

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Polymorfismus genu *ATG16L1* (autophagy-related 16-like 1) a genetická vnímavost k sarkoidóze u českých pacientů

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Štaffová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	MUDr. František Mrázek, PhD.
Termín odevzdání práce:	8. 2011

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 18. 7. 2011

Děkuji MUDr. Františku Mrázkovi, PhD. za odborné vedení mé bakalářské práce, především za pomoc při hledání potřebných informací a odborných článků, za nepostradatelné rady a připomínky a také za obrovskou trpělivost.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Kateřina Štaffová
Název práce	Polymorfismus genu <i>ATG16L1</i> (autophagy-related 16-like 1) a genetická vnímavost k sarkoidóze u českých pacientů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	MUDr. František Mrázek, PhD.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	<p>Choroby, na jejichž vzniku se podílí dědičná složka i zevní faktory, se označují jako komplexní. V poslední době je věnováno značné úsilí na identifikaci genových variant, které se na dědičné složce komplexních nemocí podílejí. Do skupiny komplexních chorob patří i sarkoidóza, systémové zánětlivé onemocnění s multigenní dědičnou složkou. Tato práce je zaměřena na testování případného vztahu mezi sarkoidózou a polymorfismem genu významného pro autofágii (<i>ATG16L1</i>). V experimentální části byla nejprve od 195 pacientů se sarkoidózou a 101 zdravých kontrolních jedinců získána DNA vysolovací technikou dle Millera. Po návrhu vhodných primerů a zavedení genotypizačního protokolu byl polymorfismus <i>ATG16L1</i> rs2241880 vyšetřen u všech zařazených jedinců metodou PCR-SSP. Produkty PCR byly detekovány elektroforézou na agarosovém gelu a vizualizovány na UV transiluminátoru. Zjištěné frekvence alel a genotypů vyšetřovaného polymorfismu byly v souladu s Hardy-Weinbergovým zákonem a nelišily se mezi skupinami pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců. Závěr: Přestože polymorfismus <i>ATG16L1</i> rs2241880 zvyšuje riziko jiných zánětlivých onemocnění, na genetické vnímavosti k sarkoidóze se v české populaci významně nepodílí.</p>
Klíčová slova	<i>ATG16L1</i> , polymorfismus rs2241880, sarkoidóza
Počet stran	43
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Kateřina Štaffová
Title	Polymorphism of the gene <i>ATG16L1</i> (autophagy-related 16-like 1) and genetic susceptibility to sarcoidosis in Czech patients
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	MUDr. František Mrázek, PhD.
The year of presentation	2011
Abstract	<p>Complex diseases are dependent on both genetic and environmental factors. Enormous effort is currently applied to the identification of gene variants conferring heritable component of complex diseases. Sarcoidosis is a complex systemic inflammatory disorder with multigenic component. This thesis aims on testing of possible relationship between sarcoidosis and the polymorphism of the gene <i>ATG16L1</i>. In the experimental part, DNA was initially obtained by a "salting-out" technique from 195 sarcoidosis patients and 101 healthy control subjects. After specific primers were designed and genotyping protocol was established, polymorphism <i>ATG16L1</i> rs2241880 was genotyped using the PCR-SSP method. Amplicons were detected by agarose-gel electrophoresis and visualized by UV light. The frequencies of <i>ATG16L1</i> alleles and genotypes complied with Hardy-Weinberg law and were similar in the groups of patients with sarcoidosis and control subjects. Conclusion: Despite polymorphism <i>ATG16L1</i> rs2241880 increases a risk for other inflammatory diseases, it is probably not involved in the genetic susceptibility to sarcoidosis in Czech population.</p>
Keywords	<i>ATG16L1</i> , polymorphism rs2244880, sarcoidosis
Number of pages	43
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce.....	8
1. Teoretická část.....	9
1.1. Úvod.....	10
1.2. Genové polymorfismy.....	11
1.2.1. SNP.....	11
1.2.2. STR/VNTR.....	11
1.2.3. CNV.....	12
1.3. Identifikace a vyšetření genových polymorfismů.....	12
1.3.1. PCR RFLP.....	13
1.3.2. PCR SSP.....	13
1.3.3. qRT PCR.....	14
1.3.4. Microarray.....	14
1.3.5. Sekvenování.....	15
1.3.6. MALDI-TOF.....	15
1.4. Průkaz vztahu mezi nemocí a genovou variantou.....	15
1.5. Gen <i>ATG16L1</i>	17
1.5.1. Polymorfismus <i>ATG16L1</i> rs2241880.....	18
1.6. Sarkoidóza.....	18
1.6.1. Patogeneze.....	18
1.6.2. Formy onemocnění sarkoidózou.....	20
1.6.3. Genetická vnímavost k sarkoidóze.....	21
1.6.4. Diagnostika.....	22
1.6.5. Léčba.....	24
2. Experimentální část.....	26
2.1. Chemikálie a přístroje.....	27
2.1.1. Chemikálie.....	27

2.1.2. Přístrojové vybavení	27
2.2. Metody.....	28
2.2.1. Izolace DNA z krve vysolovací technikou (dle Millera)	28
2.2.2. PCR SSP	29
2.2.3. Elektroforéza na agarosovém gelu.....	30
2.3. Výsledky a diskuze	31
Závěr.....	38
Literatura.....	39
Seznam použitých zkratk	42

Cíle bakalářské práce:

1. Zpracování literární rešerše zabývající se genovými polymorfismy, genotypizačními technikami a charakteristikou onemocnění sarkoidózou (včetně genetické složky).
2. Návrh primerů a zavedení protokolu pro genotypizaci SNP varianty rs2241880 na genu *ATG16L1* metodou PCR-SSP.
3. Provedení genotypizace polymorfismu *ATG16L1* rs2241880 u vzorku zdravé populace a pacientů se sarkoidózou české národnosti.
4. Statistické vyhodnocení alelické, genotypové a fenotypové frekvence vyšetřovaného polymorfismu genu *ATG16L1* u pacientů a kontrolních jedinců; posouzení jeho významu pro genetickou vnímavost k sarkoidóze.

Teoretická část

1.1. Úvod

Moderní biomedicínský výzkum, který se v posledních letech stále více opírá o využití nových technologií a pokročilých bioinformatických postupů, zásadním způsobem přispěl k poznání molekulárních mechanismů patogenezy řady chorob. Značné úsilí je věnováno hledání příčiny řady doposud nevyjasněných onemocnění. Cílem těchto snah je identifikovat procesy vedoucí ke vzniku onemocnění a získané poznatky využít k prevenci a léčbě těchto chorob. Velké množství onemocnění se dá ovlivnit omezením zevních příčin, např. změnou životního stylu. Obecně však platí, že se náchylnost k většině společensky významných onemocnění mezi lidmi liší. V těchto případech se může zásadním způsobem uplatit individuální genetická výbava jedince. To, zda u konkrétního člověka dojde ke vzniku a rozvoji onemocnění, z velké části ovlivňuje právě variabilita genů, ve většině případů ve spojení s faktory vnějšího prostředí.

Lidské choroby je tak možné z hlediska jejich genetické složky zjednodušeně rozdělit na tři základní typy:

- a. Monogenní choroby (jeden gen/genový defekt zodpovědný za onemocnění)
- b. Komplexní choroby (zpravidla multigenní typ dědičnosti, roli hrají i vlivy enviromentální)
- c. „Choroby“ bez genetické složky (např. většina úrazů)

Komplexní choroby jsou z hlediska výskytu (incidence) nejčastější, méně se vyskytují nemoci monogenní (např. fenyketonurie, hemofilie, cystická fibrosa) nebo choroby zcela postrádající genetickou složku. Komplexní choroby se v lékařské vědě těší velkému zájmu; do této skupiny patří většina společensky významných nemocí, které se významně podílejí na celkové nemocnosti/úmrtnosti v populacích v rozvinutých zemích (ateroskleróza, alergie/astma, nádory, autoimunitní choroby). Identifikace konkrétních genových variant (polymorfismů), které můžeme dát do souvislosti s danou chorobou, však není jednoduchá především v důsledku značné variability lidského genomu (existuje nepřehledné množství polymorfismů). Navíc v lidském genomu existují rozdíly mezi různými etnickými skupinami. Genová varianta přispívající k náchylnosti k onemocnění u jednoho etnika tak nemusí mít v jiné populaci žádný vliv.

Do skupiny komplexních chorob patří i sarkoidóza, kterou jsem si vybrala jako téma své bakalářské práce a sledovala její případné spojení s polymorfismem genu *ATG16L1* rs2241880, který ještě v této souvislosti nebyl u české populace studován.

V přípravné fázi bylo proto nutné navrhnout a zavést protokol pro vyšetření uvedeného polymorfismu při využití metody PCR-SSP (od návrhu specifických primerů až po optimalizaci vlastních reakčních podmínek).

Sarkoidóza a její genetická složka je jedním z hlavních témat, kterým se zabývá Laboratoř imunogenomiky a proteomiky při Ústavu imunologie Lékařské fakulty UP a Fakultní nemocnice Olomouc. S využitím genotypizačních metod (PCR-SSP, qRT-PCR) zde již byla řada polymorfismů imunitních genů u sarkoidózy zmapována a u některých byla souvislost s touto nemocí prokázána.

1.2. Charakteristika vybraných genových polymorfismů

Genový polymorfismus definujeme jako existenci dvou nebo více alel (variant genu) na jednom lokusu. Abychom mohli hovořit o polymorfismu, musí vzácnější varianta (varianty) svým výskytem převyšovat 1% v populaci.

1.2.1. SNP

Jednonukleotidové polymorfismy (z angl. single nucleotide polymorphism) jsou definovány jako možný výskyt dvou nebo více různých nukleotidů v jedné pozici DNA a/nebo genu v dané populaci (obr. 1).

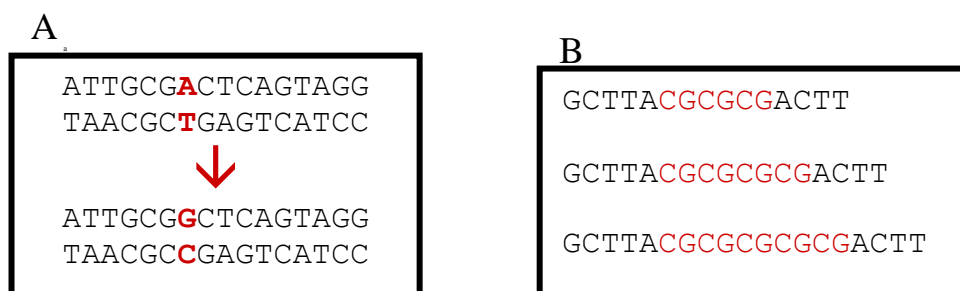
Podle polohy v DNA (ve vztahu ke genu) rozeznáváme polymorfismy v kódujících oblastech (exony) nebo v oblastech nekódujících (introny, regulační oblasti genu, negenová DNA). Pojem funkční genový polymorfismus používáme v případě, že má daná genová varianta vliv na strukturu genových produktů nebo funkci genů (např. kódující nesynonymní polymorfismy, varianty ovlivňující sestřih genu nebo vazebná místa pro transkripční faktory).

Polymorfismy kódujících oblastí můžeme rozdělit na synonymní, u kterých změna nukleotidu nemá vliv na sekvenci aminokyselin v polypeptidu (díky degeneraci genetického kódu) a nesynonymní, kdy dochází ke změně kódované sekvence aminokyselin. Vzniklý protein tak může vykazovat kvalitativní neb kvantitativní změnu funkce nebo může být zcela nefunkční.

