



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

Sekvenování genu *ZNF341*

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ZDRAVOTNÍ  
LABORANT

**Autor:** Kateřina Pospíchalová

**Vedoucí práce:** Ing. Tomáš Nix, Ph. D.

České Budějovice 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „**Sekvenování genu *ZNF341***“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 28. 4. 2021

.....

Kateřina Pospíchalová

### **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce, Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D., za jeho ochotu, trpělivost, konzultace a čas, který mi věnoval během praktické části a psaní mé práce. Poděkování patří i Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity, kde mi bylo umožněno provést praktickou část bakalářské práce. Poděkování patří též mé rodině za podporu a trpělivost.

# Sekvenování genu *ZNF341*

## Abstrakt

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala problematikou genu *ZNF341*, který je spojený s defektem proteinu STAT3, způsobující syndrom hyperimmunoglobulinémie E. Hyper IgE syndrom je multiorgánové onemocnění způsobující ekzémy, alergie, skoliózu a spoustu dalších nemocí.

V teoretické části jsem se zaměřila na gen *ZNF341*, jeho charakteristiku, umístění na chromozomu a onemocnění, které způsobuje jeho deficit. Následně jsem se zaměřila již na zmíněné onemocnění hyperimmunoglobulinémie E. U této nemoci jsem zkoumala, v jakých formách se vyskytuje a tím, jaké jsou jeho příčiny a následky. Také jsem se v teoretické části zmínila o metodě PCR a o metodách sekvenování DNA.

V praktické části jsem zpracovala 20 anonymizovaných vzorků. U všech vzorků jsem provedla izolaci DNA, PCR, elektroforézu, přečištění produktů PCR. Následovala příprava na Sangerovo sekvenování. Vzorky jsem poslala firmě GenSeq s.r.o. k osekvenování, protože ve školní laboratoři nebyl příslušný sekvenátor.

V závěrečné části bakalářské práce jsem vyhodnocovala získané sekvence. K vyhodnocení sekvencí jsem používala program BioEdit a internetovou databázi NCBI. Také jsem dostala k dispozici několik sekvencí od dětí z Českobudějovicka a Karvinska. U těchto vzorků jsem poté porovnávala výskyt mutací genu. Z celkem vyhodnocených 40 vzorků jsem ve dvou z nich našla mutaci. Šlo o stejnou mutaci, která doposud nebyla popsána v databázi NCBI.

## Klíčová slova

*ZNF341*; STAT3; Hyper IgE syndrom; PCR; Sangerovo sekvenování

## Sequencing of the *ZNF341* gene

### Abstract

In my bachelor thesis I dealt with the issue of the *ZNF341* gene, which is associated with a defect in the STAT3 protein, causing the syndrome of hyperimmunoglobulinemia E. Hyper IgE syndrome is a multiorgan disease causing eczema, allergies, scoliosis and many other diseases.

In the theoretical part, I focused on the *ZNF341* gene, its characteristics, its location on the chromosome and the disease that causes its deficiency. Subsequently, I focused on the already mentioned disease of hyperimmunoglobulinemia E. In this disease, I investigated in what forms it occurs and what are its causes and consequences. I also mentioned in the theoretical part about the PCR method and DNA sequencing methods.

In the practical part I processed 20 anonymized samples. For all samples I performed DNA isolation, PCR, electrophoresis, purification of PCR products. This was followed by preparation for Sanger sequencing. I sent the samples to GenSeq s.r.o. for sequencing because there was no appropriate sequencer in the school lab.

In the final part of the bachelor thesis I evaluated the obtained sequences. I used the BioEdit program and the NCBI internet database to evaluate the sequences. I also received several sequences from children from the České Budějovice and Karviná regions. I then compared the incidence of gene mutations in these samples. Out of a total of 40 samples evaluated, I found a mutation in two of them. It was the same mutation that has not yet been described in the NCBI database.

### Key words

*ZNF341*; STAT3; Hyper IgE syndrome; PCR; Sanger sequencing

## Obsah

Úvod .....	8
<b>1 Gen <i>ZNF341</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>2 Hyper IgE syndrom.....</b>	<b>11</b>
2.1 Autosomálně dominantní HIES (AD-HIES).....	11
2.1.1 Klinické projevy .....	11
2.1.2 Kůže .....	12
2.1.3 Plíce .....	13
2.1.4 Muskuloskeletální abnormality.....	13
2.1.5 Lebeční abnormality .....	14
2.1.6 Zubní abnormality.....	14
2.1.7 Tvář .....	14
2.1.8 Malignity.....	15
2.1.9 Terapie AD-HIES .....	15
2.2 Autosomálně recesivní HIES (AR-HIES).....	16
2.2.1 Klinické projevy AR-HIES.....	16
2.2.2 Imunologické projevy .....	17
2.2.3 Terapie AR-HIES .....	17
2.3 Dědičnost Hyper IgE syndromu.....	17
<b>3 Metody PCR.....</b>	<b>19</b>
<b>4 Sekvenování.....</b>	<b>20</b>
4.1 Maxam-Gilbertovo sekvenování.....	20
4.2 Sangerova metoda .....	21
4.3 Novější metody sekvenování .....	23
<b>5 Cíle práce.....</b>	<b>24</b>
<b>6 Metodika.....</b>	<b>25</b>
6.1 Odběr vzorků.....	25
6.2 Izolace DNA.....	25
6.3 Měření koncentrace vzorků DNA .....	27
6.4 PCR .....	27
6.5 Elektroforéza .....	30
6.6 Enzymatické přečištění PCR produktů .....	31
6.7 Příprava na sekvenování .....	32
6.8 Sangerovo sekvenování.....	33

<b>7</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>35</b>
7.1	Hodnocení sekvencí .....	37
7.1.1	Mé vzorky .....	37
7.1.2	Českobudějovicko.....	41
7.1.3	Karvinsko.....	46
<b>8</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>54</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zdrojů.....</b>	<b>55</b>
<b>11</b>	<b>Seznam tabulek, grafů a obrázků .....</b>	<b>60</b>
<b>12</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>61</b>

## Úvod

Syndrom hyperimmunoglobulinémie E, též známý jako Jobův syndrom, je primární imunodeficientní onemocnění, které zasahuje imunitní a muskuloskeletální systém (Litzman, 2008). Projevy onemocnění jsou imunologické i neimunologické. Charakteristická je zvýšená hladina imunoglobulinu E, dále pak ekzémy, alergie, atd.

Jednou z příčin tohoto onemocnění jsou mutace genu *ZNF341*. Tento gen se nachází v jádře na 20. chromozomu (Frey-Jakobs et al., 2018). Protein ZNF341 reguluje aktivitu genu *STAT3* a tím řídí i protein STAT3 (Beziat et al., 2018). V případě poškození genu *ZNF341* dochází k již zmíněnému Hyper-IgE syndromu.

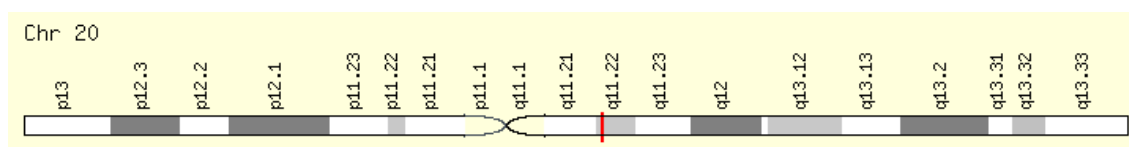
Cílem výzkumné části této bakalářské práce je osvojit si základní metody molekulární biologie, od izolace DNA, přes metodu PCR a elektroforézu, až po přípravu na Sangerova sekvenování. Na základě výsledných sekvencí vyhodnotit nalezené mutace genu *ZNF341* a porovnat výskyt těchto mutací ve vzorcích mezi populacemi dětí z Karvinska a Českobudějovicka.

V závislosti na výsledcích mohu porovnat kvalitu ovzduší ve zmíněných krajích.



## 1 Gen *ZNF341*

*ZNF341* (= zinkový prstový protein 341) kóduje transkripční nukleární faktor, který se nachází v jádru, kde váže specifický motiv DNA přítomný v genech (Beziat et al., 2018). Gen obsahuje 15 exonů a nachází se na chromozomu 20q11.22 (obrázek 1) (Frey-Jakobs et al., 2018).



**Obrázek 1** Gen *ZNF341* na 20. chromozomu (zdroj: Gene Cards, © 2021)

Lidský gen *ZNF341* kóduje 2 hlavní traskripty, které se liší o 21 in-frame nukleotidů v rámci alternativního sestřihu různých akceptorových míst na 3-hlavním konci exonu 6. Transkripty poskytují izoformy 847 a 854 aminokyselin. Obě izoformy obsahují 12 domén zinkových prstů C2H2 vázající DNA a signál nukleární lokalizace (NLS). PCR detekovala *ZNF341* exprese ve všech testovaných buněčných liniích a typech buněk, včetně B buněk transformovaných virem Epstein-Barr (EBV), T buněk transformovaných herpesvirem saimiri, primárních endoteliálních buněk lidské pupečnickové žíly (HUVEC), fibroblastů transformovaných SV40 a primárních keratinocytů. Obě izoformy genu *ZNF341* byly detekovány v jádrech trasfektovaných buněk HEK2937 metodou Western blot. (Beziat et al., 2018).

Podle studií se předpokládá, že protein *ZNF341* reguluje aktivitu genů *STAT1* a *STAT3* a tím řídí produkci proteinů *STAT1* a *STAT3*. Tyto dva proteiny jsou zapojeny do imunitního systému, kde řídí cesty v buňkách, které pomáhají bojovat proti cizím částicím, jako jsou viry, bakterie nebo houby (Beziat et al., 2018).

Důležitý je zejména protein *STAT3*, který přenáší signály pro zrání buněk imunitního systému, tedy T a B buněk (Beziat et al., 2018) a je centrálním regulátorem imunitní homeostázy (Frey-Jakobs et al., 2018). *STAT3* se též podílí na normálním vývoji a udržování kostí a jiných tkání (Beziat et al., 2018). Poškození *STAT3* vede k několika chorobám, včetně monogenního autosomálně dominantního syndromu hyperimmunoglobulinu E (IgE) (AD-HIES). Na základě tohoto podnětu byli testováni pacienti příbuzných rodin. U pacientů nebyla zjištěna přítomnost mutace genu *STAT3* se sníženou expresí *STAT3* (Frey-Jakobs et al., 2018). Gen *STAT3* je hlavním regulátorem odpovědi

T buněk, zejména Th17. Důležitost STAT3 při regulaci diferenciaci Th17 je základem fenotypů a symptomů mutantů STAT3 (August, 2018). Osobám s nedostatkem ZNF341 chybí buňky Th17, mají nadbytek Th2 a B buňky mají nízkou paměť (Beziat et al., 2018).

Jsou identifikovány dvě odlišné homozygotní mutace v *ZNF341*. Divoký typ *ZNF341* váže a aktivuje promotor *STAT3*, zatímco mutantní varianty genu snižují transkripční aktivaci (Beziat et al., 2018)

## 2 Hyper IgE syndrom

Syndrom hyperimmunoglobulinu E (HIES) je vzácné primární imunodeficientní onemocnění způsobené mutacemi v *STAT3* (Sowerwine et al., 2012). Typickými znaky hyper-IgE syndromu jsou ekzémy, zvýšené sérové IgE, dermatitida, infekce kůže a plic. Dále jsou také známy neimunologické abnormality, jako jsou zlomeniny po malém traumatu, výrazný vzhled obličeje, hyperextenzní klouby a skolióza (Minegishi, 2009). Jsou známy dvě formy HIES: dominantní forma a recesivní forma. Pro dominantní formu jsou charakteristické neimunologické rysy kosterní a pojivové tkáně, plicní abnormality, mimo ekzému a infekcí, které se opakují. Naproti tomu recesivní forma nemá somatické rysy. Recesivní forma má výrazné virové infekce a neurologické komplikace (Freeman et Holland, 2008).

### 2.1 Autosomálně dominantní HIES (AD-HIES)

Onemocnění bylo identifikováno jako syndrom hyper IgE recidivující infekce (HIES). Bylo poprvé popsáno Davisem et al. v roce 1966 jako Jobův syndrom. Roku 1972 Buckley et al., rozpoznal velmi vysoké hladiny IgE v séru (Chandesris et al., 2012). Imunoglobulin E je hlavní příčinou alergických reakcí a obvykle spouští imunitní obranou odpověď proti mnohobuněčným parazitům (Hořejší et al., 2017). Od této doby zaujímala triáda ekzému, vysoké zastoupení IgE v séru a opakující se infekce kůže a plic, i kosterní, pojivové tkáně, mozkové a srdeční abnormality (Freeman et Holland, 2008). Existuje také riziko autoimunních a lymfoproliferativních onemocnění (GeneReviews, 2010-2020). V současné době víme, že mutace *STAT3* jsou zodpovědné za drtivou většinu případů AD-HIES. Dominantní onemocnění bereme jako nedostatek *STAT3*, čímž ho odlišujeme od recesivních forem hyper IgE (Freeman et Holland, 2008). HIES je spojena s morbiditou a mortalitou, avšak díky adekvátní péči, sledování a shody osob zlepšují prognózu a délku žití (GeneReviews, 2010-2020).

#### 2.1.1 Klinické projevy

Deficit *STAT3* je dysfunkce multiorgánového onemocnění (Freeman et Holland, 2008). Projevují se charakteristické rysy, jako jsou opakující se bakteriální infekce kůže a plic, orální plísňovou infekcí, abnormality kostí a pojivové tkáně (Hillmer et al., 2016). Dříve byl problém potvrdit diagnostiku HIES genetickými testy, dokud neexistovaly somatické

i imunologické rysy. Proto byl vyvinut systém klinického hodnocení pro obě kategorie, viz tabulka 1 (Freeman et Holland, 2008).

**Tabulka 1** Klinické charakteristiky nedostatku STAT3

<b>Imunologické charakteristiky (% frekvence)</b>	<b>Neimunologické charakteristiky (% frekvence)</b>
Novorozenecká vyrážka (81%)	Charakteristická tvář (83%)
Vředy (87%)	Zadržené primární zuby (72%)
Opakující se pneumonie (87%)	Minimální zlomeniny traumatu (71%)
Pneumatokoely (77%)	Skolióza > 10 stupňů (63%)
Ekzém (100%)	Hyperextenzibilita (68%)
Mukokutánní kandidózy (83%)	Fokální mozkové hyperintenzity (70%)
Maximální sérum IgE > 2000 IU/ml (97%)	Chiari I Malformace (18%)
Eozinofilie (93%)	Kraniosynostóza (neznámá)
Zvýšený počet lymfomu	Arteriální aneuryzma (neznámá)

Zdroj: Freeman et Holland, 2008

### 2.1.2 Kůže

První projev deficitu STAT3 je novorozenecká vyrážka. Následují ekzematoidní a pustulární vyrážky, které postihují pokožku hlavy a obličej. Vyrážky jsou významné hlavně v dětství. Mimo ekzémů jsou typickým příznakem i kožní abscesy, které jsou způsobené náchylností k infekcím bakterie *Staphylococcus aureus*. Úroveň zánětlivých příznaků je velmi proměnlivá, ať už jde o citlivost nebo teplo. „Studené“ abscesy popsané Davisem et al. jsou běžné. Navzdory absenci vnějších známek zánětu však po aspiraci existuje otevřený hnis a *S. aureus* se obvykle kultivuje. S profylaktickými antibiotiky se výskyt těchto vředů podstatně snižuje. Problémové oblasti mohou přetrvávat v intertriginózních oblastech, jako jsou podpaží, tříselná oblast nebo pod prsty (Freeman et Holland, 2008).

