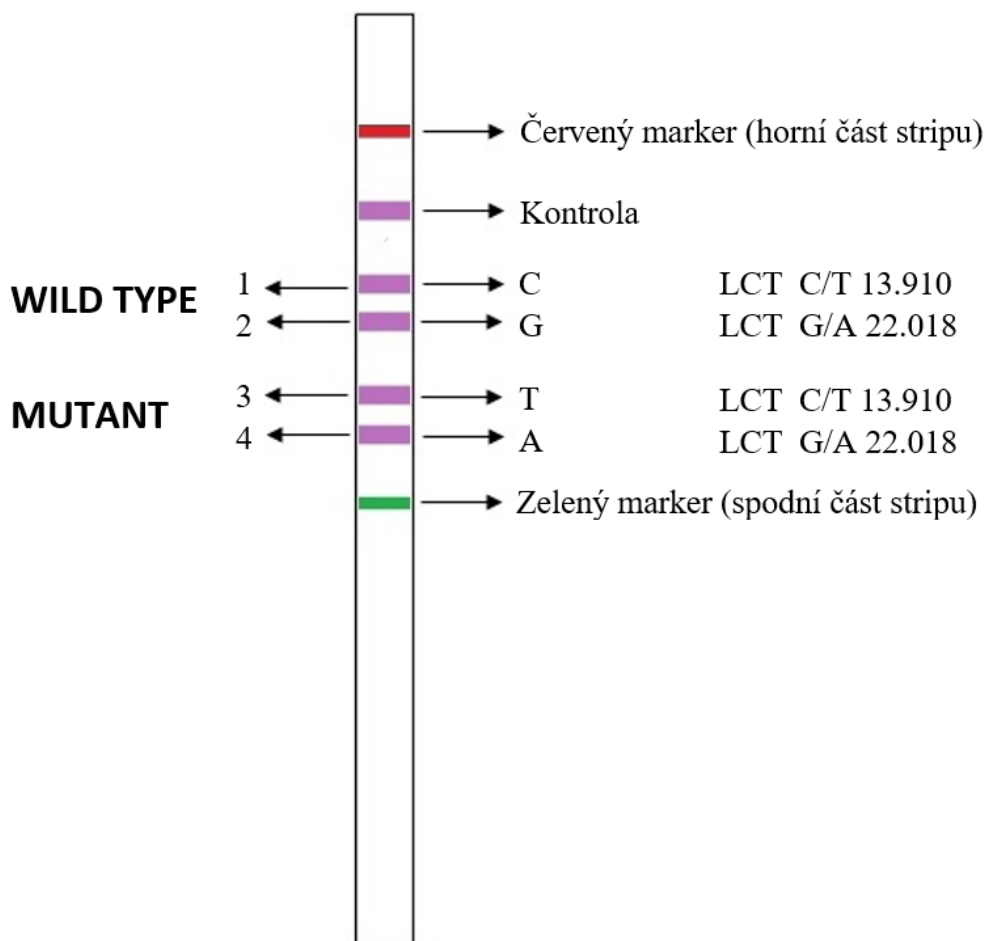
Existuje několik způsobů vizualizace úspěšné hybridizace testované DNA s referenční sondou. Jedním z nejstarších je radioaktivní značení, které využívá nukleotidy s navázaným radioizotopem. Radioaktivní značení bylo z bezpečnostních důvodů nahrazeno neradioaktivním, které funguje na základě různých principů. Příkladem může být princip chemiluminiscence, využívající upravených nukleotidů, které se v průběhu amplifikace klasicky začlení do nově vznikajícího vlákna. Tyto nukleotidy obsahují vazebný protein, který se během detekce váže s partnerskou molekulou s vysokou afinitou, takovou molekulou může být například protilátka, ligand nebo jiný protein. Partnerská molekula je pak konjugována s fluorescenčním barvivem nebo s enzymem, který zprostředkuje chemiluminiscenci (Beránek, 2016).

Velice rozšířeným způsobem neradioaktivního značení je tzv. metoda ABC (avidin-biotin complex). Principem je označení sekundární protilátky biotinem, na který se naváže avidin-biotinový komplex označený křenovou peroxidázou. Na základě enzymatické aktivity peroxidázy pak dojde k zviditelnění hybridizovaného komplexu (Zima, 2007).

2.8.3.1 Reverzní hybridizace na stripech

Reverzní hybridizace na stripech je typem reverzní hybridizace využívající imobilizované referenční sondy na nitrocelulóзовých proužcích, tzv. stripu (obr. 6). Jednotlivé sondy jsou ukotveny na stripu pod sebou v paralelních liniích. Přičemž každá sonda obsahuje buď běžnou (wild type) nebo mutovanou sekvenci DNA (Beránek, 2016).

Tato metoda začíná klasickou amplifikací studované DNA, při které jsou PCR produkty navíc značeny biotinem. Po dokončení amplifikace musí dojít k denaturaci produktů, po které přichází na řadu hybridizační krok využívající principu komplementarity bází mezi sondou a studovaným PCR produktem. Pokud není PCR produkt hybridizován na strip, dojde v promývací fázi k jeho vymytí. Hybridizovanou sondu poté zviditelníme přidáním protilátky proti biotinu. Výsledek testu lze snadno odečíst pouhým okem (Matýšková, Čech, 2009).



Obrázek 6: Ukázka stripu pro detekci polymorfismů laktóзовé intolerance. Zdroj: vlastní.

3. Cíle práce a hypotézy

3.1 Cíle práce

1. Možnosti testování laktózové intolerance.
2. Vyšetření pacientů s podezřením na laktózovou intoleranci metodou PCR-RFLP a zároveň komerčně dodávaným CE IVD kitem na principu reverzní hybridizace.
3. Srovnání použitých vyšetřovacích metod.

3.2 Hypotézy

1. Předpokládám, že metodou reverzní hybridizace půjde výsledný genotyp lépe určit než metodou PCR-RFLP.

4. Praktická část

Praktická část této práce byla provedena v molekulárně-genetické laboratoři na Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích pod odborným vedením Ing. Tomáše Nixe, Ph.D.

Výchozí biologický materiál této práce tvořily vzorky získané stěrem buněk z bukální sliznice. Vzorky byly postupně sbírány v období od 5. 9. 2017 do 9. 2. 2018. Většinu vyšetřovaného souboru tvořily vzorky získané od dobrovolníků s podezřením na laktózovou intoleranci. K dispozici byly také vzorky od vybraných pacientů genetické laboratoře GENLABS, s.r.o., které pro tuto práci poskytla Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.

K jednotlivým metodám bylo nutné využití těchto přístrojů:

- Laminární box: TELSTAR AV-100
- Sada automatických mikropipet
- Inkubátor: Mini Dry Bath
- Minicentrifuga: PrismTMMini
- Centrifuga: MiniSpin eppendorf
- Vortex mixer: Labnet international, Inc.
- Chladnička pro laboratorní použití
- Spektrofotometr: UV/VIS Shimadzu BioSpec-nano
- Termocykler: MJ MiniTM Personal Thermal Cycler
- Analytické váhy
- Laboratorní sklo
- Mikrovlnná trouba
- Elektroforetický systém: MS major science Safe Blue MBE-150 PLUS
- UV transiluminátor a detekční systém: Uvitec Cambridge, UVISAVE HD5
- Třepaná vodní lázeň: Julabo sw22

4.1 Izolace DNA

Prvním krokem většiny molekulárně biologických metod je izolace DNA z buněk a jejich separace od ostatních buněčných složek. Je známo více metod izolace nukleových kyselin, které jsou založeny na rozdílných principech (Šmarda *et al*, 2005). V praktické části této práce byl pro izolaci genomové DNA využit komerčně dodávaný kit ExtractNowTM DNA Mini Kit od firmy Minerva Biolabs. Uvedený kit využívá schopnost nukleové kyseliny vázat se v přítomnosti chaotropních solí na silikátový povrch v

silikagelové kolonce (příbalová informace k soupravě *ExtractNow™ DNA Mini Kit*, 2015).

Pro úspěšnou izolaci DNA je zcela klíčový správný odběr vzorku. Nejčastějším primárním vzorkem pro izolaci DNA je buď nesražená periferní krev nebo stěr z bukální sliznice (Šmarda *et al*, 2005). Jako výchozí biologický materiál byly v této práci využity vzorky získané z bukálních stěrů.

Reagencie:

- Lyzační pufr: Lysis Buffer C
- Proteináza K: Proteinase K
- Vázací pufr: Binding Buffer C
- Promývací pufr: Wash Buffer E
- Eluční pufr: Elution Buffer A

Pracovní Postup:

Před zahájením samotné izolace byla nastavena suchá lázeň na 50 °C.

1. Vložit tampon se vzorkem z bukálního stěru do 1,5 ml mikrozkuřavky.
2. Přidat 400 µl lyzačního pufru a 25 µl proteinázy K, vortexovat a stočit.
3. 15 minut inkubovat směs v suché lázni při 50 °C.
4. Po dokončení inkubace sterilně odstranit tampon.
5. Přidat 200 µl vázacího pufru a důkladně vortexovat.
6. Výslednou směs převést na kolonku, centrifugovat 2 min. při 12210 rpm.
7. Po ukončení centrifugace vyměnit spodní část kolonky za novou.
8. Přidat 700 µl promývacího pufru a centrifugovat 1 min. při 12210 rpm.
9. Zopakovat sedmý a osmý krok.
10. Slít filtrát a centrifugovat 2 min. na max.
11. Kolonku s navázanou DNA dát do nové 1,5 ml mikrozkuřavky označené štítkem.
12. Přidat 100 µl elučního pufru a 5 min. inkubovat při pokojové teplotě.
13. Centrifugovat 2 min. při 9458 rpm.
14. Zopakovat dvanáctý a třináctý krok.
15. Pro krátkodobé uskladnění je třeba izolovanou DNA uchovat při 4 °C, pro dlouhodobé při -20 °C (příbalová informace k soupravě *ExtractNow™ DNA Mini Kit*, 2015).