1.2.2. STR / VNTR

Jedná se o polymorfismy (z angl. short tandem repeats / variable number of tandem repeats), kdy se za sebou ve variabilním počtu opakuje jednotka 2-6 párů

nukleotidů (STR) nebo je základní opakovaná jednotka větší (VNTR). Nacházejí se především okolo chromosomální centromery. Jsou hojně využívány pro identifikaci osob (např. určení otcovství). Známé jsou také pod pojmem mikrosatelity nebo jako „kocktající“ DNA (obr. 1).



Obr. 1: (A) SNP – záměna jednoho nukleotidu (B) STR – různý počet opakování dvojice (nebo i více) nukleotidů

1.2.3. CNV

Jedná se o variabilitu v počtu kopií rozsáhlých a komplexních oblastí genomické DNA (celé exony, geny nebo skupiny genů), které se mohou u lidí různě počítat (z angl. copy number variation). Zahrnuje velké úseky DNA. Velikost variabilní DNA jednotky CNV není jednoznačně definována, ale zpravidla bývá od 1kbp až po několik Mbp. Biologický význam konkrétního CNV je zpravidla závislý na tom, jaké geny obsahuje.

1.3. Identifikace a vyšetření genových polymorfismů (metody)

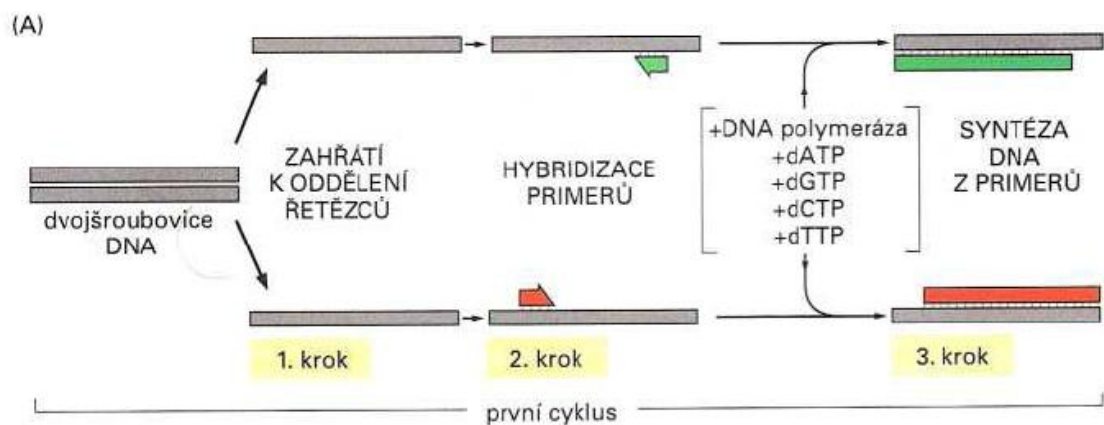
K identifikaci a vyšetření genových polymorfismů existuje obrovské množství technik, které od konce 80. let nejčastěji využívaly postupy na principu PCR (polymerase chain reaction), jedné ze základních metod molekulární biologie. V posledních letech se stále více uplatňují vysokokapacitní techniky genotypizace a sekvenování nové generace. V následujícím textu jsou uvedeny principy několika nejznámějších technik.

1.3.1. PCR – RFLP (Polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism)

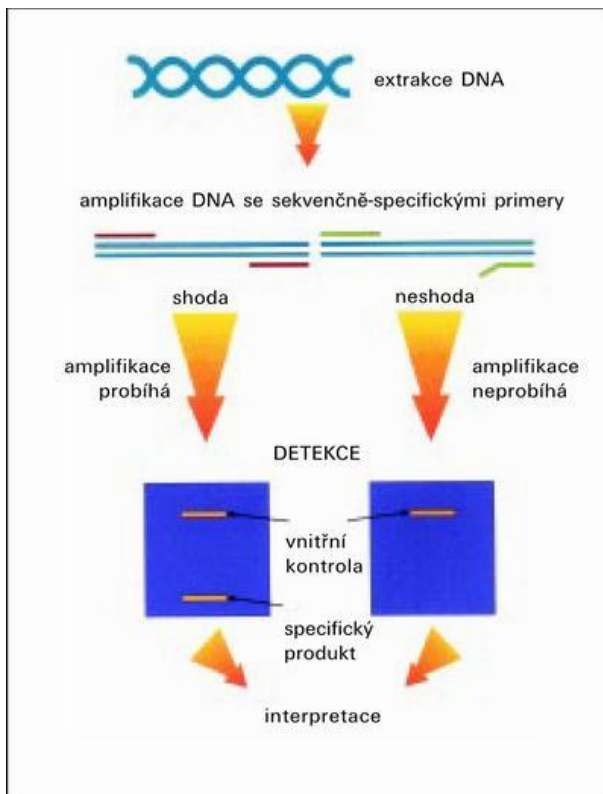
Úsek DNA namnožený pomocí PCR a zahrnující testovaný polymorfismus se podrobí štěpení pomocí specifické restriční endonukleázy. V závislosti na daném polymorfismu se liší místa štěpení. Tyto restriční produkty poté detekujeme pomocí elektroforézy.

1.3.2. PCR – SSP (Polymerase chain reaction with sequence specific primers)

Použité specifické primery, které ve své sekvenci již zahrnují zkoumaný polymorfismus nebo konkrétní alelu, odliší jednotlivé produkty už při amplifikaci. K amplifikaci dochází pouze v případě, kdy dojde k úplné hybridizaci mezi primery a cílovou sekvencí. Pokud se tak nestane, amplifikace neproběhne, žádný produkt PCR nevznikne (obr. 2 a 3). Zda byla PCR reakce pozitivní nebo negativní, zjišťujeme opět pomocí elektroforézy. Tato metoda byla využita v experimentální části této bakalářské práce.



Obr. 2: Znárodnění jednoho cyklu polymerázové řetězové reakce (převzato ze Základy molekulární biologie, Alberts et al., 2005)



Obr. 3: Princip PCR – SSP: Získanou DNA podrobíme PCR. Pokud dojde k úplné hybridizaci mezi cílovou sekvencí a primery, reakce proběhne a výsledný produkt detekujeme elektroforézou. Pokud hybridizace neproběhne, na gelu žádný produkt nevidíme a reakce je negativní. (převzato z článku Hlavní histokompatibilní komplex člověka (HLA) v klinické imunologii: nomenklatura a možnosti laboratorní diagnostiky. (2000), Alergie) http://www.tigis.cz/images/stories/Alergie/2000/03/02_03_2000.pdf

1.3.3. qRT – PCR (quantitative real time - polymerase chain reaction)

Umožňuje měřit nárůst amplifikovaného produktu v reálném čase. To je možné díky sondě (próbě) s fluorescenčním značením, která se připojuje v místě polymorfismu. Ta na svém 5' konci nese zářič a na 3' konci zhášeč. Pokud je hybridizace úplná, próba díky exonukleázové aktivitě termostabilní DNA polymerázy degraduje, zhášeč se odštěpí a dojde k vzestupu fluorescence, která je detekována. Měření signálu probíhá v každém cyklu. Výsledkem je graf, na kterém vidíme křivku exponenciálního růstu fluorescence odpovídající množství vzniklého produktu.

1.3.4. Microarray techniky

Tyto metody jsou vhodné především pro genotypizaci velkého počtu SNP polymorfismů najednou. Jsou založeny na principu PCR-SSO (Polymerase chain reaction with sequence specific oligonucleotides), kdy je na malém čipu navázáno obrovské množství nukleotidových sond. Stejně jako u jiných technik musí při pozitivní reakci dojít k úplné hybridizaci. To, zda hybridizace proběhla, zjistíme pomocí speciálního zařízení určeného ke „čtení“ čipu. Metoda má však nižší specifitu a citlivost (Rapley R. et al., 2004).

1.3.5. Sekvenování

„Klasická“ technika sekvenování pracuje většinou na principu Sangerovy metody, kdy k jednořetězcové DNA (templátu) je syntetizováno druhé vlákno. Jednotlivé deoxynukleotidtrifosfáty (dNTPs) jsou připojovány enzymem DNA polymerázou a vzniká tak komplementární řetězec. Kromě deoxynukleotidtrifosfátů jsou v reakční směsi obsaženy i radioaktivně nebo v dnešní době spíše fluorescenčně značené dideoxynukleotidtrifosfáty (ddNTPs), které nemají na 3' konci OH skupinu a po jejich připojení není již možné řetězec dále prodlužovat. Vznikne tak specificky dlouhý produkt zakončený jedním ze čtyř dideoxynukleotidtrifosfátů, který je poté separován kapilární elektroforézou na polyakrylamidovém gelu a detekován pomocí laseru.

Metoda je v dnešní době již plně automatizovaná a propojení s PC a vhodným softwarem nám umožňuje rychlé vyhodnocení výsledků. Zároveň je možno sekvenovat dosud neznámé genomy. V poslední době jsou klasické sekvenční techniky stále více nahrazovány vysokokapacitními metodami druhé a třetí generace.

1.3.6. MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption and ionization – time of flight)

Jedná se o aplikaci hmotnostní spektrometrie, která je určena pro měření spekter netěkavých látek, zvláště biopolymerů (v našem případě syntetických oligonukletidů), jelikož se jedná o měkkou ionizační techniku, při které nedochází k nežádoucí fragmentaci molekul. Ionizace probíhá za účasti matrice (deriváty kyseliny skořicové, benzoové, pikolinové...), kdy je vzorek nejdříve s jedním z derivátů smíchán a poté ozářen laserem. Při ozáření dochází k odpaření a ionizaci vzorku, který je před vstupem do TOF analyzátoru urychlen vysokým napětím. Detekce probíhá na základě určení doby průletu TOF analyzátozem až k detektoru. Doba průletu je závislá na m/z (m – hmotnost, z – náboj).

1.4. Průkaz vztahu mezi nemocí a genovou variantou

Chceme-li identifikovat konkrétní genové varianty, které mají vztah k danému onemocnění s dědičnou složkou, máme k dispozici několik základních přístupů. Volba nejvhodnějšího postupu je do značné míry závislá na výskytu (incidenci) daného onemocnění v populaci a skutečnosti, zda se jedná o nemoc monogenní nebo komplexní.

Jednou z možností hledání/průkazu vztahu mezi nemocí a genovými polymorfismy je analýza vazby (linkage analysis), která sleduje dědičnost choroby ve vztahu ke genovým variantám v rodinách a můžeme ji rozdělit na:

- a. Parametrickou – ke studiu využívá rodokmeny a mapuje podrobně výskyt nemoci v rodinách. Statisticky vhodná pro monogenní (neboli „Mendelovské“) nemoci, kde je model dědičnosti specifický.
- b. Neparametrickou – metoda „sdílených alel“ (z angl. „allele-sharing metod“), kde je potřeba nejméně dvou rodinných příslušníků postižených daným onemocněním. Nejčastěji se jedná o studie na sourozencích. Je vhodnější pro komplexní nemoci, její citlivost je nižší než v případě asociačních studií (viz dále).