### 2.1.3 *Plic*

Často se vyskytují opakující se bakteriální pneumonie. Pneumonie obvykle začínají v dětství díky bakteriálním izolátům, jako jsou *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae* (Freeman et Olivier, 2016). Časté jsou i plísňové plicní infekce a to zejména s *Aspergillus fumigatus*. Stejně jako u abscesů studené kůže mohou mít pneumonie méně příznaků, než by se dalo očekávat u osoby s neporušenou imunitou. Tento nedostatek příznaků a zpoždění v klinické prezentaci může přispět k pokročilému onemocnění a významnému poškození tkáně před identifikací a zahájením vhodné léčby (Immune Deficiency Foundation, 2020).

I když pneumonie okamžitě reagují na vhodnou léčbu, tak hojení plic se projevuje aberací. Během procesu hojení se tvoří pneumatoceles a bronchiektázie, a obvykle přetrvávají i po vymazání infekce. Tyto abnormality pak predisponují ke gramnegativní bakteriální infekci (*Pseudomonas*) a plísňovým infekcím (*Aspergillus* nebo *Scedosporium*) (Freeman et Holland, 2008).

Sekundární infekce bývají obvykle indolentní a vymažou se obtížně. Tyto dlouhodobé infekce jsou častěji spojovány s úmrtností než akutními pyogenními infekcemi. Tyto infekce způsobují prasknutí velkých plicních cév s život ohrožující hemoptýzou nebo šířením hub do mozku (Freeman et Holland, 2008).

### 2.1.4 *Muskuloskeletální abnormality*

Mezi kosterní abnormality v deficitu *STAT3* patří osteopenie, skolióza, minimální zlomeniny traumatu, hyperextensibility a degenerativní onemocnění kloubů. V dospívání se objevuje u 75 % pacientů skolióza. Skolióza se liší v závažnosti, u některých jedinců je potřeba provést chirurgickou stabilizaci nebo korekci (Freeman et Holland, 2008).

U pacientů s AD-HIES se také objevují roztavené kosti lebky (kraniosynostóza) a extra nebo abnormálně tvarovaná žebra nebo obratle (Immune Deficiency Foundation, 2020).

Hyperextenzibilita malých i velkých kloubů je častá a může souviset s vývojem degenerativního onemocnění kloubů, a to zejména páteře. Dále jsou časté i zlomeniny traumatu a snížená hustota kostních materiálů. Bylo prokázáno, že resorpce kostí je abnormálně zvýšená u pacientů s HIES v důsledku abnormalit v syntetické dráze prostaglandinu a reaguje na nesteroidní látky (Freeman et Holland, 2008).

### **2.1.5 Lebeční abnormality**

Jedná se o kraniosynostózu v různých stupních, která obvykle nevyžaduje chirurgickou opravu. Velmi často se také vyskytují malformace Chiari 1 (Freeman et Holland, 2008). Chiari malformace je stav, kdy spodní část mozku, nazývaná cerebelární mandle, herniace dolů skrz lebku a do páteřního kanálu. Herniovaná tkáň blokuje normální tok mozkomíšního moku. Toto blokování může způsobit nahromadění tekutiny v míše (syringomyelia) nebo v mozku (hydrocefalus). Chiari typu 1 se vyskytuje nejčastěji a postihuje děti i dospělé. Chiari 1 může způsobit míchu naplněnou cystou (syrinx) (Mayfield Brain & Spine, 2008-2021).

Pokud jsou Chiariho malformace pozorované, obvykle nevyžadují chirurgickou opravu. Tyto malformace jsou obvykle náhodnými nálezy (Freeman et Holland., 2008).

### **2.1.6 Zubní abnormality**

U většiny osob s nedostatkem STAT3 dochází k poškození dentice. Nejspíše se jedná o selhání odlupování primárních zubů, nikoli o to, aby se vyvinuly sekundární zuby. Jakmile se primární zuby odlupují, ať už vytržením zubů nebo přirozeně, objevují se zuby sekundární, které se normálně tvoří. Někdy se stane, že jsou přítomny obě vrstvy chrupu současně, jak primární, tak sekundární. Objeví se sekundární chrup, přestože primární nevypadl. Další charakteristické nálezy jsou také na ústní sliznici, jazyku, ústní dutině a tvářích. Centrální důlky v jazyku mohou být způsobeny nebo sekundárně infikovány kandidou. Na ústní sliznici jsou často pozorovány neobvykle výrazné vrásky (Freeman et Holland, 2008).

### **2.1.7 Tvář**

Osoby s nedostatkem STAT3 mají charakteristický vzhled obličeje, takže to může vypadat, že ani nejsou příbuzné s ostatními členy rodiny. Mezi znaky patří asymetrie obličeje, široký nos a hluboko posazené oči s výrazným čelem. Kůže na obličeji má drsný vzhled s přehnanou velikostí pórů. Tento vzhled se obvykle vyvíjí během dětství a dospívání (Freeman et Holland, 2008).

### 2.1.8 *Malignity*

S nedostatkem STAT3 jsou spojené i zvýšená rizika malignit. Byly popsány jak Hodgkinův, tak non-Hodgkinův lymfom (NHL). Většina NHL pochází z B buněk s agresivní histologií. Mezi další rakoviny popsané v HIES patří leukémie a rakoviny jater, vulvy a plic (Freeman et Holland, 2008).

### 2.1.9 *Terapie AD-HIES*

Specifické terapie pro nedostatek STAT3 se teprve vyvíjí, ale podpůrná péče byla dobře zdokonalena. Účinná péče o pleť často závisí na kontrole povrchové i invazivní infekce *S. aureus*. Velmi účinné jsou bělicí koupele a koupání v chlorovaných bazénech. K léčbě ekzému obvykle není nutné potlačení systémové imunity, protože má velmi dobrou odpověď na antimikrobiální látky (Freeman et Holland, 2008). Antibiotická profylaxe trimethoprim-sulfamethoxazole je obvykle používána proti opakujícím se respiračním infekcím (Immune Deficiency Foundation, 2020). Pro pneumonii je ideální léčba etiologickým činitelem. Bronchoskopie je užitečná pro obnovu patogenu a pomoc při odstraňování hnisu, protože pacienti nemají dostatečnou reakci na kašel (Freeman et Holland, 2008).

Před identifikací deficitu STAT3 bylo velmi málo studií o příčinách HIES. Levisol je neobvyklé antihistaminikum, které stimuluje funkci T a NK buněk. V randomizované studii bylo zjištěno, že je nižší než placebo. Interferon-gama byl použit se smíšenými výsledky. In vitro zlepšoval chemotaxi neutrofilů, ale in vivo měl nekonzistentní účinky na hladiny IgE. Intravenózní imunoglobulin může u některých pacientů snížit počet infekcí. Kauzistiky a malé série případů vychvalovaly blokádu cyklosporinu a histamin-2 receptoru. Omalizumab, což je monoklonální protilátka proti IgE, nebyl doposud studován a není tak známo, zda může být nějak přínosný (Freeman et Holland, 2008).

Multisystémová nemoc, jako je nedostatek *STAT3*, vyžaduje sofistikovaný přístup (Freeman et Holland, 2008).

## 2.2 Autosomálně recesivní HIES (AR-HIES)

Díky Renner et al. byla roku 2004 popsána recesivní forma onemocnění, které bylo podobné dominantní formě, avšak se lišilo závadou *STAT3* (Freeman et Holland, 2008). Recesivní forma je spojována s nedostatkem *DOCK8* a *PGM3* (Zhang et al., 2018). Onemocnění je časté zvláště v oblastech světa, kde je vysoká míra příbuznosti (Immune Deficiency Foundation, 2020). Stejně jako u dominantního HIES jsou projevem recesivní formy těžké ekzémy, zvýšené sérové IgE, opakující se kožní a virové infekce, ale chybějí kosterní nálezy a pojivové tkáně, které jsou charakteristické pro nedostatek *STAT3* (Freeman et Holland, 2008).

### 2.2.1 Klinické projevy AR-HIES

Prvním příznakem recesivní formy hyper IgE syndromu může být suchá, červená, šupinatá kožní vyrážka, která se objevuje při narození nebo na začátku kojeneckého věku. Též se může objevit svědění. Novorozenci jsou velmi citliví na bakteriální infekce, zejména na stafylokokové. Takové infekce mohou způsobit vředy a abscesy na pokožce. Abscesy lze nalézt také na kloubech, dásních, za uchem, v průduškách a v samotných plicích (National Organization for Rare Disorders, 1991-2012). Za kožní infekce jsou zejména zodpovědné bakterie *S. aureus* (Freeman et Holland, 2008). Někteří jedinci jsou však citliví obzvláště na virové infekce, jako je *Molluscum contagiosum* (MCV), *Herpes simplex* (HSV), *Varicella zoster virus* (VZV) a lidský papilomavirus (HPV). Tyto infekce se většinou vyskytují současně (National Organization for Rare Disorders, 1991-2012).

U osob s recesivní formou hyper IgE syndromu se též mohou rozvinout opakované plicní infekce. Pneumonie je spojena s hromaděním tekutiny kolem plic nebo hnisem mezi vnějším povrchem plic a hrudní stěnou. Mohou se vyvinout opakované respirační a sinusové infekce. Tyto infekce jsou způsobené širokým spektrem grampozitivních a gramnegativních hub a bakterií, včetně *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pneumocystis jirovecii* a *Histoplasma capsulatum* (National Organization for Rare Disorders, 1991-2021).

Osoby s AR-HIES mají také vysokou frekvenci neurologických komplikací, včetně vaskulárních mozkových lézí a encefalitidy (Immune Deficiency Foundation, 2020).



### 2.2.2 *Imunologické projevy*

Osoby s AR-HIES mají vysoké sérové IgE, velmi podobné jako jedinci s AD-HIES, avšak mají obvykle vyšší eozinofilii. Mohou se objevit autoimunitní jevy, včetně hemolytické anémie. Funkce lymfocytů a fenotypizace jsou u této formy nekonzistentní, ačkoliv byla pozorována snížená proliferace lymfocytů v reakci na stafylokokový antigen. Redukce nitroblue-tetrazolia a chemotaxe neutrofilů je v normálu (Freeman et Holland, 2008).

### 2.2.3 *Terapie AR-HIES*

Do jisté míry zůstává léčba HIES podpůrná (Immune Deficiency Foundation, 2020). Onemocnění je méně prozkoumáno než deficit *STAT3*. Nejpravděpodobněji by mohli pomoci antimikrobiální látky, s antifylokoky, antivirotiky a antimykotika. Tyto látky pomohou, když se objeví mukokutánní kandidóza nebo invazivní houbové onemocnění. Zabránit invazivní bakteriální infekci může agresivní péče o pleť (Freeman et Holland, 2008).

Závažnost onemocnění v recesivní formě je obvykle horší než deficit *STAT3*, který se nachází v dominantní formě. Transplantace kostní dřeně a imunomodulační terapie vyžadují ještě další průzkum (Freeman et Holland, 2008).

## 2.3 **Dědičnost Hyper IgE syndromu**

Autosomálně dominantní HIES, s mutacemi *STAT3*, se vyskytuje jak u mužů, tak u žen všech etnických skupin. Onemocnění se zdánlivě vyskytuje se stejnou frekvencí. V rodinách, kde se nachází více než jedna postižená osoba, je přenos onemocnění s autosomálně dominantní dědičností. Onemocnění se vyskytuje u většiny pacientů sporadicky. Téměř za všechny případy autosomálně dominantní HIES je zodpovědná mutace *STAT3*. Mutační analýza tohoto genu by umožnila genetické poradenství a definitivní diagnózu (Immune Deficiency Foundation, 2020).

Osoby, které mají autosomálně recesivní HIES, jsou většinou z příbuzné rodiny, avšak nemusí tomu tak pokaždé být. Delece a mutace v genu *DOCK8* na 9. chromozomu tvoří většinu případů, ačkoli některé osoby s AR-HIES má normální gen *DOCK8*. Mutační

analýza výše uvedeného genu je důležitá pro diagnostiku a genetické poradenství (Immune Deficiency Foundation, 2020).

### 3 Metody PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce slouží k amplifikaci úseku DNA (Sršeň, 1995). Je to technika in vitro založená na principu replikace DNA, kdy se polymerační část sekvence DNA namnoží a vytvoří miliony kopií (Kuciel a Urban, 2016). K PCR potřebujeme syntetické oligonukleotidy, které jsou komplementární ke známým sekvencím ohraničujícím oblast zájmu, aby mohla být ve zkumavce zahájena enzymová amplifikace části DNA mezi těmito sekvencemi. Metodu PCR vyvinul Kary Mullis roku 1987, který za tuto práci obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii (Snustad, 2009).

Metoda PCR zahrnuje tři kroky, které se několikrát opakují. V prvním kroku je sekvence genomové DNA denaturována zahřátím na 92-95°C po dobu 30 sekund. Ve druhém kroku je tato denaturovaná DNA hybridizována s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů, které se společně inkubují při teplotě 50-60°C po dobu 30 sekund. V posledním kroku je použita DNA-polymeráza pro replikaci úseku DNA mezi místy komplementárními k oligonukleotidovým primerům (Snustad, 2009).

Primery jsou synteticky připravené jednovláknové oligonukleotidy, které mají komplementární sekvenci k sekvencím na 3'-koncích obou vláken rozmnožovaného úseku. Skládají se přibližně z 20 nukleotidů. Pomocí primerů se rozmnožovaný úsek DNA ohraničuje. Tím také umožňuje i jeho identifikaci místo značkovaných sond, které se používají při Southerově metodě (Sršeň, 1995).

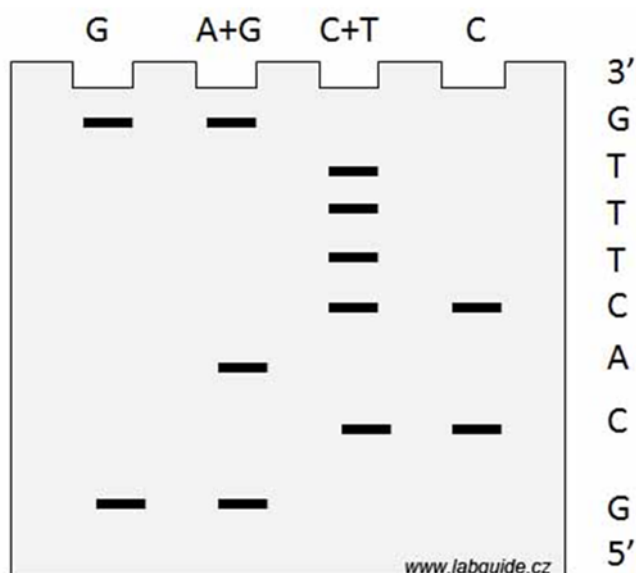
## 4 Sekvenování

Sekvenování DNA slouží ke stanovení pořadí (sekvence) nukleotidů v dané molekule DNA (Bártová, 2011). Metody sekvenování DNA lze rozdělit na metody klasické a metody sekvenování nové generace. Mezi klasické metody patří Maxam-Gilbertova metoda a Sangerova metoda (LabGuide, 2014-2019). Walter Gilbert a Frederick Sanger obdrželi za tyto metody roku 1980 Nobelovu cenu. (Kuciel a Urban, 2016). A především Sangerova metoda se rutinně používá dodnes (LabGuide, 2014-2019).