4.2 Precipitace DNA

Precipitace neboli přečištění nukleových kyselin je metoda, která se využívá ve chvíli, kdy již máme vyizolovaný vzorek DNA a potřebujeme jej zbavit nežádoucích příměsí. Metoda precipitace se také může využít v případě potřeby zvýšení koncentrace DNA.

Nejčastějším způsobem precipitace DNA je využití octanu sodného v kombinaci s ethanolem. Právě tento postup byl využit i v praktické části této práce. Pracovní postup je uveden níže. K přečištění DNA lze také využít jiné soli například chlorid lithný, octan amonný a jiné.

Reagencie:

- 3M octan sodný
- 100 % ethanol (předchlazený)
- 75 % ethanol
- PCR voda

Pracovní postup:

1. K roztoku DNA přidat 22 μ l 3M octanu sodného, vortexovat a stočit.
2. Přidat 2 - 2,5 objemu 100% předchlazeného ethanolu, tj. 555 μ l, vortexovat.
3. Výslednou směs inkubovat minimálně 1 hodinu při teplotě -20 °C.
4. Centrifugovat 20 min. při 13000 rpm.
5. Odstranit supernatant.
6. Přidat stejný objem 75% ethanolu, tj. 800 μ l, promíchat.
7. Centrifugovat 5 min. při 13000 rpm.
8. Odstranit supernatant.
9. Odpařit zbytky ethanolu.
10. Rozpustit získaný sediment v malém množství PCR vody.

4.3 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla měřena pomocí přístroje UV/VIS Shimadzu BioSpec-nano. Uvedený přístroj pracuje na principu spektrofotometrie a je vhodný pro kvantifikaci DNA, RNA a analýzu proteinů. Kvantifikace je rychlá a jednoduchá. Tento model je vhodný i pro kvantifikaci vzorků s malým objemem.

4.4 Reverzní hybridizace na stripech

Pro vyšetření jednonukleotidových polymorfismů C/T 13.910 a G/A 22.018 byly v této práci využity dvě metody. Jednou z metod využitých pro vyšetření těchto SNP byla právě reverzní hybridizace na stripech. Pro tuto metodu byl použit komerčně dodávaný CE IVD kit Lactose Intolerance StripAssay od firmy ViennaLab.

Principem metody je reverzní hybridizace biotinylovaného PCR produktu, za vzniku barevných proužků na stripu, na základě přítomnosti daného polymorfismu u testovaného jedince. Specifická hybridizace biotinylovaných sekvencí je pak detekována na stripu pomocí streptavidin-alkalické fosfatázy a barevného substrátu (příbalová informace k soupravě CE IVD StripAssay, 2015).

Celý pracovní postup byl přesně dodržen dle kroků uvedených v manuálu, který byl součástí kitu.

Reagencie:

Veškeré reagencie potřebné k provedení jednotlivých kroků jsou dodávány v jedné soupravě s výjimkou DNA polymerázy, která je dodávána zvlášť.

- Diluční pufr: *Taq* Dilution Buffer
- Amplifikační mix: Amplification Mix
- DNA polymeráza: DreamTaq DNA Polymerases
- DNAT
- Hybridizační pufr: Hybridization Buffer
- Promývací roztok A: Wash Solution A
- Konjugační roztok: Conjugate Solution
- Promývací roztok B: Wash Solution B
- Barvicí roztok: Color Developer

1. Amplifikace

Pracovní postup:

1. Naředit DNA polymerázu v dilučním pufru na potřebnou koncentraci.
2. Pro každý vzorek připravit jednu PCR zkumavku.
3. Pro každý vzorek připravit PCR reakční mix, který se skládá z:
 - 15 μ l Amplifikačního mixu
 - 5 μ l naředěné *Taq* DNA Polymerázy

- 5 µl vyizolované DNA (doporučená koncentrace DNA je 5-40 µg/ml)
4. Uzavřít PCR zkumavky, vložit je do termocykleru a spustit příslušný program (tab. 2).

Tabulka 2: PCR reakční protokol

Krok programu	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	2 min	1 cyklus
Denaturace	94 °C	15 s	35 cyklů
Annealing	58 °C	30 s	
Extenze	72 °C	30 s	
Terminální extenze	72 °C	3 min	1 cyklus
Chlazení	4 °C	10 min	1 cyklus
Chlazení	16 °C	Do vyndání vzorku ze cykleru	1 cyklus

2. Gelová elektroforéza PCR produktů

Dle doporučení výrobce byla provedena kontrola PCR produktů na 2,5% agarózovém gelu.

Reagencie:

- 0,5 x TBE pufr, připraven naředěním roztoku 10x TBE buffer
- Agaróza: Top Vision Agarose, thermoscientific
- Ethidium bromid: Ethidium bromide aqueous solution 1% w/v, SERVA
- 10x Loading Buffer
- 100 bp DNA Ladder equalized, Carl Roth GmbH + Co. + Co.KG Karlsruhe

Pracovní postup:

1. Připravit 2,5% agarózový gel:
 - 2,25 g agarózy + 75 ml 0,5 x TBE pufru, vzniklou směs povařit.
2. Směs ochladit pod tekoucí vodou na 70 °C.
3. Přidat 2 µl ethidium bromidu, dobře promíchat.
4. Připravenou směs vylít do formy na gel, vzniklé bubliny odstranit.
5. Gel nechat ztuhnout.
6. Vložit gel do elektroforetické vany s 0,5 x TBE pufrem.

7. Na gel nanést 10 μ l PCR produktu, který je předem smíchán s 2 μ l 10x Loading Bufferu.
8. Přidat 10 μ l 100 bp DNA Ladderu.
9. Zapnout elektroforézu na 30 minut při napětí 70 V.
10. Po uplynutí 30 minut přenést gel na detekční systém a vyfotit.

3. Hybridizace

Před započítím samotné hybridizace bylo zapotřebí upravit teplotu vodní lázně na 45 °C. Na stejnou teplotu byl také vytemperován hybridizační pufr a promývací roztok A. Třepaná platforma vodní lázně byla nastavena na střední frekvenci třepání, tj. cca 50 rpm.

Pracovní postup:

1. Napipetovat do spodní části promývacího korýtka 10 μ l DNAT.
2. Do kapky DNAT přidat 10 μ l PCR produktu.
3. Vzniklý roztok promíchat pipetou a nechat stát 5 min. při pokojové teplotě.
4. Do každého sloupce korýtka přidat 1 ml hybridizačního pufru.
5. Do příslušných sloupců korýtka vložit označené testovací proužky.
6. Proužky zcela ponořit a inkubovat 30 min. při 45 °C na třepané platformě.
7. Po dokončení inkubace odsát hybridizační roztok.

4. Promývání

Všechny kroky promývací fáze musí proběhnout při 45 °C na třepané lázni.

Pracovní postup:

1. Přidat 1 ml předehřátého promývacího roztoku A, inkubovat 10 sekund.
2. Po uplynutí 10 sekund odsát veškerou tekutinu.
3. Přidat 1 ml předehřátého promývacího roztoku A, inkubovat 15 minut při 45 °C.
4. Po dokončení inkubace odsát tekutinu.
5. Zopakovat třetí a čtvrtý krok.

5. Barvení

Celá fáze barvení musí proběhnout při pokojové teplotě.

Pracovní postup:

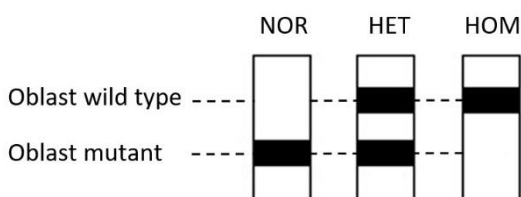
1. Přidat 1 ml konjugačního roztoku.

2. Inkubovat 15 minut na třepačce při pokojové teplotě.
3. Po uplynutí 15 minut odsát veškerou tekutinu.
4. Přidat 1 ml promývacího roztoku B, inkubovat 10 sekund při pokojové teplotě.
5. Po uplynutí 10 sekund odsát zbylou tekutinu.
6. Přidat 1 ml promývacího roztoku B.
7. Inkubovat 5 minut na třepačce při pokojové teplotě.
8. Po dokončení inkubace odsát veškerý roztok.
9. Zopakovat šestý, sedmý a osmý krok.
10. Přidat 1 ml barvicího roztoku.
11. Inkubovat 15 minut při pokojové teplotě na třepačce, ve tmě.
12. Po uplynutí 15 minut jednotlivé stripy několikrát opláchnout destilovanou vodou.
13. Stripy usušit ve tmě na filtračním papíru.

6. Vyhodnocení

Výsledkem reverzní hybridizace jsou fialové proužky na testovacím stripu. Proužky se objeví pouze v případě, když se vyšetřovaná DNA nahybridizuje k příslušné sondě ukotvené na hybridizačním stripu. Výsledky byly odečítány pomocí šablony, která byla součástí kitu (obr. 7, tab. 3).

