

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Polymorfismus imunitních genů se zaměřením na cytokiny a jejich
receptory**

Disertační práce

Zuzana Rožánková

Olomouc 2012

Prohlašuji tímto, že jsem předkládanou disertační práci vypracovala samostatně a uvedla jsem veškerou použitou literaturu i jiné prameny.

Zuzana Rožánková

.....

OBSAH:

1. PODĚKOVÁNÍ.....	6
2. SOUHRN	7
3. SUMMARY	9
4. ÚVOD	11
Obecný úvod	11
4.1. Charakteristika polymorfismu genů imunitní odpovědi.....	11
4.1.1. Základní definice.....	11
4.1.2. Definice a typy genových (DNA) polymorfismů.....	12
4.1.3. Jednonukleotidové polymorfismy	12
4.1.4. Variabilní počet tandemových opakování a polymorfismy typu “copy number variation”	13
4.1.5. Funkční DNA polymorfismy – vliv na strukturu a expresi molekul imunitní odpovědi.....	14
4.1.6. Možnosti detekce a vyšetření polymorfismů genů imunitní odpovědi	15
4.1.7. Metody detekce jednonukleotidových polymorfismů (SNP).....	15
4.1.8. Příklady “klasických” technik ke genotypizaci SNP variant	16
4.1.9. Příklady genotypizačních technik "nové generace"	18
4.2. Současné přístupy k hodnocení genetické složky komplexních nemocí a komplikací léčby	20
4.2.1. Souvislost variability genů imunitní odpovědi a vnímavosti k nemocem	20
4.2.2. Přístup kandidátních genů <i>versus</i> celogenomové studie ve studiu vnímavosti ke komplexním onemocněním	23
4.3. Design studií genetické vnímavosti ke komplexním chorobám.....	24
4.3.1. Metoda „analýzy vazby“ (z angl. „Linkage analysis“)	24
4.3.2. Asociační studie případů a kontrol (z angl. „Case – control association study“) ..	24
4.4. Variabilita genů imunitní odpovědi: perspektivy výzkumu a klinických aplikací.....	25

Specifický úvod – východiska pro konkrétní cíle disertační práce:.....	26
4.5.1. Cytokiny a variabilita jejich genů	26
4.5.2. Genetická komponenta intersticiálních plicních nemocí a polymorfismy komplementového receptoru 1 (CR1).....	29
4.5.2.1. Genetika sarkoidózy.....	29
4.5.2.2. Genetika idiopatické plicní fibrózy.....	30
4.5.2.3 Polymorfismus genu pro komplementový receptor 1 (CR1) a jeho vztah susceptibilitě k sarkoidóze a IPF.....	31
5. CÍLE	32
5.1. Polymorfismy cytokinových genů	32
5.2. Asociace polymorfismu genu pro komplementový receptor 1 (CR1) u intersticiálních plicních nemocí (sarkoidózy/IPF)	32
6. MATERIÁL A METODY	33
6.1. Polymorfismy cytokinových genů – stanovení populačních frekvencí	33
6.2. Hodnocení/replikace významu polymorfismů genu pro komplementový receptor 1 (CR1) u sarkoidózy/IPF	35
6.3. Kvantitativní real-time (qRT)-PCR ke stanovení exprese CR1 mRNA v bronchoalveolárních buňkách	37
7. VÝSLEDKY	38
7.1. Polymorfismy cytokinových genů – rozložení u středoevropské populace a srovnání s etnicky blízkými populacemi.....	38
7.2. Asociace polymorfismu genu pro komplementový receptor 1 (CR1) u intersticiálních plicních nemocí (sarkoidózy/IPF)	39
7.2.1. Sarkoidóza.....	39
7.2.2. Idiopatická plicní fibróza	41
8. DISKUSE	42
8.1. Polymorfismy cytokinových genů	42
8.2. Polymorfismus genu pro komplementový receptor 1 (CR1)	44

8.2.1. Sarkoidóza.....	44
8.2.2. Idiopatická plicní fibróza	46
9. VYSVĚTLIVKY POUŽÍVANÝCH ZKRATEK	50
10. CITACE	51
11. TABULKY	66
12. PŘEHLED VLASTNÍCH PUBLIKACÍ.....	76
13. PŘÍLOHY: Publikace předkládané v disertační práci.....	79

- Práce č. 1 Kubistova Z, Mrazek F, Tudos Z, Kriegova E, Ambruzova Z, Mytilineos J, Petrek M. Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in the healthy Czech population. *Int J Immunogenet.* 2006;33(4):261-7.
IF 2006: 1,333
- Práce č. 2 Mrazek F, Kvezereli M, Garr E, Kubistova Z, Kriegova E, Fillerova R, Arakelyan A, Ruven HJ, Drabek J, van den Bosch JM, Kolek V, Welsh KI, Grutters JC, du Bois RM, Petrek M. Complement receptor 1 single nucleotide polymorphisms in Czech and Dutch patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens.* 2008; 71(1):77-80.
IF 2008: 2,076
- Práce č. 3 Kubistova Z, Mrazek F, Lympany PA, Lagan AL, Arakelyan A, Kriegova E, Welsh KI, Kolek V, Zatloukal J, Hutyrova B, du Bois RM, Petrek M. The CR1 C5507G polymorphism is not involved in susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis in two European populations. *Tissue Antigens.* 2008; 72(5):483-6.
IF 2008: 2,076
- Práce č. 4 Kubistova Z, Mrazek F, Petrek M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009; 153(2):93-102.
IF 2010: 0,716

1. PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli Prof. MUDr. Martinovi Petřkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a vytvoření podmínek jak po celou dobu mého studia, tak při sepisování této práce.

Děkuji svému školiteli-konzultantovi MUDr. Františkovi Mrázkovi Ph.D. za všestrannou pomoc a podporu během postgraduálního studia. Dr. Ing. Evě Kriegové a Ing. Regině Fillerové za užitečné připomínky týkající se zejména experimentální části mého studia. Dále bych ráda poděkovala Martině Lukešové, Mgr. Janě Onderkové, Sylvii Zachové a Anně Vévodové z Ústavu imunologie LF UP v Olomouci za technickou pomoc. Z pracovníků Kliniky plicních nemocí a TBC LF UP a FN v Olomouci, vedené Prof. MUDr. Vítězslavem Kolkem, DrSc., bych ráda poděkovala MUDr. Beatě Hutýrové, Ph.D. a MUDr. Jaromírovi Zatloukalovi za pomoc při shromažďování klinických dat.

Poděkování patří všem výše jmenovaným, ale i ostatním pracovníkům Ústavu imunologie a Kliniky plicních nemocí a TBC LF UP a FN v Olomouci.

V neposlední řadě děkuji za podporu, porozumění a trpělivost mé rodině.

Práce byla vypracována ve spolupráci Laboratoře imunogenomiky a proteomiky Ústavu imunologie LF UP a Kliniky plicních nemocí a tuberkulózy LF UP a FN Olomouc. Realizace experimentů byla podpořena z projektů IGA NR9099-4, IGA NR9490-3, IGA NR9037 a MWSM 6198959205 a také projektem Biomedicína pro regionální rozvoj a lidské zdroje - CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

2. SOUHRN

Úvod: Imunitní systém, jeden ze základních homeostatických mechanismů organismu, se v interindividuálním srovnání imunitní odpovědi jeví jako nehomogenní. Rozdíly v charakteru a intenzitě imunitní odpovědi mohou být podmíněny, kromě exogenních a dalších endogenních faktorů, také variabilitou (polymorfismem) genů kódujících molekuly, které se na imunitní odpovědi podílejí. Variabilita těchto genů může také ovlivňovat rozvoj a průběh onemocnění s imunitní složkou. Cílem předkládané disertační práce bylo specifikovat vybrané polymorfismy genů pro cytokiny, určit jejich zastoupení v české populaci ve srovnání s dalšími evropskými národy. Práce se dále zabývala vztahem variant genu pro komplementový receptor 1 (CR1) s vnímavostí k chronickým plicním onemocněním, jmenovitě sarkoidóze a idiopatické plicní fibróze (IPF).

Metodika: Do studovaných souborů byli zahrnuti: 1) zdraví jedinci, členové registru dárců kostní dřeně (kontrolní skupiny) a 2) pacienti Kliniky respiračních nemocí a tuberkulózy LF UP a FN Olomouc (a spolupracujících zahraničních pracovišť) s diagnostikovanou sarkoidózou/IPF.

Vybrané polymorfismy genů pro cytokiny a jejich receptory byly vyšetřovány genotypizací pomocí polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP). Frekvence zjištěné v české populaci byly porovnávány s daty publikovanými v jiných evropských populacích. V části, která se zabývá studiem asociace jednonukleotidového polymorfismu genu *CR1* a vnímavosti k sarkoidóze/IPF, byly genotypizace provedeny s využitím PCR-SSP, polymerázové řetězové reakce v reálném čase (real-time PCR, „TaqMan“) a sekvenace. Získané frekvence jednotlivých genových variant genu CR1 byly srovnávány mezi zdravými jedinci a pacienty se sarkoidózou/IPF s cílem nalezení/potvrzení jejich souvislosti s predispozicí a/nebo klinickým průběhem uvedených plicních onemocnění.

Výsledky: Určili jsme populační frekvence 22 polymorfismů cytokinových genů a jejich receptorů v souboru zdravých jedinců české národnosti. Získaná data se nelišila od frekvencí v jiných středoevropských populacích (kromě *IL1B*-511; $p < 0,01$). Alelické frekvence cytokinových polymorfismů v české populaci se však významně lišily od dat, získaných v populaci makedonské, řecké, řecko-kyperské, bulharské a ruské. Dále bylo zjištěno, že zastoupení alelických variant několika jednonukleotidových polymorfismů souvisí s příslušností k jednotlivým evropským subregionům, např. středoevropské vs. jihoevropské populaci (*TNF*-308; *IL2*+166; *IL6*-174).

Ve studiích zabývajících se asociací jednonukleotidového polymorfismu pro *CR1* s vnímavostí k idiopatické plicní fibróze/sarkoidóze nebyla zjištěna souvislost mezi alelickou/genotypovou frekvencí *CR1* polymorfismu a vznikem/klinickým průběhem studovaných onemocnění plic. V naší práci jsme tedy s dostatečnou statistickou silou nepotvrdili dřívější nálezy o vztahu variant genu *CR1* k sarkoidóze/IPF v italské populaci.

Závěr: K hodnocení míry geneticky podmíněné vnímavosti ke komplexním chorobám je nezbytná znalost zastoupení jednotlivých genových variant ve zdravé populaci příslušného etnika (národnosti). Předkládaná disertační práce poukazuje na mezipopulační variabilitu v zastoupení polymorfismů cytokinových genů a přináší nové výsledky, vztahující se ke studiu genetické složky komplexních onemocnění plic. Výsledky, dosažené v této práci, navíc jednoznačně poukazují na nutnost nezávislé replikace studií genetické komponenty komplexních nemocí.