Metody sekvenování nové generace vznikly v posledních dvaceti letech. V porovnání s klasickými metodami umožňují rychlejší a cenově příznivější produkci většího množství osekvenovaných vzorků najednou. Sekvenování nové generace využívá paralelizace procesu sekvenování. Dochází tedy k sekvenování několika tisíců až milionů sekvencí současně. Výsledkem je obrovská produkce výstupních dat s tím, že se data musí utřídit a analyzovat, což bývá časově náročné (LabGuide, 2014-2019).

### 4.1 Maxam-Gilbertovo sekvenování

Tato metoda byla první přijatou metodou pro sekvenování DNA, kterou vynalezli Allan Maxam a Walter Gilbert (Snustad, 2009). Je to metoda, která je založená na chemickém štěpení jednotlivých typů bází. Pracuje se s jednovláknovou DNA, která je jedním svým konci, ať už 3' nebo 5', radioaktivně značena. Reakce se provádí ve čtyřech zkumavkách. V každé zkumavce je prováděno štěpení jen určitých typů bází. To tedy znamená, že DNA je štěpena jen v místě určitých bází. Tímto způsobem vzniká směs různě dlouhých fragmentů, které končí v místě určité báze a jejich elektroforézou v hustém polyakrylamidovém gelu, kdy jsou všechny čtyři reakce naneseny vedle sebe. Tím určíme rozdíly v délce fragmentů a to, jak daleko byla tato báze od začátku fragmentu. Odečtením pozice jednotlivých bází ve všech reakcích zjistíme sekvenci daného úseku, viz obrázek 2 (LabGuide, 2014-2019). Tato metoda se však již běžně nepoužívá.



**Obrázek 2** Maxam-Gilbertova metoda (zdroj: LabGuide, 2014-2019)

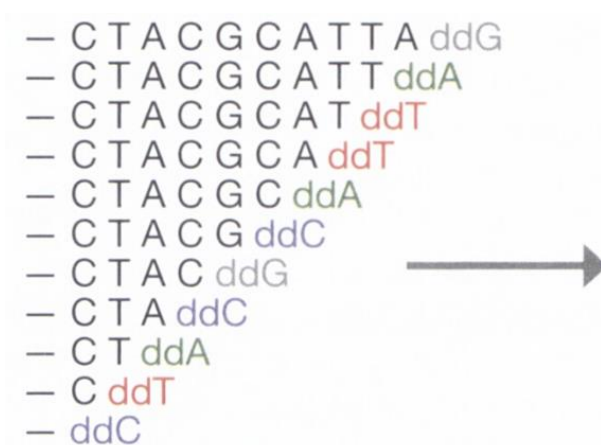
## 4.2 Sangerova metoda

Sangerova metoda sekvenování je též nazývána jako dideoxy sekvenování (Kuciel a Urban, 2016). Tato metoda využívá proces replikace DNA (LabGuide, 2014-2019). Dideoxy sekvenování je založeno na prodlužování krátkých primerů DNA polymerázou a ukončeno značenými dideoxynukleotidy (ddNTP). Nejdříve je potřeba provést denaturaci dvoušroubovicové DNA na jednotlivá vlákna. Toho lze dosáhnout pomocí zahřátí vzorku. Následně se na jedno vlákno naváže krátký primer, díky kterému bude sekvenováno jen jedno vlákno DNA. Navázaný primer má směr 5' → 3', proto začne na 3' konci syntéza nově vznikajícího vlákna podle templátového řetězce DNA, který má směr 3' → 5' (Kuciel a Urban, 2016).

Dříve se sekvenace prováděla takto. Reakce se prováděla ve čtyřech zkumavkách. V každé zkumavce byla jednovláknová DNA, primer, deoxynukleotidy (dATP, dTTP, dCTP a dGTP), DNA polymeráza a jeden specifický dideoxynukleotidy (ddATP, ddTTP, ddCTP a ddGTP) (Kuciel a Urban, 2016). Jednotlivé dideoxynukleotidy byly zastoupeny v relativně malém množství (LabGuide, 2014-2019). Dideoxynukleotidy mají na třetím uhlíku místo OH skupiny vodík, čímž se liší od deoxynukleotidů (Kuciel a Urban, 2016). V reakci muselo být přítomno více dNTP než ddNTP a to přibližně v poměru 100:1. Tento poměr zajišťoval správný průběh klasické syntézy DNA (Snustad, 2009). Pomocí radioaktivního ddNTP bylo snazší detekovat poslední zařazený nukleotid. Díky

zařazování dNTP byly syntetizovány různě dlouhé řetězce DNA (Kuciel a Urban, 2016). Po náhodném začlenění ddNTP do vlákna byla syntéza vznikajícího vlákna ukončena (Kočárek, 2004). Po připojení ddNTP už nelze připojit další nukleotid. Výsledkem byly tedy DNA fragmenty zakončené radioaktivně značenými ddNTP. K separování DNA řetězců se používala gelová elektroforéza, při které docházelo k rozdělení těchto fragmentů (Kuciel a Urban, 2016). Délka fragmentů byla vždy odlišná o jeden nukleotid (obrázek 3). Pro identifikaci posledních značených ddNTP se používala autoradiografie, což je technika k průkazu radioaktivních proužků (Campbell a Reece, 2006).

V dnešní době se používají přístroje pro automatizované sekvenování. Celá sekvenační reakce se provádí jen v jedné zkumavce (Kuciel a Urban, 2016). V automatickém sekvenování DNA se používají fluorescenční barviva místo radioaktivních izotopů ddNTP (Snustad, 2009) a je nahrazena gelová elektroforéza za kapilární (Swerdlow a Gesteland, 1990). Po proběhnutí sekvenační reakce se využívá zmíněné kapilární elektroforézy a laserového zařízení k zachycení signálu z fluorescenčně značeného ddNTP, přičemž každý nukleotid je značený jinou barvou. Výsledkem je elektroforetogram, na kterém jsou zobrazeny barvené píky, jejichž vrcholky jsou přiřazeny k jednotlivým nukleotidům podle barvy. Barevné vrcholky jsou dále automaticky převedeny do sekvence bází. Tato sekvence je komplementární k templátovému řetězci (Kuciel a Urban, 2016).



**Obrázek 3** Princip sekvenování DNA - úseky DNA o různé délce vzniklé začleněním fluorescenčně značených ddNTP (zdroj: Kočárek, 2004)

### **4.3 Novější metody sekvenování**

Jak už je zmíněno výše, sekvenování nové generace neboli „next generation sequencing“ vzniklo v posledních dvaceti letech. V porovnání s klasickými metodami sekvenování umožňují novější metody rychlou a cenově příznivou produkci velkého množství osekvenovaných vzorků najednou. Sekvenování nové generace využívá principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně. Výsledkem je obrovská produkce výstupních dat s následnou potřebou data roztrždit a analyzovat (LabGuide, 2014-2019).

Nové metody sekvenování jsou využívány především pro celogenomové sekvenování, studium genetické variability, mutační analýzu, transkriptomovou analýzu (RNA-sequencing), studium DNA-proteinových interakcí a metagenomiku (LabGuide, 2014-2019).

## 5 Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce bylo:

1. Seznámit se s literaturou ohledně genu *ZNF341* a Hyper-IgE syndromu.
2. Osvojit si základní metody molekulární biologie – izolace DNA, PCR, sekvenování, hodnocení sekvencí.
3. Srovnat výskyt nalezených mutací v genu *ZNF341* mezi populacemi dětí z Karvinska a Českobudějovicka.



## 6 Metodika

Praktickou část své bakalářské práce jsem povedla v laboratořích Zdravotně sociální fakulty Jihočeské university v Českých Budějovicích pod vedením pana Ing. Tomáše Nixe, Ph.D. Analyzovala jsem 20 anonymizovaných vzorků od náhodně vybraných jedinců. U těchto jedinců jsem provedla bukální stěr s následnou izolací DNA. Po vyizolování DNA jsem si pomocí metody PCR naamplifikovala určitý úsek genu a následně jsem díky elektroforéze zjistila přítomnost tohoto genu. Poté jsem tento PCR produkt přečistila a poslala na sekvenaci. Sekvenaci jsem nechala provést u firmy GenSeq s.r.o.

### 6.1 Odběr vzorků

Nejprve jsem odebrala vzorky DNA, které jsem získala pomocí bukálního stěru a následně z nich provedla izolaci DNA. Před samotným odběrem jsem osoby poučila o tom, že by hodinu před provedením stěru neměly nic jíst ani pít, pouze čistou vodu. Stěr z bukální sliznice jsem provedla sterilním výtěrovým tamponem. Během stírání sliznice dutiny ústní jsem tamponem otáčela, abych využila celou jeho plochu. Poté jsem výtěrový tampón vložila do zkumavky a pečlivě označila.

### 6.2 Izolace DNA

K izolaci jsem použila komerčně dodávaný kit od firmy Macherey-Nagel. Během izolace jsem postupovala podle návodu od toho výrobce.

#### Pomůcky:

- Pipeta
- Špičky
- Kolonka
- 1,5 ml zkumavky
- Sběrné zkumavky
- Rukavice

#### Reagencie:

- PBS (Phosphate Buffered Saline)

- Wash Buffer BL2
- Wash Buffer BL3
- Buffer BL1
- Elution Buffer BL4
- Proteináza K
- 96 % Ethanol

### **Pracovní postup:**

Jako první jsem si zapnula vodní lázeň na 70°, vyhřála eluční pufr BL4 na 70°C a nechala jsem rozpustit proteinázu K. Poté jsem si popsala štítky a označila jimi 1,5 ml zkumavky. Do připravených mikrozkuvek jsem sterilně odstříhla výtěrové tampóny, přidala 10 µl proteinázy K, 200 µl PBS a 200 µl lyzačního pufru BL1. Následně jsem vzorky zvortexovala a stočila. Mikrozkuvky jsem vložila do vodní lázně, kde jsem je nechala inkubovat po dobu 20 minut při teplotě 70°C. Mezitím jsem si připravila a popsala jednu kolonku a dvě sběrné zkumavky. Dále jsem popsala jednu 1,5 µl mikrozkuvku, nalepila štítek pro konečnou DNA. Po inkubaci jsem vzorky zvortexovala a krátce stočila. Následně jsem přidala 200 µl ethanolu, znovu zvortexovala a stočila.

Z každé mikrozkuvky jsem sterilně odstranila výtěrový tampón a lyzát jsem přepitetovala do předem připravených a označených kolonek a provedla centrifugaci po dobu 1 minuty při 11 000 x g. Po centrifugaci jsem kolonky přemístila do nových sběrných zkumavek a filtrát i se zkumavkou vyhodila. Následně jsem přidala 500 µl pufru BL2 a nechala stočit 1 minutu při 11 000 x g. Filtrát ze sběrných zkumavek jsem vylila a přidala 600 µl promývacího pufru BL3 a nechala centrifugovat po dobu 2 minut při 11 000 x g. Opět jsem vylila filtrát ze sběrných zkumavek a provedla centrifugaci po dobu 30 vteřin při 11000 x g. DNA byla navázaná na silikagel v kolonce, takže jsem mohla sběrnou zkumavku s filtrátem vyhodit.

Do připravené a označené 1,5 ml zkumavky jsem opatrně přendala kolonku s DNA. Přidala jsem 20 µl předehřátého pufru BL4 a nechala inkubovat při pokojové teplotě přibližně 5 minut. Po uplynutí této doby jsem dala vzorky do centrifugy a nechala je stočit 1 minutu při 11000 x g. DNA jsem přepipetovala na kolonku, nechala 5 minut inkubovat a znovu stočila na centrifuze po dobu 1 minuty při 11000 x g. Tuto dvojí eluci jsem provedla, abych dosáhla vyšší koncentrace DNA. Následně jsem kolonku vyhodila a

získala čistou DNA v označené 1,5 ml zkumavce. Poté jsem provedla měření koncentrace vzorků DNA a dále skladovala při teplotě -20°C.

### 6.3 Měření koncentrace vzorků DNA

#### Pomůcky:

- Buffer BL4
- Špičky
- Pipeta

#### Přístroje:

- Spektrofotometr Colibri Microvolume

K měření koncentrace DNA jsem použila spektrofotometr Colibri Microvolume. Nejprve jsem použila pufr BL4 jako blank, jehož koncentrace je nulová. Následně jsem měřila koncentrace jednotlivých vzorků po 1  $\mu$ l DNA. Naměřené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 20-70 ng/ $\mu$ l, tedy až na pár výjimek.

### 6.4 PCR

Metoda PCR neboli polymerázová řetězová reakce slouží k amplifikaci úseku DNA (Sršeň, 1995). Je to technika *in vitro* založená na principu replikace DNA, kdy se polymerační část sekvence DNA namnoží a vytvoří miliony kopií (Kuciel a Urban, 2016).

Do každého testu PCR je nutné dát templátovou DNA, dva primery (R – reserve a F – forward), které nám ohraničují vybraný úsek DNA, nukleotidy, které zahrnují čtyři báze – adenin, cytosin, guanin, thymin, které fungují jako stavební kameny a Taq DNA polymerázu, což je klíčový enzym pro syntézu PCR produktu (Garibyan a Avashia, 2013). Taq DNA polymeráza je izolována z bakterie *Thermus aquaticus* (Kuciel a Urban, 2016).

Všechny tyto komponenty jsou smíchány v mikrozkušavkách a poté umístěny do termocyklieru. Termocykler je přístroj, ve kterém probíhá PCR reakce. Přístroj zvyšuje a snižuje teplotu bloku, ve kterém jsou mikrozkušavky s reakční PCR směsí. Reakční roztok se nejprve zahřeje, kdy dojde k oddělení řetězců, tedy k denaturaci. Poté se teplota sníží a na segmenty DNA nasedají specifické primery. Tento proces se nazývá

hybridizace. K hybridizaci dochází pouze v případě, že primery a DNA jsou v sekvenci komplementární. Opět dojde ke zvýšení teploty, při které je DNA polymeráza schopna prodlužovat primery přidáváním nukleotidů k vyvíjejícímu se řetězci DNA. Při každém opakování těchto tří fází dochází k amplifikaci DNA (Garibyan a Avashia, 2013).

