



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Analýza genových polymorfismů v *MBL2* genu a její  
diagnostický význam**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Jana Pešková

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

České Budějovice 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Analýza genových polymorfismů v *MBL2* genu a její diagnostický význam 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 2. 6. 2020

Jana Pešková

### **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Dagmaře Riegert Bystřické, Ph.D. za její odborné vedení, za její ochotu i čas, který mi věnovala, a za poskytnutí cenných rad i zkušeností. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za jejich obrovskou podporu během studia.

# **Analýza genových polymorfismů v *MBL2* genu a její diagnostický význam**

## **Abstrakt**

Gen *MBL2* kóduje protein zvaný manózu vázající lektin, který je složkou imunitního systému. Protein se účastní nespecifické humorální imunitní odpovědi, opsonizuje patogenní mikroorganismy a zajišťuje aktivaci komplementu lektinovou cestou vedoucí k jejich eliminaci a zároveň k indukci zánětu. Deficitní hladiny MBL proteinu jsou široce zkoumány v souvislostech s opakovanými infekcemi, autoimunitními onemocněními i řadou dalších chorob.

Sérovou hladinu MBL proteinu ovlivňují polymorfismy v *MBL2* genu, které se nacházejí celkem ve třech kodonech označovaných jako 52, 54 a 57. Mutace v kodonu 52 se označuje jako alela D, pro kodon 54 jako alela B a pro kodon 57 jako alela C. Tyto mutované alely jsou často souhrnně označovány jako alely 0, wild type alela je značena písmenem A. Další polymorfismy se nacházejí v netranslatovaných oblastech. V promotoru 1 se nachází v pozici -550 (varianty H/L), druhý v pozici -221 (varianty X/Y) a jeden je lokalizován v oblasti netranslatovaného 5' konce regulačního lokusu v pozici +4 (varianty P/Q).

Praktickou část jsem vykonala v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích. Zaměřila jsem se na analýzu polymorfismů *MBL2* genu, které se nacházejí v exonu 1 (alely B, C, D). Vyšetřila jsem celkem 30 vzorků, z nichž 25 pocházelo od pacientů postižených demencí a 5 od pacientů bez známek demence. Analýza zahrnovala izolaci DNA, měření její koncentrace, přípravu a provedení metody PCR s následnou kontrolou produktů pomocí gelové elektroforézy. PCR produkty byly přečištěny a osekvenovány. Přesným popisem analýzy se zabývám v praktické části mé bakalářské práce, včetně přehledu získaných výsledků.

## **Klíčová slova**

Alzheimerova choroba; cystická fibróza; manózu vázající lektin; *MBL2* gen; PCR; polymorfismus; Sangerovo sekvenování

# **Analysis of gene polymorphisms in the *MBL2* gene and its diagnostic significance**

## **Abstract**

*MBL2* gene codes a protein called mannose binding lectin, a component of our immune system. This protein takes a part in a nonspecific humoral immune response, opsonizing pathogenic microorganisms and providing activation of the lectin pathway in the complement system, leading to elimination of pathogens and simultaneously inducing the inflammation. MBL deficiencies are widely researched in cases of recurrent infections, autoimmune diseases and others.

MBL-protein serum level is affected by polymorphisms in *MBL2* gene, located in three codones marked as '52', '54' and '57'. A mutation of the '52' codon is referred to as an allele D, for the '54' codon as an allele B and for the '57' codon as an allele C. In many cases the alleles might be referred to as the alleles zero (0), or as an 'A' in the case of wildtype alleles. Other polymorphisms are located in non-translated locations. The first one may be found in the promotor 1, in a position -550 (variants H/L); the second one in a position -221 (variants X/Y); and the third one in a non-translated 5'-end-part of a locus in a position +4 (variants P/Q).

The practical part of this bachelor thesis was executed in the genetic lab in the company GENLABS s.r.o., České Budějovice. I focused on the analysis of *MBL2* polymorphisms located in exon 1 (alleles B, C, D). I examined 30 patient samples, 25 of them were provided by patients with ongoing dementia and 5 of the samples were taken from patients with no signs of dementia. The protocol of the analysis consisted of an isolation of DNA, a measurement of DNA concentration, a preparation and an execution of a PCR method followed by a control of the products in a gel electrophoresis. These PCR products were then purified and sequenced. A precise description of the analysis including an overview of the obtained results are summed in the practical part of this bachelor thesis.

## **Key words**

Alzheimer's disease; cystic fibrosis; mannose-binding lectin; *MBL2* gene; PCR; polymorphisms; Sanger sequencing

# Obsah

<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Gen <i>MBL2</i></b> .....	<b>10</b>
1.1 Organizace lidského <i>MBL2</i> genu .....	10
1.2 Regulace exprese MBL.....	11
<b>2. Manózu vázající lektin</b> .....	<b>12</b>
2.1 Struktura MBL proteinu .....	12
2.2 Funkce MBL proteinu.....	13
2.3 Komplement a aktivace komplementu lektinovou cestou .....	13
2.4 Deficit MBL proteinu.....	15
<b>3. Polymorfismus v <i>MBL2</i> genu</b> .....	<b>16</b>
3.1 Polymorfismy <i>MBL2</i> genu v oblasti promotoru a exonu 1 .....	16
3.2 Haplotypy <i>MBL2</i> genu.....	17
3.3 Vliv polymorfismu na hladinu MBL v séru.....	18
3.4 Haplotypy a sérové koncentrace MBL napříč populacemi.....	18
<b>4. Diagnostický význam MBL</b> .....	<b>21</b>
4.1 Cystická fibróza.....	21
4.1.1 <i>Asociace MBL2 s cystickou fibrózou</i> .....	23
4.2 Vulvovaginální dyskomfort .....	25
4.2.1 <i>Asociace MBL2 s vulvovaginálním dyskomfortem</i> .....	26
4.3 Demence .....	27
4.3.1 <i>Alzheimerova choroba</i> .....	27
4.3.1.1 <i>Asociace MBL2 s Alzheimerovou chorobou</i> .....	29
4.3.2 <i>Vaskulární demence</i> .....	30
4.3.2.1 <i>Role MBL2 při mozkové ischemii</i> .....	31
<b>5. Laboratorní vyšetření polymorfismu <i>MBL2</i></b> .....	<b>32</b>
5.1 Odběr materiálu pro analýzu DNA .....	32
5.1.1 <i>Odběr periferní krve</i> .....	32
5.1.2 <i>Bukální stěr</i> .....	32
5.2 Izolace a purifikace DNA .....	33
5.2.1 <i>Lýza buněk</i> .....	33
5.2.2 <i>Fenol-chloroformová metoda</i> .....	34
5.2.3 <i>Metoda adsorpce nukleových kyselin na silikátový povrch</i> .....	34
5.3 Stanovení koncentrace DNA .....	34

5.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	35
5.4.1	<i>Princip metody PCR</i>	35
5.4.2	<i>Průběh PCR reakce</i>	36
5.5	Elektroforéza	38
5.5.1	<i>Gelová elektroforéza</i>	39
5.5.1.1	<i>Agarózový a polyakrylamidový gel</i>	39
5.5.1.2	<i>Aplikace vzorku na gel a provedení separace</i>	39
5.5.1.3	<i>Vizualizace NK v elektroforetickém gelu</i>	40
5.6	Sekvenování DNA	40
5.6.1	<i>Sangerovo sekvenování</i>	41
5.6.2	<i>Přístup moderního sekvenování</i>	42
<b>6.</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>Praktická část</b>	<b>45</b>
7.1	Popis souboru	45
7.2	Izolace DNA	45
7.2.1	<i>Izolace DNA z bukalního stěru</i>	46
7.2.1.1	<i>Pracovní postup</i>	46
7.2.2	<i>Izolace DNA z periferní krve</i>	47
7.2.2.1	<i>Pracovní postup</i>	47
7.3	Měření koncentrace	48
7.3.1	<i>Pracovní postup</i>	49
7.4	PCR reakce	50
7.5	Gelová elektroforéza	52
7.5.1	<i>Příprava gelu</i>	52
7.5.2	<i>Aplikace vzorků na gel a jejich detekce</i>	53
7.6	Sekvenování	54
7.6.1	<i>Přečištění PCR produktů pomocí Gene All® Expin™ PCR SV kit</i>	54
7.6.1.1	<i>Pracovní postup</i>	55
7.6.2	<i>Přečištění PCR produktu pomocí ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup</i>	56
7.6.2.1	<i>Pracovní postup</i>	56
7.6.3	<i>Příprava vzorků pro sekvenaci</i>	57
7.6.4	<i>Vyhodnocení sekvencí</i>	57
7.6.4.1	<i>Vyhodnocení kodonu 52</i>	58
7.6.4.2	<i>Vyhodnocení kodonu 54</i>	58
7.6.4.3	<i>Vyhodnocení kodonu 57</i>	59

7.6.4.4	<i>Změna v oblasti forward primeru</i> .....	59
<b>8.</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>61</b>
<b>9.</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>66</b>
	<b>Závěr</b> .....	<b>70</b>
	<b>Seznam použitých zdrojů</b> .....	<b>72</b>
	<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>80</b>
	<b>Seznam tabulek</b> .....	<b>81</b>
	<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>82</b>



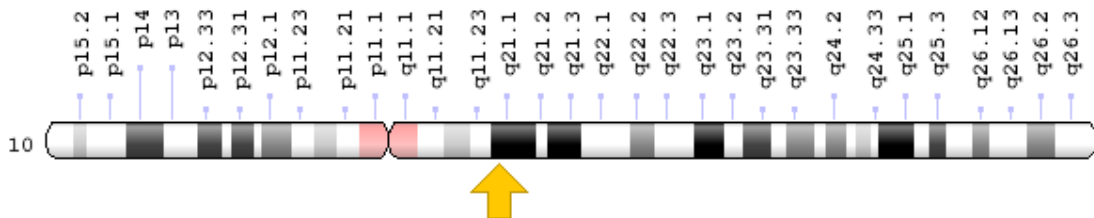
## Úvod

Gen *MBL2* kóduje protein zvaný manózu vázající lektin. Tento protein je složkou imunitního systému a uplatňuje se v nespecifické humorální imunitní odpovědi. Podílí se tak při obraně organismu proti některým patogenům z říše bakterií, hub (plísně, kvasinky) i virů. Protein tyto patogeny dokáže opsonizovat a následně aktivovat komplement lektinovou cestou, který vede k jejich eliminaci a zároveň i k indukci zánětu.

Sérové hladiny MBL jsou asociované s bodovými mutacemi *MBL2* genu, které se vyskytují na úrovni exonu 1 a v některých netranslatovaných oblastech. Deficitní hladiny jsou široce zkoumány v souvislostech s opakovanými infekcemi, autoimunitními onemocněními i řadou dalších chorob. Mnoho osob nesoucí deficit MBL však nevykazuje žádné zdravotní potíže, neboť organismus je schopný tuto nedostatečnost většinou kompenzovat jinými imunitními mechanismy. Existuje tak mnoho studií s rozdílnými názory a závěry o vlivu mutací *MBL2* genu na sérové hladiny proteinu i významu těchto variant v asociaci s nejrůznějšími chorobnými stavy.

## 1. Gen *MBL2*

Lidský gen *MBL2* kóduje tzv. manózu vázající lektin (MBL, mannose-binding lectin). Tento protein patří do skupiny plazmatických kolektinů a uplatňuje se ve vrozeném imunitním systému. Gen je lokalizován na chromosomu 10 (Vávrová et al., 2006), konkrétně v lokusu 10q11.2-q21 (obr. 1) (Garred et al., 2006). Objeven byl i pseudogen *MBL1*, který se u lidí značí jako *MBL1PI*. *MBL1PI* a *MBL2* geny se nacházejí na chromosomu 10 v těsné blízkosti. Bylo zjištěno, že v séru opice makak rhesus se vyskytují proteiny obou analogů, kdežto u lidí se vyskytuje pouze protein *MBL2* (Garred et al., 2006).



**Obrázek 1:** Lokalizace *MBL2* genu na 10. chromosomu. Zdroj: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MBL2#location>

### 1.1 Organizace lidského *MBL2* genu

Kódující oblast *MBL2* genu se skládá ze čtyř exonů (obr. 2) a třech intronů rozdělující exony v oblastech 600, 1350 a 800 bp (Taylor et al., 1989). Exon 1 tvoří domény bohaté na cystein a sedm opakujících se sekvencí ve tvaru Glycine-X-Y, kde X zastupuje jakoukoliv aminokyselinu a Y označuje nejčastěji hydroxyprolin nebo hydroxylysin (Palaniyar et al., 2004). Tyto opakující se části jsou typické pro trojitě šroubovice kolagenových struktur. V exonu 2 se nachází glycin-glutaminové duplexy, které pokračují dalšími dvanácti opakujícími se Glycine-X-Y kopiemi. Exon 3 kóduje alfa-helikální hydrofobní neck region a poslední exon 4 kóduje doménu rozpoznávající a vázající se na sacharidy (carbohydrate-recognition domain; CRD) (Garred et al., 2006). Přibližně 1 kb před exonem 1 se nachází alternativní exon označovaný jako exon 0 (Naito et al., 1999). Tento exon sice není translatován do proteinu, ale přibližně 10-15% transkripce může být iniciovaná právě v tomto úseku. Většina proteinů produkovaných v játrech je však iniciovaná v exonu 1 (Seyfarth et al., 2006).



**Obrázek 2:** Schéma organizace lidského *MBL2* genu. Zdroj: Garred et al. (2006)

## 1.2 Regulace exprese MBL

MBL je protein akutní fáze imunitní reakce a hraje roli v počátcích imunitní odpovědi. Promotor genu pro MBL obsahuje prvky reagující na teplo, stresové proteiny a glukokortikoidy charakteristické pro akutní fázi. Promotor nese i sekvenci o 20 bp, která je vysoce homologní promotorovému úseku genu kódujícího amyloid. Z tohoto zjištění vyplývá i jeho možná cytokinová regulace. (Babovic-Vuksanovic et al., 1999).

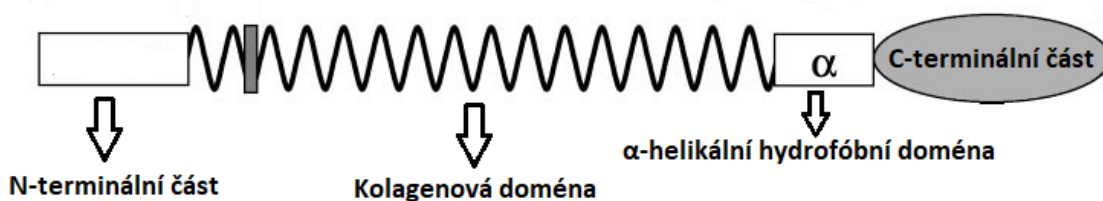
Hladiny MBL v séru se zvyšují časně při infekcích a stoupají v průběhu prvních minut až hodin před nastoupením humorální imunitní odpovědi. Expresi MBL indukují také operace nebo traumata (Babovic-Vuksanovic et al., 1999).

## 2. Manózu vázající lektin

Lektin vázající manózu je sérový protein produkovaný jaterními buňkami. Účastní se humorální nespecifické imunity a zajišťuje opsonizaci některých bakterií, plísní a virů. Jeho účinek spočívá ve vazbě MBL proteinu na povrch těchto částic, které jsou bohaté na manóзовé zbytky a tím aktivuje komplement tzv. lektinovou cestou (Bartůňková et al., 2007).

### 2.1 Struktura MBL proteinu

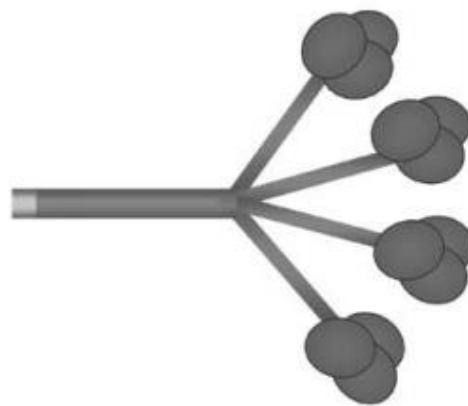
Struktura MBL proteinu odpovídá komplexu trojitě šroubovice, ve které každý z polypeptidových řetězců je složen ze čtyř domén (obr. 3). Jednu z nich tvoří 21 aminokyselin bohatých na cystein v N-terminální oblasti, která se podílí na oligomeraci proteinu a také vytváří disulfidové vazby uvnitř a mezi podjednotkami. Další doménu představuje 59 aminokyselinová kolagenová doména skládající se z 20 tandemových opakování Glycin-X-Y (kromě opakování 8, které sestává pouze z glycin-glutamin), jež tvoří dlouhý stonek molekuly. Třetí doménu tvoří 30 aminokyselinová  $\alpha$ -helikální, hydrofobní coil-coil neck doména, která má rozhodující vliv na oligomerizaci. Poslední doménu tvoří 188 C-terminálních aminokyselin rozpoznávajících uhlovodíky (Garred et al., 2006).



**Obrázek 3:** Schéma struktury lidského MBL proteinu. Zdroj: vlastní

Výsledný MBL protein je tvořen oligomery, z nichž každý má tři identické polypeptidové řetězce o 32 kDa. Za neredukujících podmínek existují dvě hlavní oligomerní formy. Tyto formy migrují během SDS-PAGE separace (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného) jako pruhy se zdánlivou molekulovou hmotností kolem 250 kDa, zatímco nejnižší pozorovaný pruh má molekulovou hmotnost odpovídající 50 kDa. Na základě vypočtené

aminokyselinové sekvence by však molekulová hmotnost měla být cca 25 kDa, což potvrzuje i molekulová hmotnost lidského MBL polypeptidu zjištěná hmotnostní spektrometrií pohybující se v rozmezí 25,3–25,5 kDa. MBL je tvořen z více trojitých helixů polypeptidové řetězce o velikosti 25 kDa vytvářející komplexní struktury různých typů oligomerů. MBL tedy představuje komplexní směs oligomerů, ve které hlavní část MBL v séru zastupují trimery a tetramery složené z podjednotek (obr. 4). Každou podjednotku představuje komplex polypeptidových řetězců uspořádaných do trojité šroubovice. Možný je i výskyt nižších (dimery) a vyšších oligomerních forem (pentamery a hexamery) (Garred et al., 2006).



**Obrázek 4:** Tetramer MBL proteinu složený z podjednotek. Zdroj: Garred et al. (2006)

## 2.2 Funkce MBL proteinu

MBL protein je schopen rozpoznávat sacharidové složky prezentované na povrchu různých patogenů. Patogeny jsou tímto proteinem opsonizovány, což usnadňuje jejich následné pohlcení fagocyty (Jack et al., 2001). Po vazbě molekuly MBL na povrch mikroorganismu, nesoucí na svém povrchu sacharidovou složku, se aktivuje jedna ze tří cest komplementové kaskády (lektinová cesta). Výsledkem tohoto sledu dějů je eliminace atakovaného mikroorganismu a indukce zánětu (Jílek, 2014).

## 2.3 Komplement a aktivace komplementu lektinovou cestou

Komplement, v odborné literatuře označovaný zkratkou C, je významnou součástí přirozené humorální imunity a také je jednou ze složek uplatňujících se při zánětu. Jeho hlavní rolí je likvidace nežádoucích buněk prostřednictvím jejich lýzy. Komplement je

tvořen soustavou bílkovin, které se postupně aktivují do podoby aktivních enzymů působících kaskádovitě na další složky komplementu (Jílek, 2014).

Hlavní složku komplementu představuje 9 sérových proteinů značených C1-C9. Tyto složky se postupně aktivují a vzniklé meziprodukty mají významné biologické funkce jako je opsonizace (složka C3b) a chemotaxe (složky C3a a C5a). Terminálním produktem kaskády je membránu atakující komplex MAC (membrane attack complex), který tvoří komplex C5b, C6, C7, C8 a C9 proteinů. Díky němu dochází k perforaci membrány buněk mikrobů, lyzuje je a tím také usmrcuje (Hořejší et al., 2013). Složky komplementu cirkulují krví v neaktivní formě do té doby, než se neseťkají s imunokomplexem či patogenním mikroorganismem. Aktivace komplementu může proběhnout třemi různými cestami podle způsobu, jakým dojde k rozštěpení C3 složky na C3a a C3b fragmenty. Rozlišujeme cestu klasickou, alternativní a lektinovou (Ferenčík et al., 2005).

Při klasické cestě zahajuje aktivaci C1 složka (složená z podjednotek C1q, C1r a C1s), která se váže na komplex antigenu (Ag) a protilátky (Ab). Vazbou dojde ke konformačním změnám a složky nabydou proteolytické aktivity. C1 následně štěpí další komponenty komplementu na fragmenty, kdy jeden nabývá proteolytických vlastností a druhý nese odlišnou biologickou aktivitu (Jílek et al., 2014). Tímto způsobem se rozštěpí prvních 5 složek komplementu C1 až C5. C5b fragment se následně váže na povrch buňky a k němu se navazují složky C6-C8 a několik molekul C9. Takto vzniklý MAC komplex působí na cílovou buňku cytotoxicky (Ferenčík et al., 2005).

Při aktivaci pomocí lektinů jsou přeskočeny některé první složky komplementu. Uplatňují se zde zmíněné lektiny, což jsou glykoproteiny, které jsou schopné specificky rozpoznávat a následně se vázat na sacharidové struktury na povrchu buněk (Ferenčík et al., 2005). Tato cesta probíhá i bez komplexu Ab-Ag, neboť účastníci se proteiny, jako je MBL, jsou strukturou podobné C1q. Po vazbě aktivují složky C1r a C1s a děj následně probíhá podobně jako cestou klasickou (Jílek et al., 2014). Aktivace vyžaduje přítomnost proteázy MASPs (MBL associated serine proteases) (Schwaeble et al., 2002). Aktivovaná forma proteázy MASP-2 štěpí C4 a C2 složky komplementu za vzniku komplexu C4b2a. Tento komplex působí na C3 konvertázu (Super et al.,

1989). Vzniklý enzym štěpí C3 na fragmenty C3a a C3b. Fragment C3b slouží jako opsonin, který se zachycuje na povrchu aktivního komplexu pomocí kovalentních vazeb, zatímco C3a má chemotaktické účinky pro fagocyty (Hořejší et al., 2013).

## **2.4 Deficit MBL proteinu**

MBL je přirozeně se vyskytující složkou séra a podílí se na odstraňování některých mikroorganismů nebo i alergenů. Osoby nesoucí mutaci v homozygotním stavu mohou být náchylnější k alergickým i autoimunitním reakcím (Bartůňková et al., 2007). Tento deficit je definován nedetekovatelnou hladinou MBL v séru. U homozygotů je hladina MBL v séru méně než 1 % vůči normální koncentraci. U heterozygotů se pohybuje hladina kolem 10 % normálu (Summerfield, 2003). Deficit MBL je spojován také s některými opakujícími se infekcemi, především týkající se respiračního systému, abscesů a sepsí (Rashidi et al., 2006). Existují také asociace s neinfekčními chorobami, jako je cystická fibróza, revmatoidní artritida, systémový lupus a další (Gupta et al., 2008). Mnoho lidí s abnormální hladinou MBL však nevykazují žádné klinické projevy (Minchinton et al., 2002). Funkci MBL jsou totiž schopny zastoupit jiné mechanismy imunitního systému. Snížená hladina MBL proto není sama o sobě zodpovědná za klinické příznaky. K manifestaci dochází často až v kombinaci s jinými poruchami imunity (např. deficit podtříd IgG) (Bartůňková et al., 2007).

