

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**VRODENÁ HEMOCHROMATÓZA – VÝZNAM
MOLEKULÁRNO BIOLOGICKÉHO VYŠETŘENIA
MUTÁCIE S65C V GÉNE HFE**

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: Doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Bc. Daniela Putzová

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

„Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v ZOZNAME POUŽITEJ LITERATÚRY a v práci riadne citované. Táto diplomová práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 4.5.2011

.....
Bc. Daniela Putzová

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa chcela pod'akovať hlavne pánovi Doc. PharmDr. Martinovi Beránkovi, Ph.D. z Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky Fakultnej nemocnice v Hradci Králové za odborné vedenie, užitočné pripomienky, rady, trpezlivosť a umožnenie vypracovať diplomovú prácu na tomto pracovisku.

Moje pod'akovanie patrí taktiež Mgr. Monike Drastíkovej a Bc. Jaroslave Hegerovej z Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky Fakultnej nemocnice v Hradci Králové za trpezlivosť a rady pri vypracovaní praktickej časti tejto práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Prahe
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických vied

Kandidát: Bc. Daniela Putzová

Školiteľ: Doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Vrodená hemochromatóza – význam molekulárno biologického vyšetrenia mutácie S65C v géne HFE

Cieľ práce: Cieľom diplomovej práce bolo zavedenie vyšetrovacej metódy PCR - RFLP pre stanovenie mutácie S65C v HFE géne, prostredníctvom ktorej by bolo možné vyšetrovať reálne klinické vzorky a zistiť výskyt S65C vo vyšetrovaných vzorkách.

Metódy: V tejto práci bolo vyšetrených 140 patientskych vzoriek (68 % (n = 95) od mužov, 32 % (n = 45) od žien ,vo veku 20 až 83 rokov) na prítomnosť mutácie S65C v HFE géne prostredníctvom metódy PCR – RFLP. Pre amplifikáciu požadovaných úsekov HFE génu boli využité primery (5´– ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC – 3´, 5´– GCC ACA TCT GGC TTG AAA TT – 3´). Pre restričnú analýzu bol použitý enzým HinfI.

Výsledky: Alelová frekvencia mutácie S65C bola v súbore pacientov určená ako 1,8 %. U 5 vzoriek (3,6 %) bola detekovaná heterozygotná forma mutácie S65C, pričom z toho 2 vzorky (1,4 %) tvorili zložení heterozygoti C282Y/S65C.

Záver: Pre vyšetrenie mutácie S65C v HFE géne sa podarilo zaviesť vyšetrovaciu metódu PCR – RFLP, prostredníctvom ktorej bolo umožnené obohatiť spektrum dosiaľ vyšetrovaných mutácií C282Y a H63D. Získané frekvencie genotypov a aliel vo vyšetrovaných vzorkách boli porovnateľné s hodnotami zistenými v stredoeurópskej populácii.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Daniela Putzová

Supervisor: Doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Title of diploma thesis: Hereditary hemochromatosis – Importance of molecular biology analysis of S65C mutation in HFE gene

Background: The aim of this work was to establish an investigative method PCR-RFLP for the detection of the mutation S65C in HFE gene which can be used for an analysis of real clinical samples and for determination of their S65C mutation occurrence.

Methods: In this study, 140 samples from patients were analyzed (68 % (n = 95) of samples from men, 32 % (n = 45) from women, in the age from 20 to 83 years) for the presence of the mutation S65C in HFE gene using PCR-RFLP method. For amplification of required segments of HFE gene, primers (5′– ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC – 3′, 5′– GCC ACA TCT GGC TTG AAA TT – 3′) were used. The enzyme HinfI was used for the restriction analysis.

Results: S65C mutation allelic frequency was determined as 1.8 % in this cohort of patients. Five patients (3.6 %) were heterozygous for the mutation S65C; two of them (1.4 %) were identified as C282Y/S65C compound heterozygotes.

Conclusions: PCR – RFLP procedure was successfully established for the determination of S65C mutation as an alternative to the more commonly analyzed mutations C282Y and H63D. The obtained results of genotypic and allelic frequencies were comparable with those reported in earlier studies concerning Central European populations.

Obsah

1.	Úvod.....	8
	Teoretická časť	9
2.	Metabolizmus železa v ľudskom organizme a úloha HFE proteínu	9
2.1.	Železo.....	9
2.2.	Homeostáza železa.....	9
2.2.1.	Príjem železa do organizmu.....	9
2.2.1.1.	Absorpcia nehemového železa.....	10
2.2.1.2.	Absorpcia hemového železa.....	11
2.2.2.	Transport železa.....	11
2.2.3.	Utilizácia železa v bunke.....	13
2.2.4.	Skladovanie a recyklácia železa.....	13
2.2.5.	Straty železa organizmom.....	14
2.2.6.	Regulácia homeostázy.....	14
2.2.6.1.	IRP/IRE systém.....	14
2.2.6.2.	Hepcidín.....	15
2.2.6.3.	HFE proteín.....	15
2.2.6.4.	Hemojuvelín.....	16
3.	Hemochromatóza	17
3.1.	Hereditárna hemochromatóza.....	17
3.1.1.	HFE hemochromatóza.....	17
3.1.1.1.	Mutácia C282Y.....	18
3.1.1.2.	Mutácia H63D.....	18
3.1.1.3.	Ostatné mutácie v HFE géne.....	19
3.1.1.4.	Zložení heterozygoti.....	19
3.1.2.	Juvenilná hemochromatóza.....	19
3.1.2.1.	Hereditárna hemochromatóza 2. typu – A.....	20
3.1.2.2.	Hereditárna hemochromatóza 2. typu – B.....	20
3.1.3.	Hemochromatóza 3. typu.....	20
3.1.4.	Hemochromatóza 4. typu.....	20
3.1.5.	Diagnostika a terapia hereditárnej hemochromatózy.....	21
3.2.	Sekundárna hemochromatóza.....	22
3.2.1.	Bantu sideróza.....	22
4.	Mutácia S65C v HFE géne	23
4.1.	Mutácia S65C.....	23
4.2.	Výskyt mutácie S65C.....	24

5.	Molekulárno biologické metódy používané k analýze mutácie S65C.....	25
5.1.	PCR – RFLP.....	25
5.1.1.	PCR	25
5.1.1.1.	Priebeh PCR.....	25
5.1.1.2.	PCR Master mix.....	26
5.1.2.	RFLP	27
5.2.	Real – time PCR.....	27
5.2.1.	Sondy Taqman™	28
5.2.2.	Sondy FRET	29
5.3.	Reverzná hybridizácia.....	30
5.4.	Sekvenovanie	31
5.5.	Ostatné metódy	31
6.	Cieľ diplomovej práce.....	33
	Experimentálna časť	34
7.	Materiál a metodika	34
7.1.	Použité chemikálie	34
7.2.	Prístroje	35
7.3.	Anonymizovaná vzorka DNA.....	35
7.4.	Charakteristika vyšetrovaného súboru pacientov	35
7.5.	Izolácia DNA z plnej nezrážanlivej krvi kitom QIAamp® DNA Mini Kit.....	36
7.6.	Používané štatistické metódy	37
8.	Výsledky	38
8.1.	Optimalizácia PCR – RFLP analýzy mutácie S65C v HFE géne	38
8.1.1.	Optimalizácia podmienok PCR.....	38
8.1.2.	Kontrola PCR účinnosti a detekcia DNA fragmentov prostredníctvom gélovej horizontálnej elektroforézy	39
8.1.3.	Optimalizácia podmienok restriktívnej analýzy	41
8.2.	Analýza klinických vzoriek	43
8.3.	Výsledky vyšetrenia klinických vzoriek	46
9.	Diskusia	49
10.	Záver diplomovej práce	53
11.	Zoznam použitých skratiek	54
12.	Zoznam použitej literatúry.....	56

1. Úvod

Hereditárna hemochromatóza je dedičné ochorenie, ktoré postihuje veľkú časť európskej populácie. Prvýkrát bola táto choroba označená ako vrodená porucha metabolizmu železa v roku 1935 pánom J.H. Sheldonom a v roku 1996 bol detekovaný HFE gén, ktorý je označovaný ako gén zodpovedný za hemochromatózu. V priebehu ďalších rokov nasledovala charakterizácia najčastejších mutácií tohto génu, C282Y, H63D a S65C.

Pôvod týchto mutácií je spájaný so selekčným zvýhodnením jedincov. V období nedostatku mäsitej potravy a zvýšených strát krvi pri boji alebo love zabezpečoval zvýšený príjem železa väčšiu ochranu jedinca pred možným rozvojom sideropenickej anémie. Avšak v dnešnej dobe s dostatočným príjmom kvalitnej stravy a s predlžovaním stredného veku života sa táto mutácia stáva nevýhodou. V dôsledku nadmernej absorpcie železa z tenkého čreva a jeho ukladania do orgánov, ako sú pečeň, srdce a pankreas, dochádza k poškodzovaniu organizmu s postupne sa vyvíjajúcimi komplikáciami, ktoré sa začínajú prejavovať až v období okolo 40. – 60. roku života.

Vzhľadom na možný rozvoj závažných ochorení, ktoré môžu pri nezačatí liečby viesť až k predčasnému úmrtiu jedinca, je kladený čoraz väčší dôraz na včasné odhalenie hereditárnej hemochromatózy spojenjej s jej celoživotnou liečbou.

Z tohto dôvodu je okrem klinického vyšetrenia potrebná hlavne v presymptomatickom období aj dostatočná škála laboratórnych metód – medzi nimi hlavne molekulárno biologických vyšetrení, ktoré umožnia potvrdiť prítomnosť predispozície pre toto ochorenie. Preto je jedným z hlavných cieľov tejto diplomovej práce zefektívniť laboratórnu diagnostiku hereditárnej hemochromatózy rozšírením spektra dosiaľ vyšetřovaných mutácií v HFE géne.

Teoretická časť

2. Metabolizmus železa v ľudskom organizme a úloha HFE proteínu

2.1. Železo

Železo je esenciálny stopový prvok, ktorý má dôležitú úlohu v mnohých fyziologických funkciách (1). Zúčastňuje sa syntézy DNA, RNA a proteínov a taktiež ovplyvňuje expresiu molekúl podieľajúcich sa na priebehu bunčného cyklu (2). Železo je zároveň súčasťou mnohých molekúl, ktoré sú potrebné pre transport kyslíka a bunčné dýchanie (3).

Na druhej strane voľné ióny železa môžu byť pre organizmus toxické. Vyvolávajú tvorbu voľných radikálov, peroxidáciu nenasýtených mastných kyselín, reagujú s redukujúcimi látkami a kyslíkom za vzniku peroxidu vodíka, superoxidovaných a hydroxylovaných radikálov (4). Tieto procesy môžu viesť k poškodeniu bunky alebo až k jej zániku (1).

Železo sa v organizme vyskytuje v dvoch oxidačných stavoch, a to ako dvojmocné (Fe^{2+}) a trojmocné (Fe^{3+}). Z dôvodu ochrany organizmu pred toxickými účinkami železa (4) sa jeho väčšina nachádza vyviazaná na proteíny ako je napr. sérový transferín, feritín, hemoglobín, myoglobín a cytochróm. Tak isto vytvára nízkomolekulárne komplexy napr. spolu s citrátom, acetátom, aminokyselinami, ale aj cukrami (5).

2.2. Homeostáza železa

Zaistenie fyziologických hladín železa je regulované udržaním rovnováhy medzi príjmom, transportom, utilizáciou, uskladnením a stratami železa (3,6).

2.2.1. Príjem železa do organizmu

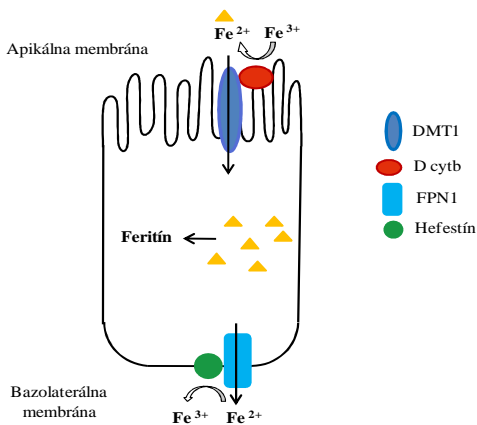
Fyziologické množstvo železa v organizme sa pohybuje v rozmedzí 35 – 45 mg na kg telesnej váhy (7). V najväčšom množstve je zastúpené v erythrocytoch, následne hlavne v makrofágoch, v kostnej dreni a časť železa je uskladnená vo forme feritínu alebo hemosderínu najmä v pečeni (3).

Príjem železa je zabezpečený prevažne absorpciou v duodene, no malá časť sa vstrebáva i prostredníctvom distálnych častí tenkého čreva (8). V denne prijímanej potrave sa nachádza 10 až 20 mg železa (2), avšak skutočne vstrebané množstvo tvorí u mužov približne len 1 mg a u žien 1,5 mg (9). Absorpcia sa týka dvoch typov: hemovej

a nehemovej formy (7). Hemové železo, vyskytujúce sa hlavne v červenom mäse, je prijímané organizmom lepšie ako nehemové (9), ktorého zdroje sú skôr orechy, strukoviny a listová zelenina (10). Príjem môže byť ovplyvnený aj inými zložkami potravy. Absorpciu železa môžu zvyšovať vitamín C a alkohol. Opačný efekt môžu mať napr. fytáty, polyfenoly, vláknina alebo kalcium (9). Nárast množstva prijímaného železa je ovplyvnený zvýšenými požiadavkami na železo pri anémii, hypoxii a jeho systémovom nedostatku (11).

2.2.1.1. Absorpcia nehemového železa

Absorpcia nehemového železa cez apikálnu membránu duodenálneho enterocyty je zabezpečená transportným proteínom DMT1 (divalent metal transporter 1). DMT1, Nramp2 (natural resistance – associated macrophage protein 2), DCT1 (divalent cation transporter 1) alebo SLC11A2 (solute carrier family 11, member 2) je transmembránový proteín, ktorý transportuje kovy v oxidačnom stave dva, okrem Fe^{2+} aj Mn^{2+} , Cu^{2+} a Cd^{2+} (12). Vzhľadom na oxidačný stav nehemového železa predchádza samotný import redukcia trojmocného Fe^{3+} (ferri–) (12) na dvojmocné Fe^{2+} (ferro–) prostredníctvom ferrireduktázy – D–Cytb (duodenálny cytochróm B) (7) alebo Cybrd1 (cytochrome b reductase 1) (10), lokalizovanej v kefkovom leme duodenálnej sliznice.

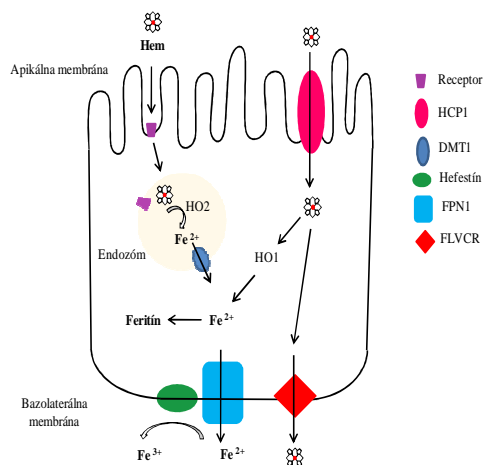


Obr. 1: Schéma absorpcie nehemového železa prostredníctvom enterocyty; upravené podľa Pácal et al. (2004).

Importované železo môže byť následne v enterocyte uskladnené v podobe feritínu (7), ktorý sa nachádza prevažne v cytoplazme, ale v malej miere aj v mitochondriách (12). Druhou možnosťou je export do krvného obehu cez bazolaterálnu membránu prostredníctvom feroportínu (7). FPN1 (feroportín), Ireg1 (iron regulated protein 1), MTP1 (metal transporter protein 1) alebo SLC40A1 (solute carrier family 40, member 1) je transmembránový proteín, ktorý sa nachádza v duodene na zrelých enterocytoch (8), hepatocytoch (13), Kupferových bunkách (8), makrofágoch a bunkách centrálného nervového systému (12). V kryptách a na prekurzoroch enterocytov sa jeho výskyt nepotvrdil (8). Okrem feroportínu sa na exporte železa z enterocyty spolupodieľa aj feroxidáza hefestín, ktorá zabezpečuje oxidáciu Fe^{2+} na Fe^{3+} a tým aj jeho následnú väzbu na transferín (12).