### Velikost sekvenovaného úseku

Gen *ZNF341* má 67510 bp. Celý exon 15 obsahuje 1282 nukleotidů. Běžnými sekvenátory nelze osekvenovat tak dlouhý exon, proto se osekvenovala pouze jeho druhá část. Z finančních důvodů nebylo možno sekvenovat celý exon. Na obrázku 4 je tmavočerveně zobrazen celý exon 15 a modře jsou označeny primery.

```

actttccctgcccctccaggcatgaagctccacaatgcccctgtgcagcaagtccttcagccgcccgtgccaccctgcccagcatcagcgcgccacacggggc
aactacaagttccgctgtgctggctgcccgaaggctttccgccacaatacctcaaagatcaccgctgtcgtctggccccaaaaggacaaggacctgcaaa
ccccggggccccccagaggaggcagccccccgagttggcagtggtggggcgaaggtgctgaccccttgccctgacccgctggggctggaggagctg
aaggacacaggggctggctgtgcccggagctgtccccggcaagccgccccttcgagagccggacgcgggtgctgcatcgttgggggtggcgggtggg
ggcgaactgagctgggtgacacgctgaggggctgggtccaacctgctgcccggagctgagggctggggccgaggcccatgtccatgctcgc
ctgtgcccgtctacatccaggcctccagtgacggacctgaggtgtctgttctggcaggccctgatactcctgtgggctcaggggccccctggggcagaccgg
tgatcctaccagtggaagcagccatcgagccattggcagaaatcctgctgaaatgctcattcagaaacctcagcccatggtgcccctctgtgccctctcctgcccg
aaagccctgcaacattctagggtggggcagggccatccacggtttctggcagagccatggtggcaggagagagatggctgaagcctgagcagcccagat
cccgtggtctaggctgggtgctggggccccctgggagaggagacagggcattcctcccactctgtctcaggctgctctggtagcctctagtctgttcttc
aggaggcctgcataaactctcggagttacgtgtgacactttcacagacgggtccccacagcatcctcagacagctctgtgatgacttttagggagcactcag
gtgtcacggctagactgagcctatgagacagatcggcttcaatccaagagttccatgacactgtgtgaccttgggcaagtcacttcacttctctgagccccgt
gttctctatctgtacaatggggcttacgatactactcctcataggggtgtcctggggatccagtatgatgaagtcgcccaggggcttggcatggtcccggcacgca
gaaagtgctcaataaatgtttttgcaaacgtttccgggtgcccctggg

```

**Obrázek 4** Sekvence exonu 15 (zdroj: NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/1173639576>)

### Primery pro PCR

Použité primery (tabulka 2) byly navrženy v laboratoři za pomoci programu Primer BLAST. Tento program je volně dostupný na stránkách NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Původní koncentrace primerů byla 100 pmol/μl, ale pro své účely jsem si roztok primerů naředila na koncentraci 10 pmol/μl. Naředila jsem to tím způsobem, že jsem do mikrozkušavky napipetovala 45 μl vody a 5 μl zásobního roztoku primeru. Primery byly syntetizovány na zakázku firmou Genери Biotech.

**Tabulka 2** Sekvence použitých primerů pro PCR

Primer	Sekvence	Délka
ZNF341 exon 15 F	5' – TGATGCTCCTGTTTGGGTCC – 3'	20 bp
ZNF341 exon 15 R	3' – CACCCGGACACGTTATGACA – 5'	20 bp

Zdroj: vlastní

Pomůcky:

- Špičky
- Rukavice
- 0,2 ml mikrozkušavky

Reagencie:

- DNA
- primer forward
- primer reverse
- MasterMix
- PCR voda

**Pracovní postup:**

Jako první jsem si popsala 0,2 ml PCR mikrozkušavky. Z mrazicího boxu jsem si vyndala potřebné reagencie a nechala je rozmrznout. Po rozmražení jsem reagencie zvortexovala a zcentrifugovala. Do jednotlivých mikrozkušavek jsem napipetovala 7,5 µl MasterMixu, 1,5 µl primeru reverse, 1,5 µl primeru forward a 1,5 µl DNA v závislosti na její koncentraci. A jako poslední jsem přidala 3,5 µl vody, aby výsledný objem měl 15 µl. Následně jsem mikrozkušavky zvortexovala, stočila a vložila do termocyklu, kde jsem nastavila příslušný program (viz tabulka 3) a nechala proběhnout reakci. Použitý teplotní profil nebylo potřeba nijak optimalizovat, protože již byl v laboratoři dříve použit pro amplifikaci části exonu 15 genu *ZNF341*.

**Tabulka 3** Teplotní profil PCR

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95°C	10 min	1
Denaturace	95°C	30 s	35
Annealing	60°C	30 s	35
Extenze	72°C	1 min	35
Konečná extenze	72°C	10 min	1
Chlazení	12°C	12 hod	1

*Zdroj: vlastní*

## 6.5 Elektroforéza

Elektroforéza je základní metoda pro separaci DNA molekul či jejich fragmentů na základě jejich velikosti, tedy počtu párů bází (Kuciel a Urban, 2016). Nukleové kyseliny jsou záporně nabitě molekuly, které jsou oddělovány na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Nukleové kyseliny se pohybují od katody k anodě. Tato pohyblivost molekul závisí na jejich molekulové hmotnosti. Čím menší molekuly jsou, tím se v daném nosiči (v tomto případě gelu) pohybují rychleji. Větší molekuly se pohybují v gelu o něco pomaleji. K vizualizaci oddělených molekul se využívají barviva ethidium bromid nebo SYBR green a ke konečnému zviditelnění je nutné gel prosvítit UV zářením (Magdeldin, 2012). Gelovou elektroforézu jsem využila pro ověření, zda amplifikace vybraného úseku DNA proběhla v pořádku.

### Pomůcky:

- Pipeta
- Špičky
- Rukavice

### Reagencie:

- Agaróza SERVA
- 1xTBE-puffer
- Ethidium bromid SERVA
- 100bp DNA-ladder (NEB, ROTH)
- Destilovaná voda

### **Pracovní postup:**

Nejprve jsem začala přípravou 3% agarózového gelu. Navážila jsem do baňky 3 g agarózy a přilila 100 ml 1xTBE. Následně jsem tuto baňku zahřívala v mikrovlnné troubě, dokud jsem se nezbavila bublin. Následně jsem baňku ochladila proudem studené vody na 70°C, přidala 10 µl ethidium bromidu a promíchala. Ethidium bromid je karcinogenní látka, musí se s ní zacházet s velkou opatrností. Poté jsem gel nalila do formy, umístila hřebínek, který vytvořil v gelu jamky a nechala ho ztuhnout.

Po ztuhnutí gelu jsem vyndala hřebínek a gel vložila do elektroforetické vany. Vanu s gelem jsem zalila 1xTBE pufrem tak, aby byl gel ponořený. Následně jsem do první jamky napipetovala 5 µl 100bp DNA ladderu, a pak do dalších jamek 5 µl jednotlivých vzorků PCR. Elektroforetickou vanu jsem přikryla víkem a připojila elektrody. Elektroforéza probíhala po dobu 35 minut při 110 V.

Po ukončení elektroforézy jsem odpojila elektrody a sundala víko z vany. Gel jsem opatrně vzala a umístila jej na UV transiluminátor, kde jsem ho prosvítla UV zářením. Gel jsem vyfotografovala a obrázek přesunula na připravený flash disk.

### **6.6 Enzymatické přečištění PCR produktů**

Metoda enzymatického přečištění PCR je snadný způsob, jak odstranit zbývající dNTP a primery z PCR reakce. Exonukleáza I (EXO I) degraduje zbytky primerů PCR a alkalická fosfatáza krevet (rSAP) defosforyluje zbývající dNTP. Po této metodě mohou přímo následovat aplikace, jakou jsou Sangerovo sekvenování, NGS (= Next Generation Sequencing), genotypizace, analýza SNP (= single-nucleotide polymorphism) a různé modifikace PCR. Po tepelném cyklování se do PCR reakce přidají 2 enzymy, beze změny pufru či dalších přísad. Tyto enzymy jsou 100% kompatibilní se všemi běžně používanými pufrů pro PCR reakci (New England BioLabs, 2019).

K čištění PCR produktů dochází vždy před sekvenováním, hlavně důsledku toho, že by mohlo dojít ke špatné čitelnosti sekvenačních grafů. Mezi nejznámější příčiny patří přítomnost různých inhibitorů v templátech reakce (např. krev, tkáň, ale mohou to být i alkoholy a soli) (Kujanová, 2019).

#### Pomůcky:

- Pipeta
- Špičky
- 1,5 ml zkumavky
- Rukavice

#### Reagencie:

- EXO I (NEB)
- rSAP (NEB)
- PCR produkt

#### **Postup přečištění:**

Nejprve jsem produkt PCR zvortexovala a stočila na cetrinfuze. Do mikrozkušavek jsem napipetovala 5 µl PCR produktu, 0,5 µl EXO I a 1 µl rSAP. Následně jsem mikrozkušavky zvortexovala, krátce stočila na centrifuze a vložila do termocycleru. Na termocycleru jsem zvolila příslušný program, který zahrnuje inkubaci vzorků a inaktivaci enzymů (tabulka 4).

**Tabulka 4** Teplotní profil PCR - EXO

<b>Postup</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>
Inkubace	37°C	15 min
Inaktivace enzymů	80°C	15 min

*Zdroj: New England BioLabs, 2019*

## **6.7 Příprava na sekvenování**

#### Pomůcky:

- Pipeta
- Špičky
- 1,5 ml zkumavky
- Rukavice

#### Reagencie:

- PCR voda



- Přečištěný PCR produkt
- Primer forward
- Primer reverse

Připravila jsem si 1,5 ml mikrokumavky a označila je čárovým kódem od firmy GenSeq s.r.o. Do sešitu jsem si vlepila druhou část kódu a řádně je popsala. Do jednotlivých mikrokumavek jsem napipetovala zvlášť 5  $\mu$ l primeru F a 5  $\mu$ l primeru R, 1,5  $\mu$ l přečištěného PCR produktu a následně jsem do celkového objemu 10  $\mu$ l doplnila PCR vodou. Poté jsem mikrokumavky uzavřela, vložila do schránky GenSeq s.r.o. a nechala vzorky osekvenovat.

## 6.8 Sangerovo sekvenování

Tato enzymatická metoda je založena na prodlužování krátkých primerů DNA polymerázou a ukončena značenými dideoxynukleotidy. Proto se tato metoda též nazývá dideoxy sekvenování (Kuciel a Urban, 2016).

V analýze se používá pouze jeden oligonukleotidový primer (forward nebo reverse), který je komplementární k počáteční oblasti sekvenovaného úseku DNA (Kočárek, 2004). Díky tomuto jednému typu primeru se sekvenuje jen jeden řetězec DNA, což je hlavní rozdíl od PCR. Syntéza nového vlákna probíhá ve směru 3'  $\rightarrow$  5' (Kuciel a Urban, 2016). Dále jsou do reakční směsi přidány deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP), dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP) a DNA-polymeráza. Dideoxynukleosidtrifosfáty (ddATP, ddGTP, ddCTP a ddTTP) mají na 3' uhlíkovém atomu deoxyribózy navázán pouze vodík místo OH-skupiny. Každý z druhů ddNTP je označen odlišným fluorescenčním barvivem (Kočárek, 2004).

Všechny tyto reagensie se dají do jedné zkumavky, která se následně vloží do termocycleru (Kuciel a Urban, 2016). V termocycleru se postupně mění teploty stejně jako u metody PCR. Při syntéze se do nových vláken DNA začleňují postupně jednotlivé nukleotidy. Pokud se zařadí ddNTP místo dNTP znamená to, že se tvorba příslušného řetězce zastaví. Je to důsledek toho, že na třetím uhlíku je pouze již zmíněný vodík, nikoli OH-skupina. Další nukleotid se nemá už kam navázat. Tímto způsobem se vytvoří velký počet fragmentů DNA o různé délce (obrázek). Pomocí elektroforézy získáme spektrum úseků a díky fluorescenčnímu barvivu zjistíme, kterým ddNTP byla syntéza ukončena. Pořadí těchto ddNTP udává sekvenci analyzovaného řetězce DNA. K vyhodnocení se

používají sekvenátory (Kočárek, 2004). Výsledkem je elektroforetogram, na kterém jsou barevné píky. Vrcholky píků představují jednotlivé nukleotidy podle barvy (Kuciel a Urban, 2016).

Vzhledem k tomu, že v laboratoři nebyl k dispozici sekvenátor, nechala jsem vzorky osekvenovat firmou GenSeq s.r.o.

## 7 Výsledky

Jak už je uvedeno výše, praktická část se skládala z izolace DNA ze stěru bukální stěny, následovalo měření koncentrace DNA, namnožení části úseku DNA pomocí PCR metody, dále byla provedena elektroforéza s následným přečištěním produktů PCR, příprava vzorků pro sekvenaci a zaslání firmě GenSeq s.r.o. k sekvenování.

Zkoumala jsem 20 anonymizovaných vzorků a vyšetřovala, zda se u některých vzorků nevyskytuje mutace části exonu 15 genu *ZNF341*. Izolaci DNA jsem provedla pomocí komerčního kitu NucleoSpin Tissue od firmy Macherey-Nagel. Postupovala jsem podle návodu a poté jsem provedla měření koncentrací vyizolovaných DNA.

Měření koncentrací DNA jsem provedla pomocí spektrofotometru Colibri Microvolume. U každého vzorku jsem měřila koncentraci dvakrát. Pokud se naměřené hodnoty shodovaly nebo byly jen trochu rozdílné, udělala jsem z nich průměrnou hodnotu. Pokud byl mezi hodnotami větší rozdíl, udělala jsem ještě třetí měření, abych zjistila, ke které ze dvou provedených měření se mám přiklonit. Průměrné hodnoty jsem zapsala do tabulky (tabulka 5).

**Tabulka 5** Výsledné měření koncentrací vzorků DNA

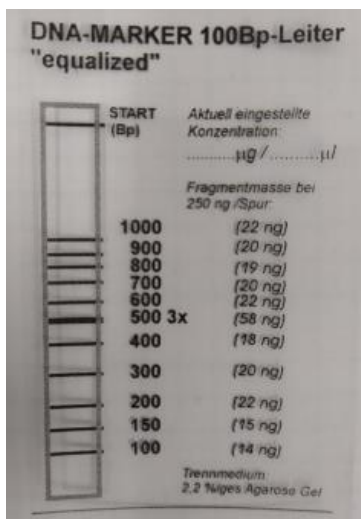
Vzorek	Výsledná koncentrace	Vzorek	Výsledná koncentrace
1.	47,65 ng/μl	11.	36,22 ng/μl
2.	33,70 ng/μl	12.	23,86 ng/μl
3.	65,81 ng/μl	13.	62,72 ng/μl
4.	7,78 ng/μl	14.	0,81 ng/μl
5.	32,14 ng/μl	15.	22,21 ng/μl
6.	7,90 ng/μl	16.	45,32 ng/μl
7.	96,60 ng/μl	17.	31,92 ng/μl
8.	30,90 ng/μl	18.	29,03 ng/μl
9.	41,35 ng/μl	19.	26,30 ng/μl
10.	53,71 ng/μl	20.	38,00 ng/μl

*Zdroj: vlastní*

Koncentrace vzorků byla pro mé potřeby dostačující, až na vzorek č. 14, kde byla naměřena koncentrace 0,81 ng/μl.