Asociace deficitu MBL s některými onemocněními budou podrobněji probrány v kapitole 4.

### 3. Polymorfismus v *MBL2* genu

Genový polymorfismus je označení pro odchylku DNA mezi jedinci až populacemi v témže úseku, který se může projevit i jako fenotypový rozdíl. Důvodem může být mutace jednoho nukleotidu, opakující se sekvence v mikrosatelitech či jiné inzerce a delece (Kuciel, Urban, 2016). Aby byla varianta v dané oblasti DNA označovaná jako polymorfismus, musí se v populaci vyskytovat u více než 1 % populace. V opačném případě se jedná o vzácné varianty a mutace (Nussbaum et al., 2004).

Vznik polymorfismu je procesem náhodným nebo podmíněným vnějšími faktory. Změny v nukleotidech mohou být detekovány na úrovni proteinu, jehož variabilita je přímo úměrná polymorfismu DNA. Přesto díky degeneraci genetického kódu nemusejí být všechny odchylky pozorovatelné. Zároveň se polymorfismus může vyskytovat kdekoli v genomu, tedy i v nekódujících oblastech (Kuciel, Urban, 2016).

SNP (single nucleotide polymorphisms) je označení pro jednonukleotidové polymorfismy vzniklé mutací v rámci jediného nukleotidu v konkrétním lokusu. Tento typ tvoří 90–95 % variabilit DNA, kdy většina se soustřeďuje v nekódujících částech genomu. K fenotypovému projevu dochází tehdy, pokud se SNP nachází v kódujícím úseku a mění smysl genetického kódu pro AK, nebo pokud se vyskytuje v promotoru, intronech a jiných regulačních nekódujících oblastech genu (Kuciel, Urban, 2016).

#### 3.1 Polymorfismy *MBL2* genu v oblasti promotoru a exonu 1

Variace *MBL2* genu vznikají díky bodovým mutacím v exonu 1 a mají vliv na oligomerizační vlastnosti MBL v rámci kolagenové domény. Tyto polymorfismy se nacházejí celkem ve třech kodonech, tj. v kodonech 52, 54 a 57. Mutace v kodonu 52 spočívá v nahrazení C za T a označuje se jako alela D. Mutovaný kodon 54 je značen jako alela B, kde G nahrazuje A. Ke stejné výměně dochází i v kodonu 57 a tato záměna je označována jako alela C. Tyto mutované alely jsou často souhrnně označovány jako alely 0, zatímco wild type alela je značena písmenem A (Hammad et al., 2018). Výsledkem těchto bodových mutací jsou záměny aminokyselin (AK) v konečném řetězci proteinu. Arginin je změněn na cystein v kodonu 52, glycin za kyselinu asparagovou v kodonu 54 a glycin za kyselinu glutamovou v kodonu 57 (tab. 1). Tyto



jednonukleotidové polymorfismy narušují kolagenovou doménu MBL molekuly (Ramasawmy et al., 2008).

**Tabulka 1:** Přehled polymorfismů *MBL2* genu v exonu 1

Kodon	Nukleotidová změna	Změna výsledné AK	Alela
52	C > T	Arg > Cys	D
54	G > A	Gly > Asp	B
57	G > A	Gly > Glu	C

Zdroj: vlastní

Homozygotnost či vícečetná heterozygotnost pro jakoukoliv z těchto mutací je asociovaná s deficitem MBL proteinu (Ramasawmy et al., 2008; Stengaard-Pedersen et al., 2003).

Další dva polymorfismy se nacházejí v promotoru 1. Jeden se nachází v pozici -550 (zde se jedná o varianty H/L) a druhý v pozici -221 (varianty X/Y). V obou případech je nahrazen G za C (tab. 2) (Garred et al., 2006).

V oblasti exonu 1 se nachází kromě alel 0 ještě další polymorfismus. Ten je však lokalizován v oblasti netranslatovaného 5' konce v pozici +4 (varianty P/Q). Jedná se o mutaci v regulačním lokusu (tab. 2) (Casanova, Abel, 2004).

**Tabulka 2:** Přehled polymorfismů *MBL2* genu vyskytujících se mimo exon 1

Pozice	Nukleotidová změna	Alela
promotor (-550)	G > C	H > L
promotor (-221)	G > C	X > Y
netranslatovaný 5' konec (4+)	C > T	P > Q

Zdroj: vlastní

### 3.2 Haplotypy *MBL2* genu

Haplotyp je označení pro 2 a více genových variant, které se na chromozomu vyskytují v takové blízkosti, že u nich nedochází k výměně genetických úseků procesem crossing-overu. Takové geny jsou spolu v pevné vazbě a dědí se společně. (Kuciel, Urban, 2016).

Na základě SNP variant přítomných v genu *MBL2* rozlišujeme v lidské populaci sedm různých haplotypů: HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, HYPD, LYQC a LYPB. Frekvence

těchto haplotypů se výrazně liší napříč populacemi a reflektuje historii lidské migrace a selektivní environmentální tlaky působící na lidský genom (Casanova, Abel, 2004).

### **3.3 Vliv polymorfismu na hladinu MBL v séru**

Hladina MBL v séru u zdravých jedinců je velmi variabilní. Pohybuje se od 0,05 µg/ml (nebo nižší) do více než 5 µg/ml, a to hlavně v závislosti na genotypu (Soltani et al., 2014).

Sérové hladiny mohou také vykazovat rozdíly závislé na věku, kdy nejnižší úroveň MBL se nacházejí u novorozenců a jejich hladina během prvních týdnů života narůstá k hodnotám odpovídajícím dospělým osobám (Babovic-Vuksanovic et al., 1999). Studie Ip et al. (2004) se zaměřila nejen na závislost rozdílů koncentrací mezi věkovými kategoriemi, ale i v závislosti na pohlaví. Ve studii zjistili, že od dětství se v průběhu života hladina MBL proteinů udržuje poměrně ve stálých hodnotách a pohlaví jejich koncentraci neovlivňuje.

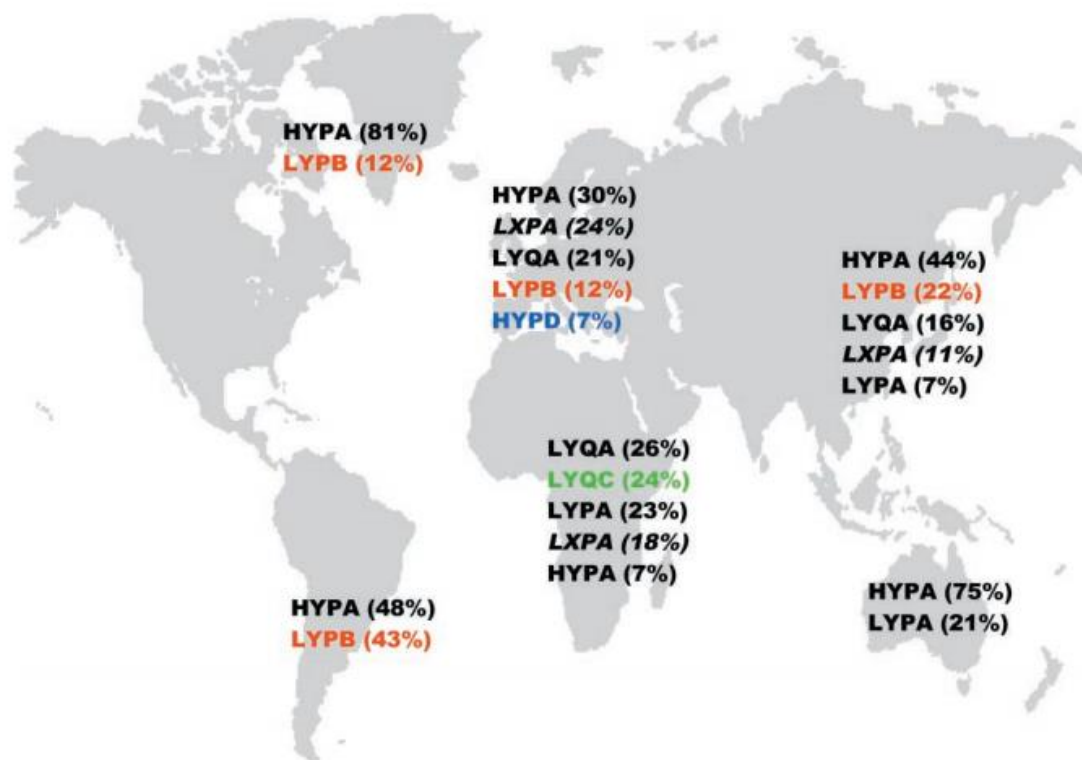
Osoby homozygotní pro alelu A mívají větší sérovou koncentraci MBL než jedinci nesoucí některou z nulových alel (Ramasawmy et al., 2008; Cedzyński et al., 2018; Babovic-Vuksanovic et al., 1999). Hladinu MBL v séru však kromě toho ovlivňují i mutace na úrovni promotoru a strukturní polymorfismy, takže výše popsané mutace nemusí být pro jeho množství rozhodující (Lee et al., 2005; Garred et al., 2006; Cedzyński et al., 2018).

Zdá se tedy, že pro každý genotyp je pozorovatelná obrovská variabilita v koncentracích. Například někteří jedinci s běžným haplotypem HYPA/HYPA vykazovali sérovou koncentraci proteinu odpovídající jedincům s genotypem 0/0 (tj. B/B, C/C, D/D). Tyto poznatky potvrzují myšlenku, že zde hrají roli i další genetické faktory (Swierzko et al., 2009).

### **3.4 Haplotypy a sérové koncentrace MBL napříč populacemi**

Je známo, že zastoupení haplotypů napříč populacemi se značně liší a reflektuje historii migrace lidstva a selektivní tlak na lidský genom. Důkazem je například haplotyp LYPB, který se migrací rozšířil z asijské populace do evropské a z té následně i do americké. LYPB chybí v domorodé populaci Austrálie stejně jako LYQC (známé

u subsaharských Afričanů) a HYPD (vyskytující se u Kavkazanů). Haplotypy spojené s defektní mutací ve strukturní (HYPD, LYQC a LYPB) nebo regulační (LXPA) oblasti genu jsou po celém světě ve výsledku velmi časté a frekvenčně přesahují 30 % v mnoha oblastech. (Casanova et al., 2004) Zastoupení haplotypů ve světě znázorňuje obr. 5.



**Obrázek 5:** Přehled zastoupení haplotypů *MBL2* genu ve světě. Zdroj: Casanova et al. (2004)

Z obr. 5 je vidět, že zastoupení alel A převažuje nad 0 alelami. To potvrzuje i studie Swierzko et al. (2009) genotypizující polské novorozence, která zjistila zastoupení genotypu A/A jako většinové. Vyskytovalo se u 60,6 %, do skupiny A/0 spadalo 35,4 % a skupina 0/0 byla zastoupena pouze 4 %. Toto rozložení koreluje i s některými studii kavkazských populací. V této studii však objevili několik jedinců s haplotypem LYPD, který je považován za vzácný. Tento haplotyp byl zachycen i v Česku a mezi Brazilci s českým původem. Haplotyp by tak mohl být omezen v rámci populace slovanského původu. Výskyt tohoto vzácného haplotypu LYD u české populace zachytila i studie Skalníková et al. (2004), kde zastoupení tohoto haplotypu činilo 1,1 %.

Zajímavou studii poskytl Sandoval et al. (2014). Sandoval genotypizoval domorodé obyvatele na území Jižní Ameriky v oblasti Peru a Ekvádoru. Analýza ukázala, že defektní haplotyp LYPB, projevující se nižšími sérovými hladiny proteinu, byl velmi častý v oblasti jezera Titicaca. Autor ve srovnání s jinými studii předpokládá, že zastoupení této defektní alely B v jihoamerické populaci se objevuje ve vysokých frekvencích.

Garred et al. (2006) popisuje, že vysoké frekvence genotypů spojených s nižšími hladinami MBL vedou k otázce, zda tyto hladiny v některých populacích na světě nevznikly v závislosti na selektivních tlacích, a nevedou tak k větší šanci jejich nositelů na přežití. Znamenalo by to, že tyto alely nesou pro takové jedince určité relativní výhody podobně jako srpkovitá anémie u obyvatelů subsaharské Afriky. Objevují se dvě hypotézy, které by mohly vysvětlovat přínos deficitu MBL. První naznačuje, že nízké úrovně aktivního MBL by snížily možné škodlivé důsledky v rámci aktivace komplementu a následného uvolňování zánětlivých mediátorů, které by mohly vést k poškození tkáně. Druhá hypotéza naznačuje, že MBL může přispívat ke zvýšenému vychytávání a virulenci určitých intracelulárních mikrobů, zatímco nízké hladiny MBL by měly efekt ochranný (Garred et al., 2006).

K této teorii se vyjadřuje i Sandoval et al. (2014), který provedl studii na již zmíněných domorodých obyvatelích v Jižní Americe, ve které bylo zaznamenáno významné zastoupení alely B. Autor k problematice přistupuje v souvislosti s historickými událostmi probíhajícími na jihoamerickém kontinentu spojených s početními změnami původních obyvatel. Výsledky studie se spíše přiklání k tzv. bottle effectu, který nastává při prudkém poklesu obyvatel, se kterým nutně dochází i k poklesu genetické diverzity. Autor přesto nevyklučuje, že na genotypovém zastoupení se mohly podílet i faktory způsobené selekcí proti specifickým patogenům zavlečených nově na území během španělské invaze (Sandoval et al., 2014).

## 4. Diagnostický význam MBL

Deficit MBL se klasifikuje jako běžně se vyskytující imunitní porucha, která postihuje asi 30 % lidské populace. Klinický dopad tohoto deficitu je spojován s řadou onemocnění (Heitzeneder et al., 2012).

Deficit MBL proteinu je asociován s výskytem těžkých a opakujících se infekcí a neprospíváním v dětství. V některých případech toto riziko přetrvává i celoživotně. Riziko je především spojováno s infekcemi bakteriálního nebo plísňového charakteru, ale ukazují se i souvislosti s virovou hepatitidou typu B (HBV) a lidským imunodeficitním virem (HIV). (Babovic-Vuksanovic et al., 1999).

MBL deficit funguje jako modulační faktor nejen infekčních, ale i autoimunitních onemocnění. Například určitý deficit MBL byl často nacházen u pacientů se systémovým lupusem erythematodes nebo u pacientů s horší prognózou revmatoidní artritidy. Nedostatek MBL byl pozorován také u plicních komplikací pacientů s cystickou fibrózou. Existují také studie zabývající se MBL v rámci opakovaných potratů a těžkou aterosklerózou (Janda et al., 2005).

Studie ukazují, že význam nízkých nebo vysokých hladin MBL je velmi rozporupný a je těžké předpovědět, zda bude MBL v důsledku jiných hladin škodlivé, prospěšné, nebo nebude hrát žádnou roli (Heitzeneder et al., 2012).

### 4.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) patří mezi onemocnění s autozomálně recesivní dominancí. Onemocnění se manifestuje dysfunkcí žláz s vnější i vnitřní sekrecí, tvorbou abnormálně hustého hlenu v dýchacím, trávicím a rozmnožovacím ústrojí a vysokou koncentrací elektrolytu v potu. Dysfunkce vede k chronickému onemocnění plic, insuficiencí exokrinní funkce pankreatu, onemocnění jater a gastrointestinálního traktu (Kolek et al., 2011). U 98 % mužů se objevuje neplodnost, přestože nevykazují hormonální změny. Neplodnost je způsobena slepě končícím nadvarletem a absencí jeho vývodu (Dítě et al., 2007). CF podmiňuje mutace v genu označovaném jako *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který je lokalizován na 7. chromozómu v pozici 7q31.3. Gen kóduje protein zvaný transmembránový regulátor

vodivosti (Vávrová et al., 2006). Protein *CFTR* genu se podílí na transportu solí přes buněčnou membránu, který funguje jako chloridový kanál, který je aktivován cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP). Jeho dysfunkce vede k neschopnosti adekvátní absorpce NaCl potními žlázami. V ostatních orgánech dochází k hyperabsorpci sodných iontů a sekundárně i vody natriovým kanálem v epitelích, čímž vzniká abnormálně vazký hlen. Za normálních podmínek *CFTR* funkci tohoto kanálu tlumí. (Kolek et al., 2011). *CFTR* gen se objevuje také pod označením *ABCC7* dle skupiny ABC transportérů, do které byl zařazen. Tato proteinová nadrodina zodpovídá za transport některých malých molekul, jako jsou chloridové ionty, ATP, disacharidy aj. (Vávrová et al., 2006).

CF patří mezi nejčastější vrozená dědičná onemocnění, která se většinou projevují v prvním roce života opakovanými infekcemi dýchacího ústrojí, neprospíváním a potem s vysokým obsahem soli (Vávrová et al., 2009). Častý výskyt onemocnění je hlavně problémem bílé rasy, u nichž přibližně na 2 500-3 500 živě narozených dětí připadá jedno dítě s CF. Zároveň se odhaduje, že přenašečem onemocnění je každý 25. až 30. jedinec (Musil et al., 2007).

Jak již bylo zmíněno, onemocnění postihuje dýchací soustavu a míra postižení určuje průběh i prognózu nemoci. Onemocnění plic patří mezi nejzávažnější projevy CF, které postihuje všechny nemocné a zodpovídá za 90 % úmrtí (Dítě et al., 2007). Respirační potíže spočívají v tvorbě hustého hlenu, jehož odstranění je obtížné a hromadí se tak na sliznicích. Sliznice dýchacích cest ztrácí schopnost samočištění pomocí řasinek, které hlen omezuje v pohybu. Dochází zde k snadnému usazení bakterií, které vedou k infekci a rozvoji zánětu. Také obrana imunitního systému není dostatečná, protože nedochází ke správnému rozpoznání bakterií, které se v hlenu shlukují. Imunitní reakce může naopak stav zhoršovat tím, že místo bakterií poškodí stěny dýchacích cest, a může přispívat k další tvorbě hlenu (Vávrová et al., 2009). Hustý abnormální hlen, vzniklý poruchou transportu iontů, vyvolává záněty i v nepřítomnosti infekce a je problémem nejen sliznice v dýchacích cestách, ale i všech ostatních orgánech vystlaných epitelem (Musil et al., 2007).

Pro pacienty s CF je typická kolonizace respiračního traktu mukoidním typem *Pseudomonas aeruginosa*. Tato bakterie se navazuje na povrchy buněk, kde dlouhodobě

přetrvává a způsobuje chronické bronchiální infekce. V zánětlivých procesech se z cytokinů uplatňuje hlavně interleukin 8 a přísun neutrofilů, z nichž jsou po reakci s bakteriemi následně uvolněny proteázy a kyslíkové radikály poškozující tkáň (Musil et al., 2007). Přesto se *Pseudomonas aeruginosa* řadí mezi oportunní patogeny a pro zdravé jedince není nebezpečná. V dospělém věku trpí chronickou infekcí až 80 % pacientů s CF. Prevalence infekce stoupá s věkem, přesto průměrný záchyt je už mezi 21. až 23 měsícem života (Vávrová et al., 2006). Mezi další významné patogeny patří *Staphylococcus aureus*, včetně jeho methicilin rezistentní verze označované jako MRSA, *Haemophilus influenzae* a některé virové infekce jako jsou chřipky A a B, rhinoviry, adenoviry a parainfluenza (Vávrová et al., 2009).

Jak již bylo zmíněno, CF nepostihuje pouze epitelie dýchacího traktu, ale i výstelku jiných soustav jako je třeba úzce související gastrointestinální trakt. Patrnou bývá maldigesce a snížená hmotnost, která je podložena menší chutí k jídlu a špatným trávením. Takový jedinec se následně i hůře vyrovnává s infekcemi dýchacích soustav. Gastrointestinální trakt může být postižen na různých úrovních. V oblasti jícnu jde zejména o gastroezofageální reflux, způsobený vrácením žaludečního obsahu do jícnu, které vyvolává pálení žáhy zejména při úporném kašli. Časté jsou i bolesti břicha, které jsou vyvolané mnoha příčinami (plynatost, ucpání střeva) (Vávrová et al., 2009). U více než 90 % pacientů se vyskytuje exokrinní insuficience pankreatu, kdy vývodné cesty dilatují v závislosti na obstrukci vazkým sekretem s následným rozvojem fibrózy pankreatu (Muntau, 2014). V oblasti střev způsobuje problémy například mekoniový ileus neboli náhlá příhoda břišní vzniklá ucpáním dolní části tenkého střeva v důsledku nevylovení spolknuté plodové vody před narozením. Ucpání může proběhnout i v pozdějším věku označované jako distální intestinální obstrukční syndrom z důvodů nedostatečného příjmu tekutin nebo konzumace stravy bohaté na nestravitelné zbytky. Porušeny mohou být i játra nebo žlučové cesty, mohou se objevovat žlučové kameny nebo jaterní cirhózy (Vávrová et al., 2009).

#### **4.1.1 Asociace MBL2 s cystickou fibrózou**

Diagnostika polymorfismů v *MBL2* genu doposud nehraje významnou roli při diagnostice závažnosti CF, neboť neexistuje dostatečné množství důkazů a výzkumů, které by se v závěrech shodovaly. Přesto se lze setkat s názory, že změny hladin MBL proteinu ovlivňují u pacientů s CF závažnost onemocnění plic a jater.

Prokázalo se, že MBL se váže na patogeny, které jsou významné pro CF, jako jsou *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Haemophilus influenzae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Zásadní význam u infekcí dýchacích cest se přisuzuje rodu *Pseudomonas*, přesto je toto tvrzení stále nejasné (Prentice et al., 2016). Například studie Haerynck et al. (2012) zkoumala vztah několika genů účastnících se komplementové dráhy aktivované lektinovou cestou v souvislosti s časným nástupem chronické infekce způsobené kolonizací *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s CF. Haerynck et al. (2012) uvádí, že u pacientů nesoucích deficit MBL nastoupila kolonizace dýchacích cest bakteriální infekcí v časnějším věku. Stejně tak se projevovaly i genotypy s Y alelou kombinované s některou z nulových alel v homozygotním či heterozygotním stavu, X alely v kombinaci s wild typem v homozygotním stavu, nebo smíšené genetické kombinace Y0/XA a YA/XA (Haerynck et al., 2012).