2.2.1.2. Absorpcia hemového železa

Hemové železo sa nachádza v štruktúre hemu viazané na protoporfyrinový kruh vo forme Fe^{2+} (12). Jeho absorpcia prebieha receptorom sprostredkovanou endocytózou, nasledovanou degradáciou hemovou oxygenázou 2 v novovzniknutých endozomálnych



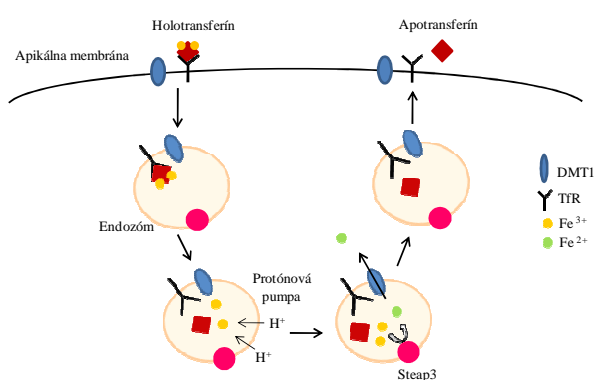
Obr. 2: Schéma absorpcie hemového železa prostredníctvom enterocyty

hemovou oxygenázou 1, ktorá je lokalizovaná na endoplazmatickom retikule alebo transportované cez bazolaterálnu membránu enterocyty do krvného obehu pomocou receptoru FLVCR (feline leukemia virus, podskupina C), kde cirkuluje naviazané na hemopexín. Nakoniec Fe^{2+} ióny uvoľnené vo vnútri enterocyty sú transportované cez bazolaterálnu membránu podobne ako u nehemového železa prostredníctvom FPN1 (10).

2.2.2. Transport železa

Transport železa v krvnom obehu a k cieľovým bunkám je zabezpečený hlavne prostredníctvom transferínu (14). Transferín je jednoreťazcový sérový glykoproteín o molekulovej hmotnosti 80 kDa (2). V svojej molekule obsahuje dve väzbové miesta pre Fe^{3+} (14) a je syntetizovaný v pečeni (2). V plazme sa nachádzajú tri izoformy transferínu: apotransferín, monofेरický a diferický transferín (3). Apotransferín neobsahuje naviazané žiadne Fe^{2+} ióny (14). Ich zastúpenie ovplyvňuje saturácia transferínu (3). Za fyziologických podmienok je transferín nasýtený z 30 % a pomer diferického a monofेरického transferínu je 1:2 (2), no so zvyšujúcou sa saturáciou narastá výskyt diferického formy (3).

Transferín sa špecificky viaže na TfR (transferínový receptor) (2), u ktorého sa rozlišujú dva typy: TfR1 a TfR2. TfR1 sa vyskytuje na membránach všetkých buniek okrem erytrocytov v rôznej miere a jeho syntéza je regulovaná posttranskripčne koncentráciou železa (2,3). TfR2 sa nachádza hlavne na membráne hepatocytov, ale aj prekursorových buniek enterocytov a erytroidných buniek (14). Afinita TfR2 k transferínu je 25 až 30 krát nižšia ako u TfR1 a jeho expresia narastá s nedostatkom železa (2,3). Po naviazaní holotransferínu (transferín s naviazanými 2 molekulami Fe^{3+}), ktorý je oproti apotransferínu pri neutrálnom pH prednostne viazaný na TfR1, dochádza k jeho endocytóze sprostredkovej receptorom. Tento proces sa nazýva transferínový cyklus. Následne v novovzniknutých endozomálnych váčkoch obsahujúcich komplex TfR1



Obr. 3: Transferínový cyklus

s holotransferínom (14) dochádza k zníženiu pH prostredníctvom ATP – dependentnej protónovej pumpy (2). Pri dosiahnutí pH 5,5 nastávajú konformačné zmeny zložiek komplexu a následné uvoľnenie Fe^{3+} iónov (14). Pred transportom Fe^{3+} iónov prostredníctvom DMT1 do cytoplazmy dochádza najmä u erytroidných prekurzoroch k ich redukcii na Fe^{2+} ióny pomocou reduktázy Steap 3 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate 3). Železo môže byť následne v bunke využité k syntéze hemoglobínu, uskladnené v podobe feritínu alebo je exportované von z bunky (7). Samotný transferínový cyklus končí splynutím endozomálneho vaku s plazmatickou membránou, návratom TfR1 na membránu a uvoľnením apotransferínu z TfR1 do krvného obehu (14). Železo je exportované z väčšiny buniek (hepatocytov, makrofágov, placentárnych syncytiotrofoblastov a už spomínaných duodenálnych enterocytov) prostredníctvom feroportínu (11). Aby mohlo dôjsť k väzbe železa na transferín, Fe^{2+} ióny sú oxidované na Fe^{3+} plazmatickým ceruloplazmínom (7). Ceruloplazmín je feroxidáza, ktorá je syntetizovaná hlavne v hepatocytoch (14), ale aj v iných bunkách, napr. v makrofágoch (11).

Železo sa však môže vyskytovať v plazme aj nnaviazané na transferín. Nachádza sa vo forme nízkomolekulárnych komplexov alebo vyviazané na iné proteíny, napr. albumín, laktoferín a extracelulárny feritín (14).

2.2.3. Utilizácia železa v bunke

Železo je v bunke zabudovávané do molekúl, ktoré vykonávajú rozdielne funkcie. Nachádza sa v hemoproteínoch (oxidáza, kataláza, cytochrom P450) a Fe – S proteínoch (mitochondriálna akonitáza a sukcinátdehydrogenáza) spolupodielajúcich sa na redoxných reakciách. Taktiež je súčasťou cytochrómov, ktoré sú dôležité pre transport elektrónov pri oxidatívnej fosforylácii. Okrem toho je železo nevyhnutné aj pre funkciu transportérov kyslíka, myoglobínu a hemoglobínu (5).

2.2.4. Skladovanie a recyklácia železa

Veľká časť železa sa v organizme vyskytuje v zásobnej podobe a je uložená vo forme feritínu alebo hemosiderínu v pečeni. Feritín je proteín s molekulovou hmotnosťou 474 kDa (2) a tvorí ho 24 podjednotiek (5), u ktorých rozlišujeme 2 základné typy. Ťažší H-feritín s feroxidázovou aktivitou zabezpečuje oxidáciou Fe^{2+} na Fe^{3+} uskladnenie železa vo feritíne (2) väzbou na bielkovinovú zložku apoferitínu. Ľahší L-feritín stabilizuje proteín. Pri nedostatku železa sa uvoľňuje železo z feritínu po redukcii Fe^{3+} na Fe^{2+} pôsobením glutatiónu, askorbovej kyseliny a iných redukčných činidiel (4). Hemosiderín vzniká agregáciou feritínu do väčších celkov (8) a nachádza sa prevažne v makrofágoch (15).

Takto uskladnené železo sa nachádza hlavne v hepatocytoch, ale aj v Kupferových bunkách, ktoré sú dôležitou súčasťou RES (retikuloendoteliálny systém). Spolu s ostatnými bunkami RES sa Kupferové bunky zúčastňujú na vychytávaní starnúcich erytrocytov a ich následnom rozklade (3). Pôsobením hydrolytických enzýmov na erytrocyty dochádza k uvoľneniu hemu z hemoglobínu s jeho následným štiepením hemoxygenázou a naviazaniu uvoľneného železa na transferín (2). 80 % hemu pochádza z erytrocytov kolujúcich v krvnom obeh, zvyšok je z prekursorových erytroidných buniek a ostatných bielkovín obsahujúcich hem. V priebehu intravaskulárnej hemolýzy erytrocytov vznikajú dva hemoglobínové diméry, ktoré sú vyvážované na proteín haptoglobín (16). Po transporte do pečene ich vychytávajú medzi inými aj RES bunky pomocou receptora CD163 (2). V prípade, že dochádza k masívnejšiemu rozpadu erytrocytov, nevyviazané hemoglobínové diméry sa postupne menia na hematín, ktorý je prenesený hemopexínom do pečene (16).

2.2.5. Straty železa organizmom

Ľudský organizmus nemá pre vylučovanie železa vyvinutý fyziologický mechanizmus. K jeho exkrécii preto dochádza prostredníctvom malých strát železa žlčou, močom a deskvamáciou črevných epitelíí (9). U žien pozorujeme straty železa aj počas menštruácie, tehotenstva, laktácie a pri pôrode (4). Denné straty železa pokrývajú približne jeho denný príjem, u mužov tvoria asi 0,5 – 1 mg a u žien 1 – 2 mg železa (2).

2.2.6. Regulácia homeostázy

Homeostáza železa je v organizme regulovaná na dvoch úrovniach rôznymi mechanizmami. Na bunčnej úrovni dochádza k posttranskripčnej regulácii génov, ktoré hrajú dôležitú úlohu pri udržiavaní fyziologických hodnôt železa v rámci bunky. Medzi tieto regulačné faktory patrí IRP/IRE (iron regulatory protein/iron responsive element) systém. K regulácii hladín železa dochádza aj na úrovni systémovej prostredníctvom peptidu hepcidínu (7), ktorý ovplyvňuje hladiny extracelulárneho železa a ochraňuje organizmus pred jeho nahromadením (6). Regulácia na bunčnej a systémovej úrovni je vzájomne prepojená. Pri znížených hladinách železa v bunke narastá expresia TfR1 a následne sa zvyšuje vychytávanie holotransferínu z krvného obehu. Vplyvom poklesu saturovaného transferínu stúpajú požiadavky na absorpciu železa enterocyty a uvoľňovanie železa z hepatocytov a RES buniek (17).

2.2.6.1. IRP/IRE systém

Posttranskripčnú reguláciu exprese proteínov podieľajúcich sa na udržaní homeostázy železa v bunke zabezpečujú dve izoformy cytoplazmatických proteínov IRPs (iron regulatory proteins): IRP1 a IRP2 (8). V prípade poklesu množstva železa dochádza k aktivácii IRP1 alebo IRP2 a ich naviazaniu na IRE (iron responsive element), ktorý je tvorený vlásenkami so slučkou o sekvencii 5'– CAGUGN – 3' (17). IRE sa vyskytuje v neprekladanej oblasti mRNA feritínu a feroportínu na 5'– konci a v mRNA TfR a DMT1 na 3'– konci (7). Pri nedostatku železa v bunke sa IRPs viažu na IRE na 3'– konci a stabilizujú tak mRNA pred pôsobením ribonukleáz, čím zabezpečujú zvýšenie exprese daných proteínov a aj príjem železa. Blokáciu syntézy feritínu spôsobuje väzba IRPs na IRE na 5'– konci (2). V prípade nadbytku železa dochádza k zníženiu afinity IRPs k IRE a k opačným dejom ako pri nedostatku (8). Tvorba TfR a DMT1 sa v dôsledku štiepenia mRNA na 3'– konci znižuje a syntéza feritínu stabilizáciou mRNA na 5'– konci narastá (2).

2.2.6.2. Hecpidín

Hecpidín je hlavným regulačným faktorom systémovej homeostázy železa. Ovplyvňuje jeho príjem enterocyty (18) a uvoľňovanie z hepatocytov (19) a RES buniek prostredníctvom väzby na feroportín, ktorá ho inaktivuje (18). Hecpidín je peptid skladajúci sa z 25 aminokyselín (11) s molekulovou hmotnosťou 2 kDa (20) exprimovaný hlavne v hepatocytoch, ale v malej miere aj bakteriálne aktivovanými makrofágmi a neutrofilmi (11). Pôvodne bol vyizolovaný z ultrafiltrátu plazmy a pomenovaný LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide). Neskôr vypurifikovaný z ľudského moču získal názov hepcidín v súvislosti s jeho pečňovým pôvodom a antimikrobiálnym pôsobením *in vitro*. Hecpidín vzniká postupným štiepením jeho prekursoru preprohepcidínu. Preprohepcidín je exprimovaný z génu HAMP (10), lokalizovaným na 19. chromozóme v oblasti 19q13 (20), ktorý kóduje 84 aminokyselín. K enzymatickému štiepeniu dochádza počas jeho prenosu v cytoplazme za vzniku pro-hepcidínu – peptidu obsahujúceho 64 aminokyselín. Hecpidín-25 je vytvorený následným štiepením pro-hepcidínu za odstránenia pro-region peptidu. Obsahuje štyri disulfidové mostíky a jeho ďalšou degradáciou vznikajú hepcidín-20 a hepcidín-22, ktoré je možné detekovať v moči (10).

Syntéza hepcidínu je regulovaná viacerými faktormi. Pri náraste hladín železa v organizme nastáva zvýšená expresia hepcidínu prostredníctvom mechanizmov, na ktorých sa spolupodieľajú HFE proteín, TfR2 a hemojuvelín (17). Okrem toho hladiny hepcidínu stúpajú aj pri zápalových ochoreniach pôsobením cytokínov IL-6 a IL-1 produkovanými makrofágmi (20). Prozápalový cytokín IL-6 ovplyvňuje expresiu hepcidínu cez STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) (7). Hypoxia organizmu a následné zvýšenie požiadaviek na erytropoézu indukuje väčšiu utilizáciu železa pri syntéze hemoglobínu a s tým súvisiaci pokles hladín hepcidínu (11).

2.2.6.3. HFE proteín

Tento proteín je kódovaný génom HFE, ktorý sa nachádza na krátkom ramienku 6. chromozómu v oblasti 6p21.3 – p22 (2), obsahuje 7 exónov (21) a je 12 kb dlhý (13). HFE gén bol objavený v roku 1996 (3) v blízkosti lokusov MHC (major histocompatibility complex) (22) a pôvodne bol nazývaný HLA-H gén (23). HFE proteín je tvorený 348 aminokyselinami (24) a obsahuje tri extracelulárne domény (α_1 , α_2 a α_3), transmembránovú a cytoplazmatickú časť (2). Tento proteín sa exprimuje hlavne v hepatocytoch, epitelových bunkách krýpt duodena a v bunkách syncytiotrofoblastu (13).

HFE proteín interaguje s receptormi TfR1 a TfR2 (25). Prostredníctvom α_1

a α_2 domény sa viaže na TfR1 (13) a pomocou α_3 domény na β_2M (β_2 -mikroglobulín) (8), ktorý je potrebný pre transport HFE proteínu na povrch bunky (2). HFE proteín kompetitívne o väzbové miesto na TfR1 s holotransferínom (17), ktorý ho vytlačuje z komplexu HFE – β_2M – TfR1. Ak sa v organizme vyskytujú hladiny saturovaného transferínu vo fyziologickom rozmedzí, pomocou HFE proteínu je vyslaný signál o dostatočnom príjme železa organizmom (2). Pri jeho zvýšených hladinách dochádza k nárastu uvoľňovania HFE proteínu a následnej expresie hepcidínu (17).

HFE proteín interaguje nezávisle od hladín holotransferínu pomocou jeho α_3 domény aj s TfR2, ktorý je lokalizovaný najmä na hepatocytoch (6). Pri väzbe na TfR2 HFE proteín stabilizuje vznikajúci komplex zvýšením recyklácie a znížením lyzozomálnej degradácie TfR2, čím upreguluje prítomnosť tohto receptora v membráne. Vzhľadom na to, že hladiny saturovaného transferínu korelujú s hladinami TfR2 a syntézou hepcidínu, vznikajúci komplex Tf/TfR2/HFE sa môže zapájať do regulácie expresie hepcidínu. Na týchto procesoch sa účastní aj HFE proteín uvoľňovaný pri kompetícii s holotransferínom o väzbové miesto na TfR1 (25).

2.2.6.4. Hemojuvelín

Hemojuvelín je membránový proteín (17) kódovaný génom lokalizovaným na 1. chromozóme v oblasti 1q21 (22). Zastáva ko-receptorovú funkciu pri väzbe ligandu BMP6 (bone morphogenetic protein 6) na BMPR (bone morphogenetic protein receptor) sprostredkujúcu intracelulárny signál pre zvýšenie expresie hepcidínu cez SMAD (7). V organizme je hemojuvelín exprimovaný na hepatocytoch, ale aj v kostrovom a srdcovom svalstve. Nachádza sa v dvoch formách; okrem membránovej aj v solubilnej, ktorá sa môže viazať na rovnaké väzbové miesto a tvoriť tak nefunkčný komplex. Jeho vznik potlačuje saturovaný transferín, ktorý inhibuje tvorbu solubilnej formy z membránovej a zabraňuje tak zníženiu syntézy hepcidínu (17).

3. Hemochromatóza

Hemochromatóza patrí medzi ochorenia, ktoré vznikajú v dôsledku porúch metabolizmu železa (22). Tieto časté patologické stavy sú zapríčinené jeho nadmerným nahromadením v organizme (26) a môžu byť vyvolané vrodenými alebo získanými poruchami, prípadne ich kombináciou (22). U hemochromatózy sa stretávame s delením na hereditárnu hemochromatózu, vyvolanú genetickými mutáciami (26) a sekundárnu hemochromatózu, ktorá vzniká v dôsledku nahromadenia železa po predchádzajúcom poškodení orgánov inou noxou alebo z inej známej príčiny (4).

3.1. Hereditárna hemochromatóza

Hereditárna, vrodená alebo primárna hemochromatóza je geneticky podmienené ochorenie, pri ktorom dochádza k nadmernej absorpcii železa enterocytmami a k jeho zvýšenému hromadeniu najmä v parenchymatóznych orgánoch spojeným s ich následným poškodením a zlyhávaním (13). Množstvo denne prijímaného železa enterocytmami môže byť pri tomto ochorení až 3 – 6 g a hodnoty zásobného železa v organizme môžu dosahovať až 60 g (27).

Rozlišujeme štyri základné podtypy hemochromatózy: HFE hemochromatózu, juvenilnú hemochromatózu a hemochromatózu 3. a 4. typu (13). Najčastejšie zastúpený podtyp hemochromatózy v populácii európskeho pôvodu je HFE hemochromatóza spôsobená mutáciou v HFE géne. Ostatné podtypy sú vyvolané radou rôznych genetických mutácií, ktorých produkty zasahujú do metabolizmu železa (11).