Pro určení vnímavosti (susceptibility) k onemocnění se dále často využívá metoda asociačních studií. Genetická asociace s nemocí může být přímá, kdy se sledovaná varianta skutečně podílí na vnímavosti k nemoci („kauzální“ varianta), nebo nepřímá, která vzniká v důsledku tzv. vazebné nerovnováhy (linkage disequilibrium). V tomto případě dochází k asociaci mezi vyšetřovanou a kauzální variantou, které se na chromozomu nacházejí blízko sebe (tzv. haplotyp). Kombinace této sestavy alel genů je častější, než se teoreticky předpokládá. Jako příčiny vzniku vazebné nerovnováhy se uvádí náhodný genetický posun, selekční tlak, příbuzenské křížení a mísení populací. Vazebné nerovnováhy se často využívá při mapování vysoce polymorfních oblastí (mikrosatelitů), které nemají přímou souvislost s onemocněním, ale mohou se nacházet ve vazebné nerovnováze s variantami, které vnímavost k danému onemocnění podmiňují.

Genetické asociační studie mohou využívat tzv. přístup kandidátních genů, kdy sledujeme vybrané varianty genů, které bezprostředně souvisejí s patogenezí onemocnění. Zde se nejčastěji využívá porovnávání výskytu variant u pacientů a kontrolních jedinců (case-control studies). Na základě porovnání genotypové a alelické frekvence v těchto skupinách zhodnotíme vliv genetické varianty na vnímavost k nemoci. Můžeme tak určit, zda se v daném případě jedná o alelu predisponující k nemoci, alelu ochrannou (protektivní) nebo variantu bez vlivu na onemocnění. Tento typ studií je vhodný pro komplexní choroby a zaměřuje se zejména na genotypizaci funkčních polymorfismů. Genetická asociační studie u sarkoidózy s využitím populační kontroly byla využita i v této bakalářské práci.

Další modifikací jsou asociační studie v rodině (family-based association study), které zpravidla zahrnují dítě s nemocí a jeho rodiče. Mezi tyto studie řadíme i nejčastěji využívaný tzv. transmission disequilibrium test (TDT). Jedná se o sledování nerovnováhy v přenesení alel z heterozygotního rodiče na postižené dítě. Porovnáváme tedy

frekvenci alely přenesené na potomky s frekvencí alely nepřenesené (Tang W. Ch. et al., 2008).

Z hlediska genetické epidemiologie jsou obecně velmi významné studie na jednovaječných dvojčatech. Díky shodě genetické výbavy je možné sledovat, jak velkou roli hraje genetická složka onemocnění a do jaké míry je jeho vznik ovlivňován faktory vnějšího prostředí; velmi často se výsledky porovnávají s nálezy u dvojevaječných dvojčat.

1.5. Gen *ATG16L1*

Gen *ATG16L1* (autophagy-related 16-like 1) se nachází na dlouhém raménku chromozomu 2 (2q), konkrétně v chromozomálním regionu 2q37.1. Kóduje protein, který je součástí proteinového komplexu zodpovědného v buňce za procesy autofágie. Komplex tvoří ještě proteiny kódované geny *ATG5* a *ATG12*.

Uvedený proteinový komplex hraje roli při tvorbě (konkrétně při elongaci) autofagosomu, což je buněčná organela s dvojitou membránou, která pohlcuje buněčný materiál, avšak postrádá lysozomální enzymy. Proto následně dochází k fúzi autofagosomu s lysozymem, který tyto rozkladné enzymy obsahuje (Deretic V., 2006). Autofágie má velký význam pro imunitní systém, kdy dochází k degradaci a recyklaci částic (poškozené organely a proteiny, intracelulární patogeny). Pokud tedy dojde k defektu některého z genů důležitých pro autofágii, může dojít k ovlivnění homeostázy imunitního systému i celého organismu (Heath R.J. & Xavier R.J., 2009).

Pro varianty genu *ATG16L1* byla v předchozích studiích prokázána spojitost s Crohnovou chorobou. Crohnova choroba je zánětlivé onemocnění postihující trávicí soustavu, které je velmi výrazně podmíněno geneticky. Stejně jako u sarkoidózy se jedná o komplexní onemocnění, takže kromě již zmíněné genetické složky je ovlivňováno i zevními faktory. Zároveň je vlastní příčina Crohnovy choroby stejně nejasná jako u sarkoidózy. Crohnova choroba patří spolu s ulcerózní kolitidou mezi tzv. nespecifická zánětlivá onemocnění střev (z angl. inflammatory bowel disease, IBD), která se svou genetickou predispozicí, některými klinickými projevy a imunologickými mechanismy částečně podobají sarkoidóze. Proto se o genu *ATG16L1*, u kterého bylo spojení s Crohnovou chorobou opakovaně prokázáno, uvažuje jako o významném kandidátním genu vzhledem k vnímavosti k sarkoidóze (Fischer A. et al., 2011).

Studie asociací Crohnovy choroby s genem *ATG16L1* byly provedeny v mnoha zemích. Například v britské populaci byla prokázána spojitost mezi variantami

ATG16L1 a Crohnovou chorobou, nikoliv však ulcerózní kolitidou (Cummings J. R. et al., 2007). Předchozí výsledek potvrdila také studie ve Španělsku (Márquez A. et al., 2009). Naopak v Číně tato asociace prokázána nebyla, což připomíná odlišnost vlivu genetické složky u různých etnických skupin (Zhi J. et al., 2008). Kromě dospělých jedinců byly testy prováděny i u dětských pacientů (např. Amre D. K. et al., 2009).

1.5.1. Polymorfismus *ATG16L1* rs2241880

V této práci jsme se zaměřili na funkční polymorfismus, který se nachází v kódující oblasti genu *ATG16L1*. Výměnou adeninu za guanin se mění kodon ACT na GCT a dochází k záměně aminokyseliny threoninu v pozici 300 *ATG16L1* proteinu za alanin (T300A). Jedná se tedy o polymorfismus nesynonymní - mění se aminokyselinová sekvence proteinu. Při synonymním polymorfismu k záměně aminokyselin nedochází. Existence synonymního polymorfismu je možná díky degeneraci genetického kódu, kdy více kodonů kóduje jednu aminokyselinu.

Uvedený polymorfismus, vyšetřovaný také v této práci, tedy patří do podskupiny funkčních genových variant, které mění strukturu kódovaného *ATG16L1* proteinu a je považován za „vedoucí“ variantu spojenou s vnímavostí ke Crohnově nemoci.

1.6. Sarkoidóza

Sarkoidóza je systémové granulomatózní onemocnění, jehož příčina není známa. V současné době se neví, zda je vlastní příčinou infekce (bakteriemi, viry nebo plísněmi) nebo se jedná o imunitní reakci proti jinému (dosud neznámému) antigenu. Postihuje různé tkáně a orgány, nejčastěji však dýchací systém a hlavně plíce (až u 90% pacientů) a nitrohruďní lymfatické uzliny. Kromě nich může také zasáhnout nervový systém, játra, oči, slezinu, kůži, ledviny a další orgány. Klinické příznaky sarkoidózy odpovídají rozsahu a lokalizaci postižení.

Sarkoidóza postihuje převážně dospělou populaci mladšího a středního věku a je diagnostikována častěji u žen než u mužů.

1.6.1. Patogeneze

Typickým projevem sarkoidózy je tvorba granulomů. Granulomy běžně vznikají při zánětlivých procesech v organismu proto, aby zabránily šíření patogenů a ochránily tak okolní tkáně. Při sarkoidóze však vznikají na dosud neznámý podnět. Granulomy

mají u sarkoidózy charakter nekaseifikujícího kompaktního centrálně organizovaného shluku makrofágů a epiteloidních buněk, který je obklopen lymfocyty (Iannuzzi M.C. et al., 2007).

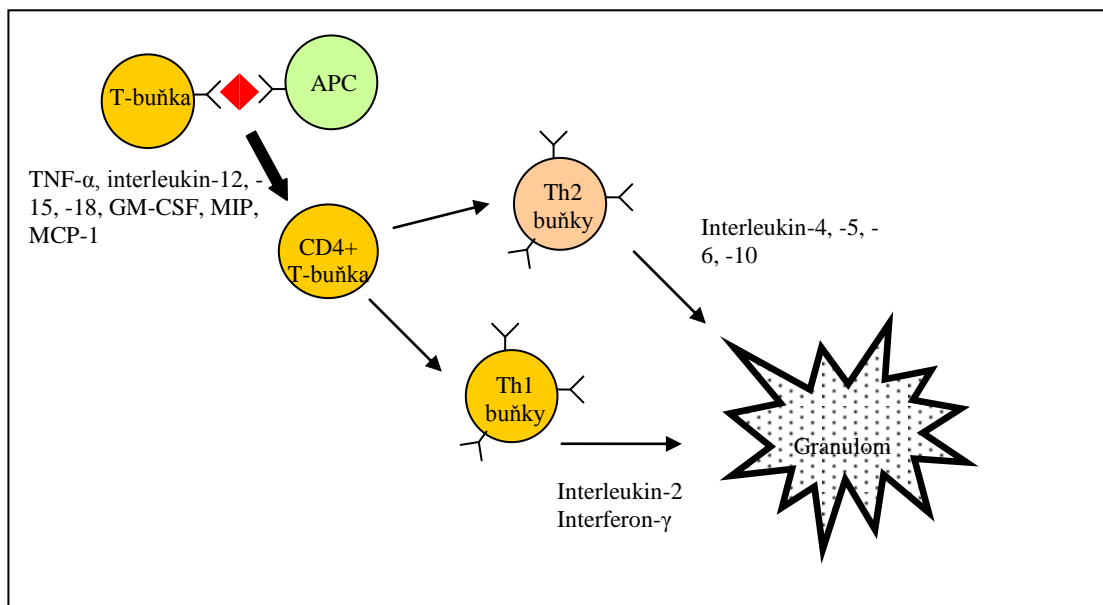
Granulomy vznikají a rozvíjejí se na základě stimulace imunitního systému, kdy CD4+ T lymfocyty interagují s antigenními peptidy, které jsou exprimovány na povrchu buněk prezentujících antigen ve vazbě na HLA molekuly. Aktivované T-lymfocyty pak mohou diferencovat do různých typů (Th1, Th2, Th17), které uvolňují řadu signálních proteinů-cytokinů (interleukiny a interferony), jejichž úlohou je aktivace a regulace imunitní odpovědi (obr. 4). V prvních fázích sarkoidózy T-lymfocyty převážně diferencují na Th1 buňky, které působí prozánětlivě a produkují interleukin-2 a interferon- γ a stimulují přeměnu makrofágů na aktivované makrofágy. Zároveň se v místě počínajícího granulomu uvolňují chemotaktické proteiny (zejména chemokiny), které podporují lokální akumulaci buněk zánětu. Th2 buňky mohou naopak regulovat vznik zánětu, produkují interleukiny-4, -5, -6 a -10 a aktivují B-lymfocyty.

Podle nálezu při rentgenovém vyšetření hrudníku se plicní sarkoidóza dělí na několik stádií:

- I. stadium – izolovaná adenopatie obou plicních hilů (bilaterální lymfadenopatie)
- II. stadium – bilaterální lymfadenopatie s plicními infiltráty
- III. stadium – přítomny pouze infiltráty
- IV. stadium – plicní fibróza

Pokud je nález na RTG hrudníku bez významných změn, označuje se jako nulté stádium (zpravidla jde o mimohrudní postižení).

Přestože etiologie onemocnění sarkoidózou není dosud vyřešena, některé výzkumy uvažují dlouhodobě jako možného původce bakteriální patogen *Mycobacterium*, konkrétně *Mycobacterium tuberculosis* (původce tuberkulózy) nebo tzv. atypická mykobaktéria. Sarkoidóza se totiž svými imunologickými, patologickými a epidemiologickými znaky do značné míry podobá jiným mykobakteriálním infekcím, mezi něž tuberkulóza patří. Nedávná studie však na základě porovnání zdravých jedinců, pacientů s tuberkulózou a pacientů se sarkoidózou tuto hypotézu nepotvrdila, protože u pacientů se sarkoidózou nebyly hodnoty při vyšetřeních specifické lokální a systémové imunitní odpovědi natolik zvýšené, aby korespondovaly s hodnotami naměřenými u pacientů s tuberkulózou a spíše odpovídaly hodnotám u zdravých kontrol (Hörster R. et al., 2009).