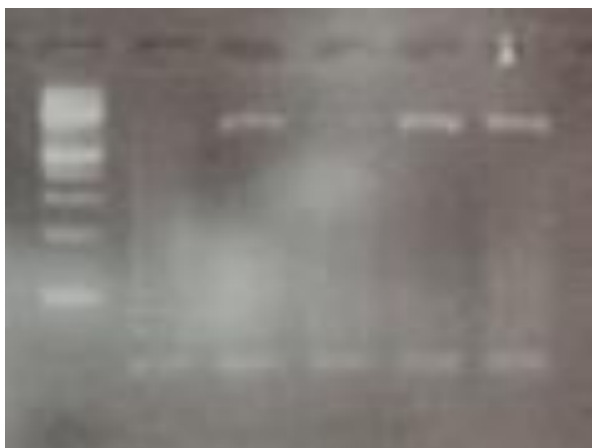
Po naměření koncentrací DNA následovala metoda PCR. Jak už je zmíněno v metodice, PCR slouží k amplifikaci určitého úseku DNA. Do mikrozkušavky se dají všechny určené reagenty, tedy MasterMix, primer forward a reverse, DNA a voda. Mikrozkušavky jsem vložila do termocycleru a zapnula příslušný program.

Abych zkontrolovala, zda amplifikace DNA proběhla úspěšně, tak jsem provedla gelovou elektroforézu. Elektroforézu jsem provedla v elektroforetické vaně od výrobce MajorSiences. Porovnávala jsem vzorky s DNA ladderem (obrázek 5).



**Obrázek 5** Použitý DNA ladder - 100 bp (zdroj: vlastní)

Ladder č. 1 č. 2 č. 3 č. 4 č. 5



**Obrázek 6** Elektroforéza produktů PCR na gelu (zdroj: vlastní)

V závislosti na obrázku 6 můžeme rozpoznat sílu bandu. U vzorku č. 1 reakce PCR nejspíš neproběhla, na rozdíl od vzorku č. 3, kde je vidět slabý band. U vzorků č. 2, 4 a 5 proběhla PCR v pořádku, je zde vidět síla bandu. Prosvícení je způsobené díky barvivu ethidium bromid, které jsem do gelu přidala.

Po elektroforéze následovalo enzymatické přečištění PCR produktů a poté jsem vzorky poslala firmě GenSeq s. r. o. k osekvenování. Po několika dnech mi od této firmy přišly výsledné sekvence, které jsem poté vyhodnocovala. K vyhodnocení jsem používala program BioEdit a databázi NCBI blast. Hodnotila jsem čitelnost sekvencí a vyhledávala, zda se v sekvencích nacházejí mutací.

## **7.1 Hodnocení sekvencí**

Všechny sekvence byly hodnoceny dle této reference: Homo sapiens zinc finger protein 341 (ZNF341), RefSeqGene on chromosome 20; Sequence ID: NG\_053072.1

### **7.1.1 Mé vzorky**

Nejprve jsem začala hodnotit 20 vzorků, které jsem zpracovala v laboratoři. Každý vzorek obsahoval dvě sekvence, jednu pro F a druhou pro R.

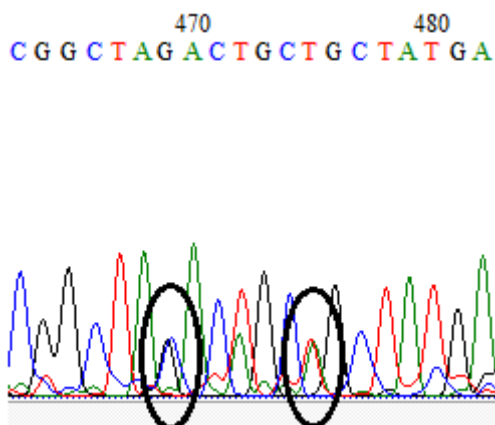
Vzorek č. 1 – F - Tento vzorek nebyl čitelný, byl tu obrovský šum a nedal se hodnotit. Nechala bych ho znovu osekvenovat.

Vzorek č. 1 – R – Tuto sekvenci bych zhodnotila jako průměrnou, prvních 70 bp bylo nečitelných. Od 70 bp byla sekvence výrazně lépe čitelná, i když byl viditelný lehký šum. Sekvence se dala hodnotit do 400 bp. V tomto vzorku jsem nenašla mutace.

Vzorek č. 2 – F – Prvních 100 bp bylo ve špatné kvalitě, byl zde viditelný šum a tento úsek se nedal hodnotit. Dále už byla sekvence lepší, avšak dala se hodnotit pouze do 400 bp. Poté už byla opět nečitelná. Navíc jsem přišla na to, že jsem do vzorku dala pravděpodobně menší množství PCR produktů, protože píky byly velmi nízké a postupně se snižovaly. V sekvenci jsem nenalezla mutace.

Vzorek č. 2 – R – Tuto sekvenci nešlo hodnotit. Byl tu obrovský šum a pravděpodobně jsem sem dala málo PCR produktů, protože píky byly opět nízké. Pokud by se ve vzorku s forwardem vyskytovaly mutace, nechala bych tento vzorek znovu osekvenovat.

Vzorek č. 3 – F – Sekvenci bych hodnotila jako velmi pěknou, i přes to, že prvních 100 bp nebylo čitelných. Sekvence se dala hodnotit do 600 bp. Stejně jako u předchozích vzorků jsem nejspíš přidala málo PCR produktů. Píky byly nízké a s přibývajícím bp se snižovaly. V databázi NCBI blast mi vyšla 98% shoda. Jako suspektní se mi jevily dvě mutace ke konci čtení sekvence (469 a 475 bp), viz obrázek 7. Jelikož zde však byla již kvalita spíše podprůměrná, přiklonila bych se k tomu, že se o mutaci nejedná. Pokud bych vyšetřovala klinický vzorek s podobnou kvalitou sekvence, nechala bych vzorek znovu osekvenovat.



**Obrázek 7** Náznak mutací u 469 bp a 475 bp ve vzorku 3 – F (zdroj: vlastní)

Vzorek č. 3 – R – Z počátku nebyla sekvence nejlepší, ale od 70 bp se dala pěkně hodnotit. Hodnotitelná byla pouze do 430 bp, pak následovat šum, ze kterého nešlo nic rozeznat. I v tomto případě jsem pravděpodobně přidala do vzorku málo PCR produktů, protože byly celkem nízké a pak se ještě snižovaly. V tomto vzorku jsem neobjevila žádnou mutaci.

Vzorek č. 4 – F – Tato sekvence byla velmi pěkná, byl sice viditelný menší šum, ale i přes to se dala sekvence dobře hodnotit. Na první pohled se mi zdálo, že se u některých bp nacházejí mutace. Po zadání do databáze NCBI blast mi vyšla 100 % shoda. Usoudila jsem tedy, že se o mutace nejednalo. Pravděpodobně šlo pouze o šum, který se ke konci sekvence nacházel.

Vzorek č. 4 – R – Sekvence se nedala hodnotit. Pokud by se nacházely mutace v F sekvenci, nechala bych tento vzorek osekvenovat.

Vzorek č. 5 – F – Na první pohled vypadla sekvence velmi pěkně. Zdálo se mi, že se sem tam vyskytuje nějaká mutace, protože se pokaždé v jednom místě vyskytovaly dva píky, buď totožné, nebo byl jeden vyšší a druhý nižší. Je však zřejmé, že se jedná o artefakty

v důsledku horšího čtení. V databázi NCBI blast mi vyšla 100% shoda a také jsem zjistila, že gen nebyl osekvenovaný celý. Avšak to nevadilo u hodnocení sekvence.

Vzorek č. 5 – R – Prvních 100 bp se nedalo hodnotit, byl zde obrovský šum. Od 100 bp byla sekvence téměř ukázková. Píky byly celkem nízké, pravděpodobně to bylo způsobené tím, že jsem přidala málo PCR produktů. V BioEditu jsem si prohlédla celou sekvenci a zjistila, že se sekvence dala hodnotit pouze do 380 bp. Poté už nastal šum a nedalo se to hodnotit. V této sekvenci se nevyskytovaly mutace.

Vzorek č. 6 – Přestože v tomto vzorku byla menší koncentrace PCR, obě sekvence, jak F, tak R, vyšly velmi pěkně. V obou sekvencích byl za začátku menší šum, ale od 100 bp se daly obě dvě velmi pěkně hodnotit. Na první pohled jsem neviděla žádnou mutaci a po zadání do databáze NCBI blast mi vyšla 100% shoda v obou sekvencích.

Vzorek č. 7 – F – Tato sekvence byla průměrná, ale dala se celkem dobře hodnotit. V místě 321 bp jsem měla podezření na heterozygotní mutaci. Byl tu dvojpík, větší pík pro C a poloviční pík pro T. Pro kontrolu jsem se podívala do R sekvence a hledala, zda se tu někde v oblasti 300-400 bp nachází podobný dvojpík. Ale nic jsem nenašla, proto jsem naznala, že se o mutaci nejednalo. Pravděpodobně šlo pouze o šum.

Vzorek č. 7 – R – Velmi pěkná sekvence bez známek mutací.

Vzorek č. 8 – F – Další velmi pěkná sekvence, řekla bych, že přímo výstavní. V BioEditu jsem nenašla jediný náznak mutace, ovšem v databázi NCBI blast mi vyšla shoda 99 %. Na konci sekvence, u 698 bp, byly 3 píky pro A. Podle databáze NCBI se v sekvenci nacházely 4 píky pro A. Z BioEditu bylo vidět, že třetí pík pro A byl o něco širší než ostatní. Tím nejspíš vznikla tato neshoda.

Vzorek č. 8 – R – Oproti sekvenci s F byla tato sekvence o něco horší. Byl tu ze začátku obrovský šum, ze kterého se nedalo nic rozeznat. Od 80 bp byla sekvence průměrná, vyskytoval se tu lehký šum. Prohlédla jsem si celou sekvenci a přišla na to, že se dala hodnotit pouze do 500 bp, protože dále už byl opět obrovský šum. I přes to, že se dal hodnotit jen kratší úsek sekvence, nenašla jsem tu jedinou mutaci.

Vzorek č. 9 – F – Sekvence nebyla vhodná k hodnocení.

Vzorek č. 9 – R – Tuto sekvenci bych hodnotila jako průměrnou. Pravděpodobně jsem do vzorku přidala málo PCR produktu, jelikož píky byly opravdu velmi nízké a tím se

ztížilo hodnocení této sekvence. V některých místech sekvence jsem měla podezření na vyskytující se mutace, ale nakonec jsem usoudila, že o mutace nejde. Šlo pouze o šum.

Vzorek č. 10 – Ani jedna z těchto dvou sekvencí tohoto vzorku nebyly k hodnocení.

Vzorek č. 11 – F – Sekvence byla celkem dobře hodnotitelná, sice byl viditelný lehký šum, ale ten nebránil v hodnocení. U 241 bp jsem měla pocit, že se vyskytuje mutace. Pro jistotu jsem se podívala do R sekvence a vyvrátila si tím svou původní myšlenku. Sekvenci jsem zadala do databáze NCBI blast, ze kterého jsem zjistila, že gen nebyl osekvenovaný celý, že část chyběla. To ovšem nemělo vliv na hodnocení.

Vzorek č. 11 – R – I tato sekvence byla pěkná bez známek mutací.

Vzorek č. 12 – F – Na první pohled bych řekla, že tato sekvence byla přímo excelentní. Žádný šum, žádné mutace a ani tu nebyly rozšířené píky.

Vzorek č. 12 – R – V porovnání s F sekvencí byla tato sekvence podprůměrná. Ze začátku byl obrovský šum, ale od 100 bp už dala se hodnotit. V některých místech jsem měla podezření na mutace, byly tu vidět jasné dvojpíky, ale usoudila jsem, že se o mutace nejednalo. Pravděpodobně šlo jen o šum. Na konci sekvence, u 659 bp byla menší nesrovnalost. Podle databáze NCBI blast tu měly být 3 píky pro G. Podívala jsem se znovu do BioEditu a uviděla, že se zde nenacházely 3 píky, nýbrž jen 2 píky pro G. Druhý pík byl ovšem velmi široký. Nejspíš proto vyšla v databázi NCBI blast 98 % shoda (viz obrázek 8).

Vzorek č. 13 – F – Do tohoto vzorku jsem nejspíš přidala málo PCR produktů, protože opět byly píky velmi nízké a s narůstajícími bp se ještě snižovaly. I tady jsem měla podezření na vyskytující se mutace. Opak byl však pravdou, v této sekvenci se nevyskytovala jediná mutace.

Vzorek č. 13 – R – Tato sekvence byla velmi pěkná, sice tu byl menší šum, ale ten neměl vliv na hodnocení. V BioEditu jsem nenašla žádný dvojpík, co by připomínal mutaci. Z databáze NCBI blast jsem zjistila, že gen nebyl osekvenovaný celý. To ale nemělo vliv na hodnocení.

Vzorek č. 14 – Tento vzorek vůbec nevyšel, hlavním důvodem pravděpodobně bylo, že jsem do vzorku přidala velmi málo PCR produktu. Z časových a finančních důvodů už jsem neprovedla opakování sekvenace tohoto vzorku.



Vzorek č. 15 – F – Tato sekvence nebyla bohužel k hodnocení.

Vzorek č. 15 – R - I tato sekvence byla velmi špatná, ale oproti F sekvenci se dala vyhodnotit. Hodnotila jsem ji až od 150 bp, protože ze začátku byla velmi špatná. I v této sekvenci jsem měla podezření na mutace, avšak tato myšlenka se mi nepotvrdila.

Vzorek č. 16 – F – V porovnání s dvěma předchozími vzorky byla tato sekvence téměř výstavní. V BioEditu jsem nenarazila na mutaci. Zadála jsem tedy sekvenci do databáze NCBI blast. Z té jsem zjistila, že se na konci sekvence vyskytuje nějaká neshoda, protože mi vyšla 98 % shoda. Znovu jsem se podívala do BioEditu a narazila na stejný problém, který se vyskytoval i v několika předchozích sekvencích. U 701 bp měly být 3 píky pro T, ale byly tu pouze píky 2.

Vzorek č. 16 – R – Sekvenci jsem nemohla vyhodnotit, protože její kvalita byla opravdu špatná.

Vzorky č. 17 – 20 – Tyto vzorky nebyly poslány k sekvenování, protože ani u jednoho z nich nebyl přítomen PCR produkt. PCR jsem zopakovala, bohužel bez úspěchu. Další opakování již nebylo možné vzhledem k časovým možnostem a téměř vyčerpované DNA. Byla by nutná nová izolace.

Ani v jednom ze vzorků, které jsem zpracovala v laboratoři, jsem nenašla jedinou mutaci. Následně jsem dostala k vyhodnocení 10 vzorků z Českobudějovicka a 10 vzorků z Karvinska.