3.1.1. HFE hemochromatóza

HFE hemochromatóza, hemochromatóza 1. typu alebo klasická hemochromatóza (13) je autozómálne recesívne ochorenie, ktoré vzniká v dôsledku mutácie HFE génu (22). Toto ochorenie prepuká v 40. až 60. roku života (28) a postihuje častejšie mužov ako ženy, zrejme z dôvodu ochrany ženského organizmu pred nadmerným hromadením železa stratami krvi počas menštruácie a pri pôrode (29). V prípade prepuknutia ochorenia u žien sú klinické prejavy pozorované až v piatej dekáde života (28).

Medzi prvé klinické prejavy hemochromatózy, ktoré sú pozorované u pacientov patria únava, kĺbové bolesti, abdominálna bolesť, zníženie libida (30) a hepatomegália, ktorá sa nachádza až u 95 % pacientov (31). V pokročilom štádiu môže byť prítomná cirhóza

pečene, pigmentácia kože (7), kardiomyopatia, artropatia (31), diabetes, hypogonadizmus a iné endokrinopatie (7).

HFE gén kóduje už spomínaný HFE proteín, ktorý ovplyvňuje expresiu hepcidínu. V prípade prítomných mutácií v géne, vzniká nefunkčný HFE proteín, znižuje sa syntéza hepcidínu a zároveň sa zvyšuje príjem železa enterocyty a jeho uvoľňovanie z RES buniek. Medzi najčastejšie mutácie tohto génu patria C282Y, H63D a S65C, ale boli detekované aj ďalšie (13).

3.1.1.1. Mutácia C282Y

Medzi najrozšírenejšie mutácie severoeurópskej populácie patrí mutácia C282Y (29), ktorá je zodpovedná za rozvoj hereditárnej hemochromatózy v najväčšej miere (32). Určité zdroje uvádzajú, že sa nachádza v homozygotnej podobe u 80 až 100 % pacientov trpiacich týmto ochorením (22). V Českej republike pozorujeme výskyt tejto mutácie v jej homozygotnej podobe u 0,12 % populácie (29) a vo forme heterozygota u 6,86 %. Jej frekvencia dosahuje v tejto populácii zhruba 3,43 % (32). Mutácia C282Y sa v slovenskej populácii vyskytuje vo forme homozygota u 0,28 % jedincov a jej alelová frekvencia je 4,04 % (33).

Mutácia C282Y je lokalizovaná v exóne 4 (34), ktorý kóduje α_3 doménu HFE proteínu (23). Táto mutácia vzniká tranzíciou guanínu za adenín v pozícii 845 (32) a v dôsledku tejto zámény dochádza v proteíne v pozícii 282 k substitúcii cysteínu tyrozínom. Mutácia C282Y spôsobuje, že mutovaný HFE proteín nie je schopný vytvoriť disulfidový mostík v oblasti α_3 domény, ktorý je nevyhnutný pre väzbu na β_2M (35). V dôsledku oslabenia tejto väzby je ovplyvnená i expresia HFE proteínu na povrchu bunky (32). Predpokladá sa, že takto mutovaný proteín je zadržovaný v endoplazmatickom retikule (35), ale staršie zdroje uvádzajú aj Golgiho aparát (2), kde následne podlieha zvýšenej degradácii (13).

3.1.1.2. Mutácia H63D

Za miernejšiu formu hereditárnej hemochromatózy zodpovedá mutácia H63D (32), ktorá sa nachádza, ako určité zdroje uvádzajú, u 15 – 40 % európskej populácie (2). V Českej republike sa táto mutácia vyskytuje v jej homozygotnej podobe u 1,67 % a v heterozygotnej podobe u 26,61 % jedincov. Frekvencia alely H63D sa pohybuje okolo 14,97 % (32). Mutácia H63D sa v slovenskej populácii vyskytuje vo forme homozygota u 3,34 % jedincov a jej alelová frekvencia je 12,67 % (33).

Samotná mutácia H63D je lokalizovaná v exóne 2 (34), ktorý kóduje α_1 doménu HFE proteínu (23). Táto mutácia vzniká transverziou cytozínu za guanín v polohe 187 (32) a spôsobuje substitúciu histidínu kyselinou asparágovou v HFE proteíne v pozícii 63 (34). Mutovaný proteín je schopný viazať sa na β_2M a je exportovaný na povrch bunky (35), no nemôže interagovať s TfR v dôsledku mutácie v α_1 doméne, a tým ovplyvňovať príjem železa bunkou (13).

3.1.1.3. Ostatné mutácie v HFE géne

V HFE géne boli objavené aj iné mutácie vyvolávajúce aminokyselinovú zámenu, avšak ich výskyt je vzácny. Medzi tieto mutácie patria napr. I105T, G93T a Q283P, ktoré boli nájdené len u malého množstva jedincov s klinickými prejavmi hereditárnej hemochromatózy (13,36).

Okrem týchto mutácií boli v HFE géne detekované aj mutácie R66C a R224G. Mutácia R66C je lokalizovaná v exóne 2. Vzniká tranzíciou cytozínu za tymín v polohe 196 a spôsobuje zámenu arginínu za cysteín v pozícii 66. Táto mutácia sa nachádza vedľa mutácie S65C a predpokladá sa, že by mohla ovplyvňovať väzbu HFE proteínu na TfR1. U mutácie R224G dochádza k zámene arginínu za glycín v polohe 224 v dôsledku tranzície guanínu za adenín v pozícii 671. Vplyvom aminokyselinovej substitúcie v HFE proteíne môže dôjsť k zmene väzbovej afinity na β_2M , a tým aj ovplyvneniu metabolizmu železa (37).

3.1.1.4. Zložení heterozygoti

V niektorých prípadoch sa stretávame s prítomnosťou viac ako jednej mutácie vyvolávajúcej hereditárnu hemochromatózu. Do tejto skupiny môžeme zaradiť zloženého heterozygota C282Y/H63D, ktorý tvorí podľa istých zdrojov 3 – 5 % prípadov hereditárnej hemochromatózy (2). V českej populácii sa táto forma zloženého heterozygota vyskytuje u 1,87 % jedincov a v slovenskej u 0,84 %. Okrem tohto genotypu sem môžeme zaradiť aj H63D/S65C, ktorý sa vyskytuje v Českej republike u 0,42 % populácie a v Slovenskej republike u 0,56 %. V prípade zloženého heterozygota C282Y/S65C je jeho odhadované množstvo výskytu 0,086 % (32,33).

3.1.2. Juvenilná hemochromatóza

Juvenilná hemochromatóza alebo hemochromatóza 2. typu je autozomálne recesívne ochorenie (13), ktoré postihuje obe pohlavia v rovnakej miere a môže sa

prejavovať už okolo 20. roku života (22). Priebeh tohto ochorenia je ťažší ako pri hemochromatóze 1. typu v dôsledku možného úplného potlačenia expície hepcidínu (7). Medzi hlavné symptómy patrí kardiomyopatia a hypogonadotropný hypogonadizmus (22). Okrem nich sú prítomné aj ďalšie klinické prejavy: hepatomegália, cirrhóza pečene, insuficiencia obličiek, hypotyreóza, a iné (13). Z dôvodu prítomných mutácií postihujúcich rozdielne gény delíme juvenilnú hemochromatózu na typ A a B (22).

3.1.2.1. Hereditárna hemochromatóza 2. typu – A

Hereditárnu hemochromatózu 2. typu – A vyvoláva mutácia v géne kódujúcom hemojuvelín lokalizovanom na 1. chromozóme v oblasti 1q21 (22). Je známych viac ako 30 rôznych mutácií, najmä v exóne 3 a 4, ale ich výskyt je zriedkavý (13). Medzi známe mutácie patria G320V, I222N a iné (22). Klinický prejav je miernejší oproti hereditárnej hemochromatóze 2. typu – B (13).

3.1.2.2. Hereditárna hemochromatóza 2. typu – B

Tento typ hemochromatózy má ťažší priebeh ako typ A (13) a je spôsobený mutáciami postihujúcimi gén HAMP kódujúci hepcidín (22). Gén HAMP sa nachádza na 19. chromozóme v oblasti 19q13 (20) a obsahuje 3 exóny, pričom najdôležitejší je tretí nesúci informácie o danom peptide. Boli detekované mutácia R56X a frameshift mutácia 93delG, ktoré zasahujú do čítacieho rámca tohto exónu (13).

3.1.3. Hemochromatóza 3. typu

Hemochromatóza 3. typu je vzácne autozomálne recesívne ochorenie, ktoré vzniká v dôsledku mutácie v géne pre TfR2 (22), lokalizovaného na chromozóme v oblasti 7q22 (13). Sú známe ako nonsense (napr. Y250X, V561X a R105X) tak aj missense (napr. I238M a A75V) mutácie (38). Ochorenie sa začína prejavovať v 20. až 30. roku života (7) a jeho priebeh je miernejší ako u juvenilnej hemochromatózy, ale ťažší ako u hereditárnej hemochromatózy 1. typu (13).

3.1.4. Hemochromatóza 4. typu

Hemochromatóza 4. typu alebo feroportínová choroba je autozomálne dominantné ochorenie (22), ktoré vyvolávajú rôzne mutácie génu SLC40A1 (19), nachádzajúceho sa v oblasti 2q32 kódujúceho feroportín (22). Fenotypový prejav daného ochorenia sa líši v závislosti od prítomnej mutácie. Pri mutáciách typu loss-of-function je znížený bunecný

export železa kvôli zadržovaniu feroportínu v endoplazmatickom retikule (19) a nedochádza k jeho transportu na povrch bunky (13). To je prípad napr. mutácie Val162del, kde dochádza k delícii 485 – 487delTTG, teda aj aminokyseliny valínu v oblasti transmembránovej domény feroportínu (22). Mutovaný proteín môže byť taktiež neschopný plniť svoju funkciu, napr. v dôsledku mutácie N147I. Výsledkom je zvýšené ukladanie železa v makrofágoch, vedúce k nárastu hladín sérového feritínu napriek normálnej saturácii transferínu.

V prípade menej častých mutácií typu gain-of-function nedochádza k degradácii feroportínu (19) vďaka jeho rezistencii voči hepcidínu (13). V dôsledku nekontrolovanej absorpcie železa enterocytmí, zvýšenej saturácie transferínu, ukladania železa do parenchymatóznych a iných orgánov, pripomínajú priebeh a klinické prejavy ochorenia hereditárnu hemochromatózu 1. typu (19). Medzi hlavné klinické prejavy sa radia cirhóza pečene, diabetes a arytmia (13). Najzávažnejší priebeh a skorý nástup ochorenia spôsobuje substitúcia C326S/Y. Miernejšie prejavy sú pozorované pri substitúciách N144D/T/H a Y64N (19).

3.1.5. Diagnostika a terapia hereditárnej hemochromatózy

Pri podozrení na prítomnosť hemochromatózy je vhodné pacienta vyšetriť klinicky, ale i laboratórne. Pri laboratórnej diagnostike sa využíva biochemických aj molekulárno biologických postupov. Biochemické vyšetrenie sa sústreďuje najmä na stanovenie saturácie transferínu a koncentrácie feritínu a železa v sére pacienta.

Medzi najcitlivejšie metódy patrí určenie saturácie transferínu (39). Za normálnych okolností je transferín saturovaný železom z 30 % (36), avšak pri hemochromatóze je pozorovaný nárast nad 50 %. Stav hladín zásobného železa v organizme odráža sérová koncentrácia feritínu (39). Pri hemochromatóze je u mužov detekované zvýšenie nad $300 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a u žien nad $200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (4). Tak isto sú nachádzané zvýšené sérové koncentrácie železa, ktoré presahujú $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (39).

Pre určenie diagnózy sa využívajú i zobrazovacie metódy, histologické vyšetrenie biopsie pečene, ale aj stanovenie funkcie pečene (40).

Liečba hemochromatózy je zameraná na zníženie hladín železa v organizme. K tomuto účelu sa využíva predovšetkým venepunkcia. Na začiatku terapie sú odbery vykonávané jeden až dvakrát týždenne. Pacientovi je odoberaných približne 500 ml krvi, v ktorom sa nachádza asi 250 mg železa (41). Ich úspešnosť je monitorovaná stanovením sérových koncentrácií železa a feritínu (27), pričom práve hodnota sérovej koncentrácie feritínu je

hlavným ukazovateľom zásob železa v organizme a mala by dosahovať hodnôt pod $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (7). Pri dosiahnutí fyziologických hodnôt, nastupuje udržiavacia terapia. Počas nej sú odbery u väčšiny pacientov prevádzané približne jedenkrát za štvrt' roka, ale počet týchto výkonov závisí hlavne od zdravotného stavu pacienta.

V prípade kontraindikácie alebo intolerancie venepunkcií je pacient liečený pomocou chelatačnej terapie alebo erytrocytaferézy. Taktiež sa stretávame s odporúčaním obmedzenia príjmu potravy obsahujúcej železo a látok, ako je napr. vitamín C, ktoré môžu ovplyvniť vstrebávanie železa (41).

3.2. Sekundárna hemochromatóza

Sekundárna hemochromatóza alebo hemosideróza je ochorenie, pri ktorom dochádza k hromadeniu železa najmä v RES bunkách a medzi najviac postihnuté orgány patria slezina, obličky, kostná dreň a v malej miere pečeň (4).

Príčinou vzniku hemosiderózy môže byť dlhodobé podávanie preparátov železa, opakované transfúzie krvi, hemolytické a dyserytroetické anémie a chronické ochorenia pečene (42), ktoré vznikajú napr. pôsobením alkoholu alebo vírusu hepatitídy C (43).

3.2.1. Bantu sideróza

Bantu sideróza je typ hemochromatózy vyskytujúcej sa v určitej černošskej populácii v Afrike. Vzniká v dôsledku nadmerného príjmu železa spolu s alkoholom z piva, ktoré je pripravované varením v železných kotlíkoch. Pri danom ochorení pozorujeme ukladanie železa najmä v RES bunkách a hyperferitinémiu. Genetický pôvod tejto hemochromatózy zatiaľ nebol odhalený, ale predpokladá sa, že na rozvoji tohto ochorenia môže mať svoj podiel (13,22).

4. Mutácia S65C v HFE géne

4.1. Mutácia S65C

Mutácia S65C bola objavená na 8 % chromozómov pacientov s hemochromatózou, u ktorých neboli prítomné mutácie C282Y a H63D (32). Táto substitúcia sa nachádza v exóne 2 génu HFE (34) a od mutácie H63D je vzdialená len šesť nukleotidov. K jej vzniku dochádza transverziou adenínu za tymín v polohe 193 (32) s následnou zmenou sekvencie DNA z 5'– GAGTC – 3' na 5'– GTGTC – 3' (13). Vplyvom tejto zámény je serín v HFE proteíne v pozícii 65 nahradený cysteínom (34).

Pre funkčnosť HFE proteínu je dôležitá tvorba disulfidových mostíkov. V prípade aminokyselinovej zámény a následnej prítomnosti cysteínu môže dochádzať k zmene tvorby týchto väzieb, a tým aj ovplyvneniu tvaru výsledného HFE proteínu (44).

Avšak je stále ťažké určiť biologický efekt tejto mutácie vďaka jej nízkemu výskytu v populácii a jej miernemu fenotypovému prejavu. Predpokladá sa, že mutácia S65C sa spolupodieľa na rozvoji hemochromatózy spolu s C282Y a H63D a v malej miere môže ovplyvňovať ukazovatele metabolizmu železa (45). No podľa Pedersna et al. nebol na ne v porovnaní s ostatnými spomínanými mutáciami v prípade S65C pozorovaný významný vplyv (46).

Sekvencia HFE génu

Nukleotidy	TTC	TAT	GAT	CAT	GAG	AGT	CGC	CGT	GTG
Aminokyseliny	Phe	Tyr	Asp	His	Glu	Ser	Arg	Arg	Val
				↓		↓			
				63		65			

Sekvencia HFE génu s mutáciou H63D a S65C

Nukleotidy	TTC	TAT	GAT	GAT	GAG	TGT	CGC	CGT	GTG
Aminokyseliny	Phe	Tyr	Asp	Asp	Glu	Cys	Arg	Arg	Val
				↓		↓			
				63		65			

Obr. 4: Ukážka sekvencie HFE génu a prítomných mutácií H63D a S65C.

4.2. Výskyt mutácie S65C

Frekvencia mutácie S65C sa v európskej populácii pohybuje v rozmedzí 0,5 – 3,0 % (32). Najväčší výskyt bol zaznamenaný v populácii Saami vo Švédsku, a to 3 %. Nižšia frekvencia tejto mutácie bola nájdená v severnej Európe, kde tvorila napr. vo Fínsku 2,3 % (47) alebo v Dánsku 1,8 % (46). V strednej Európe a v oblasti Stredomoria sa S65C nachádza napr. v Slovinsku 1,8 % (48) a v Taliansku 0,9 % zastúpení (45).

V Českej republike je nález frekvencie tejto alely okolo 1,25 %, podobne ako v Slovenskej republike. Určité zdroje uvádzajú, že mutácia S65C sa vyskytuje v jej heterozygotnej podobe u 2,49 % českej populácie (32,33). Ďalšie informácie o výskyte mutácie S65C sú uvedené v Tab. 1.