3. SUMMARY

Introduction: The immune system, one of the principal homeostatic mechanisms, may be considered as interindividually heterogeneous in the view of immune response. In addition to exogenous and further endogenous factors, these interindividual differences in the immune response may be caused by variability (polymorphisms) of the genes encoding for molecules that are involved in immune response. Variability of these genes may also affect the development and course of diseases with immune component. The aim of this thesis was to specify selected polymorphisms of cytokine genes, to determine their distribution in the Czech population and to compare obtained data with those reported from other European populations. In the second part this work dealt with possible association between the variants of the Complement Receptor 1 (CR1) gene with susceptibility to chronic pulmonary diseases, particularly sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF).

Methods: The study groups consisted of 1) healthy individuals, members of the bone marrow donor registry (control groups) and 2) the patients with diagnosis of sarcoidosis/IPF. Selected polymorphisms of the genes for cytokines and their receptors were investigated by genotyping using polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP). The frequencies obtained in the Czech population were compared with those reported in other European populations. In the section concerning possible association of *CR1* gene single nucleotide polymorphisms and susceptibility to sarcoidosis/IPF the genotypings were performed using PCR-SSP, real-time polymerase chain reaction (RT-PCR, “TaqMan”) and sequencing. The frequencies of the *CR1* gene variants were compared between the groups of healthy subjects and patients with sarcoidosis/IPF in order to identify / confirm their relationship with the genetic predisposition to development and/or clinical course of investigated pulmonary diseases.

Results: We determined the population frequencies of the 22 polymorphisms of cytokine genes and their receptors in the group of Czech healthy individuals. The data were similar to the frequencies obtained in other Central European populations (except IL-1 β -511, $p < 0.01$). However, allelic frequencies of particular cytokine gene polymorphisms in the Czech population was significantly different from the data obtained in the populations of Macedonians, Greeks, Cypriot Greeks, Bulgarians and Russians. Furthermore, we observed that the proportion of several investigated allelic variants is related to the particular European subregions, e.g. Central European versus South European populations (TNF α -308, IL-2-166, IL-6-174). In the studies dealing with association of the *CRI* gene single nucleotide polymorphisms with susceptibility to sarcoidosis/IPF, no relationship was observed between *CRI* alleles/ genotypes and development/clinical course of investigated lung diseases. Thus, disposing of the sufficient statistical power we did not confirmed here the previous findings on the *CRI* gene variants being associated with susceptibility to sarcoidosis /IPF in an Italian population.

Conclusion: In order to assess genetic susceptibility to complex diseases the data on the distribution of particular candidate genetic variants in the healthy population of concrete ethnic group are necessary. The present thesis points out population variability in the distribution of cytokine gene polymorphisms and provide novel data related to the genetic component of the complex pulmonary diseases. Furthermore, the results reported in this thesis clearly demonstrate the necessity of independent replication of studies investigating genetic component of the complex diseases.

4. ÚVOD

Obecný úvod

Imunitní systém hraje klíčovou roli v udržování individuální autonomie jedince a v procesu rozpoznávání struktur „bezpečných“ od struktur „nebezpečných“, které mohou být potenciálně nebezpečné (např. mikroby, nádorové buňky) (Schwartz, 2002). Kromě toho se efektorová fáze imunitní odpovědi zaměřuje na eliminaci cizorodých struktur z organismu. Z řady empirických pozorování i experimentálních dat je zjevné, že imunitní odpověď není jednotná a stejně efektivní v rámci celé populace. Tato „individualita“ imunitní odpovědi může být způsobena celou řadou zevních i vnitřních faktorů, mezi něž řadíme i variabilitu (polymorfismus) genů imunitní odpovědi (z angl. “immune response genes” - IRG) (Rihet, 2007). Vzhledem k tomu, že jsou složky imunitní odpovědi i jednotlivé imunitní molekuly zapojeny v patogenezi řady nemocí, může variabilita genů imunitní odpovědi ovlivnit zda a jakým způsobem se u konkrétního jedince tato onemocnění rozvinou. Kromě vnímavosti k chorobám mohou genové polymorfismy ovlivňovat i odpovídavost organismu na patogeny, chemikálie, léky, atd. Souvislost (asociace) polymorfismů genů imunitní odpovědi s vnímavostí k různým onemocněním byla popsána (a v některých případech i potvrzena) v řadě studií. Příklady dříve publikovaných prací o souvislosti polymorfismů IRG s rozvojem nebo manifestací chorob jsou uvedeny v dalším textu.

4.1. Charakteristika polymorfismů genů imunitní odpovědi

4.1.1. Základní definice

Geny imunitní odpovědi (IRG) mohou být definovány jako geny kódující molekuly a mediátory zapojené do procesů vrozené (přirozené) i získané (adaptivní) imunitní odpovědi (Bochud, 2007). Spektrum IRG je široké a vysoce komplexní – od receptorů vrozené imunity (např. “Pattern Recognition Receptors” – PRRs), přes cytokiny a jejich receptory až

k antigenům hlavního histokompatibilního systému (MHC) či imunoglobulinům. Kromě toho mohou být za geny bezprostředně související s imunitní odpovědí považovány i geny pro četné vnitrobuněčné signální molekuly, které jsou nezbytné pro zprostředkování/realizaci signálu.

Obecné znalosti o struktuře a funkci lidského genomu jsou v plném rozsahu aplikovatelné i pro geny imunitní odpovědi. Tyto geny jsou prakticky vždy polymorfní, což znamená, že se v populaci vyskytují ve více formách, které nazýváme alelami (Kwok & Chen, 2003). Stupeň (rozsah) genového polymorfismu se zásadně liší u jednotlivých skupin genů imunitní odpovědi a souvisí do značné míry s funkcí těchto genů. Zatímco kódující genová sekvence pleiotropních cytokinů (TNF, IL-1) je vysoce konzervativní, značná populační variabilita byla pozorována u genů pro molekuly související s prezentací antigenu (např. geny hlavního komplexu tkáňové slučitelnosti - MHC).

4.1.2. Definice a typy genových (DNA) polymorfismů

Obecně je genový (DNA) polymorfismus definován jako existence dvou nebo více variant (alel) chromozomálního lokusu, které se navzájem liší v nukleotidové sekvenci nebo mají proměnlivý počet opakujících se nukleotidových jednotek. Vzácné varianty nejsou klasifikovány jako polymorfismus – kritériem je, že se běžná alela v dané populaci vyskytuje s frekvencí 99% a méně (tzn., že vzácnějších variant je nejméně jedno procento). V následujícím textu jsou popisovány pouze vybrané běžné typy genových polymorfismů.

4.1.3. Jednonukleotidové polymorfismy

Jednonukleotidové polymorfismy (z angl. “single nucleotide polymorphisms”, SNPs) jsou nejběžnějším typem genových variant. Ve veřejně dostupných databázích bylo dosud registrováno více než 10 milionů jednonukleotidových polymorfismů (Lee, 2007). SNP je

změna v nukleotidové sekvenci genu (DNA) ve smyslu substituce (záměny), delece (vyřazení) nebo inserce (vřazení) jednoho nukleotidu ve specifickém místě. Polymorfismus typu SNP nejčastěji sestává ze dvou alel (frekvence výskytu vzácnější alely je $\geq 1\%$). Populační frekvenci konkrétní alely pro daný SNP určujeme jako podíl chromozomů nesoucích tuto alelu na celkovém počtu chromozomů v populaci (Kwok, 2001). Z hlediska populační genetiky je důležité věnovat pozornost značným rozdílům mezi výskytem jednotlivých variant jednonukleotidových polymorfismů v různých populacích a etnicích; SNP alela, která se běžně vyskytuje v jedné geografické nebo etnické skupině může být v jiném souboru zcela vzácná.

4.1.4. Variabilní počet tandemových opakování a polymorfismy typu “copy number variation”

Lidský genom je „plný“ opakujících se DNA sekvencí různého rozsahu, které jsou klasifikovány na základě velikosti a počtu opakování základní jednotky a/nebo celkové délky repetitivních oblastí. DNA oblasti s krátkými opakovanými jednotkami (obvykle 2-6 párů bází) se nazývají krátké tandemové repetice (z angl. short tandem repeats, STRs), regiony s delší opakující se oblastí se běžně označují jako variabilní počet tandemových opakování (z angl. variable number of tandem repeats, VNTRs). Polymorfismy definované rozdíly v počtu celých funkčních genových jednotek (exony, geny) se označují jako „variabilita v počtu kopií“ (z angl. Copy number variation, CNV).

Krátká tandemová repetice (STR) v DNA je opakující se sekvence stejné jednotky dvou nebo více nukleotidů, které spolu přímo navzájem sousedí. Základní jednotka obvykle dosahuje délky od 2 do 10 párů bází (bp). STR jsou typicky lokalizovány v nekódujících regionech DNA; nejčastěji se nacházejí v okolí chromozomálních centromer. V současné době je publikováno přes 10 000 STR sekvencí v lidském genomu. Vyšetřením několika STR

lokusů je možné vytvořit unikátní individuální genetický profil. STRs jsou vzhledem ke svým vlastnostem (vysoký stupeň polymorfismu, mnohočetný alelismus) v současné době nejvíce využívanými genetickými markery v oblasti lidské identifikace (Cheng et al., 2002). STR analýza se tak stala běžnou technikou určování genetických profilů ve forenzním lékařství (Lee et al., 2006).

Jako „Copy Number Variation“ (CNV) se označují polymorfismy, pro něž je charakteristický rozdíl v počtu kopií určitých genových oblastí (nebo celých genů) v genomu jednotlivců v rámci populace (McCarroll et al., 2008). Nedávná zjištění ukazují, že se zvýšený počet kopií některých genových oblastí často vyskytuje také v nádorových buňkách a může se odrážet i ve zvýšení exprese proteinu, který je zmnoženou genovou oblastí kódován.

4.1.5. Funkční DNA polymorfismy – vliv na strukturu a expresi molekul imunitní odpovědi

Polymorfismy, které mění jakýmkoliv způsobem expresi a/nebo strukturu genového produktu (např. proteinu, specializované RNA), označujeme jako funkční DNA polymorfismy. Polymorfismus lokalizovaný v kódující sekvenci genu může kódovat alternativní aminokyselinu v primární struktuře proteinu (produkuje se odlišná polypeptidová sekvence) nebo způsobit chybu v přepisu, která může podmínit syntézu nefunkčního proteinu (nejčastěji posun čtecího rámce v důsledku delece/inzerce nukleotidu). Tyto SNPs označujeme obecně jako kódující / nesynonymní. SNPs uvnitř kódující sekvence však nemusí bezpodmínečně měnit aminokyselinovou sekvenci produkovaného proteinu díky degeneraci genetického kódu. SNPs, u kterých vedou obě formy ke stejné výsledné polypeptidové sekvenci, nazýváme synonymní.