Obr. 4: Zjednodušený mechanismus vzniku granulomu: APC = antigen prezentující buňka s navázaným antigenem produkuje kromě vysokých hladin tumor nekrotizujícího faktoru α také interleukiny-12, -15, -18, makrofágový zánětlivý protein 1 (MIP-1), monocytový chemotaktický protein 1 (MCP-1) a faktor stimující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF). Poté interaguje s T buňkou (T-lymfocyt) CD4+ (klíčová buňka pro zánětlivý proces vedoucí k tvorbě granulomů). Aktivovaná CD4+ T-buňka diferencuje na dva typy: Th1 pomocnou buňku sekretující hlavně interleukin-2 a interferon- γ a Th2 pomocnou buňku sekretující převážně interleukiny-4, -5, -6 a -10. To vede k tvorbě granulomů.

1.6.2. Formy onemocnění sarkoidózou

Z hlediska příznaků, patologických nálezů i prognózy je sarkoidóza onemocnění poměrně pestré; v řadě případů dochází ke spontánnímu vymizení choroby. V jiných případech se může postižení i přes léčbu zhoršovat a vést k závažným zdravotním důsledkům (např. plicní fibróza až respirační selhání). Podle průběhu choroby jsou nápadné zejména dvě „extrémní“ formy sarkoidózy:

a. Akutní sarkoidóza, tzv. Löfgrenův syndrom

Poprvé popsán Svenem Löfgrenem v 50. letech 20. století. Typický je pro něj náhlý prudký začátek nemoci. Nejčastějšími symptomy jsou horečka, lymfadenopatie obou plicních hilů, erythema nodosum a artritida kloubů kotníku.

Obecně však pacienti s touto formou nemoci mají dobrou prognózu (Grunewald J. & Eklund A., 2009); v naprosté většině případů u nich dochází ke spontánní úzdavě.

b. Chronická sarkoidóza

U této formy nemoci je počátek pozvolný. Typickými symptomy jsou lupus pernio, chronická uveitida, neurosarkoidóza, postižení nosní sliznice a chronická hyperkalcémie. Plicní infiltrace může u chronické sarkoidózy přecházet do fibrózy se závažnými funkčními následky.

1.6.3. Genetická vnímavost k sarkoidóze

Sarkoidóza je považována za komplexní onemocnění, což znamená, že za jeho vznik odpovídají jak faktory genetické, tak faktory zevního prostředí („environmentální“), které však u sarkoidózy nejsou známy. Genetická složka onemocnění je poměrně významná, jak dokládají epidemiologické studie (vyšší výskyt mezi příbuznými pacientů, rozdíly mezi etniky, studie na dvojčatech). Obecně se předpokládá, že je genetická složka sarkoidózy multigenní – účastní se na ní variabilita celé řady genů.

Mnoho studií se proto zabývalo a v současné době zabývá souvislostí („asociací“) mezi variantami genů a vznikem a rozvojem onemocnění. Jednou z nejvýznamnějších cílových oblastí lidského genomu pro tyto studie je HLA (human leukocyte antigen) systém na krátkém raménku 6. chromozomu (6p). Je to proto, že tato oblast obsahuje mnoho polymorfních genů zodpovědných za imunitní odpověď a změny v jejich sekvenci mohou ovlivňovat strukturu a funkci řady imunitních molekul, které tyto geny kódují.

Studie se v mnoha případech zabývají vnímavostí k sarkoidóze u Afroameričanů, kteří jsou více náchylní k tomuto onemocnění než jiné etnické skupiny. Vyskytuje se u nich až třikrát častěji. (Rybicki B. A. et al., 1997). Afroameričané zároveň trpí vyšší hustotou granulomů v postižené tkáni oproti bělochům. Co se plic týče, hustota granulomů může být až o polovinu vyšší v bronchiální tkáni a až o čtvrtinu vyšší v případě tkáně alveolární. Obecně však závisí hustota granulomů na stádiu, v jakém se pacient nachází (Burke R. R. et al., 2009).

U Afroameričanů byla zkoumána např. spojitost mezi vznikem onemocnění a alelami HLA-DQB1 v rodinách, kde se již sarkoidóza vyskytla. Výsledky ukázaly častější výskyt alely HLA-DQB1*0602 v rodinách, u nichž byla sarkoidóza již v minulosti zaznamenána. Naopak výskyt varianty HLA-DQB1*0201 byl v těchto rodinách nižší, než u rodin bez předchozího výskytu sarkoidózy (Iannuzzi M.C. et al., 2003). Podobný výsledek zaznamenali vědci při studiu nizozemských a britských

pacientů, kdy byla alela HLA-DQB*0201 častěji zaznamenána u pacientů s mírným průběhem nemoci (stádium 0. nebo I.) na rozdíl od alely HLA-DQB*0602, která byla spojena s méně příznivou formou nemoci (plicní infiltrace/fibróza, stádia II.-IV) (Hiroe S. et al., 2002). Také alela HLA-DRB1*1101 se ukázala jako rizikový faktor ve spojení se vznikem sarkoidózy, a to jak u populace černochů, tak i u bělochů (Rossman M. D. et al., 2003).

Další spojitost mezi sarkoidózou a genovou oblastí HLA byla prokázána u genu kódujícího butyrofilin 2 (BTNL2), který se nachází v oblasti mezi geny pro HLA II. a III. třídy. Butyrofilin patří do velké rodiny imunoglobulinů. Gen kóduje malé imunoglobulinové ektodomény, které na svém N-konci (dva homologní N-konce s variabilními doménami IgV) nesou signální peptid a na C-konci (jedna konstantní doména IgC) transmembránovou helix, která ukotvuje protein v membráně buňky prezentující antigen. Polymorfismus rs2076530, který se nachází ve funkční oblasti genu, způsobuje záměnu guaninu za adenin. To má za následek posunutí sestřihového místa o 4 báze dopředu. Syntetizovaný protein postrádá na C-konci IgC doménu a transmembránovou helix. Výsledkem je absence membránových proteinů, ukotvených pomocí BTNL2, což může zvýšit náchylnost k sarkoidóze a mít vliv na dědičnost onemocnění (Valentonyte R. et al., 2005; Coudurier M. et al. 2009).

1.6.4. Diagnostika

Existuje několik typů vyšetření, která slouží k diagnostice onemocnění sarkoidózou, ne všechna jsou však dostatečně citlivá nebo specifická. Pro přesnou diagnózu se proto využívá kombinace klinického, radiologického, imunologického i histopatologického vyšetření.

Přehled vyšetření a testů: (Costabel U. et al., 2008)

- a)** Anamnéza (symptomy, vystavení vlivům vnějšího prostředí, profesní riziko)
- b)** Klinické (fyzikální) vyšetření
- c)** Rentgen plic a další zobrazovací metody

Kromě něj se využívají i jiná radiologická vyšetření, jako je počítačová tomografie při atypickém klinickém nebo základním rentgenovém nálezu nebo při podezření na komplikace, které provázejí jiná plicní onemocnění. Využití má i galiová scintigrafie, která ukáže zánětlivá ložiska v organismu. U pacientů se sarkoidózou dochází k charakteristickému vychytávání galia v plicních hilech (efekt „lambda“) nebo slzných žlázách

(efekt „panda“) (obr. 5). Citlivější než galiová scintigrafie je pozitronová emisní tomografie používající ^{18}F -fluorodeoxyglukózu (FDG-PET) (Nishiyama Y. et al., 2006). Může však docházet k falešně pozitivním výsledkům u jiných granulomatózních onemocnění, infekcí a novotvarů. Je možné ji použít zároveň s pozitronovou emisní tomografií využívající L-[3- ^{18}F]- α -metylytyrosin (FMT-PET), který je vychytáván pouze nádorovými buňkami a můžeme tak za použití obou metod odlišit nádorové bujení od sarkoidózy.

- d)** Vyšetření funkce plic (vitální kapacita, usilovně vydechnutý objem vzduchu za 1s – FEV₁, difúzní kapacita pro oxid uhelnatý – D_{LCO}).

Zde je také možné porovnat množství plynů v tepenné krvi v klidu a při zátěži. Další možností je šestiminutový test chůze (Baughman et al., 2007).

- e)** Krevní obraz – nespecifický, může se objevit leukopenie nebo anémie.
f) Stanovení koncentrací vápníku, jaterních enzymů, kreatininu a angiotensin konvertujícího enzymu (ACE).

Sérová koncentrace ACE se stanovuje společně se sérovou koncentrací lysozymu. U většiny pacientů jsou tyto hodnoty zvýšené, mohou však spolu korelovat. V případě přítomnosti diabetu, osteoartritidy, tuberkulózy a některých dalších nemocí u pacienta může docházet k falešně pozitivním výsledkům (Costabel U. et al., 2007). Další komplikací jsou polymorfismy vyskytující se v genu pro tvorbu ACE, které tak mohou individuálně ovlivňovat jeho koncentraci. Proto byly určeny referenční hodnoty koncentrace pro jednotlivé genotypy.

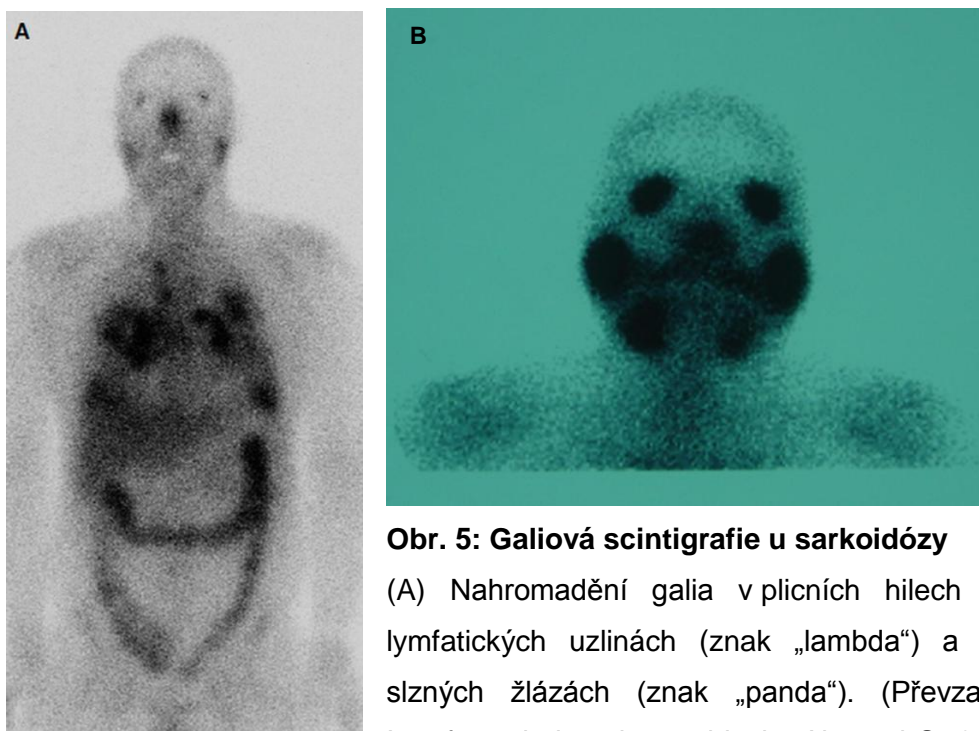
- g)** Analýza moči – hyperkalciurie.
h) Elektrokardiografie – při podezření na postižení srdce
i) Oční vyšetření – charakteristickým příznakem je uveitida.
j) Tuberkulinový kožní test
k) Fibrooptická bronchoskopie se slizniční a transbronchiální biopsií, bronchoalveolární laváž (BAL) se zjištěním poměru CD4/CD8 buněk. Poměr u pacientů by měl být větší než 3,5 (vysoká specifita, ale nízká citlivost)

Další možná vyšetření jsou:

- magnetická rezonance – v případě podezření na postižení srdce nebo neurosarkoidózu
- dopplerovská echokardiografie – zejména pro zjištění plicní hypertenze

Dříve byl k diagnostice používán také Kveim-Siltzbachův test, kdy byla pacientovi s podezřením na sarkoidózu injekčně vpravena pod kůži sarkoidní tkáň (z lymfatických uzlin nebo sleziny) od pacienta s potvrzenou diagnózou. Pokud se do 4-6 týdnů v tomto místě vytvořil granulom, byl tento test považován za pozitivní. Pokud však už byl pacient podroben léčbě, mohly se objevovat falešně negativní výsledky.

