

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra antropologie a genetiky člověka**

Diplomová práce

**Regulace genové exprese HSP70 genů a její závislost na genotypu HSP70  
genů**



Bc. Antonín Ambrož

Praha 2011

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Novota, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovával samostatně za použití uvedených literárních zdrojů. Souhlasím se zapůjčením mé práce ke studijním účelům.

V Praze, 29. 08. 2011

Bc. Antonín Ambrož

**Děkuji:**

RNDr. Petru Novotovi, Ph.D., vedoucímu oddělení molekulární biologie a imunogenetiky Revmatologického ústavu v Praze, za zadání, trpělivý přístup a odborné vedení mé práce.

RNDr. Markétě Faustové, Ph.D., zaměstnankyni oddělení molekulární biologie a imunogenetiky Revmatologického ústavu v Praze, za trpělivý přístup, odborné vedení mé práce, za teoretické a praktické uvedení do DNA metodiky v laboratoři .

Mgr. Martině Remákové, studentce doktorandského studia a zaměstnankyni oddělení molekulární biologie a imunogenetiky Revmatologického ústavu v Praze za trpělivý přístup, za teoretické a praktické uvedení do RNA metodiky v laboratoři .

Markétě Kubálkové a Jitce Smékalové, laborantkám na oddělení molekulární biologie a imunogenetiky Revmatologického ústavu v Praze, za teoretické a praktické uvedení do problematiky práce v laboratoři.

## ABSTRAKT

Předkládaná diplomová práce prezentuje problematiku míry regulace genové exprese tří HSP70 genů v mononukleárních buňkách periferní krve. Sledovali jsme závislosti regulace (inducibility) genové exprese na vybraných bodových mutacích – SNP (single nucleotide polymorphisms) v těchto genech. Mononukleární buňky jsme získali z periferní žilní krve zdravých jedinců. Pro analýzu exprese jsme selektovali jedince, kteří byli homozygotní alespoň v jedné ze sledovaných bodových mutací. Při zohledňování kritéria zdravého jedince jsme vycházeli z dotazování se na úrovni osobní anamnézy. Závislost míry regulace genové exprese studovaných genů na genotypech - sledovaných polymorfismech jsme stanovovali u dvou buněčných stresem indukovatelných genů HSP70-1 (HSPA1A) a HSP70-2 (HSPA1B) a u jednoho konstitutivně exprimovaného genu HSP70-Hom (HSPA1L). Geny HSP70 jsou lokalizovány v oblasti hlavního histokompatibilního systému MHC (major histocompatibility complex) na chromozómu 6p21. Míru regulace genové exprese studovaných genů jsme stanovovali v závislosti na SNPs lokalizovaných v genu HSP70-1 (-110A/C ~ rs1008438 a +190G/C ~ rs1043618), v genu HSP70-2 (+1267A/G ~ rs1061581 a +2074G/C ~ rs539689) a v genu HSP70-Hom (+2437T/C ~ rs2227956). Míru regulace genové exprese studovaných genů jsme dále stanovovali v závislosti na pětinukleotidové mutaci (rs9281590) genu HSP70-2. Podařilo se nám úspěšně indukovat zvýšení genové exprese HSP70-1 a HSP70-2 genů v experimentálních podmínkách. Zjistili jsme, že v omezené míře lze indukovat i gen HSP70-Hom. Statisticky významné rozdíly v míře genové exprese v závislosti na genotypech lokalizovaných v jednotlivých genech jsme nepotvrdili. Zjistili jsme statisticky významný vliv polymorfismů na genovou expresi genů, v nichž se polymorfismy nenalézají.

**Klíčová slova:** hlavní histokompatibilní komplex (MHC), heat-shock protein o velikosti 70 kDa (HSP70), bodová mutace (SNP), regulace exprese, teplotní indukce genové exprese.

## **ABSTRACT**

The topic of the presented thesis is the regulation of gene expression level of the three HSP70 genes in mononuclear cells. We investigated the dependence of expression regulation (induction) ability on selected point mutations, so-called SNPs (single nucleotide polymorphism) in the observed genes. The mononuclear cells were obtained from peripheral blood samples of healthy individuals. In order to analyze their gene expression, we selected individuals who were homozygous for at least one of the monitored point mutations. Taking into account the chosen criteria for healthy individuals we based on interviews with these individuals and their personal history. We determined the polymorphisms observed in two cell stress-inducible HSP70-1 (HSPA1A) and HSP70-2 (HSPA1B) genes and in one constitutively expressed gene HSP70-Hom (HSPA1L). Further, we have analyzed HSP70s gene expression regulation and the relation between the expression regulation and studied polymorphisms. We determined the degree of regulation of a gene expression in the studied genes in relation to two SNPs -110A/C (rs1008438), +190G /C (rs1043618) gene HSP70-1, and two SNPs +1267A/G (rs1061581), +2074G /C (rs539689 ) of the HSP70-2 gene, and the mutation of one five-nucleotide (rs9281590) HSP70-2 gene, and one SNP +2437T/C (rs2227956) of the gene HSP70-Hom. We have finally reached the induction with a higher gene expression of HSP70-1 and HSP70-2 genes in experimental conditions. Moreover, we have found that also the HSP70-Hom expression can be induced in restricted range. We have not confirmed statistically significant differences in a gene expression in relation to their genotypes located in studied gene. However, we have found a statistically significant association between gene polymorphisms and regulation of the expression of genes they are located of these gene polymorphisms.

Keywords: major histocompatibility complex (MHC), heat-shock protein of 70kDa in size (HSP70), single nucleotide polymorphisms (SNP), gene expression, induction of gene expression

## **OBSAH**

<b>1</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>1</b>
1.1	MHC	1
1.1.1	Genový komplex MHC	1
1.1.2	Dědičnost MHC	3
1.1.3	Polymorfismy MHC a jejich význam	3
1.1.4	Asociace mezi polymorfismy genů MHC a autoimunitními chorobami	5
1.2	Proteiny teplotního šoku (Heat Shock Proteins- HSP)	6
1.2.1	HSP70	9
1.2.2	Vybrané mutace HSP70 genů	11
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b>	<b>13</b>
3.1	DNA metodika	13
3.1.1	Izolace a ředění DNA	13
3.1.2	PCR	13
3.1.3	Elektroforéza	14
3.1.4	Čištění PCR produktu před sekvenační reakcí	15
3.1.5	Sekvenační reakce	15
3.1.6	Čištění PCR sekvenačního produktu po sekvenační reakci	15
3.1.7	Sekvenční elektroforéza	16
3.2	RNA metodika	16
3.2.1	Příprava mononukleárních buněk (PBMCs) z periferní krve	16
3.2.2	Heat Shock	17
3.2.3	Izolace RNA	17
3.2.4	Měření kvality a kvantity RNA	19
3.2.5	Reverzní transkripce	19
3.2.6	Real-Time PCR	20
3.2.7	Statistická analýza	20
3.2.7.1	Statistická analýza DNA	20
3.2.7.2	Statistická analýza RNA	21
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>22</b>
4.1	DNA analýza	22
4.2	RNA analýza	22
4.2.1	Závislost regulace genové exprese HSP70 genu na jeho polymorfismech	22
4.2.1.1	Vliv polymorfismů ležících v HSP70-1 genu na expresi genu HSP70-1	22
4.2.1.2	Vliv polymorfismů ležících v HSP70-2 genu na expresi genu HSP70-2	24
4.2.1.3	Vliv polymorfismu ležícího v HSP70-Hom genu na expresi genu HSP70-Hom	27
4.2.2	Závislost regulace genové exprese HSP70 genu na polymorfismech okolních genů	28
4.2.2.1	Vliv polymorfismů ležících mimo gen HSP70-1 na expresi genu HSP70-1	28
4.2.2.2	Vliv polymorfismů ležících mimo gen HSP70-2 na expresi genu HSP70-2	28
4.2.2.3	Vliv polymorfismů ležících mimo gen HSP70-Hom na expresi genu HSP70-Hom	29
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>35</b>

<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHA A - TABULKY</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHA B - GRAFY</b>	<b>57</b>

## Seznam ilustrací a tabulek v textu

**Obrázek 1 - 1** Presentace peptidů na MHC molekulách I. třídy

**Obrázek 1 - 2** Presentace peptidů na MHC molekulách II. třídy

**Obrázek 1 - 3** Mechanismus cross prezentace

**Graf 4 – 1** Závislost míry genové exprese **HSP70-1 (HSPA1A) genu** na genotypech bodové mutace **rs1008438** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovaná a neindukovaná stanovení na genotypu

**Graf 4 – 2** Závislost míry genové exprese **HSP70-1 (HSPA1A) genu** na genotypech bodové mutace **rs1043618** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovaná a neindukovaná stanovení na genotypu

**Graf 4 - 3** Závislost míry genové exprese **HSP70-2 (HSPA1B) genu** na genotypech bodové mutace **rs1061581** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovaná a neindukovaná stanovení na genotypu

**Graf 4 - 4** Závislost míry genové exprese **HSP70-2 (HSPA1B) genu** na genotypech bodové mutace **rs539689** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovaná a neindukovaná stanovení na genotypu

**Graf 4 - 5** Závislost míry genové exprese **HSP70-2 (HSPA1B) genu** na genotypech mutace **rs9281590** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovaná a neindukovaná stanovení na genotypu

**Graf 4 - 6** Závislost míry genové exprese **HSP70-Hom (HSPA1L) genu** na genotypech bodové mutace **rs2227956** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovaná a neindukovaná stanovení na genotypu

**Tabulka 4 - 1** Asociace mezi polymorfismy a zvýšenou regulací exprese HSP70-1 genu

**Tabulka 4 - 2** Asociace mezi polymorfismy a zvýšenou regulací exprese HSP70-2 genu

**Tabulka 4 - 3** Asociace mezi polymorfismy a zvýšenou regulací exprese genu HSP70-Hom

## Seznam zkratek

A – adenin

AA – homozygotní genotyp bodové mutace

AC – heterozygotní genotyp bodové mutace

ADP – adenosindifosfát

AG – heterozygotní genotyp bodové mutace

ATP - adenosintifosfát

APC – buňka prezentující antigen (antigen-presenting cell)

$\beta$ 2-m –  $\beta$ 2-microglobulin

bp - páry bazí (base pair)

C - cytosin

C (2-4) – komplement

CC – homozygotní genotyp bodové mutace

cca - přibližně

CD - rozlišovací shluk (cluster of differentiation)

cDNA – complementary DNA

dATP - deoxyadenosintrifosfát

dCTP – deoxycytidintrifosfát

ddH<sub>2</sub>O – double distilled water

del – delece

del/del – homozygotní genotyp mutace rs9281590

del/ins – heterozygotní genotyp mutace rs9281590

dGTP – deoxyguanosintrifosfát

dNTP - směs deoxyribonukleotidtrifosfátů

dTTP - deoxythymidintrifosfát

DMEM F-12 – kultivační médium (Dulbecco's modified eagle's medium)

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DPBS – Dulbecco's phosphate buffered saline

DTT - dithiotreitol

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

ER – endoplazmatické retikulum

ERRAP - aminopeptidáza

EtOH - etanol

EXO – exonuclease I

G – guanin

GA – Golgiho aparát

GG – homozygotní genotyp bodové mutace

GC – heterozygotní genotyp bodové mutace

HEPES – N-(hydroxymethyl) piperazin

HLA - lidský hlavní histokompatibilní komplex (human leukocyte antigen)

HS – heat shock

HSE – heat shock element

HSFs – heat shock transcription factors

HSP - protein teplotního šoku (heat shock protein)

HSP70 – protein teplotního šoku o velikosti 70 kDa

ins - inserce

ins/ins – homozygotní genotyp bodové mutace rs9281590

kb - kilobáze

kDa – kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)

LMP – low molecular mass polypeptide

LOX 1 – Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor - 1

M – MLV RT – reverzní transkriptáza

MHC - hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)

mRNA - informační ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)

např. - například

NaOAc – octan sodný

NBD – nukleotide binding domain

nHS – non heat shock

NK - přirození zabíječi (natural killer cells)

PCR - polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PBMCs – mononukleární buňky periferní krve (peripheral blood mononuclear cells)

PPP mix – taq-purple DNA PCR master mix

qRT PCR – kvantitativní real time PCR

RDD – název pufru

resp. – respektive

rpm – rounds per minute

RIN – RNA integrity number

RLT – název pufru

RNA – ribonukleová kyselina

RPE – název pufru

RÚ – Revmatologický ústav

RW-1 – název pufru

SAP – shrimp alkaline phosphatase

SBD – substrate binding domain

SNP - jednonukleotidová záměna (single-nucleotide polymorphism)

T – thymin

TAP – transporter associated processing

TBE – tris/borate/EDTA pufr

TBP – tata box binding

TC – heterozygotní genotyp bodové mutace

TMA – oxalát – enhancer tetramethyl ammonium oxalát

tj. – to jest

TLRs – toll-like receptor

TNF $\alpha$  - tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ )

TNF $\beta$  - tumor nekrotizující faktor  $\beta$  (tumor necrosis factor  $\beta$  (LT $\alpha$ ))

TT – homozygotní genotyp bodové mutace

tzn. – to znamená

tzv. - takzvaný

UBC – ubiquitin

UTR – nepřekládaná oblast genu (untranslated region)

UV - ultrafialový (ultraviolet)

vs. – versus, proti

# 1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 MHC

Hlavní histokompatibilní systém MHC (Major Histocompatibility Complex) je označení pro multigenní systém a jím kódované proteiny, které se podílejí na udržování imunologické homeostázy organismu a které jsou odpovědné za tkáňovou slučitelnost při transplantacích (histokompatibilitu). MHC se vyskytuje až u obratlovců. U člověka je označován jako HLA (Human Leukocytes Antigen) a je lokalizovaný na chromozómu 6p21.31 (Goate et al., 1987). Definice rozsahu MHC není dodnes ujednocena. MHC zaujímá úsek, který má rozsah v intervalu 3000- 4000 kb (Sargent et al., 1989), což je něco přes 1 % lidského genomu. K vědeckým počátkům se řadí objev britského imunogenetika Petera Alfreda Gorera, který v roce 1936 identifikoval histokompatibilní H-2 lokus u myši. Význam lokusu H-2 pro transplantace byl oceněn až mnohem později po objasnění mechanismů odvrhnutí transplantované tkáně (Klein, 1986). Lidský systém HLA byl poprvé popsán v roce 1956 a Jean Dausset za tento objev, stejně tak jako Peter Alfred Gorer za výše zmiňovaný předchozí objev, obdržel Nobelovu cenu. V roce 1974 Rolf M. Zinkernagel a Peter C. Doherty zjistili, že MHC je zodpovědný nejen za tkáňovou slučitelnost při transplantacích, ale i za prezentaci cizorodých antigenů T-lymfocytům (Nikolich-Zugich et al., 2004). Genová oblast lidského MHC byla kompletně zmapována Geraghtym a spol. v roce 1999.

### 1.1.1 Genový komplex MHC

Geny MHC jsou rozdělovány do tří tříd označovaných římskými číslicemi I., II., III. MHC geny III. třídy jsou v odborné literatuře častěji označovány jako „non Class I/II MHC geny“, tedy geny nepatřící do I. ani do II. třídy. Rozdělení genů do tříd je založeno na odlišné struktuře a funkci proteinů, které jsou těmito geny kódovány. Na telomerickém konci 6. chromozómu v oblasti p21 leží skupina genů kódujících MHC molekuly I. třídy (HLA-F, HLA-G, HLA-A, HLA-E, HLA-C, HLA-B). Centromericky lokalizovaná oblast chromozómu 6p21, v níž se nalézají MHC geny II. třídy, bývá někdy též označována písmenem D. D-oblast je rozčleněna na tři podoblasti (HLA-DR, HLA-DQ a HLA-DP), z nichž jsou kódovány příslušné MHC molekuly II. třídy (Hansen et al., 1993). MHC geny I. a II. třídy jsou dále děleny na klasické a neklasické. Klasické vysoce polymorfní MHC geny I. třídy, mezi něž patří geny HLA-A, HLA-B, HLA-C, kódují klasické transplantační MHC molekuly I. třídy, které se významně uplatňují při obraně proti intracelulárním

patogenům (Otting et al., 2004) a jsou přítomné v membránách všech buněk vyjma membrán erytrocytů. Neklasické geny HLA-E, HLA-F, HLA-G mají nízkou úroveň polymorfismu a kódují neklasické MHC molekuly I. třídy, které mají omezenou tkáňovou distribuci (Shankarkumar, 2004). Klasické MHC geny II. třídy (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) kódují příslušné MHC molekuly II. třídy, které jsou exprimovány v imunokompetentních buňkách, hlavně na membránách B-lymfocytů a aktivovaných T-lymfocytů a na membránách antigen prezentujících buněk Antigen Presenting Cells (APC), mezi které patří makrofágy, monocyty a dendritické buňky.

MHC molekuly I. a II. třídy jsou transmembránové glykoproteiny. MHC molekuly I. třídy se skládají z polymorfního transmembránového řetězce alfa, který je kódován geny HLA-A, -B, -C, a s ním nekovalentně spojeného nepolymorfního  $\beta$ 2-mikroglobulinu ( $\beta$ 2m). Nepolymorfní řetězec  $\beta$ 2-mikroglobulinu je kódován genem na chromozómu 15, který není lokalizován v oblasti MHC. MHC molekuly II. třídy se skládají ze dvou nekovalentně vázaných glykoproteinových řetězců,  $\alpha$  a  $\beta$ , a jsou kódovány geny z oblasti MHC. Primární funkcí MHC molekul obou tříd je navázat peptidové fragmenty proteinů a prezentovat je na buněčném povrchu T – lymfocytům. MHC molekuly I. třídy tvoří vazbu s peptidovými fragmenty, které vznikly v proteozómu proteolytickým štěpením proteinů intracelulárního původu (např. virové kapsidy nebo proteiny produkované nádorovými buňkami nebo vlastní antigeny). Takové peptidové fragmenty jsou na povrchu buňky rozpoznávány pomocí CD8+ T-lymfocytů. Klasické MHC molekuly I. třídy s prezentovanými peptidovými fragmenty jsou exprimovány na povrchu téměř všech buněk (Campbell et al., 2008). MHC molekuly II. třídy tvoří vazbu s peptidovými fragmenty vzniklými v endolysozómu štěpením proteinů většinou extracelulárního původu, které se do buňky dostaly fagocytózou nebo endocytózou. Takové peptidové fragmenty jsou na buněčném povrchu rozpoznávány prostřednictvím CD4+ pomocných T-lymfocytů. MHC molekuly II. třídy jsou exprimovány většinou na APC (Campbell et al., 2008). Třetím známým způsobem prezentace antigenu je tzv. zkřížená prezentace - cross prezentace, která spočívá v tom, že MHC molekuly I. třídy mohou prezentovat i peptidové fragmenty vzniklé rozštěpením proteinů extracelulárního původu (Rock, 2006). Takový komplex MHC molekuly I. třídy a peptidového fragmentu je vystaven na povrchu buňky CD8+ T-lymfocytům.