Každá mutace, ať už v oblasti wild type nebo v oblasti mutant (obr. 6) musí mít alespoň jeden nebo oba proužky. Dva proužky v oblasti wild type znamenají toleranci laktózy. Dva proužky v oblasti mutant se vyskytují u pacientů s laktózovou intolerancí. Dalším možným výsledkem je zbarvení všech čtyř proužků na stripu, v takovém případě se jedná o heterozygota. Pacienti s takovým výsledkem jsou více náchylní k rozvoji laktózové intolerance. Mohou se vyskytnout i kombinace proužků mezi oblastí mutant a wild type, například 1 proužek ve wild type a dva proužky v oblasti mutant. Tyto kombinace se nevyskytují často, protože vyšetřované polymorfismy se vyskytují v genu *MCM6* blízko u sebe a ve většině případů se dědí společně.



Obrázek 7: Hodnocení genotypu – vizualizace proužků na testovacím stripu. Zdroj: vlastní.

Tabulka 3: Určování genotypů pomocí reverzní hybridizace.

	Wild type	Mutant	Genotyp
NOR	negativní	pozitivní	tolerance laktózy
HET	pozitivní	pozitivní	heterozygot
HOM	pozitivní	negativní	intolerance laktózy

4.5 PCR-RFLP

Další vhodnou metodou pro vyšetření jednonukleotidových polymorfismů C/T 13.910 a G/A 22.018 je využití principů polymerázové řetězové reakce a polymorfismu délky restrikčních fragmentů.

Metoda PCR-RFLP se skládá ze dvou hlavních kroků. Nejprve se pomocí PCR reakce za využití dvou ohraničujících oligonukleotidových primerů amplifikuje vyšetřovaná oblast genu. Ve druhém kroku se pak k amplifikovanému úseku přidá enzym restriktáza, který štěpí specificky. Výsledek štěpení se pak odečítá na 4% agarózovém gelu.

Tato práce je zaměřena na vyšetření dvou nejčastěji se vyskytujících polymorfismů C/T 13.910 a G/A 22.018 v kavkazské populaci. Pro každý polymorfismus musely být využity jiné sekvence primerů, odlišné teploty při amplifikaci v termocykleru a samozřejmě také různé restrikční enzymy. Z těchto důvodů musely být testované polymorfismy vyšetřovány odděleně.

Vyšetření polymorfismů C/T 13.910 a G/A 22.018 metodou PCR-RFLP

1. Amplifikace

Reagencie:

- Master mix: EmeraldAmp GT PCR Master Mix of firmy Takara
- Primery (20 pmol/μl) od firmy Generi biotech: pro SNP C/T 13.910: lac_13910_C/T_F a lac_13910_C/T_R, nebo pro SNP G/A 22.018: lac_22018_G/A_F a lac_22018_G/A_R
- Templát DNA
- PCR voda

Sekvence primerů pro SNP C/T 13.910:

lac_13910_C/T_F: 5'- GCT GGC AAT ACA GAT AAG ATA ATG GA -3'

lac_13910_C/T_R: 5'- CTG CTT TGG TTG AAG CGA AGA T -3' (sekvence primerů byly získány ze článku: Mattar *et al*, 2008).

Sekvence primerů pro SNP G/A 22.018:

lac_22018_G/A_F: 5'- CTC AGT GAT CCT CCC ACC TC -3'

lac_22018_G/A_R: 5'- CCC CTA CCC TAT CAG TAA AGG C -3' (sekvence primerů byly převzaty ze článku: Coelho *et al*, 2005).

Pracovní postup:

1. Pro každý vzorek připravit jednu PCR zkumavku.
2. Pro každý vzorek připravit PCR reakční mix, který se skládá z:
 - 25 µl master mixu
 - 22 µl PCR vody
 - 0,5 µl primeru lac_13910_C/T_F, nebo 1 µl primeru lac_22018_G/A_F
 - 0,5 µl primeru lac_13910_C/T_R, nebo 1 µl primeru lac_22018_G/A_R
 - 2 µl vyizolované DNA
3. Uzavřít PCR zkumavky, vložit je do termocykleru a spustit příslušný program (tab. 4).

Tabulka 4: PCR reakční protokol pro oba polymorfismy současně.

Krok programu	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	5 min	1 cyklus
Denaturace	95 °C	60 s	35 cyklů
Annealing	57,4 °C pro C/A 13.910 60,1 °C pro G/A 22.018	60 s	
Extenze	72 °C	60 s	
Terminální extenze	72 °C	5 min	1 cyklus
Chlazení	4 °C	10 min	1 cyklus
Chlazení	16 °C	Do vyndání vzorků ze cykleru	1 cyklus

2. Kontrola PCR produktů gelovou elektroforézou

Dle doporučení byla provedena kontrola PCR produktů gelovou elektroforézou. Ke kontrole byl využit 2,5 % agarózový gel (2,25 g agarózy + 75 ml 0,5 x TBE pufru). PCR produkty byly vizualizovány pomocí 2 µl ethidium bromidu. Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně s 0,5 x TBE pufrům při napětí 70 V po dobu 30 minut.

Na gel bylo napipetováno z každého vzorku 5 µl amplifikačních produktů. Vzorky byly naneseny na gel se 4 µl 10 x Loading Bufferu. Pro orientační stanovení velikostí PCR produktů byl použit 100 bp DNA Ladder. Přičemž velikosti amplifikačních produktů by měly mít délku 201 bp pro polymorfismus C/T 13.910 a 271 bp pro polymorfismus G/A 22.018.

3. Restrikční štěpení PCR produktů

Pro detekci polymorfismů C/T 13.910 a G/A 22.018 se používají restrikční enzymy izolované z bakterie *Haemophilus influenzae*.

Pro SNP C/T 13.910 se užívá enzym označovaný jako *HinfI*. Tento enzym štěpí amplifikační produkty na specifické fragmenty v sekvenci 5'... G^AANTC ... 3' nebo na druhém raménku DNA v sekvenci 3'...CTNA^G ...5'.

U polymorfismu G/A 22.018 se používá restrikční enzym označovaný jako *Hin6I*. Tato restriktáza štěpí PCR produkty na fragmenty v sekvenci 5'...G^ACGC... 3' nebo na druhém raménku DNA v sekvenci 3'...CGC^G ...5'.

Reagencie pro SNP C/T 13.910:

- Enzym: *HinfI* (10U/ µl), ThermoScientific
- Pufr: 10x Buffer R, ThermoScientific

Reagencie pro SNP G/A 22.018

- Enzym: *Hin6I* (10U/ µl), ThermoScientific
- Pufr: 10x Buffer Tango, ThermoScientific

Pracovní postup:

1. Restrikční štěpení PCR produktu pro SNP C/T 13.910 přidat 4,5 µl 10x Buffer R a 1,5 µl enzymu *HinfI*. Pro SNP G/A 22.018 přidat k PCR produktu 4,5 µl 10x Buffer Tango a 1,5 µl enzymu *Hin6I*.

2. Směs z vortexovat a stočit.
3. Směs vložit do předem vyhřátého inkubátoru nejméně na 1 hodinu při 37 °C.

4. Gelová elektroforéza

Kontrola rozštěpených amplifikačních produktů se provádí na 4% agarózovém gelu.

Reagencie:

- 1 x TBE pufr, připraven naředěním roztoku 10x TBE buffer
- Agaróza: Top Vision Agarose, thermoscientific
- Ethidium bromid: Ethidium bromide aqueous solution 1% w/v, SERVA
- 10x Loading Buffer
- 100 bp DNA Ladder equalized, Carl Roth GmbH + Co. + Co.KG Karlsruhe

Pracovní postup:

1. Připravit 4% agarózový gel:
 - 6 g agarózy + 150 ml 1 x TBE pufru, vzniklou směs povařit.
2. Směs ochladit pod tekoucí vodou na 70 °C.
3. Přidat 4 µl ethidium bromidu, dobře promíchat.
4. Připravenou směs vylít do formy na gel, vzniklé bubliny odstranit.
5. Gel nechat ztuhnout.
6. Vložit gel do elektroforetické vany s 0,5 x TBE puftrem.
7. Na gel nanést 20 µl PCR produktu.
8. Přidat 10 µl 100 bp DNA Ladderu.
9. Zapnout elektroforézu na 30 minut při napětí 70 V.
10. Po uplynutí 30 minut přenést gel na detekční systém, zkontrolovat výsledek pomocí UV světla a vyfotit. Pokud není možné odečíst výsledek, vrátit gel zpět do elektroforetické vany, kde ho nechat tak dlouho, dokud nepůjde výsledek dobře odečíst. Gel kontrolovat v intervalech přibližně 20 minut a průběžně fotit.

5. Vyhodnocení

SNP C/T13.910

Restrikční enzym *HinfI* štěpí PCR produkty, které mají velikosti 201 bp, v sekvenci G^AANTC na fragmenty specifických velikostí. Právě podle velikosti těchto fragmentů můžeme určit genotyp vyšetřovaného pacienta (Hubáček *et al*, 2017).

Na agarózovém gelu můžeme vidět:

- Jeden fragment, o velikosti 201 bp. Jedná o genotyp CC.
- Dva fragmenty, o velikosti 177 bp a 24 bp. Zde se jedná se o genotyp TT.
- Tři fragmenty, o velikosti 201 bp, 177 bp a 24 bp. Takový výsledek se označuje jako heterozygot a jedná se o genotyp CT (Hubáček *et al*, 2017).

SNP G/A 22.018

Enzym *Hin6I* štěpí amplifikační produkty o velikosti 271 bp, na specifické fragmenty v sekvenci G[^]CGC, podle jejich velikosti pak můžeme určit výsledný genotyp (Coelho *et al*, 2005).