Tento test byl poprvé použit ve 30. letech 20. století Walterem J. Nickersonem a později ve 40. letech zdokonalen Ansgarem Kveimem, který také prokázal biopsií vzniklé uzliny, že se histologicky jedná o stejný granulom, jako v sarkoidní tkáni (Moller D. R., 2007).



Obr. 5: Galiová scintigrafie u sarkoidózy

(A) Nahromadění galia v plicních hlech a hrudních lymfatických uzlinách (znak „lambda“) a průšních a slzných žlázách (znak „panda“). (Převzato z článku Interferon-induced sarcoidosis, Alazemi S. & Campos M. A., 2006). (B) Efekt panda (převzato z článku Sarcoidosis involving the lacrimal, submandibular, and parotid glands with panda sign, Çakmak S. K. et al., 2009)

1.6.5. Léčba

Primárně používanými léky při léčbě sarkoidózy jsou už od 50. let 20. století kortikosteroidy. Jejich účinek je imunosupresivní a protizánětlivý. Potlačují působení prozánětlivých cytokinů jako je IL-1 nebo TNF α a zároveň podporují tvorbu cytokinů protizánětlivých. Kortikosteroidy se běžně podávají orálně, možná je však u plicní sarkoidózy i inhalace. U pacientů inhalujících kortikosteroidy ale nebylo zaznamenáno nijak výrazné zlepšení. Při orálním podání dochází u pacientů ke zlepšení jejich

stavu. Zvyšuje se vitální a difúzní kapacita plic a pozitivní změny můžeme nalézt i na RTG nálezu. Kromě systémového použití kortikosteroidů, které je časté především při přetrvávajícím a rychle postupujícím onemocnění, je možné užívat kortikosteroidy i lokálně. Lokální užití preferujeme především při postižení očí a kůže (Grutters J. C. & van den Bosch J. M. M., 2006).

Dávkování je individuální u každého pacienta, závisí na rozsahu a závažnosti onemocnění. Léčbu je vhodné provádět v rozmezí 6-24 měsíců. U některých pacientů však po ukončení léčby dochází k návratu choroby.

Pacienti, u kterých léčba kortikosteroidy a imunosupresivy nezabírá nebo se potýkají s vedlejšími účinky těchto léků, se využívá infliximab. Ten výrazně zlepšuje především projevy kožní sarkoidózy (např. Lupus pernio) a neurosarkoidózy (Doty J.D. et al., 2005). Jelikož se jedná o monoklonální protilátku proti cytokinu TNF α , je využíván především při léčbě autoimunitních onemocnění, jako je např. revmatoidní artritida, Crohnova choroba a další (<http://www.remicade.com/>). Zároveň je TNF α významným činitelem při tvorbě sarkoidních granulomů, a proto je infliximab využíván k potlačení jeho produkce.

Mezi další léky ovlivňující produkci TNF α makrofágy patří hydrochlorochin a pentoxyfillin. Hydrochlorochin řadíme mezi antimalarika a působí především na plicní projevy sarkoidózy. Stejně tak pentoxyfillin, který je xanthinovým derivátem a je užíván spolu s kortikosteroidy (Wu J. J. & Rashcovsky Schiff K., 2004).

Dalším možným lékem je metotrexát nebo azathioprin, které patří mezi cytotoxické látky. Metotrexát se běžně používá k léčbě leukémie, azathioprin jako imunosupresivum a v léčbě autoimunitních onemocnění. Metotrexát je antagonist kyseliny listové a mechanismem působení je inhibice dihydrofolátreduktasy. Nevzniká tedy tetrahydrofolát nutný k syntéze purinových nukleotidů (Smith J. R. & Rosenbaum J. T., 2001). Azathioprin se v těle metabolizuje na 6-merkaptopurin, který také funguje jako inhibitor syntézy purinů. Při léčbě sarkoidózy je možné metotrexát užívat společně s kortikosteroidy. Sám má účinek především na akutní průběh s jasnými příznaky. Často však po ukončení léčby dochází k relapsu choroby. Podobně je tomu i u azathioprinu, který také účinkuje jen u omezeného počtu pacientů a často je užíván zároveň s kortikosteroidy (Müller-Quernheim J. et al., 1999). Spíše než k léčbě sarkoidózy, dochází jen k jejímu potlačení.

Cyklosporin, řazený mezi imunosupresiva, byl také testován jako možný lék jakožto inhibitor aktivace T-lymfocytů, ale bohužel s téměř nulovým efektem a nepříznivými vedlejšími účinky (Wyser et al., 1997). U pacientů se závažným postižením plic, zejména pokročilou fibrózou, se jeví jako možné řešení i transplantace plic.

Experimentální část

2.1. Použité chemikálie a přístroje

2.1.1. Chemikálie

Název	Výrobce
Agarosa	Serva
CaCl ₂	Promega
dNTPs	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol	Fagron Olomouc
Ethidium bromid	Top-Bio Praha
Glycerol	Sigma
H ₃ BO ₃	Sigma
MgCl ₂ 6H ₂ O	Sigma
NaCl	Serva
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma
Voda pro PCR	Fresenius
Primery	Generi Biotech
Proteináza K	Serva
Sacharóza	Lachner
SDS	Serva
Spermidin	Sigma
Taq DNA polymeráza	Top-Bio Praha
Tris HCl	Sigma
Trizma-base	Sigma
TritonX100	Serva
Tween 20	Sigma

2.1.2. Přístrojové vybavení

- Centrifuga Hettich 16 R (izolace DNA)
- Centrifuga MLW T 62.1 (PCR-SSP)
- pH metr Jenway 3310
- Spektrofotometr Nanodrop ND-1000
- Termocykler DNA ENGINE TETRAD 2 Bio-Rad
- Minicentrifuga MINI-LABNET
- Termoblok Grant QBT1

- Dokumentační systém Gel Logic 112 KODAK
- Fotoaparát Polaroid DS34
- Mikrovlnka
- UV-transiluminátor MEB 20 Ultralum
- Laminární box Bio-II-A TELSTAR
- Zdroj napětí Bio-Rad PowerPac 300

2.2. Metody

2.2.1. Izolace DNA z krve vysolovací technikou (dle Millera)

Chemikálie: roztok LB1 (300 mM sacharóza, 10 mM Tris Cl pH 7,5, 5 mM MgCl₂ · 6H₂O, 1% TritonX100), roztok R (10 mM Tris pH 7,5), roztok proteázy (40% glycerol, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM CaCl₂, 20 mg/ml proteináza K), roztok P (10 mM TrisCl, 40 mM EDTA, 4 mM CaCl₂, 300 mM NaCl, 4% SDS), NaCl, ethanol 96%, ethanol 70%, 10 mM Tris pH 8

Ze vzorku bylo nejdříve jako záloha do mikrozkušavky odebráno a zamraženo 0,5 ml krve. Do zbývajících objemu vzorku (cca 10 ml) byl přidán vychlazený roztok LB1 tak, abychom získali celkový objem 45 ml. Poté byl vzorek protřepán a došlo k lýzi buněk (erytrocytů). Vzorek byl centrifugován 5'/4000 rpm/5°C. Supernatant byl slit a k sedimentu bylo přidáno 5 ml roztoku R. Důkladným třepáním byl sediment rozbit a vzorek byl znovu centrifugován 5'/4000 rpm.

Supernatant byl opět slit a k sedimentu bylo přidáno 930 µl roztoku R. Po rozbití sedimentu bylo dále přidáno 40 µl proteázy (20 mg/ml) a 370 µl roztoku P. Zkušavka se vzorkem byla vložena do termostatu a inkubována přes noc při 37°C. Po vytažení z termostatu a ochlazení na pokojovou teplotu bylo ke vzorku přidáno 400 µl 5 M NaCl. Vzorek byl protřepán a následně centrifugován 15'/4000 rpm/RT. Po centrifugaci byl supernatant přelit do 2 ml mikrozkušavky a ta byla centrifugována 10'/14000 rpm/RT. Po přesunutí do flow-boxu byl supernatant přelit do 15 ml zkušavky a DNA byla vysrážena přidáním 3,5 ml 96% ethanolu. Následně byla dvakrát promyta v 0,5 ml 70% ethanolu a na závěr přemístěna do šroubovací 1,5 ml mikrozkušavky, kde byla rozpuštěna zahřáním po dobu 5' při 70°C v 10 mM Tris pH 8. DNA byla poté skladována v lednici, popř. mrazáku.

2.2.2. PCR-SSP

Chemikálie: primerový mix (specifické primery pro alelu A/G, zpětný primer, kontrolní primery, Tris HCl pufr), roztok „fototyp“ master [komponenty: 10* koncentrovaný „oxfordský“ PCR pufr (0,67 M TrisCl pH 8,8; 0,166 M (NH₄)₂SO₄, 1% Tween 20), voda pro PCR, 25 mM MgCl₂, 25 mM dNTPs, 12,5 mg/ml spermidin; termostabilní Taq DNA polymeráza, PCR voda].

Sekvence specifických primerů (uvedeny níže) byly navrženy s využitím referenčních sekvencí *ATG16L1* genu a informací o studovaném jednonukleotidovém polymorfismu rs2241880 z veřejné databáze (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Metodu bylo potřeba nejprve optimalizovat - především zvolit vhodný typ programu na termocykleru a upravit koncentrace specifických primerů, aby nedocházelo ke vzniku nespecifického produktu.

V laminárním boxu byly nejprve připraveny primerové mixy zvlášť pro alelu A a zvlášť pro alelu G polymorfismu rs2241880. Primerový mix pro genotypizaci dvaceti čtyř DNA byl připraven tak, že do mikrozkušavky bylo napipetováno 131 µl Tris pufru pro alelu A, 137 µl pro alelu G, následně bylo přidáno 7,5 µl specifického primeru pro alelu A, 1,5 µl pro alelu G a poté do obou zkumavek po 7,5 µl konstantního zpětného primeru a 2,1 µl primerů pro vnitřní kontrolu P33 a P34 (všechny primery o koncentraci 100µM). Primerový mix byl protřepán a stočen na minicentrifuze.