Velmi zajímavým poznatkem je, že i u sourozenců trpící CF se vyskytují odlišné klinické projevy. Tímto tématem se zabývala studie Wilk et al. (2020), která provedla sekvenaci genomu tří bratrů, kteří byli nositeli stejného genotypu pro *CFTR* gen. Přesto se počátky i závažnost plicních onemocnění bratrů během dětství lišily. Na základě zjištěných rozdílů v genomu všech bratrů byla vytvořena hypotéza, která variabilitu plicních onemocnění u CF přisuzuje genetickým modifikátorům anebo farmakogenomickým faktorům. Bylo zjištěno celkem pět genů, které by mohly mít souvislost s odlišnými fenotypovými projevy u sourozenců. Mezi tyto modifikátory byl vedle genů *EPHX1*, *HFE*, *PLG*, *SEPRINE1* vybrán také gen *MBL2* (Wilk et al., 2020).

Nositelem varianty D *MBL2* genu spojované s deficitem hladiny MBL byl nejstarší a nejmladší z bratrů. U nejstaršího bratra byla zároveň ve 12 letech prokázána kolonizace *Pseudomonas aeruginosa*. Prostřední bratr, který nebyl nositelem deficitu MBL, byl na *Pseudomonas* negativní až do svých 16 let. U nejmladšího z bratrů, ač je nositelem varianty pro deficit MBL, se kolonizace *Pseudomonas* neprokázala ani v jeho současném věku 26ti let (údaj vztažený k roku 2020) (Wilk et al., 2020).

K představě MBL jako modifikátoru průběhu CF se přiklání i studie Gravina et al. (2015), která se zabývala genotypy *MBL2* genu dětských argentinských pacientů s CF. Ze 106 pacientů byly nositeli A/0 genotypu 36,5 % a genotypu 0/0 9,3 %. V oblasti promotoru mělo 27,6 % pacientů genotyp Y/X a 2 % X/X. U 66 pacientů byl stanoven



klinický fenotyp závažnosti, z nichž 27 pacientů mělo MBL insuficienci. MBL deficit byl významně zastoupen u pacientů se závažnějším projevem onemocnění (62 %) a na základě těchto výsledků byl asociován s 3,5 násobným rizikem pro horší průběh onemocnění CF. Stejně tak bylo zjištěno, že u takto MBL deficitních pacientů byl pozorován nižší věk při průkazu *P. aeruginosa*, než u pacientů s normálními hladinami MBL (Gravina et al., 2015).

Na druhou stranu existuje studie Tarova et al. (2012) provedená na slovenských pacientech s CF, která provedla genetickou analýzu *MBL2* genu 91 pacientů s CF a 100 zdravých jedinců. Tato studie však neprokázala spojitost mezi genotypy *MBL2* a sníženou plicní funkcí či s dřívějším nástupem infekce *P. aeruginosa* ani *Burkholderia cepacia*. U 34 pacientů byla provedena i analýza MBL hladiny v séru. Významná byla spojitost sérových hladin s polymorfismy v exonu 1. *MBL2* přesto stále představuje fenomén v asociaci s plicními funkcemi CF. Pro pochopení genetických i environmentálních faktorů je důležité provést další studie, které by zahrnovaly větší skupinu pacientů, a která by se zaměřila na více genetických faktorů včetně analýzy celého genomu (Tarova et al., 2012).

#### **4.2 Vulvovaginální dyskomfort**

Vulvovaginální dyskomfort (VVD) je definován jako pocit nepohodlí v genitální oblasti, které ženy vnímají subjektivně, a je doprovázeno variabilním klinickým obrazem. Dyskomfort může být akutní, dlouhodobý nebo opakovaný. Tyto potíže jsou způsobeny nejčastěji mikrobiálním původem, ale význam mohou mít i jiné nemikrobiální faktory (alergické nebo chemické reakce). VVD se projevuje nejčastěji pálením, svěděním či výtokem. Tyto problémy jsou jednou z nejčastějších příčin návštěv gynekologických ambulancí a není výjimkou, že pocíťovaný druh dyskomfortu pacientek se často opakuje (Špaček et al., 2013). Mezi hlavní činitele způsobující VVD u žen v reprodukčním věku patří bakteriální vaginóza, vulvovaginální kandidóza a trichomoniáza. Pokud není dyskomfort léčen, může vést nejen k ovlivnění reprodukčního zdraví pacientek, ale také ke vzniku mnoha chorobných stavů i těhotenských komplikací (Kalia et al., 2019).

Jedním z majoritních faktorů vyvolávající VVD jsou kvasinky, z nichž nejvýznamnější roli hraje *Candida albicans*. *C. albicans* spadá do skupiny nepohlavně se

rozmnožujících kvasinek, která dokáže přežít ve velmi širokém rozmezí pH (2 až 8) v aerobních i anaerobních podmínkách. K získání energie využívá jednoduché cukry, jako jsou glukóza, sacharóza a galaktóza. Tato kvasinka je běžným komenzálním mikroorganismem vyskytujícím se na kůži i sliznicích zdravých jedinců, přesto patří mezi etiologicky nejčastější vyvolavače oportunních houbových infekcí člověka s imunosupresí či výskytem jiného závažného onemocnění. V případě VVD však nelze jednoznačně určit predispoziční faktor (Špaček et al., 2013).

#### **4.2.1 Asociace *MBL2* s vulvovaginálním dyskomfortem**

*C. albicans* se považuje za součást přirozené mikroflóry, kterou imunitní systém toleruje. Přesto však může dojít ke stavu, kdy imunitní systém zahájí imunitní odpověď, která se může manifestovat jako vulvovaginální kandidóza (VVK) s charakterem opakující se infekce u predisponovaných pacientek. Rekurentní vulvovaginální kandidózy (RVVK) nelze pravděpodobně vysvětlit v souvislosti s vyskytujícím se imunodeficitem, ale spíše s genetickou predispozicí přehnané reakce na nadlimitní přítomnost kvasinek. Vrozené podmínění k RVVK představuje mimo jiné polymorfni gen *MBL2*. Exprimovaný lektin je považován za detektor mikroorganismů obsahujících manózu, kterými jsou právě kvasinky. Zdravé ženy s alelami A (wild type) mají ve vaginálním sekretu nízkou koncentraci MBL, která mnohonásobně vzrůstá při VVK. Ženy trpící RVVK ani při kandidóze nedisponují žádnou koncentrací MBL formy wild type, ale mají nízké koncentrace mutované formy MBL. Ženy s RVVK byly často nositelkami alel A/B a nejčastější výskyt dyskomfortů byl nalezen u žen homozygotních pro alelu B (Špaček et al., 2013). Kromě genetických predispozic mají význam i další navrhované rizikové faktory pro RVVK, jako je nadměrné užívání antibiotik, antikoncepčních preparátů, sexuální aktivita nebo hygienické návyky (Gonçalves et al., 2016).

Asociaci RVVK s *MBL2* genem podporuje několik dalších studií. Jednou z nich je studie Wojtani et al. (2012), která analyzovala polymorfismus pro kodon 54 (alelu B) u 100 brazilských žen s RVVK a u 100 zdravých žen tvořících kontrolní skupinu. Alela B byla spojena s nižšími hladinami MBL v séru. Mutace v kodonu 54 byla potvrzena u 12 % žen s RVVK, kdežto v kontrolní skupině tento genotyp zastupoval pouze 1 % žen. K obdobnému závěru došla i studie Hammad et al. (2018), která také analyzovala výskyt alel B u žen trpících RVVK. Studie říká, že riziko RVVC bylo 3krát vyšší u žen

nesoucích variantní alely B, a shoduje se na tom, že je u plodných žen rizikovým faktorem pro RVVK. Studie Ghazanfari et al. (2017) na rozdíl od jiných studií uvádí, že v jejich výsledcích ženy s RVVK disponovaly na rozdíl od kontrolní skupiny významně vyššími hladinami MBL v séru. Studie tvrdí, že fenotypové hladiny v séru jsou ovlivněny i faktory prostředí a jinými genetickými změnami, a že genotypový profil MBL genu neodráží přesné fenotypové hladiny v séru. Tato studie se zabývala pouze měřením sérových hladin MBL proteinu pomocí ELISA a neuvádí tak genotypy analyzovaných vzorků pro kodony 52, 54 a 57 (Ghazanfari et al., 2017).

### **4.3 Demence**

Demence je pojem pro syndrom vzniklý v důsledku onemocnění mozku, které má chronický či progresivní charakter. Vyznačuje se poruchou vyšších korových funkcí, zahrnující paměť, myšlení, učení, orientaci a řeč, ale také kontrolu emocí a sociálního chování. Demenci tedy lze také definovat jako získanou poruchu kognitivních funkcí, která svou závažností ovlivňuje další funkce organismu i život pacienta (Pidrman, 2007). Nejčastěji se vyskytuje u starších osob, není však vyloučena přítomnost v jakémkoliv věku (Seidl, 2015). Demenci lze dělit na primární a sekundární. Mezi primární demence se řadí neurodegenerativní demence jako důsledek onemocnění jako je Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc či Huntingtonova choroba. Mezi sekundární demence patří ischemicko-vaskulární demence a jiné demence sekundárně vzniklé v rámci poúrazových stavů, zánětlivých onemocnění mozku (syfilis, AIDS), nádorů mozku a dalších (Hosák et al., 2015).

Odhadem se v České republice nachází kolem 150 000 lidí s některým typem demence, kdy z tohoto počtu 2/3 představují ženy. Počet postižených demencí neustále narůstá a rozpočet i nároky ohledně péče o tyto pacienty jsou stále významnější (Zvěřová, 2017).

#### **4.3.1 Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba (AD) je onemocnění představující 50 % všech demencí. Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění, které je ireverzibilní a jehož počátek je zprvu velmi nenápadný. Choroba se projevuje kortikální degenerací související s poruchami krátkodobé paměti doprovázené často depresí, apatií a pocitem

znepokojení. Později se objevují poruchy nekognitivních funkcí (poruchy emotivity, chování, poruchy cyklu spánku-bdění, aktivity denního života a ztráta soběstačnosti) (Zvěřová, 2017). Onemocnění postihuje osoby do 45 let jen velmi vzácně. Před 65. rokem je označováno jako presenilní forma demence a nad 65 let jako senilní typ AD, přičemž tento senilní typ se vyskytuje nejčastěji (Seidl, 2015).

Příčina vzniku a rozvoje AD není dosud stále známá zejména proto, že se jedná o tzv. multifaktoriální onemocnění, na jehož vzniku se podílí mnoho faktorů, jako je genetická výbava, vliv toxických látek, infekce virem a mnoho dalších (Seidl, 2008). Velký význam pro vznik a průběh onemocnění má tedy kombinace vrozených faktorů a vlivů prostředí. Mezi významné geny zodpovědné za dědičnou/familiární formu AD patří zejména presenilin 1 (*PSEN1*), presenilin 2 (*PSEN2*) a gen amyloidového prekurzorového proteinu (*APP*). U sporadických případů je jedním z nejvýznamnějších vrozených genetických faktorů gen pro apolipoprotein E (*ApoE*). Na rozvoji AD se však může pravděpodobně podílet i několik stovek dalších genů (Hosák et al., 2015).

Základem extracelulární patogeneze AD je ukládání a shlukování cerebrovaskulárního beta-amyloidu do mozkového parenchymu a do stěny mozkových cév, kolem nichž následně probíhají neurodegenerativní děje. Protein se skládá z fragmentů APP, který je u zdravého jedince štěpen pomocí alfa-sekretázy na rozpustné fragmenty. U pacientů s AD dochází k patologickému štěpení APP v odlišném místě a vytváří se tak nerozpustné fragmenty proteinu, které koagulují a ukládají se za vzniku tzv. Alzheimerovských plaků (Pidrman, 2007). Plaky jsou tvořeny toxickým amyloidem beta 40 a beta 42 a ve svém okolí způsobují sterilní zánětlivé změny (Hosák et al., 2015). V intracelulární patogenezi hraje roli degenerace bílkoviny zvané tau-protein spojující se s neuronálními vlákny. Mikrotubuly tau-proteinu se zkracují důsledkem patologické fosforylace, čímž ztrácejí svou funkci a vytvářejí neuronální klubka označovaná jako tangles. Tento proces vede k apoptóze neuronů a tedy k jejich zániku. Kromě těchto dvou základních dějů se na neurodegenerativních změnách podílejí například i sterilní záněty s následnou stimulací interleukinu 1, poruchy transportu iontů vedoucí k poruše vnitřního prostředí neuronů nebo také vliv kyslíkových radikálů narušujících metabolismus nervových buněk (Pidrman, 2007). Postižený mozek pacientů s AD atrofuje mnohem rychleji než u normálně stárnoucích jedinců. Atrofie vede ke zmenšování a celkovému úbytku neuronů. Úbytku podléhá zejména mozková

kůra v oblasti mediálního temporálního laloku a parietálního laloku mozku (Hosák et al., 2015).

#### **4.3.1.1 Asociace *MBL2* s Alzheimerovou chorobou**

Procesy vrozeného imunitního systému byly dříve stavěny do souvislosti s AD. Předpokládá se, že aktivita MBL vzájemně působí s procesy, na kterých se podílí APP, amyloid-beta a komplementový receptor 1 (CR1). Poruchy ve formě nízkých hladin MBL v séru nebo snížená afinita komplementových proteinů k MBL může potenciálně ovlivnit zpracování APP, reakci buňky na amyloid nebo eliminaci patogenů, čímž může MBL přispívat k náchylnosti k AD. Pacienti s AD také vykazují v porovnání s kontrolní skupinou nižší hladiny MBL v mozkomíšním moku (Sjölander et al., 2013).

O těchto asociacích AD s *MBL2* genem pojednává studie Sjölander et al. (2013). V jejich práci vyšetřili 448 pacientů s AD a kontrolní skupinu o 199 jedincích kavkazského původu. Studie analyzovala v *MBL2* genu šest typů SNP, tedy alely B, C, D a dále mutace v oblastech odpovídajících pro alely X/Y, H/L a P/Q. Studie se zabývala nejen jednotlivými polymorfismy, ale i celými haplotypy. Frekventované byly mutace pro alely X a Q, méně častými byly mutace pro B alelu. Nejvýznamnějšími haplotypy spojenými silně s rizikem AD byly LXP a LYQ, rizikové byla i kombinace těchto haplotypů s A alelou v exonu jedna (LXPA a LYQA). Naopak haplotypy LYP a HYP se jeví jako ochranné (Sjölander et al., 2013).

Studie Winston et al. (2019) se zabývala neobvyklými hladinami komplementových proteinů v exozomech vzniklých z plazmatických astrocytů. Vzorky byly odebrány skupinám pacientů, kteří trpěli AD, pacientům s mírným poškozením kognitivních funkcí a skupině pacientů, u kterých se do 3 let rozvinula AD z předešlého mírného poškození. Tato studie však nepotvrdila významné rozdíly hladin MBL mezi pacienty a kontrolní skupinou (Winston et al., 2019).

Starší studie Lanzrein et al. (1998) se také zabývala hladinami MBL v séru a v mozkomíšním moku u pacientů s AD. Tato studie sice nepozorovala rozdíly hladin MBL v séru pacientů ve srovnání s kontrolní skupinou, ale hladiny MBL v mozkomíšním moku byly u AD pacientů významně sníženy. Jejich studie také ukázala, že hladiny MBL v mozkomíšním moku byly 103–104krát nižší než v séru. MBL protein syntetizují játra a jedná se o velkou ve vodě rozpustnou molekulu, proto je

výskyt v mozkomíšním moku a průchod přes hematoencefalickou bariéru (BBB) nepravděpodobný. Nález v mozkomíšním moku by mohl indikovat patologickou lokální syntézu nebo aktivní transport z krve přes BBB. Je také možné, že k transportu do CNS dochází přes Clq receptor, avšak tento jev je známý spíše pro pupečnickovou žílu (Lanzrein et al., 1998).

#### **4.3.2 Vaskulární demence**

Vaskulární demence (VD) je po AD druhou nejčastější příčinou demence, která zodpovídá za 10-50 % všech případů. Výskyt stoupá s rostoucím věkem nezávisle na pohlaví. U lidí nad 65 let se prevalence pohybuje kolem 1-4 % (Ambler et al., 2010). VD jsou heterogenní skupinou demencí s různými klinickými projevy. Příčinou této demence jsou mnohočetné ischemické léze nebo hemoragické poškození v mozkové tkáni, které je provázeno dysfunkcí kognitivních funkcí (Bartoš, Hasalíková, 2010). VD může doprovázet AD, v takovém případě se jedná o smíšený typ demence (Hosák et al., 2015). Symptomy demence nastupují do 3 měsíců po cévní příhodě náhle a mohou se skokově zhoršovat (Pidrman, 2007).

Jedním z typů VD je multiinfarktová demence, která nastupuje po malých i větších mnohočetných mozkových infarktech. Předpokladem je zasažení minimálně 50 ml mozkové tkáně, avšak rozsah poškození může být i menší, pokud je infarkt strategicky lokalizován (například v gyrus angularis v řečově dominantní hemisféře) (Jirák, Koukolík, 2004). Podkladem pro rozvoj bývá embolizace sklerotických nebo intrakardiálních trombů, které poškozují extracerebrální cévy. Mezi časné symptomy spadá podrážděnost, poruchy pozornosti, závratě, bolesti hlavy a zejména poruchy paměti. Mohou se vyskytnout i depresivní stavy a tranzitorní stavy zmatenosti. Při náhlém zhoršení v důsledku rozvoje cévního poškození mohou jedinci trpět přechodnými poruchami vědomí. Při ztrátě nad 100 cm<sup>3</sup> parenchymu mozku se vyvíjí i deficit kognitivních funkcí (Pidrman, 2007).

VD může být také způsobena rozsáhlou cévní mozkovou příhodou (CMP), kdy demence vzniká náhle. Neurologické příznaky závisí na lokalizaci cévní léze a mají tendenci se časem částečně mírnit. Objevují se poruchy chůze, pády a psychomotorické zpomalení. Přesto prognóza není jistá kvůli riziku opakování CMP a je zde kladen důraz

na potlačení rizikových faktorů, jako jsou například hypertenze či hypercholesterolémie (Pidrman, 2007).

#### ***4.3.2.1 Role MBL2 při mozkové ischemii***

CMP souvisí s cévními pochody, jako je koagulační a komplementová kaskáda. Ukazuje se, že zde má roli i lektinová cesta aktivace komplementu, které se MBL účastní. MBL totiž dokáže mimo jiné i rozpoznávat a vázat sacharidy exponované na povrchu pozměněných či poškozených buněk, včetně buněk endotelových. Zajímavostí je, že u lidí s CMP a současným deficitem MBL se zjistil menší výskyt infarktů (Fumagalli et al., 2016).

## **5. Laboratorní vyšetření polymorfismu *MBL2***

Dnešní metody molekulární diagnostiky jsou schopné identifikovat polymorfismy a jiné rozdíly v DNA sekvenci jak na úrovni celého genomu, tak i v jeho konkrétních částech na úrovni chromozomové, mitochondriální, chloroplastové i plazmidové. Metody založené na analýze DNA mají tu výhodu, že DNA obsahují všechny organismy a identifikace nebo typizace vzorků nevyžaduje nutně fenotypový projev (na rozdíl od biochemických a sérologických metod) (Šmarda et al., 2005).

### **5.1 Odběr materiálu pro analýzu DNA**

Každé genetické vyšetření začíná odběrem vzorku tkáně pacienta, ze kterého lze následně izolovat NK (nukleová kyselina) (Kočárek, 2007).

Z hlediska etického i právního je nutné pacienta podrobně informovat o vyšetření, se kterým musí pacient, případně i zákonný zástupce pacienta, vyjádřit informovaný souhlas. Pacient má také právo rozhodnout, jak bude s jeho DNA po provedeném vyšetření naloženo (Beránek, 2016).

#### **5.1.1 Odběr periferní krve**

Nejčastěji používaným vstupním materiálem pro genetické postnatální vyšetření je periferní krev odebraná ze žíly, která obsahuje leukocyty. Pro vyšetření se odebírá kolem 4-10 ml krve (Kočárek, 2007). Odběrové zkumavky obsahují kyselinu etylendiaminotetraoctovou (EDTA), což je látka s vysokou afinitou k vápenatým iontům, které z plazmy vyvazuje. Díky tomu je krev udržována v nesrážlivém stavu. Odběr provádí kvalifikovaný zdravotní pracovník na základě požadavku lékaře (Pecka et al., 2010). Odběr do heparinu se nedoporučuje, neboť může inhibovat polymerázovou řetězovou reakci (PCR) (Carpi et al., 2011).

#### **5.1.2 Bukální stěr**

Další metodou odběru vzorku je neinvazivní odběr epitelových buněk z ústní sliznice. Ten se provádí většinou pomocí komerčně dodávané sterilní soupravy složené z tyčinky a speciálního tampónu. Z bukáních oblastí ústní sliznice se pomocí odběrové soupravy setrou epitelové buňky (Kočárek, 2007), ze kterých je dále izolována DNA.



## 5.2 Izolace a purifikace DNA

Pro většinu metod molekulární genetiky je třeba získat z biologického materiálu dostatečné množství NK. Prvním krokem pro její získání je proces zvaný izolace neboli extrakce DNA, případně její purifikace (přečištění). Podstatou procesu je rozrušení buněčného materiálu a odstranění či modifikování složek, jako jsou bílkoviny, ionty apod., které mohou představovat inhibitory pro následné zpracování vzorku. Výsledkem extrakce je izolát obsahující DNA rozpuštěnou ve vodě popř. v jiném elučním roztoku. (Rak et al., 2008).

Kvalita izolovaného materiálu je zásadní pro úspěšnost analýzy. Dostatečné množství a čistotu nativní NK zajišťují purifikační procesy. Obzvláště důležité je odstranění proteinů z lyzátu pomocí proteáz jako je proteináza K nebo pronáza E. Buňky totiž obsahují enzymy, které jsou schopny degradovat NK a jiné proteiny, které se vážou na DNA, a mohou negativně ovlivnit výsledky genetické analýzy (Šmarda et al., 2005).

### 5.2.1 Lýza buněk

Při izolaci musí nejdříve dojít k dezintegraci (lýze) buněk. Živočišné buňky nemají buněčnou stěnu, proto lze k rozrušení použít jemnější metody než u buněk rostlinných, např. pomocí slabých neiontových detergentů (Šmarda et al., 2005). Nejčastějšími detergenty jsou Triton X-100 nebo SDS (angl. sodium dodecylsulphate, dodecyl sulfát sodný) (Kočárek, 2007).

Po rozrušení membrány se v roztoku objeví degradační produkty plazmatické membrány a nitrobuněčné složky. Vzniká komplexní směs DNA, RNA, proteinů, lipidů, sacharidů a uhlovodíků. Často může při lýze dojít k fragmentaci chromozomové DNA (Šmarda et al., 2005). Po destrukci buněčných membrán se DNA uvolní do extrakčního pufru, který obsahuje kromě detergentu také EDTA. Vytvořené komplexy EDTA s  $\text{Ca}^{2+}$  ionty inaktivují nukleázy, které se běžně vyskytují v cytoplazmě. Jejich inaktivace je tedy nutná pro zabránění rozštěpení DNA i RNA. Vzniklý extrakt je využit pro izolaci DNA, která se dříve běžně prováděla fenol-chloroformovou metodou. Dnes se více využívá izolace pomocí adsorpce NK na silikátový povrch (Kočárek, 2007).