Jsou možné 3 výsledky štěpení:

- Na gelu vidíme jeden fragment o velikosti 271 bp. V takovém případě se jedná o genotyp AA.
- Na gelu jsou viditelné dva fragmenty o velikostech 196 bp a 75 bp. V tomto případě můžeme tvrdit, že se jedná se o genotyp GG.
- Na gelu jsou patrné tři fragmenty o velikostech 271 bp, 196 bp a 75 bp. Takový výsledek se označuje jako heterozygot a jedná se tedy o genotyp GA (Coelho *et al*, 2005).

5. Výsledky

Pro tuto práci byl vyšetřen soubor 20 vzorků. Z tohoto souboru byly všechny vzorky vyšetřeny metodou reverzní hybridizace. Metodou PCR-RFLP bylo vyšetřeno pouze 8 vzorků, důvodem byl zejména nedostatek vyizolované DNA.

Vyšetřované vzorky byly získané stěrem buněk z bukální sliznice od dobrovolníků s podezřením na laktózovou intoleranci. DNA byla izolována komerčně dodávaným kitem. Výsledné koncentrace DNA testovaných vzorků jsou uvedeny v tabulce (tab. 5). Vzorky s nižší koncentrací byly zakoncentrovány pomocí vakuové odparky.

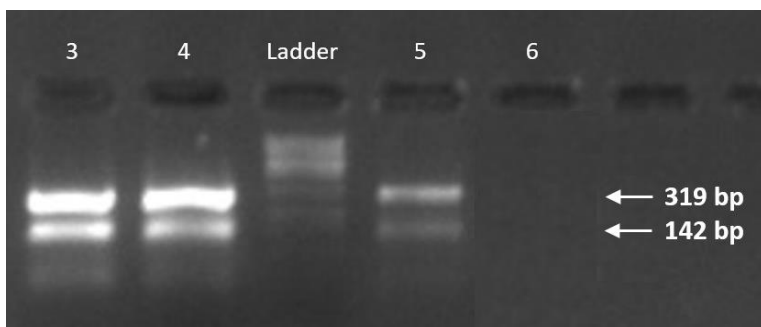
Tabulka 5: Koncentrace DNA testovaných vzorků uvedených v ng/μl.

Číslo vzorku	Koncentrace [ng/μl]	Číslo vzorku	Koncentrace [ng/μl]
1	230,9	11	19,6
2	585,6	12	21,7
3	39,8	13	19,1
4	41,7	14	27,3
5	40,6	15	44,3
6	24,8	16	16,2
7	72,9	17	87,6
8	27,1	18	117,3
9	30,6	19	51,2
10	54,1	20	87,8

5.1 Reverzní hybridizace na stripech

Gelová elektroforéza

Amplifikační produkty byly dle doporučení výrobce zkontrolovány pomocí gelové elektroforézy. Na 2,5% agarózový gel bylo naneseno 10 μl PCR produktů. Po dokončení gelové elektroforézy by měly být na gelu viditelné dva amplifikační produkty o velikostech 142 bp a 319 bp. Příklad výsledku kontroly amplifikačních produktů gelovou elektroforézou je znázorněn na obrázku (obr. 8).



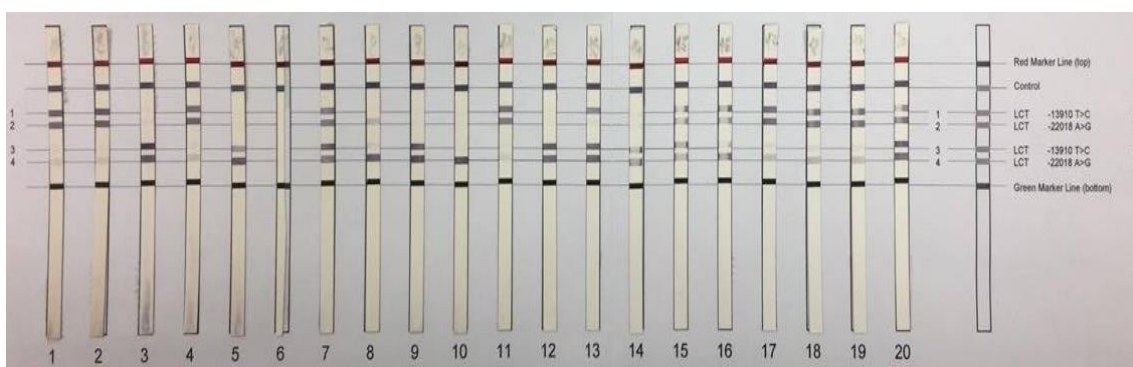
Obrázek 8: Kontrola PCR produktů získaných pomocí certifikovaného kitu CE IVD Strip Assay. U vzorků 3, 4 a 5 se podařilo amplifikovat oba požadované produkty o velikosti 142 bp a 319 bp. U vzorku 6 není patrný žádný produkt. Zdroj: vlastní.

Stanovení genotypů

Výsledný genotyp testovaného vzorku byl stanoven pomocí šablony, která byla součástí kitu.

Na testovacím stripu se může po dokončení reakce objevit maximálně 5 barevných proužků (obr. 9). Přičemž by se po každé provedené reakci měl na stripu objevit minimálně jeden barevný pruh v horní oblasti stripu, v tomto místě je umístěna pozitivní kontrola. Zbarvení této kontroly značí správnou funkci konjugátu a barvicího roztoku.

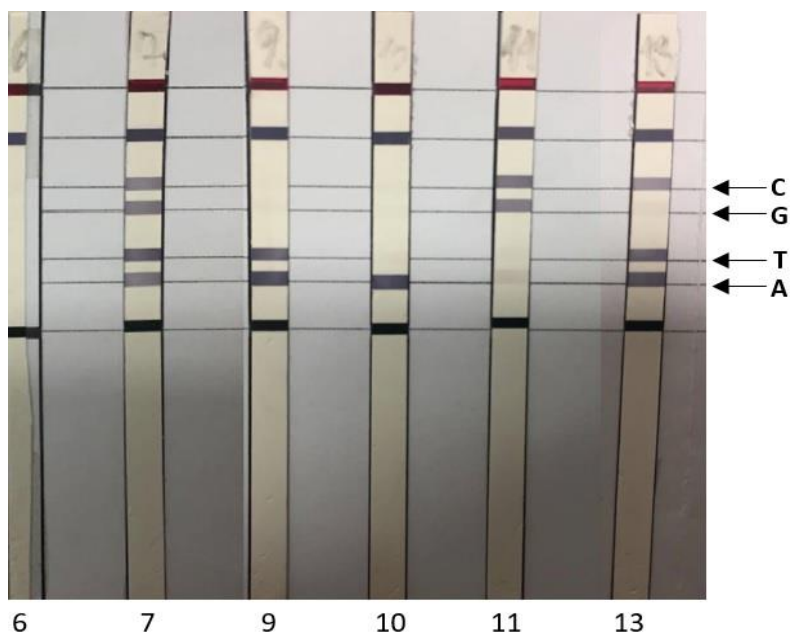
Pro každý polymorfismus jsou na testovacím stripu umístěny dva proužky, jeden v oblasti mutant, druhý v oblasti wild type. Na základě zbarvení těchto proužků se stanovuje výsledný genotyp. Intenzita zbarvení proužků se může lišit. Síla zbarvení nemá význam pro výsledek, důležitá je přítomnost signálu.



Obrázek 9: Výsledné testovací stripy po provedené reverzní hybridizaci. Zdroj: vlastní.

Jak již bylo řečeno, výsledkem reverzní hybridizace jsou fialové proužky na testovacích stripích. Pro každý polymorfismus musí být viditelný minimálně jeden proužek, a to buď

v oblasti mutant nebo v oblasti wild type. Některé možné výsledky jsou znázorněny na obrázku (obr. 10).



Obrázek 10: Porovnání možných výsledků reverzní hybridizace. U jednoho experimentu (strip č. 6) neproběhla hybridizace. Na strip č. 10 nebyl hybridizován jeden polymorfismus. U ostatních stripů (stripy č.: 7, 9, 11 a 13) proběhla hybridizace v pořádku. Zdroj: vlastní.

Polymorfismus C/T 13.910

Laktózová intolerance je v kavkazské populaci nejčastěji způsobena substitucí cytosinu (C) za thymin (T) na pozici 13.910, kde je alela C standardní a alela T mutantní. Výsledné genotypy testovaných vzorků jsou uvedeny v tabulce (tab. 6). U dvou experimentů nedošlo k hybridizaci.

Tabulka 6: Výsledné genotypy pro polymorfismus C/T 13.910 určené pomocí reverzní hybridizace na stripech.

Výsledek	Genotyp	Počet jedinců
Laktózová tolerance	T/T	6
Heterozygot	C/T	5
Laktózová intolerance	C/C	7

Polymorfismus G/A 22.018

Další mutace, která se v kavkazské populaci pojí s výskytem laktózové intolerance je mutace G/A 22.018, která je způsobena záměnou guaninu (G) za adenin (A) na pozici 22.018. Výsledné genotypy jsou uvedeny v tabulce (tab. 7). U jednoho experimentu nedošlo k hybridizaci.

Tabulka 7: Výsledné genotypy pro polymorfismus G/A 22.018 určené pomocí reverzní hybridizace na stripech.