Do stojanu bylo umístěno čtyřicet osm mikrozkušavek pro PCR a do nich byl rozpipetován připravený primerový mix po 5 µl, vždy dvě řady pro alelu A a dvě řady pro alelu G. Následně bylo rozmrazeno dvacet čtyři vzorků DNA, byly stočeny na minicentrifuze a napipetovány do PCR mikrozkušavek v objemu 0,5 µl ke každému z obou primerových mixů. Nakonec byl připraven roztok obsahující „fototyp“ master, Taq DNA polymerázu a PCR vodu. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 433 µl fototyp masteru, 14 µl PCR vody a 4 µl Taq polymerázy. Takto vzniklý roztok byl rozpipetován po 8 µl do PCR mikrozkušavek.

Stojan s PCR mikrozkušavkami byl stočen na centrifuze MLW T 62.1, dokud nebylo dosaženo 400 ot./min. Poté byly PCR mikrozkušavky vyjmuty a vloženy do termocykleru, kde byl nastaven program (F4) cyklických změn teplot pro PCR [96°C 1 min, 5x (96°C 20s, 72°C 1min 10s), 21x (96°C 25s, 69°C 50s, 72°C 30s), 4x (96°C 30s, 59°C 1 min, 72°C 1 min, 30s)]. K amplifikaci byl využit uvedený „přísnější“ protokol (vyšší hybridizační teploty), aby byla vyloučena nespecifická amplifikace.

Po skončení programu byly PCR mikrozkušavky vyjmuty a PCR produkt byl detekován elektroforézou na agarosovém gelu.

Sekvence očekávaného specifického produktu PCR pro alelu A, místo polymorfismu zvýrazněno

```
ccccagga caatgtggat actcatcctg gttctggtaa agaagtgagg gtaccagcta ctgccttg  
tgtcttcgta agtatgcttc agccccgaac cctaccacgc ttgatatggt gacagagcct ggcaattaa  
gggtccttc taggcctgca gctaagcatt ccattgtttt acttatatca agccttcca cct
```

Sekvence použitých primerů:

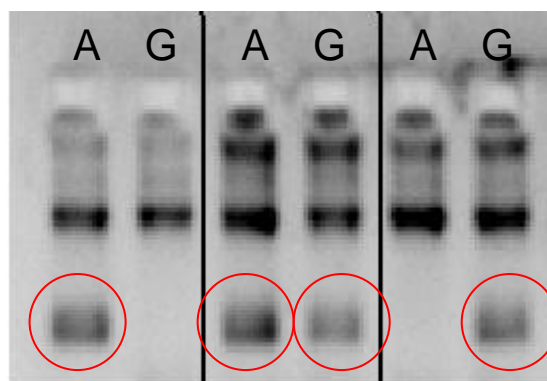
Specifický dopředný pro alelu A:	5'ccc cag gac aat gtg gat a
Specifický dopředný pro alelu G:	5'ccc cag gac aat gtg gat g
Konstantní zpětný:	5'agg tgg aaa ggc ttg ata taa g
Kontrolní primer 33:	5'tgc caa gtg gag cac cca a
Kontrolní primer 34:	5'gca tct tgc tct gtg cag at

2.2.3. Elektroforéza na agarosovém gelu

Chemikálie: agarosa, TBE pufr – koncentrát (500 mM TrisCl, 660 mM H₃BO₃, 5 mM EDTA), ethidium bromid, nanášecí pufr

Nejprve byl připraven agarosový gel (2%). Pro přípravu šestiřadého gelu bylo potřeba v Erlenmayerově baňce smíchat 2g agarosy se 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru. Agarosa byla rozpuštěna zahřátím (varem) v mikrovlnné troubě zapnuté na nejvyšší výkon. Po cca 3-4 minutách, kdy byla agarosa zcela rozpuštěna, byla baňka vyjmuta z mikrovlnné trouby a ke gelu bylo přidáno 4 µl roztoku ethidium bromidu. Ten byl v gelu důkladně rozmíchán a následně byl gel vlit do již připravené formy s hřebínky. Po ztuhnutí gelu byly hřebínky vyjmuty a gel vložen do elektroforetické vany, která obsahovala 0,5x koncentrovaný TBE pufr.

K produktům PCR reakce bylo napipetováno 5 µl nanášecího pufru. Poté bylo pomocí multikanálové pipety nanášeno na gel po 10 µl každého vzorku. Po nanesení byla elektroforetická vana uzavřena a připojena ke zdroji. Na zdroji bylo nastaveno napětí 130 V a elektroforéza probíhala po dobu 20 minut. Poté byl gel vyjmut a vložen do UV-transiluminátoru (k vizualizaci ethidium bromidu) a bylo vyhodnoceno zastoupení obou alel ve vzorku. Pokud byla ve vzorku detekována pouze varianta A, jednalo se o homozygota pro alelu A (AA); pokud byly ve vzorku obsaženy obě varianty A i G, jednalo se o heterozygota (AG); pokud byla ve vzorku obsažena pouze varianta G, jednalo se o homozygota pro alelu G (GG) (obr. 6).



Obr. 6: Znázornění jednotlivých možností výsledků PCR-SSP pro polymorfismus genu *ATG16L1* po agarosové elektroforéze (genotypy AA, AG a GG). Specifický produkt (vyznačen kruhem) vzniká jen v případě, pokud vzorek obsahuje variantu, na kterou jsou cíleny specifické primery. Obrázek je inverzním zobrazením; reálně světlé proužky na tmavém pozadí.

2.3. Výsledky a diskuze

Celkově bylo pro polymorfismus *ATG16L1* rs2241880 genotypizováno 296 vzorků DNA, z toho bylo 195 pacientů se sarkoidózou a 101 kontrolních jedinců. Pacienti se sarkoidózou byli diagnostikováni na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy Fakultní nemocnice v Olomouci, jedinci zařazení do skupiny zdravých kontrol byli členové registru dárců kostní dřeně. Charakteristiku skupin z hlediska věku, zastoupení mužů a žen a u pacientů zastoupení jednotlivých stádií onemocnění můžeme vidět v tabulce (tab. 1).

Výsledky byly analyzovány z několika pohledů. Pro identifikaci případných signifikantních rozdílů mezi srovnávanými skupinami byla určena hodnota $p < 0,05$. Distribuce genotypů *ATG16L1* ve skupině pacientů i kontrolních jedinců byla v souladu s předpokládaným rozdělením v populaci podle Hardy-Weinbergovy rovnováhy („ χ^2 -kvadrátový test dobré shody“ s jedním stupněm volnosti). Ve vyšetřovaných skupinách byly vypočítány jednotlivé genotypové, alelické a fenotypové frekvence (postup výpočtu je uveden na str. 33). Získané hodnoty zastoupení *ATG16L1* variant byly nejprve porovnány mezi celými soubory pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců s využitím „ χ^2 -kvadrátového testu“ s příslušným počtem stupňů volnosti (tab. 2). Zjistili jsme, že se frekvence genotypů a alel polymorfismu *ATG16L1* rs2241880 statisticky významně neliší mezi skupinami pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců (Grafy 1-3).

Zajímalo nás také, zda vyšetřovaný polymorfismus nemůže ovlivňovat klinický průběh onemocnění sarkoidózou. Proto jsme provedli hlubší subanalýzu uvnitř skupiny pacientů se sarkoidózou, kde jsme porovnali frekvence *ATG16L1* variant mezi pacienty s různými rentgenologickými stádii choroby (první stádium *versus* druhé a třetí stádium). Dále byli srovnáni zvlášť pacienti a kontroly odděleně podle pohlaví. Na závěr byly frekvence vyšetřovaného polymorfismu genu *ATG16L1* porovnány mezi pacienty, kteří prodělali Löfgrenův syndrom a ostatními pacienty se sarkoidózou (tab. 3). Ani v případě popsáných podrobnějších subanalýz jsme nezjistili signifikantní rozdíly v distribuci *ATG16L1* variant mezi testovanými podskupinami.

Jednonukleotidový polymorfismus *ATG16L1* rs2241880 lze považovat za relevantní kandidátní genovou variantu, která by mohla mít vliv na vnímavost k sarkoidóze. Pro genetickou asociační studii vedenou v rámci bakalářské práce byla tato varianta *ATG16L1* genu vybrána na základě několika publikací, které popisují její vliv (konkrétně alely G, tedy varianty pro alanin) na vnímavost k chronickému zánětlivému onemocnění trávicí soustavy (Crohnova choroba). Uvedená souvislost byla prokázána s výjimkou italské populace (Perricone C. et al. 2008) v řadě zahraničních studií a dokonce i v práci pocházející z české populace (Dusatkova P. et al., 2009). Při výběru uvedeného polymorfismu pro účely této práce jsme vycházeli z předpokladu, že by se sdílení některých patogenetických mechanismů Crohnovy choroby a sarkoidózy mohlo odrážet i v genetické predispozici k oběma chorobám (Fischer A. et al., 2011). Jak u Crohnovy choroby, tak u sarkoidózy zůstává vlastní etiologie neznámá, přičemž se u obou nemocí uvažuje o účasti dysregulované imunitní/zánětlivé odpovědi na neznámé antigenní stimuly.

V této práci jsme zjistili, že jsou jednotlivé varianty polymorfismu *ATG16L1* rs2241880 (alely i genotypy) zastoupeny ve velmi podobných frekvencích u pacientů se sarkoidózou i zdravých kontrolních jedinců. To je zřejmé především na grafickém porovnání frekvencí rs2241880 polymorfismu mezi sledovanými skupinami (Grafy 1-3). Tento náález svědčí proti předpokladu, že se uvedený polymorfismus může podílet na vnímavosti k sarkoidóze v české populaci. Nepřítomnost statisticky významných rozdílů v distribuci polymorfismu *ATG16L1* rs2241880 mezi podskupinami pacientů s různými klinickými „fenotypy“ sarkoidózy (různá rentgenologická stádia, Löfgrenův syndrom) naznačuje, že uvedená genová varianta neovlivňuje ani konkrétní klinickou manifestaci onemocnění, přinejmenším ve sledovaných parametrech. Výsledky této práce jsou však přirozeně limitovány velikostí testovaných souborů pacientů a kontrolních jedinců, jako velmi vhodná se proto jeví jejich nezávislá replikace (ověření) na dalších souborech pacientů se sarkoidózou (nejlépe i v jiných populacích).

Genotypová frekvence: Vyjadřuje podíl zastoupení homozygotů polymorfismu *ATG16L1* rs2241880 pro alelu A, heterozygotů AG a homozygotů pro alelu G na celkovém počtu genotypizovaných jedinců.

$$f_g = \frac{n_x}{n_{celk.}}$$

f_g – genotypová frekvence

n_x – počet pacientů/kontrolních jedinců pro daný genotyp (AA/AG/GG)

$n_{celk.}$ – celkový počet genotypizovaných pacientů/kontrolních jedinců

Alelická frekvence: Vyjadřuje podíl zastoupení alely A nebo alely G na celkovém počtu alel lokusu *ATG16L1* rs2241880 v populaci. Např. podíl alely A vypočítáme tak, že počet homozygotů pro alelu A vynásobíme dvěma (dvě kopie alely A), přičteme počet heterozygotních jedinců (jedna kopie alely A) a součet vydělíme celkovým počtem alel (dvojnásobek počtu pacientů nebo kontrolních jedinců).

$$f_a = \frac{2n_x + n_y}{2n_{celk.}}$$

f_a – alelická frekvence

n_x – počet homozygotních pacientů/kontrolních jedinců pro danou alelu

n_y – počet heterozygotních pacientů/kontrolních jedinců

$n_{celk.}$ – celkový počet genotypizovaných pacientů/kontrolních jedinců

Fenotypová frekvence: Vyjadřuje podíl zastoupení nosičů dané alely. Celkovým počtem pacientů/kontrolních jedinců tedy dělíme součet počtu homozygotů pro danou alelu a heterozygotů (všech nosičů).

$$f_f = \frac{n_x + n_y}{n_{celk.}}$$

f_f – fenotypová frekvence

n_x – počet homozygotních pacientů/kontrolních jedinců pro danou alelu

n_y – počet heterozygotních pacientů/kontrolních jedinců

$n_{celk.}$ – celkový počet genotypizovaných pacientů/kontrolních jedinců

Tab. 1: Základní demografická a klinická charakteristika vyšetřovaných skupin pacientů a zdravých kontrolních jedinců zařazených do studie.