SNPs, které se nacházejí mimo kódující regiony genu, mohou ovlivňovat sestřih mRNA, vazbu transkripčních faktorů nebo sekvence nekódujících RNA. Varianty v těchto

nekódujících oblastech mohou tedy významně ovlivňovat bazální a/nebo indukovanou expresi genů nebo vést k produkci alternativních sestřihovaných variant. Pro řadu polymorfismů regulačních genových regionů již byly prokázány asociace s deregulací exprese molekul účastnících se imunitní odpovědi. Tyto polymorfismy v regulačních oblastech genů jsou pravděpodobně (spolu)zodpovědné za individuální rozdíly v hladině řady cytokinů; uvedený fenomén se někdy popisuje jako „vysoké nebo nízké producentství“ cytokinů.

4.1.6. Možnosti detekce a vyšetření polymorfismů genů imunitní odpovědi

Primární identifikace DNA (genového) polymorfismu je založena na srovnání homologních DNA sekvencí mezi jedinci téhož druhu. Jakmile je DNA polymorfismus identifikován, může být vyšetřován (“genotypizován”) v populačních vzorcích s pomocí desítek popsanych genotypizačních technik, jejichž cílem je rozlišit jednotlivé nukleotidové varianty. Existuje celá řada přehledů genotypizační technik, tento text se omezuje na příklady „klasických“ genotypizačních technik, které jsou charakteristické relativně nízkou kapacitou. Naproti tomu nové “vysokokapacitní” genotypizační technologie v poslední době dramaticky rozšířily možnosti genetické epidemiologie – dovolují paralelní genotypizaci tisíců variant (Schuster, 2008). V současné době jsou tak k dispozici celogenomové asociační studie genetické vnímavosti k řadě onemocnění (Kim & Misra, 2007). V závěru této kapitoly je stručně zmíněno sekvenování DNA jako nástroj k určování nových variant i genotypizaci a možná alternativa celogenomové typizace v budoucích aplikacích.

4.1.7. Metody detekce jednonukleotidových polymorfismů (SNP)

Cílem genotypizačních technik je v případě polymorfismů typu SNP rozlišit jednotlivé nukleotidové varianty vyšetřovaného úseku DNA nebo celého genomu. K tomuto účelu slouží řada metod, které se liší na úrovni vstupních reagensů, reakčními podmínkami či způsobem

detekce signálu a vyhodnocením výsledků (Sylvänen, 2001). Základem společným pro většinu nízkokapacitních technik ale zůstává polymerázová řetězová reakce (PCR), která s využitím opakování cyklů denaturace dvouřetězcové DNA, připojení oligonukleotidových sond (primerů) a následné syntéze nových komplementárních fragmentů umožňuje exponenciální zmnožení (amplifikaci) cílové DNA oblasti. Tyto molekulárně-genetické postupy jsou používány v diagnostice geneticky podmíněných chorob, určování asociací SNP variant s komplexními chorobami, při ověřování shody dárce a příjemce pro transplantace orgánů a tkání i u paternitních sporů a identifikace osob (Fiedler, 2001).

4.1.8. Příklady “klasických” technik ke genotypizaci SNP variant

PCR-SSP (*polymerase chain reaction with sequence specific primers*) – genotypizační technika založená na určování variant na základě klasické polymerázové řetězové reakce pomocí sekvenčně specifických primerů. Primery, které jsou komplementární k sekvencím určitých alel, se k nim připojují a následně umožňují amplifikaci daných úseků v případě, že vyšetřovaná DNA obsahuje cílovou alelu. Produkty PCR reakce jsou detekovány při elektroforéze v agarózovém gelu a vizualizovány pomocí UV záření.

PCR-SSO (*polymerase chain reaction with sequence specific oligonucleotides*) - produkt PCR amplifikace je hybridizován se škálou alelicky specifických oligonukleotidů (sond), které jsou navázané na pevné fázi. Striktní hybridizace a promytí zajistí, že značené DNA fragmenty vyšetřovaného genu zůstanou navázány pouze na DNA sondách zcela komplementárních k sekvenci vyšetřované DNA. Vizualizace signálu je možná pomocí fluorescenčního značení.

PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*)– jedna z nejstarších metod pro detekci SNPs, která využívá afinitu restričních endonukleáz ke

specifickým restričními místy v DNA sekvenci. Analýza se provádí pomocí gelové elektroforézy, kdy jsou restriční fragmenty tříděny podle délky.

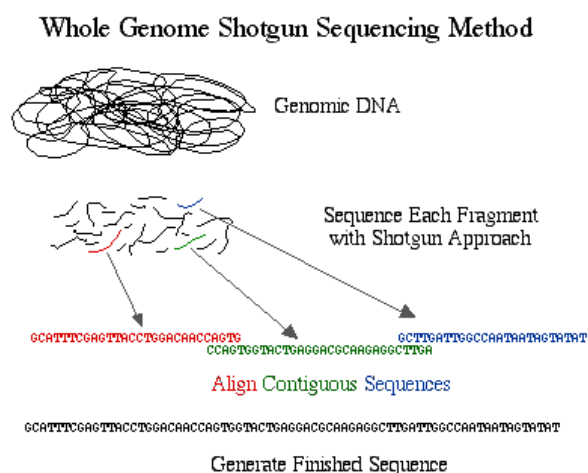
qRT-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*) – umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu, během níž dochází k paralelní amplifikaci a detekci fluorescenčního signálu, který je průběžně (“real-time”) zaznamenáván a během reakce kdykoliv dostupný. Během reakce je tedy měřeno množství uvolněné fluorescence, které odpovídá množství nahromaděného produktu. Podle metody fluorescenční detekce a vyhodnocení množství PCR produktu rozlišujeme interkalační “SYBR Green assays”, značené hybridizační sondy a značené hydrolyzační sondy. “TaqMan” technika je nejrozšířenější qRT-PCR metoda typizace jednonukleotidových polymorfismů využívající hybridizaci PCR produktu a specifického oligonukleotidu (sondy) značeného na 5’ konci zářičem (reporter) a na 3’ konci zhasičem (quencher). Po navázání značené sondy na templát je sonda hydrolyzována 5’ nukleázovou aktivitou Taq polymerázy, čímž dochází k oddělení dosud záření inhibujícího zhasiče od zářiče. Zářič uvolňuje fluorescenční signál úměrně rychlosti odštěpování sondy a množství přibývajících produktu. qRT-PCR lze využít i pro multiplexové analýzy v počtu závislých na množství kanálů snímajících fluorescenci u detekčního přístroje (McGuigan & Ralston, 2002) .

SBT (*sequencing based typing*) – používá se pro stanovení sekvence jednotlivých nukleotidů v řetězci DNA na základě různých technik, jako např. Maxam-Gilbertovy (chemické) nebo, dnes více používané, Sangerovy (biochemické) (Franca et al., 2002). Tato technika využívá tvoření nového řetězce podle templátového pomocí deoxynukleotidtrifosfátů (dNTPs) a dideoxynukleotidtrifosfátů (ddNTPs). ddNTPs nejsou na 3’ konci ukončené vazbou –OH skupiny na uhlík, čímž je zamezeno připojení dalšího nukleotidu, a tím zastavena syntéza

nového řetězce. V každé sekvenační reakci jsou kromě deoxynukleotidů vždy zastoupeny také dideoxynukleotidy, které náhodně vstoupí do syntézy nového řetězce v místě, kde by se normálně vyskytoval odpovídající deoxynukleotid, a tím se celá reakce zastaví. Analýza reakce je provedena na gelové elektroforéze, kde jsou vytvořeny 4 dráhy pro různé oligonukleotidové směsi nebo dnes častěji používanou laserovou detekcí v kapiláře sekvenátoru, kdy je každý nukleotid (terminátor) značen jinou fluorescenční barvou.

4.1.9. Příklady genotypizačních technik “nové generace”

„Shotgun“ (*Whole-Genome Shotgun Assembly*) – metoda použitá pro čtení lidského genomu firmou Celera Genomics. Jde o rozdělení určité části genomu na jednotlivé krátké úseky, jejich osekvenování a následné vyhledání překrývajících se částí, pomocí nichž se zpětně poskládá daná sekvence. Pro dostatečné překrytí jednotlivých fragmentů je ale třeba více sekvenačních reakcí, než při klasickém sekvenování (Edenberg & Liu, 2009; Maresso & Broeckel, 2008).



DNA čipy (*microarrays*) – technika využívající uspořádání až statisíců oligonukleotidových sond na jeden čip a umožňující detekci obrovského množství polymorfismů zároveň. Vyšetřovaná fluorescenčně značená DNA se přidává na čip k sondám specifickým pro různé

SNPs. Po odmytí DNA, které se dokonale nehybridizovaly, jsou detekovány jednotlivé vazby na základě fluorescence. Přestože oligonukleotidové mikročipy mají poněkud nižší specifitu a senzitivitu (je třeba využívat speciální postupy kontroly kvality), pro obrovskou kapacitu současně vyšetřovaných SNPs jde o velmi výhodnou genotypizační techniku (Bier et al., 2008). Mezi nejpoužívanější a nejpokročilejší techniky patří mikročipy firem Illumina a Affymetrix. Mikročipy Illumina jsou zaměřené především na genotypizaci SNPs, genovou expresi a proteomiku s využitím tzv. BeadArray technologie, založené na křemičitých mikrokuličkách v malých jamkách, na svazcích optických vláken nebo dvourozměrných křemičitých destičkách. Každá kulička je pokryta statisíci kopiemi specifického oligonukleotidu, který funguje jako hybridizační sekvence.

Affymetrix nabízí mikročipovou technologii schopnou vyšetřit statisíce SNPs z několika set nanogramů DNA na základě měření hybridizace oligonukleotidů k příslušným sekvencím, přičemž jako kontroly jsou použity oligonukleotidy se záměrně vnesenou chybou. Jedním 500k GeneChip čipem je možné teoreticky genotypizovat až 500000 SNP (reálný výtěžek je vždy nižší vzhledem k vyřazení SNP, které neprošly kontrolou kvality).

MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) – metoda využívající hmotnostních rozdílů alelicky specifických PCR produktů, které jsou navázány na mikročipy a následně analyzovány. Primery pro extenzi musí být navrženy tak, aby měly různou hmotnost odlišující dané jednonukleotidové polymorfismy. Tato metoda umožňuje multiplexovou analýzu a díky rychlé sériové analýze vzorků má vysokou kapacitu (Ragoussis et al., 2006).

Molecular beacon genotyping (*molecular beacons*) - jde o jednořetězcové oligonukleotidové hybridizační sondy vytvářející smyčky, uvnitř nichž se nachází úsek komplementární k cílové

sekvenci. Pro účely fluorescenční detekce se na jednom konci komplementárního řetězce nachází zářič (fluorofor) a na druhém zhášec (quencher). V klidovém stavu je zhášec díky komplementaritě tak blízko zářiči, že nedochází k fluorescenci. Pokud se ale do blízkosti specifické smyčky přiblíží cílová sekvence a tyto spolu začnou hybridizovat, konce řetězce se od sebe oddálí a dochází k uvolnění fluorescence. Tuto techniku lze využít pro multiplexové analýzy díky možnosti syntézy různých fluoroforů.