Výsledek	Genotyp	Počet jedinců
Laktózová tolerance	A/A	7
Heterozygot	G/A	5
Laktózová intolerance	G/G	7

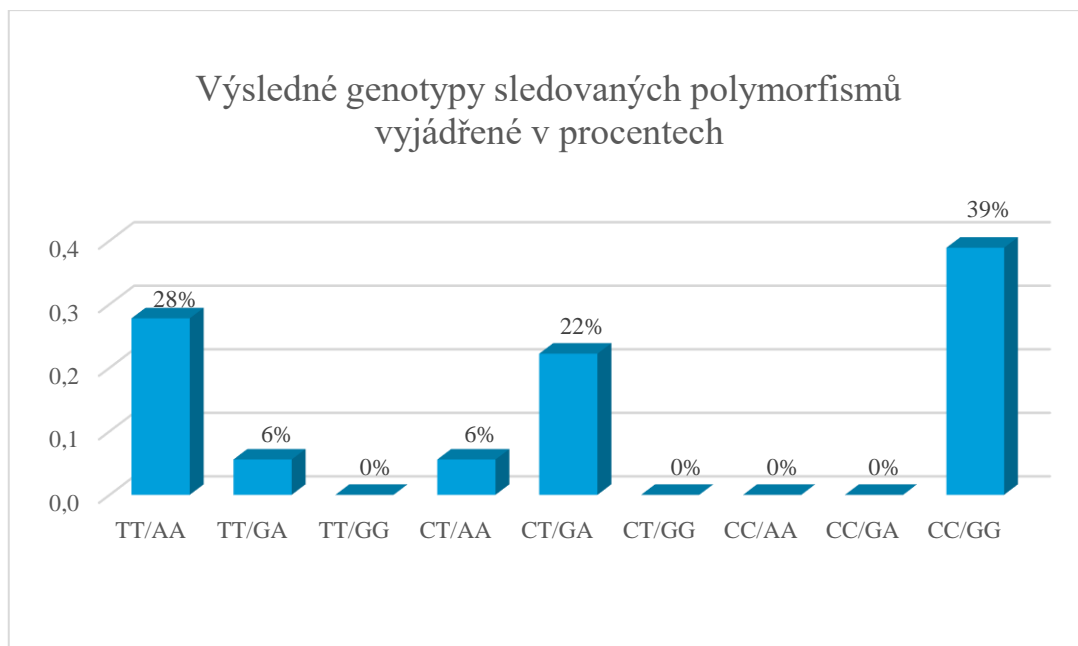
Výsledky reverzní hybridizace pro sledované polymorfismy – C/T 13.910 a G/A 22.018

Celkový přehled výsledků stanovených genotypů pomocí reverzní hybridizace je uveden v tabulce (tab. 8). Pro tuto práci byl vyšetřen soubor 20 vzorků, z toho u dvou experimentů nedošlo k hybridizaci.

Tabulka 8: Výsledné genotypy pro oba polymorfismy současně.

G/A C/T 13.910	AA	GA	GG
TT	5	1	0
CT	1	4	0
CC	0	0	7

V grafu (obr. 11) jsou uvedeny genotypové frekvence pro oba polymorfismy. Nejčastěji se vyskytujícím genotypem ve vyšetřovaném souboru je genotyp CC/GG, který se vyskytuje s frekvencí cca 39 %. Druhým nejčetnějším se vyskytujícím genotypem ve vyšetřovaném souboru je genotyp TT/AA, který se vyskytuje s frekvencí cca 28 %. Dalším častým genotypem je CT/GA, který se v testovaném souboru vyskytuje v 22 %. Genotypy TT/GA a CT/AA se ve vyšetřovaném souboru vyskytovaly v 6 %.



Obrázek 11: Výsledky reverzní hybridizace dvou sledovaných polymorfismů vyjádřené grafem. Zdroj: vlastní.

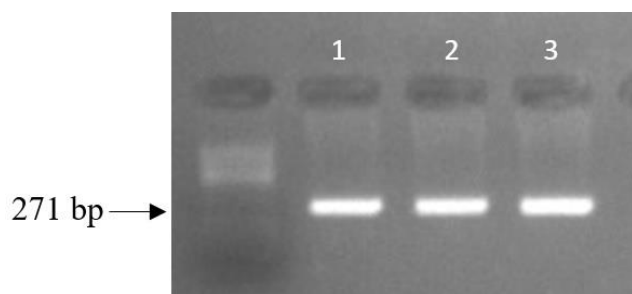
5.2 PCR-RFLP

Metodou PCR-RFPL bylo vyšetřeno celkem 8 vzorků. Před samotným započítím vyšetření testovaného souboru metodou PCR-RFLP bylo zapotřebí metodu zoptimalizovat, a to pro každý polymorfismus zvlášť. Pro optimalizaci metody byly použity tři referenční vzorky, které nebyly součástí vyšetřovaného souboru.

5.2.1 Polymorfismus G/A 22.018

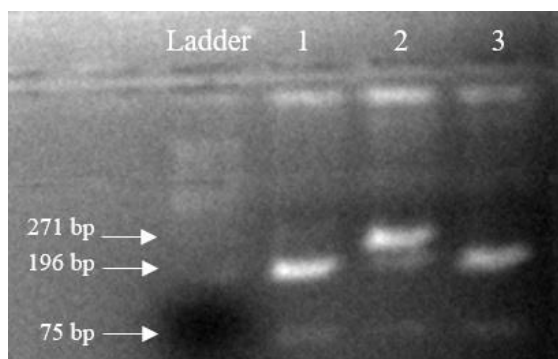
Optimalizace metody PCR-RFLP pro polymorfismus G/A 22.018

Po dokončení PCR reakce byly amplifikační produkty zkontrolovány na 2,5% agarózovém gelu (obr. 12). PCR produkty měly mít velikost 271 bp.



Obrázek 12: Kontrola PCR produktů na 2,5% agarózovém gelu. U všech vzorků vyšel požadovaný produkt o velikosti 271 bp. Zdroj: vlastní.

Po zkontrolování amplifikačních produktů následovalo restriční štěpení, jehož výsledek byl posléze ověřen pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu (obr. 13).

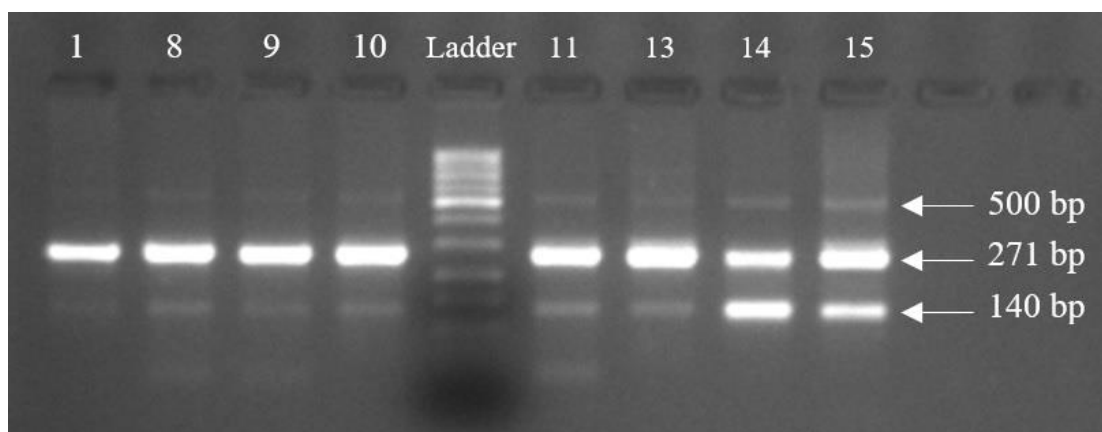


Obrázek 13: Kontrola restričního štěpení na 4% agarózovém gelu. U prvního a třetího vzorku vyšly dva produkty o velikosti 196 bp a 75 bp, což odpovídá genotypu GG. U druhého vzorku jsou na gelu patrné tři fragmenty o velikostech 271 bp, 196 bp a 75 bp, v tomto případě se jedná o genotyp GA. Zdroj: vlastní.

Vyšetření polymorfismu G/A 22.018 metodou PCR-RFLP

Po úspěšné optimalizaci metody, provedené na referenčních vzorcích, proběhlo samotné vyšetření testovaného souboru, který se skládal z 8 vzorků.

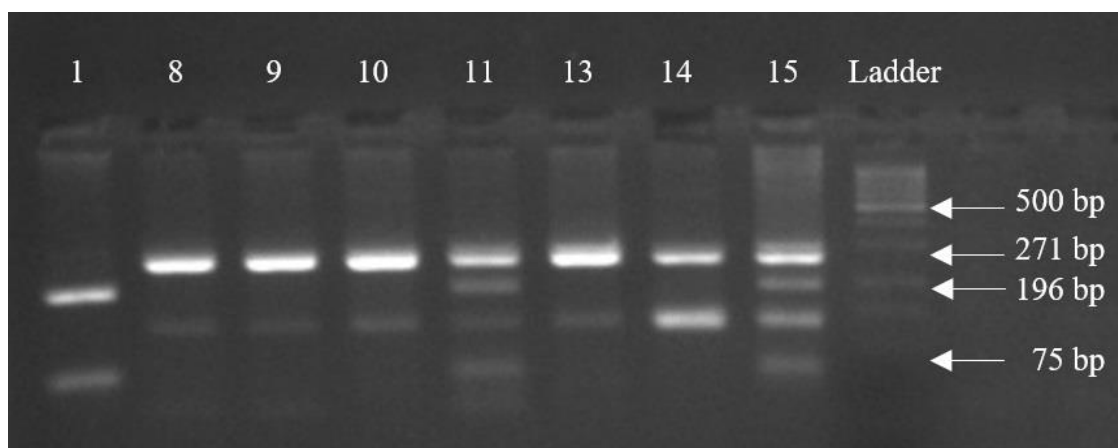
Amplifikační produkty byly zkontrolovány pomocí gelové elektroforézy (obr. 14).