Tab. 1: Alelová frekvencia mutácie S65C v zdravej populácii

krajina	citácia	S65C (%)
Brazília	(49)	0,60
Česká republika	(32)	1,25
Čína, Chanové	(50)	0,00
Dánsko	(46)	1,80
Faerské ostrovy	(51)	1,00
Fínsko	(47)	2,30
Francúzsko	(52)	1,95
Slovenská republika	(33)	1,25
Slovinsko	(48)	1,80
Švédsko	(53)	1,60
Švédsko, Saami	(47)	3,00
Taliansko	(45)	0,90
USA, Kalifornia	(54)	2,00

5. Molekulárno biologické metódy používané k analýze mutácie S65C

Medzi molekulárno biologické metódy, ktoré sa využívajú pre detekciu mutácií v HFE géne, teda aj mutácie S65C, patria najmä metódy PCR – RFLP, real-time PCR využívajúca TaqmanTM a FRET sondy, reverzná hybridizácia a sekvenovanie (34,48,55). Okrem nich boli navrhnuté aj iné metódy, napr. alelovo špecifická PCR (34) a SSCP (56).

5.1. PCR – RFLP

Medzi jednu z najstarších neautomatizovaných genotypovacích metód patrí restričná analýza získaných PCR produktov (57). Jej prevedenie zahŕňa dva kroky. Najskôr je prostredníctvom PCR (polymerázová reťazová reakcia, polymerase chain reaction) amplifikovaná požadovaná časť DNA, v ktorej je následne pomocou metódy RFLP (polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov, restriction fragment length polymorphism) detekovaná možná prítomnosť mutovanej alely (55).

5.1.1. PCR

PCR je metóda, ktorá je bežne využívaná k molekulárno biologickému vyšetreniu v rôznych modifikáciách a slúži k namnoženiu požadovaných úsekov DNA. V prípade S65C sa stretávame s amplifikáciou oblasti obsahujúcej danú mutáciu v HFE géne (55).

Podstatou tejto metódy je cyklické opakovanie troch krokov, ktoré sa striedajú v závislosti od teploty v rôznych časových úsekoch a umožňujú syntézu nových vlákien DNA (58). Počet jednotlivých cyklov sa väčšinou pohybuje v rozmedzí 30 – 40 opakovaní (55), ale závisí hlavne od počiatočnej koncentrácie vzorky. Po prebehnutí každého cyklu dochádza k zdvojnásobeniu množstva DNA a nárast koncentrácie má exponenciálny charakter (2^n , n = počet cyklov) (58).

Metóda PCR prebieha v uzavretých skúmavkách v termocykléroch – zariadeniach, kde dochádza k automatickému striedaniu jednotlivých krokov v závislosti od nastaveného času a teplôt (55), ktoré je vhodné najskôr optimalizovať (58).

5.1.1.1. Priebeh PCR

V priebehu prvého kroku metódy PCR dochádza k prerušeniu vodíkových mostíkov medzi dvojreťazovými DNA molekulami (tzv. denaturácia) prostredníctvom pôsobenia zvýšenej teploty, ktorá sa pohybuje v rozmedzí 94 – 97 °C. Pri počiatočnej denaturácii je potrebné úplné rozvolňenie templátovej molekuly. Z tohto dôvodu je čas prvej denaturácie

dlhší, pohybuje sa v rozpätí 2 – 5 minút. Denaturácia amplikonov, teda namnožených úsekov DNA, už prebieha v kratšom časovom úseku. Trvá zhruba 15 – 45 sekúnd a volí sa na základe polčasu stability DNA – polymerázy pri určitej teplote.

Počas druhého kroku, tzv. annealingu alebo hybridizácie primerov, dochádza k zníženiu teploty reakčnej zmesi, z dôvodu umožnenia naviazania sa primerov na komplementárne oblasti jednoreťazcových vlákien DNA. Primery predstavujú syntetizované jednovláknové oligonukleotidy, ktoré vymedzujú požadovanú amplifikovanú časť ich nasadnutím na protíľahlé jednoreťazcové vlákna DNA a smerujú proti sebe ich 3'– koncami. Teplota pre túto väzbu sa pohybuje v rozpätí 55 – 68 °C a daná reakcia prebieha počas 30 – 60 sekúnd (58).

V poslednom kroku, v extenzii alebo elongácii, nastáva tvorba nových vlákien DNA pôsobením enzýmu DNA – polymerázy, ktorý zabezpečuje predlžovanie primerov v smere 5'→3' pripájaním jednotlivých nukleotidov na základe komplementarity k templátovej DNA využívajúc voľnú 3'– OH skupinu (58,59). V PCR sa najčastejšie využívajú termostabilné DNA – polymerázy, ktoré odolávajú aj teplotám potrebným pre denaturáciu. Patrí k nim napr. Taq DNA – polymeráza, ktorá sa získava z termofilných baktérií *Thermus aquaticus*. Optimálna teplota tohto kroku sa pohybuje v rozmedzí 68 – 72 °C a rýchlosť syntézy PCR produktu Taq DNA – polymerázou je pri týchto podmienkach asi 60 báz za sekundu. Z toho vyplýva, že doba trvania posledného kroku závisí od dĺžky syntetizovaného vlákna (58).

Po ukončení celého procesu dochádza k ochladeniu získaných amplikonov na 4 °C, čo zabráni tvorbe prípadných nešpecifických produktov a umožní krátkodobé uskladnenie PCR produktu (60).

5.1.1.2. PCR Master mix

PCR Master mix alebo PCR reakčná zmes obsahuje už okrem spomínanej templátovej DNA, primerov, DNA – polymerázy, deoxyribonukleotidtrifosfátov a vody aj pufer a Mg^{2+} ióny, ktoré slúžia ako kofaktor pre daný enzým a sú dodávané najčastejšie v podobe $MgCl_2$. Pufer je získavaný väčšinou spolu s DNA – polymerázou a jeho zloženie súvisí s typom používaného enzýmu. Najčastejšie je jeho súčasťou TRIS – pufer a KCl.

Ďalšími zložkami tejto zmesi môžu byť zlúčeniny, ktoré ovplyvňujú priebeh PCR. Paria medzi ne napr. detergenty Triton X–100, Tween 20 a dimetylsulfoxid, ktoré môžu zasahovať do PCR zvýšením špecificity väzby primerov alebo potlačením vzniku sekundárnych štruktúr (60).

5.1.2. RFLP

Princíp metódy RFLP je založený na enzymatickom štiepení namnožených PCR produktov. Vykonanie tohto kroku umožňujú enzýmy restričné endonukleázy, ktoré rozlišujú pre ne špecifické rozpoznávacie miesto (57). Táto oblasť je väčšinou tvorená 4 až 8 nukleotidovou palindromickou sekvenciou. Samotné štiepenie DNA nastáva hydrolýzou fosfodiesterových väzieb oboch vlákien v tzv. restričnom mieste, ktoré sa nachádza priamo v rozpoznávacom mieste alebo v jeho blízkosti (61). Výsledkom je získanie rôzne dlhých restričných fragmentov, ktoré sú následne separované pomocou gélovej elektroforézy (57) a zviditeľnené napr. interkalačným fluorescenčným činidlom etídiumbromidom (32) alebo SYBR® Green (28).

Dĺžkový polymorfizmus restričných fragmentov vyšetrovanej DNA vzniká z dôvodu možného výskytu mutácií v pôvodných restričných miestach, ktoré môžu vyvolať vznik nového alebo zánik starého restričného miesta, a tým aj ovplyvniť výslednú dĺžku fragmentu.

V prípade mutácie S65C sa stráca v dôsledku zámény A za T restričné miesto pre enzým *Hinf*I, ktorý za normálnych okolností rozlišuje sekvenciu 5'– GAGTC – 3' a štiepi požadovaný PCR produkt (55).

5.2. Real – time PCR

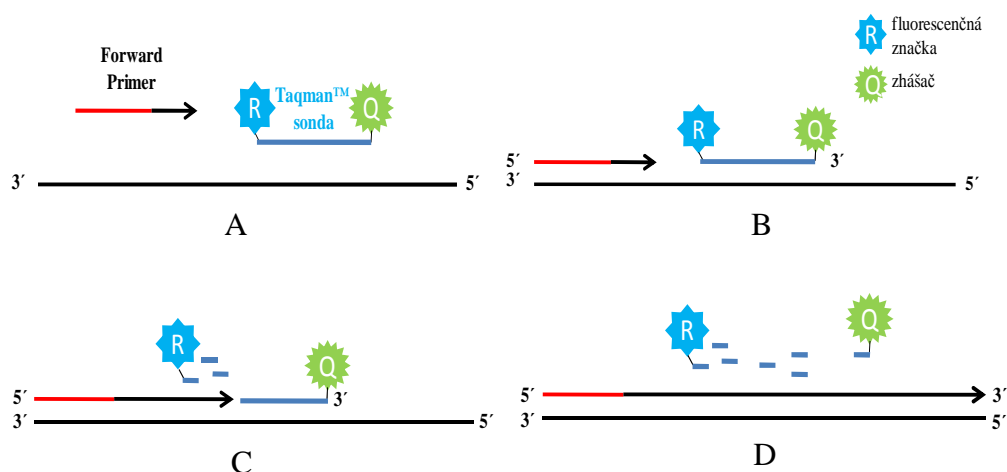
Real – time alebo „kinetická“ PCR je variantom metódy PCR, ktorá má široké uplatnenie v klinickej praxi, napr. v detekcii bodových mutácií, delécií, ale aj chromozómových aberácií. Podstatou tejto metódy je kvantifikácia vznikajúceho PCR produktu už počas prebiehajúcej reakcie, ktorá je zabezpečená vyhodnotením detekovaného fluorescenčného signálu. Kinetická PCR prebieha v upravených cykléroch a množstvo vznikajúcich amplikonov je možné zistiť využitím interkalačných farieb, fluorescenčne značených primerov alebo sond, ktoré sa vyväzujú na DNA.

Ako fluorofory sú používané látky, ktoré po absorpcii žiarenia o určitej vlnovej dĺžke emitujú žiarenie s inou vlnovou dĺžkou. Pri dvojito značených sondách sa využíva aj zhášač, ktorý absorbuje žiarenie vyžarované fluoroforom a zabezpečuje jeho rozptýlenie napr. vo forme tepla. Pre dosiahnutie optimálneho zhášania by sa malo absorpčné spektrum zhášača prekrývať s emisným spektrom fluoroforu (58).

5.2.1. SONDY Taqman™

V súčasnosti je real – time PCR založená na Taqman™ technológii jednou z najvýznamnejších metód kvantifikácie (48). Sondy Taqman™ sú oligonukleotidy, ktoré majú na ich 5'– konci vyviazanú fluorescenčnú značku a na 3'– konci zhášač. Po naviazaní na komplementárnu oblasť sekvencie DNA, je celá sonda rozložená pôsobením 5'– exonukleázovej aktivity Taq DNA – polymerázy, čo spôsobí uvoľnenie fluoroforu a emisiu fluorescenčného žiarenia (58).

V štúdiu Cukjatiho et al. boli navrhnuté fluorescenčne označené Taqman sondy, ktoré využívajú MGB (minor groove binder) pre detekciu mutácie S65C v HFE géne (48). MGB predstavuje nefluorescenčný zhášač, ktorý zvyšuje teplotu topenia sondy, vďaka jeho schopnosti viazať sa do úzkeho žliabku DNA. Preto môžu byť tieto sondy kratšie oproti ostatným sondám, teda 13 až 18 nukleotidov dlhé (62) a aj oproti ostatným DNA sondám špecifickejšie pre detekciu SNP (single nucleotide polymorphisms, jednonukleotidové polymorfizmy) (48).



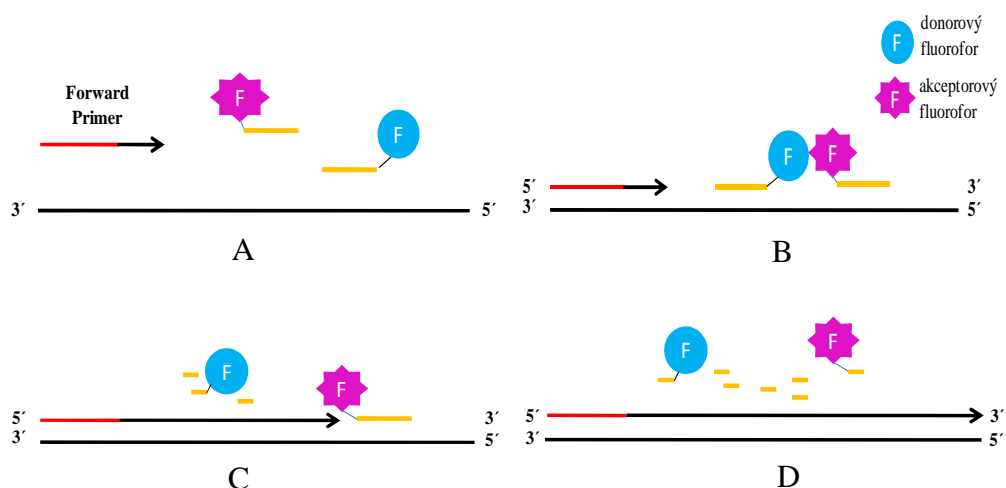
Obr. 5: Ukážka Taqman™ technológie: A – denaturácia, B – annealing, C – elongácia, D – ukončenie reakcie.

5.2.2. Sondy FRET

Medzi metódy vhodné pre analýzu mutácií v HFE géne patrí aj real – time PCR využívajúca FRET (prenos energie fluorescenčnou rezonanciou, fluorescence resonance energy transfer) sondy, nasledovaná analýzou teploty topenia v LightCycleri™. Táto technológia využíva dve fluorescenčne značené oligonukleotidové sondy. Jedna z nich je značená donorovým fluoroforom na jej 3'-konci a druhá akceptorovou fluorescenčnou značkou na jej 5'-konci. Po naviazaní sond na komplementárne oblasti DNA nachádzajúce sa na rovnakom reťazci je umožnený prenos energie medzi týmito fluoroforami v závislosti na ich vzdialenosti. Donorový fluorofor excitovaný vonkajším svetelným zdrojom emituje žiarenie, ktoré absorbuje akceptorový fluorofor. Následne je z neho vyžarovaná pohltená energia v podobe merateľného svetelného žiarenia (34).

Aby bolo možné tento prenos uskutočniť, je nutné splniť nasledujúce podmienky. Excitačné spektrum akceptorového fluoroforu sa musí prekrývať s emitačnou vlnovou dĺžkou donorového fluoroforu (63) a vzdialenosť fluorescenčne značených sond naviazaných na komplementárne oblasti cieľovej DNA sa musí pohybovať v rozpätí 1 až 5 nukleotidov (58).

Moysés a spol. využili pre analýzu mutácie S65C spolu s C282Y a H63D v HFE géne quenched – FRET metódu, ktorá umožňuje analýzu väčšieho počtu mutácií v rovnakej skúmavke. Táto technológia je podobná FRET metóde, avšak v dôsledku nahradenia akceptorového fluoroforu zhášačom je meraný pokles emisie donorového fluoroforu (34).



Obr. 6: Priebeh real – time PCR využívajúcej FRET sondy: A – denaturácia, B – annealing, C – elongácia, D – ukončenie reakcie.

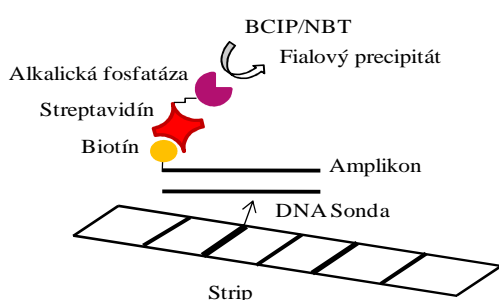
5.3. Reverzná hybridizácia

Podstatou hybridizácie je vytváranie dvojreťazcových molekúl DNA alebo RNA na základe úplnej alebo čiastočnej sekvenčnej komplementarity z vlákien, ktoré pochádzajú z rôzneho zdroja (61). V priebehu tejto metódy dochádza pôsobením zvýšenej teploty alebo pH k denaturácii a následne k opätovnému spájaniu vlákien pri tzv. renaturácii (55).

Pre detekciu požadovanej sekvencie sa v prípade hybridizačných reakcií využívajú molekulárne sondy, ktoré sú tvorené rádioaktívne alebo chemicky značenou jednovláknovou molekulou DNA alebo RNA.

Proces hybridizácie je možné prevádzať v roztoku, na pevných podkladoch alebo aj v preparátoch chromozómov. Reverzná hybridizácia patrí k reakciám prebiehajúcim na pevnom podklade, pri ktorých je základným krokom prenos denaturovanej DNA alebo RNA na nitrocelulóзовý filter alebo nylónovú membránu. V tomto prípade sa vyšetřované vzorky hybridizujú s imobilizovanými neznačenými sondami s hľadanou sekvenciou DNA (61).