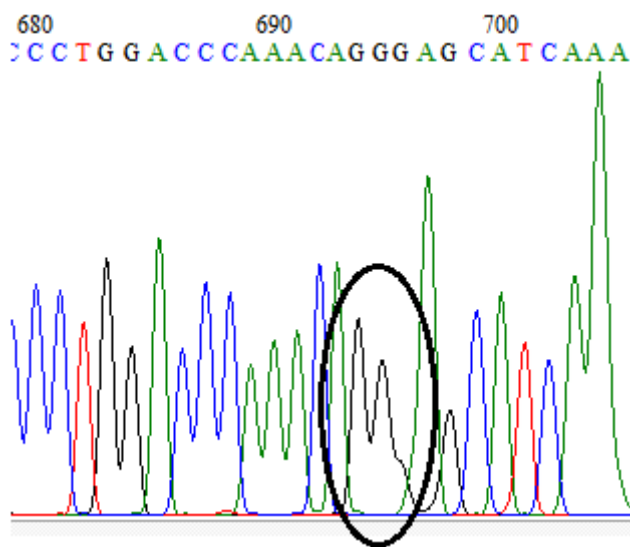
### **7.1.2 Českobudějovicko**

Vzorek č. 1 – F – Tuto sekvenci bych hodnotila jako průměrnou, je zde vidět menší šum. U 253 bp by se mohlo jednat o heterogenní mutaci. Jsou tam patrné dva píky, větší pro C a mnohem menší pro T. Program označil bázi C, která je shodná s referencí v databázi NCBI blast. Přiklonila bych se k tomu, že se o mutaci nejedná. Kontrola se sekvencí R nebyla možná.

Vzorek č. 1 – R – Sekvenci nelze hodnotit, je tu obrovský šum. Nechala bych ji znovu osekvenovat.

Vzorek č. 2 – F – Tuto sekvenci nelze hodnotit. Navíc od 160 bp jsou píky celkem nízké. Pravděpodobně bylo do vzorků přidáno málo PCR produktu.

Vzorek č. 2 – R - Oproti sekvenci s primerem forward je tato sekvence přímo ukázková. Sekvence byla sice lehce kratší (měla by mít 728 bp, ale měla jen 700 bp), ale k hodnocení to stačilo. Po zadání do databáze NCBI blast se ukázalo, že se na konci sekvence nachází mutace. Podle databáze se v úseku 694-696 bp nachází 3 guaniny. Znovu jsem se podívala do BioEditu a zjistila, že v tomto úseku se nacházejí pouze 2 guaniny. Pík pro druhý guanin je lehce širší (viz obrázek 8), proto nejspíš program blast vyhodnotil, že tam je o jeden guanin více.



**Obrázek 8** Ukázka rozšířeného píku pro G ve vzorku 2 – R (zdroj: vlastní)

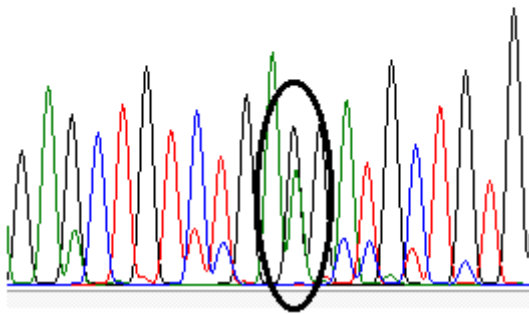
Vzorek č. 3 – F - Na první pohled vypadala tato sekvence moc pěkně, ale k hodnocení byla jen do 290 bp. Po 290 bp nastal obrovský šum. Možná bych nechala tento vzorek znovu osekvenovat. Ale na druhou stranu jsem v té části sekvence, která se dala hodnotit, nenašla žádnou mutaci.

Vzorek č. 3 – R – Tahle sekvence byla přímo excelentní. Nebyl tu vidět žádný náznak mutace. Jen na konci sekvence u 694 bp byl stejný problém jako u vzorku č. 2 s primerem reverse. Opět databáze NCBI blast vyhodnotila, že se tu nacházely 3 guaniny vedle sebe, ale ve skutečnosti tu byli pouze 2, z čehož ten druhý byl lehce širší.

Vzorek č. 4 – F – Dle mého názoru byla tato sekvence průměrná. Kolem 253 bp by se mohlo jednat o dvě mutace vedle sebe, v obou případech záměna G za T. Pík pro T je však poloviční. V R sekvenci již není tato mutace ani v náznacích. Proto bych se zase přiklonila k tomu, že ve skutečnosti o mutaci nejde.

Vzorek č. 4 – R – Tato sekvence mi přišla též průměrná, byl tu vidět menší šum. V místě 275 bp se mi jevila možná heterozygotní mutace, záměna G za A. Pík pro bázi A byl lehce nižší. Ve F sekvenci nebyl ani náznak mutace (viz obrázek 9).

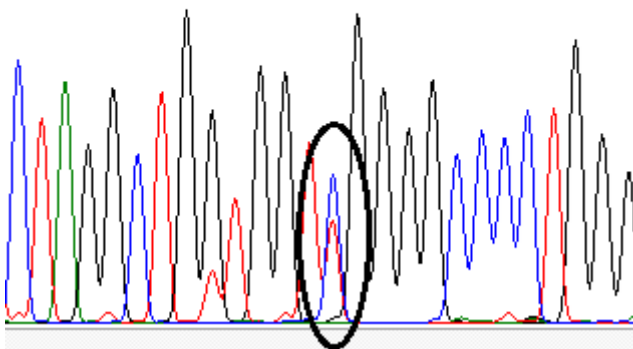
270 280  
G A G C T G T C T G A G G A T G C T G T G



**Obrázek 9** Náznak heterozygotní mutace u 275 bp ve vzorku 4 – R (zdroj: vlastní)

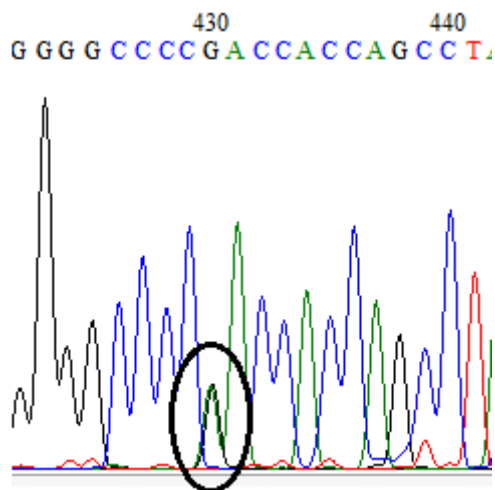
Vzorek č. 5 – F – Ze začátku byl v sekvenci menší šum, ale od 230 bp byla sekvence velmi pěkná. V místě 252 bp by se mohla nacházet mutace, byl tu větší pík pro C a menší pro T. Pro jistotu jsem se podívala na R sekvenci, zda se ve stejném místě nenachází podobný dvojpík (viz obrázek 10). Jedná se o tuto mutaci: NG\_053072.1.g.65066C>T (HGVS). V databázi NCBI nebyla tato mutace doposud popsána.

240 250 260  
C T A G G C T G G T G G T C G G G G C C C C T G G G



**Obrázek 10** Heterozygotní mutace v místě 252 bp ve vzorku 5 – F (zdroj: vlastní)

Vzorek č. 5 – R – Sekvence byla velmi pěkná. V úseku 430 bp jsem byla přesvědčená, že se jedná o mutaci. Dva téměř shodné píky, co opisují stejný oblouk, viz obrázek 11. Podobný dvojpík jsem našla i ve F sekvenci. Mutace byla prokázána v sekvenci F i R.



**Obrázek 11** Heterozygotní mutace v místě 430 bp ve vzorku 5 – R (zdroj: vlastní)

Vzorek č. 6 – F – Další velmi pěkná sekvence, na první pohled nebyla vidět žádná mutace. Databáze NCBI blast našla jednu nesrovnalost na konci sekvence. U 701 bp se nacházely vedle sebe 2 píky pro G. Podívala jsem se do BioEditu a zjistila, že tam byl 1 vysoký, širší pík a že měl vedle takový menší výstupek. A ten byl nejspíš zaznamenán, ale o mutaci se v tomto případě nejednalo.

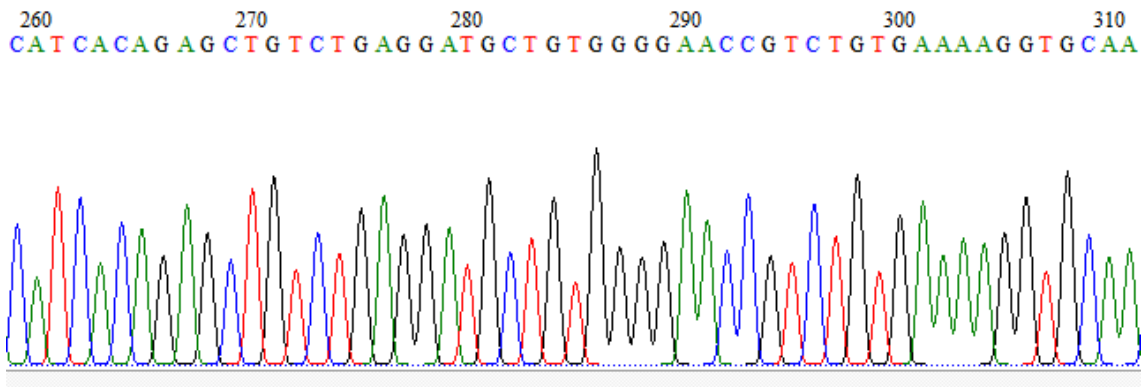
Vzorek č. 6 – R – Z počátku byla sekvence trochu horší, ovšem dále byla velmi pěkná, téměř ukázková. I tato sekvence neobsahovala žádnou mutaci.

Vzorek č. 7 – F – Tato sekvence byla velmi špatná, nedalo se z ní vyhodnotit vůbec nic. Pokud by se ve vzorku 7 s primerem reverse objevila nějaká mutace, nebo by byly nějaké pochybnosti, nechala bych tento vzorek znovu osekvenovat.

Vzorek č. 7 – R – Oproti předešlému vzorku s primerem forward byla tato sekvence excelentní. V BioEditu jsem po prozkoumání sekvence neobjevila jedinou mutaci.

Vzorek č. 8 – F – Tato sekvence vypadala velmi pěkně, ale jen ze začátku. Hodnotitelných bylo pouze prvních 50 bp. Od 150 bp byl vidět náhlý pokles píků, byly velmi nízké. Nejpravděpodobnějším důvodem je, že bylo přidáno málo PCR produktů. Ani v této krátké sekvenci, kterou se dalo hodnotit, jsem nenašla mutaci.

Vzorek č. 8 – R – Další excelentní sekvence bez známek mutací, viz obrázek 12.



**Obrázek 12** Ukázka sekvence bez mutací (zdroj: vlastní)

Vzorek č. 9 – F – I tato sekvence byla pěkná. V místě 408 bp jsem měla podezření na heterozygotní mutaci, záměna G za C. Pík pro bázi C byl o 1/3 nižší. V R sekvenci jsem nezachytla ani náznak dvojpíku. Proto jsem usoudila, že se o mutaci nejednalo.

Vzorek č. 9 – R – Tato sekvence byla velmi pěkná, dala se pěkně hodnotit. Ani tady se nevyskytovala žádná mutace.

Vzorek č. 10 – F – Další velmi pěkná, přímo výstavní sekvence, na první pohled bez mutace. Avšak po zadání do databáze NCBI blast mi vyskočila shoda 99%. Podle všeho byly u 695 bp 2 píky pro G. Podívala jsem se znovu do BioEditu a tam jsem viděla 2 píky pro G, druhý byl sice menší, ale byl tam. Nedokážu říci, proč byla shoda pouze 99 %.

Vzorek č. 10 – R – I tato sekvence byla velmi pěkně čitelná. Taktéž mi vyšla shoda 99%. V místě 694 bp se měly vyskytovat 3 píky pro G, ale v BioEditu byly pouze 2. Druhý pík byl lehce širší, proto nejspíš došlo k tomuto mylnému vyhodnocení.

V grafu 1 jsem uvedla výsledky nálezů mutací v sekvencích z Českobudějovicka. Ze všech 10 vzorků, které jsem měla k dispozici, jsem pouze v jednom z nich našla mutaci. Mutace doposud nebyla popsána v databázi NCBI.



**Graf 1** Výskyt mutací na Českobudějovicku (zdroj: vlastní)

### 7.1.3 Karvinsko

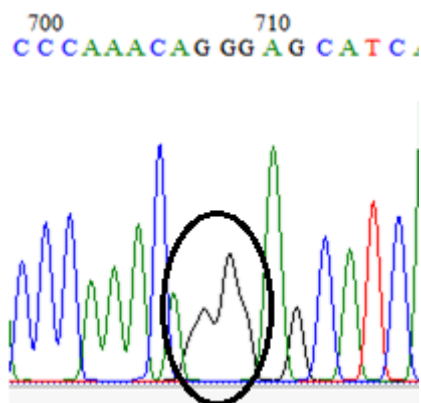
Vzorek č. 11 – F – Z počátku byla sekvence dosti nečitelná, ale od 270 bp se dala mnohem lépe hodnotit. Na první pohled to vypadalo, že v sekvenci bylo velké množství mutací. Ovšem v databázi NCBI blast mi vyšla 100% shoda, tudíž se nejspíš jednalo pouze o šum, který tu byl velmi výrazný. Taktéž jsem zjistila, že gen nebyl osekvenovaný celý, ale na hodnocení to nemělo vliv.

Vzorek č. 11 – R – Tato sekvence byla trochu horší, byl zde vidět větší šum. Od 490 bp byla čitelnost z daleka lepší. Dalo by se říci, že se zde nacházelo velké množství mutací. Avšak bych řekla, že nastala stejná situace jako ve F sekvenci. Nejednalo by se o mutace, ale o šum.

Vzorek č. 12 – F – Začátek sekvence byl opět horší, byl tu vidět šum, ze kterého by se dalo předpokládat větší množství mutací. Od 210 bp se dala sekvence velmi dobře hodnotit, protože byla téměř excelentní. V místě 697 bp jsem si nebyla jistá, jestli se tu nenacházela mutace. V tomto místě byl pík pro G a těsně u něj pík pro T. Podívala jsem se do sekvence s primerem reverse, ale podobný dvojpík jsem tu neobjevila. Usoudila jsem tedy, že se o mutaci nejednalo.

Vzorek č. 12 – R – Prvních 130 bp bylo téměř nečitelných. Až poté se dala sekvence hodnotit, protože byla opravdu ukázková. Neviděla jsem tu jedinou mutaci. Z databáze NCBI blast jsem zjistila, že mezi 707 – 709 bp se nacházejí 3 píky pro G. Podívala jsem

se do BioEditu a zjistila, že v tomto místě byly pouze 2 píky pro G, avšak oba píky byly o něco širší než ostatní píky (obrázek 13). Proto nejspíš vznikla tato neshoda.



**Obrázek 13** Dva širší píky pro G ve vzorku 12 – R (zdroj: vlastní)

Vzorek č. 13 – F – U této sekvence bylo pravděpodobně přidáno menší množství PCR produktů, protože píky byly velmi nízké. I tady byla na začátku horší čitelnost, ale ta se od 210 bp opět zlepšila a sekvence se dala hodnotit. V této sekvenci se nenacházela žádná mutace.