Obrázek 14: Kontrola PCR produktů na 2,5% agarózovém gelu. Při amplifikační reakci došlo k nespecifickému nasednutí primerů a proto jsou na obrázku viditelné slabé nespecifické PCR produkty o velikostech cca 500 bp a 140 bp. Požadovaný PCR produkt o velikosti 271 bp je patrný u všech testovaných vzorků. Zdroj: vlastní.

Výsledek restričního štěpení byl zobrazen pomocí gelové elektroforézy (obr. 15).

Při kontrole PCR produktů před štěpením byly na gelu patrné nespecifické amplifikační produkty o velikostech 500 bp a 140 bp. Tyto nespecifické produkty byly viditelné i při kontrole restričního štěpení. I přes přítomnost těchto nespecifických amplifikačních produktů lze výsledek dobře odečíst.



Obrázek 15: Kontrola restričního štěpení na 4% agarózovém gelu. U prvního vzorku vyšly dva produkty restričního štěpení o velikostech 196 bp a 75 bp, výsledný genotyp tohoto vzorku je GG. U vzorků číslo 8, 9, 10, 13 a 14 je viditelný pouze jeden fragment o velikosti 271 bp, výsledný genotyp těchto vzorků je tedy AA. Vzorky 11 a 15 mají viditelné 3 požadované fragmenty restričního štěpení o velikostech 271 bp, 196 bp a 75 bp, výsledný genotyp je GA, jedná se tedy o heterozygoty. Zdroj: vlastní.

V následující tabulce (tab. 9) jsou uvedeny výsledky testovaného souboru metodou PCR-RFLP pro polymorfismus G/A 22.018.

Tabulka 9: Výsledné genotypy pro polymorfismus G/A 22.018 určené pomocí metody PCR-RFLP.

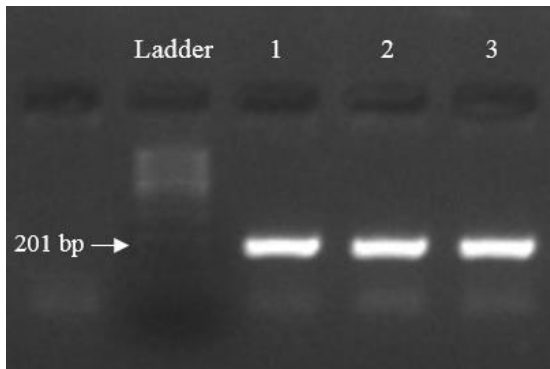
Výsledek	Genotyp	Počet jedinců
Laktózová tolerance	A/A	5
Heterozygot	G/A	2
Laktózová intolerance	G/G	1

5.2.2 Polymorfismus C/T 13.910

Optimalizace metody PCR-RFLP pro polymorfismus C/T 13.910

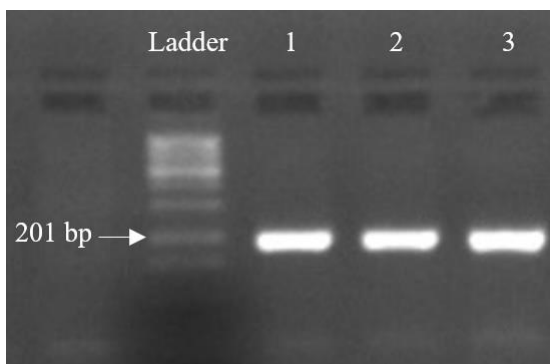
Po úspěšném vyšetření SNP G/A 22.018 musela být metoda PCR-RFLP zoptimalizována i pro polymorfismus C/T 13.910. Pro optimalizaci byly využity tři referenční vzorky se známým genotypem.

Na obrázku (obr. 16) je zobrazena kontrola PCR produktů, která byla provedena na 2,5% agarózovém gelu. Požadovaná velikost amplifikačních produktů je 201 bp.



Obrázek 16: Kontrola amplifikačních produktů. U všech vzorků vyšel požadovaný produkt o velikosti 201 bp. Zdroj: vlastní.

Po kontrole PCR produktů následovalo restriční štěpení. Výsledek štěpení byl ověřen pomocí gelové elektroforézy (obr. 17).



Obrázek 17: Kontrola restričního štěpení na 4% agarózovém gelu. Jelikož byla optimalizace prováděna s referenčními vzorky se známým genotypem, bylo předpokládáno, že se u druhého vzorku objeví tři fragmenty o velikostech 201 bp, 177 bp a 24 bp. U vzorků číslo 1 a 3 byl předpokládáný nálezn dvou fragmentů o velikostech 177 bp a 24 bp. Na obrázku je však patrné, že všechny vzorky mají velikost 201 bp, z čehož vyplývá, že nedošlo k rozštěpení na požadované fragmenty. Zdroj: vlastní.

Optimalizace metody PCR-RFLP pro SNP C/T 13.910 byla několikrát zopakována, a to i s různými vzorky, ale žádný z pokusů nepřinesl požadované výsledky. Po těchto neúspěšných pokusech bylo předpokládáno, že jedinou možnou příčinou tohoto problému by mohla být chyba v použitém enzymu *Hinf*I. Skrz tento předpoklad byl pokus znovu zopakován s použitím jiného enzymu *Hinf*I, který zapůjčila genetická laboratoř

GENLABS, s.r.o.. Bohužel ani s jiným, prokazatelně funkčním enzymem se nepodařilo získat požadované výsledky. Problém tudíž musel nastat ještě před samotným štěpením. Přesná příčina však nebyla z nedostatku času dohledána. Metodu se nepodařilo zoptimalizovat, proto nejsou k dispozici ani výsledky vyšetření SNP C/T 13.910 metodou PCR-RFLP.

5.3 Srovnání výsledků

V této části práce jsou uvedeny souhrnné tabulky zobrazující výsledky obou metod. V tabulce číslo 10 jsou zobrazeny výsledky z reverzní hybridizace na stripech (tab. 10).

Tabulka 10: Výsledky reverzní hybridizace pro oba polymorfismy.

Číslo vzorku	Výsledný genotyp	Číslo vzorku	Výsledný genotyp
1	CC/GG	11	CC/GG
2	CC/GG	12	TT/AA
3	TT/AA	13	CT/AA
4	CC/GG	14	TT/AA
5	TT/AA	15	CT/AG
6	...	16	CT/AG
7	CT/AG	17	CC/GG
8	TT/AG	18	CC/GG
9	TT/AA	19	CC/GG
10	.../AA	20	CT/AG

Jelikož se metodu PCR-RFLP podařilo zoptimalizovat pouze pro polymorfismus G/A 22.018 jsou v následující tabulce (tab. 11) uvedeny výsledky pouze tohoto SNP.

Tabulka 11: Výsledky PCR-RFLP pro SNP G/A 22.018.

Číslo vzorku	Výsledný genotyp	Číslo vzorku	Výsledný genotyp
1	GG	11	AG
8	AA	13	AA
9	AA	14	AA
10	AA	15	AG

Genetická laboratoř GENLABS, s.r.o. poskytla pro tuto práci sedm vzorků DNA od vybraných pacientů, tyto vzorky byly k dispozici i s výsledným genotypem (tab. 12).

Tabulka 12: Výsledky PCR-RFLP z referenční laboratoře GENLABS, s.r.o.

Číslo vzorku	Výsledný genotyp	Číslo vzorku	Výsledný genotyp
7	CC/AG	11	CC/AG
8	CT/AA	12	TT/AG
9	TT/AG	13	CT/AA
10	CT/AA		

6. Diskuse

V praktické části této práce byl vyšetřen soubor 20 vzorků, ze kterého byly všechny vzorky vyšetřeny metodou reverzní hybridizace. Metoda reverzní hybridizace na stripech byla provedena za použití komerčně dodávaného kitu od firmy ViennaLab. Osm vzorků z testovaného souboru bylo zároveň vyšetřeno metodou PCR-RFLP. Oběma použitými metodami byly zkoumány dva nejčastěji se vyskytující polymorfismy související v kavkazské populaci s laktózovou intolerancí.

Jak již bylo řečeno metodou reverzní hybridizace na stripech bylo vyšetřeno celkem 20 vzorků. Z testovaného souboru nedošlo u jednoho vzorku (vzorek č. 6) k hybridizaci na strip, důvodem byla s největší pravděpodobností nižší koncentrace DNA. U vzorku číslo 10 se z neznámého důvodu i při opakovaném pokusu hybridizoval na strip pouze SNP 22.018.

Po vyhodnocení výsledků reverzní hybridizace bylo zjištěno, že se v testovaném souboru nejčastěji vyskytoval homozygotní genotyp CC/GG, který tvoří genetický předpoklad pro intoleranci laktózy. Uvedený genotyp se ve vyšetřovaném souboru vyskytoval v 39 %. V ČR se vyskytuje homozygotní genotyp CC/GG cca u 25 % populace. Vyšší procento intolerantních jedinců zachycených v rámci praktické části této bakalářské práce vysvětluje fakt, že vyšetřovaný soubor tvořily zejména vzorky od pacientů s podezřením na hypolaktázii. Druhým nejčetnějším genotypem byl genotyp TT/AA, který se na rozdíl od předešlého CC/GG pojí s tolerancí laktózy. Ve vyšetřovaném souboru se genotyp TT/AA vyskytoval v 28 %. Heterozygotní genotyp CT/GA se v testovaném souboru vyskytoval ve 22 %. Jedinci nesoucí tento genotyp nemusí mít problémy s trávením laktózy, ale může se u nich laktózová intolerance rozvinout, například při dlouhodobém stresu.