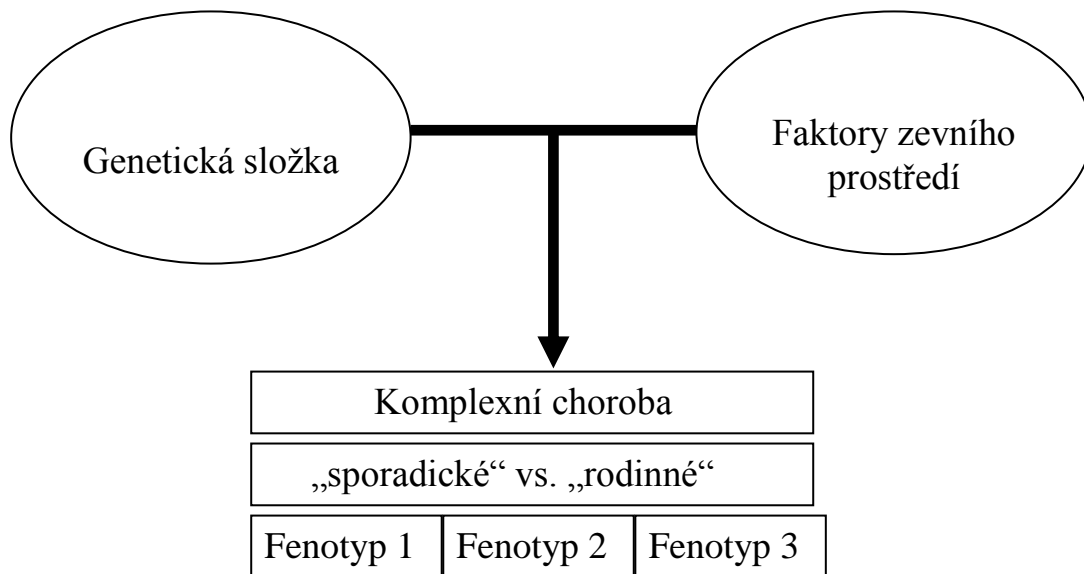
4.2. Současné přístupy k hodnocení genetické složky komplexních nemocí a komplikací léčby

4.2.1. Souvislost variability genů imunitní odpovědi a vnímavosti k nemocem

Z hlediska klasického hodnocení účasti genetické složky na vzniku a rozvoji onemocnění rozeznáváme 1) monogenní choroby, kde varianta jednoho genu (mutace) přímo způsobuje onemocnění (zevní vlivy však mohou modifikovat “fenotyp”), 2) komplexní (multigenní) choroby, kde interakce geneticky různě vnímavých jedinců s faktory prostředí vede k rozvoji onemocnění (podíl genetické složky a zevních faktorů se zásadně liší u různých chorob) a 3) choroby bez genetické komponenty, které se vyvíjí nezávisle na genetické výbavě jedince (viz Obr. 1.).

Polymorfismus genů imunitní odpovědi je zapojen do patogeneze u monogenních i komplexních chorob. Znalosti o příčinách a molekulárních mechanismech monogenních nemocí rapidně vzrostly spolu s rozvojem v oblasti molekulární genetiky. Díky molekulárně-genetickým metodám byly u řady monogenních chorob identifikovány příčinné genetické varianty, jako je tomu například u primárních imunodeficitů (Marodi, 2007). Obecně jsou varianty způsobující kritické změny ve struktuře a/nebo expresi genů imunitní odpovědi v běžné populaci velmi vzácné (často nejsou považovány za “polymorfismus” podle arbitrární definice).

Obr. 1. : Vliv genetické složky a vnějších faktorů na vznik komplexního onemocnění (zjednodušené schéma), příklady společensky významných komplexních onemocnění.



ateroskleróza, tumory, alergie/astma, autoimunitní choroby

V epidemiologických studiích (např. při studiích na dvojčatech) bylo prokázáno, že velká většina nemocí s významným dopadem na celkovou morbiditu a mortalitu v rozvinutých zemích patří do skupiny komplexních nemocí s různým podílem genetických faktorů (např. ateroskleróza a její komplikace, alergie/astma, nádory, autoimunitní onemocnění). Protože se molekuly kódované geny imunitní odpovědi (např. cytokiny a jejich receptory, receptory přirozené imunity, MHC komplex) významně účastní na rozvoji těchto nemocí, jsou jejich geny vhodnými kandidáty pro hledání faktorů genetické vnímavosti k těmto nemocem.

Genetická složka multigenních nemocí musí být chápána jako komplexní jev na rozdíl od těsného vztahu mezi příčinou (genová varianta) a důsledkem (nemoc) u monogenních onemocnění. Cílem následující části textu je stručný popis hlavních přístupů, užívaných pro identifikaci genetických variant, souvisejících s komplexními nemocemi. Způsob, jakým je

prokazována souvislost jednotlivých variant s komplexními chorobami, by se měl držet pravidel doporučených pro tento typ genetického výzkumu (viz Obr. 2.) (von Elm et al., 2009). Přesná definice “fenotypu” nemoci a její dodržování při vytváření skupin pacientů (zajištění “fenotypové homogenity”), správné genotypizační a statistické přístupy a omezení populační stratifikace (bias v důsledku nehomogenity genetického pozadí studovaných populací) jsou kritickými podmínkami pro vedení genetických studií. Na základně zkušeností z posledního desetiletí se k potvrzení role genetických variant u nemocí jeví jako nezbytné ověření primárních dat nezávislou replikací.

Obr. 2.: Průkaz vztahu mezi konkrétní genovou variantou a vnímavostí k onemocnění (podle Ioannidis, 2005)



4.2.2. Přístup kandidátních genů *versus* celogenomové studie ve studiu vnímavosti ke komplexním onemocněním

Rychlý rozvoj v molekulárně-genetické technologii (viz sekce o vysokokapacitních genotypizačních technikách) poskytl během několika posledních let možnost provést řadu celogenomových genetických studií k detekci variant, které souvisejí s vnímavostí ke komplexním nemocem. Celogenomové studie tak kompletně změnily oblast studia genetiky komplexních nemocí, která byla dříve doménou přístupů vazebné analýzy a kandidátních genů.

Celogenomové studie (GWAS, z angl. Geonome-Wide Association Study) aplikují systematický (“hypothesis free”) přístup: u pacientů a kontrolních jedinců testují genetické markery, které by měly dostatečně pokrývat variabilitu celého genomu (Clayton, 2005). Pro tento účel je typizováno obrovské množství variant (často více než půl milionu SNPs) ve skupině pacientů s určitou nemocí. Zjištěné zastoupení jednotlivých SNP variant je poté srovnáváno s odpovídajícími daty, získanými u zdravé kontrolní populace; analýza výsledků GWAS se opírá o speciální statistické metody. Aplikace přístupu kandidátních genů vyžaduje naproti tomu co nejpřesnější znalosti molekulárních mechanismů nemoci. Na základě těchto vědomostí mohou být za kandidátní považovány všechny geny, jejichž produkty se účastní patogeneze nemoci v nejširším slova smyslu. Pokud jsou takové geny polymorfní, jsou jejich polymorfismy (především funkční varianty) vyšetřovány u pacientů a kontrolních subjektů (nebo nejbližších příbuzných v rámci rodinných studií).

4.3. Design studií genetické vnímavosti ke komplexním chorobám

4.3.1. Metoda „analýzy vazby“ (z angl. „Linkage analysis“)

„Analýza vazby“ je metoda založená na sledování segregace alel genetických markerů, které mohou být ve vazebné nerovnováze s alelami v hypotetickém lokusu ovlivňujícím vnímavost k dané chorobě (Tang et al., 2008). Nejčastěji se jedná o analýzu segregace vyšetřovaných genetických markerů v rámci rodin. Obecně se popisují dva základní typy vazebné analýzy. Parametrická (klasická) vazebná analýza se užívá především u jednoduchých (monogenních) nemocí s Mendelistickým a jednoznačně definovaným modelem dědičnosti. Neparametrická vazebná analýza (např. metoda postižených sourozeneckých párů, z angl. „affected sib-pair metod“) je založená na analýze alel konkrétních genetických markerů sdílených mezi sourozenci postiženými danou nemocí. Markery, které jsou mezi postiženými sourozenci sdíleny častěji, než lze očekávat u náhodné segregace, mohou poukazovat na genetickou oblast s kauzální (susceptibilní) genovou variantou. Ve srovnání s „case-control“ studiemi je vazebná analýza charakterizována omezenou kapacitou k detekci alel se slabší asociací k danému onemocnění. Další důkazy přítomnosti genetického faktoru a pečlivý výběr fenotypu nemoci může zvýšit výpovědní sílu tohoto přístupu.

4.3.2. Asociační studie případů a kontrol (z angl. „Case – control association study“)

Asociační studie představují nejčastěji používaný přístup k identifikaci genů vnímavosti u komplexních nemocí, který je založen na srovnání frekvencí tzv. kandidátních genových variant mezi skupinami pacientů a zdravých kontrol (nebo srovnávání statisíců SNP markerů u celogenomových asociačních studií). Populační asociační studie jsou charakterizované nábořem kontrolních subjektů z populací, které jsou stejného etnického původu jako pacienti, zatímco rodinné asociační studie využívají jako kontrol příbuzných

pacientů (obvykle rodičů). Genetické asociační studie mají ve srovnání se studii „Analýzy vazby“ větší výpovědní hodnotu při detekci genů s malým vlivem u komplexních nemocí. Nevýhodou těchto studií je naopak náchylnost k falešně pozitivním výsledkům (nutnost replikace dat). Většina těchto studií se zaměřuje přímo na jeden nebo několik málo genů, u kterých se vyšetřují funkčně významné polymorfismy nebo polymorfismy dostatečně pokrývající variabilitu příslušné genové oblasti (tzn. „značkové“ polymorfismy). Návrh a provedení „case-control“ asociačních studií vyžaduje pečlivé posouzení řady faktorů, které mohou významně ovlivnit získané výsledky: od výběru kandidátních genů a polymorfismů, přes způsob zařazování jedinců do testované a kontrolní populace, až po užití validních genotypizačních a statistických přístupů (Daly, 2009)

4.4. Variabilita genů imunitní odpovědi: perspektivy výzkumu a klinických aplikací

Vědomosti o genech imunitní odpovědi získané jejich dlouhodobým výzkumem jsou již běžně využívané v četných oblastech klinické medicíny. Imunogenetika HLA systému je nepostradatelnou součástí komplexní diagnostiky u klinických transplantací (optimální párování dárce a příjemce) a pomocné diagnostiky onemocnění asociovaných s HLA systémem. Možnosti identifikace a diagnostiky monogenních nemocí (např. primárních imunodeficitů) byly významně rozšířeny cíleným vyhledáváním nejčastěji se vyskytujících příčinných genetických variant, které tyto choroby způsobují. Kromě těchto praktických aplikací se studiem genů imunitní odpovědi významně zlepšilo pochopení mechanismů imunitního systému a imunitní odpovědi.