### **5.2.2 Fenol-chloroformová metoda**

Fenol-chloroformová metoda je tradiční a levnou technikou. Při této metodě se bílkoviny degradují pomocí proteinázy K a extrahují fenol-chloroformovou směsí, která se nemísí s vodou (Kočárek, 2007). Směs těchto rozpouštědel se po přidání DNA odstředí a tvoří bifázickou emulzi. Horní vodní fáze obsahuje NK, zatímco spodní fázi tvoří směs organických rozpouštědel s denaturovanými bílkovinami a hydrofobními molekulami. Vodnou fázi je nutné přecistit chloroformem, aby z ní byla odstraněna příměs fenolu (Carpi et al., 2011). Vodná fáze se opatrně odebere a DNA se z ní vysráží pomocí ethanolu nebo izopropanolu ve vysokých koncentracích. Sraženina se oddělí centrifugací. DNA se po slití supernatantu promývá 70% ethanolem a opět centrifuguje (Kočárek, 2007). DNA může být znovu resuspendována sterilní destilovanou vodou nebo speciálním pufru (nejčastěji Tris-EDTA pufr). Od této metody se však ustupuje z důvodu práce se zdravím škodlivými chemikáliemi. (Carpi et al., 2011).

### **5.2.3 Metoda adsorpce nukleových kyselin na silikátový povrch**

Metoda využívá mikrokolonové systémy a lyzační, promývací a eluční pufrů. Lyzační pufr obsahuje kromě detergentu také chalatropní soli, které napomáhají oddělení proteinů od NK, inhibují degradační účinky ribonukleáz a umožňují absorpci DNA na modifikovaný silikátový povrch za pomoci centrifugace. Při eluci DNA se využívají pufrů s nízkou koncentrací solí, které obnovují vazbu NK k vodě a uvolňují ji ze silikátu. Výhodou metody je rychlost a možnost automatizace, která je však finančně náročnější (Beránek, 2016).

## **5.3 Stanovení koncentrace DNA**

Pro kontrolu získaných extraktů NK (ať už pro kontrolu čistoty, množství NK či její celistvosti) se využívají spektrofotometrické, fluorometrické, fluorescenční a elektroforetické techniky (Beránek, 2016).

NK absorbují monochromatické světlo o vlnové délce 260 nm. Míra absorpce tohoto záření tedy odpovídá koncentraci NK ve vzorku. Při měření je možné zjistit i kontaminaci vzorku bílkovinami. Absorpční maximum pro bílkoviny je měřeno při vlnové délce 280 nm. Poměr absorbance při 260 nm a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) udává míru znečištění vzorku proteiny. Ideálně by hodnoty měly dosahovat 1,8-2,0. Pokud

jsou hodnoty nižší než 1,75, vzorek je kontaminován vysokým množstvím bílkovin a je doporučeno vzorek znovu přečistit (purifikovat) (Kočárek, 2007).

Fluorescenční metoda využívá fluorescenčních barviv, která jsou specifická pro dvouřetězovou či jednořetězovou DNA nebo jsou specifické pro RNA. Tyto barvy se mísí s příslušným poměrem NK, přičemž dojde k vmezeření barviva do vlákna mezi nukleotidy. Následně působením monochromatického vlákna dochází k emisi fotonů, které zachycuje fotonásobič. Koncentrace NK je přímo úměrná intenzitě fluorescence (Beránek, 2016).

Pro měření koncentrace DNA lze využít také mikrokolony, které jsou založeny na principu detekce jedné molekuly (single molecule detection). Kolonou prochází jednotlivé molekuly, které jsou detekovány pomocí fluorescenčních výbojů emitovaných z obarvených molekul. Absolutní koncentrace DNA ve vzorku je kvantifikována na základě počtu fluorescenčních molekul, objemu protékajícího vzorku a rychlosti toku (Chao et al., 2007).

#### **5.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) je metoda, kterou objevil roku 1983 americký vědec Kary Banks Mullis, který za tento objev získal v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii (Mullis, 1990). Tato metoda umožňuje amplifikovat (zmnožit) úsek DNA *in vitro*, díky využití specifických DNA-polymeráz amplifikující příslušný úsek. Tento proces probíhá cyklicky a imituje přirozenou replikaci DNA probíhající v rámci buněčného dělení. Metodou je možno získat až několik milionů jakéhokoliv úseku, u kterého je známa sekvence bazí koncových částí ohraničujících požadovaný úsek DNA (Sršeň, Sršňová, 2005).

##### **5.4.1 Princip metody PCR**

Principem PCR reakce je enzymová syntéza úseku DNA, kterou zprostředkovává DNA-polymeráza. Syntéza nových dvouřetězových úseků DNA probíhá ve směru  $5' \rightarrow 3'$  a opakuje se v cyklech. (Šmarda et al., 2005). Amplifikací jedné molekuly DNA vznikají vždy dvě další molekuly a jejich počet v rámci každého cyklu exponenciálně narůstá. V  $n$ -tém cyklu tedy lze získat  $2^n$  molekul shodujících se s původním templátem DNA (Penka et al., 2011).

Požadovaný úsek vyšetřované DNA je možno vymezit pomocí tzv. primerů, což jsou krátké (zpravidla 20-25 nukleotidů dlouhé) úseky, jež na základě komplementarity bází odpovídají dvěma koncovým oblastem cílového úseku vyšetřované DNA. (Kočárek, 2007). Syntézu zvolených primerů dnes zajišťují automatizované přístroje a jejich výroba není finančně nákladná (Bartůňková et al., 2011).

K provedení PCR je potřeba kromě vzorku DNA a primerů zhotovit tzv. master mix (MM), který kromě primerů (přímého a zpětného) obsahuje mnoho dalších složek. MM obsahuje enzym *Taq* DNA polymerázu, která katalyzuje replikaci DNA. Tato polymeráza je izolována z bakterie *Thermus aquaticus* a odolává vysokým teplotám (Kuciel, Urban, 2016). Dnes jsou komerčně dostupné i tzv. *hots start* polymerázy, které se aktivují až při vysoké teplotě (např. 95 °C), čímž se zajistí spuštění PCR reakce až po denaturaci DNA a zabrání tak možné nespecifické hybridizaci primerů, ještě před začátkem amplifikace v termálním cyklu (Beránek, 2016). Dále je nutné do MM přidat prekurzory DNA tvořící základní stavební kameny pro syntézu nové DNA. Tyto prekurzory tvoří 4 typy deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP) (Sršeň, Sršňová, 2005). MM obsahuje dále vodu, pufr pro *Taq*-polymerázu, MgCl<sub>2</sub>, KCl a Tris-HCl (Kuciel, Urban, 2016).

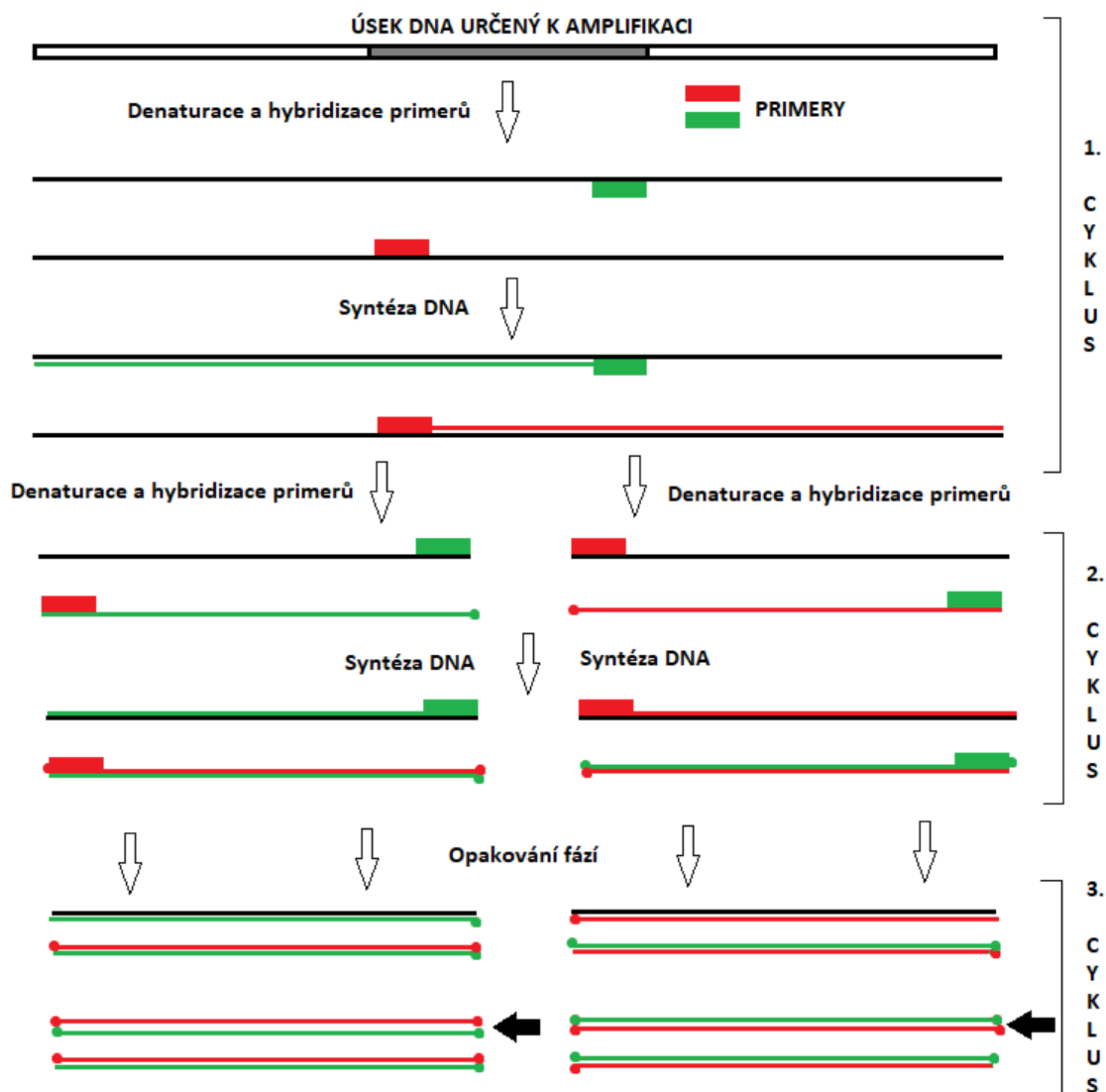
#### 5.4.2 Průběh PCR reakce

PCR reakce probíhá v přístroji zvaném termální cyklu, který dokáže měnit teplotu ve velmi krátkém čase (Kuciel, Urban, 2016) Jeden cyklus PCR reakce zahrnuje tři základní kroky, kterými jsou denaturace vyšetřované DNA, annealing (hybridizace) primerů a elongace (prodlužování) nukleotidových řetězců (Kočárek, 2007).

V prvním kroku dochází k denaturaci dvouvláknové templátové DNA. Denaturace se provádí zahřátím reakční směsi na 90-95 °C (odvíjí se od typu použité polymerázy) (Kuciel, Urban, 2016). Ve druhém kroku (annealingu) se navazují dva komplementární primery na příslušný 3' konec daného amplifikovaného úseku (Sršeň, Sršňová, 2005). Teplota pro navázání primerů se odvozuje od jejich délky a nukleotidového zastoupení (Šmarda et al., 2005). Posledním krokem je elongace, tedy syntéza nového komplementárního vlákna analyzovaného úseku DNA ohraničeného primery, kterou zprostředkovává DNA-polymeráza (Kuciel, Urban, 2016). DNA-polymeráza nasedá na primery v oblasti 3'-OH konce a prodlužuje řetězec ve směru 5' → 3' připojováním

jednotlivých nukleotidů na základě komplementarity bází (Sršeň, Sršňová, 2005). Délka elongace závisí na délce amplifikovaného úseku a probíhá při teplotě 70-74 °C (Kočárek, 2007), 65-75 °C (Šmarda et al., 2005).

Uvedené kroky tvoří jeden cyklus, který je třeba cyklicky zopakovat za přesné kontroly teploty. Procesy reakce jsou automaticky řízeny programovatelnými termocyklery (Beránek, 2016). Počet opakování cyklů vychází z koncentrace templátové DNA, zpravidla se pohybuje kolem 25-35 cyklů (Šmarda et al., 2005). Schéma PCR reakce představuje obr. 6.



**Obrázek 6:** Schéma PCR reakce (první 3 cykly). Zdroj: vlastní

Výsledek amplifikace po PCR reakci se detekuje pomocí elektroforézy na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu (Penka et al., 2011).

## 5.5 Elektroforéza

Elektroforéza patří k separačním metodám, která se využívá pro separaci, identifikaci a purifikaci NK a je nedílnou součástí molekulární biologie. Principem je separace založená na pohybu nabitých molekul ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektronegativita DNA i RNA je dána zbytky kyseliny fosforečné (Beránek, 2016). Tyto nabité částice se spolu s celou NK pohybují v elektrickém poli ke kladně nabitě elektrodě (anodě). Při separaci DNA či RNA se nezvažuje velikost náboje, neboť náboj

je rozložen rovnoměrně a jeho velikost je na jednotku délky stejná. Roli zde hraje rozdílná molekulová hmotnost jednotlivých fragmentů (Šmarda et al., 2005). Základními médii pro separaci jsou agarózové a polyakrylamidové gely o různých velikostech a koncentracích. Existují i plně automatizované elektroforetické separace NK využívající křemenné kapiláry plněné tekutým separačním gelem (Beránek, 2016).

### **5.5.1 Gelová elektroforéza**

Elektroforetické gely představují složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost je ovlivnitelná složením roztoku a koncentrací polymeru (Šmarda et al., 2005). Přes toto síto prochází molekuly DNA, které uvede do pohybu elektrické pole. Kratší fragmenty mají při průchodu polymerním sítím menší tření a jsou tak rychlejší než molekuly delší (Kočárek, 2007).

#### **5.5.1.1 Agarózový a polyakrylamidový gel**

Agaróza se získává izolací z mořských řas rodu *Gelidium* a *Gracilaria* (Kuciel, Urban, 2016). Jedná se o polymer, jehož základ tvoří D-galaktóza a 3,6-anhydro-L-galaktóza. Gel se připravuje z práškové agarózy, která se rozvaří v pufru (TBE, TEA nebo TPE pufr). Tyto gely jsou snadné na přípravu, průběh separace je na nich rychlejší, ale mají menší rozlišovací schopnost než gely polyakrylamidové (Beránek, 2016).

Polyakrylamid je polymer složený z jednotek akrylamidu a bisakrylamidu. Tyto gely jsou schopny rozlišit i fragmenty DNA o max. délce 500 bp, které se liší velikostí jen o jediný nukleotid (Beránek, 2016).

#### **5.5.1.2 Aplikace vzorku na gel a provedení separace**

Gely mají zpravidla obdélníkový tvar. Na okraji jsou pomocí hřebenů během přípravy a tuhnutí gelu vytvořeny jamky pro nanesení vzorku DNA. Tuhé gely se pak umísťují do elektroforetické vany, která je naplněná pufrem. Na obou koncích jsou zavedené elektrody. Pomocí pipety se do jednotlivých jamek vpraví vzorky DNA a do jedné z jamek je také vpraven tzv. standard molekulové hmotnosti. Jedná se o komerčně dodávanou směs fragmentů DNA o známé molekulové hmotnosti, která pomáhá určit přibližnou velikost vyšetřovaného fragmentu DNA ze vzorku (Kočárek, 2007).

Po nanesení vzorků do startovacích jamek je aparatura připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Negativně nabitá fosfátová kostra DNA migruje gelem. Tato migrace je určena především velikostí molekuly DNA, koncentrací a typem gelu, konformací DNA, napětím a elektroforetickým pufrem (Kuciel, Urban, 2016). Fragmenty DNA vytvářejí na gelu pruhy různě vzdálené od startu. Kratší fragmenty jsou rychlejší a nacházejí se ve větší vzdálenosti od jamky, kdežto delší úseky procházejí gelem pomaleji a urazí menší vzdálenost (Kočárek, 2007).

### **5.5.1.3 Vizualizace NK v elektroforetickém gelu**

Aby bylo možné na gelu vidět jednotlivé fragmenty DNA, je nutné použít tzv. interkalační látky, které jsou schopné se vmezeřit mezi sousední nukleotidy vlákna NK (Beránek, 2016). Dříve se nejčastěji používal k barvení ethidiumbromid (2,7-diamino-10-etyl-9-fenylfenatridium bromid), jehož molekuly se vkládají mezi polynukleotidové řetězce DNA. Po ozáření gelu UV-zářením v tzv. transiluminátoru lze pak pozorovat jednotlivé pruhy DNA, reprezentující izolovanou DNA nebo PCR produkty, restriční fragmenty apod. Tyto pruhy se zformují během elektroforézy, v důsledku pohybu DNA v elektrickém poli, a intenzivně fluoreskují (Kuciel, Urban, 2016). Dříve používané interkalační látky, jako je právě ethidiumbromid, vykazují mutagenitu, proto se dnes používají bezpečnější fluorescenční barvy, jako jsou SYBR Green, DAPI, TOTO-1, thiazolová oranž, Midori Green, GelRed nebo GelGreen (Beránek, 2016).

## **5.6 Sekvenování DNA**

Účelem sekvenování DNA je stanovení sekvence DNA z hlediska její primární struktury, tedy určení pořadí jednotlivých nukleotidů v molekule. Porozumění sekvence DNA prohlubuje znalosti o různých organismech a jejich jedinečných a repetitivních oblastech, pozicích a sekvencích genů a nakonec umožňuje i porovnávání těchto sekvencí napříč organismy (Beránek, 2016). Znalost sekvence dále umožňuje porozumět molekulární podstatě biologických procesů, regulaci tvorby proteinů a také je významná při studiu mutací. Tato metoda má význam také pro návrh a optimalizaci PCR reakce, která je závislá na znalosti sekvencí DNA (Šmarda et al., 2005).

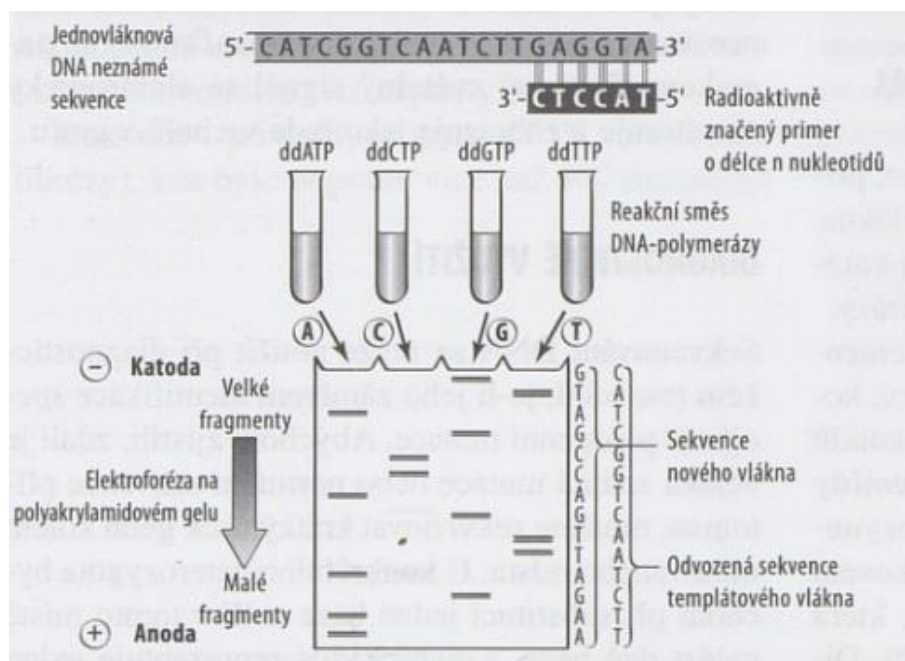


K sekvenování DNA se v minulosti používaly dvě metody založené na rozdílném principu. První metodou je Maxamovo-Gilbertovo sekvenování (tj. chemická metoda), jejíž princip spočívá ve specifické degradaci řetězců NK působením chemických látek. Druhou metodou je Sangerovo sekvenování (tj. enzymová metoda), která využívá specifické inhibice enzymové syntézy DNA řetězců. Pro obě metody je výchozím materiálem DNA s přesně definovanými konci, mohou to být fragmenty získané PCR nebo restriční fragmenty ve vhodném klonovacím vektoru (Šmarda et al., 2005).

### **5.6.1 Sangerovo sekvenování**

Tuto metodu vymyslel roku 1977 Frederick Sanger, který byl za ní následně oceněn Nobelovou cenou. Její modifikace je v současnosti nejpoužívanější metodou pro sekvenování DNA. Původní metoda však byla nejen velmi pracná, ale využívala radioaktivní značení pro nukleotidy. Dnes se tedy používá její modifikace, která je automatizovaná a využívá fluorescenčně značené nukleotidy (Kočárek, 2007).

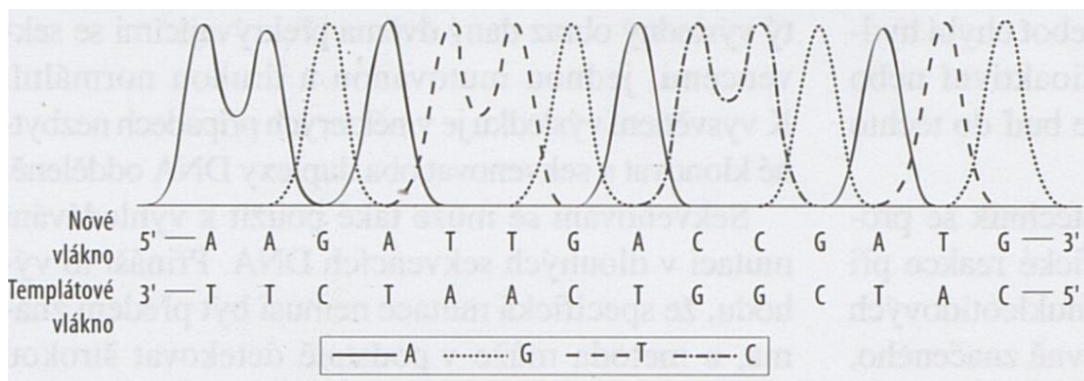
Principem Sangerova sekvenování je prodlužování krátkých primerů DNA polymerázou, které je ukončené značenými dideoxinukleotidy. DNA musí být nejdříve za zvýšené teploty denaturována na jednořetězcovou DNA (tzv. ssDNA). Jeden z řetězců na sebe naváže krátký oligonukleotidový primer a v dalším průběhu dojde k jeho prodlužování. Sekvenační směs obsahuje nejen ssDNA a primer, běžné deoxynukleotidy (dNTP) a DNA polymerázu, ale také dideoxynukleotidy (ddNTP) (Kuciel, Urban, 2016). Rozdílnost ddNTP od běžných dNTP spočívá v absenci OH skupiny na uhlíkovém atomu deoxyribózy v pozici 3'. Právě tato OH skupina umožňuje propojení sousedních nukleotidů (Pritchard, Korf, 2007). Místo této skupiny je zde pouze H, který není schopen tvořit fosfodiesterovou vazbu, a znemožňuje tak další prodlužování řetězce DNA a ukončuje syntézu. Tyto ddNTP jsou fluorescenčně značené a konce řetězců DNA mohou být snadno detekovány. Během syntézy dochází ke vzniku stovek nových různě dlouhých řetězců, které jsou ukončeny náhodným zařazením ddNTP. Výsledná směs obsahuje fragmenty se zařazenými ddNTP na všech pozicích od primeru až po konec výchozí sekvence, které lze rozdělit po jedné bázi separací pomocí kapilární elektroforézy (Kuciel, Urban, 2016). Schéma procesu Sangerova sekvenování je znázorněn na obr 7.