Námi studované geny proteinů teplotního šoku HSP70-1 (HSPA1A), HSP70-2 (HSPA1B) a HSP70-Hom (HSPA1L) jsou spolu s dalšími geny součástí různorodé

skupiny genů III. třídy, častěji označované jako non Class I/II MHC geny. Tato skupina o počtu cca 150 genů je lokalizována v genové oblasti nalézající se mezi oblastí genů kódujících MHC molekuly I. třídy a oblastí genů kódujících MHC molekuly II. třídy (Geraghty et al., 1999). Do této skupiny genů kromě výše zmiňovaných HSP70 genů patří i další imunologicky relevantní geny (Lie et al., 2005) např. geny, jimiž jsou kódovány složky komplementu (C2, C4A, C4B, faktor B), podjednotky proteazómu – Low Molecular Mass Polypeptide (LMP2, LMP7), podjednotky peptidové pumpy – Transporter Associated with Processing (TAP1, TAP2), enzymy 21-hydroxylázy (21A, 21B) uplatňující se při metabolismu steroidních hormonů a tumor nekrotizující faktory (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) uplatňující se jako cytokiny (Abbas et al., 1997).

### **1.1.2 Dědičnost MHC**

Silná vazba mezi genovými lokusy MHC je příčinou toho, že konkrétní uspořádání alel skupiny genů MHC lokusů je děděno kodominantně jako haplotyp. Haplotyp je určen konkrétním uspořádáním alel dvou nebo více lokusů v homologním úseku DNA. Vzhledem k silné vazbě alel v rámci MHC lokusů v konkrétním haplotypu dochází při meiotickém dělení k minimální rekombinaci (crossing-overu). Každý rodič má dva haplotypy tvořící konkrétní genotyp a předává jeden nebo druhý z haplotypů každému ze svých potomků. Sourozenci pak mohou být buď HLA identičtí nebo haploidentičtí tzn., že mají totožný pouze jeden haplotyp a v druhém se odlišují, anebo jsou rozdílní a odlišují se v obou haplotypech. Rodiče jsou vůči svým potomkům vždy haploidentičtí (Buc, 2001). Jev, kdy se určitá uspořádání alel vyskytují v populaci častěji než by odpovídalo Hardy-Weinbergově rovnováze, se označuje jako vazebná nerovnováha (linkage disequilibrium), která je charakteristická pro MHC geny (Nussbaum et al., 2001).

### **1.1.3 Polymorfismy MHC a jejich význam**

MHC je nejpolymorfnější známou genovou oblastí lidského genomu. Tzn., že v populaci existuje velké množství odlišných alelických variant typických pro jednotlivé genové lokusy MHC. Ze skutečnosti, že každý jedinec v populaci má v podstatě jiné alelické varianty v jednotlivých genových lokusech MHC, vyplývá i různá variabilita produktů těchto genů. Například každá z variant MHC molekul ať již I. nebo II. třídy váže odlišný typ peptidových fragmentů vznikajících štěpením proteinů intracelulárního resp. extracelulárního původu a prezentuje jej na buněčném povrchu. Tím určuje, podle kterých úseků aminokyselinového řetězce bude imunitní systém daného jedince rozpoznávat

konkrétní prezentovaný protein. Tento mechanismus umožňuje různým jedincům v rámci jedné populace rozpoznávat cizorodost stejných proteinů na základě jiných sekvenčních motivů. Virus nebo parazit se tak nemůže evolučně přizpůsobit populaci hostitele, která je dostatečně polymorfní v MHC-proteinech (Flégr, 2009).

Nejčastější příčinou existence několika alelických variant genových lokusů jsou bodové mutace - single nucleotide polymorphisms (SNPs). Bodové mutace nejčastěji vznikají záměnou jednoho nukleotidu za druhý v homologním místě alel téhož genu. V takovém případě se jedná o záměnové mutace tzv. substitute. Je-li nukleotid s pyrimidinem zaměněn za nukleotid s purinem anebo naopak, pak hovoříme o transverzi. Je-li nukleotid s pyrimidenem resp. purinem zaměněn za nukleotid s bází stejného typu, pak hovoříme o tranzici. Mezi bodové mutace patří také jednonukleotidová inserce a delece. Inserce a delece mohou být i vícenukleotidové. Veškeré inserce a delece jsou tzv. posunové mutace (frameshift), protože vložením nebo odstraněním jednoho či více nukleotidů dochází, v případě kódující sekvence, k posunu čtecího rámce. K posunu čtecího rámce dochází ve směru od místa inserce nebo delece. V případě, že je insertovaný či deletovaný úsek násobkem tří nukleotidů a je v souladu s počátkem transkriptu, dojde k inserci nebo deleci příslušné aminokyseliny či aminokyselin ve výsledném proteinu.

V lidském genomu se vyskytují 1-3 SNPs na 1000 bp. Jsou lokalizovány jak v kódujících, tak i v nekódujících oblastech. Pokud se SNPs nalézají v oblastech tzv. junk DNA, tedy v oblastech nekódujících, budou pravděpodobně bez fenotypového projevu. SNPs nalézající se v úseku DNA kódujícím protein lze rozdělit podle jejich vlivu na proteinovou strukturu na synonymní („silent“ mutace) a nesynonymní („missense“ mutace). Vzhledem k tomu, že genetický kód je degenerovaný tzn., že stejná aminokyselina může být kódována několika různými kodóny (nukleotidovými triplety), se záměna nukleotidu v kodónu nemusí nikterak projevit na úrovni aminokyselin a tudíž ani změnou struktury proteinu. V takovém případě se jedná o „silent“ mutaci. Tento typ mutací je z hlediska přirozeného výběru „neviditelný“, neutrální. Je však známo, že „silent“ mutace ve skutečnosti často neutrální nejsou, neboť mohou významně ovlivnit regulaci exprese daného genu (Flégr, 2009). K „missense mutaci“ neboli mutaci se změnou smyslu dochází v důsledku záměny nukleotidu v kodónu nahrazením jedné aminokyseliny za jinou, což způsobí změnu struktury a funkce proteinu. Je-li původní aminokyselina zaměněna za aminokyselinu s obdobnými chemicko-fyzikálními vlastnostmi (hydrofobie, náboj, aj.) jedná se o záměnu konzervativní, při které nemusí dojít k výrazné změně

terciární struktury a funkce proteinu. Naopak, má-li nová aminokyselina výrazně odlišné chemicko-fyzikální vlastnosti, může dojít k významné změně struktury a funkce proteinu (např. vazebné domény aj.). Mezi záměnové mutace patří rovněž „nonsense“ mutace neboli mutace nesmyslné, při kterých dochází k změně kodónu pro aminokyselinu na některý z terminačních kodónů a v důsledku toho je předčasně ukončena proteosyntéza. Téměř všechny nesmyslné mutace vedou k nefunkčním proteinům.

#### **1.1.4 Asociace mezi polymorfismy genů MHC a autoimunitními chorobami**

Autoimunitní choroby jsou charakterizovány patologickým projevem v imunitní odpovědi organismu, kdy dochází k porušení autotolerance a k neadekvátní imunitní reakci. Typické je napadání buněk, tkání a orgánů nesoucích autoantigeny. Na vzniku autoimunitních chorob se podílejí faktory zevního prostředí, hormonální a genetické.

Z faktorů zevního prostředí se při vzniku autoimunitních chorob uplatňují především infekce, léky a další chemikálie, UV záření, výživa např. u coeliakie.

U hormonálních faktorů je nejčastěji zmiňováno uplatnění pohlavních hormonů v etiologii autoimunitních chorob. Autoimunitní choroby vznikají častěji u žen než u mužů, ale po menopauze se frekvence autoimunitních chorob u žen a mužů vyrovnává. Příčinou tohoto jevu je rozdílná citlivost regulačních T-buněk k estrogenům u žen a mužů (Hořejší et al., 2009).

Genetická predispozice je většinou polygenní tzn. že, při rozvoji autoimunitních chorob se uplatňuje zpravidla soubor několika genů. Mnohé studie poukázali na úzkou spojitost mezi polymorfismy genů MHC systému a vznikem autoimunitních chorob. Vznik některých autoimunitních chorob je přímo asociován s pouhou přítomností jednoho či více polymorfismů v MHC genech I., II. a III. třídy. Příkladem autoimunitní choroby asociované přítomností jednoho polymorfismu v MHC genu I. třídy je ankylozující spondylitida, jejíž výskyt je významně vázán na alelu HLA-B27 (Khan et al., 1992). Mezi autoimunitní choroby asociované přítomností jednoho polymorfismu v MHC genu II. třídy patří mimo jiné Sclerosis multiplex, která je v silné vazbě na alelu DQ6 (Marachandran et al., 1995). Onemocnění Diabetes melitus I. typu je autoimunitní choroba asociovaná s přítomností 2 polymorfismů v MHC genech, jedná se o alely DQ8 a DQ2 (Pociot et al., 1993). Avšak u většiny autoimunitních chorob není kvůli silné vazbě na alely v MHC systému zcela zřejmé, zda je za jejich vznik odpovědná pouhá přítomnost polymorfismů v MHC genech I., II., III. třídy nebo zda je přítomnost určitého polymorfismu v daném MHC genu spjata s funkcí jiného MHC genu, který může přímo

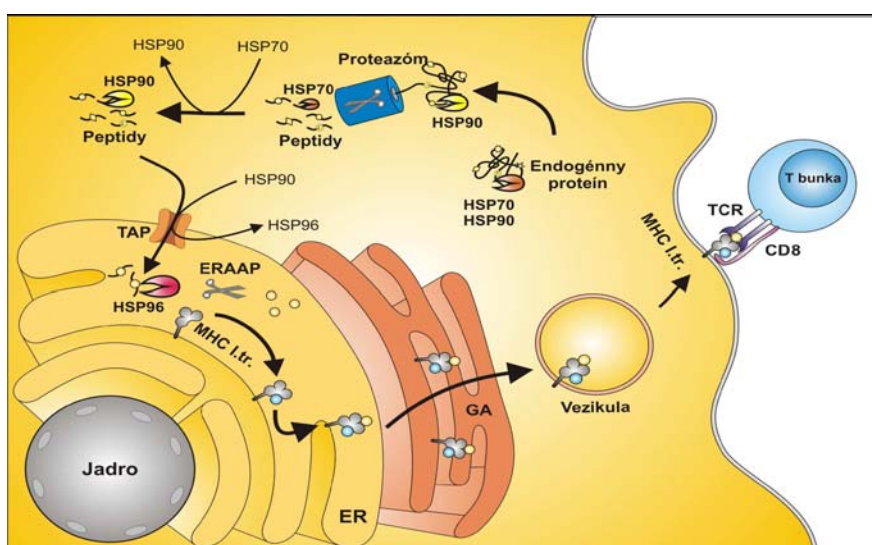
ovlivňovat etiologii daného autoimunitního onemocnění (Sargent et al., 1989). Přítomnost polymorfismů v genech MHC systému může tedy působit jak rizikově, tak protektivně z pohledu vzniku autoimunitních chorob. Např. prostřednictvím in vivo a in vitro studií bylo prokázáno, že zvýšená exprese HSP70 genu vede ke kardioprotekci (Currie et al., 1993) a je asociována s inhibicí apoptózy v myokardu u ischemických onemocnění (Suzuki et al., 2000).

## **1.2 Proteiny teplotního šoku (Heat Shock Proteins- HSP)**

Proteiny teplotního šoku byly objeveny v důsledku jejich indukovatelné exprese v reakci na endogenní a exogenní podněty jakými jsou např. teplotní, osmotický šok anebo přítomnost cizorodých částic (Hartl, 1996). HSP rozdělujeme do několika rodin podle jejich molekulové hmotnosti: malé HSP (12 - 43 kDa), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 a velké HSP (100 - 100 kDa; Weiegl et al., 1999). Za fyziologických podmínek jsou přítomny v nízkých koncentracích v cytoplazmě a ve všech důležitých buněčných organelách (Benjamin et al., 1998). Jedná se o evolučně staré proteiny, které se vyskytují u prokaryot, eukaryot včetně rostlin, a napříč různými druhy jsou strukturně konzervativní (Lamb et al., 2002). Tzn., že v průběhu evoluce jejich struktura prodělala minimum změn a u řady organismů lze vysledovat shodu v primární struktuře DNA. Rozlišujeme konstitutivní a stresem indukovatelné HSP. Konstitutivní HSP jsou syntetizovány stále, bez ohledu na buněčný stres. Exprese genů kódujících stresem indukovatelné HSP se aktivuje jako odpověď na buněčný stres a představuje tím účinnou ochranu před poškozením buněčných struktur. Buněčný stres může být vyvolán nejen teplotním šokem, ale i např. zánětem, viry nebo fyzikálními, chemickými a mechanickými faktory. K aktivaci transkripce genů kódujících HSP dochází vazbou specifických transkripčních faktorů HSFs (heat shock transcription factors) na vysoce konzervativní sekvence v oblasti promotoru HSP genů, která je označována jako HSE - heat shock element (Benjamin et al., 1998; McGrath et al., 1995). Mechanismus autoregulace stresové odpovědi, který vysvětluje působení HSFs, byl popsán na začátku 90. let. HSF je v klidové buňce vázán na HSP70. Působením buněčného stresu se v buňce zvýší počet denaturovaných proteinů. Jejich vazbou na HSP70, které je svou činností skládají do původní konformace, dojde k uvolnění HSF z HSP70. HSFs následně vstupují do jádra, kde aktivují transkripci genu HSP70 navázáním se na HSE. Exprese genu HSP70 ustává v okamžiku kdy se nadbytečné HSP70 váže na HSFs vázaných na promotoru a způsobují jejich uvolnění z HSE (Abravaya et al., 1991).

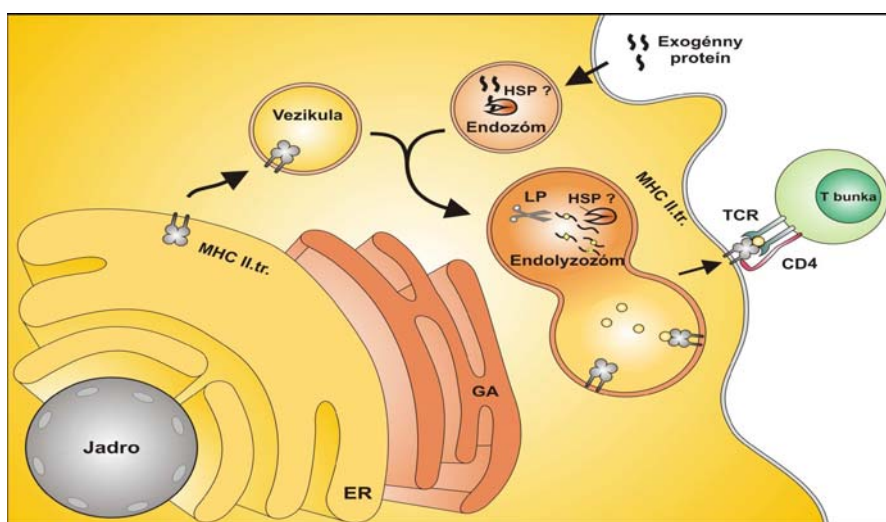
HSP se uplatňují při udržování buněčné homeostázy. Nejčastěji je zmiňována jejich funkce chaperonů, tedy proteinů, které stabilizují sekundární, terciární a kvartérní struktury nově syntetizovaných proteinů. Stabilizují i struktury stávajících proteinů, jejichž struktura byla poškozena při buněčném stresu (Helmbrecht et al., 2000). Z této funkce vyplývá i jejich občasné pojmenování „chaperokiny“. Další uplatnění HSP je např. při regulaci buněčného cyklu, při inhibici apoptózy (Beere et al., 2000), ochraně cytoskeletu – obnově mikrofilament, mikrotubulů atd. (Latchman, 2001).

HSP jsou součástí mechanismu prezentace peptidů prostřednictvím MHC molekul (Pierce et al., 1991). Dobře prostudované je především jejich uplatnění při prezentaci peptidů vzniklých rozštěpením proteinů intracelulárního původu a prezentovaných prostřednictvím MHC molekul I. třídy. Úloha HSP při prezentaci tohoto typu spočívá jednak v selekci a stabilizaci intracelulárních proteinů a dále pak v transportu peptidů od proteazómu až k MHC molekulám I. třídy. Intracelulární proteiny jsou nejprve v proteazómu proteolyticky rozštěpeny na peptidy (Udono et al., 2009). Peptidy se pak váží na HSP70 a posléze jsou z HSP70 přeneseny na HSP90 a jsou tak transportovány směrem k endoplazmatickému retikulu (ER). Přejednost peptidů z cytoplazmy do ER je zprostředkován pomocí peptidových pump složených z podjednotek TAP. V lumen ER se peptidy váží na HSP96, účinkem aminopeptidázy ERAAP jsou upraveny a následně předány MHC molekulám I. třídy (Hickman et al., 2004). Komplex tvořený peptidem a MHC molekulou I. třídy je poté transportován přes Golgiho aparát na povrch buňky, kde je schopen vyvolat svou vazbou s CD8+ T-lymfocytem cytotoxickou odpověď namířenou proti buňkám produkujícím tyto proteiny. Mechanismus je vyobrazen na obrázku 1 - 1.



**Obrázek 1 - 1** Prezentace peptidů na MHC molekulách I. třídy

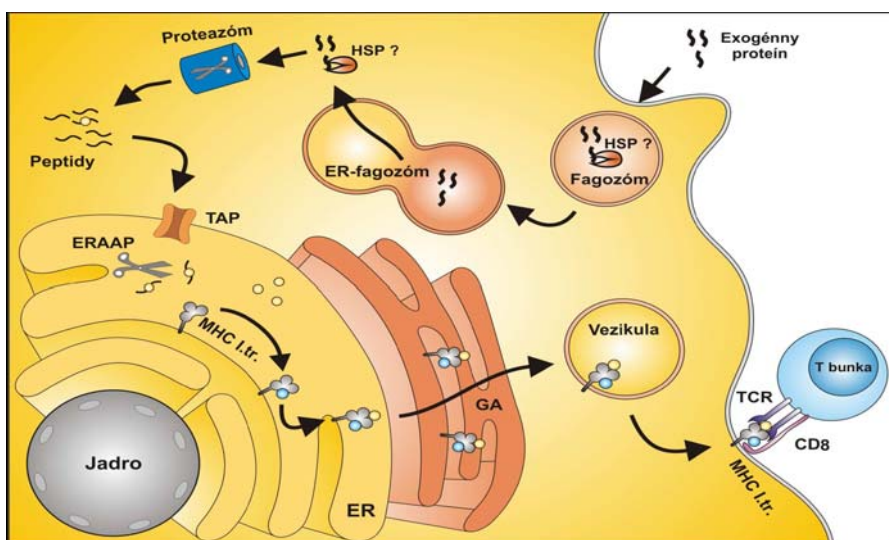
Úloha HSP při prezentaci peptidových fragmentů extracelulárního původu prostřednictvím MHC molekul II. třídy není zcela objasněna. Předpokládá se ale, že HSP se uplatňují při stabilizaci (folding) proteinů extracelulárního původu v endozómu resp. fagozómu, dále pak v endolysozómu resp. fagolysozómu při jejich štěpení a při transportu peptidů směrem k buněčné membráně. Proteiny extracelulárního původu se do buňky mohou dostávat prostřednictvím membránových vezikul tzv. fagozómů resp. endozómů, které vznikají při procesu fagocytózy resp. endocytózy. Fagozomy resp. endozomy posléze splývají s lysozomy za vzniku fagolysozómů resp. endolysozómů v nichž, dochází účinkem proteáz k rozštěpení proteinů na peptidy, které posléze tvoří komplex s MHC molekulou II. třídy. A tento komplex je transportován na povrch buňky, kde vyvolává odpověď zprostředkovanou CD4+ pomocnými T-lymfocyty (Schmid et al., 2005). Mechanismus prezentace peptidu je názorně vyobrazen na obrázku 1 - 2.