Vzorek č. 13 – R – Prvních 140 bp bylo velmi špatných, nedalo se z toho hodnotit. Od 140 bp byla sekvence výrazně lepší. Měla jsem pochybnosti v místě 483 bp, jelikož tu byly dva píky, vyšší pík pro G a nižší pík pro A. Zkontrolovala jsem sekvenci s F a zjistila, že se v ní takový artefakt nenacházel. Možnost přítomnosti mutace jsem tedy vyloučila.

Vzorek č. 14 – F – Ani tady nebyla výjimka, i tady se ze začátku sekvence nedala číst, protože se tu nacházel obrovský šum. Od 180 bp se dala sekvence hodnotit, jelikož byla velmi pěkná. Z databáze NCBI blast jsem zjistila, že gen nebyl osekvenovaný úplně celý, avšak to nemělo vliv na hodnocení. V této sekvenci se nenacházela jediná mutace.

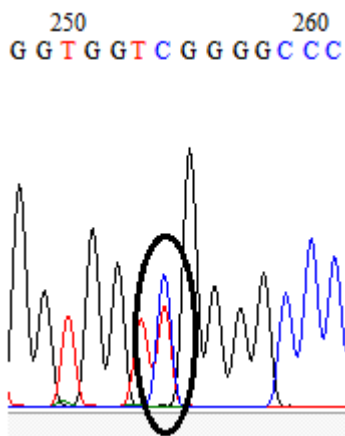
Vzorek č. 14 – R – Do této sekvence bylo pravděpodobně přidáno málo PCR produktů, protože píky byly opět velmi nízké. Z počátku byla špatná čitelnost, ale od 130 bp se dala sekvence velmi pěkně hodnotit. Po prohlédnutí sekvence jsem nezahledla jedinou mutaci.

Vzorek č. 15 – F – Též tato sekvence patřila k těm, které byly ze začátku špatně čitelné. Ovšem od 200 bp byla opět velmi pěkná a dalo se z ní krásně hodnotit. Po zadání do databáze NCBI blast jsem zjistila, že není osekvenovaný celý gen. Také jsem objevila několik nesrovnalostí, které byly hlavně na začátku sekvence, která byla špatně čitelná.

Poté jsem našla na konci sekvence, v místě 698 bp 2 píky, vyšší pík pro G a těsně vedle něj pík pro T. Ale ani tady se pravděpodobně o mutaci zjevně nejednalo.

Vzorek č. 15 – R – Od 150 bp byla tato sekvence velmi dobře hodnotitelná. Ze začátku byl viditelný šum. Sekvenci jsem zadala do databáze NCBI blast a přišla na to, že gen byl osekvenovaný jen z části. To ovšem nemělo vliv na hodnocení. Rovněž se v této sekvenci nenacházely mutace.

Vzorek č. 16 – F – Takhle sekvence byla oproti ostatním téměř excelentní, už od začátku byla velmi pěkně čitelná, žádný šum a dalo se z ní dobře hodnotit. Z databáze NCBI blast jsem zjistila, že je osekvenována jen část genu. Jsem přesvědčená, že se v úseku 254 bp vyskytovala heterozygotní mutace. V tomto místě se nacházely 2 píky, vyšší pík pro C a o ¼ nižší pík pro T (viz obrázek 14). Bohužel srovnání s R sekvencí nebyla možná. Stejnou mutaci jsem našla i ve vzorku č. 5 z Českobudějovicka. Je to tedy mutace: NG\_053072.1.g.65066C>T (HGVS).

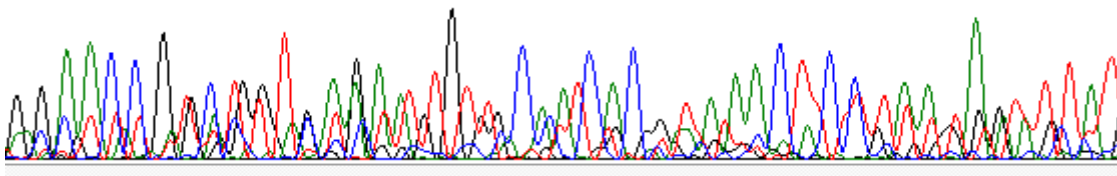


**Obrázek 14** Heterozygotní mutace v místě 254 bp ve vzorku 16 – F (zdroj: vlastní)

Vzorek č. 16 – R – Tato sekvence nebyla k hodnocení vhodná, byl tu obrovský šum (viz obrázek 15). Jelikož jsem ve F sekvenci objevila mutaci, nechala bych tento vzorek znovu osekvenovat.



290 300 310 320 330  
G G A A C C G T C T T T G A G A T T G T C A A C A C G T A A A C T C C T A A T A G A T T A T



**Obrázek 15** Sekvence nevhodná k hodnocení - vzorek 16 – R (zdroj: vlastní)

Vzorek č. 17 – F – Na první pohled vypadala tato sekvence velmi pěkně, bez šumu. Prohlédla jsem si celou sekvenci a nezaznamenala jsem jedinou mutaci. Po zadání do databáze NCBI blast jsem zjistila, že malý kousek genu nebyl osekvenovaný, ale to v hodnocení nevadilo. Vyšla mi shoda 100%.

Vzorek č. 17 – R – Prvních 50 bp bylo hůře čitelných, byl zde viditelný šum. Dále byla sekvence dobře čitelná a hodnotitelná. V sekvenci jsem nenašla jedinou mutaci.

Vzorek č. 18 – F – Další velmi krásná sekvence bez náznaku šumu. Díky databázi NCBI blast jsem přišla na to, že gen nebyl osekvenovaný celý. Ani v této sekvenci jsem nenašla mutace.

Vzorek č. 18 – R – Jedna z mála sekvencí, která byla opravdu excelentní. Na první pohled nebyl viditelný ani šum, ani mutace.

Vzorek č. 19 – F – Na začátku této sekvence byl viditelný obrovský šum, nedala se dobře hodnotit, ale od 110 bp se kvalita sekvence velice zlepšila. Po zadání sekvence do databáze NCBI blast jsem zjistila, že gen nebyl osekvenovaný celý. To ovšem nemělo vliv na hodnocení. V této sekvenci jsem nezaznamenala žádné mutace.

Vzorek č. 19 – R – Tato sekvence byla z počátku hodně špatně čitelná, byl tu obrovský šum, ale od 100 bp byla sekvence přímo výstavní. Ani v této sekvenci jsem neobjevila jedinou mutaci.

Vzorek č. 20 – F – Na první pohled vypadala tato sekvence velmi dobře, byla velmi pěkně čitelná. Ovšem dala se hodnotit pouze do 650 bp, poté už nastal obrovský šum a zbytek sekvence byl nečitelný. Pozastavila jsem se v místě 525 bp, kde se nacházely 2 píky, vyšší

pík pro A a o něco málo nižší pík pro G. Pro jistotu jsem se podívala do R sekvence, ale tam jsem takový dvojpík neobjevila. Takže se pravděpodobně o mutaci nejednalo, byl to pouze šum.

Vzorek č. 20 – R - U tohoto vzorku jsem zjistila, že bylo přidáno málo PCR produktů, protože píky byly velmi nízké a od 200 bp se ještě více snižovaly. Sekvence byla průměrná, byl tu vidět menší šum. Navíc se tato sekvence dala hodnotit jenom do 250 bp. Tento zkrácený úsek sekvence jsem vložila do databáze NCBI blast a ukázalo se, že se tu mutace nenacházely. Pokud by se ovšem nějaká mutace objevila, nebo by se vyskytla u vzorku s F, nechala bych tento vzorek znovu osekvenovat.

V grafu 2 jsem uvedla výsledky nálezu mutací v sekvencích z Karvinska. Stejně jako ve vzorcích z Českobudějovicka, i tady jsem našla pouze jednu mutaci. Jedná se o mutaci: NG\_053072.1.g.65066C>T (HGVS), která zatím nebyla popsána.



**Graf 2** Výskyt mutací na Karvinsku (zdroj: vlastní)

## 8 Diskuse

Při praktické části bakalářské práce jsem celkem zpracovala 20 vzorků. Během práce v laboratoři došlo u 6 vzorků k problémům. U vzorku č. 10 došlo pravděpodobně ke špatnému stěru z bukální stěny nebo k chybě při izolaci DNA. Obě sekvence tohoto vzorku nebyly vůbec čitelné a nedaly se vyhodnotit. Poté u vzorku č. 14 jsem po izolaci DNA naměřila velmi nízkou koncentraci DNA, tedy pouze 0,81 ng/μl. Tato odchylka měla vliv při dalším postupu, proto nejspíš ani u tohoto vzorku sekvence nevyšly. Takto nízká koncentrace DNA byla pravděpodobně důsledkem nedostatečného setření bukální stěny. Problém také nastal u vzorků č. 17, 18, 19 a 20. U těchto vzorků nebyl přítomen PCR produkt. Metodu PCR jsem tedy zopakovala, ale opět bez výsledku. Dále jsem tento postup z časových důvodů už neopakovala.

S ostatními vzorky nebyl problém. Začala jsem s izolací DNA, při které jsem postupovala podle návodu od výrobce. Při měření koncentrací DNA se většina vzorků nacházela v rozmezí 20 – 70 ng/μl. U tří vzorků došlo k menším odchylkám. Konkrétně u vzorků č. 4, 6 a 14 byly koncentrace pod 10 ng/μl. Nejspíš to bylo způsobené špatným nebo nedostatečným stěrem bukální stěny. To je taky pravděpodobně důvodem, že bylo získáno velmi málo PCR produktu. Podle laboratoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy by měla být minimální koncentrace k sekvenování 5 ng/100 pb u PCR produktu. Díky tomu vyšlo najevo, proč u vzorku č. 14 nebyly sekvence k hodnocení. U těchto vzorků bylo do PCR reakce přidáno maximální množství DNA. Právý opak nastal u vzorku č. 7, kde byla koncentrace velmi vysoká a dosahovala hodnoty 96,60 ng/μl. V tomto případě se dotyčné osobě hodně odlupují buňky z bukální stěny, nebo tu mohla být přítomna i krev.

Následovala metoda PCR, při které dochází k namnožení úseku DNA. Pro kontrolu, zda PCR reakce proběhla, jsem provedla elektroforézu. Menší zádrhel nastal při výrobě agarózového gelu k elektroforéze. Při zahřívání baňky v mikrovlnné troubě jsem si sestavila vaničku, kam jsem posléze nalila obsah baňky, ze které během pár minut vznikl gel. Po nalití tekutiny do vaničky jsem chtěla vložit hřebínek, ale všimla jsem si, že pacičky z hřebínku jsou krátké a že nevzniknou dostatečně hluboké jamky k elektroforéze. Nejdříve jsem si myslela, že jsem si vzala špatný hřebínek. Ale po několika málo vteřinách mi došlo, že jsem si vzala špatnou vaničku. Tudíž jsem si postup výroby gelu ještě jednou zopakovala. Dle vedoucího práce jsou to začátečnické chyby.

Po proběhlé elektroforéze jsem z gelu vyhodnotila, zda u vzorků proběhla amplifikace PCR. Z gelu bylo jasně vidět, že u vzorku č. 2, 4 a 5 proběhla elektroforéza. Byly tu svítivé pruhy, které udávají dostatečnou přítomnost PCR produktu. Naopak u vzorků č. 1 a 3 byl pruh velmi slabý, proto jsem přidala více PCR produktu do sekvenační reakce.

Následně jsem provedla přečistění PCR produktů a přípravu na sekvenování. Jelikož v laboratoři Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích nebyl k dispozici sekvenátor, zaslala jsem vzorky firmě GenSeq s.r.o. a nechala je osekvenovat. Během několika dnů mi přišly osekvenované vzorky a já je mohla začít hodnotit výsledné sekvence.

K hodnocení jsem používala program BioEdit, který je volně dostupný na internetu. Tento program nabízel spoustu funkcí, ale ne všechny jsem k hodnocení využila. BioEdit byl dostačující ke čtení sekvencí, protože pěkně zobrazoval sekvenogramy a sekvence nukleotidů. Jedna z jeho velkých nevýhod ale byla, že nerozeznal heterozygotní mutace, tedy překryv dvou píků. Jakmile se v sekvenci vyskytl dvojpík, automaticky zahrnul do řady nukleotidů jen jeden pík (nukleotid), ten vyšší. Dále jsem používala databázi NCBI. Zpočátku mi přišla databáze složitá, ale po trpělivosti a konzultacích s vedoucím Ing. Tomášem Nixem, Ph. D. jsem databázi nakonec porozuměla.

Hodnocení sekvencí probíhalo tak, že jsem si každou otevřela v programu BioEdit. V programu jsem si ji celou prohlédla a vyhodnotila, jak vypadá. Následně jsem sekvenci zkopírovala a vložila do databáze NCBI blast. V databázi jsem zjišťovala, zda se v sekvencích nenachází nějaká neshoda, mutace a zda je požadovaný úsek osekvenovaný celý. U některých sekvencí část úseku chybělo. Pokud by se jednalo o klinické vzorky, nechala bych je znovu osekvenovat. V případě, že by se to nepovedlo ani na druhý pokus, nechala bych požadovaný úsek rozdělit na 2 kratší sekvence.

Nejprve jsem vyhodnotila svých dvacet vzorků, ale nenašla jsem jedinou mutaci. Ovšem u několika vzorků se vyskytovala stejná neshoda. U několika vzorků se na konci sekvence vyskytovaly dva píky, z čehož druhý pík byl rozšířený. V databázi NCBI blast se pokaždé ukázalo, že se v sekvenci nacházejí tři píky, což nebyla pravda. Tuto chybu bych přisoudila tomu, že konce sekvencí už nebývají tak kvalitně osekvenované.

Následně jsem dostala k dispozici deset vzorků z populace dětí z Českobudějovicka a Karvinska. Tyto obdržené sekvence jsem hodnotila stejným způsobem. Sekvence od dětí

z Českobudějovicka byly velmi pěkné a dobře se hodnotily. Ve vzorku č. 5 jsem narazila na heterozygotní mutaci. Nacházela se v obou sekvencích. Ve F sekvenci v místě 252 bp a v R sekvenci v místě 430 bp. Jedná se o mutaci: NG\_053072.1.g.65066C>T (HGVS). V databázi NCBI nebyla tato mutace doposud popsána.

Poté jsem vyhodnotila vzorky z populace dětí z Karvinska. V porovnání se vzorky z Českobudějovicka byla jejich kvalita mnohem horší. Některé byly nehodnotitelné. Špatnou kvalitu vzorků přisuzuji vnějším faktorům. Hlavně tomu, jakým způsobem byly vzorky uchovávány. Podle laboratorní příručky Centra lékařské genetiky (2019) by měl být materiál uchováván v chladícím zařízení při teplotě 4-9 °C. Podle zjištěných informací byly některé vzorky uloženy v mrazáku a naopak některé zůstaly při pokojové teplotě. Navíc vzorky z Karvinska byly zpracovány po delší době, na rozdíl od vzorků z Českobudějovicka, se kterým si pracovalo do týdne. U vzorku č. 16 jsem objevila heterozygotní mutaci. Mutace byla v F sekvenci v místě 254 bp, R sekvence nebyla vhodná k hodnocení. V tomto případě se jednalo o stejnou mutaci, jako byla nalezena ve vzorcích z Českobudějovicka, tedy NG\_053072.1.g.65066C>T (HGVS).