Druhou použitou metodou vyšetření polymorfismů souvisejících s laktózovou intolerancí tvořila v rámci praktické části této práce metoda PCR-RFLP. Uvedenou metodu se bohužel pro polymorfismus C/T 13.910 nepodařilo ani po několika opakovaných pokusech zoptimalizovat. Proto jsou k dispozici pouze výsledky pro polymorfismus G/A 22.018.

První domněnkou, proč se nedařilo zoptimalizovat metodu PCR-RFLP pro SNP C/T 13.910 byl předpoklad chyby v použitém restričním enzymu *HinfI*. Tato domněnka však byla vyvrácena užitím jiného, prokazatelně funkčního enzymu *HinfI*. Problém proto

musel nastat ještě před samotným štěpením, s největší pravděpodobností nastala chyba v přípravě PCR reakčního mixu. PCR reakční směs byla připravována z komerčně dodávaného master mixu EmeraldAmp, primerů od firmy Generi biotech a PCR vody. Vzhledem k tomu, že byl k přípravě reakčního PCR mixu použit komerčně dodávaný master mix, bylo předpokládáno, že se v tomto master mixu mohly vyskytovat inhibitory restričního enzymu. Tento předpoklad byl však vyvrácen zopakováním pokusu s jiným master mixem, konkrétně se jednalo o PPP master mix. Abychom objasnili příčinu opakovaného selhávání pokusu, byl jeden vzorek osekvenován. Z nedostatku času však výsledek sekvenování nemohl být zařazen do této práce a ze stejného důvodu se bohužel nepodařilo metodu PCR-RFLP pro SNP C/T 13.910 zoptimalizovat.

I když nejsou k dispozici výsledky SNP C/T 13.910 můžeme alespoň porovnat výsledky polymorfismu G/A 22.018 získané jak metodou reverzní hybridizace, tak metodou PCR-RFLP. Výsledné genotypy jsou uvedeny v tabulkách 10 a 11.

Z tabulek je patrné, že u vzorků s čísly 8 a 11 je výsledný genotyp určen odlišně. U vzorku číslo 8 bohužel nebyla dohledána příčina rozdílných výsledků. U vzorku 11 jsou na testovacím stripu viditelné dva silně pozitivní proužky v první a druhé pozici, navíc je na stripu patrná velmi slabá pozitivita na čtvrté pozici (obr. 10.). Za normálních okolností by byla uvedená slabá, pozitivní reakce zanedbána a výsledný genotyp by byl určen jako CC/GG. Jelikož se jednalo o vzorek, který pro tuto práci poskytla genetická laboratoř GENLABS, s.r.o. byl k tomuto vzorku k dispozici i výsledný genotyp určený touto laboratoří pomocí metody PCR-RFLP. Výsledný genotyp však tým laboratoře GENLABS určil jako CC/AG, stejný výsledek byl určen i po zopakovaném pokusu. Výsledný genotyp SNP G/A 22.018 byl i v rámci praktické části této práce metodou PCR-RFLP určen jako AG.

Na základě uvedené neshody byl díky spolupráci s laboratoří GENLABS tento vzorek osekvenován. Výsledek sekvenace ukázal, že v lokusu 22.018 se opravdu vyskytovala homozygotní alela GG, výsledný genotyp byl tedy správně určen pomocí metody reverzní hybridizace.

Výsledek sekvenace také objasnil, proč metodou PCR-RFLP u testovaného vzorku číslo 11 opakovaně vycházel výsledný genotyp studovaného polymorfismu AG. Za tuto skutečnost je odpovědný sousední lokus 22.017, ve kterém se vyskytuje substituovaná heterozygotní alela CT. Právě skrz tuto záměnu zůstalo restriční místo zachováno, a

proto se výsledný genotyp jevil po restrikci jako AG. Díky této skutečnosti se také objevila slabá reakce na testovacím hybridizačním stripu, kdy hybridizace k sondě nebyla díky popisované záměně dokonalá.

V tabulce číslo 12 jsou uvedeny výsledné genotypy vzorků, které pro tuto práci poskytla genetická laboratoř GENLABS, s.r.o., tyto genotypy byly určeny pomocí metody PCR-RFLP. Výsledné genotypy z této laboratoře (tab. 12) můžeme porovnat s výsledky, které vznikly v rámci této bakalářské práce.

Po porovnání tabulek 10 a 12 je patrné, že výsledky se liší u pěti ze sedmi vzorků. Konkrétně se jedná o odlišnost ve vzorcích 7, 8, 9, 11 a 12. Důvod odlišnosti ve vzorku 11 je popsán výše. U vzorků 7 a 8 bohužel nebyla dohledána příčina neshodných výsledků. Vzorky 9 a 12 byly vyšetřeny třetí nezávislou metodou – sekvenováním. Výsledek sekvenace u obou vzorků ukázal, že výsledný genotyp byl správně určen pomocí metody reverzní hybridizace.

V neposlední řadě bych ráda srovnala časové a finanční náklady použitých metod a jejich rizika. V následujícím porovnání není zahrnuta ani u jedné z metod izolace DNA ani další pre-PCR procesy.

Výsledky vyšetření pomocí metody reverzní hybridizace jsou získány zhruba do 5 hodin po vložení vzorků do termocykleru, zatímco metodou PCR-RFLP získáme výsledky zhruba po 9 hodinách.

Po spočítání finančních nákladů obou metod bylo zjištěno, že vyšetření jednoho vzorku pomocí metody reverzní hybridizace vyjde dvakrát draž než za použití metody PCR-RFLP. Vyšetření jednoho vzorku metodou PCR-RFLP vychází zhruba na 420 korun, zatímco vyšetření stejného vzorku za použití reverzní hybridizace vyjde asi na 870 Kč.

Úskalí metody PCR-RFLP je zejména v odečítání výsledků. Ze zkoumaných polymorfismů je problematičtější odečtení výsledku u SNP C/T 13.910. Právě u uvedeného polymorfismu mají restrikční fragmenty velikosti 201 bp a 177 bp. Rozdíl mezi těmito fragmenty tvoří pouze 24 bp, takto malý rozdíl je mnohdy na agarózovém gelu nepatrný a často kvůli němu dochází k chybnému odečtení výsledku.

Nevýhodou reverzní hybridizace je nutnost použití vzorku DNA s optimální koncentrací.

Vzhledem k časové náročnosti by byla z popsaných metod jasnou volbou reverzní hybridizace. Na druhé straně z finančního hlediska vychází výhodněji metoda PCR-RFLP. Klíčovou roli by však při výběru metody měly hrát přesnost a správnost výsledků. Při posouzení faktorů přesnosti a správnosti vyzkoumaných dat vychází jako vhodnější metoda reverzní hybridizace.

7. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo sepsání odborné rešerše na téma možnosti testování laktóзовé intolerance. Experimentální část práce byla zaměřena na praktické zvládnutí dvou molekulárně biologických metod, které se využívají k detekci polymorfismů souvisejících s laktózovou intolerancí. V závěrečné diskusi je uvedeno srovnání použitých metod.

Stanovit diagnózu laktóзовé intolerance je možné více způsoby. Z výše popsaných možností se však jako nejlepší jeví právě genetické vyšetření. Mezi hlavní výhody tohoto typu vyšetření patří fakt, že je neinvazivní a na rozdíl od jiných druhů vyšetření nezpůsobuje příznaky intolerance laktózy. Další výhodou genetického testu je skutečnost, že se může provést v podstatě kdykoliv, a to i před nástupem prvotních příznaků.

Praktická část této práce je věnována vyšetření dvou polymorfismů (C/T 13.910 a G/A 22.018) souvisejících v kavkazské populaci s laktózovou intolerancí. Uvedené polymorfismy byly vyšetřeny dvěma metodami, konkrétně se jednalo o techniku reverzní hybridizace na stripech a metodu PCR-RFLP.

Jedním z cílů práce bylo srovnání použitých metod. Mezi výhody reverzní hybridizace na stripech bych zařadila skutečnost, že umožňuje vyšetření obou polymorfismů současně, což vede k úspoře času i práce. Nevýhoda uvedené metody tkví v nutnosti použití DNA zkoumaného vzorku s optimální koncentrací. S tímto problémem se při vyšetření studovaných polymorfismů, za použití metody PCR-RFLP nesetkáme. Na vyšetření pomocí této metody totiž stačí malé množství DNA vyšetřovaného vzorku. Nevýhoda metody PCR-RFLP spočívá v nutnosti provedení vlastní PCR reakce pro každý polymorfismus zvlášť. Kvůli této skutečnosti vzniká větší riziko chyby vzniklé záměnou vzorků. Další úskalí metody PCR-RFLP je v odečítání výsledků.

Na základě výsledků ověřených třetí nezávislou metodou mohu konstatovat, že stanovená hypotéza (Předpokládám, že metodou reverzní hybridizace půjde výsledný genotyp lépe určit než metodou PCR-RFLP.) byla potvrzena.