**Obrázek 1 - 2** Prezentace peptidů na MHC molekulách II. třídy

Stejně tak u zkřížené prezentace se předpokládá uplatnění HSP při stabilizaci (folding) extracelulárních peptidů v membránovém vezikulu a při transportu peptidových fragmentů z ER - vezikulu do proteozómu. Zkřížená prezentace peptidových fragmentů tzv. cross prezentace spočívá v tom, že MHC molekuly I. třídy za jistých okolností prezentují nejen peptidy intracelulárního původu, ale i peptidy vzniklé rozštěpením proteinů extracelulárního původu (Rock, 2006). Extracelulární proteiny se do buňky dostávají procesem fagocytózy, přičemž vzniká fagozóm. Fagozóm pravděpodobně následně splývá s vezikulou z ER za vzniku ER-fagozómu. Z ER-fagozómu jsou proteiny doposud pro nás neznámým způsobem transportovány do proteozómu, kde jsou proteolyticky rozštěpeny na peptidy. Peptidy jsou transportovány směrem k ER a do lumen

ER se dostávají prostřednictvím přenašečů tvořených molekulami TAP. V ER jsou peptidy vystaveny úpravám působením aminopeptidázy ERAAP a následně vytvářejí komplexy s MHC molekulami I. třídy (Creswell et al., 2005). Komplex tvořený peptidem a MHC molekulou I. třídy je poté transportován přes Golgiho aparát na povrch buňky, kde je vystaven CD8<sup>+</sup> T-lymfocytům. Mechanismus zkřížené prezentace - cross prezentace je vyobrazen na obrázku 1 - 3.



**Obrázek 1 - 3** Mechanismus cross prezentace

### 1.2.1 HSP70

Jednou z nejvýznamnějších HSP rodin je HSP70 rodina (Gunther et al., 1994). Jedná se o rodinu proteinů teplotního šoku s molekulovou hmotností kolem 70 kDa. Buňky obratlovců obsahují nejméně 12 různých genů kódujících HSP70 (Lindquist et al., 1988; Tavaría et al., 1996). Tři z těchto genů jsou lokalizovány v MHC a patří do skupiny genů označovaných jako non Class I/II MHC geny a jsou uspořádány tandemově na chromozomu 6p21.3. Jedná se o gen HSP70-1 (někdy též označovaný jako HSPA1A), o gen HSP70-2 (HSPA1B) a HSP70-Hom (HSPA1L). Všechny tři geny jsou bez intronů. Geny HSP70-1 a HSP70-2 jsou buněčným stresem indukovatelné a kódují 2 izoformy téhož proteinu (Milner and Campbell, 1990). Gen HSP70-Hom kóduje protein, který má z 90 % stejnou aminokyselinovou sekvenci jako předchozí HSP70, ale není indukovatelný. Patří mezi konstitutivní geny (Milner and Campbell, 1990) a je tkáňově specifický a jeho exprese může být detekována v testes (Ito et al., 1998).

Geny rodiny HSP70 jsou evolučně nejkonzervovanější a jsou lokalizovány v různých intracelulárních kompartmentech. Do této rodiny, kromě již zmiňovaných HSP70 proteinů kódovaných geny lokalizovanými v MHC systému, patří např. i

cytoplazmatický Hsc70- cytosolic heat shock cognate 70, dále pak GRP78 – glukose regulated protein 78 lokalizovaný v ER anebo mitochondriální HSP75. Zmiňované proteiny jsou exprimovány konstitutivně. Proteiny HSP70 rodiny vykazují vysoký stupeň strukturální homologie. Ve struktuře HSP70 jsou popisovány 2 domény. Na N-terminálním konci struktury HSP70 se nalézá nukleotidová vazebná doména - nukleotide binding domain (NBD) o velikosti 44 kDa, pro kterou je charakteristická ATPásová aktivita. C-terminální konec struktury HSP70 o velikosti 27 kDa je tvořen centrální substrát vázající doménou - substrate binding domain (SBD) a charakteristickým terminálním úsekem velikým 10 kDa a bohatým na alfa-šroubovicovité struktury, který funguje jako kryt vazebné domény SBD (Bertelsen et al., 1999). SBD doména je vysoce (až z 60 %) konzervována u různých proteinů patřících do HSP70 rodiny (Wang et al., 1993). Funkce této domény není zcela objasněna, ale předpokládá se, že je zapojena do interakce s DnaJ – „co-chaperonem“ HSP70 (Freeman et al., 1995; Demand et al., 1998). Další studie ukázaly, že C-terminální doména HSP70-1, HSP70-2 a HSP70-Hom, nikoliv u Hsc70, stimuluje proliferaci a cytolickou aktivitu NK buněk (Multhoff et al., 1999). Na rozhraní mezi N-terminální a C-terminální oblastí je lokalizován charakteristický úsek, který zprostředkovává propojení mezi doménami (Jiang et al., 2005). HSP70 se po navázání ATP dostává do otevřené konformace, v níž je schopen vázat hydrofobní části špatně složených proteinů. Následně dochází k hydrolyze ATP a uzavření chaperonového komplexu, čímž protein dostane možnost sbalit se do správného prostorového uspořádání. V následující fázi dojde k výměně ADP za ATP a HSP70 se dostává opět do otevřené konformace a je připraven stabilizovat další proteiny (Bukau et al., 1998)

Na význam HSP70 je možno pohlížet z několika úhlů. Všechny HSP a tedy i HSP70 plní již zmíněnou funkci molekulárních chaperonů. HSP70 se dále uplatňují při transportu proteinů mezi intracelulárními kompartmenty. Bylo prokázáno, že extracelulární HSP70 je považován za určitý signál nebezpečí, který vede k aktivaci imunitního systému a že má významný imunoregulační potenciál (Radons et al., 2005). Z imunologického hlediska jsou HSP70 schopné aktivovat jednak nespecifickou (vrozenou) imunitní odpověď. Příkladem vrozené imunitní odpovědi je uvolňování cytokinů dendritickými buňkami a makrofágy v důsledku zvýšené syntézy HSP70 v průběhu buněčného stresu (Srivastava, 2002; Flohe et al., 2003). HSP70 jsou těmito APC buňkami rozpoznávány prostřednictvím jejich povrchových receptorů (např. CD40, CD91, LOX1, TLRs). HSP70 plní tedy funkci jakéhosi ukazatele, který poukazuje na poškození tkáně tím, že se zvýší

koncentrace HSP70 v oběhu, do kterého jsou uvolňovány z nekrotických či poškozených buněk (Basu et al., 2000). HSP70 jsou schopné aktivovat i specifickou (adaptivní) imunitní odpověď. Např. byla zjištěna nádorově specifická exprese indukovatelné formy HSP70 v membráně některých nádorů, která je nádorově specifickou rozpoznávací strukturou pro NK buňky (Gastpar et al., 2004). I výše zmiňovaná prezentace antigenů, při níž se rovněž uplatňují HSP70, je počátkem specifické imunitní odpovědi.

Strukturální podobnost lidských a prokaryotických proteinů HSP70 rodiny činí cca 50 %. V důsledku toho jsou v těchto proteinech některé sekvence aminokyselin shodné a v lidském organismu tak mohou vznikat klony lymfocytů, které rozeznávají a reagují na vlastní HSP70 stejně tak jako na mikrobiální HSP70. Taková imunitní odpověď na vlastní HSP70 je zpravidla potlačena, ale za jistých okolností se může autotolerance prolomit a HSP se tak mohou stát chybným cílem imunitní odpovědi. Ta v konečném důsledku může vést ke vzniku autoimunitního onemocnění (Granja et al., 2004).

### **1.2.2 Vybrané mutace HSP70 genů**

Přesto že jsou HSP70 geny vysoce konzervativní, je u nich známa řada mutací. V této práci jsme se zabývali pouze několika z mnoha známých mutací HSP70 genů. Studované mutace jsme vybrali na základě několika studií (v různých populacích) v nichž byly studovány vztahy mutací v genech HSP70 a přítomnosti konkrétního onemocnění jakým je např. Alzheimerova choroba (Clarimón et al., 2003), Diabetes melitus I. typu (Pociot et al., 1993), Systémový lupus erythematosus (Jarjour et al., 1996) a Revmatoidní artritida (Statsny, 1978).

U HSP70-1 genu jsme se konkrétně zabývali bodovou mutací -110A/C (rs1008438), která je přítomna v promotorové oblasti, a bodovou mutací +190G/C (rs10436198), která se nachází v nepřekládané oblasti 5'UTR genu HSP70-1.

V rámci genu HSP70-2 genu jsme se zabývali dvěma bodovými mutacemi a jednou pětínukleotidovou insercí/delecí. Obě bodové mutace +12676A/G (rs1061581) a +2074G/C (rs539689) jsou synonymní a jsou přítomny v kódující oblasti genu. Insece/delece nukleotidového úseku AAGTT (rs9281590) je lokalizována na pozici +2046 v 3'-UTR nepřekládané oblasti genu (Dressel et al., 1994).

U genu HSP70-Hom jsme se zabývali nesynonymní bodovou mutací +2437T/C (rs2227956), která je přítomna v kódující oblasti.

## 2 CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce je pilotní studií odvozené z probíhající studie realizované v Revmatologickém ústavu, která se zabývá rozdíly v míře exprese tří HSP70 genů (HSP70-1, HSP70-2 a HSP70-Hom) u pacientů se systémovými autoimunitními chorobami (Idiopatické zánětlivé myopatie, Sclerodermie, Revmatoidní artritída a Systémový lupus erythematosus) a zdravých kontrol. Cílem této diplomové práce je získat první data o závislosti míry genové exprese HSP70 genů na vybraných polymorfismech. Vzhledem k tomu, že se jedná o dílčí pilotní studii, zabývali jsme se pouze zdravými kontrolami.

### **Cíle práce:**

1. Genotypizace tří HSP70 genů (HSP70-1, HSP70-2 a HSP70-Hom) v souboru 59 zdravých jedinců se zaměřením na 5 vybraných SNPs a jednu pětínukleotidovou delecii/inserci .
2. Zjistit míru regulace exprese HSP70 genů v závislosti na výše uvedených mutacích v HSP70 genech.

### 3 MATERIÁL A METODIKA

Odběry periferní krve proběhly u 59 jedinců České a Slovenské národnosti v období od ledna 2010 do dubna 2011 v Revmatologickém ústavu v Praze. Pro analýzu DNA jsme odebírali 10 ml srážlivé krve. V případě, že byl jedinec homozygotní v minimálně jedné ze sledovaných mutací, byl vybrán pro další část studie zabývající se mírou genové exprese HSP70 genů v závislosti na indukci teplotním šokem. Pro tuto druhou část studie jsme jedincům odebraly dalších 20 ml srážlivé krve. Do souboru vyšetřovaných jedinců jsme zahrnuli pouze zdravé osoby ve věku od 19 do 73 v průměru 34 let, žádná další kritéria jsme nezohlednili. Při zohledňování kritéria zdravého jedince jsme vycházeli z dotazování se na úrovni osobní anamnézy. Všichni účastníci studie byli předem seznámeni o jejích cílech a před vlastním odběrem podepsali informovaný souhlas. Vlastní studie byla schválena etickou komisí Revmatologického ústavu. Vzorky jsme po odběru zaevidovali a bezprostředně jsme je zpracovali (izolace DNA). Po izolaci jsme vzorky uchovávali při teplotě +4 °C při krátkodobém skladování (do 4 týdnů) a při -20 °C při dlouhodobém skladování (nad 4 týdny).

#### 3.1 DNA metodika

##### 3.1.1 Izolace a ředění DNA

DNA jsme izolovali pomocí kitu QIAmp DNA blood mini kitu (Qiagen GmbH, Hilden, Německo). Po změření koncentrace DNA pomocí spektrofotometru BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburk, Německo) jsme DNA naředili na koncentraci v rozmezí 10 ng/μl – 40 ng/μl.

##### 3.1.2 PCR

Amplifikovali jsme čtyři úseky tří genů: 488 bp dlouhý úsek s bodovými mutacemi rs1008438 a rs10436198 v HSP70-1 genu, 1117 bp dlouhý úsek s bodovými mutacemi rs1061581 a rs539689 v HSP70-2 genu, 203 bp dlouhý úsek s mutací rs9281590 v HSP70-2 genu a 627 bp dlouhý úsek s bodovou mutací rs2227956 v HSP70-Hom genu. Pro úsek dlouhý 488 bp v HSP70-1 genu jsme použili primery:

forward 5'-CGCCATGGAGACCAACACCC-3' a

reverse 5'- GCGGTTCCCTGCTCTCTGTC-3'.

Pro úsek dlouhý 1117 bp v HSP70-2 genu jsme použili primery:

forward 5'-CATCGACTTCTACACGTCCA-3' a

reverse 5'- CAAAGTCCTTGAGTCCCAAC-3'.

Pro úsek dlouhý 203 bp v HSP70-2 genu jsme použili primery:

forward 5'-AGGTGGATTAGGGGCCTTTG-3' a

reverse 5'-AAAGGGAACGAAACACCCTTACA-3'.

Pro úsek dlouhý 627 bp v HSP70-Hom genu jsme použili primery:

forward 5'-GTCCCTGGGGCTGGAGACGG-3' a

reverse 5'-GTGATGATAGGGTTACACATTCTGCT-3.

Primery jsme převzali ze studie od Wu et al. (2004) vyjma primerů, jimiž byl amplifikován 203 bp dlouhý úsek HSP70-2 genu. PCR jsme připravovali v objemu 20  $\mu$ l do sterilních mikrozkušavek. Reakční směs jsme připravovali v laminárním boxu a pro amplifikaci všech čtyř sekvencí DNA jsme většinou použili shodné koncentrace, které jsou uvedené v příloze, viz tabulka A - 1. Jednotlivé reagenty podle počtu analyzovaných DNA jsme napipetovali do jedné zkumavky v pořadí: voda, primery, PPP mix (Top-Bio, Praha, Česká republika). Následně jsme je promíchali na vortexu GVLab (Gilson, Middleton, USA) a krátce stočili na centrifuze (Labnet, Edison, USA). Odpovídající objem PCR směsi (19  $\mu$ l) jsme rozpipetovali do jednotlivých předem označených mikrozkušavek na 200  $\mu$ l. Do každé z nich jsme přidali 1  $\mu$ l příslušného vzorku DNA a směs jsme promíchali. Poté jsme vzorky přemístili do thermocykleru Multi Gene TC9600 (Labnet, Edison, USA), kde jsme je inkubovali při teplotách uvedených v příloze, viz tabulka A - 2. Specifita reakce PCR byla optimalizována a maximalizována použitím enhanceru TMA oxalátu (Top-Bio, Praha, Česká republika) případně zvýšením koncentrace  $MgCl_2$ . Přidání těchto reagentů vedlo ve všech případech k odstranění případných nespecifických PCR produktů a ke zvýšení množství PCR produktu.

### 3.1.3 Elektroforéza

Kvalitu a specifitu PCR produktu jsme kontrolovali prostřednictvím elektroforézy v 1,5 % agarózovém gelu. Agarózový gel jsme připravili podle Sambrook et al. (1989). Použili jsme 0,75 g agarózy (Serva, Heidelberg, Německo) a 50 ml směsi tris-borátu, kyseliny borité a chelatačního činidla EDTA (TBE pufr). Výsledný gel jsme obarvili 3  $\mu$ l barviva Gel Red (Biotium, Hayward, USA). Z výsledného objemu (20  $\mu$ l) PCR produktu jsme do gelu nanесли 5  $\mu$ l PCR produktu obarveného 1  $\mu$ l barviva Gel loading solution (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) a elektroforéza probíhala v 1 x TBE pufru při napětí 120 V po dobu 35 minut. Pro určení velikosti separovaných úseků DNA jsme použili DNA hmotnostní marker Hyperladder IV (Biolone, London, UK). Ke kontrole specifity produktů jsme PCR produkty s navázaným Gel Red zviditelnili pomocí UV

transiluminátoru (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, Velká Británie). Nakonec jsme provedli fotodokumentaci prostřednictvím přístroje Uvitec (Uvitec, Cambridge, Velká Británie) a video copy procesoru od firmy Mitsubishi.

#### **3.1.4 Čištění PCR produktu před sekvenační reakcí**

K přečištění PCR produktu před vlastní sekvenační reakcí jsme použili enzymatickou směs se SAP – shrim alkaline phosphatase (Fermentas, St. Leon-Rot, Německo) a EXO – exonuclease I (Fermentas, St. Leon-Rot, Německo), která se používá pro specifické a vysoce koncentrované produkty). Při purifikaci jsme měli reagentie umístěné v chladícím kovovém stojánku a k 15  $\mu\text{l}$  PCR produktu jsme přidali 5,1  $\mu\text{l}$  předem připravené směsi SAP : EXO v poměru 5 : 0,1  $\mu\text{l}$ . Vzniklou směs o objemu 20,1  $\mu\text{l}$  jsme krátce stočili na centrifuze GmCLab (Gilson, Middleton, USA) a hned poté inkubovali po dobu 60 minut při teplotě 37 °C v thermocykleru Multi Gene TC9600 (Labnet, Edison, USA). Po skončení inkubace proběhla deaktivace EXO zahřátím na teplotu 65 °C po dobu 15 minut.

#### **3.1.5 Sekvenační reakce**

Na ledu jsme předem připravili směs z RR mixu (Applied Biosystems, Foster City, USA) a odpovídajícího sekvenačního primeru v poměru 2 : 1  $\mu\text{l}$  pro příslušný počet vzorků (vždy zvláště pro forward a reverse reakci). Směs jsme promíchali na laboratorním vortexu TK3S (Kartell, Noviglio, Itálie), krátce stočili na stolní centrifuze GmCLab (Gilson, Middleton, USA), rozpipetovali do označených mikrozkušavek, přidali do ní 4  $\mu\text{l}$  – 0  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O (dle objemu PCR produktu) a následně 1  $\mu\text{l}$  – 5  $\mu\text{l}$  přečištěného PCR produktu (cca 100 ng do 20  $\mu\text{l}$  PCR reakce), tak aby celkový objem reakční směsi byl 8  $\mu\text{l}$ . Směs jsme krátce stočili na stolní centrifuze a následně vložili do thermocykleru Multi Gene TC9600 (Labnet, Edison, USA) s teplotním programem uvedeným v příloze viz tabulka A - 3.