Využitie rýchlej reverznej hybridizačnej metódy umožňujúcej simultánnu detekciu mutácií súvisiacich s rozvojom ochorenia hereditárnej hemochromatózy navrhli Kotze et al. Technika je založená na amplifikácii PCR produktu prostredníctvom multiplexovej PCR a následnej detekcii možných mutácií pomocou membránových testovacích stripov, ktoré boli pripravené vopred na použitie a obsahujú imobilizované oligonukleotidové sondy pre každú normálnu aj mutovanú alelu (30).



Obr. 7: Princíp reverznej hybridizácie biotinylovaných PCR produktov; upravené podľa Koeken et al. (2002).

Koeken et al. navrhli PCR – LiPA (line probe assay) metódu, ktorá umožňuje tak isto súčasnú detekciu mutácií S65C s C282Y a H63D. V priebehu nej dochádza k amplifikácii požadovaných úsekov HFE génu tiež pomocou multiplexovej PCR využitím biotinylovaných primerov. Následne sú získané biotinylované amplicony hybridizované s imobilizovanými sondami, ktoré sa vyskytujú v paralelnej línii na nitrocelulóзовom stripe. Vzniknuté hybridné

molekuly sú detekované použitím streptavidínu označeného alkalickou fosfatázou a chromogénneho substrátu BCIP/NBT (bromochloroindolylphosphate/nitro blue tetrazolium) za tvorby fialového precipitátu (64).

5.4. Sekvenovanie

Sekvenovanie je metóda, ktorá sa využíva na určenie primárnej štruktúry požadovaného úseku DNA. V laboratórnej praxi sa väčšinou realizuje po predchádzajúcej detekcii mutovanej alely a slúži pre potvrdenie jej prítomnosti.

V poslednej dobe sa najčastejšie využíva Sangerova alebo enzýmová metóda sekvenovania (55). Tento typ je založený na tvorbe rôzne dlhých úsekov DNA prostredníctvom DNA – polymerázy. Reakcia je ukončená začlenením 2', 3'- dideoxyribonukleotidu, tzv. terminátora syntézy reťazca, ktorý neobsahuje 3'- OH skupinu, a preto neumožňuje tvorbu ďalšej fosfodiesterovej väzby (59).

Nasledujúcim krokom je denaturácia, po ktorej sú v reakčnej zmesi prítomné rôzne dlhé jednoreťazcové molekuly DNA, ktoré na svojom 5'- konci obsahujú primer a na 3'- konci dideoxyribonukleotid (55). Pre analýzu týchto produktov sú dnes používané hlavne automatické sekvenátory, v ktorých prebieha separácia jednotlivých fragmentov najmä prostredníctvom kapilárnej elektroforézy. Detekcia nukleotidovej sekvencie prebieha na základe špecificky fluorescenčne značených primerov alebo dideoxyribonukleotidov so štyrmi rozdielnymi fluoroformi (59).

5.5. Ostatné metódy

Medzi ďalšie metódy, ktoré je možné využiť pre detekciu mutácie S65C, patrí alelovo špecifická PCR založená na dvoch alebo viacerých reakciách (54). Počas prvej z nich je využívaný primer rozlišujúci štandardnú sekvenciu DNA. V priebehu ďalšej reakcie sa aplikuje primer komplementárny k sekvencii obsahujúcej hľadanú mutáciu. V prípade homozygotnej formy výskytu bude vychádzať len jedna z reakcií (58). Medintz et al. použili vo svojej štúdií kombináciu tejto metódy s fluorescenčne značenými primerami a radiálnej kapilárnej elektroforézy umiestnenej na mikrodostičke pre detekciu mutácií v HFE géne (54).

Jednou z ďalších možností je využitie metódy SSCP (konformačný polymorfizmus jednovláknovej DNA, single-strand conformation polymorphism) (44), ktorá je založená na denaturácii dvojreťazcov, získaných prostredníctvom PCR, formamidom alebo teplom a následnej elektroforetickej separácii v nedenaturačnom polyakrylamidovom géle. Prítomnosť pozmenenej sekvencie je možné detekovať na základe rozdielnej migračnej schopnosti sekundárnych štruktúr danej molekuly (65).

Iná štúdia Biasiotta et al. uvádza pre detekciu mutácie S65C využitie denaturačnej HPLC metódy založenej na rozdielnej separácii homoduplexov a heteroduplexov, ktoré boli získané predchádzajúcou denaturáciou PCR produktu (37).

6. Cieľ diplomovej práce

1. Zavedenie vyšetrovacej metódy PCR – RFLP pre stanovenie mutácie S65C v HFE géne:
 - a) Optimalizácia podmienok metódy PCR
 - b) Optimalizácia podmienok metódy RFLP
2. Aplikácia metódy PCR – RFLP pre vyšetrenie klinických vzoriek
3. Zistenie a porovnanie výskytu mutácie S65C vo vyšetrovaných vzorkách

Experimentálna časť

7. Materiál a metodika

7.1. Použité chemikálie

Pre izoláciu DNA zo vzoriek bol využitý kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, SRN). Pre prevedenie metódy PCR boli použité nasledujúce chemikálie: 10× TaKaRa Taq™ Buffer, obsahujúci 15 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 500 mmol.l⁻¹ KCl a 100 mmol.l⁻¹ TRIS – HCl (pH = 8,3), ďalej 2,5 mmol.l⁻¹ dNTPs a 5 U.μl⁻¹ TaKaRa Taq™ HS DNA – polymeráza (TaKaRa SHUZO CO. Ltd., Otsu, Shiga, Japonsko). Medzi ďalšie chemikálie patril 100 pmol.μl⁻¹ zásobný roztok primerov so sekvenciami 5′– ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC – 3′ a 5′– GCC ACA TCT GGC TTG AAA TT – 3′, z ktorého bol pripravený 10 pmol.μl⁻¹ pracovný roztok (GENERI BIOTECH, Hradec Králové). Taktiež boli využité aqua pro inj.(B. Braun Melsungen AG, Melsungen, SRN) a 25 mmol.l⁻¹MgCl₂(Roche Diagnostics, Mannheim, SRN).

Pre uskutočnenie gélovej elektroforézy boli použité agaróza (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, SRN), 10 mg.ml⁻¹ etídiumbromid, TBE tlmivý pufer obsahujúci kyselinu boritú, EDTA, Trizma base a HCl (Sigma – Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA).

Medzi ďalšie využívané chemikálie patrili nanášací tlmivý roztok obsahujúci sacharózu (Sigma – Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) a brómfenolovú modrú (AMRESCO Inc., Solon, OH, USA), DNA marker *Low Molecular Weight DNA Ladder* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) a DNA marker *Molecular Weight Marker XIII* (Roche Diagnostics, Mannheim, SRN).

Restrikčná analýza bola uskutočnená pomocou 10× NEBuffer 4 a restrikčného enzýmu 10 000 U.ml⁻¹ HInfI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). 10× NEBuffer 4 je dodávaný spolu s enzýmom HInfI. 1× NEBuffer 4 obsahuje 50 mmol.l⁻¹ acetát draselný, 20 mmol.l⁻¹ TRIS – acetát, 10 mmol.l⁻¹ acetát horečnatý, 1 mmol.l⁻¹ DTT a pH je 7,9.

Restrikčný enzým HInfI je dodávaný v 50 mmol.l⁻¹ KCl, 10 mmol.l⁻¹ TRIS – HCl (pH = 7,4), 0,1 mmol.l⁻¹ EDTA, 1 mmol.l⁻¹ DTT, 200 μg.ml⁻¹ BSA a 50% glycerole. Jeho rozpoznávací sekvencia je 5′– G/ANTC – 3′.

7.2. Prístroje

Pri práci bola využitá centrifúga Microfuge 18 Centrifuge (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA) a pre stanovenie koncentrácie a čistoty vyizolovanej DNA sa použil prístroj Thermo Scientific NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific – NanoDrop products, Wilmington, DE, USA).

PCR reakcia bola vykonaná v cykléri PTC – 220 DNA Engine Dyad™ Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) a pre inkubáciu restriktívnej zmesi bol využitý termocyklér GeneAmp PCR systeme 2400 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Elektroforetickej separácia bola prevedená v elektroforetickej vani model B2 (OWL Separation Systems Inc., Portsmouth, NH, USA) a bol využitý elektroforetický zdroj Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA).

Pre detekciu a gélovú dokumentáciu PCR produktov a restriktívnych fragmentov bol použitý UV transluminátor TVC – 312 A (Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA), kamera pripojená k počítaču a software: BioCapt Version 11.03 (Vilber Lourmat, Torcy Z.I. Sud, Francúzko).

7.3. Anonymizovaná vzorka DNA

Pre optimalizáciu PCR a RFLP bola v práci použitá anonymizovaná vzorka DNA s koncentráciou 23,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a čistotou 1,8.

7.4. Charakteristika vyšetrovaného súboru pacientov

V tejto štúdií bolo vyšetrených 140 patientskych vzoriek. Z celkového počtu pacientov tvorili muži 68 % ($n = 95$) a ženy 32 % ($n = 45$). Títo jedinci sa nachádzali vo veku 20 až 83 rokov; medián veku mužov bol 56 a žien 55 rokov.

Vyšetrenie vzoriek bolo indikované z rôznych oddelení. Medzi najčastejšie z nich patrili: gastroenterologická a hepatologická poradňa, transfúzne oddelenie, oddelenie interné a oddelenie klinickej hematológie.

Analýza DNA bola najčastejšie požadovaná u pacientov trpiacich ochorením pečene s nešpecifickými prejavmi. Medzi ďalšie časté diagnózy patrila hepatitída, alkoholická cirhóza a steatóza pečene. Okrem nich boli často žiadané aj vyšetrenia vzoriek pacientov s poruchami metabolizmu železa, anémiou z nedostatku železa alebo vitamínu B12, prípadne pacientov postihnutých dyspepsiou.

V súbore pacientov bola už vyšetrená prítomnosť mutácií C282Y a H63D. Homozygotná forma C282Y bola nájdená u 18 a heterozygotná u 15 pacientov. V 7 vyšetovaných vzorkách sa vyskytovala homozygotná podoba mutácie H63D a v 35 prípadoch heterozygotná forma tejto mutácie. Zložení heterozygoti C282Y/H63D boli u 3 pacientov. U zvyšných 68 vzoriek nebola prítomná žiadna z týchto mutácií. Informácie o výskyte C282Y a H63D v závislosti na pohlaví sú uvedené v Tab. 2.

Vyšetrenie vzoriek a výber dát z laboratórneho informačného systému boli prevedené so súhlasom Etickej komisie Fakultnej nemocnice Hradec Králové a vedenia Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky Fakultnej nemocnice Hradec Králové.

*Tab. 2 : Zastúpenie jednotlivých mutácií u pacientov
v absolútnych počtoch (a percentuálne)*

	Bez nálezu	C282Y M/wt	C282Y M/M	H63D M/wt	H63D M/M	C282Y M/wt / H63D M/wt	Celkový počet
Počet vzoriek	68 (48 %)	15 (11 %)	18 (13 %)	35 (25 %)	7 (5 %)	3 (2 %)	140 (100 %)
Muži	45 (47 %)	10 (11 %)	14 (15 %)	24 (25 %)	4 (4 %)	2 (2 %)	95 (100 %)
Ženy	23 (51 %)	5 (11 %)	4 (9 %)	11 (24 %)	3 (7 %)	1 (2 %)	45 (100 %)

M – mutant type

wt – wild type

7.5. Izolácia DNA z plnej nezrážanlivej krvi kitom QIAamp® DNA Mini Kit

K izolácii DNA zo vzoriek plnej nezrážanlivej krvi bol použitý kit QIAamp® DNA Mini Kit, ktorý umožňuje purifikáciu DNA od proteínov, nukleáz, a iných kontaminant.

Do 1,5 ml skúmavky bolo napipetovaných 200 µl AL pufru, ku ktorému sa pridalo 200 µl vopred na laboratórnu teplotu vytemperovanej vzorky plnej nezrážanlivej krvi a 20 µl proteázy Q. Táto zmes bola následne zvortexovaná a inkubovala sa 10 minút pri teplote 56 °C. Počas tohto kroku dochádzalo k lýze buniek a bunečných štruktúr.

Po centrifugácii bolo do skúmavky pridaných 200 µl 96 – 100% etanolu a znovu sa celá zmes zvortexovala a scentrifugovala. V ďalšom kroku bola vzorka opatrne preliata na kolónku so zbernou skúmavkou tak, aby sa zabránilo zmáčaniu stien kolónky. Počas nasledovnej krátkej centrifugácie, ktorá trvala 1 minútu a prebiehala pri 6000×g,

dochádzalo k vyviazaniu DNA na QIAamp kremennú membránu v kolónke. QIAamp kolónka bola následne vybratá a premiestnená do novej 2 ml zbernej skúmavky. Použitá skúmavka s filtrátom sa odstránila.

Na kolónku sa napipetovalo 500 μ l premývacieho AW1 pufru a znovu sa opakovala centrifugácia počas 1 minúty pri 6000 \times g. QIAamp kolónka bola opätovne vybratá a premiestnená do novej 2 ml zbernej skúmavky.

Potom sa na kolónku pridávalo 500 μ l premývacieho AW2 pufru a nasledovala centrifugácia pri 20 000 \times g trvajúca 3 minúty. Kolónka bola následne premiestnená do novej 1,5 ml zbernej skúmavky.

V poslednom kroku bola vyviazaná DNA z kolónky eluovaná nanesením 150 μ l AE pufru predhriateho na 70 °C. Nasledovala inkubácia prebiehajúca 1 minútu pri laboratórnej teplote a centrifugácia počas 1 minúty pri 6000 \times g. Získaný eluát sa následne zvortexoval. Takto pripravenú DNA bolo možné dlhodobo skladovať pri teplote -20 °C (66).

Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA sa prevádzalo spektrofotometricky pomocou prístroja Thermo Scientific NanoDrop 1000 premeraním 2 μ l vzorky s izolovanou DNA. Táto metóda je založená na meraní absorpcie pri vlnovej dĺžke 260 a 280 nm. Vzhľadom na to, že nukleové kyseliny majú absorpčné maximum pri 260 nm, sa koncentrácia DNA určuje pri tejto vlnovej dĺžke. Pretože najčastejšou kontamináciou vzoriek sú proteíny a organické zlúčeniny s všeobecným absorpčným maximom pri 280 nm, využíva sa pri určovaní čistoty DNA pomer absorpcií A_{260}/A_{280} .

Optimálne koncentrácie DNA by sa mali pohybovať v rozmedzí 20 – 60 μ g.ml⁻¹ s čistotou 1,7 – 1,9. Získané vzorky mali priemernú hodnotu koncentrácie $33,7 \pm 14,1$ μ g.ml⁻¹ s čistotou $1,9 \pm 0,2$. Hodnota smerodajnej odchýlky je pravdepodobne ovplyvnená možným výskytom chýb v preanalytickej či analytickej časti a biologickou variabilitou medzi jedincami.

7.6. Používané štatistické metódy

Pre výpočet dát (číselný priemer a smerodajná odchýlka) bol použitý program Microsoft Office Excel, verzia 2007.

8. Výsledky

Experimentálna časť diplomovej práce sa skladala z dvoch častí: optimalizácie PCR – RFLP a vyšetrenia klinických vzoriek.

8.1. Optimalizácia PCR – RFLP analýzy mutácie S65C v HFE géne

8.1.1. Optimalizácia podmienok PCR

Cieľom optimalizácie metódy PCR bolo získanie čo najväčšieho množstva amplikonov požadovaného úseku HFE génu v oblasti možného výskytu mutácie S65C a minimalizácia možného vzniku nešpecifických produktov.

V prvom kroku bola pripravená základná reakčná zmes, ktorej celkový objem bol 23 μl . Finálna koncentrácia jednotlivých komponent bola:

- 1 \times TaKaRa TaqTM Buffer
- 0,2 mmol.l⁻¹ dNTPs
- 0,4 pmol. μl^{-1} primer HFE 1
- 0,4 pmol. μl^{-1} primer HFE 2
- 1,5 U. μl^{-1} TaKaRa TaqTM HS DNA – polymeráza

Do takto pripravenej reakčnej zmesi boli následne pridané rôzne objemy MgCl₂, primerov a anonymizovanej vzorky DNA podľa Tab. 3.