Výzkum genů imunitní odpovědi a genomu jako takového je stále konfrontován s řadou výzev. Z technologického hlediska je významný další vývoj „high-throughput“ genotypizačních technik včetně vysokokapacitního sekvenování individuálního humánního genomu (Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT et al., 2007; Lee,

2007). Masivnějšímu využití celogenomového sekvenování v genetických asociačních studiích stále brání jeho vysoká ekonomická náročnost. Sběr, statistická analýza a interpretace obrovského množství dat získaných z rozsáhlých genetických studií vyžadují aplikaci relevantních biostatistických a bioinformatických metod.

Za hlavní cíle budoucího výzkumu genetické vnímavosti k nemocem lze považovat: 1) definici genetických komponent nemoci ve smyslu identifikace jednotlivých predisponujících genetických variant, 2) identifikaci nových molekulárních cílů pro léčbu, 3) příspěvek k další individualizaci přístupu k pacientovi (ve vztahu k prognózování, profylaxi a léčbě) a 4) příspěvek k diagnostice onemocnění (vyhrazeno pro silně vázané varianty - zvláště u monogenních chorob). Na základě nedávných zjištění celogenomových asociačních studií lze očekávat využití některých genetických markerů zejména v prognózování onemocnění. Nesporný význam mají nová data o genetické komponentě chorob pro lepší porozumění jejich etiopatogenetickým mechanismům (Lango et al., 2008).

Speciální úvod – v tomto oddíle jsou uvedena teoretická východiska pro konkrétní cíle disertační práce:

4.5.1. Cytokiny a variabilita jejich genů

Cytokiny (rozpuštěné proteiny a glykoproteiny) jsou jako základní regulační molekuly imunitní odpovědi produkovány širokým spektrem buněk a působí na cílové buňky prostřednictvím cytokinového receptoru buď autokrinně (na tutéž buňku, která cytokin secernuje), parakrinně (na okolní buňky), nebo endokrinně (na vzdálené buňky). Vazbou cytokinu na receptor a přenosem signálu do buňky se spustí signální dráhy vedoucí ke změnám exprese genů, pomocí nichž jsou cytokiny schopny regulovat intenzitu a délku trvání imunitní odpovědi. Odpověď na cytokinový signál může mít např. charakter stimulace nebo

inhibice proliferace cílových buněk, navození jejich migrace, iniciace apoptózy nebo sekrece protilátek či jiných cytokinů těmito buňkami.

Cytokiny mohou nejrůznějším způsobem ovlivňovat aktivitu širokého spektra cílových buněk (hovoříme o pleiotropních účincích), mohou mít podobnou funkci a navzájem se zastupovat (redundance), mohou působit souhlasně (synergismus) nebo naopak mohou své účinky navzájem inhibovat (antagonismus).

Z hlediska regulace imunitní odpovědi (zejména zánětu) lze cytokiny velmi zjednodušeně rozdělit do dvou skupin – na prozánětlivé a protizánětlivé (imunoregulační). Prozánětlivé cytokiny, mezi něž patří např. interleukin (IL)-1 a tumor nekrotizující faktor (TNF), jsou schopny svými pleiotropními účinky navodit komplexní reakce, které se mohou projevit horečkou, lokální či systémovou zánětlivou reakcí, tkáňovou destrukcí a v některých případech i šokem s následkem smrti. Omezení biologické aktivity IL-1 a TNF je možné několika způsoby, např. neutralizací pomocí protilátek, rozpustných receptorů, receptorových antagonistů a inhibitorů proteáz přeměňujících inaktivní prekurzory na aktivní zralé molekuly. Blokování účinku obou výše uvedených cytokinů lze úspěšně léčebně využít u pacientů s revmatoidní artritidou, zánětlivým onemocněním střev nebo reakce štěpu proti hostiteli; neúspěšné naopak bývá u septických pacientů (Dinarello et al., 2000) .

Protizánětlivé cytokiny jsou skupinou imunoregulačních molekul, které mohou kontrolovat (inhibovat) mechanismy spouštějící a udržující zánět. Jsou, spolu se specifickými cytokinovými inhibitory a rozpustnými cytokinovými receptory, spoluzodpovědné za regulaci imunitní odpovědi v organismu. Jejich „fyziologické“ účinky v případě lokálního zánětu a „patologické“ účinky u systémové zánětlivé odpovědi jsou předmětem intenzivního výzkumu. Mezi hlavní protizánětlivé cytokiny patří interleukin (IL)-1 receptorový antagonist (RA), IL-4, IL-10, IL-11 a IL 13. Volné specifické receptory pro cytokiny IL-1, TNF α a IL-18 působí

rovněž jako inhibitory cytokinů, podporujících zánětlivou reakci organismu (Opal et al., 2000).

Na základě četných pozorování bylo zjištěno, že se produkce a regulace cytokinů liší u různých jedinců. Za jednu z nejvýznamnějších a nejpravděpodobnějších příčin této interindividuální variability v produkci cytokinů se pokládá polymorfismus kódujících genů. Předpokládá se, že se nejčastěji jedná o polymorfismy uvnitř regulačních oblastí cytokinových genů (širší promotory, introny, blízké 3'oblasti) (Knight & Kwiatkowski, 1999). Na základě tohoto faktu bývají příslušné cytokinové polymorfismy a polymorfismy cytokinových genů studovány jako „kandidáti“ v souvislosti s vnímavostí k infekčním a autoimunitním onemocněním (Bidwell et al., 1999, 2001), stejně jako u posttransplantačních komplikací (Dickinson et al., 2004; Mytilineos et al., 2004, Ollier, 2004; Mrázek & Petřek, 2004).

Distribuce cytokinových polymorfismů se značně liší v závislosti na národnosti příslušnosti vyšetřované populace (Hoffmann et al., 2002; Louie et al., 2005); z toho plyne, že by asociace polymorfismu cytokinových genů s konkrétním onemocněním, pozorovaná u jedné populace, neměla být automaticky přenášena na jiné populace odlišného genetického „pozadí“. Data, týkající se rozložení cytokinových polymorfismů ve zdravé populaci, jsou nezbytná k vyšetřování nebo replikaci asociací těchto polymorfismů s konkrétními nemocemi, především v případě použití přístupu „case-control“. Protože byly údaje o distribuci polymorfismu cytokinových genů v české populaci dosud publikovány pouze omezeně (Cinek et al., 2004), zaměřila se předkládaná studie na určení frekvencí vybraných polymorfismů cytokinů a cytokinových genů u vzorku české populace a dále na jejich srovnání s frekvencemi pozorovanými u několika jiných evropských populací.

4.5.2. Genetická komponenta intersticiálních plicních nemocí a polymorfismy komplementového receptoru 1 (CR1)

4.5.2.1. Genetika sarkoidózy

Sarkoidóza je multisystémové granulomatozní onemocnění, vznikající vystavením geneticky vnímavých jedinců neznámým spouštěcím faktorům vnějšího prostředí (Baughman et al., 2003; du Bois et al., 2005; Iannuzzi, 2007). Sarkoidóza se často projevuje oboustrannou hilovou lymfadenopatií, plicní infiltrací, očními a kožními lézemi, ovšem postiženy bývají neřídka i jiné orgány. Přítomno bývá zvýšené množství cirkulujících imunokomplexů a hyperreaktivita B-lymfocytů. V některých případech přechází nemoc do chronické fáze spojené často s plicní fibrózou, kdy dochází k rozvoji Th2 imunitní odpovědi (Moller et al., 2003). V patogenezi sarkoidózy, stejně jako ostatních multigenních chorob, se uplatňují geny vnímavosti (susceptibility), které predisponují ke vzniku onemocnění, a geny modifikující jejich průběh (du Bois et al., 2005). Několik příkladů publikovaných asociací polymorfismů cytokinových genů s vnímavostí k plicní sarkoidóze je uvedeno v Tabulce 1. Významnými se jeví zejména varianty HLA genů související s přítomností Löfgrenova syndromu (LS), akutní formy sarkoidózy s lepší prognózou (zejména alely DRB1*03 a DQB1*02). Obdobně byly s LS asociovány varianty genů pro tumor nekrotizující faktor (TNF) α a lymphotoxin (LT) α , které jsou klíčovými mediátory granulomatozního zánětu. Rozdílné výsledky v jednotlivých populacích byly pozorovány při sledování asociace polymorfismu genu pro komplementový receptor (CR)1, kdy se u české populace nepotvrdila souvislost GG genotypu s vnímavostí k sarkoidóze (Mrazek et al., 2008), která byla zjištěna u italské populace (Zorzetto et al., 2002).

4.5.2.2. Genetika idiopatické plicní fibrózy

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je závažné chronické onemocnění neznámé etiologie, provázené fibrotizací plicní tkáně, které má v případě neprovedení transplantace plic velmi nepříznivou prognózu. Charakteristickým rysem idiopatické plicní fibrózy je histologický obraz „běžného intersticiálního zánětu“ plic (usual interstitial pneumonia, UIP). Diagnóza IPF je bez provedení otevřené (chirurgické) plicní biopsie nespolehlivá, je však možné ji stanovit s vysokou pravděpodobností, pokud pacient splňuje 4 stanovená „velká“ kritéria pro klinickou diagnostiku IPF, kterými jsou: 1. vyloučení jiných příčin intersticiálního plicního procesu, 2. abnormální plicní funkce ukazující na poruchu nebo zhoršení plicní výměny, 3. oboustranné bazální retikulární abnormality s minimálními změnami charakteru „mléčného skla“ na HRCT, 4. transbronchiální biopsie nebo bronchoalveolární laváž (BAL), jejichž nález vylučuje alternativní diagnózu. Dále je zapotřebí naplnění alespoň 3 ze 4 „malých“ kritérií - 1. věk nad 50 let, 2. postupný vznik ponámahové dušnosti, která není zdůvodnitelná jinou nemocí, 3. trvání nemoci více než 3 měsíce, 4. poslechový nález nádechového praskání bilaterálně bazálně (American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias, 2002). Podobně jako u sarkoidózy se předpokládá, že se na vnímavosti k tomuto onemocnění a jeho klinickém průběhu podílí genetické faktory. Hlavními kandidáty genetické složky IPF jsou geny pro klíčové mediátory idiopatické plicní fibrózy, např. tumor nekrotizující faktor (TNF) α , interleukin (IL)-6, lymphotoxin (LT) α , endothelin, matrix -metaloproteináza-1 (MMP-1). Hladiny mnohých cytokinů jsou rovněž zvýšeny v bronchoalveolární laváži pacientů s IPF (např. IL-1 β nebo IL-1RA).