#### **3.1.6 Čištění PCR sekvenačního produktu po sekvenační reakci**

Před analýzou v automatickém sekvenátoru bylo nutné produkty sekvenační reakce znovu přečistit prostřednictvím kyselého EtOH (směs 96 % EtOH + 3M NaOAc + H<sub>2</sub>O) a 70 % EtOH. Do 1,5  $\mu\text{l}$  zkumavky jsme napipetovali 50  $\mu\text{l}$  kyselého EtOH a 8  $\mu\text{l}$  sekvenačního produktu. Směs jsme poté nechali 10 minut stát a následně stočili na centrifuze (Eppendorf, Hamburk, Německo) při 13000 ot/min po dobu 15 - 20 minut. Po stočení jsme opatrně odpipetovali EtOH. Pak jsme přidali 150  $\mu\text{l}$  70 % EtOH. Směs jsme stočili při 13000 ot/min po dobu 15 - 20 minut. Po stočení jsme opět odsáli EtOH

s ohledem na předpokládanou přítomnost pelet a zkumavky poté nechali vyschnout do druhého dne, případně jsme je dali do thermobloku BioTDB-100 (Biosan, Riga, Lotyšsko) o teplotě 40 °C po dobu 10 minut. Po úplném vysušení jsme přidali 25 µl formamidu a nechali pelet rozpustit. Takto připravené vzorky jsme následně přepipetovali do sekvenačního plata a následně vložili do sekvenátoru 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

### **3.1.7 Sekvenční elektroforéza**

Přečištěné produkty sekvenační reakce byly v sekvenátoru děleny gelovou elektroforézou. Výsledkem procesu bylo zjištění pořadí jednotlivých bází pomocí softwaru Chromas 2 (Technelysium, Helensvale, Austrálie). DNA fragmenty byly sekvenovány z obou stran a oba řetězce jsme sjednotily v programu Bioedit (Ibis Biosciencis, Carlsbad, USA).

## **3.2 RNA metodika**

### **3.2.1 Příprava mononukleárních buněk (PBMCs) z periferní krve**

Čerstvou nesrážlivou krev (2 x 10 ml; K<sup>2+</sup>EDTA) jsme nechali 30 minut odstát. Po 30 minutách jsme zkumavky s krví stočili na centrifuze Jouan CR 3i (Jouan, St. Herblain, Francie) při nastavení 10min/3500ot/RT. Po centrifugaci jsme k následné analýze použili pouze tenkou vrstvu oddělující krevní elementy od plazmy tzv. buffy-coat. Buffy-coat v množství cca 1,5 ml – 2 ml jsme přenesli do pomocných zkumavek Falcon obsahujících stejný objem pufru DPBS pomocí sterilní pasturovy pipety. Pomocné zkumavky jsme uzavřeli, promíchali šetrným otáčením a obsah následně přelili do zkumavek Leucosep (Greiner, Frinckenhausen, Německo) obsahujících 3 ml Ficollu (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko). Zkumavky jsme následně nechali stočit na centrifuze při nastavení 10min/2400ot/RT. Po stočení jsme část objemu obsahujícího PBMCs odebrali pasturovou pipetou do sterilních zkumavek typu simport (Simport, Beloeil, Kanada) a následně doplnili puftrem DPBS do objemu 10 ml. Zkumavky simport jsme uzavřeli a promíchali. Následovalo jejich stočení na centrifuze při nastavení 10min/1000ot/10°C. Získaný supernatant jsme odlili, zbylý sediment řádně a šetrně roztřepali, objem zkumavek simport doplnili puftrem DPBS do 10 ml, zkumavky uzavřeli, promíchali a opět stočili na centrifuze při nastavení 10min/1000ot/10°C. Tento krok jsme zopakovali ještě jednou. Výsledkem byly dvě zkumavky simport obsahující mononukleární buňky jednoho jedince. Jedna

zkumavka s mononukleárními buňkami byla určena pro analýzu „Heat Shock“ a druhá pro „non Heat Shock“ analýzu.

### **3.2.2 Heat Shock**

Mononukleární buňky promyté puřrem jsme stočili na centrifuze ve zkumavkách simport (Simport, Beloeil, Kanada). Po odlití supernatantu jsme sediment protřepali, doplnili do objemu 8 ml kultivačním médiem DMEM suplementovaným HEPES (Lonza Biotec, Basilej, Švýcarsko), uzavřeli je a šetrně promíchali otočením 10x. Zkumavku simport určenou pro analýzu „Heat Shock“ (HS) jsme poté dali inkubovat do vodní lázně o teplotě 42 °C po dobu jedné hodiny. Druhou zkumavku simport určenou pro analýzu „non-Heat Shock“ (nHS) jsme inkubovali ve sterilním stojanu vloženém do CO<sub>2</sub> inkubátoru (Sanyo, Sakata, Japonsko) při teplotě 37 °C po dobu tří hodin. Zkumavku simport určenou pro „HS“ jsme po hodinové inkubaci ve vodní lázni přenesli do termostatu s CO<sub>2</sub> o teplotě 37 °C na další dvě hodiny. Po skončení inkubace jsme obě zkumavky stočili na centrifuze Jouan M3 23i (Jouan, St. Herblain, Francie) při nastavení 10min/1000ot/4°C. Po odlití supernatantu jsme každý z obou sedimentů rozpustili v 1 ml DMEM a přenesli do označených mikrozkuavek o objemu 1,5 ml. Následně jsme je stočili na centrifuze Eppendorf model 5418 (Eppendorf, Hamburk, Německo) při nastavení 1min/8000ot/RT.

### **3.2.3 Izolace RNA**

Totální RNA jsme z monoklonálních periferních buněk izolovali pomocí izolačního kitu Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Německo). Supernatant vzniklý při přípravě PBMCs jsme odsáli a k sedimentu jsme přidali 600 µl pufru RLT z izolační soupravy Qiagen RNeasy. Následně jsme směs důkladně promíchali na Vortexu Classic (VELP Scientifica, Usmate, Itálie). K promíchanému lysátu jsme přidali 600 µl 70 % EtOH a dobře promíchali pipetou. Poté jsme 700 µl vzorku včetně sraženin přepipetovali do kolonky ve sběrné zkumavce o objemu 2 ml, kolonku uzavřeli, stočili na centrifuze Eppendorf model 5418 (Eppendorf, Německo, Hamburk) po dobu 15 sekund při nastavení  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$  rpm) a po stočení ze sběrné zkumavky odstranili supernatant. Tento krok jsme opakovali do vyčerpání vzorku. Ze sběrné zkumavky jsme odstranili supernatant, přidali 350 µl RW1 pufru z izolační soupravy Qiagen do kolonky umístěné stále ve stejné sběrné zkumavce o objemu 2 ml, kolonku uzavřeli, nechali stočit na centrifuze po dobu 15 sekund při nastavení  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$  rpm) a nakonec jsme opět

ze sběrné zkumavky odstranili supernatant. V následující fázi izolace RNA jsme si na ledu připravili 160  $\mu\text{l}$  DNase I inkubační směsi smícháním 20  $\mu\text{l}$  DNase I a 140  $\mu\text{l}$  RDD pufru z izolační soupravy Qiagen RNase-Free DNase set (80  $\mu\text{l}$  pro „HS“ analýzu a 80  $\mu\text{l}$  pro „nHS“ analýzu). 80  $\mu\text{l}$  DNase I inkubační směsi jsme přidali do středu membrány kolonky umístěné ve sběrné zkumavce a DNase I jsme nechali působit po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po 15 minutách jsme přidali 350  $\mu\text{l}$  RW1 pufru z izolační soupravy Qiagen do kolonky umístěné stále ve stejné sběrné zkumavce o objemu 2 ml, kolonku uzavřeli a nechali stočit na centrifuze po dobu 15 sekund při nastavení  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$  rpm). V dalším kroku jsme odstranili sběrné zkumavky se supernatantem a nahradili je novými. Do kolonky umístěné v nové sběrné zkumavce o objemu 2 ml jsme přidali 500  $\mu\text{l}$  RPE pufru z dodávaného izolačního kitu, kolonku uzavřeli a stočili na centrifuze po dobu 15 sekund při nastavení  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$  rpm). Následně jsme odstranili supernatant a sběrnou zkumavku opětovně použili v následujícím kroku, ve kterém jsme přidali 500  $\mu\text{l}$  RPE pufru z izolační soupravy Qiagen do kolonky, kolonku uzavřeli a stočili na centrifuze po dobu 2 minut při nastavení  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$  rpm). Po stočení jsme kolonku umístili do nové 2 ml sběrné zkumavky, opět ji stočili na centrifuze tentokrát však po dobu jedné minuty při nastavení  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$  rpm), následně odstranili i tuto sběrnou zkumavku se supernatantem a kolonku umístili do nové předem označené uzavíratelné zkumavky o objemu 1,5 ml. Do středu membrány v kolonce jsme pak přidali 50  $\mu\text{l}$  RNeasy free vody, kolonku uzavřeli, nechali stát po dobu 1 minuty při teplotě 4 °C a stočili na centrifuze po dobu 1 minuty při nastavení  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$  rpm). Ze spodku sběrné zkumavky o objemu 1,5 ml jsme posléze odebrali vodu, umístili ji opět na membránu kolonky a kolonku stočili opět na centrifuze po dobu 1 minuty při nastavení  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$  rpm). Vyizolované vzorky RNA jsme umístili do chladicího stojánu. Z celkového objemu 50  $\mu\text{l}$  jsme odebrali 2  $\mu\text{l}$  do sterilní mikrozkušavky a zbytek jsme umístili do ledničky. Poté, co jsme zjistili koncentrace vzorků RNA na přístroji Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA), jsme na ledu připravili aliquoty o objemu 3  $\mu\text{l}$  a koncentraci (100 - 200) ng/ $\mu\text{l}$ , které byly určeny pro analýzu integrity RNA. Dále pak jsme si na ledu ještě připravili aliquoty o objemu 10  $\mu\text{l}$  obsahující 1  $\mu\text{g}$  RNA, které byly určeny pro reverzní transkripci. Vzorky jsme poté uchovávali v -20 °C, abychom zabránili jejich degradaci. Aliquoty jsme buď hned zpracovali, nebo rovněž uložili do -20 °C a pro další práci použili později.

### 3.2.4 Měření kvality a kvantity RNA

Koncentraci izolované RNA jsme stanovovali pomocí Nanodropu 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) a kvalitu RNA jsme měřili přístrojem Agilent 2100 Bioanalyseru (Agilent, Santa Clara, USA). Nanesli jsme 2  $\mu\text{l}$  referenčního roztoku ddH<sub>2</sub>O do místa určení a zkalibrovali spektrofotometr Nanodrop. Následně jsme postupně nanášeli po 2  $\mu\text{l}$  vzorku RNA. Mezi měřeními jednotlivých vzorků jsme vždy místo určené pro vzorek vyčistili pomocí ddH<sub>2</sub>O. Nakonec jsme vyhodnocovali kvalitu a koncentraci RNA. Podle koncentrace každého vzorku RNA jsme je pro zjištění jejich kvality naředili na koncentraci 100 ng/ $\mu\text{l}$  - 200 ng/ $\mu\text{l}$ . Analýzu integrity celkové RNA jsme prováděli prostřednictvím Agilent RNA 6000 Nano Kitu (Agilent, Santa Clara, USA) za využití přístroje Bioanalyser 2100 (Agilent, Santa Clara, USA). Postupovali jsme podle standardizované pracovní instrukce uvedené v příloze, viz tabulka A - 5. Výsledkem měření kvality RNA je elektroforetogram a číslo RIN (RNA Integrity Number), které referuje o stupni degradované testované RNA.

### 3.2.5 Reverzní transkripce

Je proces, při kterém je mRNA enzymem reverzní transkriptázou přepsána do cDNA. Reagencie pro reverzní transkripci jsme měli umístěné v chladícím stojánku. Podle koncentrace každého izolovaného vzorku RNA jsme si po jeho rozmražení připravili do mikrozkušavky 1  $\mu\text{g}$  RNA a doplnili RNase free H<sub>2</sub>O do objemu 10  $\mu\text{l}$ . Ke každému k takto naředěnému vzorku jsme posléze přidali 1  $\mu\text{l}$  random primeru (5nmol; Roche, USA). Následně jsme na termocykleru iCycler (Bio-Rad, Berkley, USA) spustili přednastavený program o 4 krocích uvedený v příloze, viz tabulka A - 4. V prvním kroku jsme nechali připravené vzorky denaturovat při teplotě 70 °C po dobu 5 minut. Po 5 minutách jsme program pozastavili a vzorky umístili do chladícího stojánku do ledničky. Mezitím jsme si, podle počtu vzorků, připravili reakční směs, která obsahovala: pufr 5x RT Buffer (Promega, Madison, USA), směs deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP = směs dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega, Madison, USA), dithiotreitol (DTT; Promega, Madison, USA), RNasin Plus (Promega, Madison, USA), reverzní transkriptázu M-MLV RT (Promega, Madison, USA), ddH<sub>2</sub>O. Množství a koncentrace jednotlivých reagentů na vzorek RNA jsou zaznamenány v příloze viz tabulka A - 6. RNasin Plus a reverzní transkriptázu M-MLV RT jsme vyndali z ledničky a napipetovali až když jsme měli napipetovány ostatní reagenty (5x RT Buffer, dNTP, DTT, ddH<sub>2</sub>O). Ke každému vzorku RNA jsme pak přidali 14  $\mu\text{l}$  této reakční směsi a celkový objem na jednu reakci činil 25  $\mu\text{l}$ .

Vzorky jsme vrátili zpět do termocykleru a spustili druhý krok. V druhém kroku probíhala reverzní transkripce při teplotě 37 °C po dobu 75 minut. Ve třetím kroku probíhala inaktivace transkriptázy její denaturací při teplotě 85 °C po dobu 5 minut.

### **3.2.6 Real-Time PCR**

Vzniklou cDNA jsme naředili tak, abychom do PCR reakce vložili 10 ng. Do příslušné jamky v 96 - jamkové destičce jsme napipetovali 1 µl vzorku cDNA, k nimž jsme přidali 24 µl směsi „Master Mix“, který obsahoval interkalační barvivo SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, USA), sadu primerů (forward a reverse) syntetizovaného nebo referenčního genu (příloha viz tabulka A - 9) a ddH<sub>2</sub>O. Master mix jsme připravili smícháním ddH<sub>2</sub>O se sadou primerů a těsně před napipetováním do destičky jsme ke směsi „Master Mix“ přidali SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, USA). Při Real Time PCR jsme použili 3 sady primerů pro syntézu námi sledovaných genů: HSP70-1 (HSPA1A), HSP70-2 (HSPA1B), HSP70-Hom (HSPA1L) a tři sady primerů pro syntézu referenčních tzv. „housekeeping“ genů ( $\beta$ 2-m -  $\beta$ 2-microglobulin, UBC - ubiquitin, TBP - tata box binding protein), které jsme použili k normalizaci dat. „Housekeeping“ geny jsou vždy exprimovány pod konstitutivními promotory tzn., že jejich exprese je za všech podmínek stejná a nebývá ničím ovlivňována. Celkový objem reakční směsi a objemové zastoupení jednotlivých reagensů je uvedený v příloze viz tabulka A- 7. Pro kontrolu kvality pipetování jsme každý vzorek analyzovali paralelně (dvakrát). Pro kontrolu čistoty práce jsme do několika jamek napipetovali místo vzorku pouze vodu a tak získali negativní kontrolu, která nám umožnila ověřit si kvalitu a čistotu namíchaných směsí. Nakonec jsme destičku překryli adhezivní průhlednou folií, krátce ji zcentrifugovali a umístili do cykleru 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, USA), který byl napojen na počítač a ovládán příslušným softwarem SDS 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Real Time PCR reakce proběhla v režimu uvedeném v příloze, viz tabulka A - 8.

### **3.2.7 Statistická analýza**

Ke statistickému hodnocení dat jsme použili programy MS Excel (Windows) a GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, inc., La Jolla, USA)

#### **3.2.7.1 Statistická analýza DNA**

Četnost jednotlivých genotypů pro všechny námi sledované mutace jsme porovnali s teoreticky očekávanými četnostmi genotypů pro ideální (tj. panmiktickou) populaci.

Shodu získaných genotypových četností jsme porovnávali s teoretickými četnostmi genotypů prostřednictvím chí-kvadrát testu. Za signifikantní jsme považovali hladinu významnosti 5 % ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.7.2 Statistická analýza RNA

K ověření normality rozložení testovaných dat jsme použili tři testy: KS-normality test, D'Agostino a Pearsonův test a Shapiro-Wilkův test. K potvrzení významných rozdílů středních hodnot delta Ct teplotou indukovaných a neindukovaných stanovení, tj. ověření indukovatelnosti studovaných genů, jsme použili párový t-test. Testovali jsme nejen gen a jeho SNPs či ins/del (z-test) ale i vztah SNPs a ins/del a dvou dalších studovaných genů, v nichž se konkrétní SNPs a studovaná inserce/delece nenachází (t-test). Srovnávání míry genové exprese genu v závislosti na genotypech (v rámci každého SNPs a studované inserce/delece) jsme testovali Wilcoxonovým mediánovým testem **pro hodnocení míry polohy** tzv. z-testem porovnáním středních hodnot delta Ct HS - delta nHS na 5 % hladině významnosti ( $p < 0,05$ ). Tímto testem jsme testovali, zda má konkrétní genotyp v rámci jedné SNPs odlišný vliv na expresi daného genu ve srovnání se dvěma zbývajících genotypy. Jednou z podmínek z-testu je na začátku zjistit rozptyly hodnot námi porovnávaných souborů, čímž se současně **posouzuje statistická variabilita (rozptýlenost)** sledovaných hodnot (Havránek, 1993) v našem případě hodnot delta Ct po indukci teplotním šokem pro každou sledovanou skupinu (tj. genotyp v rámci každého SNPs či inserce/delece pro skupinu „heat shockem“ ovlivněných i neovlivněných stanovení). K tomuto stanovení jsme použili dvou-výběrový F-test v programu MS-Excel.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 DNA analýza

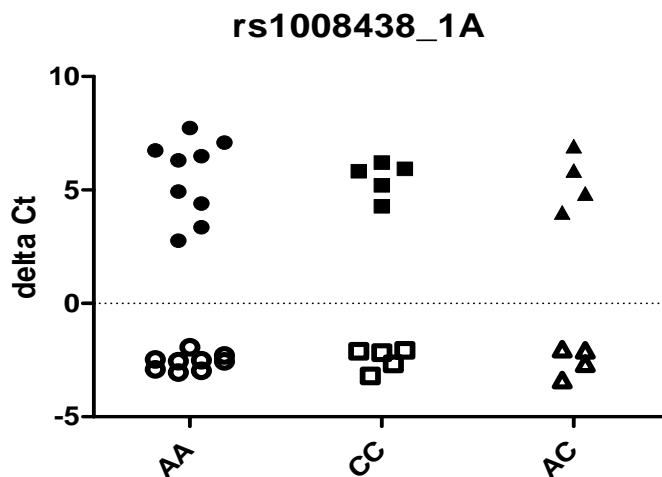
Vypočtené hodnoty chí-kvadrát testu při hodnocení genotypů byly nižší než kritická hodnota na hladině 5% ( $\chi^2_{df=1, \alpha=0,05} = 3,84$ ), viz příloha tabulka A - 18, což znamená, že zjištěné četnosti genotypů ve studovaném souboru se neliší od teoreticky očekávaných četností v ideální populaci nacházející se v Hardy-Weinbergově rovnováze. Nejistili jsme tedy statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel studovaných polymorfismů. Toto zjištění platí pro všechny studované polymorfismy.