Tab. 3: Zloženie výslednej PCR reakčnej zmesi a teplota annealingu

Číslo vzorky	Reakčná PCR zmes (μl)	MgCl ₂ (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	DNA (μl)	Teplota annealingu (°C)
1	23	0	0	0	5	55
2	23	0	1	1	2	55
3	23	0	0	0	2	59
4	23	0	0	0	2	51
5	23	2,4	0	0	2	55
6	23	1,2	0	0	2	55
7	23	0	0	0	2	55

Pri optimalizácii PCR podmienok bola PCR reakcia vykonaná za týchto podmienok:

1. počiatočná denaturácia: 94 °C – 5 minút
2. opakovanie 30 cyklov:
 - a) denaturácia: 94 °C – 30 sekúnd
 - b) annealing: 40 sekúnd, pri teplote – pozri Tab. 3
 - c) elongácia: 72 °C – 35 sekúnd
3. záverečná elongácia: 72 °C – 5 minút

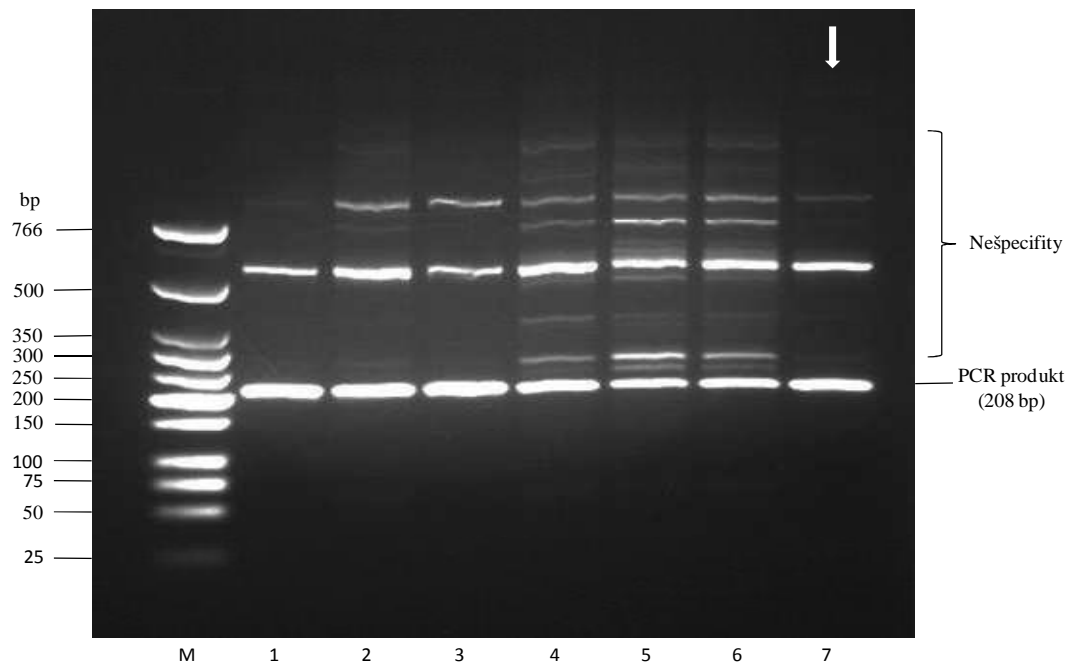
8.1.2. Kontrola PCR účinnosti a detekcia DNA fragmentov prostredníctvom gélovej horizontálnej elektroforézy

Pre kontrolu PCR účinnosti a detekciu získaných produktov bola urobená gélová elektroforéza. Separácia prebiehala na 2% agarózovom géle, ktorý bol pripravený rozpustením 2 g agarózy v 100 ml TBE tlmivého pufru s prídavkom 5 µl etídiumbromidu. Po stuhnutí bol gél prenesený do aparatury a zaliaty TBE pufrom. Pre prípravu jedného litra zásobného roztoku TBE tlmivého pufru bolo potrebných 27,65 g kyseliny boritej, 3,72 g EDTA a 53,90 g Trizma base. Pomocou 10 mol.l⁻¹ HCl bolo výsledné pH upravené na 8,0. Pre prípravu gélu a prevedenie elektroforézy bol pripravený pracovný roztok tohto pufru nariadením s destilovanou vodou v pomere 1:9.

Pre naniesenie 10 µl vzoriek a 3 µl veľkostného markeru *Low Molecular Weight DNA Ladder* (alebo *Molecular Weight Marker XIII*) na gél boli použité 3 µl nanášacieho pufru, ktorý bol pripravený rozpustením 8 g sacharózy a 0,03 g brómfenolovej modrej v 20 ml destilovanej vody. Úlohou sacharózy bolo zvýšiť hustotu vzorky, a tým uľahčiť klesnutie DNA na dno jamky. Farbivo brómfenolová modrá slúžilo ako indikátor pre ukončenie elektroforézy vďaka jeho rýchlejšej migrácii oproti DNA.

Gélová elektroforéza prebiehala pri 105 V počas 90 minút pri laboratórnej teplote. Po jej ukončení boli DNA fragmenty detekované prostredníctvom UV transluminátora. Pozri Obr. 8.

V dôsledku vzniku malého množstva nešpecifických produktov bol pre priebeh metódy PCR zvolený ako najvhodnejší postup, ktorý bol aplikovaný pri amplifikácii vzorky č. 7 z Tab. 3 (Obr. 8). Táto vzorka bola uprednostnená pred vzorkou č. 1 z dôvodu menšieho množstva prídavanej DNA do PCR reakčnej zmesi a neobsahovala prídavky primerov a MgCl₂. Teplota annealingu bola 55 °C.



Obr. 8: Ukážka detekcie získaných PCR produktov pri optimalizácii podmienok PCR na 2% agarózovom géle. V pozícii M sa nachádza veľkostný marker Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Do pozícií 1 – 7 boli napipetované jednotlivé vzorky, ktoré boli amplifikované podľa podmienok v Tab. 3.

8.1.3. Optimalizácia podmienok restriktívnej analýzy

Pre zistenie najvhodnejších podmienok priebehu restriktívnej analýzy bol do 200 μl skúmaviek napipetovaný určitý objem PCR produktu, pufru 10 \times NEBuffer 4 a restriktívneho enzýmu HInfI podľa Tab. 4. Inkubácia restriktívnej zmesi prebiehala pri 37 °C a trvala 1, 3 a 16 hodín.

Tab. 4: Podmienky optimalizácie RFLP

Inkubácia	1 hod			3 hod			16 hod		
Číslo vzorky	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR produkt (μl)	5	10	10	5	10	10	5	10	10
NEBuffer 4 (μl)	1	1,2	1,1	1	1,2	1,1	1	1,2	1,1
HInfI (μl)	2	1	0,5	2	1	0,5	2	1	0,5

Separácia restriktívnych fragmentov prostredníctvom gélovej elektroforézy bola prevedená podobne ako analýza PCR produktov na 2% agarózovom géle. Postup prípravy gélu a samotnej separácie sa líšil len v nasledujúcich bodoch.

Pre nanosenie 15 μl vzoriek a 3 μl veľkostného markeru *Molecular Weight Marker XIII* na gél boli použité 3 μl nanášacieho pufru.

Elektroforetická separácia prebiehala pri 100 V počas 90 minút pri laboratórnej teplote. Po jej prebehnutí boli restriktívne fragmenty získané počas optimalizácie RFLP detekované prostredníctvom UV transluminátora. Pozri Obr. 9.

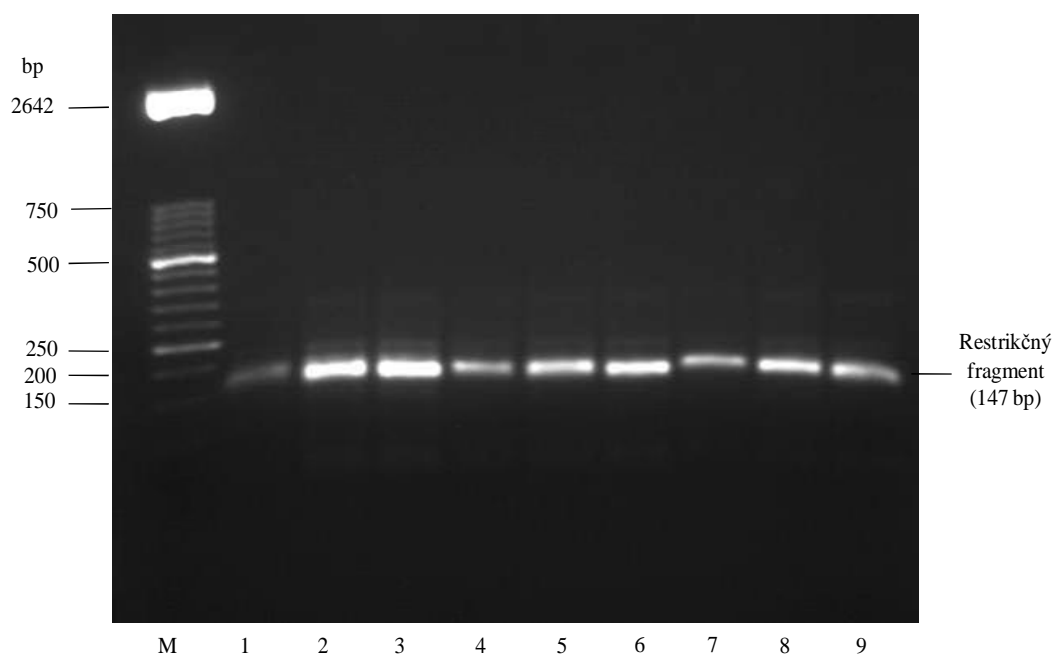
Pri vyhodnotení optimalizácie restriktívnej analýzy bol pozorovaný rozdiel v jednotlivých nálezoch vzoriek, ktoré sa líšili objemom pridávaného PCR produktu. Zistilo sa, že použitie objemu 5 μl oproti 10 μl produktu je nevýhodné z dôvodu malej intenzity výsledného produktu (Obr. 9).

Taktiež bolo preukázané, že rozdiely v pridávanom objeme 10 \times NEBuffer 4 nemajú výrazný vplyv na priebeh restriktívnej analýzy. Preto bol zvolený používaný objem 1 μl pufru (Obr. 9).

Rozdielne ovplyvnenie tejto reakcie nebolo pozorované ani pri 3– a 16– hodinovej inkubácii. Pre vyšetrovanie klinických vzoriek bola uprednostnená dlhšia doba inkubácie. Tento krok bol zvolený, hlavne z dôvodu uistenia sa, že daná reakcia prebehla úplne, ale aj

kvôli predchádzaniu možnej nesprávnej interpretácie výsledkov. Napr. v prípade získania hustejších extraktov DNA by nemusel byť kratší priebeh restrikcie dostatočný. Získané výsledky by mohli byť vyhodnotené ako falošne pozitívny nález heterozygotnej formy mutácie S65C, čo nie je žiaduce.

V prípade neprítomnosti mutácie S65C v HFE géne je restrikčné miesto pre enzým nepozmenené a dochádza k štiepeniu PCR produktu (208 bp) na dva restrikčné fragmenty s dĺžkou 147 bp a 61 bp. Avšak vďaka predĺženému času elektroforézy, nie je na Obr. 9 vidieť restrikčný fragment s dĺžkou 61 bp.



Obr. 9: Ukážka detekcie restrikčného fragmentu o dĺžke 147 bp pri optimalizácii RFLP na 2% agarózovom géle. V pozícii M sa nachádza veľkostný marker Molecular Weight Marker XIII (Roche Diagnostics, Mannheim, SRN), pozície 1 – 9 predstavujú jednotlivé vzorky, ktoré boli štiepené podľa podmienok v Tab. 4.

8.2. Analýza klinických vzoriek

Pre vyšetrenie DNA získanej z reálnych klinických vzoriek, kontrolu PCR účinnosti a detekciu PCR produktov boli používané rovnaké postupy aké boli uvedené vyššie v kapitolách 8.1.1. a 8.1.2.

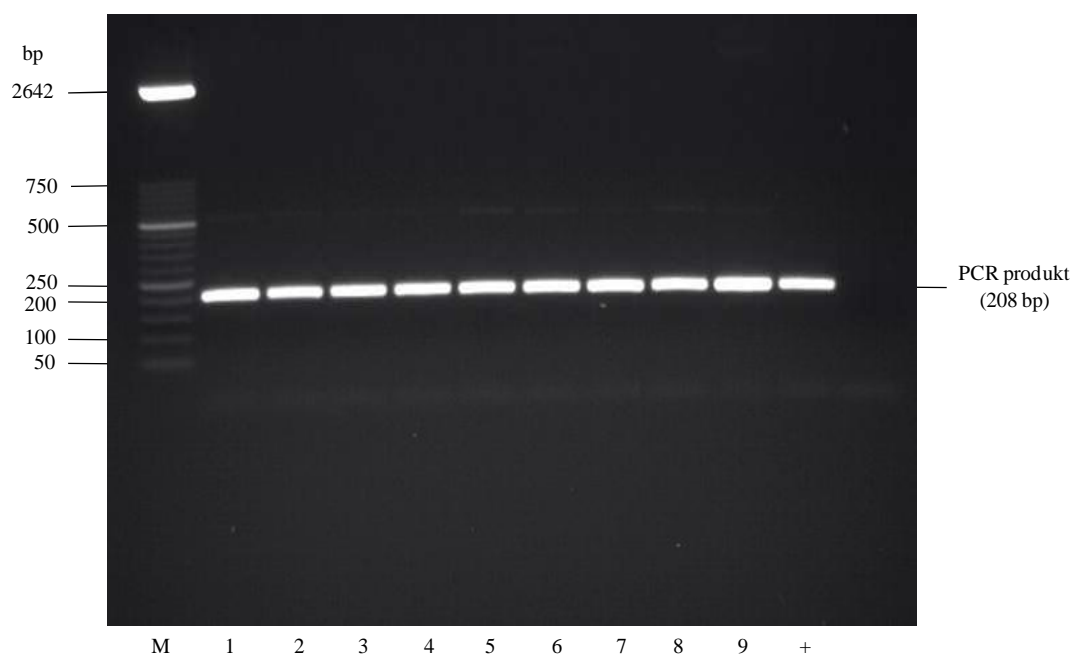
Tab. 5: Zloženie optimalizovanej reakčnej zmesi

Zložka	Koncentrácia pracovného roztoku	Objem (25 μ l)	Finálna koncentrácia v reakčnej zmesi
TaKaRa Taq TM Buffer	10 \times	2,5 μ l	1 \times
dNTPs	2,5 mmol.l ⁻¹	2 μ l	0,2 mmol.l ⁻¹
primer HFE 1	10 pmol. μ l ⁻¹	1 μ l	0,4 pmol. μ l ⁻¹
primer HFE 2	10 pmol. μ l ⁻¹	1 μ l	0,4 pmol. μ l ⁻¹
TaKaRa Taq TM HS DNA – polymeráza	5 U. μ l ⁻¹	0,3 μ l	1,5 U. μ l ⁻¹
DNA templát	cca 33,7 ng. μ l ⁻¹	2 μ l	cca 2,7 ng. μ l ⁻¹
H ₂ O	–	16,2 μ l	–

Tab. 6: Podmienky priebehu metódy PCR

	Teplota (°C)	Čas
Počiatočná denaturácia	94	5 minút
Opakovanie 30 cyklov:		
Denaturácia	94	30 sekúnd
Annealing	55	40 sekúnd
Elongácia	72	35 sekúnd
Záverečná elongácia	72	5 minút

Dĺžka získaných ampliconov bola 208 bp. Ukážka je uvedená na Obr. 10.

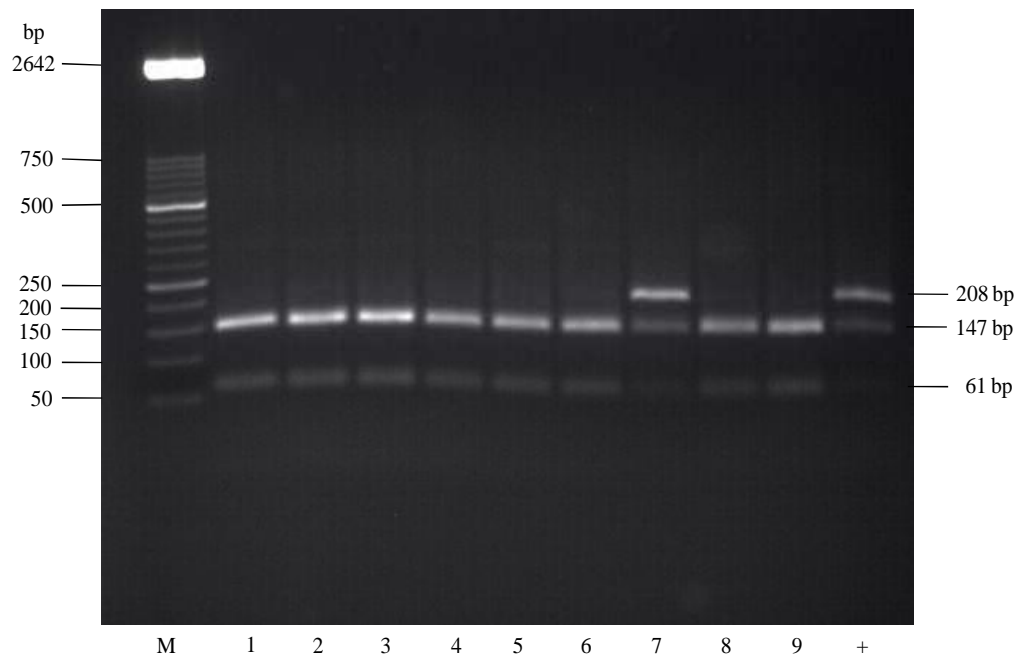


Obr. 10: Ukážka detekcie PCR produktov na 2% agarózovom géle. V pozícii M sa nachádza veľkostný marker Molecular Weight Marker XIII (Roche Diagnostics, Mannheim, SRN), pozície 1 – 9 predstavujú jednotlivé vzorky a + značí pozitívnu kontrolu.

Restriktcia jednotlivých PCR produktov a následná analýza restriktčných fragmentov prebiehala podobne ako bolo uvedené v kapitole 8.1.3. Ukážka je uvedená na Obr. 11.