	Pacienti	Kontroly
Celkový počet	195	101
Věk (medián)	44	28
Věk (rozpětí)	25 - 77	19 – 56
Muži/ženy	85/110	48/53
RTG stádium (0/I/II/III/IV/Neurčeno)	8/89/76/14/0/8	

Tab. 2: Srovnání genotypových a alelických frekvencí variant polymorfismu *ATG16L1* rs2241880 mezi pacienty se sarkoidózou a kontrolními jedinci. První číslo vyjadřuje podíl (relativní zastoupení), druhé absolutní počet dané varianty.

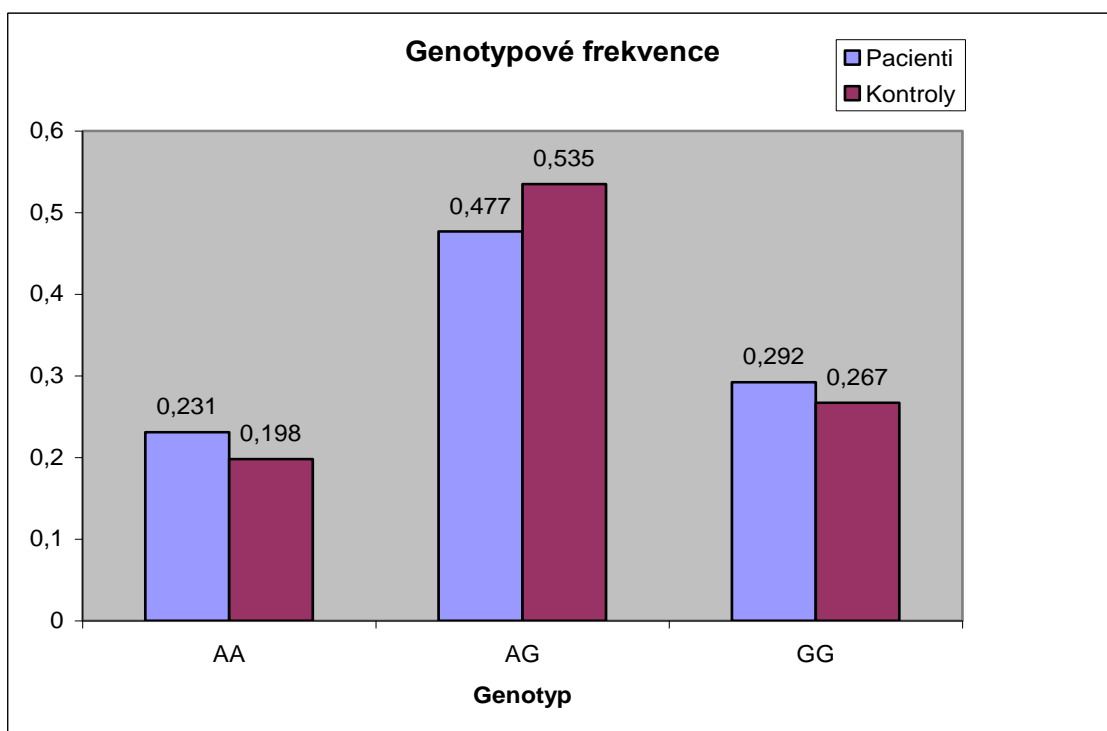
ATG16L1
rs2241880 A/G

	Pacienti	Kontroly
Genotyp*	N=195	N=101
AA	0,231/45	0,198/20
AG	0,477/93	0,535/54
GG	0,292/57	0,267/27
Alela*	2N=390	2N=202
A	0,469/183	0,465/94
G	0,531/207	0,535/108

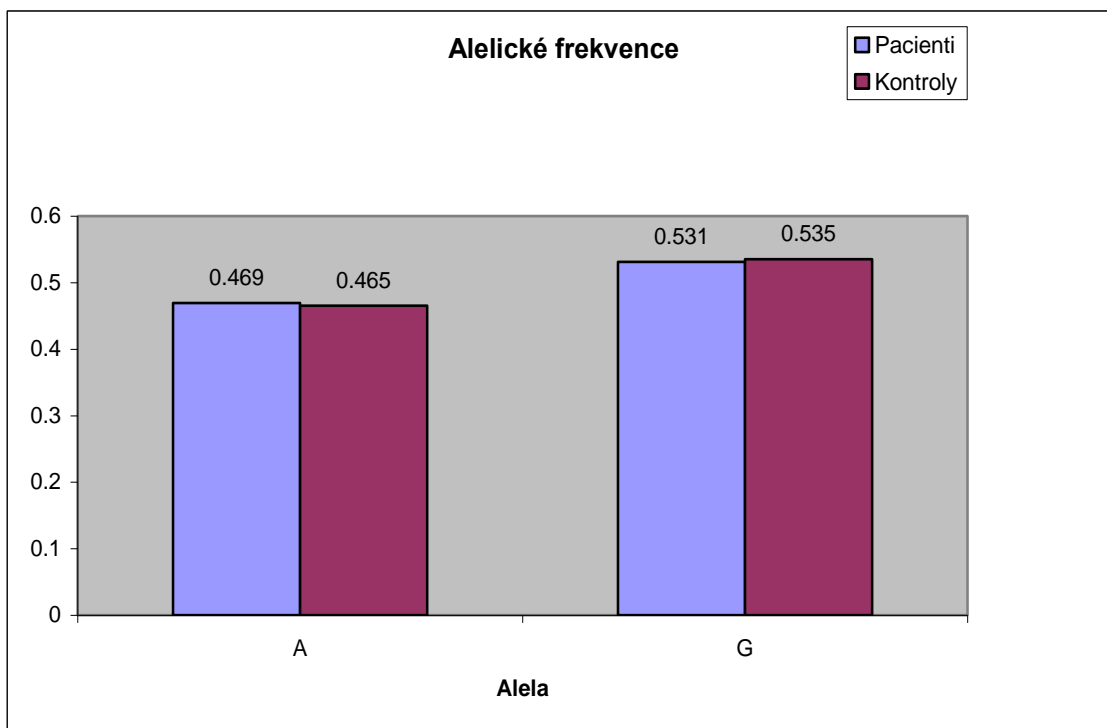
Při srovnání alelických a genotypových frekvencí mezi skupinami pacientů se sarkoidózou a kontrolními jedinci nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$).

	Genotypové frekvence	Alelické frekvence	Fenotypové frekvence	
Celkem	195			
AA	45	0,231	183	0,469
AG	93	0,477		
GG	57	0,292	207	0,531
Muži				
kontroly	48			
AA	12	0,250	47	0,490
AG	23	0,479		
GG	13	0,271	49	0,510
Pacienti	85			
AA	17	0,200	75	0,441
AG	41	0,482		
GG	27	0,318	95	0,559
Ženy				
kontroly	53			
AA	8	0,151	47	0,443
AG	31	0,585		
GG	14	0,264	59	0,557
Pacienti	110			
AA	28	0,255	108	0,491
AG	52	0,473		
GG	30	0,273	112	0,509
RTG stádium				
I.	89			
AA	20	0,225	79	0,444
AG	39	0,438		
GG	30	0,337	99	0,556
II.+III.	90			
AA	20	0,222	89	0,494
AG	49	0,544		
GG	21	0,233	91	0,506
LS				
Ano	29			
AA	9	0,310	28	0,483
AG	10	0,345		
GG	10	0,345	30	0,517
Ne	116			
AA	26	0,224	107	0,461
AG	55	0,474		
GG	35	0,302	125	0,539

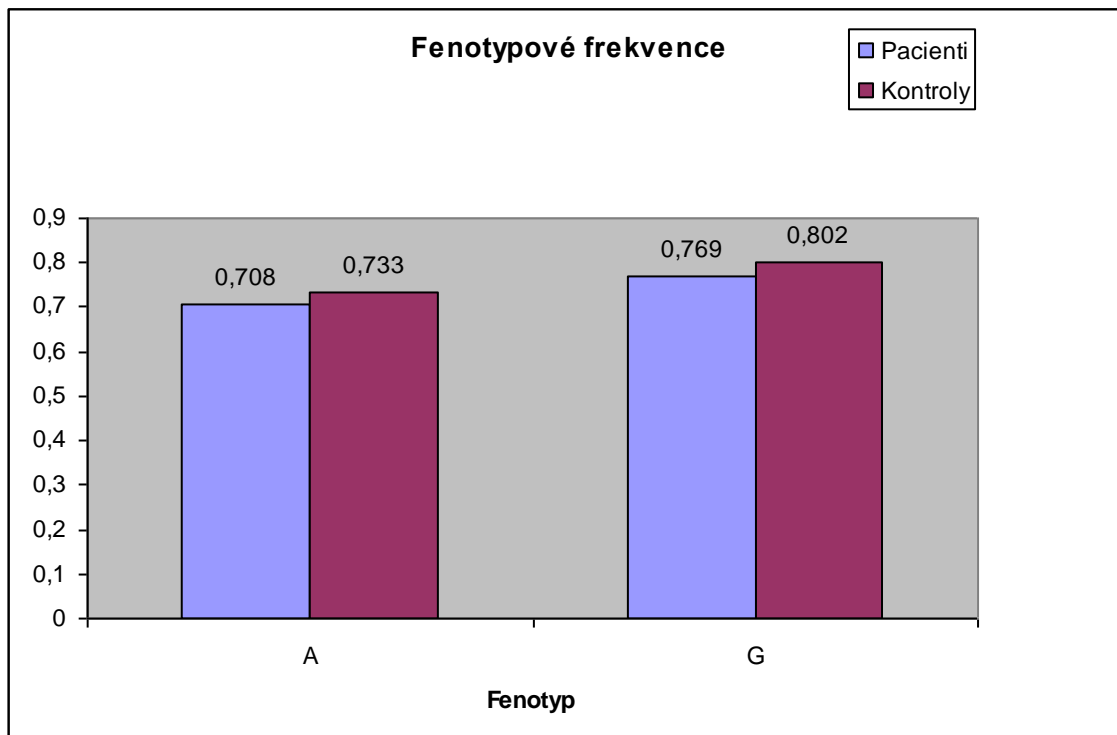
Tab. 3: Tabulka uvádí srovnání genotypové, alelické a fenotypové frekvence *ATG16L1* rs2241880 variant v celé skupině pacientů se sarkoidózou a výsledky subanalýzy v podskupinách podle pohlaví, RTG stádia sarkoidózy a přítomnosti Löfgrenova syndromu (LS). Sloupec frekvencí je rozdělen na dva další, kde v prvním vidíme absolutní počet a druhý znázorňuje relativní podíl zastoupení dané varianty.



Graf 1: Srovnání genotypové frekvence. Graf znázorňuje srovnání podílu zastoupení *ATG16L1* rs2241880 genotypů mezi pacienty a kontrolními jedinci. V prvním sloupci srovnání pro homozygoty AA, ve druhém pro heterozygoty AG a ve třetím pro homozygoty GG.