### 4.2 RNA analýza

#### 4.2.1 Závislost regulace genové exprese HSP70 genu na jeho polymorfismech

##### 4.2.1.1 Vliv polymorfismů ležících v HSP70-1 genu na expresi genu HSP70-1

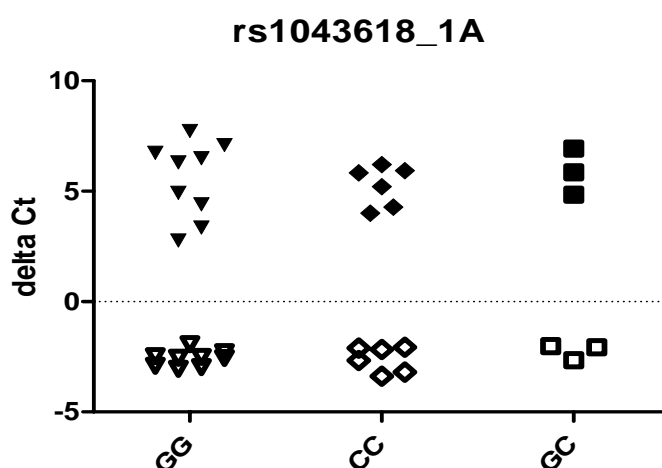
Míru regulace genové exprese HSP70-1 genu v závislosti na polymorfismech bodové mutace -110A/C (**rs1008438**) jsme testovali na genotypch AA, CC, AC, které v testovaném souboru nebyly zastoupeny stejnou měrou (AA devětkrát, CC pětkrát, AC čtyřikrát). Z grafu 4 - 1 je patrné, že u všech tří genotypů je významný rozdíl v expresi genu před a po vystavení buněk teplotnímu šoku.



**Graf 4 – 1** Závislost míry genové exprese **HSP70-1 (HSPA1A) genu** na genotypch bodové mutace **rs1008438** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovaná (plné symboly) a neindukovaná stanovení. Hodnota delta Ct je hodnota exprese studovaného genu (HSPA70-1) a je normalizována dle hodnoty exprese housekeeping genu.

Svědčí o tom i párový t-test, který potvrdil statisticky významný rozdíl mezi expresí buněk vystavených a nevystavených teplotnímu šoku. Pro všechna tři srovnání byly p-value hodnoty menší než 0,05 ( $p = 0,0001$  pro AA;  $p = 0,0001$  pro CC;  $p = 0,0009$  pro AC). Tabulka A - 10 v příloze obsahuje hodnoty delta Ct, z nichž vycházejí další statistické analýzy. Po vystavení buněk teplotnímu šoku mohou být jednotlivé polymorfismy příčinou významné variability exprese genu. Srovnávání míry genové exprese genu v závislosti na genotypu jsme testovali z-testem. Jednou z podmínek z-testu je na začátku zjistit rozptyly hodnot námi porovnávaných souborů. Rozptýlenost (variabilitu) výše zmíněných hodnot delta Ct po indukci teplotním šokem v závislosti na jednotlivých genotypu bodových mutací jsme zjistili F-testem. F-testem jsme nepotvrdili rozdílnou variabilitu srovnávaných hodnot a p-value hodnoty po řadě činily:  $p = 0,35$  pro HS\_AA vs. HS\_AC;  $p = 0,17$  pro HS\_AA vs. HS\_CC;  $p = 0,33$  pro HS\_AC vs. HS\_CC. Získané hodnoty rozptylů jsme použili ve výše zmíněném z-testu, kterým jsme nepotvrdili statisticky významné rozdíly ve vlivu jednotlivých genotypů bodové mutace rs1008438 na regulaci genové exprese HSP70-1 genu, viz příloha tabulka A – 16 a tabulka A - 17.

Míru regulace genové exprese **HSP70-1 genu** jsme dále testovali ve vztahu k bodové mutaci **+190GC (rs1043618)**. Genotypy GG, CC, GC nebyly v testovaném souboru zastoupeny stejnoměrně (GG devětkrát, CC šestkrát, GC třikrát). Z grafu 4 – 2 je zřetelné, že u všech tří genotypů sledované bodové mutace existuje významný rozdíl v expresi genu před a po indukci teplotním šokem.

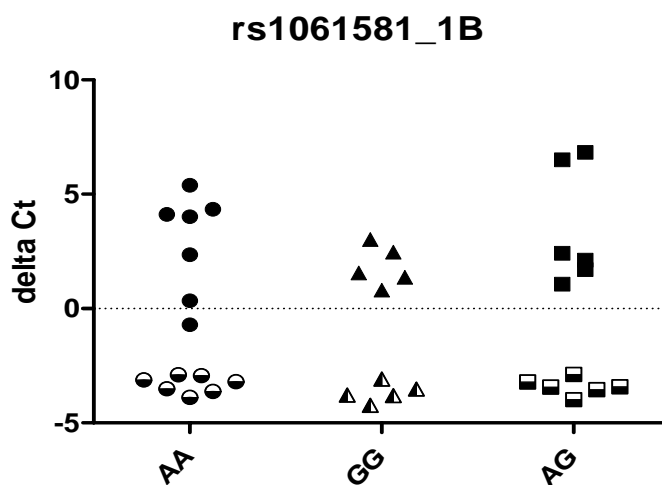


**Graf 4 – 2** Závislost míry genové exprese **HSP70-1 (HSPA1A) genu** na genotypu bodové mutace **rs1043618** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovanou (plné symboly) a neindukovanou stanovení. Hodnota delta Ct je hodnota exprese studovaného genu (HSPA70-1) a je normalizována dle hodnoty exprese housekeeping genu.

Vypovídají o tom i p-value hodnoty párového t-testu, které byly pro všechna tři porovnání menší než 0,05 ( $p = 0,0001$  u GG;  $p = 0,0001$  u CC;  $p = 0,0092$  u GC). Tabulka A - 11 v příloze obsahuje výsledky měření, z nichž vycházejí další statistické výpočty. F-testem jsme nepotvrdili rozdílnou variabilitu (rozptýlenost) srovnávaných hodnot delta Ct ( $p$ -value hodnoty činily:  $p = 0,51$  pro HS\_GG vs. HS\_GC;  $p = 0,11$  pro HS\_GG vs. HS\_CC;  $p = 0,18$  pro HS\_GC vs. HS\_CC). Z-testem jsme, stejně tak jako u předchozího polymorfismu v rámci téhož genu, nepotvrdili statisticky významné rozdíly ve vlivu jednotlivých genotypů bodové mutace rs1043618 na regulaci genové exprese HSP70-1 genu (viz příloha tabulka A – 16 a tabulka A - 17).

#### 4.2.1.2 Vliv polymorfismů ležících v HSP70-2 genu na expresi genu HSP70-2

U genu HSP70-2 jsme ověřovali míru regulace genové exprese v závislosti na třech mutacích. U bodové mutace +1267A/G (rs1061581) nebyly v testovaném souboru jednotlivé genotypy zastoupeny stejnoměrně (AA sedmkrát, GG pětkrát, AG šestkrát). Z grafu 4 - 3 vyplývá, že u všech tří genotypů bodové mutace existuje statisticky významný rozdíl v expresi genu před a po vystavení buněk teplotnímu šoku.

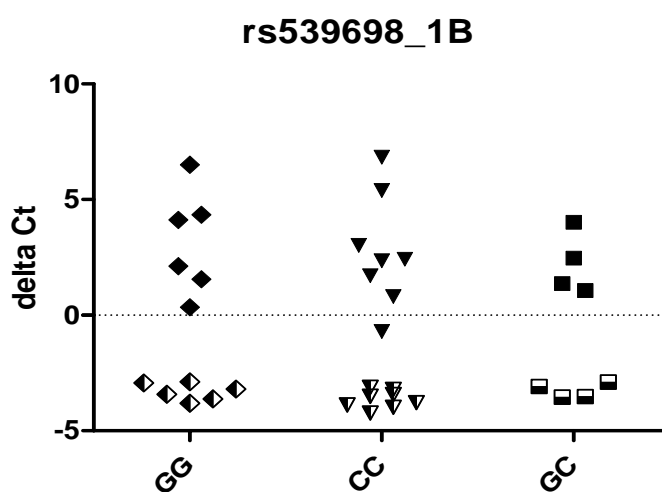


**Graf 4 - 3** Závislost míry genové exprese **HSP70-2 (HSPA1B)** genu na genotypech bodové mutace **rs1061581** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovaná (plné symboly) a neindukovaná stanovení. Hodnota delta Ct je hodnota exprese studovaného genu (HSPA70-2) a je normalizována dle hodnoty exprese housekeeping genu.

Také p-value hodnoty párového t-testu byly pro všechny tři polymorfismy menší než 0,05 ( $p = 0,0003$  pro AA;  $p = 0,0003$  pro GG;  $p = 0,0013$  pro AG). V příloze, viz tabulka A- 12,

jsou shrnuty výsledky měření, z nichž vycházejí další statistické výpočty. Použitím F-testu jsme nepotvrdili rozdílnou variabilitu (rozptýlenost) srovnávaných hodnot delta Ct a p-value hodnoty činily:  $p = 0,34$  pro HS\_AA vs. HS\_AG;  $p = 0,09$  pro HS\_AA vs. HS\_GG;  $p = 0,51$  pro HS\_GG vs. HS\_AG. Z-testem jsme neprokázali významné rozdíly v míře genové exprese HSP70-2 genu v závislosti na genotypech bodové mutace rs1061581, viz příloha tabulka A – 16 a tabulka A - 17.

U druhé bodové mutace genu HSP70-2 +2074G/C (**rs539689**) byl v testovaném souboru genotyp GG zastoupen šestkrát, genotyp CC osmkrát a genotyp GC čtyřikrát. Z grafu 4 - 4 je patrné, že u genotypů sledované bodové mutace existuje významný rozdíl v expresi genu před a po indukci genu teplotním šokem.

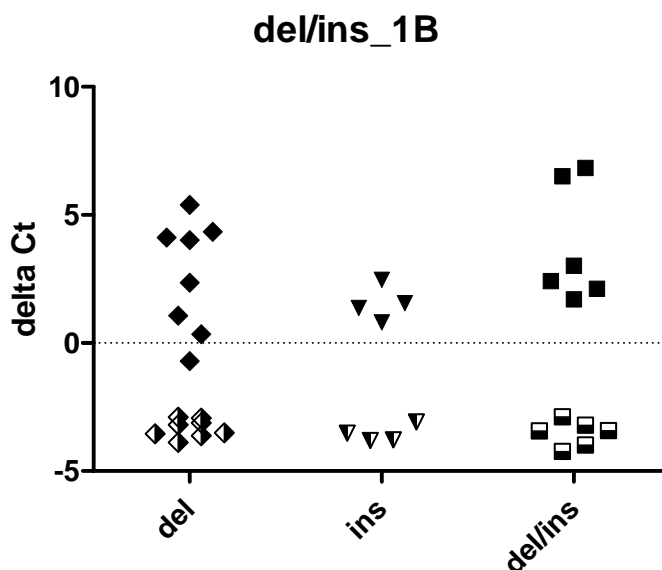


**Graf 4 - 4** Závislost míry genové exprese **HSP70-2 (HSPA1B)** genu na genotypech bodové mutace **rs539689** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovaná (plné symboly) a neindukovaná stanovení. Hodnota delta Ct je hodnota exprese studovaného genu (HSPA70-2) a je normalizována dle hodnoty exprese housekeeping genu.

Statisticky významný rozdíl před a po indukci genu teplotním šokem ve vztahu ke všem genotypům potvrdil jasně párový t-test s p-value hodnotami menšími než 0,05 ( $p = 0,0006$  pro GG;  $p = 0,0002$  pro CC;  $p = 0,0017$  pro GC). Tabulka A - 13 v příloze obsahuje výsledky měření, z nichž vycházejí další statistické výpočty. F-testem jsme nepotvrdili významné rozdíly v rozptýlenosti (variabilitě) srovnávaných hodnot delta Ct po indukci teplotním šokem v závislosti na jednotlivých genotypech bodových mutací. P-value hodnoty činily:  $p = 0,14$  pro HS\_GG vs. HS\_GC;  $p = 0,36$  pro HS\_GG vs. HS\_CC;  $p = 0,09$  pro HS\_CC vs. HS\_GC. Také pro bodovou mutaci rs539689 jsme z-testem

nepotvrdili statisticky významné rozdíly v míře genové exprese v závislosti na genotypě, viz příloha tabulka A – 16 a tabulka A - 17.

U genu HSP70-2 jsme se kromě předchozích dvou bodových mutací ještě zabývali delecí/insercí nukleotidového úseku AAGTT (**rs9281590**) a vlivem jejich genotypů (del/del, del/ins, ins/ins) na regulaci exprese genu. V testovaném souboru nebyly jednotlivé genotypy zastoupeny stejnoměrně (del/del osmkrát, ins/ins čtyřikrát, del/ins šestkrát). Z grafu 4 – 5 je zřejmé, že u všech tří genotypů této mutace existuje významný rozdíl v expresi genu před a po indukci genu teplotním šokem.

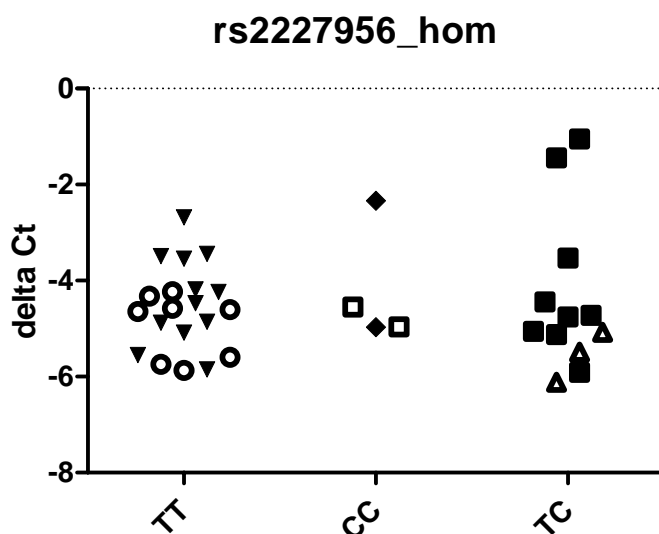


**Graf 4 - 5** Závislost míry genové exprese **HSP70-2 (HSPA1B)** genu na genotypěch mutace **rs9281590** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovaná (plné symboly) a neindukovaná stanovení. Hodnota delta Ct je hodnota exprese studovaného genu (HSPA70-2) a je normalizována dle hodnoty exprese housekeeping genu.

Vypovídají o tom p-value hodnoty párového t-testu, které byly menší než 0,05 ( $p = 0,0001$  u del/del;  $p = 0,0002$  u ins/ins;  $p = 0,0006$  u del/ins). Tabulka A - 14 v příloze obsahuje výsledky měření, z nichž vycházejí další statistické výpočty. Aplikováním F-testu jsme pro dvě srovnání potvrdili významné rozdíly v rozptýlenosti (variabilitě) srovnávaných hodnot delta Ct po indukci teplotním šokem v závislosti na jednotlivých genotypěch bodových mutací. P-value hodnoty činily:  $p = 0,37$  pro HS\_del/del vs. HS\_del/ins;  $p = 0,013$  pro HS\_del/del vs. HS\_ins/ins;  $p = 0,009$  pro HS\_ins/ins vs. HS\_del/ins. Z-testem jsme potvrdili statisticky významné rozdíly v expresi genu s genotypy ins/ins a del/ins ( $p = 0,013$ ), viz příloha tabulka A – 16 a tabulka A - 17.

#### 4.2.1.3 Vliv polymorfismu ležícího v HSP70-Hom genu na expresi genu HSP70-Hom

Míru regulace genové exprese HSP70-Hom genu v závislosti na polymorfismech bodové mutace +2437T/C (**rs2227956**) jsme testovali na souboru 18ti kontrol, ve kterém nebyly jednotlivé genotypy zastoupeny stejnou měrou (TT desetkrát, CC dvakrát, TC šestkrát). Z grafu 4 - 6 a ze zjištěných p-value hodnot pro genotypy TT ( $p = 0,0043$ ) a CC ( $p = 0,0227$ ) vyplývá statisticky významný rozdíl v expresi genu před a po jeho indukci teplotním šokem. U genotypu CC jsme pro jeho nízké zastoupení v souboru nemohli p-value hodnotu stanovit.



**Graf 4 - 6** Závislost míry genové exprese **HSP70-Hom (HSPA1L)** genu na genotypech bodové mutace **rs2227956** vyjádřené hodnotami delta Ct pro indukovaná (plné symboly) a neindukovaná stanovení. Hodnota delta Ct je hodnota exprese studovaného genu (HSPA70-Hom) a je normalizována dle hodnoty exprese housekeeping genu.

Tabulka A - 15 v příloze obsahuje výsledky měření, z nichž vycházejí další statistické výpočty pro bodovou mutaci rs2227956. Prostřednictvím F-testu jsme nepotvrdili rozdílnou variabilitu (rozptýlenost) srovnávaných hodnot delta Ct po indukci teplotním šokem pro každou sledovanou skupinu (tj. genotyp v rámci SNP). P-value hodnoty činily:  $p = 0,06$  pro HS\_TT vs. HS\_TC;  $p = 0,096$  pro HS\_TT vs. HS\_CC;  $p = 0,35$  pro HS\_CC vs. HS\_TC. Z-test nepotvrdil žádné významné rozdíly v míře genové exprese v závislosti na genotypech, viz příloha tabulka A - 16 a tabulka A - 17.

#### 4.2.2 Závislost regulace genové exprese HSP70 genu na polymorfismech okolních genů

##### 4.2.2.1 Vliv polymorfismů ležících mimo gen HSP70-1 na expresi genu HSP70-1

Statisticky významnou souvislost jsme zjistili mezi všemi námi studovanými genotypy bodových mutací dvou zbývajících genů a expresí HSP70-1 genu. Jednalo se o genotypy AA, AG, GG bodové mutace rs1061581 genu HSP70-2, genotypy GG, GC, CC bodové mutace rs539689 genu HSP70-2, genotypy del/del, del/ins, ins/ins delece/inserce nukleotidového úseku AAGTT (rs9281590) genu HSP70-2, a genotypy TT, CC bodové mutace rs2227956 genu HSP-Hom. P value hodnoty vyjadřující významnou či nevýznamnou asociaci mezi těmito polymorfismy a mírou exprese genu jsme zjistili párovým t-testem a zaznamenali je do tabulky 4 - 1 a spojitost je zobrazena v grafech, viz příloha graf B - 1, graf B - 2, graf B - 3.