Tab. 7: Optimálne zloženie restriktčnej zmesi a doba inkubácie

Inkubácia	Restriktčná zmes	Objem (μl)
16 hod	HinfI	1
	10× NEBuffer 4	1
	DNA	10



Obr. 11: Ukážka detekcie restriktčných fragmentov na 2% agarózovom géle. V pozícii M sa nachádza veľkostný marker Molecular Weight Marker XIII (Roche Diagnostics, Mannheim, SRN), pozície 1 – 9 predstavujú jednotlivé vzorky. U vzoriek 1 – 6, 8 a 9 bol negatívny nález, sú prítomné fragmenty dlhé 147 bp a 61 bp. U vzorky 7 bola nájdená heterozygotná forma mutácie S65C, teda restriktčné fragmenty o veľkosti 208 bp, 147 bp a 61 bp. + značí pozitívnu kontrolu.

Pri interpretácii výsledkov bolo možné pozorovať tri rôzne nálezy (genotypy). V prípade neprítomnosti mutácie S65C v HFE géne sú obe alely zdravé (wt/wt) a restriktčné miesto pre enzým nie je pozmenené. Na géle sa nachádzali dva restriktčné fragmenty s dĺžkou 147 bp a 61 bp.

Ďalšou možnosťou je výskyt S65C v homozygotnej podobe (M/M), kedy je prítomná mutácia na oboch alelách. Amplikon veľký 208 bp zostáva celý v dôsledku straty restriktčného miesta. Poslednou variantov je heterozygotná forma mutácie (M/wt), kedy sú pozorovateľné fragmenty dlhé 208 bp, 147 bp a 61 bp.

Tab. 8: Interpretácia nájdených fragmentov

Genotyp	Dĺžka fragmentu
wt/wt	61 bp, 147 bp
M/wt	61 bp, 147 bp a 208 bp
M/M	208 bp

8.3. Výsledky vyšetrenia klinických vzoriek

V súbore 140 vyšetovaných klinických vzoriek bolo detekovaných 5 pozitívnych nálezov mutácie S65C. Štyri vzorky pochádzali od mužov vo veku 32 až 76 rokov a jedna od ženy vo veku 31 rokov. Viac informácií je uvedených v Tab. 9.

Tab. 9: Nález mutácie S65C

Číslo vzorky	Pohlavie	Vek	Diagnóza	S65C	C282Y	H63D
1	žena	31	hepatitída A	M/wt	wt/wt	wt/wt
2	muž	32	ochorenie pečene	M/wt	wt/wt	wt/wt
3	muž	56	ochorenie pečene	M/wt	wt/wt	wt/wt
4	muž	63	poruchy metabolizmu železa	M/wt	M/wt	wt/wt
5	muž	76	dyspepsia	M/wt	M/wt	wt/wt

U žiadneho pacienta nebola detekovaná homozygotná forma mutácie S65C (Tab. 10). U 5 pacientov sa vyskytovala heterozygotná podoba mutácie S65C (3,6 %). V prípade dvoch nálezov je možné hovoriť o prítomnosti zloženého heterozygota C282Y/S65C (1,4 %). Frekvencia alely S65C bola 1,8 % (Tab. 11).

Tab. 10: Frekvencia genotypu

Genotyp	Počet jedincov s hodnoteným genotypom	Frekvencia genotypu (%)
wt/wt	135	96,4
M/wt	5	3,6
M/M	0	0

Tab. 11: Frekvencia alely

Alela	Počet hodnotených aliel	Frekvencia alely (%)
wt	275	98,2
M	5	1,8

Medzi zložených heterozygotov C282Y/S65C patrili dvaja pacienti. V Tab. 12 a v Tab. 13 sú uvedené vyšetrené biochemické hodnoty v dlhšom časovom období v priebehu liečby (venepunkciou, chelátormi a diétou) pacienta. Tento jedinec bol muž, vo veku 63 rokov s diagnózou poruchy metabolizmu železa. Medzi jednotlivými vyšetreniami je viditeľný pokles hodnôt feritínu (Obr. 12 – A), železa (Obr. 12 – B) a saturácie transferínu (Obr. 12 – D).

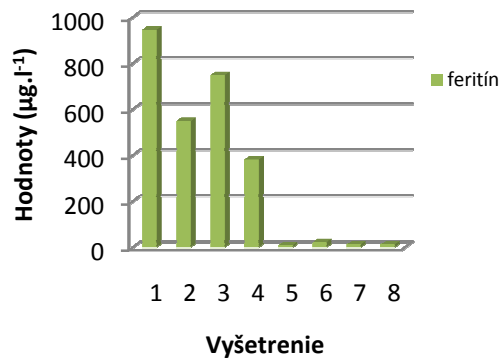
Výsledky týchto vyšetrení od druhého pacienta neboli k dispozícii, z dôvodu zaslania tejto vzorky na vyšetrenie prítomných mutácií v HFE géne z regionálnej nemocnice.

Tab. 12: Biochemické parametre u zloženého heterozygota C282Y/S65C v priebehu augusta 2004 až februára 2005

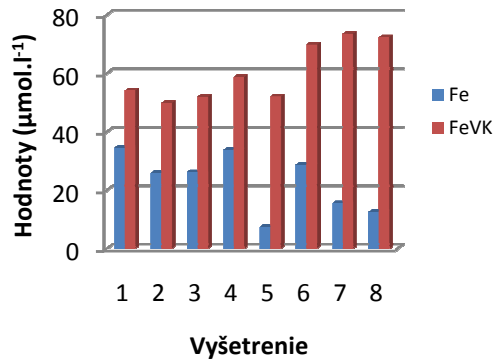
Poradie vyšetrenia	August 2004	November 2004	Január 2005	Február 2005	Referenčné hodnoty
Feritín ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	946,6	549,8	749,8	382,4	14 – 284
Transferín (g.l^{-1})	2,49	2,41	2,24	2,89	2,0 – 3,6
Fe ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	34,5	25,9	26,2	33,7	6,6 – 28,3
FeVK ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	54,1	49,8	52,0	58,7	44,8 – 73,6
Saturácia transferínu (%)	64	52	50	57	15 – 50

Tab. 13: Biochemické parametre u zloženého heterozygota C282Y/S65C v priebehu apríla 2005 až januára 2006

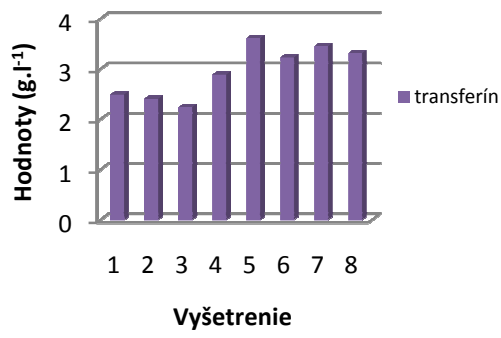
Poradie vyšetrenia	Apríl 2005	Júl 2005	September 2005	Január 2006	Referenčné hodnoty
Feritín ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	9,7	23,2	13,2	13,4	14 – 284
Transferín (g.l^{-1})	3,61	3,23	3,45	3,31	2,0 – 3,6
Fe ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	7,5	28,7	15,6	12,6	6,6 – 28,3
FeVK ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	52,1	69,8	73,5	72,3	44,8 – 73,6
Saturácia transferínu (%)	14	41	21	17	15 – 50



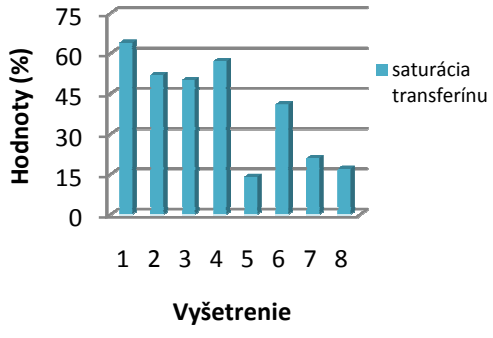
A



B



C



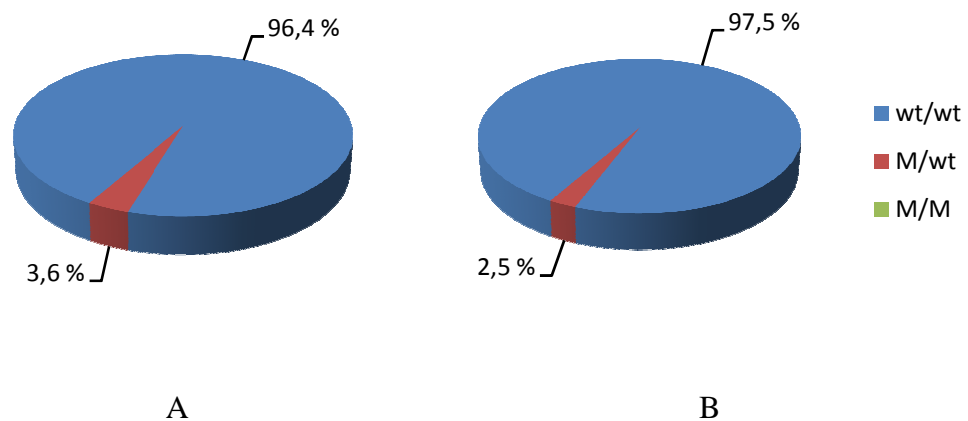
D

Obr. 12: Grafy znázorňujú časový priebeh jednotlivých parametrov v priebehu liečby u zloženého heterozygota C282Y/S65C. A – Časový priebeh koncentrácie ferritínu. B – Časový priebeh koncentrácie transferínu. C – Časový priebeh koncentrácie železa a väzbovej kapacity pre železo. D – Časový priebeh saturácie transferínu.

9. Diskusia

V roku 2005 boli prvýkrát v Českej republike uverejnené frekvencie genotypov a aliel mutácie S65C v HFE géne v štúdií Čimburovej et al. (32). Bolo zistené, že mutácia S65C sa v homozygotnej podobe nevyskytuje u žiadneho pacienta a v heterozygotnej forme je u 2,49 % populácie. V Slovenskej republike bola prvýkrát táto mutácia detekovaná v roku 2010 v štúdií Gabrikovej et al. (33). Nález homozygotnej formy bol rovnaký ako v Českej republike, no výskyt heterozygotnej podoby bol porovnateľný, 2,51 %. Z týchto údajov vyplývalo, že každá 40. osoba v českej, ale aj v slovenskej populácii je heterozygotom pre túto mutáciu.

V iných krajinách bola frekvencia jednotlivých genotypov podobná. Na Faerských ostrovoch bol nájdený heterozygotný genotyp mutácie S65C u 2 % populácie (51). V Slovinsku bol výskyt tohto genotypu o niečo vyšší, 3,7 % (48).



Obr. 13: Porovnanie frekvencie genotypov z tejto práce (A) a štúdie Gabrikovej et al. v Slovenskej republike (B). V grafe A je znázornená frekvencia heterozygotného genotypu (M/wt) ako 3,6 %. Mutácia S65C nebola prítomná u 96,4 % vzoriek. V grafe B je zobrazený výskyt heterozygotnej podoby mutácie S65C (M/wt) ako 2,5 %. Mutácia S65C nebola nájdená u 97,5 % prípadov (33).

Alelová frekvencia mutácie S65C sa v európskej populácii pohybovala v rozmedzí 0,5 – 3,0 % (32). V prípade štúdie Trombiniho et al. bola určená frekvencia S65C v Taliansku ako 0,9 %, čo zodpovedalo nižšiemu výskytu tejto mutácie v oblasti Stredomoria (45). V iných krajinách bola zistená vyššia alelová frekvencia, napr. v Dánsku (46) a Slovinsku ako 1,8 % (48) a vo Francúzku ako 1,95 % (52). Najvyššie hodnoty boli detekované v oblasti severnej Európy – vo Fínsku 2,3 % a v populácii Saami vo Švédsku 3 % (47). V štúdiách uverejňujúcich výskyt v českej a slovenskej populácii bol tento výsledok nižší, 1,25 % (32,33).

Pre analýzu mutácie S65C v HFE géne a zistenie frekvencií genotypov a aliel bola v tejto práci zvolená metóda PCR – RFLP, ktorá patrí medzi jednu z najčastejšie využívaných metód v laboratórnej praxi. Zavedenie tejto techniky umožnilo rozšíriť spektrum dosiaľ stanovovaných mutácií C282Y a H63D a zefektívniť laboratórnu diagnostiku hereditárnej hemochromatózy.

Pre prevedenie tejto techniky boli pôvodne zvolené primery z práce Cukjatiho et al. (48). Avšak pre stanovenie mutácie S65C sa neosvedčili. Po restriktívnej analýze bolo zistené, že PCR produkt obsahuje viac než 1 rozpoznávacie miesto pre konkrétny enzým a to by mohlo negatívne ovplyvňovať vyhodnocovanie výsledkov. Z tohto dôvodu boli vybrané primery zo štúdie Oliveira et al. (28), ktoré využil aj Beckam et al. (47) a boli zhodné aj s primerami používanými na Ústave klinickej biochémie a diagnostiky Fakultnej nemocnice Hradec Králové pre už zavedenú analýzu mutácie H63D. Použitie týchto primerov umožnilo minimalizáciu stanovenia falošne negatívnych výsledkov.

Zistené frekvencie genotypov a aliel boli porovnateľné s údajmi uvedenými vyššie. Homozygotná forma mutácie S65C sa nevyskytovala u žiadneho pacienta a heterozygotná forma tejto mutácie bola zastúpená u 3,6 % vyšetovaných jedincov. Alelová frekvencia mutácie S65C sa rovnala 1,8 %. V porovnaní s nálezom v štúdií Čimburovej et al. (heterozygotný genotyp u 2,49 % a frekvencia alely 1,25%) boli tieto hodnoty vyššie pretože u pacientov v tejto štúdií bola očakávaná vyššia pravdepodobnosť výskytu hereditárnej hemochromatózy (32,33).

Okrem genotypov bola vo vyšetrovanom súbore vzoriek detekovaná v dvoch prípadoch (1,4 %) aj prítomnosť zloženého heterozygota C282Y/S65C. V porovnaní s odhadovaným množstvom výskytu týchto zložených heterozygotov v českej populácii (0,086 %) bola získaná hodnota vyššia. Zloženého heterozygota H63D/S65C sa v tejto štúdií nepodarilo určiť, avšak v Českej republike bol už detekovaný (0,42 %) (32). Z predchádzajúcich údajov vyplýva, že mutácia S65C v HFE géne sa v populácii vyskytuje pomerne málo.

Mutácia S65C vyvoláva miernu formu tohto ochorenia. Jej presný biologický dopad nie je známy, ale Holmström et al. vo svojej štúdií uvádza, že jednou z možností vplyvu mutácie S65C na metabolizmus železa a následný vznik hereditárnej hemochromatózy môže byť podobne ako pri mutácii H63D zmena vlastností HFE proteínu (53).

Predpokladá sa, že na rozvoji tohto chorobného stavu sa S65C spolupodieľa s ostatnými mutáciami C282Y a H63D (32,52). Avšak názory ohľadom vplyvu S65C na hladiny niektorých biochemických parametrov sa rôznia.

Mura et al. vo svojej štúdií uvádza, že pacienti, u ktorých bola detekovaná táto mutácia v heterozygotnej podobe mali typický biochemický nález a trpeli klinickými symptómami charakteristickými pre hereditárnu hemochromatózu. U týchto jedincov boli nájdené zvýšené hladiny feritínu, železa a saturácie transferínu (52). Ale podľa Aranda et al., S65C v heterozygotnej podobe výrazne neovplyvňuje hladiny feritínu a saturáciu transferínu (67). K tomuto názoru sa prikláňa aj Pedersen et al., ktorý tvrdí, že mutácia S65C nemá významný vplyv na hodnoty biochemických parametrov v porovnaní s mutáciami C282Y a H63D. Dokonca uvádza, že zvýšené hodnoty biochemických markerov u zložených heterozygotov C282Y/S65C mali podobný alebo nižší výskyt ako u mutácie C282Y v heterozygotnej forme (46).

Holmström et al. vo svojej štúdií zistil, že mutácia S65C sa viac vyskytovala u pacientov so zvýšenými koncentraciami feritínu alebo so zvýšenou saturáciou transferínu. U zložených heterozygotoch C282Y/S65C bola stanovená výrazne vyššia saturácia transferínu v porovnaní s ostatnými pacientmi, u ktorých nebola nájdená iná mutácia v HFE géne. Avšak v týchto hodnotách a ani koncentracii sérového feritínu nebol pozorovaný výrazný rozdiel v porovnaní s výsledkami získanými od jedincov s mutáciou S65C v jej heterozygotnej podobe (53).

V tejto štúdií boli sledované ukazovatele metabolizmu železa u pacienta s nálezom C282Y/S65C. Počas prvých vyšetrení, v štádiu diagnózy, boli preukázané výrazne zvýšené koncentrácie feritínu v sére. Tieto hodnoty odrážajú stav hladín zásobného železa v organizme. Za fyziologických podmienok je táto hodnota nízka, avšak pri hemochromatóze výrazne narastá.

V menšej miere bola nájdená aj zvýšená hladina saturácie transferínu a sérová koncentrácia železa. Saturácia transferínu železom je za fyziologických podmienok 30%. Avšak pri hemochromatóze narastá až nad 50 %. Následkom nadmerného príjmu železa a zníženej voľnej väzbovej kapacity transferínu dochádza aj k nárastu sérovej koncentrácie železa.