Graf 2: Srovnání alelických frekvencí polymorfismu *ATG16L1* rs2241880. První sloupec srovnává relativní zastoupení alely A mezi pacienty a kontrolními jedinci. Ve druhém sloupci je totéž srovnání pro alelu G.



Graf 3: Srovnání počtu nosičů alely A (první sloupec) a alely G (druhý sloupec) polymorfismu *ATG16L1* rs2241880 mezi pacienty se sarkoidózou a zdravými kontrolami.

Závěr

V teoretické části této bakalářské práce byly shrnuty dosavadní znalosti o sarkoidóze, komplexním zánětlivém onemocnění s neznámou příčinou. Práce se zaměřila na patogenezi, diagnostiku, léčbu a zejména genetickou složku ovlivňující vnímavost k tomuto onemocnění. V kontextu nejvýznamnějších přístupů ke studiu dědičné složky komplexních nemocí byly popsány základní typy genových polymorfismů a podán stručný přehled metod pro jejich genotypizaci - včetně metody PCR-SSP, která byla poté použita v části experimentální. Pro účely praktické části byl také stručně charakterizován gen *ATG16L1*, jeho polymorfismus a význam pro vnímavost k jiným zánětlivým chorobám.

V experimentální části pak byly popsány postupy všech použitých laboratorních metod potřebných pro genotypizaci vybraného polymorfismu, charakterizovány soubory pacientů a kontrolních jedinců a shrnuty získané výsledky. Ve studovaných skupinách byla určena distribuce jednotlivých genotypů polymorfismu *ATG16L1* rs2241880. Zjištěné frekvence alel a genotypů byly porovnány mezi kontrolními jedinci a pacienty se sarkoidózou. Nejvýznamnějším nálezem této práce je zjištění, že se polymorfismus *ATG16L1* rs2241880 zásadním způsobem nepodílí na genetické vnímavosti k sarkoidóze v české populaci.

Literatura:

- Amre D. K., Mack D. R., Morgan K., Krupoves A, Costea I., Lambrette P., Grimard G., Dong J., Feguery H., Bucionis V., Deslandres C., Levy E., Seidman E. G. (2009) Autophagy gene ATG16L1 but not IRGM is associated with Crohn's disease in Canadian children. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 501-507.
- Baughman R. P., Sparkman B. K., Lower E. E. (2007) Six-minute walk test and health status assessment in sarcoidosis. *Chest* **132**, 207–213.
- Biller H., Zissel G., Ruprecht B., Nauck, Busse Grawitz A., Müller-Quernheim J. (2006) Genotype-corrected reference values for serum angiotensin-converting enzyme. *Eur. Resp. J.* **28**, 1085–1090.
- Burke R. R., Stone C. H., Havstad S., Rybicki B. A. (2009) Racial differences in sarcoidosis granuloma density. *Lung* **187**, 1-7.
- Costabel U., Guzman J., Baughman R. P. (2007) Systemic evaluation of a potential cutaneous sarcoidosis patient. *Clin. Dermatol.* **25**, 303–311.
- Costabel U., Ohshimo S., Guzman J. (2008) Diagnosis of sarcoidosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **14**, 455-461.
- Coudurier M., Freymond N., Aissaoui S., Calender A., Pacheco Y., Devouassoux G. (2009) Homozygous variant rs2076530 of BTNL2 and familial sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffus. Lung Dis.* **26**, 162-166.
- Cummings J. R., Cooney R., Pathan S., Anderson C. A., Barrett J. C., Beckly J., Geremia A., Hancock L., Guo C., Ahmad T., Cardon L. R., Jewell D. P. (2007) Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 941-946.
- Deretic V. (2006) Autophagy as an immune defence mechanism *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 375-382.
- Doty J.D., Mazur J.E., Judson M.A. (2005) Treatment of sarcoidosis with Infliximab. *Chest* **127**, 1064-1071.
- Dusatkova P., Hradsky O., Lenicek M., Bronsky J., Nevoral J., Kotalova R., Bajerova K., Vitek L., Lukas M., Cinek O. (2009) Association of *IL23R* p.381Gln and *ATG16L1* p.197Ala with Crohn disease in the Czech population. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **49**, 405-410.
- Fischer A., Nothnagel M., Franke A., Jacobs G., Saadati H.R., Gaede K.I., Rosenstiel P., Schürmann M., Müller-Quernheim J., Schreiber S., Hofmann S. (2011) Association of inflammatory bowel disease risk loci with sarcoidosis, and its acute and chronic subphenotypes. *Eur. Resp. J.* **37**, 610-617.

- Grunewald J, Eklund A. (2007) Sex-specific manifestation of Löfgren's syndrom. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 40-44.
- Grunewald J., Eklund A. (2009) Löfgren's syndrom: Human leukocyte antigen strongly influences the disease course. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 307-312.
- Grutters J. C., van den Bosch J. M. M. (2006) Corticosteroid treatment in sarcoidosis. *Eur. Resp. J.* **28**, 627-636.
- Heath R. J., Xavier R. J. (2009) Autophagy, immunity and human disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **25**, 512-520.
- Hörster R., Kirsten D., Gaede K. I., Jafari C., Strassburg A., Greinert U., Kalsdorf B., Ernst M., Lange C. (2009) Antimycobacterial immuneresponses in patients with pulmonary sarcoidosis. *Clin. Respir. J.* **3**, 229–238.
- Iannuzzi M. C., Maliarik M. J., Poisson L. M., Rybicki B. A. (2003) Sarcoidosis Susceptibility and Resistance HLA-DQB1 Alleles in African Americans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 1225-1231.
- Iannuzzi M. C., Rybicki B. A., Teirstein A. S. (2007) Medical Progress: Sarcoidosis. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2153–2165.
- Márquez A., Núñez C., Martínez A., Mendoza J. L., Taxonera C., Fernández-Arquero M., Díaz-Rubio M., de la Concha E. G., Urcelay E. (2009) Role of ATG16L1 Thr300Ala polymorphism in inflammatory bowel disease: a Study in the Spanish population and a meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 1697-1704.
- Moller D. R. (2007) Potential etiologic agents in sarcoidosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **4**, 465-468.
- Müller-Quernheim J., Kienast K., Held M., Pfeifer S., Costabel U. (1999) Treatment of chronic sarcoidosis with an azathioprine/prednisolone regimen. *Eur. Resp. J.* **14**, 1117-1122.
- Nishiyama Y., Yamamoto Y., Fukunaga K., Takinami H., Iwado Y., Satoh K., Ohkawa M. (2006) Comparative evaluation of 18F-FDG PET and 67Ga Scintigraphy in patients with sarcoidosis. *J. Nucl. Med.* **47**, 1571-1576.
- Perricone C., Borgiani P., Romano S., Ciccacci C., Fusco G., Novelli G., Biancone L., Calabrese E., Pallone F. (2008) ATG16L1 Ala197Thr is not associated with susceptibility to Crohn's disease or with phenotype in an Italian population. *Gastroenterology* **134**, 368-370.
- Rossmann M. D., Thompson B., Frederick M., Maliarik M., Iannuzzi M. C., Rybicki B. A., Pandey J. P., Newman L. S., Magira E., Beznik-Cizman B., Monos D.; ACCESS Group (2003) HLA-DRB1*1101: a significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 720-735.

- Rybicki B. A., Major M., Popovich J. Jr., Maliarik M. J., Iannuzzi M. C. (1997) Racial Differences in Sarcoidosis Incidence: A 5-Year Study in a Health Maintenance Organization. *Am. J. Epidemiol.* **145**, 234–241.
- Sato H., Grutters J. C., Pantelidis P., Mizzon A. N., Ahmad T., van Houte A.-J., Lammers J. W. J., van den Bosch J. M. M., Welsch K. I., du Bois R. M. (2002) HLA-DQB*0201: A marker for good prognosis in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**, 406-412.
- Smith J. R., Rosenbaum J. T. (2001) A role of methotrexate in the management of non-infectious orbital inflammatory disease. *Br. J. Ophthalmol.* **85**, 1220-1224.
- Tang W. Ch., Yap M. K. H., Yip S. P. (2008) A review of current approaches to identifying human genes involved in myopia. *Clin. Exp. Optom.* **91**, 4-22.
- Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A, Nagy M, Gaede KI, Franke A, Haesler R, Koch A, Lengauer T, Seegert D, Reiling N, Ehlers S, Schwinger E, Platzer M, Krawczak M, Müller-Quernheim J, Schürmann M, Schreiber S. (2005) Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nature Genet.* **37**, 357-364.
- Wu J. J., Rashcovsky Schiff K. (2004) Sarcoidosis. *Am. Fam. Physician* **70**, 312-322.
- Wyser Ch. P., van Schalkwyk E. M., Alheit B., Bardin P. G., Joubert J. R. (1997) Treatment of progressive pulmonary sarcoidosis with cyclosporin A. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 1371-1376.
- Zhi J., Zhi F. C., Chen Z. Y., Yao G. P., Guan J., Lin Y., Zhang Y. C. (2008) Correlation of the autophagosome gene ATG16L1 polymorphism and inflammatory bowel disease. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **28**, 649-651.

Seznam použitých zkratk:

ACE	angiotensin konvertující enzym
APC	antigen prezentující buňka
BAL	bronchoalveolární laváž
BTNL2	butyrolin 2
CaCl ₂	chlorid vápenatý
CNV	variabilita v počtu kopií úseku DNA
D _{LCO}	difúzní kapacita pro oxid uhelnatý
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ddNTPs	dideoxynukleotidtrifosfáty
dNTPs	deoxynukleotidtrifosfáty
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FEV1	usilovný vydechnutý objem vzduchu za 1s
FDG PET	pozitronová emisní tomografie využívající ¹⁸ F-fluorodeoxyglukózu
FMT PET	pozitronová emisní tomografie využívající L-[3- ¹⁸ F]- α -metylytyrosin
GM CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
H ₃ BO ₃	kyselina trihydrogenboritá
HLA	hlavní histokompatibilní komplex člověka
IBD	zánětlivá onemocnění střeva
IL – 1	interleukin 1
MALDI – TOF	hmotnostní spektrometrie s laserovou ionizací za účasti matrice a detektorem analyzujícím dobu letu
MCP-1	monocytový chemotaktický protein 1
MgCl ₂ · 6H ₂ O	hexahydrát chloridu hořečnatého
MIP-1	makrofágový zánětlivý protein 1
NaCl	chlorid sodný
(NH ₄) ₂ SO ₄	síran amonný
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR RFLP	polymerázová řetězová reakce s analýzou polymorfismu v délce restrikčních fragmentů
PCR SSO	polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými oligonukleotidy
PCR SSP	polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery

PCR voda	voda pro polymerázovou řetězovou reakci
qRT PCR	polymerázová řetězová reakce s detekcí v reálném čase
RTG	rentgenové vyšetření
SDS	dodecylsulfát sodný
SNP	jednonukleotidové polymorfismy
STR	polymorfismus v počtu krátkých opakovaných sekvencí
Taq polymeráza	termostabilní polymeráza z <i>Thermus aquaticus</i>
TDT	test sledování nerovnováhy přenášených alel
Th1	pomocný T-lymfocyt typu 1
Th2	pomocný T-lymfocyt typu 2
TNF α	faktor nekrotizující nádory α
TOF	analyzátor doby průletu
Tris	pufr tris(hydroxymethyl)aminomethan
VNTR	polymorfismus v počtu opakovaných (tandemových) sekvencí