Mutace genu	genotyp	p-value hodnota
+1267A/G (rs1061581)	AA	0,0001
	AG	0,0001
	GG	0,0001
+2074G/C (rs539689)	GG	0,0001
	GC	0,0002
	CC	0,0001
delece/inserce (rs9281590)	del/del	0,0001
	del/ins	0,0001
	ins/ins	0,0007
+2437T/C (rs2227956)	TT	0,0001
	TC	0,0001
	CC	NA *

**Tabulka 4 - 1** Asociace mezi polymorfismy a zvýšenou regulací exprese HSP70-1 genu  
pozn. \* pro malý počet genotypu v souboru bylo nemožné určit p-value hodnotu

##### 4.2.2.2 Vliv polymorfismů ležících mimo gen HSP70-2 na expresi genu HSP70-2

Statisticky významnou souvislost jsme zjistili mezi zvýšenou regulací genové exprese HSP70-2 genu a genotypy AA, AC, CC bodové mutace rs1008438 genu HSP70-1, genotypy GG, CC bodové mutace rs1043618 genu HSP70-1, a genotypy TT, TC bodové mutace rs2227956 genu HSP70-Hom. P value hodnoty vyjadřující významnou či nevýznamnou asociaci mezi těmito polymorfismy a mírou exprese genu jsme zjistili párovým t-testem a zaznamenali je do tabulky 4 - 2 a spojitost je zobrazena v grafech, viz příloha graf B - 4, graf B - 5.

mutace	genotyp	p-value hodnota
-110A/C (rs1008438)	AA	0,0001
	AC	0,0155
	CC	0,0001
+190G/C (rs1043618)	GG	0,0001
	GC	0,0592
	CC	0,0001
+2437T/C (rs2227956)	TT	0,0001
	TC	0,0009
	CC	NA *

**Tabulka 4 - 2** Asociace mezi polymorfismy a zvýšenou regulací exprese HSP70-2 genu  
pozn. \* pro malý počet genotypu v souboru bylo nemožné určit p-value hodnotu

#### 4.2.2.3 Vliv polymorfismů ležících mimo gen HSP70-Hom na expresi genu HSP70-Hom

Statisticky významnou souvislost jsme zjistili mezi zvýšenou regulací genové exprese HSP70-Hom genu a genotypy AA, CC bodové mutace rs1008438 genu HSP70-1, genotypu GG bodové mutace rs1043618 genu HSP70-1, genotypy AA, GG bodové mutace rs1061581 genu HSP70-2, genotypu CC bodové mutace rs539689 genu HSP70-2, genotypy del/del, ins/ins pětínukleotidové mutace genu HSP70-2. P value hodnoty vyjadřující významnou či nevýznamnou asociaci mezi těmito polymorfismy a mírou exprese genu jsme zjistili párovým t-testem a zaznamenali je do tabulky 4 - 3 a spojitost je zobrazena v grafech, viz příloha graf B - 6, graf B - 7, graf B - 8.

mutace	genotyp	p-value hodnota
-110A/C (rs1008438)	AA	0,0004
	AC	0,3561
	CC	0,0122
+190G/C (rs1043618)	GG	0,004
	GC	0,2746
	CC	0,0667
+1267A/G (rs1061581)	AA	0,0064
	AG	0,1358
	GG	0,0122
+2074G/C (rs539689)	GG	0,0540
	GC	0,0653
	CC	0,0229
delece/inserce (rs9281590)	del/del	0,0059
	del/ins	0,1025
	ins/ins	0,0402

**Tabulka 4 - 3** Asociace mezi polymorfismy a zvýšenou regulací exprese HSP70-Hom genu

## 5 DISKUZE

Přestože jsou geny rodiny HSP70 evolučně nejkonzervovanější, byla u nich nalezena a popsána řada mutací. Z mnoha známých mutací HSP70 genů jsme se zabývali mutacemi: -110A/C (rs1008438), +190G/C (rs10436198), +12676A/G (rs1061581), +2074G/C (rs539689), delece/inserce nukleotidového úseku AAGTT (rs9281590) a +2437T/C (rs2227956). Mutace jsme vybrali na základě několika studií v různých populacích v nichž byly studovány vztahy mutací a přítomnosti konkrétního onemocnění. Tyto studie naznačují, že polymorfismy mohou ovlivňovat míru exprese HSP70 genů. Kvůli vazebné nerovnováze však nelze s jistotou říci, zda za tímto ovlivněním regulace genové exprese stojí přímo pouze samotné polymorfismy v jednotlivých genech. Otázka uplatnění vybraných mutací při regulaci exprese HSP70 genů zůstává tedy doposud neobjasněna. My jsme se snažili přispět k objasnění této otázky.

Ačkoliv jsme pracovali s malým souborem, tak genotypové četnosti všech šesti vybraných polymorfismů se nelišili od teoreticky očekávaných četností v ideální (panmiktické) populaci nacházející se v Hardy-Weinbergově rovnováze. To obvykle svědčí o správném výběru souboru. Četnosti pozorovaných a teoreticky očekávaných genotypů jsme porovnávali prostřednictvím chí-kvadrát testu neboli testu dobré shody. Test dobré shody testuje shodu očekávaných a skutečných četností v částech oboru možných hodnot. Částmi oboru možných hodnot se v tomto konkrétním případě mají na mysli jednotlivé pozorované genotypy. Jeho síla tedy závisí na vhodném rozdělení tohoto oboru na části. Čím více částí, tím je test přesnější, ale na druhou stranu je nutné zachovat pro všechny části alespoň minimální požadovanou očekávanou četnost 5 %. Námi zjištěné hodnoty chí-kvadrát testu byly nižší než tabulková hodnota ( $\chi^2_{df=1, \alpha=0,05} = 3,84$ ) tzn., že zjištěné četnosti genotypů ve studovaném souboru se neliší od teoreticky očekávaných četností v ideální populaci nacházející se v Hardy-Weinbergově rovnováze. Musíme ale dodat, že chí-kvadrát test je “nespolehlivý“ v případě, kdy pracujeme s nedostatečně nebo extrémně velikým souborem. Za takové okolnosti můžeme dojít k mylnému závěru, že četnost pozorovaných genotypů, se významně neliší od četnosti očekávaných genotypů.

Geny proteinů teplotního šoku HSP70-1 (HSPA1A) a HSP70-2 (HSPA1B) jsou buněčným stresem indukovatelné a po indukci se liší v míře genové exprese (Wu et al., 1985). Některé literární zdroje uvádí, že gen HSP70-Hom nepatří mezi geny indukovatelné (Milner and Campbell, 1990; Ito et al., 1998). V této diplomové práci jsme ověřovali indukovatelnost těchto genů v kontrolovaných laboratorních podmínkách, přesněji řečeno

jsme zjišťovali, jak se změní míra exprese po indukci těchto genů teplotním šokem. V experimentálních podmínkách jsme úspěšně indukovali zvýšení genové exprese HSP70-1 (HSPA1A) a HSP70-2 (HSPA1B) genů. Zjistili jsme, že podmínky teplotního šoku indukují i expresi genu HSP70-Hom (HSPA1L). Ačkoliv je exprese genu HSP70-Hom po indukci teplotním šokem statisticky významně zvýšena, tak je v absolutní hodnotě (úroveň exprese odráží úroveň delta Ct) natolik nízká, že z biologického hlediska není relevantní.

Ověřovali jsme, zda i mutace lokalizované v jednom genu ovlivňují míru exprese druhého genu, v němž se dané mutace nenalézají. V tomto případě jsme zjistili statisticky významné souvislosti mezi zvýšenou regulací exprese daných genů a téměř všemi námi studovanými genotypy mutací, jenž se v daných genech nenachází (viz výsledky nebo závěr). Výsledky této studie jsou podpořeny i jinými studiemi (např. Li et al., 2009), v nichž byly popsány a potvrzeny silné interakce např. mezi polymorfismy -110A/C genu HSP70-1 a +1267A/G genu HSP70-2 nebo polymorfismy +2074G/C genu HSP70-2 a +2437T/C genu HSP70-Hom. Lze to vysvětlit tím, že strukturně vysoce homologní geny HSP70-1 (HSPA1A) a HSP70-2 (HSPA1B) jsou tandemově upořádané v 14kb oblasti na chromozómu 6p21.3. K nim rovněž homologní gen HSP70-Hom je situován opačným směrem cca 4kb „upstream“ od HSP70-1 genu. Geny jsou lokalizovány blízko vedle sebe a je mezi nimi silná vazba.

Zjišťovali jsme, zda konkrétní genotyp v rámci jedné mutace má či nemá odlišný vliv na míru exprese daného genu ve srovnání se dvěma zbývajících genotypy. Statisticky významné rozdíly v míře genové exprese HSP70-1 genu v závislosti na polymorfismech rs1008438 a rs1043618 jsme neprokázali. Z některých jiných studií však vyplývá, že na míru regulace genové exprese HSP70-1 genu mají vliv právě tyto bodové mutace: -110A/C (rs1008438) ležící v promotorové oblasti a +190G/C (rs1043618), která je lokalizována v nekódující oblasti genu. Obě oblasti genu jsou jak konstitutivní, tak stresem indukovatelné. Bodová mutace -110A/C konkrétně leží 3bp „upstream“ od HSE, který je nezbytný pro indukci HSP70-1 genu (Milner and Campbell, 1992). Bylo rovněž prokázáno, že bodová mutace -110A/C leží v oblasti pěti po sobě jdoucích regulačních elementů, na které se váží regulační proteiny – transkripční faktory (Abravaya et al., 1991). Záměna A za C dle literatury ovlivňuje vznik superhelikální konformace v amplifikované dvoušroubovici DNA (Cascino et al., 1993) a bylo zjištěno, že frekvence alely C je vyšší u pacientů s coeliakií (Ramos-Arroyo et al., 1993). Tato skutečnost naznačuje, že bodová

mutace -110A/C možná ovlivňuje regulaci exprese HSP70-1 genu. Jistá studie (Wu et al., 2004) to i potvrzuje a poukazuje na to, že alela -110A může být asociována s vyšší transkripční aktivitou genu než která by nastala za přítomnosti alely -110C alely jak před tak po teplotním šoku. To je v rozporu s jinou studií (Favatier et al., 1999), která prokázala, že bodová mutace -110A/C nemá vliv na vazbu transkripčních faktorů na HSE a tím i na syntézu HSP70. Již zmiňovaná studie (Wu et al., 2004) dále neprokázala žádný významný rozdíl v transkripční aktivitě v okamžiku, kdy je přítomna +190G alela resp. +190C alela v bodové mutaci +190A/C. To je opět v rozporu s jinou studií (He et al., 2009), která prokázala, že přítomnost alely +190C v 5'UTR oblasti genu HSP70-1 vede ke snížení aktivity promotoru a pravděpodobně snížení syntézy HSP70. Za rozdílnými výsledky studií stojí silná vazebná nerovnováha alel v této oblasti a není teda zcela jasné, zda za rozdílnou transkripční aktivitu jsou zodpovědné přímo jednotlivé bodové mutace daného genu nebo je to způsobeno vztahem mezi bodovými mutacemi v rámci genu anebo zda za rozdílnou transkripční aktivitu jsou odpovědné interakce s jiným genem MHC systému.

V rámci stresem indukovatelného HSP70-2 genu jsme se zabývali mutacemi: +1267A/G (rs1061581), +2074G/C (rs539689) a pětínukleotidovou delecí/insercí (rs9281590). Prvně dvě jmenované jsou mutace se synonymním efektem („silent“ mutace) nalézající se v kódující oblasti genu. V úvodu jsme se zmínili, že „silent“ mutace nebývají často neutrální, neboť mohou významně ovlivnit regulaci exprese daného genu (Flégr, 2009). V našem případě se ale tyto bodové mutace zdají být skutečně neutrální, protože jsme v závislosti na jejich genotypu nezjistili žádný vliv na míru exprese genu HSP70-2. Dva z genotypů (ins/ins, del/ins) pětínukleotidové delece/inserce (rs9281590), jejíž výskyt je spjat s pozicí +2046 v 3'-UTR nepřekládané oblasti genu HSP70-2, statisticky významně ovlivnily míru regulace genové exprese HSP70-2.

U genu HSP70-Hom jsme se zabývali bodovou mutací +2437T/C, která je přítomna v kódující oblasti. Tato bodová mutace vede k záměně aminokyselin na pozici 493, kdy je nepolární, hydrofobní, kyselý methionin nahrazen polárním, neutrálním threoninem (Milner and Campbell, 1992) a to by mohlo mít vliv míru regulace tohoto genu. Pozice aminokyseliny 493 je lokalizována v peptidové vazebné doméně  $\beta$ -skládaného listu (Pociot et al., 1993). A to by mohlo mít vliv na chaperonovou aktivitu a funkční účinnost HSP70-Hom, konkrétně na snížení hydrofobní interakce mezi chaperonem a cílovým proteinem (Ross et al., 2003). Dalo by se tedy očekávat, že tento

fakt bude mít vliv na míru regulace exprese genu HSP70-Hom v závislosti na genotypech bodové mutace. Tuto skutečnost jsme ale nepotvrdili.

Vzhledem k tomu, že v naší studii provedené na zdravých jedincích jsme vliv genotypů v rámci genu na inducibilitu exprese ve většině případů nepotvrdili, vyvozujeme z toho domněnku, že inducibilita exprese HSP70 genů bude závislá nejenom na polymorfismech soustředěných v HSP70 genech, nýbrž na polymorfismech soustředěných také v okolí těchto genů. Tyto polymorfismy vytvářejí haplotyp MHC a tento může mít schopnost ovlivnit inducibilitu HSP70 genů. Jako důležitý regulační mechanismus exprese zde může sehrávat roli také mechanismus epigenetické regulace exprese. V této souvislosti existuje stále vrůstající množství důkazů, že při regulaci genové transkripce se významně uplatňuje methylace DNA a histonové modifikace. Sekvence genů HSP70 i celého MHC jsou vysoce polymorfní a mimo jiné se v nich nalézají dinukleotidové páry CpG, jejichž množství se od člověka k člověku liší. Dinukleotidové páry CpG jsou seskupeny do shluků označovaných jako CpG ostrůvky, které se např. nalézají v blízkosti promotoru. Větší množství CpG ostrůvků předznamenává zvýšenou metylaci, při které je pátý uhlík pyrimidinového kruhu cytosinu enzymaticky methylován na 5-methylcytosin. 5-methylcytosin ovlivňuje strukturu molekuly DNA (Tahiliani, 2009), zejména navázáním specifických proteinů v oblasti promotoru, což je obvykle spojeno s inaktivací cílové sekvence. Pod pojmem histonová modifikace se skrývá např. acetylace/deacetylace lysinu (Roth et al., 2001), fosforylace/defosforylace serinu (Clayton and Mahadevan, 2003), methylace lysinu a argininu (Zhang and Reinberg, 2001), a ubiquitinace lysinu (Berger, 2002). Acetylace znamená připojení acetylové skupiny k určitým aminokyselinám histonových proteinů. Deacetylace je odstranění acetylové skupiny. Acetylací lysinů v histonech dochází k eliminaci jejich pozitivního náboje a v důsledku toho dochází k rozvolnění těsné interakce DNA-histon. Díky tomuto rozvolnění mají transkripční faktory snadnější přístup ke genům v acetylované oblasti a tudíž tak může být zahájena transkripce těchto genů. Deacetylace vede k utlumení transkripční aktivity. Vede k vytváření transkripčně neaktivního heterochromatinu. NH<sub>2</sub>-skupina lysinu má basický charakter, a proto se lysiny mohou vázat s negativně nabitými fosfáty DNA. Iontovou vazbou se DNA v oblasti lysinů těsně váže k histonům a tím dojde k zamezení transkripce. K zesílení útlumu transkripční aktivity dále dochází i za přítomnosti proteinů, které se mohou vázat k methylovaným CpG. Tyto proteiny stimulují enzymy pro histonovou deacetylaci a poskytují tak mechanismus při kterém může spolupracovat DNA methylace a

histonová deacetylase na potlačení transkripce. Těmito epigenetickými mechanismy jsme se v této studii nezabývali a jejich vliv na míru regulace genové exprese HSP70 genů je předmětem dalších studií probíhajících na RÚ.

## 6 ZÁVĚR

Proteiny teplotního šoku se významně uplatňují při fyziologických procesech, v imunitní odpovědi, ale i při etiopatogenezi autoimunitních chorob. Úloha vybraných polymorfismů jedné posunové a pěti bodových mutací při genové expresi HSP70 genů není stále zcela objasněna. A touto prací jsme se snažili přispět k objasnění této problematiky.

V předložené diplomové práci, která je pilotní studií, jsme zjišťovali, zda jsme v experimentálních podmínkách schopni teplotním šokem indukovat zvýšenou genovou expresi HSP70 genů (HSP70-1/HSPA1A, HSP70-2/HSPA1B a HSP70-Hom/HSPA1L) v mononukleárních buňkách periferní žilní krve. Následně jsme zjišťovali, zda míra genové exprese HSP70 genů je ovlivněna šesti vybranými genetickými polymorfismy (rs1008438, rs1043618, rs1061581, rs539689, rs9281590 a rs2227956) lokalizovanými v těchto genech. Abychom jsme se mohli zabývat těmito úkoly, provedli jsme nejprve genotypizaci tří HSP70 genů v souboru 59 zdravých jedinců se zaměřením na těchto šest výše zmiňovaných genetických polymorfismů, což bylo také jedním z cílů.

Cílem genotypizace bylo vyselektovat z výše uvedeného souboru jedince, kteří byli homozygotní alespoň v jedné ze sledovaných bodových mutací. Původně jsme inducibilitu genové exprese HSP70 genů chtěli porovnávat pouze mezi jedinci s homozygotními variacemi polymorfismů, ale nakonec jsme inducibilitu exprese porovnávali i mezi jedinci s homozygotními a heterozygotními variacemi polymorfismů.

Zjistili jsme, že v laboratorních podmínkách jsme schopni úspěšně teplotním šokem indukovat zvýšení genové exprese HSP70 genů a potvrdili jsme, že geny HSP70-1 (HSPA1A) a HSP70-2 (HSPA1B) patří mezi indukovatelné geny. Teplotním šokem jsme indukovali i expresi genu HSP70-Hom (HSPA1L), který je podle literatury genem s konstitutivní expresí, tedy teplotním šokem neindukovatelným. Zvýšení regulace genové exprese u tohoto genu bylo sice statisticky významné, ale při porovnání s úrovněmi genové exprese předchozích dvou genů bylo jen nepatrné a z biologického hlediska bezvýznamné.

Předpokládali jsme, že polymorfismy v rámci svých HSP70 genů mohou mít vliv na inducibilitu genové exprese daného genu. Předpoklad, že genotyp v rámci jedné mutace by mohl mít odlišný vliv na inducibilitu exprese genu v porovnání se dvěma zbývajících genotypy, jsme neprokázali s výjimkou polymorfismu rs9281590 (tj. delece/inserce nukleotidového úseku AAGTT) ležícího v HSP70-2 genu.

Předpokládali jsme, že genotypy mutace lokalizované v jednom studovaném HSP70 genu mohou mít vliv na inducibilitu exprese zbývajících dvou námi studovaných HSP70 genů. Prokázali jsme, že inducibilita exprese HSP70-1 genu je ovlivňována jednak dvěma ze tří genotypů (TT a TC) bodové mutace rs2227956 lokalizované v kódující oblasti genu HSP70-Hom a dále pak, že je rovněž ovlivňována každým ze třech genotypů bodových mutací rs1061581, rs539689, rs9281590 ležících v HSP70-2 genu. Prokázali jsme, že inducibilita exprese HSP70-2 genu je také ovlivňována dvěma ze tří genotypů (TT a TC) bodové mutace rs2227956 lokalizované v genu HSP70-Hom a dále pak, že je ovlivňována každým ze tří genotypů (AA, AC, CC) bodové mutace rs1008438 a dvěma ze tří genotypů (GG, GC) bodové mutace rs1043618. Bodové mutace rs1008438 a rs1043618 jsou lokalizovány v HSP70-1 genu, první z nich leží v promotorové oblasti genu a druhá z nich v 5'UTR nepřekládané oblasti genu. Prokázali jsme, že za nepatrně zvýšenou inducibilitou exprese genu HSP70-Hom stojí některé polymorfismy v genech HSP70-1 a HSP70-2. U HSP70-1 genu se konkrétně jedná o genotypy AA, CC bodové mutace rs1008438 a o genotyp GG bodové mutace rs1043618. U HSP70-2 genu se konkrétně jedná o genotypy AA, GG bodové mutace 1061581, o genotyp CC bodové mutace rs539689 a genotypy del/del, ins/ins mutace rs9281590.