**Obrázek 7:** Schéma procesu Sangerova sekvenování. Zdroj: Pritchard, Korf (2007)

### 5.6.2 Přístup moderního sekvenování

Dnes pro sekvenování DNA existují automatizované přístroje, kde veškeré reakce probíhají v jedné zkumavce a vše potřebné obsahuje jedna reakční směs (Kuciel, Urban, 2016). Ke značení ddNTP jsou používány fluorofory a vzniklý signál zachycuje čtecí laserové zařízení. Průchod značeného fragmentu DNA je na detektoru zaznamenán jako nárůst fluorescence, jejíž vlnová délka je předem známá a umožňuje tak určení typu připojeného ddNTP (Beránek, 2016). Výsledek je zobrazen počítačem v podobě elektroforetogramu (obr. 8), který má podobu barevných píků. Každý barevný vrcholek odpovídá danému nukleotidu v DNA sekvenci. Výsledná sekvence odpovídá sekvenci přítomné v analyzovaném genu příslušného pacienta, která je komplementární k templátovému řetězci DNA (Kuciel, Urban, 2016).



**Obrázek 8:** Elektroforetogram. Zdroj: Pritchard, Korf (2007)

Technologie pro sekvenaci DNA se rychle rozvíjí a ač jsou přístroje drahé, samotná cena za sekvenaci a doba trvání se snižuje. Metod existuje více a některé z nich jsou schopné osekvenovat kompletní genom organismu. Data získaná sekvenací jsou vkládány do volně přístupných počítačových databází, díky nimž může být sekvence analyzována a porovnána s dalšími sekvenčními daty (Kuciel, Urban, 2016).

## **6. Cíle práce**

Cílem mé bakalářské práce bylo naplnění těchto bodů:

- sepsání odborné rešerše na dané téma
- zvládnutí základních metod molekulární biologie (izolace DNA, příprava PCR reakce, gelová elektroforéza, přečištění PCR produktu a jeho příprava pro sekvenaci, analýza získaných výsledků)

## **7. Praktická část**

Praktická část mé bakalářské práce byla vykonána v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích. Celá práce probíhala pod vedením a dohledem Mgr. Dagmary Riegert Bystřické, PhD. Před zahájením veškerých úkonů v laboratoři jsem byla nejdříve seznámena s organizací laboratoře a s jejími bezpečnostními předpisy. K práci jsem používala příslušné ochranné prostředky a dodržovala veškeré postupy správné laboratorní praxe.

Genetická analýza vzorků byla rozdělena na dvě části. První část probíhala přímo v laboratoři GENLABS a zahrnovala izolaci DNA a amplifikaci vyšetřovaného úseku *MBL2* genu pomocí PCR. PCR produkty byly následně zkontrolovány pomocí gelové elektroforézy, přečištěny a připraveny pro sekvenaci. Ve druhé části byly takto připravené PCR produkty zaslány do firmy SEQme s.r.o. v Dobříši, kde byla provedena jejich sekvenace. Výsledky sekvenace byly analyzovány opět v laboratoři GENLABS.

Před jakoukoliv manipulací v genetické laboratoři byly použity latexové rukavice, které zabraňovaly nejen kontaminaci vzorků, přístrojů i veškerých dalších pomůcek, ale také sloužily k vlastní ochraně. Při práci byly dodržovány pracovní postupy laboratoře GENLABS a její provozní řád. Úkony v laboratoři, které jsou následně popsány, vycházejí z těchto pracovních postupů a pokynů vedoucího práce.

### **7.1 Popis souboru**

V rámci praktické části bakalářské práce bylo vyšetřeno celkem 30 vzorků. 25 vzorků pocházelo od seniorů, kterým byl diagnostikován některý z typů demence (převážně Alzheimerova demence nebo vaskulární demence), jednalo se především o jedince ve věku 65 a více let. Zbýlých 5 vzorků bylo získáno od jedinců mladších 65 let bez známek demence.

### **7.2 Izolace DNA**

Každé molekulárně genetické vyšetření začíná izolací DNA ze vzorku pacienta. K izolaci byly použity dva typy primárních vzorků, ve 2 případech to byly bukalní stěry a ve zbylých 28 případech periferní krev. Bukální stěry si provedli pacienti sami

na základě doporučení výrobce odběrové soupravy pro bukální stěr. Periferní krev byla odebrána kvalifikovaným pracovníkem na příslušném odběrovém pracovišti. Ke každému vzorku byla přiložena vyplněná laboratorní žádanka a informovaný souhlas pacienta s provedením laboratorního vyšetření a jeho anonymním využitím pro výzkum. Odebrané vzorky byly po přijetí do laboratoře označeny laboratorními identifikačními čísly a uchovány v chladničce při teplotě 4 °C.

Během mé práce jsem si vyzkoušela izolaci z obou typů primárních vzorků.

### 7.2.1 Izolace DNA z bukálního stěru

Pro izolaci DNA z bukálního stěru jsem použila komerční izolační kit GeneAll ExGene™ Clinic SV mini dle doporučení výrobce. Seznam reagensů a spotřebního materiálu je shrnut v tab. 3, seznam použitých přístrojů je uveden v tab 4.

**Tabulka 3:** Přehled použitých reagensů a spotřebního materiálu

Reagencie	Spotřební materiál
PBS pufr (není v kitu)	rukavice
proteináza K	1,5 ml mikrozkušavky
BL pufr	kolonky
100% etanol	sběrné zkumavky
BW pufr	špičky
TW pufr	
AE pufr	

Zdroj: vlastní

**Tabulka 4:** Přehled použitých přístrojů

Přístroje	Výrobce
automatické pipety	-
TDB-120, Dry-block Thermostat with block	Biosan
FV-2400, Mini-centrifuge/Vortex Microspin	Biosan
Centrifuge 5415R, without rotor	Eppendorf

Zdroj: vlastní

#### 7.2.1.1 Pracovní postup

Pro izolaci DNA ze vzorků jsem si nejprve připravila do stojánku pro každý vzorek 2x 1,5 ml mikrozkušavky, kolonku a dvě sběrné zkumavky. Kolonku a zkumavku jsem si označila identifikačním číslem vzorku. Termostat jsem si nastavila na 56 °C a nechala ho vytemperovat. Připravila jsem si všechny potřebné reagensy, dále jsem potřebovala

sadu automatických pipet, špičky, mini centrifugu/vortex a centrifugu s nastavitelnými otáčkami.

Tampon se stěrem jsem si pomocí pinzety přenesla do 1,5 ml mikrozkušavky a napipetovala k němu 400  $\mu$ l PBS pufru, 40  $\mu$ l proteinázy K a 400  $\mu$ l BL pufru. Uzavřenou zkumavku jsem důkladně promíchala pomocí vortexu a nechala inkubovat v termostatu při 56 °C po dobu 10 min. Po inkubaci jsem zkumavku krátce zcentrifugovala, aby mi na víčku nezůstaly kapičky. Do zkumavky jsem přidala 400  $\mu$ l 100% etanolu a v pulzech ji zvortexovala a následně zcentrifugovala. Všechnu směs jsem po částech (cca po 600  $\mu$ l) napipetovala na kolonku usazenou ve sběrné zkumavce. Zkumavky jsem umístila do centrifugy tak, aby byla vyvážená, a nechala ji centrifugovat po dobu 1 min při > 8 000 rpm. Sběrnou zkumavku jsem nahradila čistou sběrnou zkumavkou a přidala 600  $\mu$ l BW pufru. Zkumavku jsem opět zcentrifugovala za stejných podmínek jako v minulém kroku. Sběrnou zkumavku jsem opět nahradila novou zkumavkou, přidala jsem 700  $\mu$ l TW pufru a opět centrifugovala za stejných podmínek. Supernatant jsem ze sběrné zkumavky odstranila a vrátila do ní zpět kolonku. Tuto zkumavku jsem na sucho zcentrifugovala po dobu 1 min při nejvyšších otáčkách. Kolonku jsem vyndala ze sběrné zkumavky a ujistila se, že je kolonka dokonale suchá. Suchou kolonku jsem umístila do popsané 1,5 ml mikrozkušavky s víčkem. Přímo na střed filtru v kolonce jsem pak napipetovala 50  $\mu$ l AE pufru a nechala vzorek inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Zkumavku jsem po inkubaci umístila do centrifugy tak, aby otevřené víčko směřovalo po směru točení a zcentrifugovala zkumavku při nejvyšších otáčkách po dobu 1 min. Pro větší výtěžnost izolace DNA jsem po centrifugaci přenesla AE pufr znovu na střed filtru a zopakovala inkubaci a centrifugaci jako v předchozím kroku. Kolonku jsem odstranila a zkumavku s izolátem jsem si připravila na změření koncentrace DNA.

### ***7.2.2 Izolace DNA z periferní krve***

Pro izolaci DNA z periferní krve jsem využila stejný kit GeneAll ExGene™ Clinic SV mini jako u bukalního stěru. Pracovní postup se liší jen v několika krocích.

#### ***7.2.2.1 Pracovní postup***

Příprava materiálu a přístrojů pro izolaci DNA z plné krve jsem provedla stejně jako u bukalního stěru. Do popsané 1,5 ml mikrozkušavky jsem si následně napipetovala

20  $\mu$ l proteinázy K. Zkumavku s krví jsem promíchala pomalým překlápěním zkumavky v ruce a poté jsem přidala 200  $\mu$ l této krve do zkumavky s proteinázou K. Dále jsem napipetovala do zkumavky 200  $\mu$ l BL pufru. Vzorek jsem důkladně promíchala pomocí vortexu a inkubovala v termostatu po dobu 10 min při teplotě 56 °C. Po inkubaci jsem zkumavku krátce stočila a přidala 200  $\mu$ l 100% etanolu. Směs jsem zvortexovala v pulzech a zcentrifugovala. Obsah zkumavky jsem přenesla na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce a centrifugovala po dobu 1 min při > 8 000 rpm. Sběrnou zkumavku jsem nahradila čistou sběrnou zkumavkou a přidala na kolonku 600  $\mu$ l BW pufru a opět centrifugovala při stejných podmínkách. Tento krok jsem opakovala do té doby, než supernatant nebyl průhledný. Sběrnou zkumavku jsem opět nahradila čistou a přidala 700  $\mu$ l TW pufru a centrifugovala opět za stejných podmínek. Supernatant jsem odstranila a kolonku vrátila do stejné sběrné zkumavky a zcentrifugovala ji po dobu 1 min při nejvyšších otáčkách. Ujistila jsem se, že kolonka zůstala suchá a umístila ji do popsané 1,5 ml mikrozukavky s víčkem. Napipetovala jsem na střed filtru kolonky 50  $\mu$ l AE pufru a inkubovala vzorek 5 min při pokojové teplotě. Po inkubaci jsem zkumavku zcentrifugovala 1 min při nejvyšších otáčkách. Zkumavky jsem v centrifuze orientovala tak, aby víčka směřovala po směru točení centrifugy. Eluát jsem opět přenesla na střed kolonky a znovu zcentrifugovala. Zkumavku s izolátem jsem si připravila na změření koncentrace DNA.

### **7.3 Měření koncentrace**

U všech vzorků byla ihned po izolaci změřena koncentrace DNA. K měření byl využit přístroj Qubit® 2.0 Fluorometer s využitím kitu Qubit dsDNA BR Assay Kit. Přehled reagensů kitu a dalších použitých pomůcek je shrnut v tab. 5. Seznam použitých přístrojů je uveden v tab. 6.



**Tabulka 5:** Seznam reagensií v kitu a použitého spotřebního materiálu

Reagencie	Spotřební materiál
Qubit™ dsDNA BR reagent (Component A)	rukavice
Qubit™ dsDNA BR buffer (Component B)	0,5 ml mikrozkušavky
Qubit™ dsDNA BR Standard #1 (Component C)	špičky
Qubit™ dsDNA BR Standart #2 (Component D)	

Zdroj: vlastní

**Tabulka 6:** Přehled použitých přístrojů

Přístroje	Výrobce
automatické pipety	-
Qubit® 2.0 Fluorometer	Invitrogen, Life Technologies
FV-2400, Mini-centrifuge/Vortex Microspin	Biosan

Zdroj: vlastní

### 7.3.1 Pracovní postup

Kalibraci přístroje nebylo nutné provádět, neboť byl kalibrován během předchozích měření. Připravila jsem si reagencie obsažené v kitu, které jsem si nechala vytemperovat na pokojovou teplotu. Dále jsem si označila 0,5 ml zkumavky identifikačními čísly izolovaných vzorků, u kterých jsem chtěla změřit koncentraci DNA. Do nové 1,5 ml zkumavky jsem si připravila pracovní roztok připravený z množství, které odpovídalo počtu vzorků určených pro stanovení.

Nejprve jsem si připravila pracovní roztok, který jsem si napipetovala tak, aby pro každý jeden vzorek odpovídalo množství 200  $\mu$ l pracovního roztoku. Toto množství se skládalo ze 199  $\mu$ l Qubit™ dsDNA BR buffer a 1  $\mu$ l Qubit™ dsDNA BR reagent. Jelikož nebylo nutné vytvářet kalibrační křivku, nemusela jsem používat standardy, a proto jsem objem reagensií vynásobila pouze počtem vzorků určených pro měření. Zkumavku s pracovním roztokem jsem zvortexovala a zcentrifugovala.

Do 0,5 ml zkumavky jsem napipetovala 190  $\mu$ l připraveného pracovního roztoku a k němu přidala 10  $\mu$ l izolované DNA z příslušného vzorku. Směs jsem krátce zvortexovala, zcentrifugovala a nechala ji inkubovat při pokojové teplotě po dobu

2 min. Přístroj jsem mezitím zapojila a pomocí dotykového displeje na něm navolila měření pro dsDNA. Dále jsem zvolila, že nechci provádět kalibraci, a použila jsem kalibrační křivku z nedávného měření. Zkumavku jsem vložila do přístroje a provedla měření pomocí tlačítka Read. Výsledek na fluorometru jsem nechala pomocí tlačítka Calculate Stock Cone přepočítat na objem 10  $\mu$ l. Měření dalšího vzorku jsem provedla pomocí tlačítka Read Next Sample. Všechny výsledky jsem si zaznamenala.

#### 7.4 PCR reakce

U vzorků DNA byla provedena amplifikace pomocí metody PCR, díky které byl z DNA získán požadovaný úsek *MBL2* genu. Pro tento úsek byly primery navoleny tak, aby amplifikovaný úsek zahrnoval exon 1, v němž se nachází všechny tři zkoumané mutace pro alely wild type, B, C a D. Sekvence primerů forward a reverse byly převzaty z odborné práce Ramasawmy et al. (2008). Použité primery jsou shrnuty v tab. 7.

**Tabulka 7:** Přehled sekvencí použitých primerů

Primer	Sekvence
Forward	5'-CATCAACGGCTTCCCAGGCAAAGATGCG-3'
Reverse	5'-CAGGCAGTTTCCTCTGGAAGGTAAAG-3'

Zdroj: vlastní

Pro přípravu PCR reakce jsem použila kit PCR BIO HS Taq Mix. Seznam použitých reagensií a jejich množství pro přípravu 1 reakce a jejich přepočet na přípravu 10 reakcí jsou uvedeny v tab. 8. Seznam použitých přístrojů a spotřebního materiálu je uveden v tab. 9.

**Tabulka 8:** Přehled reagensií a objemů použitých pro 1 a 10 reakcí

1 reakce		10 reakcí	
Reagencie	Objem ( $\mu$ l)	Reagencie	Objem ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	8,25	H <sub>2</sub> O	82,5
MM – master mix	12,5	MM – master mix	125
DMSO	1,25	DMSO	12,5
Forward primer	0,5	Forward primer	5
Reverse primer	0,5	Reverse primer	5
DNA	2	DNA	2x10
Celkem objem	25	Celkem objem	250

Zdroj: vlastní

**Tabulka 9:** Přehled použitého spotřebního materiálu a přístrojů

Spotřební materiál	Přístroje	Výrobce přístroje
rukavice	automatické pipety	-
0,2 ml mikrozkušavky	FV-2400, Mini-centrifuge/Vortex Microspin	Biosan
1,5 ml zkumavky	MultiGene Gradient Cycler	Labnet International Inc.
špičky		-

Zdroj: vlastní

Přípravu PCR reakce jsem prováděla v laminárním boxu. Nejprve jsem si potřebné reagenty vyndala z mrazicího boxu a nechala je rozmrazit. Do chladicího stojánku jsem si připravila 0,2 ml mikrozkušavky, které jsem si označila identifikačními čísly vzorků a jednu zkumavku určila pro negativní kontrolu. Dále jsem si připravila větší zkumavku o objemu 1,5 ml, ve které jsem si následně připravila reakční mix pro příslušný počet vzorků. Objem reagentů pro 1 reakci (viz tab. 8) jsem si nejdříve přepočítala na objem odpovídající počtu zpracovávaných vzorků. Rozmražené reagenty jsem zvortexovala a zcentrifugovala. Přepočítané objemy jednotlivých reagentů jsem si napipetovala do zkumavky a pokaždé směs promíchala pomocí špičky. Připravený reakční mix jsem zvortexovala, zcentrifugovala a následně ho rozpipetovala do označených mikrozkušavek po 23  $\mu$ l. K negativní kontrole jsem přidala 2  $\mu$ l vody. Do ostatních mikrozkušavek jsem přidala 2  $\mu$ l odpovídajícího vzorku DNA. Vzorky DNA jsem před použitím zvortexovala a zcentrifugovala. Pokud byly uchovávány v mrazicím boxu, bylo nutné je nejdříve nechat rozmrazit a zvortexovat. Výslednou směs reakčního mixu a DNA o celkovém objemu reakce 25  $\mu$ l jsem opět zvortexovala a zcentrifugovala. Takto připravené mikrozkušavky jsem umístila do termocyklu, na kterém jsem zvolila předem nastavený PCR reakční protokol. Reakční protokol byl částečně převzat z odborné práce Ramasawmy et al. (2008). Reakční protokol PCR reakce jsem shrnula v tab. 10.

**Tabulka 10:** Protokol PCR reakce

Počet cyklů	Fáze	Teplota	Čas
1	počáteční denaturace	95 °C	2 min
35	denaturace	95 °C	20 s
	anealing	62 °C	20 s
	extanze	72 °C	30 s
1	terminální extanze	72 °C	7 min
-	chlazení	4 °C	-

Zdroj: vlastní

## 7.5 Gelová elektroforéza

Po ukončení PCR reakce byly produkty zkontrolovány pomocí gelové elektroforézy. Díky ní bylo možné ověřit, zda PCR produkty mají odpovídající délku 119 bp. Pro gelovou elektroforézu bylo nutné nejprve připravit 4% agarózový gel.

### 7.5.1 Příprava gelu

Před samotným provedením elektroforézy jsem si nejdříve připravila 4% agarózový gel. Seznam použitých reagensů a spotřebního materiálu pro přípravu gelu je uveden v tab. 11. Seznam použitých přístrojů je shrnut v tab. 12.

**Tabulka 11:** Přehled použitých reagensů a spotřebního materiálu

Reagencie	Spotřební materiál
TBE pufr	rukavice
agarózové tablety	špičky
barva EliDNA™ PS GREEN	

Zdroj: vlastní

**Tabulka 12:** Přehled použitých přístrojů

Přístroje	Výrobce
mikrovlnná trouba SMW 2917	SENCOR
automatické pipety	-

Zdroj: vlastní

Připravila jsem si elektroforetickou formu, do kterého jsem umístila hřebeny pro vytvoření budoucích jamek pro vzorky. Do plastové kádinky jsem si odlila 50 ml již připraveného 1xTBE pufru. Abych docílila 4% agarózového gelu, přidala jsem do kádinky 4 tablety agarózy (2 g agarózy). Tablety jsem nechala úplně rozpustit

a kádinku pak umístila do mikrovlnné trouby, ve které jsem cca 3 minuty ohřívala roztok při maximálním výkonu. Obsah kádinky jsem při ohřevu pozorovala a kontrolovala, aby mi její obsah při vyublání nepřetekl. V případě potřeby jsem kádinku vyndala z mikrovlnné trouby, promíchala krouživým pohybem a vrátila zpět k ohřevu. K provařenému gelu jsem přidala 15 µl fluorescenční barvy EliDNA™ PS GREEN a důkladně ji promíchala s gelem. Hotovou směs jsem nalila do připravené formy a špachtličkou odstranila veškeré bubliny, které by jinak negativně ovlivňovaly průběh elektroforézy. Gel jsem nechala zatuhnout. Po ztuhnutí gelu jsem z něj vyndala hřebeny a umístila gel do elektroforetické vany s 1xTBE pufrem, který jsem dolila tak, aby byl gel plně ponořen.

### 7.5.2 Aplikace vzorků na gel a jejich detekce

Seznam použitých reagensí, spotřebního materiálu a přístrojů pro gelovou elektroforézu je shrnut v tab. 13 a tab. 14.

**Tabulka 13:** Přehled použitých reagensí a spotřebního materiálu

Reagencie	Spotřební materiál
marker 100 bp DNA LADDER H3RTU	rukavice
	špičky

Zdroj: vlastní

**Tabulka 14:** Přehled použitých přístrojů

Přístroje	Výrobce
automatické pipety	-
Mupid One elektroforéza	Nippon Genetics
Mupid One LED illuminator	Nippon Genetics

Zdroj: vlastní

Do první jamky gelu umístěného v elektroforetické vaně jsem napipetovala 5 µl markeru 100 bp DNA LADDER H3 RTU. Do dalších jamek jsem postupně napipetovala vzorky po 5 µl a ukončila řadu negativní kontrolou. Elektroforézu jsem nechala probíhat při 135 V po dobu 15 min. Výsledný gel jsem přenesla na detekční systém, kde jsem zkontrolovala PCR produkty. V případě potřeby jsem gel vrátila zpět do elektroforetické vany a nechala probíhat elektroforézu ještě několik dalších minut. Gel jsem pomocí detekčního systému vyfotila a uložila jeho fotografii na paměťovou kartu.