4.5.2.3 Polymorfismus genu pro komplementový receptor 1 (CR1) a jeho vztah susceptibilitě k sarkoidóze a IPF

CR1 a Sarkoidóza: Sarkoidóza je komplexní systémové onemocnění charakterizované granulomatozním zánětem. Interakce dosud neznámých antigenů se specifickými protilátkami může vést k formování imunokomplexů (ICs), potenciálně důležitých v patogenezi sarkoidózy (Zorzetto et al., 2002). Komplementový receptor 1 (CR1) je exprimován převážně na membráně erytrocytů, které jeho prostřednictvím zajišťují přenos imunokomplexů k jaterním a slezinným fagocytům. CR1 je tak významně zapojen v odstraňování imunokomplexů z oběhu (Krych-Goldberg et al., 2001). Hypotéza o roli imunokomplexů v patogenezi sarkoidózy spolu s dokumentovaným funkčním polymorfismem *CR1* genu (Wilson et al., 1986; Herrera et al., 1998), vedly k vypracování genetické asociační studie u italské populace, ve které byla G alela jednonukleotidového polymorfismu v pozici 5507 *CR1* genu asociována s vnímavostí k sarkoidóze (Zorzetto et al., 2002).

V naší studii jsme se pokusili nejen potvrdit dřívější závěry z italské populace vyšetřením polymorfismu *CR1* C5507G a také blízkého nesynonymního SNP *CR1* A3650G u dvou odlišných kavkazoidních populací, ale také popsat případné funkční dopady genových variant *CR1* na expresi jeho mRNA v buňkách bronchoalveolární lavážní tekutiny pacientů se sarkoidózou a zdravých kontrolních jedinců.

CR1 a IPF: Idiopatická plicní fibróza (IPF) je vzácné ale velmi závažné plicní onemocnění s velmi nepříznivou prognózou. Současné paradigma patogeneze IPF je založeno na konceptu abnormální reparační tkáně v reakci na poranění plic dosud nedefinovaného původu (Hunninghake et al., 2007; Studer et al., 2007). Předpokládá se, že se na vnímavosti k tomuto onemocnění i jeho klinickém průběhu mohou podílet genetické faktory. Některé varianty kandidátních genů již byly ve vztahu k IPF vyšetřovány, často však s nekonzistentními výsledky (Studer et al., 2007; Lawson et al., 2006). Zorzetto a spol. již dříve referoval o

asociaci funkčního jednonukleotidového polymorfismu (SNP) komplemenového receptoru 1 (CR1), jmenovitě *CR1* C5507G (rs3811381), s vnímavostí jak k sarkoidóze (Zorzetto et al., 2002), tak k idiopatické plicní fibróze (IPF) (Zorzetto et al., 2003). *CR1* C5507G SNP má duální charakter ve smyslu struktury CR1 alelických isoform, je tedy lokalizován uvnitř exonu 33 (F isoforma) nebo exonu 41 (S isoforma) genu pro komplementový receptor 1. Tato skutečnost má důležité metodologické důsledky, jak se ukázalo ve studii na finské populaci (Hodgson et al., 2005; Zorzetto et al., 2006). Od původní italské studie (Zorzetto et al., 2003) nebyla další data, potvrzující zapojení *CR1* genových variant v patogenezi IPF, publikována. V souladu s pravidly pro replikaci genetických asociačních studií (Chanock et al., 2007), jsme za účelem zjištění možné asociace *CR1* C5507G SNP s IPF, vyšetřovali dvě dobře charakterizované skupiny evropských pacientů (českých a anglických), spolu s etnicky odpovídajícími zdravými kontrolními jedinci.

5. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

5.1. Polymorfismy cytokinových genů – populační frekvence

- a) Provést genotypizaci vybraných polymorfismů cytokinových genů ve vzorku zdravé české populace (n = 120) a stanovit jejich alelické, genotypové a fenotypové frekvence.
- b) Porovnat získané frekvence s daty, která jsou dostupná pro další evropské populace.

5.2. Asociace polymorfismu genu pro komplementový receptor 1 (CR1) u intersticiálních plicních nemocí (sarkoidózy/IPF) v české populaci – replikační studie

a) Sarkoidóza

Pomocí genetické asociační studie pacientů a zdravých populačních kontrol provedené paralelně ve dvou evropských populacích (české a nizozemské), ověřit případnou souvislost

SNP variant C5507G a A3650G v genu pro komplementový receptor 1 (CR1) se sarkoidózou, která byla dříve publikována pro italskou populaci (Zorzetto et al., 2002)

Pomocí analýzy mRNA zjistit, zda a jak varianty genu *CR1* ovlivňují jeho genovou expresi.

b) Idiopatická plicní fibróza

Obdobným způsobem jako u sarkoidózy (pomocí genetické asociační studie ve dvou na sobě nezávislých populacích, české a anglické) replikovat zjištění Zorzetto a spol. (2003), kteří popisují souvislost mezi SNP variantou C5507G komplementového receptoru 1 (CR1) a idiopatickou plicní fibrózou.

6. MATERIÁL A METODY

6.1. Polymorfismy cytokinových genů – stanovení populačních frekvencí

Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) cytokinových genů byly v rámci této „case – control“ studie typizovány pomocí polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) s použitím „Heidelberg kitu“ (výrobce Univerzita v Heidelbergu) a to u 120 zdravých nepříbuzných jedinců české národnosti (60 mužů a 60 žen), kteří poskytli informovaný souhlas s účastí ve studii.

Genomická deoxyribonukleová kyselina (DNA) byla extrahována z jaderných buněk periferní krve vyšetřovaných jedinců pomocí metody, při níž dochází k vysolování buněčných proteinů dehydratací a srážení saturovaným NaCl roztokem, tzv. vysolovací metodou (Miller et al. 1988). Takto získaná DNA byla použita do vlastní PCR reakce s využitím „Cytokine CTS-PSR-SSP Tray“ (Heidelberg) kitu, který umožňuje detekci regulačních polymorfismů genů pro cytokiny/cytokinové receptory IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α a γ -IFN, stejně jako polymorfismů v kódujících oblastech genů TGF- β a IL-4R α . Pro všechny výše zmíněné polymorfismy byl publikován jejich funkční význam a

souvislost se změnou klidové nebo indukované produkce odpovídajícího cytokinu. Použitý kit využívá metody PCR-SSP, která mimo stanovení polymorfních variant jako takových umožňuje v některých případech fyzicky detekovat rovněž přítomné haplotypy. Součástí kitu jsou vlastní primerové mixy lyofilizované v mikrozkušavkách a master mix obsahující všechny ostatní reakční komponenty s výjimkou Taq polymerázy a vyšetřované DNA (síran amonný, pufovací systém, chlorid hořečnatý, glycerol, kresolovou červeň a deoxyribonukleotidy). Pro potřeby vyhodnocení byly ve směsi lyofilizovaných primerů pro PCR-SSP navíc obsaženy primery pro interní pozitivní kontrolu o délce 440 bp pro IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL-4R α , IL-12, γ -IFN, TGF- β , TNF- α a délce 90 bp pro IL-2, IL-4, IL-6 a IL-10. PCR reakce probíhá za následujících teplotních podmínek: úvodní denaturace (94°C po dobu 2 minut), 10 amplifikačních cyklů (annealing 10 sekund na teplotě 94°C a extenze trvající 1 minutu na teplotě 65°C), 20 cyklů (střídání annealingu 10 sekund na teplotě 94°C a extenze trvající 50 sekund na teplotě 61°C a poté 30 sekund na teplotě 72°C) a renaturace na teplotě 4°C. Výsledný produkt byl vyhodnocen pomocí gelové elektroforézy, při níž specifické amplikony indikují přítomnost dané alely (haplotypu).

Alelické, genotypové i fenotypové (nosičství dané varianty) frekvence byly stanoveny u 22 polymorfismů 13 genů pro cytokiny a jejich receptory (IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL-4R α , IL-12, γ -IFN, TGF- β , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 a IL-10). Pro testování odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy bylo použito u genotypového rozložení χ^2 analýzy. Porovnání zjištěných alelických frekvencí s frekvencemi publikovanými v jiných studiích bylo provedeno standardním χ^2 testem s korekcí podle Woolf-Haldana v případě malých čísel. V Tabulce 2 jsou uvedena srovnání alelických frekvencí jednotlivých polymorfismů cytokinových genů zjištěných u české populace (Olomouc) s odpovídajícími daty publikovanými u zdravých jedinců následujících populací: makedonské, řecké, kyperské, bulharské, polské a ruské.

6.2. Hodnocení/replikace významu polymorfismů genu pro komplementový receptor 1 (CR1) u sarkoidózy/IPF

Sarkoidóza - studovaná populace:

Do této studie bylo celkem zahrnuto 641 nepříbuzných kavkazoidních jedinců, z nichž bylo 210 českých a 116 holandských pacientů se sarkoidózou a 203 českých a 112 holandských zdravých kontrolních jedinců. Sarkoidóza byla u postižených diagnostikována na základě mezinárodně akceptovaných kritérií „ATS/ERS International Consensus Statement“ (ATS/ERS, 2002). Pacienti se sarkoidózou byli dále členěni do jednotlivých subfenotypů s ohledem na rentgenologické stádium nemoci a přítomnost/absenci Löfgrenova syndromu. Všichni pacienti byli diagnostikováni v jediném univerzitním centru (pro každou národnost), pro českou skupinu pacientů na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy Fakultní nemocnice Olomouc a pro holandskou v St. Antoniu Hospital v Nieuwegeinu. Kontrolní skupinu tvořili zdraví dárci krve nebo členové registru dárců kostní dřeně. Nepřítomnost plicního postižení byla u kontrolních subjektů ověřována dotazníkem a pohovorem se zaměřením na rodinnou anamnézu a symptomy respiračního onemocnění. Všichni jedinci souhlasili s anonymním použitím jejich biologických vzorků (DNA, bronchoalveolární lavážní tekutina); studie byla schválena etickými komisemi obou pracovišť. V Tabulce 3 jsou uvedeny klinické charakteristiky pacientů se sarkoidózou i zdravých kontrolních jedinců.

IPF - studovaná populace

Do této studie bylo zapojeno celkem 475 nepříbuzných jedinců kavkazoidního původu, z toho 53 českých IPF pacientů se 203 zdravými kontrolními jedinci a 70 anglických IPF pacientů se 149 kontrolami. Diagnóza idiopatické plicní fibrózy byla provedena na základě typických klinických a rentgenologických znaků, spolu s histologickým obrazem běžného intersticiálního zánětu plic (UIP) při chirurgické plicní biopsii a v souladu s kritérii

pro diagnózu idiopatické plicní fibrózy podle American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS Consensus Classification of IPF, 2002). Všichni jedinci byli diagnostikováni v jediném univerzitním centru; pro českou skupinu pacientů na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy Fakultní nemocnice Olomouc a pro anglickou populaci v Interstitial Lung Disease Unit, Royal Brompton Hospital v Londýně. Jako kontrolní skupina byli použiti zdraví dárci krve nebo členové registru dárců kostní dřeně. Absence plicního postižení u kontrolních subjektů byla ověřována, jak je popsáno v předchozích odstavcích (popis skupin u sarkoidózy). Všichni jedinci souhlasili s anonymním použitím svých biologických vzorků (DNA, bronchoalveolární lavážní tekutina); studie byla schválena etickými komisemi obou pracovišť.