Ze zjištěných skutečností vyplývá, že inducibilita exprese HSP70-1 genu, HSP70-2 genu a HSP70-Hom genu je závislá na polymorfismech soustředěných v okolí těchto genů. Proto by se mohlo zdát, že polymorfismy v rámci výše zmiňovaných genů nemají vliv na inducibilitu vlastní genové exprese. Nemusí tomu ale tak být. Silná vazba mezi genovými lokusy MHC je příčinou toho, že tyto polymorfismy jsou součástí haplotypu MHC a konkrétní spolupůsobení polymorfismu lokalizovaného v genu s polymorfismem soustředěným v okolí genu může ovlivnit inducibilitu genové exprese. Vzhledem k vysokému stupni polymorfismu MHC může být inducibilita exprese HSP70 genů ovlivňována i epigenetickými mechanismy. Těmito epigenetickými mechanismy jsme se v diplomové práci nezabývali. Navíc je třeba připomenout, že jsme se zabývali pouze inducibilitou exprese HSP70 genů zdravých kontrol. Proto je opodstatněné, aby navazující studie na tuto diplomovou práci byly provedeny i u pacientů se systémovými autoimunitními chorobami a zabývala se i vlivem epigenetických mechanismů na inducibilitu genové exprese HSP70 genů.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S.: Cellular and molecular immunology. W. B. Saunders Company, 1997.

Abravaya, K.; Philips, B.; Morimoto, R. I.: Heat shock-induced interactions of heat shock transcription factors and the human hsp70 promoter examined by in vivo footprinting. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 586-592.

Abravaya, K.; Myers, M. P.; Murphy, S. P.; Morimoto, R. I.: The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes Dev* 1992; 6: 1153–1164.

Basu, S.; Binder, R. J.; Suto, R.; Anderson, K. M.; Srivastava, P. K.: Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000; 12: 1539-1516.

Beere, H. M.; Wolf, B. B.; Cain, K.; Mosser, D. D.; Mahboubi, A.; Kuwana, T.; Taylor, P.; Morimoto, R. I.; Cohen, G. M.; Green, D. R.: Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000, 2: 469–75.

Benjamin, I. J., McMillan, D. R.: Stress (heat shock) proteins. Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998; 83: 117-32.

Berger, S. L.: Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 142-148.

Bertelsen, E. B.; Zhou, H.; Lowry, D. F.; Flynn, G. C.; Dahlquist, F. W.: Topology and dynamics of the 10 kDa C-terminal domain of DnaK in solution. *Protein Sci* 1999; 8: 343-54.

Buc M.: *Imunológia*, 1.vyd., Veda, Bratislava 2001. ISBN: 80-224-0667-8.

Bukau, B.; Horwich, A. L.: The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998, 92: 351-366.

Campbell, N. A.; Reece, J. B.; *Biologie*, 1.vyd., Computer Press, Brno 2008. ISBN 80-251-1178-4.

Cascino, I.; Sorrentino, R.; Tosi, R.: Strong genetic association between HLA-DR3 and a polymorphic variation in the regulatory region of the HSP70-1 gene. *Immunogenetics* 1993; 37: 177-182.

Clarimón, J.; Bertranpetit, J.; Boada, M.: HSP70-2 (HSPA1B) is associated with noncognitive symptoms in late-onset Alzheimer's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2003; 16: 146-150.

Clayton, A. L.; Mahadevan, L. C.: MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS* 2003; 546: 51-58.

Creswell, P., Ackerman, A. L.; Giodini, A.; Peaper, D. R.; Wearsch, P. A.: Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* 2005, 207: 145-147.

Curie, R. W.; Tanguay, R. M.; Kingma, J. G. Jr: Heat shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation* 1993; 87: 963-971.

Demand, J.; Luders, J.; Hohfeld, J.: The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2023-2028.

Dressel, R.; Günther, E.: A pentanucleotide tandem duplication polymorphism in the 3' untranslated region of the HLA-linked heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) gene. *Human Genet* 1994. 94: 585-586.

Favatier, F.; Jacquier - Sarlin, M. R.; Swierczewski, E.; Polla, B. S.: Polymorphism in the regulatory sequence of the human hsp70-1 gene does not affect heat shock factor binding or heat shock protein synthesis. *Cell Mol life Sci* 1999; 56: 701-708.

Flégr, J.: *Evoluční biologie*, 2.vyd., Academia, Praha 2009. ISBN 978-80-200-1767-3.

Flohe, S. B.; Bruggeman, J.; Lendemans, S.; Nikulina, M.; Meierhoff, G.; Flohe, S. et al.: Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol* 2003; 170: 2340-8.

- Freeman, B. C.; Myers, M. P.; Schumacher, R.; Morimoto, R. I.: Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J* 1995; 14: 2281-2292.
- Gastpar, R.; Gross, C.; Rossbacher, L.; Ellwart, J.; Riegger, J.; Multhoff, G.: The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells. *J Immunol* 2004; 172: 972–80.
- Geraghty D. E.; Beck, S.; Inoko, H.; Rowen, L.: Complete sequence and gene map of human major histocompatibility complex. *Nature* 1999; 401: 921-923.
- Goate, A. M.; Cooper, D. N.; Hall, C.; Leung, T. K. C.; Salomon, E.; Lim, L.: Localization of a human heat-shock Hsp70 gene sequence to chromosome-6 and detection of 2 other loci by somatic-cell hybrid and restriction-fragment-length-polymorphism analysis. *Human Genet* 1987; 75: 123-128.
- Granja, C.; Moliterno, R. A.; Ferreira, M. S.; Fonseca, J. A.; Kalil, J.; Coelho, V.: T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. *Hum Immunol* 2004; 65: 124-34.
- Günther, E.; Walter, L.: Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia* 1994; 50: 987-1001.
- Hansen, T. H.; Carreno, B. M.; Sachs, D. H.: The major histocompatibility complex, in *Fundamental immunology*, edited by Paul WE, New York, Raven Press 1993; 577-628.
- Hartl, F. U.: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381: 571-9.
- Havránek, T.: *Statistika pro biologické a lékařské vědy*. Academia, Praha 1993. ISBN 80-200-0080-1.
- He, M.; Guo, H.; Yang, X.; Zhang, X.; Zhou, L. et al.: Functional SNPs in HSPA1A Gene predict Risk of Coronary Heart Disease. *PLoS ONE* 2009; 4(3): e4851.
- Helmbrecht, K.; Zeise, E.; Rensing, L.: Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 2000; 33: 341-65.

- Hickman-Miller, H.; Hildebrand, W. H.: The immune response under stress: the role of Hsp-derived peptides. *Trends in Immunology* 2004; 25: 427-33.
- Hořejší, V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*, 4.vyd., Triton, Praha 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.
- Ito, Y.; Ando, H; Ando, J.; Saijoh, Y.; Inoko, H.; Fujimoto, H.: Genomic structure of the spermatid-specific hsp70 homolog gene located in the class III region of the major histocompatibility complex of mouse and man. *J Biochem* 1998; 124: 347-353.
- Jarjour, W.; Reed, A. M.; Gauthier, J.: The 8.5-kb PstI Allele of the stress protein gene, HSP70-2: an independent risk factor for systemic lupus erythematosus in African Americans? *Hum Immunol* 1996; 45: 59-63.
- Jiang, J.; Prasad, K.; Lafer, E. M.; Sousa, R.: Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol Cell* 2005; 20: 513-524.
- Khan, M. A.; Kellner H.: Immunogenetics of spondyloarthropathies. *Neum Dis Clin North Am* 1992; 18: 837-64.
- Klein, J.: *Natural history of the major Histocompatibility Komplex*. New York : Wiley, 1986.
- Lamb, D. J.; El-Sankary, W.; Ferns, G. A. A.: Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis* 2002;167: 177-85.
- Latchman, D. S.: Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 637-46.
- Li, J.-X.; Tang, B.-P.; Sun, H.-P.; Feng, M.; Cheng, Z.-H.; Niu, W.-Q.: Interacting contribution of the five polymorphisms in three genes of Hsp70 family to Essential hypertension in Uyghur ethnicity. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14: 355-362.
- Lie, B. A.; Thorsby, E.: Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Current Opinion in Immunology* 2005; 17: 526-31.
- Lindquist, S., Craig, E. A.: The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22:631-37.

Mcgrath, L. B.; Locke, M.: Myocardial self-preservation: absence of heat shock factor activation and heat shock proteins 70 mRNA accumulation in the human heart during cardiac surgery. *J Card Surg* 1995; 10: 400-6.

Milner, C.; Campbell, R. D.: Structure and expression of the three MHC-linked Hsp70 genes. *Immunogenetics* 1990; 32: 242-51.

Milner, C. M.; Campbell, R. D.: Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1992; 36: 357-362.

Multhoff, G.; Mizzen, L.; Winchester, C. C.; Milner, C. M.; Wenk, S.; Eissner, G.; Kampinga, H. H.; Laumbacher, B.; Johnson, J.: Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol* 1999; 27: 627–36.

Nussbaum, R. I.; McInnes, R. R.; Willard, H. F.: *Klinická genetika*, 6.vyd., Triton, Praha 2004. ISBN 80-7254-475-6.

Nikolich – Žugich, J.; Fremont, D. H.; Miley, M. J.; Messaudi, I.: The role of mhc polymorphism in anti-microbial resistance. *Microbec Infect.* 2004, 6, 5, s. 501-512.

Otting, N.; Heijmans, C. M.; Noort, R.C.; De Groot, N. G.; Doxiadis, G. G.; Van Rood, J. J.; Watkins, D. I.; Bontrop, R. E. Unparalleled complexity of the MHC class I region in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102, 5, 1626-1631.

Pierce, S. K.; DeNagel, D. C.; VanBuskirk, A. M.: A role for heat shock proteins in antigen processing and presentation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991; 167: 83-92.

Pociot, F.; Ronningen K. S.; Nerup, J.: Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-hom genes in in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J immunol* 1993; 38: 491-5.

Ramachandran, S.; Bell, R. B.: Heat shock protein 70 gene polymorphisms and multiple sclerosis. *Tissue antigens* 1995; 46: 140-1.

Ramos-Arroyo, M. A.; Feijoo, E.; Sanchez - Valverde, F.; Aranburu, E.; Irissari, N.; Olivera, J. E.; Valiente, A.: Heat-shock protein 70-1 and HLA class II gene polymorphisms associated with celiac disease susceptibility in Navarra (Spain). *Hum Immunol* 2001; 62: 821-825.

- Rock, K. L.: Exiting the outside world for cross presentation. *Immunity* 2006; 25: 523-25.
- Radons, J.; Multhoff, G.: Immunostimulatory functions of membranebound and exported heat shock protein 70. *Exerc Immunol Rev* 2005; 11: 17-33.
- Ross, O. A.; Curran, M. D.; Crum, K. A.; Rea, I. M.; Barnett, Y. A.; Middleton, D.: Increased frequency of the 2437T Allele of the heat shock protein 70-Hom gene in an aged Irish population. *Exp Gerontol* 2003; 38: 561-565.
- Roth, S. Y.; Denu, J. M.; Allis, C. D.: Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 81 – 120.
- Sargent, C. A.; Dunham, I.; Trowsdale, J.; Campbell, R. D.: Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1968-72.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T.: *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harb. Lab. Press, USA, 1989, vols. 1-3.
- Shankarkumar, U.: The human leukocyte antigen (HLA) system. *Int J Hum Genet*. 2004; 4: 91-103.
- Schmid, D.; Münz, C.: Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12: 1519-27.
- Srivastava, P. K.: Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 185–94.
- Stastny P.: Association of B cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978; 298: 869-71.
- Suzuki, K.; Sawa, Y.; Kagisaki, K.; Takenati, S.; Ichikawa, H.: Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat heat shock protein 70. *Basic Res Cardiol* 2000; 95: 397-403.
- Tavaria, M.; Gabriele, T.; Kola, I.; Anderson, R. L.: A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1: 23-8.

Tahiliani, M.: Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET 1. *Science* 2009; 324: 930-935.

Udono, H.; Ichiyanagi, T.; Mizukami, S., Imai, T.: Heat shock protein in antigen trafficking – Implications on antigen presentation to T cells. *Intrnational Journal of Hyperthermia* 2009; 1-9.

Wang, T. F.; Chang, J.; Wang, C.: Identification of the peptide binding domain of Hsc70. *J Biol Chem* 1993; 268: 26049-26051.

Weigl, E.; Kopeček, P.; Raška, M.; Hradilová, Š.: Heat shock proteins in immune reactions. *Folia Microbiologica* 1999; 44: 561-6.

Wu, B.; Hunt, C.; Morimoto, R.: Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein Hsp70. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 330-341.

Wu, Y. R.; Wang, C. K.; Chen, C. M.: Analysis of heat-shock protein 70 gene polymorphisms and risk of Parkinson's disease. *Hum Genet* 2004; 114: 236-241.

Zhang, Y.; Reinberg, D.: Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001; 15: 2343-2360.

## 8 PŘÍLOHA A - TABULKY

**Tabulka A - 1** Přehled reagensií a jejich koncentrací na přípravu reakční směsi PCR

reagencie	objem (μl)	koncentrace
ddH <sub>2</sub> O	N x 7	
PPP mix	N x 10	
5' primer	N x 1	10 μM
3' primer	N x 1	10 μM
„N“ počet PCR reakcí		

**Tabulka A - 2** Teplotní program PCR63 resp. PCR65

1 cyklus	predenaturace	95 °C	5 min
35 cyklů	denaturace	95 °C	30 s
	annealing	63 °C resp. 65 °C	30 s
	extenze	72 °C	30 s
1 cyklus	terminální extenze	72 °C	5 min
	konec programu	4 °C	∞

**Tabulka A - 3** Teplotní program sekvenční reakce

denaturace – 95 °C	10 s	25 x
annealing – 50 °C	5 s	
extenze – 60 °C	4 min	
konec programu – 10 °C	∞	

**Tabulka A - 4** Teplotní program Reverse Transcriptase PCR

1. krok	denaturace	70 °C	5 min
2. krok	reverzní transkripce	37 °C	75 min
3. krok	inaktivace transkriptázy	85 °C	5 min
4. krok	konec programu	14 °C	∞

**Tabulka A - 5** Postup při analýze integrity celkové RNA

1) Vybereme všechny reagensie pro přípravu separačního gelu, necháme stát 30 minut. V průběhu tohoto času vyčistíme elektrody přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer.
A/ Do čistícího čipu napipetujeme 350 $\mu$ l RNase free vody, do druhého čipu napipetujeme 350 $\mu$ l RNase Zap.
B/ Otevřeme víko přístroje, vložíme čistící chip s RNase Zap, zavřeme víko a necháme stát 4 minuty.
C/ Otevřeme víko přístroje, vyjmeme čistící chip s RNase Zap, vložíme čistící chip s vodou, zavřeme víko a necháme stát 4 minuty.
D/ Otevřeme víko přístroje, vyjmeme čistící chip s vodou a necháme oschnout 5 minut
2) Vzorky určené pro analýzu integrity naředíme na koncentraci 100-200 ng/ $\mu$ l a 3 $\mu$ l této RNA a ladder denaturujeme v termobloku při 70°C po dobu 2 minut. Po denuraci uchováváme na ledu až do použití.
3) Příprava separačního gelu
A/ Napipetujeme 550 $\mu$ l RNA Nano gel (červené víčko) do epp.zkumavky s filtrem
B/ Stočíme při 1500g/10min/RT (přefiltrovaný gel se nesmí používat déle než 4 týdny)
C/ 65 $\mu$ l přefiltrovaného gelu napipetujeme do eppendorfy o 0,5ml
4) Příprava barvičky do gelu (pozor barvička je citlivá na světlo)
A) Zvortexujeme barvičku RNA Nano dye(modré víčko) a krátce stočíme „Pulse Spin“
B/ K 65 $\mu$ l gelu přidáme 1 $\mu$ l barvičky a zvortexujeme
C/ Stočíme na centrifuze 13000g/10min/RT
D/ Připravený gel neskladujeme a ještě týž den ho spotřebujeme.
5) Příprava Priming station (PS), test těsnosti
A/ Základnu PS nastavíme do polohy C a aretační páčka pro stříkačku je v nejvyšší poloze
B/ Nepoužitý RNA 6000 Nano Chip vložíme do PS
C/ Píst dávkovací stříkačky na PS natáhneme na objem 1ml a uzavřeme PS.
D/ Zatlačíme píst až do zacvaknutí za aretační páčku, počkáme 10s a píst uvolníme.
E/ Počkáme 5s a píst by se měl vysunout na objem 0,7-0,8 ml. Pokud se tak nestane, je nutné použít novou dávkovací
F/ Píst opatrně pomalu vytáhneme zpátky na objem 1ml.
6) Nanášení do gelu
A/ Do jamky označené „G“ v černém kroužku napipetujeme 9 $\mu$ l gelu smíchaného s barvičkou
B/ Píst dávkovací stříkačky na PS natáhneme na objem 1ml a uzavřeme PS
C/ Píst zatlačíme až do zacvaknutí za aretační páčku, počkáme 30s a píst uvolníme.
D/ Počkáme 5s.
E/ Píst pomalu opatrně vytáhneme zpátky na objem 1ml.
F/ Otevřeme PS a napipetujeme 9 $\mu$ l gelu do ostatních dvou jamek označených „G“. Zbytek gelu vyhodíme.
7) Příprava a pipetování RNA 6000 Nano marker(zelené víčko)
A/ 5 $\mu$ l markeru napipetujeme do všech 12 jamek určených pro vzorky a také do jamky označené žebříčkem.
8) Příprava a pipetování vzorků a markeru molekulární hmotnosti(ladder)
A/ 1 $\mu$ l ladderu napipetujeme do jamky označené žebříčkem
B/ Napipetujeme 1 $\mu$ l vzorku do každé z 12 jamek pro ně určené. Musíme mít 12 vz.
9) Příprava čipu
A/ Chip zvortexujeme po dobu 1 minuty a vložíme do Agilent 2100 Bioanalyzeru

**Tabulka A - 6** Přehled reagensií a jejich koncentrací používaných na přípravu reakční směsi Reverse Transcriptase PCR

reagencie	objem( $\mu$ l)	koncentrace
5 x RT Buffer	N x 5	
dNTP	N x 2	10 mM
DTT	N x 1	0,1M
RNasin Plus	N x 1	40 u/ $\mu$ l
M – MLV RT	N x 1	200 u/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	N x 4	
„N“ počet PCR reakcí		

**Tabulka A - 7** Přehled reagensií používaných na přípravu reakční směsi do Real Time PCR

reagencie	objem na reakci( $\mu$ l)	koncentrace
Syber GREEN	12,5 x 2N	
Primer mix	2 x 2N	5pmol (každý primer)
H <sub>2</sub> O	9,5 x 2N	
cDNA	1 x 2N	10 ng/ $\mu$ l
„2N“ počet reakcí		

**Tabulka A - 8** Teplotní program Real-Time PCR

1 cyklus	úvodní zahřátí reakční směsi	50 °C	2 min
1 cyklus	úvodní denaturace	95 °C	10 min
45 cyklů	denaturace	95 °C	15 s
	annealing primerů + syntéza PCR	60 °C	1 min
1 cyklus	postupná denaturace produktu PCR za účelem zjištění teploty tání T <sub>m</sub> PCR produktů – tvorba „dissociation curve“	95 °C	15 s
		60 °C	15 s

**Tabulka A - 9** Sekvence primerů pro qRT PCR

Gen	Primer sequence 5' - 3'
HSPA1A	F: GCTGTTTTTGTGTTTGGAGCTTCA R: TTCAACATTGCAAACACAGGAAA
HSPA1B	F: GGCCTTTGTTCTTTAGTATGTTTGTCT R: AGCTGAAGCAGAAATGACATAGGA
HSPA1L	F: GAATCTAAGTTACCATCCGGAAA R: AACAGGATGTGAGGGAGTGTGA
$\beta$ 2-M	F: GAGCAGGTTGCTCCACAGGT R: CAAGCTTTGAGTGCAAGAGATTGA
UBC	F: TTGGTCCTGCGCTTGAGG R: GGAATGCAACAACCTTTATTGAAAGGA
TBP	F: TGTTTTTCCCATGAACCACA R: CCTGCAATACTGGAGAGGTGGA

**Tabulka A - 10** delta Ct hodnoty genové exprese HSP70-1 genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na bodové mutaci rs1008438.