Pozorované hodnoty jednotlivých parametrov by mohli potvrdzovať predchádzajúce tvrdenia Mury et al. alebo Holmströma et al. No v dôsledku možného pôsobenia rôznych faktorov na tieto výsledky je zrejme predčasné domnievať sa, že je tento nárast vyvolaný len pôsobením mutácie S65C. Na základe tvrdení Pedersna et al. je možné predpokladať, že jedným z dôležitých pôsobiacich faktorov je prítomnosť mutácie C282Y (46). Okrem toho tento autor uvádza, že v malej miere môže pôsobiť na nárast sérovej koncentrácie feritínu a saturácie transferínu aj zvýšený príjem alkoholu, ktorý môže

podporovať a urýchliť fenotypový prejav jednotlivých mutácií a aj rozvoj hereditárnej hemochromatózy. Medzi ďalšie pôsobiace elementy, ktoré môžu vyvolávať nárast týchto parametrov patrí aj vek jedinca a prítomnosť iného ochorenia (68).

Na základe predchádzajúcich zistení, je možné teda usudzovať, že hodnoty biochemických parametrov majú pre stanovenie diagnózy hereditárnej hemochromatózy len informatívny charakter a k jedným z najdôležitejších vyšetrení pre toto ochorenie patrí molekulárno biologické vyšetrenie HFE génu, vrátane mutácie S65C.

10. Závěry diplomovej práce

Zavedenie vyšetrovacej metódy PCR – RFLP pre stanovenie mutácie S65C v HFE géne umožnilo obohatiť spektrum dosiaľ vyšetrovaných mutácií C282Y a H63D a stanoviť výskyt S65C vo vyšetrovaných klinických vzorkách.

Počas optimalizácie tejto metódy bolo zistené, že pre amplifikáciu požadovaných fragmentov DNA je najvhodnejšie pripravovať PCR reakčnú zmes bez obsahu ďalších prídavkov $MgCl_2$, primerov a DNA oproti pôvodnému zloženiu. Ako optimálna teplota annealingu bolo stanovených 55 °C.

Pri optimalizácii podmienok restriktívnej analýzy zohrávalo dôležitú úlohu určenie vhodnej doby inkubácie restriktívnej zmesi. Z dôvodu uistenia sa, že daná reakcia prebehla úplne, ale aj kvôli predchádzaniu možnej nesprávnej interpretácie výsledkov, bola pre vyšetrenie klinických vzoriek uprednostnená 16– hodinová doba inkubácie.

Vo vyšetrovaných vzorkách bola stanovená frekvencia genotypov a aliel mutácie S65C. V homozygotnej podobe sa táto mutácia nevyskytovala u žiadneho pacienta a v heterozygotnej forme bol nález 3,6 %. Prítomnosť zloženého heterozygota C282Y/S65C bola detekovaná v prípade dvoch pacientov (1,4 %) a frekvencia alely S65C bola u jednotlivých vzoriek 1,8%.

11. Zoznam použitých skratiek

ATP	adenozíntrifosfát
β_2M	β_2 -mikroglobulín
BCIP/NBT	bromochloroindolylphosphate/nitro blue tetrazolium
BMP6	bone morphogenetic protein 6
BMPR	bone morphogenetic protein receptor
BSA	bovine serum albumin
CD163	cluster of differentiation 163
Cybrd1	cytochrome b reductase 1
DCT1	divalent cation transporter 1
D-Cytb	duodenálny cytochróm B
DMT1	divalent metal transporter 1
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphates (deoxyribonukleozid trifosfáty)
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FeVK	väzbová kapacita pre železo
FLVCR	feline leukemia virus, podskupina C
FPN1	feroportín
FRET	fluorescence resonance energy transfer (prenos energie fluorescenčnou rezonanciou)
HCP1	heme carrier protein 1
HPLC	high-performance liquid chromatography
IL-1	interleukín 1
IL-6	interleukín 2
Ireg1	iron-regulated protein 1
IRP/IRE	iron regulatory protein/iron responsive element
LEAP-1	liver-expressed antimicrobial peptide
LiPA	line probe assay
M	mutant type
MGB	minor groove binder
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid

MTP1	metal transporter protein 1
Nramp2	natural resistance-associated macrophage protein 2
PCFT	proton-coupled folate transporter
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia)
RES	retikuloendoteliálny systém
RFLP	restriction fragment length polymorphism (polymorfizmus dĺžky restrikčných fragmentov)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
SLC11A2	solute carrier family 11, member 2
SLC40A1	solute carrier family 40, member 1
SNP	single nucleotide polymorphisms (jednonukleotidové polymorfizmy)
SSCP	single-strand conformation polymorphism (konformačný polymorfizmus jednovláknovej DNA)
STAT-3	signal transducer and activator of transcription 3
Steap 3	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 3
TBE	TRIS/Borate/EDTA
Tf	transferín
TfR	transferínový receptor
wt	wild type

12. Zoznam použitej literatúry

1. Čermák, J. (2005). Železo v organizmu – nutný pomocník a skrytý nepřítel. Jaký význam mají nové poznatky o metabolismu železa pro kliniku – editorial. *Vnitřní lékařství*. 51, 3, s. 278 – 281.
2. Pácal, L., Kaňková, K. (2004). Novější poznatky o metabolismu železa a jeho poruchách. *Časopis lékařů českých*. 143, 1, s. 9 – 14.
3. Horák, J. (2010). Metabolismus železa. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 9 – 15. ISBN: 978–80–247–3287–9.
4. Brodanová, M., Kordáč, V. (1993). Metabolismus železa a mědi a jaterní poškození. *Klinická hepatologie*. Praha: Grada – Avicenum, s. 360 – 369. ISBN: 80–7169–069–4.
5. Kovář, J. (2010). Biologický význam a fyziologické funkce železa. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 15 – 22. ISBN: 978–80–247–3287–9.
6. Jacolot, S. et al. (2010). Iron metabolism in macrophages from HFE hemochromatosis patients. *Molecular Genetics and Metabolism*. 101, 2 – 3, s. 258 – 267.
7. Camaschella, C., Strati, P. (2010). Recent advances in iron metabolism and related disorders. *Internal and Emergency Medicine*. 5, 5, s. 393 – 400.
8. Šimek, M. (2005). Nové poznatky o metabolismu železa. *Vnitřní lékařství*. 51, 3, s. 345 – 353.
9. Horák, J. (2010). Příjem železa potravou a jeho ztráty z organismu. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 23 – 26. ISBN: 978–80–247–3287–9.
10. Franchini, M. et al. (2010). Hepcidin and iron metabolism: From laboratory to clinical implications. *Clinica Chimica Acta*. 411, 21-22, s. 1565 – 1569.
11. Ganz, T. (2006). Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology*. s. 29 – 35.
12. Neubauerová, J., Kovař, J. (2010). Intestinální absorpce železa. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 26 – 30. ISBN: 978–80–247–3287–9.

13. Dostalíková, M. (2010). Geneticky podmíněné poruchy metabolismu železa. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 43 – 65. ISBN: 978–80–247–3287–9.
14. Neubauerová, J., Kovář, J. (2010). Transport železa k orgánům a do buněk. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 30 – 35. ISBN: 978–80–247–3287–9.
15. Bowen, R. *Ferritins and Hemosiderin* [online]. Posledná revízia 04.2001 [cit. 2011–01–30]. Dostupné z: <<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/molecules/ferritin.html>>.
16. Pecka, M. (2002). Tvorba a vývoj červených krvinek. *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, s. 96 – 131. ISBN: 80–86682–01–3.
17. Kovář, J., Neubauerová, J. (2010). Regulace množství železa v organismu. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 35 – 41. ISBN: 978–80–247–3287–9.
18. Poli, M. et al. (2010). Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal – regulated kinase (MAPK/ERK) signaling. Implications for transferrin – dependent hepcidin regulation. *Haematologica*. 95, 11, s. 1832 – 1840.
19. Fernandes, A. et al. (2009). The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood*. 114, 2, s. 437 – 443.
20. Maruna, P. et al. (2003). Hepcidin - nový peptid zánětlivé odpovědi a metabolismu železa. *Klinická biochemie a metabolismus*. 12, 33, s. 55 – 59.
21. *Hemochromatosis Gene* [online]. Posledná revízia 06.2010 [cit. 2011–02–02]. Dostupné z: <http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/posters/chromosome/hfe.shtml>.
22. Novotný, J. (2005). Poruchy metabolismu železa II. *Vnitřní lékařství*. 51, 9, s. 995 – 1006.
23. Albig, W. et al. (1998). The Haemochromatosis Candidate Gene HFE (HLA – H) of Man and Mouse is Located in Syntenic Regions Within the Histone Gene Cluster. *Journal of Cellular Biochemistry*. 69, s. 117 – 126.
24. *HFE Gene – GeneCards | HFE Protein | HFE Antibody* [online]. Posledná revízia 12.2010 [cit. 2011–02–02]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id=4886&id_type=hgnc&search=4886>.

25. Chen, J. X. et al. (2007). HFE modulates transferrin receptor 2 levels in hepatoma cells via interactions that differ from transferrin receptor 1 – HFE interactions. *Journal of Biological Chemistry*. 282, 51, s. 36862 – 36870.
26. Horák, J. (2010). Poruchy metabolismu železa. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 42 – 43. ISBN: 978–80–247–3287–9.
27. Bureš, J., Horáček, J. (2003). Hemochromatóza. *Základy vnitřního lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén – Karolinum, s. 363 – 365. ISBN: 80–7262–208–0.
28. Oliveira, V. C. et al. (2009). Frequency of the S65C mutation in the hemochromatosis gene in Brazil. *Genetics and Molecular Research*. 8, 3, s. 794 – 798.
29. Dostalíková, M. (2010). Epidemiologie genetické hemochromatózy. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 82 – 89. ISBN: 978–80–247–3287–9.
30. Kotze, M. J. et al. (2004). Molecular diagnosis of hereditary hemochromatosis: application of a newly – developed reverse-hybridization assay in the South African population. *Clinical Genetics*. 65, 4, s. 317 – 321.
31. Horák, J. (2010). Klinické projevy genetické hemochromatózy. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 90 – 91. ISBN: 978–80–247–3287–9.
32. Čimbuřová, M. et al. (2005). S65C and other mutations in the haemochromatosis gene in the Czech population. *Folia Biologica*. 51, 6, s. 172 – 176.
33. Gabrikova, D. et al. (2011). Hemochromatosis gene mutations in the general population of Slovakia. *Central European Journal of Medicine*. 6, 2, s. 148 – 151.
34. Moyses, C. B. et al. (2008). Simultaneous detection of the C282Y, H63D and S65C mutations in the hemochromatosis gene using quenched – FRET real – time PCR. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 41, 10, s. 833 – 838.
35. Bhatt, L. et al. (2010). N – Glycosylation is important for the correct intracellular localization of HFE and its ability to decrease cell surface transferrin binding. *Febs Journal*. 277, 15, s. 3219 – 3234.
36. Půtová, I. et al. (2005). Mutace v genu HFE u osob s revmatickým postižením. *Časopis lékařů českých*. 144, 6, s. 391 – 396.

37. Biasiotta, G. et al. (2003). Identification of New Mutations of the HFE, Hfe, and Transferrin Receptor 2 Genes by Denaturing HPLC Analysis of Individuals with Biochemical Indications of Iron Overload. *Clinical Chemistry*. 49, 12, s. 1981 – 1988.
38. Biasiotta, G. et al. (2008). New TFR2 mutations in young Italian patients with hemochromatosis. *Haematologica*. 93, 2, s. 309 – 310.
39. Horák, J. (2010). Biochemické vyšetření. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 93 – 95. ISBN: 978–80–247–3287–9.
40. Horák, J. (2010). Diagnostika genetické hemochromatózy. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 92 – 122. ISBN: 978–80–247–3287–9.
41. Horák, J. (2010). Terapie genetické hemochromatózy. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 127 – 130. ISBN: 978–80–247–3287–9.
42. Zlocha, J. et al. (2006). Molekulovo – genetická diagnostika a skrýning hereditárnej hemochromatózy. *Vnitřní lékařství*. 52, 6, s. 602 – 608.
43. Horák, J. (2010). Sekundární akumulace železa. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 67 – 72. ISBN: 978–80–247–3287–9.
44. Simonsen, K. et al. (1999). Rapid and simple determination of hereditary haemochromatosis mutations by multiplex PCR – SSCP: detection of a new polymorphic mutation. *Annals of Human Genetics*. 63, s. 193 – 197.
45. Trombini, P. et al. (2001). S65C frequency in Italian patients with hemochromatosis, porphyria cutanea tarda and chronic viral hepatitis with iron overload. *Haematologica*. 86, s. 316 – 317.
46. Pedersen, P., Milman, N. (2009). Genetic screening for HFE hemochromatosis in 6,020 Danish men: penetrance of C282Y, H63D, and S65C variants. *Annals of Hematology*. 88, 8, s. 775 – 784.
47. Beckman, L. E. et al. (2001). Haemochromatosis gene mutations in Finns, Swedes and Swedish Saamis. *Human Heredity*. 52, 2, s. 110 – 112.
48. Cukjati, M. et al. (2007). Prevalence of H63D, S65C and C282Y hereditary hemochromatosis gene mutations in Slovenian population by an improved high – throughput genotyping assay. *Bmc Medical Genetics*. 8, s. 9.

49. Santos, P. C. J. L. et al. (2010). HFE gene mutations and iron status of Brazilian blood donors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 43, 1, s. 107 – 114.
50. Lin, A. et al. (2007). Analysis of the HFE gene (C282Y, H63D and S65C) mutations in a general Chinese Han population. *Tissue Antigens*. 70, s. 252 – 255.
51. Milman, N. et al. (2005). Frequency of the hemochromatosis HFE mutations C282Y, H63D, and S65C in blood donors in the Faroe Islands. *Annals of Hematology*. 84, 3, s. 146 – 149.
52. Mura, C. et al. (1999). HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: Evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood*. 93, 8, s. 2502 – 2505.
53. Holmström, P. et al. (2002). Mild iron overload in patients carrying the HFE S65C gene mutation: a retrospective study in patients with suspected iron overload and healthy controls. *Gut*. 51, 5, s. 723 – 730.
54. Medintz, I. et al. (2001). High – performance multiplex SNP analysis of three hemochromatosis – related mutations with capillary array electrophoresis microplates. *Genome Research*. 11, 3, s. 413 – 421.
55. Dostálíková, M., Půtová, I. (2010). Molekulárně – biologická diagnostika. In: Horák, J. (ed.) *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, s. 95 – 103. ISBN: 978–80–247–3287–9.
56. Gomez-Llorente, C. et al. (2004). Multiplex analysis of the most common mutations related to hereditary haemochromatosis: two methods combining specific amplification with capillary electrophoresis. *European Journal of Haematology*. 72, 2, s. 121-129.
57. Aquilante, C. L. (2010). Methodologies in Pharmacogenomics. In: Zdanowicz, M. M. (ed.) *Concepts in Pharmacogenomics*. Bethesda: American Society of Health – System Pharmacists, s. 55 – 84. ISBN: 978–1–58528–234–0.
58. Pantůček, R., Doškař, J. (2005). Amplifikace nukleových kyselin. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, s. 73 – 110. ISBN: 80–210–3841–1.
59. Pantůček, R. (2005). Stanovení sekvence DNA (sekvencování DNA). *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, s. 59 – 72. ISBN: 80–210–3841–1.

60. van Pelt-Verkuil, E. et al. (2008). The PCR in Practise. *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Springer Science + Business Media B.V., s. 17 – 22. ISBN: 978-1-4020-6240-7.
61. Doškař, J., Šmarda, J. (2005). Manipulace s nukleovými kyselinami. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, s. 17 – 28. ISBN: 80-210-3841-1.
62. *MGB Probes* [online]. Posledná revízia 01.2011 [cit. 2011-03-12]. Dostupné z: <<http://www.biosyn.com/faq.aspx?qid=362>>.
63. *Selection of Hybridization Probe Sequences for Use with the LightCycler – Roche Diagnostics* [online]. Posledná revízia 07.2002 [cit. 2011-03-14]. Dostupné z: <http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/lightcycler_docs/technical_notes/lc_06.pdf>.
64. Koeken, A. et al. (2002). Genotyping of Hemochromatosis – Associated Mutations in the HFE Gene by PCR – RFLP and a Novel Reverse Hybridization Method. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 40, 2, s. 122 – 125.
65. Doškař, J., Pantůček, R. (2005). Fyzikální mapování DNA (genomu). *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, s. 45 – 58. ISBN: 80-210-3841-1.
66. *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook* [online]. Posledná revízia 05.2010 [cit. 2011-03-18]. Dostupné z: <www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=200373>.
67. Aranda, N. et al. (2010). Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. *Annals of Hematology*. 89, 8, s. 767 – 773.
68. Pedersen, P., Milman, N. (2009). Extrinsic factors modifying expressivity of the HFE variant C282Y, H63D, S65C phenotypes in 1,294 Danish men. *Annals of Hematology*. 88, 10, s. 957 – 965.