Genotypizace

Za účelem stanovení rozložení genotypů jednonukleotidových polymorfismů komplementového receptoru 1 C5507G (GenBank SNP ID: rs3811381) a A3650G (GenBank SNP ID: rs2274567) byla provedena typizace pomocí polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) (specifikace viz Tabulka 8). DNA, získaná z periferní krve, byla použita do vlastní PCR, která proběhla za následujících teplot pro jednotlivé amplifikační kroky: po úvodní denaturaci (96°C po dobu 1 min) následovaly 3 série po sobě následujících amplifikačních cyklů – 5 cyklů (annealing 20 sekund na teplotě 96°C následován extenzí trvající 45 sekund na teplotě 70°C a 25 sekund na teplotě 72°C), 21 cyklů (annealing 25 sekund na teplotě 96°C následován extenzí trvající 50 sekund na teplotě 65°C a 30 sekund na teplotě 72°C), 4 cykly (annealing 30 sekund na teplotě 96°C následován extenzí trvající 1 minutu na teplotě 55°C a 1 minutu a 30 sekunda teplotě 72°C) poté následovala renaturace na teplotě 4°C. Získaný produkt byl vyhodnocen pomocí agarozové elektroforézy, kde amplikony specifické pro jednotlivé alely poukazovaly na jejich

přítomnost. Specificita PCR reakce byla následně ověřena sekvenováním ampliconu v náhodně vybraných vzorcích všech genotypů. Podíl jednotlivých genotypů byl stanoven přímo a alelické i fenotypové frekvence byly vypočteny pro každou skupinu zvlášť. Soulad s rozložením genotypů podle Hardy-Weinbergovy rovnováhy byl testován pomocí χ^2 testu, který byl využit i pro srovnání genotypových, alelických i fenotypových frekvencí kontrolních skupin a pacientů se sarkoidózou i IPF. Statistická síla studie byla určena podle Lalouela a Rohrwassera (Lalouel a Rohrwasser, 2002). Pro výpočet vztahu mezi CR1 C5507G genotypy a průběžnými proměnnými (věk a plicní funkce) byla použita regresní analýza (SPSS software verze 15.0).

6.3. Kvantitativní real-time (qRT)-PCR ke stanovení exprese CR1 mRNA v bronchoalveolárních buňkách

Expresi mRNA genu *CR1* jsme vyšetřovali v buňkách bronchoalveolární laváže (BAL) kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase (qRT-PCR), pomocí primerů a sond navržených programem ProbeFinder (www.universalprobelibrary.com; Roche Applied Science, Indianapolis, IN), s využitím přístroje přístroj RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia) u podskupiny českých pacientů z genetické asociační studie u sarkoidózy, u nichž byla k dispozici lavážní tekutina (BAL) (n = 52) a kontrolních subjektů (n = 14) bez známek plicního zánětu s normální cytologií buněk lavážní tekutiny. Expresi *CR1* byla určována pomocí metody druhé derivace a normalizována na expresi referenčního genu *PSMB2* (ROTORGENE Software 6.1.71; Corbett Research).

7. VÝSLEDKY

7.1. Polymorfismy cytokinových genů – rozložení u středoevropské populace a srovnání s etnicky blízkými populacemi

Abychom stanovili populační frekvence vybraných 22 SNPs genů pro cytokiny a jejich receptory (viz Tabulka 2), vyšetřili jsme 120 zdravých jedinců české národnosti. Populační frekvence stanovené v naší populaci odpovídaly frekvencím získaným stejnou typizační technikou (Heidelberg kit) v geograficky blízkých populacích [Praha, ČR - (Cinek et al., 2004); Heidelberg, Německo (Louie et al., 2005)]. Pro velkou většinu vyšetřovaných SNPs bylo rozložení variant cytokinových genů, pozorované v naší populaci, velmi blízké frekvencím zjištěným u zdravých populací v Praze i Heidelbergu. Signifikantní rozdíl byl zjištěn pouze v jednom případě (polymorfismus *IL1B*-511, $P < 0.01$).

Záměr studie jsme dále rozšířili o srovnání populačních dat z našeho centra s těmi, které byly zjištěny u jiných kavkazoidních populací, převážně slovanského původu. Toto srovnání však bylo omezeno spektrem polymorfismů, které byly v těchto populacích vyšetřovány. Data všech 22 vyšetřovaných SNPs byla k dispozici pouze pro makedonskou populaci (Skopje - Trajkov et al., 2005). Omezený počet vyšetřovaných jednonukleotidových polymorfismů pak poskytly také studie v dalších populacích – bulharské (Sofie - Mihailova et al., 2005), polské (Polský Těšín - Kurzawski et al., 2005) a ruské (Novosibirsk - Konenkov & Smolnikova, 2002). Pro rozšíření populačních srovnání jsme proto využili také kompletních dat z jiných jihoevropských populací [řecké (Atény) a kyperské (Nicosia), Louie et al., 2005]. Alelické frekvence získané u populace zdravých jedinců české národnosti se významně lišily od frekvencí publikovaných u Makedonců (pro dva z 22 vyšetřovaných SNPs), Řeků (3/22), Kyperských Řeků (5/22), Bulharů (1/8) a ruské populace (1/3). Vzhledem k tomu, že jsme nezjistili žádné rozdíly mezi námi vyšetřovanou a polskou populací můžeme spekulovat, že rozložení alelických variant některých jednonukleotidových polymorfismů cytokinových

genů souvisí s rozdíly mezi jednotlivými evropskými regiony – zřetelné rozdíly byly zjištěny mezi středoevropskou a jihoevropskou populací v polymorfismech *TNF*-308, *IL2* +166 a *IL6*-174 (viz Tabulka 2).

7.2. Asociace polymorfismu genu pro komplementový receptor 1 (CR1) u intersticiálních plicních nemocí (sarkoidózy/IPF)

7.2.1. Sarkoidóza

S cílem stanovit zastoupení variant jednonukleotidového polymorfismu genu pro komplementový receptor 1 (jmenovitě *CR1* C5507G, GenBank SNP ID: rs3811381 a *CR1* A3650G, GenBank SNP ID: rs2274567) ve skupinách českých a nizozemských zdravých kontrolních jedinců a pacientů se sarkoidózou byla u všech vyšetřovaných subjektů provedena genotypizace pro uvedenou variantu *CR1* genu polymerázovou řetězovou reakcí se sekvenčně specifickými primery (Okayama et al., 1989). Pozorovaná distribuce genotypů pro uvedený polymorfismus odpovídala Hardy-Weinbergově rovnováze ($P > 0,05$). Statistická síla naší studie ve vztahu k replikaci výsledků publikovaných v italské práci (Zorzetto et al., 2002) dosáhla hodnoty 99% pro českou populaci a 93% pro nizozemskou populaci (Lalouel et al., 2002). Na rozdíl od zvýšeného výskytu *CR1* 5507*G alely, který byl zaznamenán u italských pacientů se sarkoidózou (Zorzetto et al., 2002), se frekvence zjištěné u českých a nizozemských pacientů nelišily od frekvencí odpovídajících kontrolních skupin, přičemž četnost výskytu G alely u zdravých jedinců byla u všech tří populací (italské, české a nizozemské) stejná (viz Tabulka 4). Zjistili jsme však rozdíly ve frekvencích výskytu G alely mezi skupinami pacientů se sarkoidózou u italské studie (34%) a námi studovanými skupinami pacientů v české (18%) a holandské (23%) populaci. Tyto rozdíly byly způsobeny

vyšším zastoupením GG homozygotů mezi italskými pacienty se sarkoidózou (18%), zatímco u české ani holandské patientské populace nepřevyšovala jejich frekvence 5%.

Vzhledem k tomu, že jsme nenašli žádný významný rozdíl mezi distribucí *CRI* C5507G polymorfismu mezi pacienty se sarkoidózou a zdravými kontrolami v české ani nizozemské populaci, rozšířili jsme genotypizaci i na další nesynonymní jednonukleotidový polymorfismus *CRI* genu (*CRI* A3650G, rs2274567). Ani v případě tohoto polymorfismu jsme nezjistili rozdíly v alelických frekvencích mezi skupinami pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců české či nizozemské národnosti (viz Tabulka 5). Stanovili jsme také frekvenci *CRI* A3650G/C5507G haplotypů pomocí algoritmu “estimation – maximization“ (software ARLEQUIN, verze 3.000) (Excoffier et al., 2005). Odhadované frekvence A3650G/C5507G haplotypů, uvedené v tabulce 6, odpovídaly předchozím výsledkům (Zorzetto et al., 2002; Xiang et al., 1999) včetně nálezů silné vazebné nerovnováhy (LD) (software ARLEQUIN) mezi vzácnějšími alelami obou polymorfismů (*CRI* 5507*G a 3650*G) u všech vyšetřovaných skupin ($D = 0.95$ u českých pacientů, $D = 1.00$ u českých kontrol, nizozemských pacientů i kontrol; $P < 0.00001$ pro všechny vyšetřované skupiny) (Jorde et al., 2000).

Protože stále chybí dostatečné důkazy o zapojení *CRI* v patogenezi sarkoidózy (Biglino et al., 1985; Rooney et al., 1990; Schoenfeld et al. 1994) a jeho konkrétní role v regulaci imunitní odpovědi (Krych-Goldberg et al., 2001), zajímalo nás také, zda je zánět u sarkoidózy doprovázen změnami v lokální expresi *CRI* mRNA. Při těchto experimentech nebyl nalezen významný rozdíl v expresi *CRI* mRNA v broncholaveolárních buňkách mezi pacienty se sarkoidózou ($N=52$) a zdravými kontrolními jedinci ($N=14$). Ve snaze analyzovat možný účinek variant *CRI* C5507G SNP na transkripci genu, bylo množství *CRI* mRNA srovnáváno mezi subjekty nesoucí genotyp *CRI* 5507 CC ($n = 44$) a CG ($n = 20$) v celé populaci a navíc ve skupině pacientů a kontrol zvlášť. Přítomnost vzácnější alely *CRI*

5507*G neměla vliv na *CRI* mRNA expresi (srovnání exprese u CC *versus* CG genotypů: P = 0.44). V naší studii jsme nicméně neprováděli vyšetřování „systémových“ hladin CR1 na erytrocytech u sarkoidózy, což by mohlo být považováno za hlavní limitaci práce.