## 7.6 Sekvenování

V odborné práci Ramasawmy et al. (2008) byla pro analýzu polymorfismů v *MBL2* genu v exonu 1 využita metoda PCR RFLP za použití restrikčních enzymů BanI, MboII a HhaI. Pro náš výzkum však nebyla využita PCR RFLP metoda. Místo toho byla využita rychlejší a levnější metoda, tj. sekvenování PCR produktů ve spolupráci s firmou SEQme s.r.o. Tato firma využívá sekvenátory od firmy Applied Biosystems, pracující na principu sekvenování podle Sangerova. Díky sekvenaci příslušného PCR produktu z reverse primeru bylo možné analyzovat všechny tři kodóny 52, 54 i 57 (jejichž změny odpovídají alelám D, B a C) po provedení jediné sekvenační reakce.

Před sekvenováním je nutné PCR produkty přečistit, a odstranit tak zbytky krátkých sekvencí, primerů a nevyužitých nukleotidů. Tyto příměsi by negativně ovlivňovaly proces sekvenování. Příprava vzorku pro sekvenaci zahrnuje správné naředění přečištěného PCR produktu a sekvenačního primeru. Požadavky firmy SEQme s.r.o. se týkaly: přečištění PCR produktů, jejich správného naředění na požadovanou koncentraci a jejich smíchání se sekvenačním primerem do jedné zkumavky.

K vzorku je nutné přidat pouze jeden z primerů, který je zvolen podle potřeby. Pokud je nutné osekvenovat vzorek z obou stran, vytvoří se pro vzorek 2 zkumavky lišící se typem přidaného primeru. V našem případě se jednalo o velmi krátký PCR produkt, a proto byla vhodná sekvenace pouze pomocí primeru *MBL2* reverse. Hledané mutace se vyskytovaly v první polovině PCR produktu. Pro každý vzorek byla tedy připravena jen jedna mikrozkušavka, která byla odeslána k sekvenaci.

### 7.6.1 Přečištění PCR produktů pomocí Gene All® Expin™ PCR SV kit

Pro přečištění PCR produktů byl využit kit Expin™ PCR SV kit od firmy Gene All®. Přehled reagensií a spotřebního materiálu použitého pro přečištění je uveden v tab. 15. Seznam použitých přístrojů je uveden v tab. 16.

**Tabulka 15:** Seznam použitých reagensí a spotřebního materiálu

Reagencie		Spotřební materiál
Buffer PB	PCR Purification Buffer	rukavice
Buffer NW	Column Wash Buffer N	špičky
Buffer EB	Elution Buffer	SV kolonky typu D
		sběrné zkumavky
		mikrozkumavky

Zdroj: vlastní

**Tabulka 16:** Přehled použitých přístrojů

Přístroje	Výrobce
automatické pipety	-
Centrifuge 5415R, without rotor	Eppendorf
Standardrotor F 45-24-11	Eppendorf

Zdroj: vlastní

### 7.6.1.1 Pracovní postup

Připravila jsem si všechny potřebné reagencie obsažené v kitu a pro každý PCR produkt jsem si připravila kolonku, sběrnou zkumavku a mikrozkumavky. Zkumavky jsem si označila identifikačními čísly vzorků. Do mikrozkumavky jsem napipetovala jeden díl PCR produktu, který jsem smíchala s pěti díly BP Bufferu, směs jsem zvortexovala a zcentrifugovala. Tento roztok jsem následně přepipetovala na kolonku usazenou ve sběrné zkumavce a zkumavku zcentrifugovala po dobu 30 s při > 12 000 rpm. Eluát jsem odstranila a umístila kolonku zpět do stejné sběrné zkumavky. Pro promytí kolonky jsem přidala následně 700 µl promývacího bufferu NW a opět odstředila za stejných podmínek. Odstředěný roztok jsem vylila a zkumavku opětovně zcentrifugovala po dobu 1 minuty při nejvyšších otáčkách na sucho, aby se odstranil všechny promývací roztok. Kolonku jsem umístila do čisté označené mikrozkumavky, na střed kolonky jsem aplikovala 50 µl elučního roztoku EB bufferu a nechala 1 min inkubovat při pokojové teplotě. Poté jsem zkumavku odstředila při nejvyšších otáčkách. Výsledný eluát s přečištěným PCR produktem jsem zkontrolovala pomocí elektroforézy (postup elektroforézy je uveden v kapitole číslo 7.5). Zkontrolovaný PCR produkt jsem připravila pro sekvenaci a k odeslání do firmy SEQme s.r.o. (popsáno v podkapitole 7.6.3).

### 7.6.2 Přečištění PCR produktu pomocí ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup

Výsledky sekvencí vzorků přečištěných pomocí Expin™ PCR SV kitu zaslané firmou SEQme s.r.o. byly problematické. Obsahovaly mnoho kratších sekvencí a výsledná sekvenace nebyla velmi kvalitní. Výsledky bylo sice možné odečíst, ale pro další vzorky byla zvolena jiná metoda přečištění s využitím kitu ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup od firmy ThermoFisher Scientific. Použité reagensie, spotřební materiál a přístroje potřebné pro přečištění PCR produktů jsou uvedeny v tab. 17 a tab. 18.

**Tabulka 17:** Přehled použitých reagensií a spotřebního materiálu

Reagensie	Spotřební materiál
ExoSAP-IT™ reagent	rukavice
	špičky
	0,2 ml mikrozkušavky

Zdroj: vlastní

**Tabulka 18:** Přehled použitých přístrojů

Přístroje	Výrobce
automatické pipety	-
MultiGene Gradient Cyclor	Labnet International Inc.
Standardrotor F 45-24-11	Eppendorf

Zdroj: vlastní

#### 7.6.2.1 Pracovní postup

Následující pracovní postup byl proveden dle doporučení výrobce. Pro každý PCR produkt jsem si připravila 0,2 ml mikrozkušavku, kterou jsem popsala identifikačním číslem vzorku. Do mikrozkušavek jsem napipetovala 5 µl PCR produktu a přidala k němu 2 µl ExoSAP-IT™ reagentu. Mikrozkušavky jsem zcentrifugovala a umístila do termocykleru, kde jsem zvolila reakční protokol pro přečištění. Reakční protokol je shrnut v tab. 19.

**Tabulka 19:** Reakční protokol pro přečištění PCR produktů pomocí ExoSAP-IT™

Fáze	Teplota	Čas
Degradace primerů a nukleotidů	37 °C	15 min
Inaktivace reagentu ExoSAP-IT™	80 °C	15 min

Zdroj: vlastní



### 7.6.3 Příprava vzorků pro sekvenaci

Přečištěný PCR produkt musí být před odesláním na sekvenaci ještě patřičně připraven a naředěn dle požadavků firmy SEQme s.r.o. Ke každému vzorku bylo nutné přidat odpovídající primer. V našem případě nám stačila zpětná sekvence PCR produktů, kterou zajistil *MBL2* reverse primer. Využité reagentie, spotřební materiál a přístroje jsou shrnuty v tab. 20.

**Tabulka 20:** Přehled použitých reagentií, spotřebního materiálu a přístrojů

Reagentie	Spotřební materiál	Přístroje
deionizovaná voda	rukavice	automatické pipety
<i>MBL2</i> reverse primer	0,2 ml mikrozkušavky	
	špičky	

Zdroj: vlastní

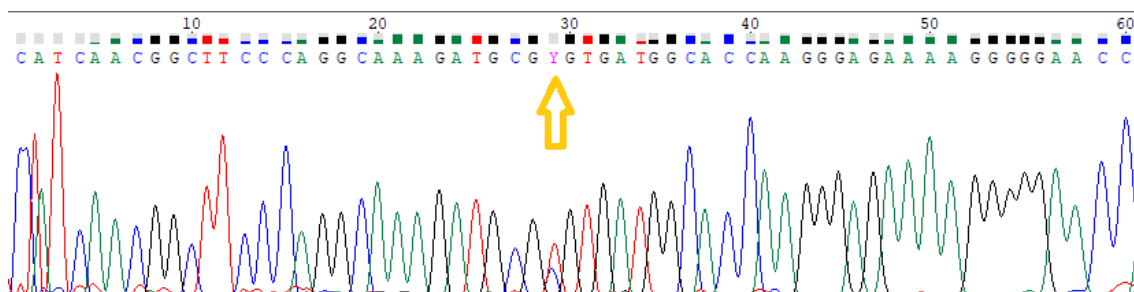
V laminárním boxu jsem si připravila příslušný počet 0,2 ml mikrozkušavek, které jsem si označila čísla přiřazenými k jednotlivým vzorkům. Do další 0,2 ml mikrozkušavky jsem si připravila směs vody a primeru *MBL2* reverse. Objem reagentií bylo nutné zvolit na základě koncentrace výsledných PCR produktů při gelové elektroforéze. Pruhy na gelu byly vždy dobře viditelné, proto stačilo menší množství těchto produktů. Výsledný objem ve zkumavce určené k odeslání pro sekvenování činí 10  $\mu$ l. Pro každý vzorek byl tedy použit objem 0,5  $\mu$ l primeru o koncentraci 20 pmol, 1  $\mu$ l PCR produktu odpovídající přibližně 50 ng DNA a objem deionizované vody dopočítaný tak, aby výsledný objem zkumavky činil požadovaných 10  $\mu$ l, objem vody tedy činil 8,5  $\mu$ l.

### 7.6.4 Vyhodnocení sekvencí

Výsledné sekvence jsem zpracovala v PC pomocí freewarového programu Chromas. Nejdříve jsem v programu sekvenci editovala tak, aby se mi reverzně přepsala dle komplementarity. Ze sekvencí jsem vymazala koncové šумы a sekvenci prohlédla a zkontrolovala. Výsledné sekvence a zjištěné mutace jsem si zaznamenala. Soubor jsem exportovala ve formátu FASTA, kterým jsem následně mohla porovnat sekvenci vzorků s genovou databází NCBI (National Center for Biotechnology Information). Porovnání jsem dělala pomocí nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), který je součástí Národní zdravotní instituce (NIH, National Institutes of Health).

#### 7.6.4.1 Vyhodnocení kodonu 52

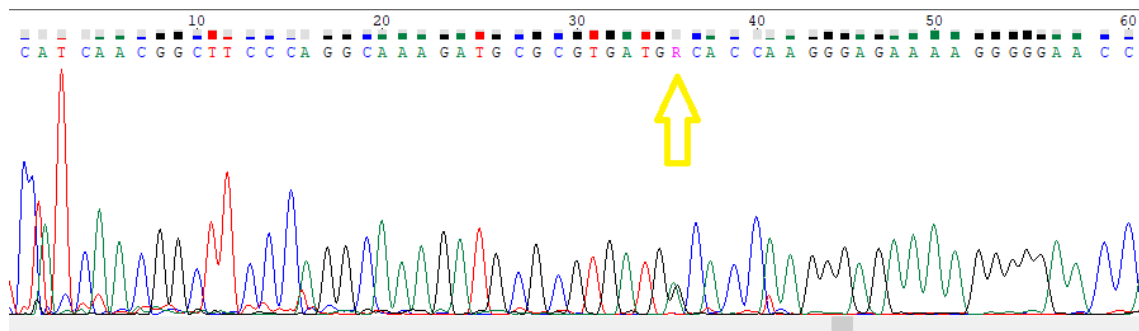
V PCR produktu dlouhém 119 bp se polymorfismus pro kodon 52 vyskytuje na pozici 28. nukleotidu. Zde mohou nastat celkem 3 případy možných genotypů a to wild type homozygot A/A, heterozygot A/D či homozygot D/D. Wild type v této pozici obsahuje nukleotid C. Pokud je tento nukleotid nahrazen T, jedná se o polymorfismus označovaný jako alela D v homozygotním stavu. Heterozygot je v sekvenci zaznamenán pomocí IUPAC codes (International Union of Pure and Applied Chemistry) pomocí písmene Y, které označuje výskyt nukleotidu C i T (obr. 9). Tyto kódy představují označení nukleotidu alternativními písmeny, jež jsou symbolem pro dva až tři různé nukleotidy.



**Obrázek 9:** Sekvence heterozygota A/D (vzorek č. 25). Zdroj: vlastní

#### 7.6.4.2 Vyhodnocení kodonu 54

V PCR produktu dlouhém 119 bp se polymorfismus pro kodon 54 vyskytuje v pozici 35. nukleotidu. Zde můžou nastat 3 varianty genotypů a to homozygotní wild type A/A, homozygot pro alelu B, tzn. B/B, nebo heterozygot A/B. U wild type alel se v příslušném lokusu nachází G. U homozygotů pro B alelu se v místě nachází A. Dle IUPAC code se výskyt nukleotidu G i A současně značí písmenem R (obr. 10).



**Obrázek 10:** Sekvence heterozygota A/B (vzorek č. 19). Zdroj: vlastní

#### 7.6.4.3 Vyhodnocení kodonu 57

V PCR produktu dlouhém 119 bp se polymorfismu kodonu 57 vyskytuje v pozici 44. nukleotidu. Stejně jako v ostatních kodonech zde mohou nastat 3 situace: homozygot pro wild type alely A/A, homozygot C/C a heterozygot A/C. Wild type alela nese v této pozici nukleotid G. V případě náhrady G za A se jedná o homozygotní C alelu. Heterozygot je označován pomocí IUPAC code písmenem R, které označuje výskyt nukleotidu G i A současně. Sekvence obsahující C alelu se v souboru nevyskytla.

#### 7.6.4.4 Změna v oblasti forward primeru

Při porovnávání sekvencí v nástroji BLAST lze u každého vzorku pozorovat neshodu v oblasti primeru. Vzniká důsledkem cíleně zvoleného primeru forward, u nějž je nukleotid záměrně nahrazen, a není tedy projevem žádného polymorfismu ani chyby vzniklé při sekvenování. Tato úprava se dělá z technického důvodu, aby nebyly dva nukleotidy G umístěny vedle sebe na 3' konci, čímž se snižuje riziko nespecifického nasednutí primeru. Tuto situaci ukazuje obr. 11, jež znázorňuje sekvenci člověka bez mutace odpovídající analyzovaným kodonům.

## Homo sapiens mannose binding lectin 2 (MBL2), transcript variant 1, mRNA

Sequence ID: [NM\\_000242.3](#) Length: 3521 Number of Matches: 1

Range 1: 143 to 202 [GenBank](#) [Graphics](#)

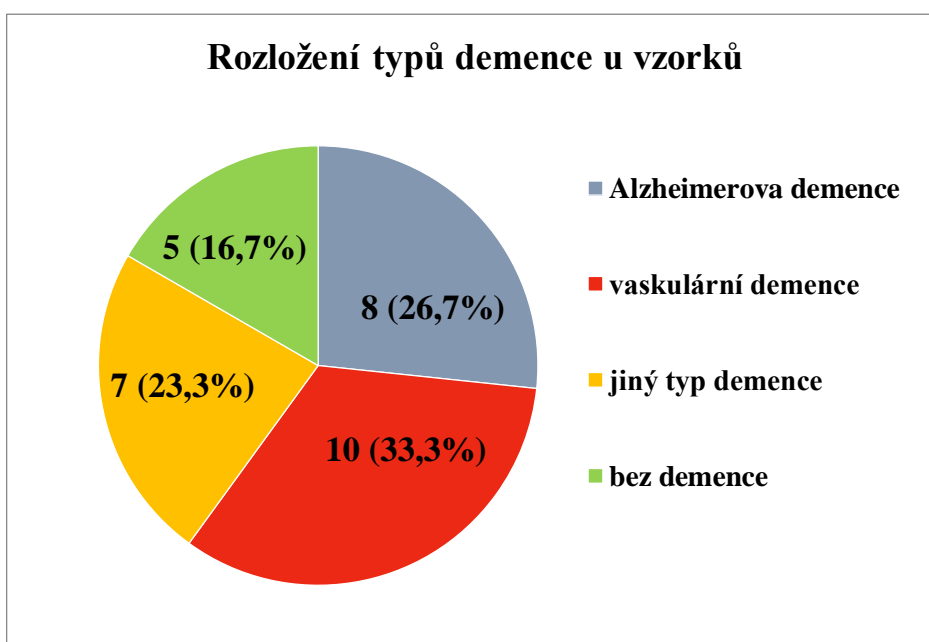
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
106 bits(57)	7e-20	59/60(98%)	0/60(0%)	Plus/Plus
Query 1	CATCAACGGCTTCCCAGGCAAAGATGCGCGTGATGGCACCAAGGGAGAAAAGGGGGAACC	60		
Sbjct 143	CATCAACGGCTTCCCAGGCAAAGATGGGCGTGATGGCACCAAGGGAGAAAAGGGGGAACC	202		

↑

**Obrázek 11:** Výsledek porovnání vzorku (horní řádek) s databází BLAST (referenční dolní řádek). Červeně je označeno místo neshody vzniklé záměrnou úpravou primeru. (vzorek č. 1). Zdroj: vlastní

## 8. Výsledky

V období od února 2019 do března 2020 bylo v laboratoři GENLABS s. r. o. v Českých Budějovicích analyzováno celkem 30 vzorků na přítomnost polymorfismů v exonu 1 *MBL2* genu. Z tohoto počtu bylo vyšetřeno 25 vzorků od pacientů s diagnostikovaným typem demence (obr. 12) v seniorském věku a 5 vzorků pocházejících od lidí mladších 65 let bez známek demence. Z celkového počtu 30 analyzovaných vzorků se jednalo o 23 žen a 7 mužů pocházejících z České Republiky.



**Obrázek 12:** Zastoupení jednotlivých typů demence u vzorků. Zdroj: vlastní

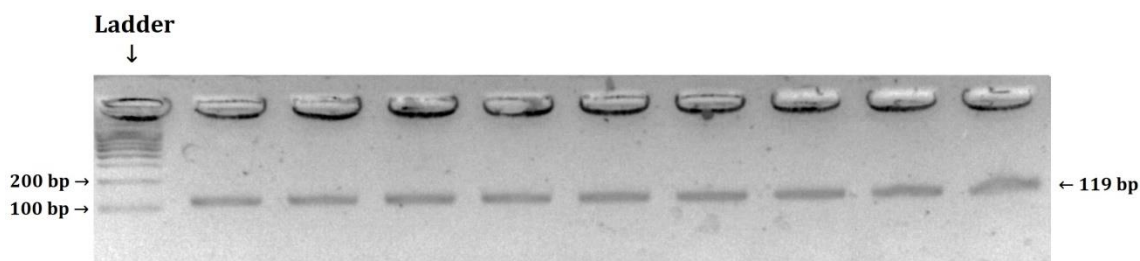
28 vzorků bylo analyzováno z periferní krve (PK) a 2 vzorky pocházející od osob bez demence z bukalního stěru (BS). U izolovaných vzorků byla následně změřena koncentrace DNA. Z tab. 21 lze vyčíst, že BS měly dokonce výrazně vyšší koncentrace DNA než vzorky izolované z PK. Tyto vzorky si respondenti odebírali sami a dostatečné koncentrace naznačují, že odběr byl proveden správným způsobem.

**Tabulka 21:** Přehled primárních materiálů vzorků a koncentrace izolátů

Číslo vzorku	Typ	Koncentrace DNA (ng/ul)	Číslo vzorku	Typ	Koncentrace DNA (ng/ul)
1	PK	23,6	16	PK	48,5
2	PK	49,6	17	PK	67,6
3	PK	68,8	18	PK	36,3
4	PK	45,2	19	PK	32,9
5	PK	35,8	20	PK	33,7
6	PK	36,7	21	PK	19,3
7	PK	34,4	22	PK	20,9
8	PK	39,9	23	PK	38,9
9	PK	35,6	24	PK	10
10	PK	32,7	25	PK	21,3
11	PK	18,9	26	PK	81,8
12	PK	56,3	27	PK	29,9
13	PK	35,6	28	PK	85,5
14	PK	36,7	29	BS	94,7
15	PK	49,9	30	BS	100

Zdroj: vlastní

U všech vzorků byla provedena PCR amplifikace pomocí forward a reverse primerů ohraničujících úsek *MBL2* genu v oblasti exonu 1. PCR produkty byly dlouhé 119 bp, tato délka byla ověřena pomocí gelové elektroforézy (obr. 13).

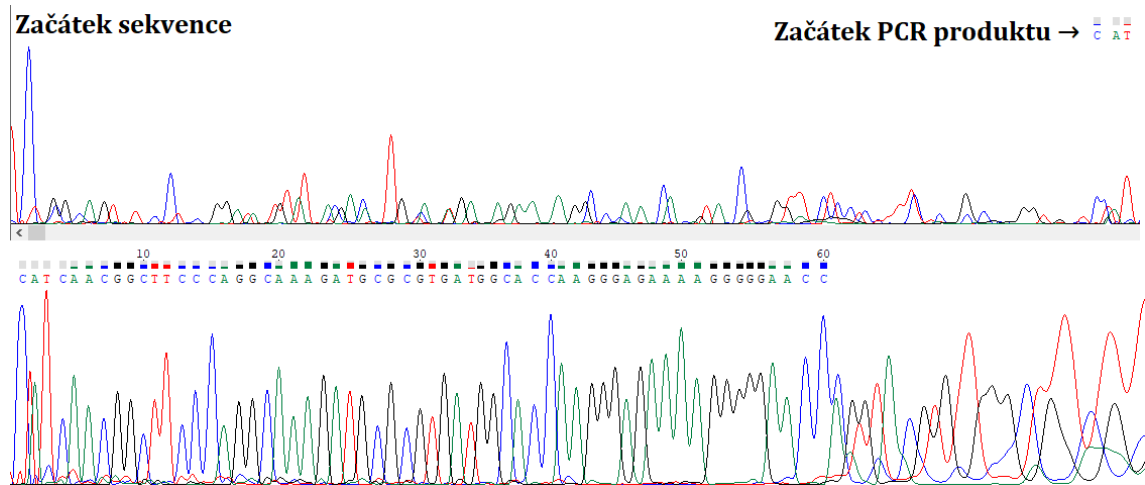


**Obrázek 13:** Výsledky elektroforézy PCR produktů dlouhých 119 bp. Vpravo se nachází 100 bp DNA Ladder, následující jamky obsahují vzorky č.10-16, 29 a 30.