Z deseti vzorků z Českobudějovicka jsem našla jednu mutaci. Stejnou mutaci jsem objevila i v jednom vzorku z Karvinska. Poměr výskytu nalezených mutací je tedy stejný. V různých koutech České republiky jsou trochu odlišné životní podmínky. Ať už se jedná o kvalitu ovzduší nebo životosprávu rodin. Znečištěné ovzduší má vliv neuropsychický vývoj dítěte a to především polycyklické aromatické uhlovodíky. Podle Šráma (2017) nebyly v posledních dvou letech zjištěny žádné rozdíly mezi dětmi z Karviné a Českých Budějovic. Tato skutečnost odpovídá i výsledkům nalezených mutací.

## 9 Závěr

V rámci bakalářské práce jsem vypracovala odbornou rešerši, ve které jsem se seznámila s genem *ZNF341* a problematikou Hyper-IgE syndromu, který je způsobený poruchou genu *ZNF341*. U tohoto onemocnění jsem se zabývala druhy nemocí, které jsou pro syndrom typické, např. ekzémy, zubní, muskuloskeletální a lebeční abnormality, pneumonie a další. Popsala jsem metody PCR a metody klasického a novodobého sekvenování DNA.

V praktické části jsem popsala laboratorní práci, kterou jsem provedla. Laboratorní část zahrnoval odběr vzorku z bukalní stěny, izolace DNA, amplifikace pomocí PCR metody, elektroforéza, přečištění PCR produktů a příprava na Sangerovo sekvenování. Samotné sekvenování bylo provedeno firmou GenSeq s.r.o. V neposlední řadě jsem výsledné sekvence hodnotila a porovnávala. K hodnocení jsem používala program BioEdit a internetovou databázi NCBI blast.

V laboratoři jsem zpracovala 20 anonymizovaných vzorků. Ani u jednoho z těchto vzorků jsem nenalezla mutace. Následně jsem dostala k dispozici 20 vzorků z populace dětí z Českobudějovicka a Karvinska (10 z ČB a 10 z Karvinska). Dohromady jsem našla 2 mutace. V obou případech šlo o totožnou mutaci NG\_053072.1.g.65066C>T (HGVS), která doposud nebyla v databázi NCBI popsána.

Cílem bakalářské práce bylo seznámit se s odbornou literaturou zabývající se genem *ZNF341* a syndromem hyperimmunoglobulinémie E. Osvojit si základní metody molekulární biologie, od izolace DNA až po sekvenování. Porovnat mutace genu *ZNF341* mezi populacemi dětí z Českobudějovicka a Karvinska. Všechny tyto cíle byly naplněny.

## 10 Seznam použitých zdrojů

1. AUGUST, A., 2018, Who regulates whom: ZNF341 is an additional player in the STAT3/Th17 song, *Sci Immunol.* [online]. **3**(24), 9779 [cit. 2021-02-26]. doi: 10.1126/sciimmunol.aat9779. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6211796/>
2. BÁRTOVÁ, E., © 2011, Sekvenování DNA, Enzymová Sangerova metoda, VFU Brno [online]. [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-sekvenovani&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-sekvenovani&lang=cz)
3. BÉZIAT, V., LI, J., et al., 2018, A recessive form of hyper-IgE syndrome by disruption of ZNF341-dependent STAT3 transcription and activity, *Sci Immunol.* [online]. **3**(24), 4956 [cit. 2020-10-11]. doi: 10.1126/sciimmunol.aat4956. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29907691/>
4. CAMPBELL, N.A., REECE, J.B., 2006. *Biologie*. Brno: Computer Press. ISBN 80-251-1178-4.
5. Centrum lékařské genetiky s.r.o., 2019. *Laboratorní příručka*. 20. vydání, České Budějovice. [online]. [cit. 2021-04-26]. Dostupné z: <https://www.clg.cz/wp-content/uploads/2020/05/Laboratorn%C3%ADp%C5%99%C3%ADru%C4%8Dka.pdf>
6. FREEMAN, A.F., HOLLAND, S.M., 2008, The Hyper IgE Syndromes, *Immunol Allergy Clin North Am.* [online]. **28**(2), 277-8 [cit. 2020-10-10]. doi: 10.1016/j.iac.2008.01.005. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2683262/>
7. FREEMAN, A.F., OLIVIER, K.N., 2016. Hyper IgE Syndromes and the Lung, *Clin Chest Med.* [online]. **37**(3), 557-567 [cit. 2021-03-18]. doi: 10.1016/j.ccm.2016.04.016. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4987538/>

8. FREY-JAKOBS, S., et al., 2018, ZNF341 controls STAT3 expression and thereby immunocompetence, *Sci Immunol.* [online]. **3**(24), 4941 [cit. 2020-10-11]. doi: 10.1126/sciimmunol.aat4941. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6173313/?\\_ga=2.24648890.1030434870.1614947027-520749958.1614947027](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6173313/?_ga=2.24648890.1030434870.1614947027-520749958.1614947027)
  
9. GARIBYAN, L., AVASHIA, N., 2013. Polymerase Chain Reaction. *The Journal of investigative dermatology.* [online]. **133**(3), 1-4 [cit. 2021-01-26]. doi: 10.1038/jid.2013.1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308>
  
10. Gene Cards, The Human Gen Database, © 2021. *Genomics for ZNF341 Gene.* [online]. [cit. 2021-03-03]. Dostupné z: [genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZNF341](http://genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZNF341)
  
11. HILLMER, E., J., ZHANG, H., LI, H., S., WATOWICH, S., S., 2016, STAT3 signaling in immunity, *Cytokine Growth Factor Rev.*[online]. **31**, 1-15 [cit. 2021-02-02]. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.05.001. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5050093/>
  
12. HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., ŠPÍŠEK, R., 2017, *Základy imunologie*, 6. aktualizované vydání, Praha: Stanislav Juhaňák – Triton. 297 s. ISBN 978-80-7553-250-3
  
13. HSU, A.P., BA, DAVIS, J., PNP-BC, APNG, PUCK, J.M., MD, HOLLAND, S.M., MD, FREEMAN, A.F., MD, 2010-2020. *STAT3 Hyper IgE Syndrome, GeneReviews®.* [online]. [cit. 2020-11-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK25507/>
  
14. CHANDESRIIS, M.-O., et al., 2012, Autosomal Dominant STAT3 Deficiency and Hyper-IgE Syndrome Molecular, Cellular, and Clinical Features From a French National Survey, *Medicine (Baltimore).* [online]. **91**(4), e1-19 [cit. 2021-03-13]. doi: 10.1097/MD.0b013e31825f95b9. Dostupné z:



[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3680355/?\\_ga=2.73015509.772121374.1615885693-1262960556.1615885693](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3680355/?_ga=2.73015509.772121374.1615885693-1262960556.1615885693)

15. Immune Deficiency Foudation, © 2020. *Hyper IgE Syndrome*. [online]. [cit. 2020-10-30]. Dostupné z: <https://primaryimmune.org/about-primary-immunodeficiencies/specific-disease-types/hyper-ige-syndrome/>
16. KOČÁREK, E., 2004. *Genetika*, 1. vydání, Praha: Scientia. 211 s. ISBN 80-7183-326-6
17. KUCIEL, J., URBAN, T., 2016. *Principy genetiky*. 1. vydání, Brno: Mendelova univerzita v Brně. 200 s. ISBN 978-80-7509-385-1
18. KUJANOVÁ, M., 2019. *SEQme, Přečištění PCR produktů – srovnání kolonkových souprav různých výrobců a naše tipy*. [online]. [cit. 2020-12-12]. Dostupné z: <https://www.seqme.eu/cs/magazine/precisteni-pcr-produktu>
19. LABGuide Průvodce laboratoří, © 2014-2019, *Sekvenování DNA*. [online]. [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: <https://labguide.cz/sekvenovani/>
20. LABGuide Průvodce laboratoří, © 2014-2019, *Klasické metody sekvenování*. [online]. [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: <https://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/>
21. LITZMAN, J., 2008. Hyper IgE syndrom - další z primárních imunodeficitů, u něhož byla poznána genetická podstata. *Alergie*. Praha: TIGIS s.r.o., roč. 10, č. 1, s. 19-23. ISSN 1212-3536
22. MAGDELDIN, S., 2012. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. Croatia: InTech. ISBN 978-953-51-0458-2.

23. MAYFIELD Brain & Spine, © 2008-2021, *Chiari I malformation and syringomyelia*. [online]. [cit. 2021-01-19]. Dostupné z: <https://mayfieldclinic.com/pe-chiari.htm>
24. MINEGISHI, Y., 2009, Hyper-IgE syndrome, *Curr Opin Immunol*. [online]. **21**(5), 487-92 [cit. 2021-03-01]. doi: 10.1016/j.coi.2009.07.013. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19717292/>
25. NCBI, 2020. *Homo sapiens zinc finger protein 341 (ZNF341), RefSeq on chromosome 20*, [online]. [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1173639576>
26. New England BioLabs® Inc., © 2019, *Enzymatic PCR Cleanup using Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase*. [online]. [cit. 2021-03-04]. Dostupné z: [https://www.neb.com/-/media/nebus/files/application-notes/enzymatic-pcr-cleanup-exo\\_sap-app-note.pdf?la=en](https://www.neb.com/-/media/nebus/files/application-notes/enzymatic-pcr-cleanup-exo_sap-app-note.pdf?la=en)
27. NORD – National Organization for Rare Disorders, © 2021, *Autosomal Recessive Hyper IgE Syndrome*. [online]. [cit. 2020-12-30]. Dostupné z: <https://rarediseases.org/rare-diseases/autosomal-recessive-hyper-ige-syndrome/>
28. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Laboratoř sekvence DNA, [online]. [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna>
29. SNUSNAD, D.P., SIMMONS, M.J., 2009, *Genetika*. 1. vydání, Brno: Masarykova univerzita. 871 s. ISBN 978-80-321-4852-2
30. SOWERWINE, K.J., HOLLAND, S.M., FREEMAN, A.F., 2012, Hyper-IgE syndrome update, *Ann N Y Acad Sci*. [online]. **1250**, 25-32 [cit. 2021-01-30]. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06387.x. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4103910/>

31. SRŠEŇ, Š., SRŠŇOVÁ, K., 2000. *Základy klinické genetiky a její molekulární podstata*. 3. přepracované a rošířené vydání. Martin: Osveta. 260 s. ISBN 80-8063-021-6
32. ŠRÁM, R., 2017. *Jak znečištěné ovzduší ovlivňuje lidské zdraví*. AV ČR, [online]. [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: <https://www.avcr.cz/cs/onas/aktuality/Jak-znecistene-ovzdusi-ovlivnuje-lidske-zdravi>
33. SWERDLOW, H., GESTELAND, R., 1990. Capillary Gel Electrophoresis for Rapid, High Resolution DNA Sequencing. *Nucleic Acid Research*. [online]. **18**(6), 1415-1419 [cit. 2020-11-23]. doi: 10.1093/nar/18.6.1415. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/18/6/1415/1325051>
34. ZHANG, Q., et al., 2018, Human hyper-IgE syndrome: singular or plural?, *Mamm Genome*. [online]. **29**(7-8), 603-617 [cit. 2021-03-10]. doi: 10.1007/s00335-018-9767-2. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6317873/?\\_ga=2.6284789.73041576.1615552782-81675923.1615552782](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6317873/?_ga=2.6284789.73041576.1615552782-81675923.1615552782)

## 11 Seznam tabulek, grafů a obrázků

<b>Tabulka 1</b> Klinické charakteristiky nedostatku STAT3 .....	12
<b>Tabulka 2</b> Sekvence použitých primerů pro PCR .....	29
<b>Tabulka 3</b> Teplotní profil PCR.....	30
<b>Tabulka 4</b> Teplotní profil PCR - EXO .....	32
<b>Tabulka 5</b> Výsledné měření koncentrací vzorků DNA .....	35
<b>Graf 1</b> Výskyt mutací na Českobudějovicku .....	46
<b>Graf 2</b> Výskyt mutací na Karvinsku .....	50
<b>Obrázek 1</b> Gen ZNF341 na 20. chromozomu .....	9
<b>Obrázek 2</b> Maxam-Gilbertova metoda .....	21
<b>Obrázek 3</b> Princip sekvenování DNA - úseky DNA o různé délce vzniklé začleněním fluorescenčně značených ddNTP .....	22
<b>Obrázek 4</b> Sekvence exonu 15 .....	28
<b>Obrázek 5</b> Použitý DNA ladder - 100 bp .....	36
<b>Obrázek 6</b> Elektroforéza produktů PCR na gelu .....	36
<b>Obrázek 7</b> Náznak mutací u 469 bp a 475 bp ve vzorku 3 – F.....	38
<b>Obrázek 8</b> Ukázka rozšířeného píku pro G ve vzorku 2 – R.....	42
<b>Obrázek 9</b> Náznak heterozygotní mutace u 275 bp ve vzorku 4 – R .....	43
<b>Obrázek 10</b> Heterozygotní mutace v místě 252 bp ve vzorku 5 – F .....	43
<b>Obrázek 11</b> Heterozygotní mutace v místě 430 bp ve vzorku 5 – R.....	44
<b>Obrázek 12</b> Ukázka sekvence bez mutací .....	45
<b>Obrázek 13</b> Dva širší píky pro G ve vzorku 12 – R .....	47
<b>Obrázek 14</b> Heterozygotní mutace v místě 254 bp ve vzorku 16 – F .....	48
<b>Obrázek 15</b> Sekvence nevhodná k hodnocení - vzorek 16 – R .....	49

## 12 Seznam zkratek

A	adenin
AD-HIES	Autosomálně dominantní hyper IgE syndrom
AR-HIES	Autosomálně recesivní hyper IgE syndrom
bp	párů bází (base pare)
C	cytosin
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
dCTP	Deoxycytidintrifosfát
ddATP	Dideoxyadenosintrifosfát
ddCTP	Dideoxycytidintrifosfát
ddGTP	Dideoxyguanosintrifosfát
ddNTP	Dideoxynukleotidtrifosfát
ddTTP	Dideoxythymidintrifosfát
dGTP	Deoxyguanosintrifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxynukleotidtrifosfát
DOCK8	Dedicator of cytokinesis 8
dTTP	Deoxythymidintrifosfát
EBV	Epstein-Barrová virus
EXO I	Exonukleáza I
F	Forward primer
G	guanin
HEK2937	Human embryonic kidney 2937 cells

HIES	Hyper IgE syndrom
HPV	lidský papilomavirus
HSV	Herpes simplex
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IgE	Imunoglobulin E
MCV	Molluscum contagiosum
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace
NGS	Sekvenování další generace (next generation sequencing)
NHL	non-Hodkinův lymfom
NK	Natural killer
NLS	Jaderný lokalizační signál (nuclear localisation signal)
OH	Hydroxylová skupina
PCR	Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PGM3	Phosphoglucomutase 3
R	Reverse primer
RNA	Ribunukleová kyselina
rSAP	Shrimp alkaline phosphatase
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SV40	Simian virus 40
T	thymín

TBE	Tris-borát-EDTA pufr
UV	Ultrafialové záření (ultraviolet)
VZV	Varicella zoster virus
ZNF	Zinc finger protein