8. Seznam použitých zdrojů

1. AL-ABRI, A., BAYOUMI, R., 2013. The Phenotype/Genotype Correlation of Lactase Persistence among Omani Adults. *Oman Medical Journal*. **28**(5), 341-344. DOI: 10.5001/omj.2013.98. ISSN 1999768X.
2. AMIRI, M., DIEKMANN, L., KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M., NAIM, H. Y., 2015. The Diverse Forms of Lactose Intolerance and the Putative Linkage to Several Cancers. *Nutrients*. **7**(9), 7209–7230. DOI: 10.3390/nu7095332.
3. BERÁNEK, M. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
4. BROWN, T. A., 2007. *Klonování genů a analýza DNA*. V Olomouci. ISBN 978-80-244-1719-6.
5. COELHO, M., LUISELLI, D., BERTORELLE, G., LOPES, A. I., SEIXAS, S., DESTRO-BISOL, G., ROCHA, J., 2005. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. *Human Genetics*. **117**(4), 329-339. DOI: 10.1007/s00439-005-1322-z. ISSN 0340-6717. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-005-1322-z>
6. DENG, Y., MISSELWITZ B., DAI N., FOX M., 2015. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. *Nutrients*. **7**(9), 8020–8035. DOI: 10.3390/nu7095380.
7. DI RIENZO, T., G. D'ANGELO, F. D'AVERSA, M. C. CAMPANALE, CESARIO, M. MONTALTO, A. GASBARRINI a V. OJETTI, 2013. Lactose intolerance: from diagnosis to correct management. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. **17**(2), 18-25.
8. ENATTAH, N. S., SAHI, T., SAVILAHTI, E., TERWILLIGER, J. D., PELTONEN, L., JÄRVELÄ, I., 2002. Identifiacion of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature genetics*. **30**, 233-237. DOI: 10.1038/ng826.

9. ENATTAH, N. S., TRUDEAU, A., PIMENOFF, V., MAJURI, L., AURICCHIO, S., GRECO, L., ROSSI, M., LENTZE, M., SEO, J. K., RAHGOZAR, S., KHALIL, I., ALIFRANGIS, M., NATAH, S., GROOP, L., SHAAT, N., KOZLOV, A., VERSCHUBSKAVA, G., COMAS, D., BULAVEVA, K., MEHDI, S. Q., TERWILLIGER, J. D., SAHI, T., SAVILAHTI, E., PEROLA, M., SAJANTILA, A., JÄRVELÄ, I., PELTONEN, L., 2007. Evidence of Still-Ongoing Convergence Evolution of the Lactase Persistence T-13910 Alleles in Humans. *American Journal of Human Genetics*. 81(3), 615-625. DOI: 10.1086/520705.
10. FOJÍK, P., FALT, P., URBAN, O., NOVOSAD, P., RICHTEROVÁ, L., BÓDAY, A., 2013. Laktózová intolerancia. *Practicus*. 13(5), 7-12. ISSN 1213-8711.
11. FRIEDRICH, D. C., SANTOS, S. E. B., RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K. C., HUTZ, M. H., CRAWFORD, D. C., 2012. Several Different Lactase Persistence Associated Alleles and High Diversity of the Lactase Gene in the Admixed Brazilian Population. *PLoS ONE*. 7(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0046520. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0046520>.
12. FRITZSCHEOVÁ, D., 2015. *Intolerance laktózy*. Bratislava: Noxi, s.r.o. 128 s. ISBN 978-80-8111-259-1.
13. HUBÁČEK, J. A., ADÁMKOVÁ, V., ŠEDOVÁ, L., OLÍŠAROVÁ, V., ADÁMEK, V., TÓTHOVÁ, V., 2017. Frequency of adult type-associated lactase persistence LCT-13910C/T genotypes in the Czech/Slav and Czech Roma/Gypsy populations. *Genetics and Molecular Biology*. 40(2), 450-452. DOI: 10.1590/1678-4685-gmb-2016-0071. ISSN 1415-4757.
14. INGRAM, C. J. E., MULCARE, C. A., ITAN, Y., THOMAS, M. G., SWALLOW, D. M., 2009. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human Genetics*. 124(6), 579-591. DOI: 10.1007/s00439-008-0593-6.

15. KHABAROVA, Y., GRIGORYEVA, V., TUOMISTO, S., KARHUNEN, P. J., MATTILA, K., ISOKOSKI, M., 2012. High prevalence of lactase non-persistence among indigenous nomadic Nenets, north-west Russia. *International Journal of Circumpolar Health*. 71(1). DOI:10.3402/ijch.v71i0.17898.
16. KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z., 2002. *Molekulární genetika zvířat: (metody detekce polymorfizmů DNA genů)*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7616-6.
17. KOCNA, P., DVOŘÁK, M., 2010. Laboratorní diagnostika deficitu laktázy. Praha. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/biolaby/2010/5-Kocna.pdf>
18. KOCNA, P., 2006. Dechové testy: Moderní neinvazivní diagnostika. *Interní medicína*. 8(7), 336-341.
19. KUOKKANEN, M., ENATTAH, N. S., OKSANEN, A., SAVILAHTI, E., ORPANA, A., JÄRVELÄ, I., 2003. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut*. 52(5), 647-652.
20. KUOKKANEN, M., KOKKONEN, J., ENATTAH, N. S., YLISAUKKO-OJA, T., KOMU, H., VARILO, T., PELTONEN, L., SAVILAHTI, E., JÄRVELÄ I., 2006. Mutations in the Translated Region of the Lactase Gene (LCT) Underlie Congenital Lactase Deficiency. *American Journal of Human Genetics*. 78(2), 339-344. DOI: 10.1086/500053.
21. LAM, H-Y., VAN HOFFEN, E., MICHELSEN, A., GUIKERS, K., VAN DER TAS, C. H. W., BRUIJNZEEL-KOOMEN, C. H. F. M., KNULST, A. C., 2008. Cow's milk allergy is rare but severe: both casein and whey proteins are involved. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(6), 995-1002. ISSN: 0954-7894. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2008.02968.x.

22. LIEBERT, A., JONES, B. L., DANIELSEN, E. T., OLSEN, A. K., SWALLOW, D. M., TROESEN, J. T., 2016. In Vitro Functional Analyses of Infrequent Nucleotide Variants in the Lactase Enhancer Reveal Different Molecular Routes to Increased Lactase Promoter Activity and Lactase Persistence. *Annals of Human Genetics*. 80(6), 307-318. DOI: 10.1111/ahq.12167.
23. LOMER, M. C. E., PARKERS, G. C., SANDERSON, J. D., 2007. Lactose Intolerance in Clinical Practise – Myths and Realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 27 (2), 93-103. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2007.03557.
24. MAĐRY, E., FIDLER, E., WALKOWIAK, J., 2010. Lactose Intolerance – Current State of Knowledge. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 9(3), 343-350. ISSN 1889-9594.
25. MATTAR, R., VILLARES, C. A., DOS SANTOS, A. F., CARRILHO, F. J., DO SOCORRO, MONTEIRO M., 2008. Single nucleotide polymorphism C/T-13910, located upstream of the lactase gene, associated with adult-type hypolactasia: Validation for clinical practice. *Clinical Biochemistry*. 41(7-8), 628-630. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2008.01.006. ISSN 00099120. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912008000143>
26. MATÝŠKOVÁ, M., ČECH, Z., 2009. Warfarin a farmakogenetika. *Klinická biochemie a metabolismus*. 17(38), 215-219.
27. RASINPERÄ, H., SAVILAHTI, E., ENATTAH, N. S., KUOKKANEN, M., TÖTTERMAN, N., LINDAHL, H., JÄRVELÄ, I., KOLHO, K. L., 2004. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut*. 53(11), 1571-1576. DOI: 10.1136/gut.2004.040048.
28. RASMUSSEN, H. B., 2012. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. *Gel Electrophoresis: Principles and Basics*. MAGDELDIN, S., 2012. Rijeka, Croatia: InTech. ISBN 978-953-51-0458-2. Dostupné také z: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/35104.pdf>.

29. RUML, T., RUMLOVÁ, M., PAČES, V., 2002. *Genové inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0499-8.
30. SAHI, T., 2001. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia with emphasis on the situation in Europe. *Food & Nutrition Research*. DOI: 10.3402/fnr.v45i0.1799.
31. SCHAAFSMA G. (2008): Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5), 458-465. ISSN: 0958-6946.
32. SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J., RELICHOVÁ, J., ed., 2009. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2.
33. STRÁNSKÝ, M., RYŠAVÁ, L., 2014. *Fyziologie a patofyziologie dětské výživy*. 2., dopl. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zdravotně sociální fakulta. 182 s. ISBN 978-80-7394-241-0.
34. SVACHINA, Š., a kolektiv, 2010. *Poruchy metabolismu a výživy*. Praha: Galén. 505 s. ISBN 978-80-7262-676-2.
35. SWALLOW, D. M., 2003. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Review of Genetics*. 37, 197-219. DOI: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143820.
36. ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
37. USAI-SATTA, P., SCARPA M., OPPIA, F., CABRAS, F., 2012. Lactose malabsorption and intolerance: What should be the best clinical management? *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. 3(3), 29-33. DOI: 10.4292/wjgpt.v3.i3.29. ISSN 2150-5349. Dostupné také z: <http://www.wjgnet.com/2150-5349/full/v3/i3/29.htm>

38. WAUD, J. P., MATTHEWS, S. B., CAMPBELL, A. K., 2008. Measurement of breath hydrogen and methane, together with lactase genotype, defines the current best practice for investigation of lactose sensitivity. *Annals of Clinical Biochemistry*. 45(1), 50-58. DOI: 10.1258/acb.2007.007147.
39. ZIMA, T., 2007. *Laboratorní diagnostika*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. 906 s. ISBN 978-80-7262-372-3.

9. Seznam zkratek

A	adenosin
ABC	avidin-biotin complex
C	cytosin
DNA	deoxynukleotidová kyselina
G	guanin
<i>LCT</i>	gen pro laktázu
<i>MCM6</i>	<i>minichromosome maintenance complex component 6</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR-RFLP	polymerázová řetězová reakce - polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (jednonukleotidový polymorfismus)
T	thymin