Zdroj: vlastní

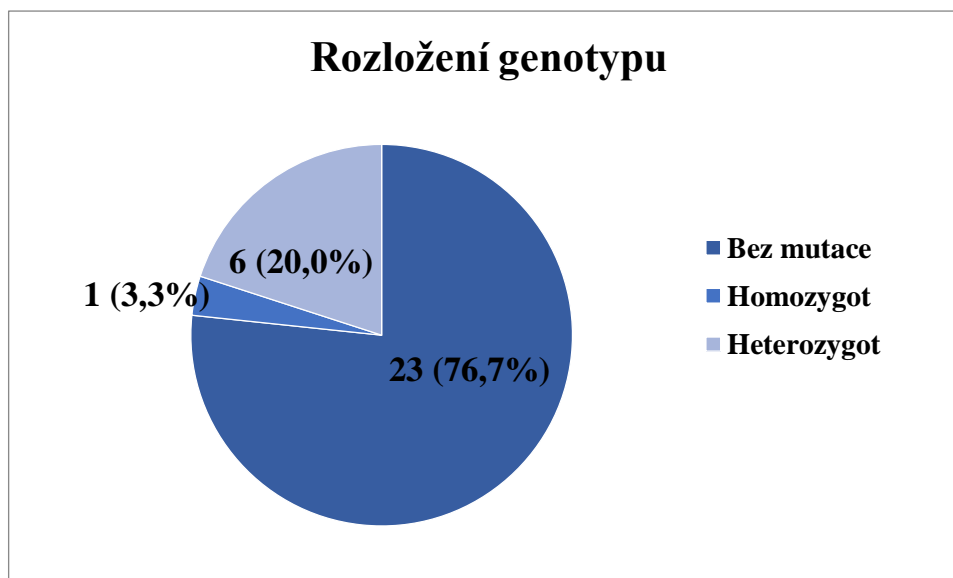
Vyhodnocení polymorfismů probíhalo na základě získaných sekvencí PCR produktů, které byly poskytnuty firmou SEQme s.r.o. K odečtení vzorků byl použit program Chromas. Z celkového počtu výsledků sekvencí obsahovalo 9 vzorků vedlejší sekvence (obr. 14). PCR produkty těchto vzorků byly přečištěné pomocí kitu Expin™ PCR SV kit od firmy Gene All®. Při přečišťování touto metodou nebyly PCR produkty dostatečně přečištěny. Výsledky bylo i přesto možné spolehlivě odečíst. Zbylé PCR produkty byly přečištěny pomocí kitu ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup od firmy

ThermoFisher Scientific, tyto sekvenační výsledky odpovídaly očekávanému úseku genu *MBL2*.



**Obrázek 14:** Porovnání sekvencí 2 vzorků, jejichž PCR produkt byly přečištěny pomocí odlišné metody. Horní vzorek (č. 1) obsahuje vedlejší sekvence, dolní sekvence (vzorek č. 6) je neobsahuje. Zdroj: vlastní

Z analyzovaného souboru dat bylo zjištěno celkem 23 osob, které nevykazovaly žádnou z hledaných mutací v kodonech 52, 54 a 57, a byly tak určeny jako wild type homozygoti A/A. Zbýlých 7 vzorků obsahovalo mutaci, 5 z nich bylo heterozygotní pro jednu alelu, 1 byl heterozygotní pro 2 alely (zařazen do skupiny heterozygotů) a pouze 1 vzorek nesl homozygotní mutovanou alelu (obr. 15).



**Obrázek 15:** Rozložení genotypu zdravých i patientských vzorků. Zdroj: vlastní

Mutace *MBL2* genu se objevily u žen i mužů a to jak u patientských, tak i u zdravých vzorků. U vzorků seniorů bylo zjištěno celkem 5 vzorků nesoucích mutovanou alelu. Jeden z nich byl homozygotní pro alelu B/B a byl jediným vzorkem ze souboru nesoucí mutovaný homozygotní genotyp. Tři vzorky byly heterozygotní A/B a jeden A/D. Mutace byly zjištěny u pacientů s Alzheimerovou demencí, vaskulární demencí a nespecifickou demencí. U zdravých osob bez znaků demence nesly mutace 2 vzorky z 5, jeden genotypu A/D a druhý heterozygotní pro dvě alely A/D a A/B. Přehled vzorků nesoucích mutaci včetně jejich pohlaví a diagnózy demence je uveden v tab. 22.

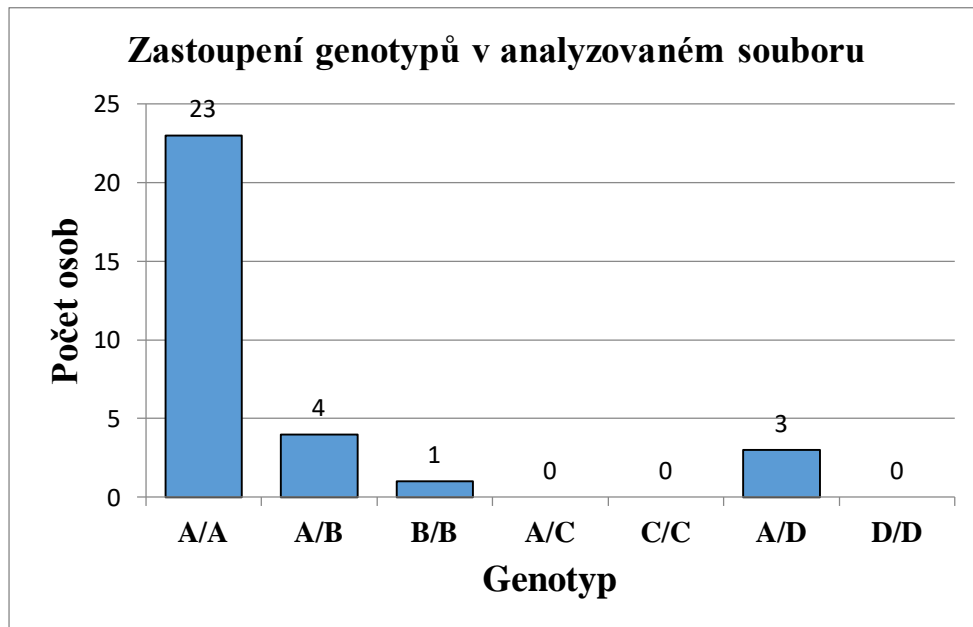
**Tabulka 22:** Přehled osob nesoucích polymorfismus, jejich pohlaví a diagnostikovaný typ demence.

Číslo vzorku	Pohlaví	Demence	Polymorfismus
8	žena	Alzheimerova	B/B
12	žena	Alzheimerova	A/B
13	muž	nespecifická	A/B
19	žena	vaskulární	A/B
25	muž	vaskulární	A/D
26	žena	ne	A/D
29	žena	ne	A/D A/B

Zdroj: vlastní



V souboru analyzovaných vzorků se nevyskytla ani jedna alela C a to jak v homozygotním, tak ani v heterozygotním stavu. Neobjevil se ani žádný homozygot pro alelu D. Zastoupení jednotlivých genotypů analyzovaného souboru jsou znázorněny na obr. 16. Vzorek heterozygotní pro dvě alely je zde započítán pro každou alelu zvlášť, proto zde celkový počet analyzovaných vzorků dosahuje počtu 31.



**Obrázek 16:** Přehled zastoupení genotypů u analyzovaného souboru. Zdroj: vlastní

## 9. Diskuze

Molekulární struktura *MBL2* genu byla objasněna již v roce 1989 (Taylor et al., 1989, Sastry et al., 1989). V odborných pracích jako je třeba Madsen et al. (1995), Casanova et al. (2004), Garred et al. (2006) nebo Sandoval et al. (2014) je popsáno celkem 6 různých polymorfismů. Těmito polymorfismy jsou H/L a X/Y alely v oblasti promotoru 1, P/Q alely v oblasti netranslatovaného 5' konce regulačního lokusu a alely B, C, D (neboli nulové alely) v oblasti exonu 1. V databázi NCBI však můžeme pozorovat, že variant v *MBL2* genu existuje daleko více.

V této bakalářské práci bylo analyzováno 30 vzorků na výskyt alel B, C a D v exonu 1 *MBL2* genu pomocí Sangerova sekvenování pocházejících od seniorů postižených některým typem demence (25 vzorků) a zdravých pacientů (5 vzorků).

Gynotypizací *MBL2* genu u demenčních pacientů se jako první zabývala odborná práce Sjölander et al. (2013). V této práci bylo vyšetřeno 448 pacientů s AD a 199 kontrolních vzorků kavkazské populace. Žádný z pacientů nevykazoval historii autozomálně dominantně dědičné demence a kontrolní skupina neměla výskyt demence v rodinné anamnéze. Studie provedla analýzu všech šesti polymorfismů *MBL2* genu pomocí metody INNO-LIPA od firmy Innogenetics, což je hybridizační metoda, která není v současnosti komerčně dostupná. Nebyly zde odhaleny statisticky významné rozdíly pro výskyt genotypu A/A mezi pacienty s AD a kontrolní skupinou, zatímco alely B se vyskytovaly u AD pacientů s menší frekvencí než u zdravé populace. Zároveň zde byly zjištěny dva haplotypy LXPA a LYQA, které byly označeny jako rizikové pro onemocnění AD. Naopak se zde vyskytovaly i ochranné haplotypy LYP- a HYP-.

Ve výzkumu v rámci této bakalářské práce byla alela B (v heterozygotním nebo homozygotním stavu) zjištěna u 16 % demenčních pacientů a u 20 % zdravé skupiny. V korespondenci se Sjölander et al. (2013) se i v této analýze ukázal menší výskyt B alely u pacientů s demencí. Počet vyšetřených vzorků byl oproti Sjölander et al. (2013) výrazně nižší, proto mohou být procentuální zastoupení jen hrubě orientační. Stejně tak kontrolní skupina byla málo zastoupena. Vyšetření většího počtu vzorků by bylo finančně velmi náročné pro účely bakalářské práce a ze stejného důvodu nebyly ani vyšetřovány polymorfismy v netranslatovaných oblastech. Nelze tedy ověřit

ani odhadnout výskyt rizikových haplotypů LXPA a LYQA, které obsahují wild type alelu A.

Přestože se na Sjölander et al. (2013) odkazuje několik studií, žádná z nich již neprovedla výzkum polymorfismů *MBL2* genu v exonu 1 u pacientů s AD. Zdá se tedy, že se jedná dosud o neprozkoumané téma.

Na základě výzkumu v rámci bakalářské práce můžeme sledovat orientační údaje o zastoupení genotypů *MBL2* genu v rámci české populace. Genotyp A/A byl v analyzovaném souboru zastoupen většinou a to v 76,7 %. Alela A, tedy wild type, byla nejvíce zastoupenou alelou v souboru. Druhou nejčastější alelou byla alela B, tedy v 13,3 % jako genotyp A/B a v 3,3 % v homozygotním stavu B/B. Alela D byla zastoupena pouze v kombinaci A/D a to v 10 % případů. Nulové zastoupení pak měla alela C, která v souboru nebyla prokázána u žádného vzorku.

Pro srovnání s další skupinou české populace lze využít poznatky studie Skalníková et al. (2004). Tato studie využila pro genotypizaci 359 vzorků metody restriční štěpení a sekvenování. Z výsledků lze pozorovat většinové zastoupení A/A genotypu a to v 68,0 %. Po A/A genotypu byl nejčtenější genotyp A/B (19,2 %), stejně jako v našem výzkumu, a třetím nejzastoupenějším byl genotyp A/D (8,4 %). Zastoupení těchto tří nejčtenějších genotypů koresponduje s našimi zjištěnými výsledky. Studie Skalníkové také prokazuje 1,1% zastoupení genotypu A/C, který jsme v našem výzkumu neprokázali. Studie našla také B/B genotyp (1,1 %) a dvojitou heterozygotnost pro B/D alely (1,1 %), jež byly zastoupeny i u našich vzorků. Homozygotnost pro C alelu se ani zde neprokázala, na rozdíl od toho se zde však vyskytly dva případy homozygotní alely D a 2 heterozygoti pro alely B/C. Tyto případy genotypů jsme nezachytili. Ve studii si také můžeme všimnout, že zápis dvojitého heterozygota je ve tvaru B/C. Tento zápis pokládám za nevhodný, neboť obě alely se vyskytují v odlišném lokusu, a zapsaný genotyp tak může milně nabývat dojmu, že se jedná o dvojitou homozygotní mutaci.

Další studií zabývající se slovanským národem je studie Tarova et al. (2012), která prováděla genotypizaci *MBL2* genu u slovenských pacientů s CF. Tato studie shledává genotyp A/A také jako většinový a to v 64,9 % souhrnně pro kontrolní skupinu i studovanou skupinu pacientů s CF s celkovým rozsahem 191 osob. Méně zastoupen

byl genotyp A/B v 20,4 %. Stejně jako v našem souboru se jednalo o druhý nejrozšířenější genotyp. Třetím nejpočetnějším genotypem ve studii i v našem výzkumu byl genotyp A/D v 11,0 %. Studie Tarova et al. (2012) potvrzuje i zastoupení C alely ve formě A/C v 6,3 %. Stejně jako náš výzkum objevila Tarova jediný případ homozygotního genotypu a to pro alelu B. Jiné alely v homozygotním stavu nebyly zachyceny. V 6ti případech se vyskytl také kombinovaný heterozygotní genotyp pro BD, CD a BC alely. Nejzastoupenějším z nich byl heterozygotní genotyp pro alely BD, který se v naší studii v jednom případě také objevil.

Jak můžeme vidět, zastoupení jednotlivých genotypů české a slovenské populace vykazuje určité shody v pořadí nejčetnějších genotypů.

Některé odborné publikace uvádějí, že mutace v kodonech 52, 54 a 57 jsou asociovány se změnami sérových hladin *MBL2* proteinu. Například studie Babovic-Vuksanovic et al. (1999) uvádí, že nosiči mutací *MBL2* genu mají snížené hladiny MBL v séru. Tyto hladiny mohou být u heterozygotů A/B až 6,4x nižší, avšak struktura cirkulujícího proteinu má normální molekulární hmotnost i biologickou aktivitu. Heterozygoti A/C vykazují střední hladiny MBL proteinu, zatímco změny v kodonu pro alelu D mohou způsobit až dvojnásobné snížení hladin. Také studie Hammad et al. (2018) ve své práci uvádí, že wild type alely A/A dosahují sérových hladin MBL nad 1 µg/mL, kdežto heterozygoti A/0 se pohybují v rozsahu 0,5-1 µg/mL. Sérové hladiny jedinců nesoucích mutaci pro obě alely (0/0) disponují hladinou nižší než 0,05 µg/mL. Hammad také uvádí, že polymorfismy v kodonu 54 (B alela) jsou asociovány s nižšími koncentracemi MBL mezi pacientkami s RVVC. Zároveň tato studie uvádí souvislost mezi hladinami proteinu s některými haplotypy. Vysoké koncentrace MBL vykazovaly haplotypy HYPA, LYQA a LYPA. Naopak haplotypy LXPA, HYPD, LYPB a LYQC souvisí s jeho nižšími hladinami. Zde je možno vidět, že nemutovaná alela A může nést deficit MBL z důvodu variantní netranslatované oblasti genu. O dalším haplotypu nesoucím alelu A se zmiňuje také Swierzko et al. (2009), který uvádí, že někteří jedinci genotypu HYPA vykazovali fenotyp odpovídající jedincům 0/0 (tzn. B/B, C/C nebo D/D).

Zdá se tedy, že MBL protein ovlivňují nejen mutace v exonu 1, ale i změny v netranslatovaných oblastech. Také Madsen et al. (1995) přisuzuje změny koncentrace proteinu změnám v oblasti promotoru. Konkrétně zmiňuje, že HY alely souvisí

s vyššími koncentracemi, LY se středními a LX s nižšími. Toto zjištění může odůvodňovat i deficit v přítomnosti A alely v kombinaci s LXP z již zmiňované studie Hammad et al. (2018). K myšlence vlivu promotoru na množství MBL se přiklání například i Lee et al. (2005); Garred et al. (2006) nebo Cedzyński et al. (2018).

V kapitole 4.3 jsem zmiňovala některé poznatky o hladinách MBL u demenčních pacientů. Výzkum bakalářské práce se zaměřoval pouze na genové polymorfismy v exonu 1, sérová hladina MBL proteinu tedy nebyla změřena. V korespondenci s jinými odbornými publikacemi není ani možné přiřadit vzorkům předpokládanou hladinu proteinu na základě zjištěných mutací. K tomu by bylo nutné určit celý haplotyp *MBL2* genu, avšak ani v tomto názoru se jednotlivé studie neshodují. Relevantní poznatky by tedy přinesla pouze genotypizace haplotypu *MBL2* genu v rámci většího souboru pacientů i kontrolní skupiny v kombinaci s ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) průkazem sérových a mozkomíšních hladin MBL proteinu, které by mohly poukázat na možné asociace dědičnosti *MBL2* genu a možného výskytu demence.

## Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo sepsání odborné rešerše na téma: Analýza genových polymorfismů *MBL2* genu a její diagnostický význam. V teoretické části bakalářské práce se snažím poskytnout informace o struktuře *MBL2* genu i jeho exprimovaného proteinu. Zabývám se zde také polymorfismy *MBL2* genu a jejich vlivu na sérové koncentrace proteinu i významem těchto variací v asociaci s některými onemocněními, z kterých jsem hlouběji popsala CF, VVK a AD.

Bakalářská práce obsahuje také obecné poznatky o metodách využívaných při analýze polymorfismů jako je izolace DNA a měření její koncentrace, metoda PCR, gelová elektroforéza a sekvenování. Tyto základní molekulárně biologické metody jsem aplikovala v rámci praktické části, která se zaměřila na vyšetření polymorfismů v exonu 1 *MBL2* genu u 30 vzorků, z nichž 25 pocházelo od pacientů postižených demencí. Přesným popisem analýzy se zabývá praktická část této bakalářské práce, ve které jsou následně i shrnuty získané výsledky.

Vyšetření polymorfismů *MBL2* genu nepatří mezi rutinní vyšetření, neboť tyto mutace mají stále velmi nejasný diagnostický význam. Vyšetření těchto polymorfismů se tedy využívá zejména v rámci výzkumu. Běžně jsou však vyšetřovány hladiny MBL v séru pomocí ELISA u dětských pacientů, kteří trpí opakovanými infekcemi. Tyto hladiny ovlivňují mutace v *MBL2* genu. Na základě studií se ukazuje, že na tyto hladiny nemají vliv pouze polymorfismy v exonu 1 (alely B, C, D), ale také změny v netranslatovaných oblastech jako je promotor a 5' netranslatovaný konec regulačního lokusu. Ve fenotypu může hrát roli i mnoho dalších faktorů, neboť u osob stejného genotypu *MBL2* genu se nacházejí rozdílné sérové hladiny proteinu a případně i odlišný průběh nejen infekčních onemocnění. Zároveň vyšetření celého genotypu *MBL2* genu je oproti ELISA metodě náročnější a dražší metodou, která dnes ještě neumí poskytnout přesné informace o jejím dopadu na stav pacienta.

I přes všechny mezery v interpretaci vyskytujících se polymorfismů v *MBL2* genu se objevují zajímavé poznatky popisující jejich asociaci nejen s infekčními a autoimunitními onemocněními. Problematika obsahuje napříč studii mnoho nesrovnalostí, jejichž další studium a objasnění by mohlo přinést užitečné informace

o průběhu a komplikacích několika, především infekčních, nemocí. Zajímavými shledávám také geografické odlišnosti zastoupení genotypů napříč populacemi.

## Seznam použitých zdrojů

1. AMBLER, Z., J. BEDNAŘÍK a E. RŮŽIČKA a kol., 2010. *Klinická neurologie - část speciální*, 2.sv. Praha: Triton. 711-1277 s. ISBN 978-80-7387-389-9.
2. BABOVIC-VUKSANOVIC, D., SNOW, K., TEN, R. M., 1999. Mannose-binding lectin (MBL) deficiency. Variant alleles in a Midwestern population of the United States. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* [online]. 82(2), 134-143, [cit. 2020-02-27]. doi: 10.1016/S1081-1206(10)62586-0. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1081120610625860>
3. BARTOŠ, A., HASALÍKOVÁ, M., 2010. *Poznejte demenci správně a včas: příručka pro klinickou praxi*. Praha: Mladá fronta. 181 s. ISBN 978-80-204-2282-8.
4. BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. a kol., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. 164 s. ISBN 978-80-247-3533-7.
5. BARTŮŇKOVÁ, J., ŠEDIVÁ, A., JANDA, A., 2007. *Imunodeficiency*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. 254 s. ISBN 978-80-247-1980-1.
6. BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum. 194 s. ISBN 978-80-246-3224-7.
7. CARPI, M. F., DI PIETRO, F., VINCENZETTI, S., MIGNINI, F., NAPOLIONI, V., 2011. Human DNA Extraction Methods: Patents and Applications. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* [online]. 5(1), 1-7, [cit. 2020-04-11]. doi: 10.2174/187221511794839264. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1872-2156&volume=5&issue=1&spage=1>
8. CASANOVA, J. L., ABEL, L., 2004. Human Mannose-binding Lectin in Immunity. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 199(10), 1295-1299, [cit. 2020-02-18]. doi: 10.1084/jem.20040537. Dostupné z: <https://rupress.org/jem/article/199/10/1295/39901/Human-Mannosebinding-Lectin-in-Immunity-Friend-Foe>
9. CEDZYŃSKI, M., KILPATRICK, D. C., ŚWIERZKO, A. S., 2018. *The Complement FactsBook*. 2nd ed. London: Elsevier Science Publishing. 512 s. ISBN 9780128104200.
10. DÍTĚ, P. et al., 2007. *Vnitřní lékařství: učebnice pro lékařské fakulty*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. 586 s. ISBN 978-80-7262-496-6.
11. FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J., SHOENFELD, Y., MAŤHA, V., 2005. *Imunitní systém: informace pro každého*. Praha: Grada. 236 s. ISBN 80-247-1196-6.