číslo vzorku	bodová mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
2419	rs1008438_AA	3,536	-3,0447
3226	rs1008438_AA	4,9295	-2,5124
3236	rs1008438_AA	7,7361	-1,9361
3574	rs1008438_AA	6,4992	-2,4695
4093	rs1008438_AA	4,4102	-2,9633
4160	rs1008438_AA	6,3070	-2,9043
4204	rs1008438_AA	6,7468	-2,5401
4205	rs1008438_AA	7,0998	-2,2969
4418	rs1008438_AA	2,7678	-2,5622
4151	rs1008438_AC	4,8434	-2,0637
4170	rs1008438_AC	5,8562	-2,0211
4196	rs1008438_AC	6,9362	-2,6578
4225	rs1008438_AC	4,0118	-3,3754
4227	rs1008438_CC	5,9333	-2,1105
4174	rs1008438_CC	4,2864	-2,1694
3230	rs1008438_CC	6,2050	-2,0644
4422	rs1008438_CC	5,8370	-3,1909
4425	rs1008438_CC	5,2035	-2,6645

**Tabulka A - 11** delta Ct hodnoty genové exprese HSP70-1 genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na bodové mutaci rs1043618.

číslo vzorku	bodová mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
4227	rs1043618_CC	5,9333	-2,1105
4225	rs1043618_CC	4,0118	-3,3754
4174	rs1043618_CC	4,2864	-2,1694
3230	rs1043618_CC	6,2050	-2,0644
4422	rs1043618_CC	5,8370	-3,1909
4425	rs1043618_CC	5,2035	-2,6645
4151	rs1043618_CG	4,8434	-2,0637
4170	rs1043618_CG	5,8562	-2,0211
4196	rs1043618_CG	6,9362	-2,6578
4205	rs1043618_GG	7,0998	-2,2969
4204	rs1043618_GG	6,7468	-2,5401
4160	rs1043618_GG	6,3070	-2,9043
4093	rs1043618_GG	4,4102	-2,9633
3574	rs1043618_GG	6,4992	-2,4695
3236	rs1043618_GG	7,7361	-1,9361
3226	rs1043618_GG	4,9295	-2,5124
2419	rs1043618_GG	3,3536	-3,0447
4418	rs1043618_GG	2,7678	-2,5622

**Tabulka A - 12** delta Ct hodnoty genové exprese HSP70-2 genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na bodové mutaci rs1061581.

číslo vzorku	bodová mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
4205	rs1061581_AA	4,1231	-2,9359
4204	rs1061581_AA	4,3410	-3,6174
4160	rs1061581_AA	4,0196	-2,8932
3236	rs1061581_AA	5,3911	-3,1206
3226	rs1061581_AA	2,3619	-3,8873
2419	rs1061581_AA	0,3456	-3,1968
4418	rs1061581_AA	-0,7051	-35042
3574	rs1061581_AG	6,5074	-2,8870
4093	rs1061581_AG	1,0745	-3,5429
4151	rs1061581_AG	2,4217	-3,4270
4170	rs1061581_AG	1,7016	-3,2082
4196	rs1061581_AG	6,8255	-3,9865
4225	rs1061581_AG	2,1195	-3,4187
4227	rs1061581_GG	2,4637	-3,0804
4174	rs1061581_GG	0,8067	-3,7761
3230	rs1061581_GG	3,0248	-4,2357
4422	rs1061581_GG	1,5505	-3,8056
4425	rs1061581_GG	1,3673	-3,5222

**Tabulka A - 13** delta Ct hodnoty genové exprese HSP70-2 genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na bodové mutaci rs539689.

číslo vzorku	bodová mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
4196	rs539689_CC	6,8255	-3,9865
4174	rs539689_CC	0,8067	-3,7761
4170	rs539689_CC	1,7016	-3,2082
4151	rs539689_CC	2,4217	-3,4270
3236	rs539689_CC	5,3911	-3,1206
3230	rs539689_CC	3,0248	-4,2357
3226	rs539689_CC	2,3619	-3,8873
4418	rs539689_CC	-0,7051	-3,5042
4093	rs539689_GC	1,0745	-3,5429
4160	rs539689_GC	4,0196	-2,8932
4227	rs539689_GC	2,4637	-3,0804
4425	rs539689_GC	1,3673	-3,5222
4225	rs539689_GG	2,1195	-3,4187
4205	rs539689_GG	4,1231	-2,9359
4204	rs539689_GG	4,3410	-3,6174
3574	rs539689_GG	6,5074	-2,8870
2419	rs539689_GG	0,3456	-3,1968
4422	rs539689_GG	1,5505	-3,8056

**Tabulka A - 14** delta Ct hodnoty exprese HSP70-2 genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na genotypch pětínukleotidové mutace (rs9281590)

číslo vzorku	mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
4205	del/del	4,1231	-2,9359
4204	del/del	4,3410	-3,6174
4160	del/del	4,0196	-2,8932
4093	del/del	1,0745	-3,5429
3236	del/del	5,3911	-3,1206
3226	del/del	2,3619	-3,8873
2419	del/del	0,3456	-3,1968
4418	del/del	-0,7051	-3,5042
4225	del/ins	2,1195	-3,4187
4196	del/ins	6,8255	-3,9865
4170	del/ins	1,7016	-3,2082
4151	del/ins	2,4217	-3,4270
3574	del/ins	6,5074	-2,8870
3230	del/ins	3,0248	-4,2357
4227	ins/ins	2,4637	-3,0804
4174	ins/ins	0,8067	-3,7761
4422	ins/ins	1,5505	-3,8056
4425	ins/ins	1,3673	-3,5222

**Tabulka A - 15** delta Ct hodnoty genové exprese HSP70-Hom genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na bodové mutaci rs2227956

číslo vzorku	bodová mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
3236	rs2227956_CC	-2,3384	-4,5480
4418	rs2227956_CC	-4,9722	-4,9620
4093	rs2227956_CT	-4,7206	-5,0770
4170	rs2227956_CT	-5,1265	-5,4879
4160	rs2227956_CT	-3,5320	-6,1180
4196	rs2227956_CT	-1,4420	-5,0547
3574	rs2227956_CT	-1,0507	-4,789
3226	rs2227956_CT	-4,434	-5,9087
4227	rs2227956_TT	-4,4676	-5,8715
4225	rs2227956_TT	-4,8793	-4,2295
4205	rs2227956_TT	-3,5429	-5,5940
4204	rs2227956_TT	-2,6801	-4,3246
4174	rs2227956_TT	-4,1852	-4,6053
4151	rs2227956_TT	-5,0834	-5,7466
3230	rs2227956_TT	-3,4923	-4,5744
2419	rs2227956_TT	-4,2360	-4,6418
4422	rs2227956_TT	-3,4442	-5,5508
4425	rs2227956_TT	-4,8558	-5,8523

**Tabulka A - 16** Střední hodnoty delta Ct\_HS – delta Ct\_nHS míry genové exprese v závislosti na konkrétní bodové mutaci

mutace	genotyp	medián $\Delta Ct_{HS} - \Delta Ct_{nHS}$
-110A/C (rs1008438)	AA	8,1199
	AC	7,9414
	CC	7,9330
+190G/C (rs1043618)	GG	8,1199
	GC	8,1261
	CC	7,8420
1267A/G (rs1061581)	AA	6,1475
	AG	6,8534
	GG	5,5266
2074G/C (rs539689)	GG	6,4748
	GC	5,4909
	CC	6,3717
delece/inserce (rs928190)	del/del	5,9563
	del/ins	7,2939
	ins/ins	5,0931
2437T/C (rs2227956)	TT	1,0124
	TC	2,0150
	CC	1,0997

**Tabulka A – 17** P-value hodnoty z-testu charakterizující rozdíly genové exprese v závislosti na genotypech

gen	mutace	porovnávané genotypy	p-value
HSP70-1	rs1008438	AA vs. AC	0,41
		AA vs. CC	0,40
		CC vs. AC	0,50
	rs1043618	CC vs. GC	0,37
		CC vs. GG	0,33
		GG vs. GC	0,50
HSP70-2	rs1061581	AA vs. AG	0,30
		AA vs. GG	0,26
		GG vs. AG	0,13
	rs539689	CC vs. GC	0,19
		CC vs. GG	0,47
		GG vs. GC	0,16
	rs928190	del/ del vs. del/ins	0,13
		del/del vs. ins/ins	0,13
		ins/ins vs. del/ins	0,013
HSP70-Hom	rs2227956	CC vs. CT	0,24
		CC vs. TT	0,47
		TT vs. CT	0,07

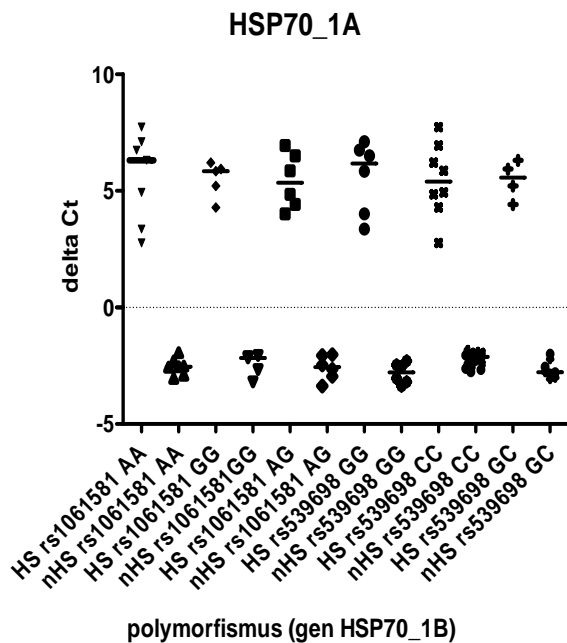
**Tabulka A - 18  $\chi^2$  test**

mutace	genotyp	n	%	$\chi^2$
-110A/C (rs1008438)	AA	23	38,98	0,701
	AC	30	50,85	
	CC	6	10,17	
+190G/C (rs1043618)	GG	22	37,29	0,103
	GC	29	49,15	
	CC	8	13,56	
1267A/G (rs1061581)	AA	20	33,90	1,158
	AG	32	54,24	
	GG	7	11,86	
2074G/C (rs539689)	GG	18	30,51	0,114
	GC	28	47,46	
	CC	13	22,03	
delece/inserce (rs928190)	del/del	25	42,37	1,596
	del/ins	30	50,85	
	ins/ins	4	6,78	
2437T/C (rs2227956)	TT	40	67,80	0,014
	TC	17	28,81	
	CC	2	3,39	

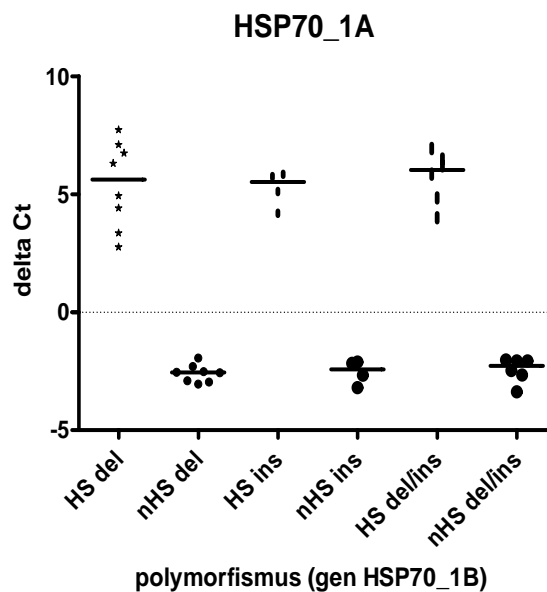
## 9 PŘÍLOHA B - GRAFY

Graf B - 1, Graf B - 2, Graf B - 3 zobrazuje spojitost mezi mírou regulace genové exprese HSP70-1 genu a polymorfismy rs1061581, rs539698, pětínukleotidovou mutací (rs9281590) a rs2227956.

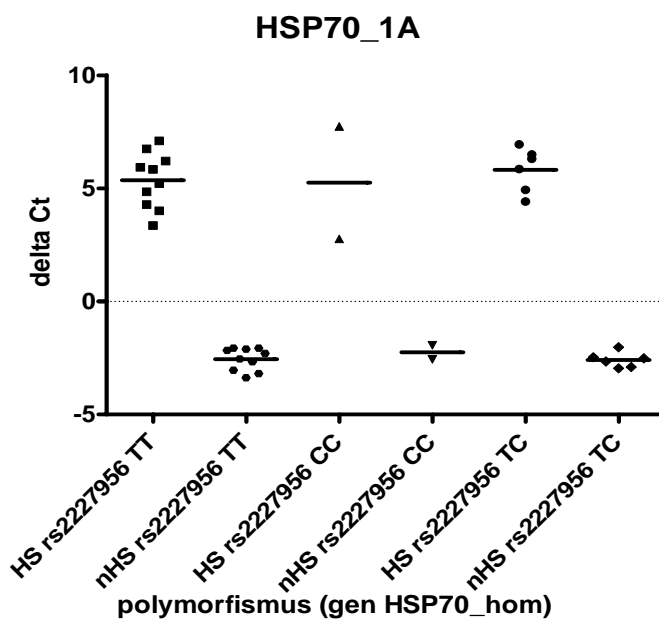
Graf B - 1



Graf B - 2

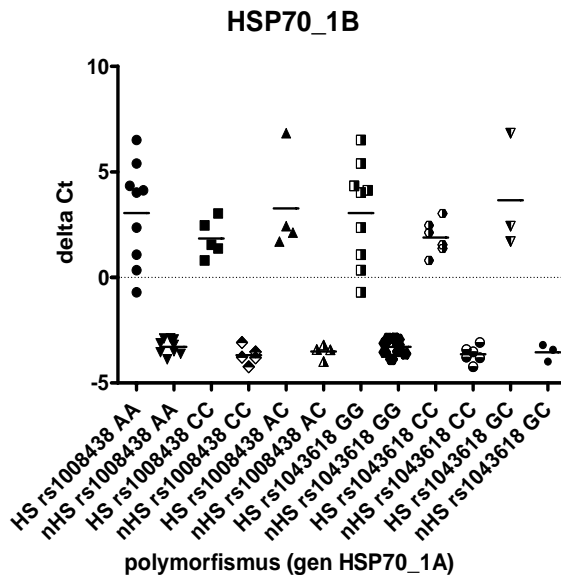


Graf B - 3

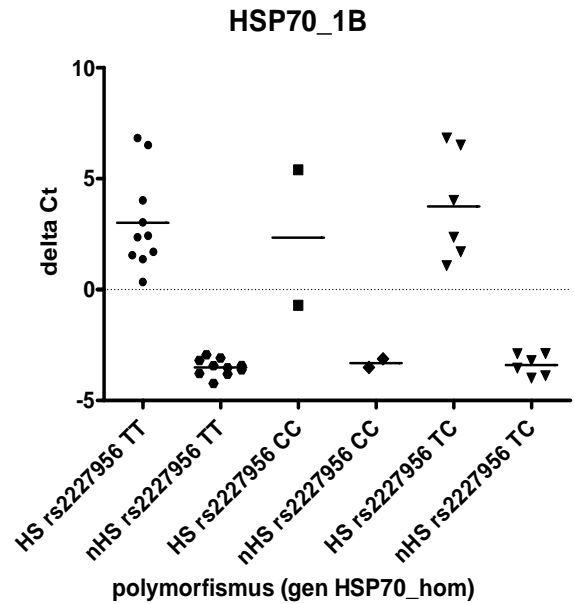


**Graf B - 4, Graf B - 5** zobrazuje spojitost mezi mírou regulace genové exprese HSP70-2 genu a polymorfismy rs1008438, rs1043618 a rs2227956.

**Graf B - 4**

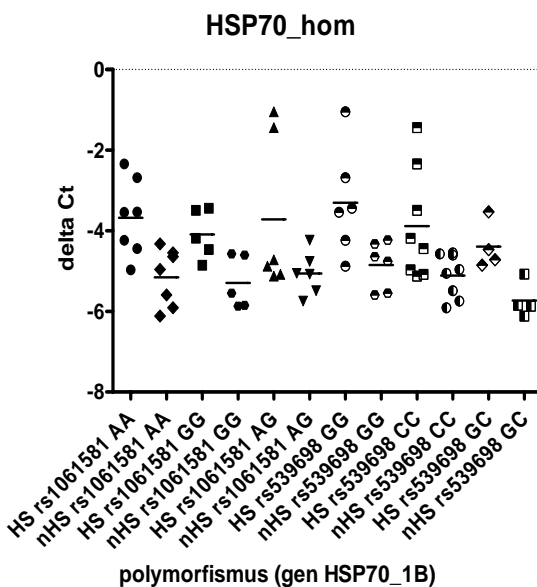


**Graf B - 5**

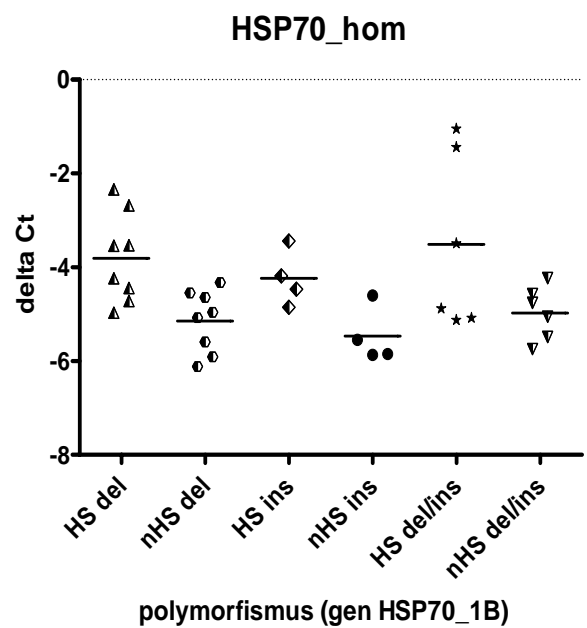


**Graf B - 6, Graf B - 7** zobrazuje spojitost mezi mírou regulace genové exprese HSP70-Hom genu a polymorfismy rs1061581, rs539689, pětínukleotidovou mutací (rs9281590), rs1008438 a rs1043618

**Graf B - 6**



**Graf B - 7**



**Graf B – 8** zobrazuje spojitost mezi mírou regulace genové exprese HSP70-Hom genu a polymorfismy rs1061581, rs539689, pětinkleotidovou mutací (rs9281590), rs1008438 a rs1043618