12. FUMAGALLI, S., DE SIMONI, M. G., 2016. Lectin Complement Pathway and Its Bloody Interactions in Brain Ischemia. *Stroke* [online]. 47(12), 3067-3073, [cit. 2020-02-25]. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.012407. Dostupné z: [https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/STROKEAHA.116.012407?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/STROKEAHA.116.012407?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
13. GARRED, P., LARSEN, F., SEYFARTH, J., FUJITA, R., MADSEN, H. O., 2006. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes & Immunity* [online]. 7(2), 85-94, [cit. 2020-02-17]. doi: 10.1038/sj.gene.6364283. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/6364283>
14. GHAZANFARI, M., FALAHATI, M., BAZRAFSHAN, F. et al., 2017. Is mannose-binding lectin serum concentration a reliable predictor for recurrent vulvovaginal candidiasis? *Mycoses* [online]. 62(2), 106-111, [cit. 2020-02-23]. doi: doi.org/10.1111/myc.12723. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/myc.12723>
15. GONÇALVES, B., FERREIRA, C., ALVES, C. T., HENRIQUES, M., AZEREDO, J., SILVA, S., 2016. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 42(6), 905-927, [cit. 2020-02-23]. doi: 10.3109/1040841X.2015.1091805. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26690853>
16. GRAVINA, L. P., CRESPO, C., GIUGNO, H., SEN, L., CHERTKOFF, L., MANGANO, A., CASTAÑOS, C., 2015. Mannose-binding lectin gene as a modifier of the cystic fibrosis phenotype in Argentinean pediatric patients. *Journal of Cystic Fibrosis* [online]. 14(1), 78-83, [cit. 2020-02-25]. doi: 10.1016/j.jcf.2014.07.012. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199314001738?via%3Dihub>
17. GUPTA, K., GUPTA, R. K., HAJELA, K., 2008. Disease associations of mannose-binding lectin & potential of replacement therapy. *Indian Journal of Medical Research* [online]. 127(5), 431-40, [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18653905>
18. HAERYNCK, F., VAN STEEN, K., CATTART, T. et al., 2012. Polymorphisms in the lectin pathway genes as a possible cause of early chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis patients. *Human Immunology* [online]. 73(11), 1175-1183, [cit. 2020-02-25]. doi: 10.1016/j.humimm.2012.08.010. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885912005265>
19. HAMMAD, N. M., EL BADAWY, N. E., NASR, A. M., GHRAMH, H. A., AL KADY, L. M., 2018. Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphism and Its Association with Susceptibility to Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *BioMed Research International* [online]. 2018, 1-8, [cit. 2020-02-17]. doi: 10.1155/2018/7648152. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1155%2F2018%2F7648152>

20. HEITZENEDER, S., SEIDEL, M., FÖRSTER-WALDL, E., HEITGER, A., 2012. Mannan-binding lectin deficiency — Good news, bad news, doesn't matter? *Clinical Immunology* [online]. 143(1), 22-38, [cit. 2020-02-29]. doi: 10.1016/j.clim.2011.11.002. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521661611003305>
21. HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., ŠPÍŠEK, R., 2013. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton. 330 s. ISBN 978-80-7387-713-2.
22. HOSÁK, L., HRDLIČKA, M., LIBIGER, J. a kol., 2015. *Psychiatrie a pedopsychiatrie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum. 648 s. ISBN 978-80-246-2998-8.
23. CHAO, S. Y., HO, Y. P., BAILEY, V. J., WANG, T. H., 2007. Quantification of Low Concentrations of DNA Using Single Molecule Detection and Velocity Measurement in a Microchannel. *Journal of Fluorescence* [online]. 17(6), 767-774, [cit. 2020-04-11]. doi: 10.1007/s10895-007-0194-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10895-007-0194-0>
24. IP, W. K., TO, Y. F., CHENG, S. K., LAU, Y. L., 2004. Serum Mannose-Binding Lectin Levels and mbl2 Gene Polymorphisms in Different Age and Gender Groups of Southern Chinese Adults. *Scandinavian Journal of Immunology* [online]. 59(3), 310-314, [cit. 2020-02-27]. doi: 10.1111/j.0300-9475.2004.01392.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0300-9475.2004.01392.x>
25. JACK, D. L., KLEIN, N. J., TURNER, M. W., 2001. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunological Reviews* [online]. 180(1), 86-99, [cit. 2020-02-17]. doi: 10.1034/j.1600-065X.2001.1800108.x. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11414367>
26. JANDA, A., BARTUŇKOVÁ, J., ŠPÍŠEK, R., FREIBERGER, T., 2005. Deficit lektinu vázajícího manózu. *Československá pediatrie*. 60(2), 79-80. ISSN 0069-2328. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/286442454\\_Mannose-binding\\_Lectin\\_Deficiency](https://www.researchgate.net/publication/286442454_Mannose-binding_Lectin_Deficiency)
27. JÍLEK, P., 2014. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. 96 s. ISBN 978-80-247-4822-1.
28. JIRÁK, R., KOUKOLÍK, F., 2004.. *Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie*. Praha: Galén. 335 s. ISBN 80-7262-268-4.
29. KALIA, N., SINGH, J., SHARMA, S., KAUR, M., 2019. SNPs in 3'-UTR region of MBL2 increases susceptibility to recurrent vulvovaginal infections by altering sMBL levels. *Immunobiology* [online]. 224(1), 42-49, [cit. 2020-02-20]. doi: 10.1016/j.imbio.2018.10.009. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298518301074>

30. KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
31. KOLEK, V., KAŠÁK, V., VAŠÁKOVÁ, M. a kol., 2011. *Pneumologie*. Praha: Maxdorf, Jessenius. 552 s. ISBN 978-80-7345-255-1.
32. KUCIEL, J., URBAN, T., 2016. *Principy genetiky*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. 199 s. ISBN 978-80-7509-385-1.
33. LANZREIN, A. S., JOBST, K. A., THIEL, S., JENSENIUS, J. C., SIM, R. B., PERRY, V. H., SIM, E., 1998. Mannan-binding lectin in human serum, cerebrospinal fluid and brain tissue and its role in Alzheimer's disease. *NeuroReport* [online]. 9(7), 1491-1495, [cit. 2020-02-23]. doi: 10.1097/00001756-199805110-00045. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1097%2F00001756-199805110-00045>
34. LEE, S. G., YUM, J. S., MOON, H. M. et al., 2005. Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population. *Molecular Immunology* [online]. 42(8), 969-977, [cit. 2020-02-27]. doi: 10.1016/j.molimm.2004.09.036. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589004004201>
35. MADSEN, H. O., GARRED, P., THIEL, S., KURTZHALS, J. A. L., LAMM, L. U., RYDER, L. P., SVEJGAARD, A., 1995. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *Journal of Immunology* [online]. 155(6), 3013-20 [cit. 2020-04-14]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Interplay+between+promoter+and+structural+gene+variants+control+basal+serum+level+of+mannan-binding+protein>
36. MINCHINTON, R. M., DEAN, M. M., CLARK, T. R., HEATLEY, S., MULLIGHAN, C. G., 2002. Analysis of the Relationship Between Mannose-Binding Lectin (MBL) Genotype, MBL Levels and Function in an Australian Blood Donor Population. *Scandinavian Journal of Immunology* [online]. 56(6), 630-641, [cit. 2020-02-18]. doi: 10.1046/j.1365-3083.2002.01167.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3083.2002.01167.x>
37. MULLIS, K. B., 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* [online]. 262(4), 56-65, [cit. 2020-04-30]. doi: 10.1038/scientificamerican0490-56. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/scientificamerican0490-56>
38. MUNTAU, A., 2014. *Pediatric*. 2. vyd. Praha: Grada. 588 s. ISBN 978-80-247-4588-6.
39. MUSIL, J., PETŘÍK, F., TREFNÝ, M. a kol., 2007. *Pneumologie: (učebnice pro studenty lékařství)*. Praha: Karolinum. 250 s. ISBN 978-80-246-0993-5.

40. NAITO, H., IKEDA, A., HASEGAWA, K., OKA, S., UEMURA, K., KAWASAKI, N., KAWASAKI, T., 1999. Characterization of Human Serum Mannan-Binding Protein Promoter. *Journal of Biochemistry* [online]. 126(6), 1004-1012, [cit. 2020-02-17]. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022543. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10578050>
41. NUSSBAUM, R. L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F., 2004. *Klinická genetika*. 6. vyd. Praha: Triton. 428 s. ISBN 80-7254-475-6.
42. PALANIYAR, N., NADESALINGAM, J., CLARK, H., SHIH, M. J., DODDS, A. W., REID, K. B. M., 2004. Nucleic Acid Is a Novel Ligand for Innate, Immune Pattern Recognition Collectins Surfactant Proteins A and D and Mannose-binding Lectin. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 279(31), 32728-32736, [cit. 2020-02-17]. doi: 10.1074/jbc.M403763200. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M403763200>
43. PECKA, M. a kol., 2010. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art. 343 s. ISBN 978-80-903871-9-5.
44. PENKA, M., SLAVÍČKOVÁ, E. a kol., 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada. 421 s. ISBN 978-80-247-3459-0.
45. PIDRMAN, V., 2007. *Demence*. Praha: Grada. 184 s. ISBN 978-80-247-1490-5.
46. PRENTICE, B., MCKAY, K., SELVADURAI, H., ROBINSON, P. D., ABEL, F., FITZGERALD, D. A., 2016. Question 6: Is there a role for Mannose-Binding Lectin measurement in Cystic Fibrosis management? *Paediatric Respiratory Reviews* [online]. 19, 46-48, [cit. 2020-02-25]. doi: 10.1016/j.prrv.2015.09.008. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526054215000998>
47. PRITCHARD, D. J., KORF, B. R., 2007. *Základy lékařské genetiky*. Praha: Galén. 182 s. ISBN 978-80-7262-449-2.
48. RAK, R., MATYÁŠ, V., ŘÍHA, Z. a kol., 2008. *Biometrie a identita člověka ve forenzních a komerčních aplikacích*. Praha: Grada, Profesionál. 631 s. ISBN 978-80-247-2365-5.
49. RAMASAWMY, R., SPINA, G. S., FAE, K. C. et al., 2008. Association of Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphism but Not of Mannose-Binding Serine Protease 2 with Chronic Severe Aortic Regurgitation of Rheumatic Etiology. *Clinical and Vaccine Immunology* [online]. 15(6), 932-936, [cit. 2020-02-17]. doi: 10.1128/CVI.00324-07. Dostupné z: <https://cvi.asm.org/content/15/6/932.full>
50. RASHIDI, E., FAZLOLLAHI, M. R., ZAHEDIFARD, S., TALEBZADEH, A., KAZEMNEJAD, A., SAGHAFI, S., POURPAK, Z., 2006. Mannose-binding Lectin Deficiency in Patients with a History of Recurrent Infections. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* [online]. 15(1), 69-74, [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <http://ijaai.tums.ac.ir/index.php/ijaai/article/view/628>

51. SANDOVAL, J. R., MADSEN, H. O., DE STEFANO, G. et al., 2014. Extreme High Prevalence of a Defective Mannose-Binding Lectin (MBL2) Genotype in Native South American West Andean Populations. *PLoS ONE* [online]. 9(10), [cit. 2020-02-27]. doi: 10.1371/journal.pone.0108943. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0108943>
52. SASTRY, K., HERMAN, G. A., DAY, L., DEIGNAN, E., BRUNS, G., MORTON, C. C., EZEKOWITZ, R. A., 1989. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 170(4), 1175-1189, [cit. 2020-04-14]. doi: 10.1084/jem.170.4.1175. Dostupné z: <https://rupress.org/jem/article/170/4/1175/24167/The-human-mannosebinding-protein-gene-Exon>
53. SEIDL, Z., 2008. *Neurologie pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada. 168 s. ISBN 978-80-247-2733-2.
54. SEIDL, Z., 2015. *Neurologie pro studium i praxi*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. 384 s. ISBN 978-80-247-5247-1.
55. SEYFARTH, J., GARRED, P., MADSEN, H. O., 2006. Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (mbl2) and the MBL-associated serine protease 1–3 genes. *Molecular Immunology* [online]. 43(7), 962-971, [cit. 2020-02-17]. doi: 10.1016/j.molimm.2005.06.033. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589005002105?via%3Dihub>
56. SCHWAEBLE, W., DAHL, M. R., THIEL, S., STOVER, C., JENSENIUS, J. C., 2002. The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MASP 19: Four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. *Immunobiology* [online]. 205(4), 455-66, [cit. 2020-02-18]. doi: 10.1078/0171-2985-00146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298504700959?via%3Dihub>
57. SJÖLANDER, A., MINTHON, L., NUYTINCK, L., VANMECHELEN, E., BLENNOW, K., NILSSON, S., 2013. Functional Mannose-Binding Lectin Haplotype Variants are Associated with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. 35(1), 121-127, [cit. 2020-02-23]. doi: 10.3233/JAD-122044. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348713>
58. SKALNÍKOVÁ, H., FREIBERGER, T., CHUMCHALOVÁ, J., GROMBIŘÍKOVÁ, H., ŠEDIVÁ, A., 2004. Cost-effective genotyping of human MBL2 gene mutations using multiplex PCR. *Journal of Immunological Methods* [online]. 295(1-2), 139-147, [cit. 2020-04-14]. doi: 10.1016/j.jim.2004.10.007. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175904003734>

59. SOLTANI, S., POURPAK, Z., ALIZADEH, Z., SAGHAFI, S., HAJIBEIGI, B., ZEIDI, B., FARAZMAND, A., 2014. Polymorphisms and serum level of mannose-binding lectin: an Iranian survey. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* [online]. 13(6), 428-32, [cit. 2020-02-27]. ISSN 1735-5249. Dostupné z: <http://ijaai.tums.ac.ir/index.php/ijaai/article/view/424>
60. SRŠEŇ, Š., SRŠŇOVÁ, K., 2005. *Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata*. 4., preprac. a rozšír. vyd. Martin: Vydavateľstvo Osveta. 445 s. ISBN 80-8063-185-9.
61. STENGAARD-PEDERSEN, K., THIEL, S., GADJEVA, M. et al., 2003. Inherited Deficiency of Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease 2. *New England Journal of Medicine* [online]. 349(6), 554-560, [cit. 2020-02-17]. doi: 10.1056/NEJMoa022836. Dostupné z: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa022836?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dwww.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa022836?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dwww.ncbi.nlm.nih.gov)
62. SUMMERFIELD, J. A., 2003. Clinical potential of mannose-binding lectin-replacement therapy. *Biochemical Society Transactions* [online]. 31(4), 770-773, [cit. 2020-02-18]. doi: 10.1042/bst0310770. Dostupné z: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/31/4/770/63031/Clinical-potential-of-mannosebinding>
63. SUPER, M., LU, J., THIEL, S., LEVINSKY, R. T., TURNER, M. W., 1989. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *The Lancet* [online]. 334(8674), 1236-1239, [cit. 2020-02-18]. doi: 10.1016/S0140-6736(89)91849-7. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673689918497>
64. SWIERZKO, A. S., SZALA, A., CEDZYNSKI, M. et al., 2009. Mannan-binding lectin genotypes and genotype-phenotype relationships in a large cohort of Polish neonates. *Human Immunology* [online]. 70(1), 68-72, [cit. 2020-02-27]. doi: 10.1016/j.humimm.2008.10.004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885908004977>
65. ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
66. ŠPAČEK, J., BUCHTA, V., JÍLEK, P., 2013. *Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí*. Praha: Grada. 360 s. ISBN 978-80-247-4554-1.
67. TAROVA, E. T., POLAKOVA, H., KAYSEROVA, H., CELEC, P., ZUZULOVA, M., KADASI, L., 2012. Study of the effect of DNA polymorphisms in the mannose-binding lectin gene (MBL2) on disease severity in Slovak cystic fibrosis patients. *General physiology and biophysics* [online]. 30(04), 373-378, [cit. 2020-02-25]. doi: 10.4149/gpb\_2011\_04\_373. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.4149%2Fgpb\\_2011\\_04\\_373](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.4149%2Fgpb_2011_04_373)

68. TAYLOR, M. E., BRICKELL, P. M., CRAIG, R. K., SUMMERFIELD, J. A., 1989. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochemical Journal* [online]. 262(3), 763-771, [cit. 2020-02-17]. doi: 10.1042/bj2620763. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2590164>
69. URL1: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MBL2#location>
70. VÁVROVÁ, V. a kol., 2006. *Cystická fibróza*. Praha: Grada. 516 s. ISBN 8024705311.
71. VÁVROVÁ, V., BARTOŠOVÁ, J. a kol., 2009. *Cystická fibróza: příručka pro nemocné a jejich rodiče*. 2., dopl. vyd. Praha: Professional Publishing. 165 s. ISBN 978-80-7431-000-3.
72. WILK, M. A., BRAUN, A. T., FARRELL, P. M. et al., 2020. Applying whole-genome sequencing in relation to phenotype and outcomes in siblings with cystic fibrosis. *Molecular Case Studies* [online]. 6(1), [cit. 2020-02-25]. doi: 10.1101/mcs.a004531. Dostupné z: <http://molecularcasestudies.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/mcs.a004531>
73. WINSTON, C. N., GOETZL, E. J., SCHWARTZ, J. B., ELAHI, F. M., RISSMAN, R. A., 2019. Complement protein levels in plasma astrocyte-derived exosomes are abnormal in conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease dementia. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* [online]. 11(1), 61-66, [cit. 2020-02-23]. doi: 10.1016/j.dadm.2018.11.002. Dostupné z: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.dadm.2018.11.002>
74. WOJITANI, M. D. K. H., L. M. DE AGUIAR, E. C. BARACAT a I. M. LINHARES., 2012. Association between mannose-binding lectin and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and recurrent vulvovaginal candidiasis. *Archives of Gynecology and Obstetrics* [online]. 285(1), 149-153, [cit. 2020-02-23]. doi: 10.1007/s00404-011-1920-z. ISSN 0932-0067. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1007%2Fs00404-011-1920-z>
75. ZVĚŘOVÁ, M., 2017. *Alzheimerova demence*. Praha: Grada. 144 s. ISBN 9788027105618.

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Lokalizace <i>MBL2</i> genu na 10. chromosomu .....	10
<b>Obrázek 2:</b> Schéma organizace lidského <i>MBL2</i> genu .....	11
<b>Obrázek 3:</b> Schéma struktury lidského MBL proteinu .....	12
<b>Obrázek 4:</b> Tetramer MBL proteinu složený z podjednotek .....	13
<b>Obrázek 5:</b> Přehled zastoupení haplotypů <i>MBL2</i> genu ve světě.....	19
<b>Obrázek 6:</b> Schéma PCR reakce (první 3 cykly) .....	38
<b>Obrázek 7:</b> Schéma procesu Sangerova sekvenování.....	42
<b>Obrázek 8:</b> Elektroforetogram .....	43
<b>Obrázek 9:</b> Sekvence heterozygota A/D .....	58
<b>Obrázek 10:</b> Sekvence heterozygota A/B.....	59
<b>Obrázek 11:</b> Výsledek porovnání vzorku (horní řádek) s databází BLAST (referenční dolní řádek). Červeně je označeno místo neshody vzniklé záměrnou úpravou primeru .....	60
<b>Obrázek 12:</b> Zastoupení jednotlivých typů demence u vzorků .....	61
<b>Obrázek 13:</b> Výsledky elektroforézy PCR produktů dlouhých 119 bp. Vpravo se nachází 100 bp DNA Ladder, následující jamky obsahují vzorky .....	62
<b>Obrázek 14:</b> Porovnání sekvencí 2 vzorků, jejichž PCR produkt byly přečištěny pomocí odlišné metody. Horní vzorek obsahuje vedlejší sekvence, dolní sekvence je neobsahuje .....	63
<b>Obrázek 15:</b> Rozložení genotypu zdravých i patientských vzorků .....	64
<b>Obrázek 16:</b> Přehled zastoupení genotypů u analyzovaného souboru .....	65



## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Přehled polymorfismů <i>MBL2</i> genu v exonu 1 .....	17
<b>Tabulka 2:</b> Přehled polymorfismů <i>MBL2</i> genu vyskytujících se mimo exon 1 .....	17
<b>Tabulka 3:</b> Přehled použitých reagensí a spotřebního materiálu.....	46
<b>Tabulka 4:</b> Přehled použitých přístrojů.....	46
<b>Tabulka 5:</b> Seznam reagensí v kitu a použitého spotřebního materiálu.....	49
<b>Tabulka 6:</b> Přehled použitých přístrojů.....	49
<b>Tabulka 7:</b> Přehled sekvencí použitých primerů .....	50
<b>Tabulka 8:</b> Přehled reagensí a objemů použitých pro 1 a 10 reakcí .....	50
<b>Tabulka 9:</b> Přehled použitého spotřebního materiálu a přístrojů .....	51
<b>Tabulka 10:</b> Protokol PCR reakce.....	52
<b>Tabulka 11:</b> Přehled použitých reagensí a spotřebního materiálu.....	52
<b>Tabulka 12:</b> Přehled použitých přístrojů .....	52
<b>Tabulka 13:</b> Přehled použitých reagensí a spotřebního materiálu.....	53
<b>Tabulka 14:</b> Přehled použitých přístrojů .....	53
<b>Tabulka 15:</b> Seznam použitých reagensí a spotřebního materiálu.....	55
<b>Tabulka 16:</b> Přehled použitých přístrojů .....	55
<b>Tabulka 17:</b> Přehled použitých reagensí a spotřebního materiálu.....	56
<b>Tabulka 18:</b> Přehled použitých přístrojů .....	56
<b>Tabulka 19:</b> Reakční protokol pro přečištění PCR produktů pomocí ExoSAP-IT™ .....	56
<b>Tabulka 20:</b> Přehled použitých reagensí, spotřebního materiálu a přístrojů.....	57
<b>Tabulka 21:</b> Přehled primárních materiálů vzorků a koncentrace izolátů .....	62
<b>Tabulka 22:</b> Přehled osob nesoucích polymorfismus, jejich pohlaví a diagnostikovaný typ demence.....	64

## Seznam zkratek

A – adenin

Ab – protilátka

AD – Alzheimerova choroba

Ag – antigen

AIDS – syndrom získaného selhání imunity

AK – aminokyselina

ApoE – apolipoprotein E

APP – amyloidový prekurzorový protein

Arg – arginin

Asp – kyselina asparagová

ATP – adenosintrifosfát

BBB – blood-brain barrier – hematoencefalická bariéra

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool – nástroj pro porovnání výsledných sekvencí s databází

BS – bukální stěr

C - cytosin

C1-C9, C3a, C3b, C5b apod. – označení složek komplementu

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CF – cystická fibróza

CFTR – gen kódující transmembránový regulátor vodivosti

CMP – cévní mozková příhoda

CMP – cévní mozková příhoda

CNS – centrální nervová soustava

CR1 – komplementový receptor 1

CR1 – komplementový receptor 1

CRD – doména rozpoznávající sacharidy

Cys – cystein

ddNTP – dideoxynukleotidtrifosfát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxynukleotidtrifosfát

EDTA – kyselina etylendiaminotetraoctová

ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

G – guanin

Glu – kyselina glutamová

Gly – glycin

HBV – virová hepatitida B

HIV – lidský imunodeficitní vir

IgG – imunoglobuliny typu G

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii

MAC – membránu atakující komplex

MASP – serinová proteáza asociovaná s MBL

MBL – mannose-binding lectin – manózu vázající lektin

MBL2 – gen kódující manózu vázající lektin

MM – master mix

NCBI – National Center for Biotechnology Information – Národní centrum pro biotechnologické informace

NIH – National Institutes of Health – Národní zdravotní instituce

NK – nukleová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR RFLP – polymerázová řetězová reakce – polymorfismus délky restrikčních fragmentů

PK – periferní krev

RNA – ribonukleová kyselina

rpm – revolutions per minute – otáčky za minutu

RVVK – rekurentní vulvovaginální kandidóza

SDS – sodium dodecylsulphate – dodecyl sulfát sodný

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

SNP – single nukleotid polymorphism – jednonukleotidové polymorfismy

ssDNA – jednořetězová DNA

T – thymin

VD – vaskulární demence

VVD – vulvovaginální dyskomfort

VVK – vulvovaginální kandidóza