7.2.2. Idiopatická plicní fibróza

Abychom určili případnou souvislost polymorfismu *CRI* C5507G s vnímavostí k IPF, provedli jsme genotypizaci uvedené varianty ve dvou skupinách pacientů s IPF (česká a anglická) a porovnali její distribuci se skupinami zdravých kontrolních jedinců (odpovídající populace). Distribuce genotypů uvedeného polymorfismu *CRI* genu byla v souladu s Hardy–Weinbergovou rovnováhou u všech vyšetřovaných skupin. Statistická síla této studie k replikaci hlavních nálezů původní italské publikace (rozdíl mezi frekvencemi *CRI* 5507 GG homozygotů u pacientů s IPF a zdravou kontrolní skupinou, Zorzetto et al., 2003) dosáhla 92.3% u české populace a 94.8% u populace anglické. Přestože v práci Zorzetta a spol. (Zorzetto et al., 2003) byla v italské populaci zjištěna zřetelná převaha *CRI* 5507 GG homozygotů mezi IPF pacienty (16%) ve srovnání se skupinou zdravých kontrolních jedinců (3%), byli v naší práci *CRI* 5507 GG homozygoti zastoupeni stejnoměrně u všech vyšetřovaných skupin (čeští a angličtí pacienti s IPF, české a anglické kontroly), viz Tabulka 7. Podíl *CRI* 5507 GG homozygotů nebyl navíc v rámci jednotlivých skupin naší studie vyšší než 3%. Nejistili jsme ani signifikantní rozdíly mezi frekvencemi *CRI* 5507*G alely u IPF pacientů a zdravých kontrol anglické ani české populace (alelické frekvence *CRI* 5507*G: čeští IPF pacienti 21%; české kontroly 18%; angličtí IPF pacienti 14%; anglické kontroly 15%). Podobný byl i podíl nosičů *CRI* 5507*G alely ve skupinách pacientů s IPF a zdravých jedinců.

Další srovnání odhalilo významný rozdíl v rozložení *CRI C5507G* genotypů mezi skupinami českých a anglických IPF pacientů ($p = 0.03$), což lze vysvětlit rozdílným původem vyšetřovaných populací pacientů s IPF. Celková frekvence *CRI 5507*G* alely se zdá být mírně nižší v anglické populaci jako takové (projevuje se i u kontrolní skupiny) ve srovnání s českou populací. Podobně jako v případě studie u sarkoidózy, jsme provedli také subanalýzu uvnitř skupin pacientů s IPF pro nalezení eventuálního vztahu *CRI C5507G* SNP se specifickými fenotypy IPF. U české ani anglické populace však souvislost mezi variantami *CRI C5507G* při subanalýze podle pohlaví a věku nebyla nalezena ($P > 0.05$ pro všechny vyšetřované skupiny). Podobně nebyly zjištěny rozdíly v rozložení *CRI C5507G* variant u anglické IPF populace, kdy byla navíc provedena i subanalýza na základě demografických dat týkajících se kouření a plicních funkcí. U českých IPF pacientů nemohla být tato subanalýza provedena vzhledem k nedostupnosti dat pro podstatnou část studovaného souboru.

8. DISKUSE

8.1. Polymorfismy cytokinových genů

V současné době existuje řada prací, které popisují souvislost funkčních polymorfismů genů pro cytokiny a jejich receptory s komplexními chorobami s multigenním typem dědičnosti (Bidwell et al., 1999, 2001; Knight, 2005). Z důvodu výrazných rozdílů v rozložení polymorfismů cytokinových genů a jejich receptorů mezi jednotlivými populacemi a etniky (Hoffman et al., 2002), jsou data populačních skupin zdravých kontrolních jedinců mimořádně přínosná pro hodnocení významnosti vyšetřovaných genetických markerů vnímavosti, fenotypu a prognózy daného onemocnění (Meenagh et al., 2002; Costeas et al., 2003; Trejaut et al., 2004). V naší práci jsme získali populační frekvence 22 polymorfismů genů, kódujících cytokiny a jejich receptory u zdravé české populace a srovnali je s odpovídajícími daty, publikovanými v jiných částech Evropy. Z hlediska

metodologického byly všechny polymorfismy typizovány standardizovanými postupy a reagensii, které byly předtím ověřeny v průběhu International Histocompatibility Workshop (Seattle, USA, 2002). Proto a také díky faktu, že byly při typizaci cytokinů dodržovány zásady správné laboratorní praxe při genotypizaci (podle standard Evropské federace pro imunogenetiku), neměly by být výsledky této studie ovlivněny. Distribuce všech vyšetřovaných polymorfismů kromě SNP *IL2–330* odpovídala v našem populačním vzorku H-W rovnováze. Vzhledem k počtu vyšetřovaných variant (více než 20 SNPs) je možné, že je uvedená odchylka od H-W rovnováhy náhodná (náhodná fluktuace) (Svejgaard & Ryder, 1994).

Při hodnocení naší práce jsme si vědomi, že v případě polymorfismů s frekvencí vzácnější alely (MAF) nižší než 10% může být velikost vyšetřované populační skupiny považována za suboptimální. Nicméně tyto polymorfismy (*TNF-308*, *TGFβ* codon 25, *IL4-1098*) v naší studii reprezentují méně než 15% všech vyšetřovaných variant. Za velmi důležitou naopak považujeme skutečnost, že data získaná v této studii byla v souladu s frekvencemi z ostatních středoevropských center – Prahy a Heidelbergu (Cinek et al., 2004; Louie et al., 2005). Studie z pražského centra byla provedena u populace stejné národnosti a odpovídala i velikostí souboru ($n = 103$). Od naší studie se lišila regionem nábory vyšetřovaných jedinců – zahrnovala převážně jedince ze středozápadní části České republiky na rozdíl od olomoucké populace, původem většinou z východu republiky. Německá populace (Heidelberg, $n = 200$) byla vybrána pro srovnání jako geograficky nejbližší, z níž byla dostupná data shodných genetických markerů (Louie et al., 2005). Při srovnání všech 22 sledovaných polymorfismů byly výsledky všech tří populací velmi podobné. Data čtyř vyšetřovaných polymorfismů u polské populace (Kurzawski et al., 2005) odpovídala rovněž frekvencím získaným v naší studii, což poskytlo další důkaz relativní homogenity středoevropské populace v distribuci cytokinových polymorfismů. Oproti víceméně shodným

frekvencím polymorfismů genů kódujících cytokiny, zjištěným u české a německé populace, byla nedávno publikována značně odlišná data u několika populací jihovýchodní Evropy (Trajkov et al., 2005; Mihailova et al., 2005; Louie et al., 2005). Genetické rozdíly, třebaže jsou zde prokazované pouze v některých polymorfismech cytokinů a jejich receptorů, mohou odrážet specifickou národnostní historii ve střední Evropě (Češi, Němci, Poláci) oproti jihovýchodní Evropě (Makedonci, Řekové, Kyperští Řekové a Bulhaři). Z tohoto pohledu lze spekulovat, že populace sídlící ve střední Evropě a náležící k rozdílným etnickým skupinám (germánský původ obyvatel Německa vs. Slovanský původ Čechů), si mohou být geneticky bližší, než dvě geograficky vzdálené slovanské populace (např. česká a makedonská).

Závěr: Naše data popisující rozložení alelických variant 22 SNPs genů pro cytokiny a jejich receptory u zdravé české populace se shodují s nálezy jiných středoevropských laboratoří, částečně se však liší od frekvencí publikovaných z populací jihovýchodními Evropou. S největší pravděpodobností tak odrážejí rozdílnou národnostní historii (genetické pozadí jednotlivých evropských regionů). Data z této studie již byla použita pro práce, které se zabývají asociacemi polymorfismů cytokinových genů s chorobami nebo komplikacemi léčby v české populaci (Gallo et al., 2009; Ambruzova et al., 2009).

8.2. Polymorfismus genu pro komplementový receptor 1 (CR1)

8.2.1. Sarkoidóza

Přestože Zorzetto a spol. (Zorzetto et al., 2002) pozoroval zvýšený výskyt *CR1* C5507G GG homozygotů zejména u žen se sarkoidózou (zvýšené hodnoty v rámci skupiny mužů nebyly statisticky signifikantní), v naší studii jsme žádné rozdíly v zastoupení GG genotypu mezi pacienty se sarkoidózou a kontrolními jedinci nezjistili, a to ani při subanalýze podle pohlaví. Tyto navzájem odlišné nálezy mohou podporovat hypotézu o zvýšeném zastoupení GG genotypu u italských pacientek se sarkoidózou, odrážející vyšší podíl určitých

„specifických“ fenotypů této nemoci, které se v našich skupinách pacientů vyskytovaly výjimečně nebo vůbec. Naše studie však neposkytuje důkazy podporující tuto interpretaci, jelikož jsme nepozorovali žádnou asociaci s konkrétními fenotypy sarkoidózy. V tomto smyslu jsme nezjistili vztah vyšetřovaného *CR1* polymorfismu s RTG stádiem sarkoidózy, nutností léčby glukokortikoidy ani přítomností/absencí Löfgrenova syndromu ($P > 0,05$ ve všech uvedených případech).

Jako možné vysvětlení rozdílu mezi „pozitivními“ nálezy v italské populaci a absencí asociace u Čechů a Nizozemců se nabízí možnost, že hypotetická kauzální genová varianta (genu *CR1* nebo v blízkosti) je ve vazebné nerovnováze s *CR1* 5507*G alelou pouze u italské, ne však u české a nizozemské populace (Silverman, 2007). Hlavní haplotypy genu *CR1* jsou nicméně velmi stabilní, bez ohledu na etnický původ vyšetřované populace (Xiang et al., 1999). Na druhé straně je však důležité připomenout, že studovaný polymorfismus *CR1* C5507G souvisí s počtem funkčních CR1 molekul na povrchu erytrocytů u kavkazoidní, ne však afroamerické populace (Herrera et al., 1998). Z toho lze vyvodit, že počet funkčních CR1 molekul proto musí být kontrolován dalším genetickým faktorem („gene-gene interaction“), který není u afroameričanů přítomen (Cockburn et al., 2006). Dokud budou tyto genetické faktory neznámé, nemůžeme zcela zamítnout výše uvedenou hypotézu o vazebné nerovnováze *CR1* 5507*G alely s kauzální variantou, která je závislá na konkrétních populacích.

Výsledky našich experimentů zkoumajících CR1 expresi mohou být interpretovány v tom smyslu, že 1) sarkoidóza není doprovázena lokálními změnami exprese *CR1* mRNA v místě probíhajícího granulomatozního zánětu a 2) není patrný žádný efekt *CR1* G5507C SNP variant (Wilson et al., 1986; Herrera et al., 1998) na hladiny CR1 mRNA v jaderných buňkách bronchoalveolární laváže. Poslední zmíněný nález je v souladu s předchozími studiemi, kdy byly varianty *CR1* genu spojeny s povrchovou expresí funkčního CR1

receptoru pouze na erythrocytech, ale ne na buňkách jiných vývojových linií (Wilson et al., 1986). To také podporuje hypotézu, že *CR1* varianty ovlivňují četnost funkčních CR1 molekul na povrchu erythrocytu zatím neznámým posttranslačním mechanismem (Herrera et al., 1998).

Přes adekvátní metodický přístup, který byl doplněn dostatečnou statistickou silou studie, jsme u české a nizozemské populace nepotvrdili předchozí závěry o souvislosti C5507G polymorfismu genu pro CR1 se sarkoidózou (Zorzetto et al., 2002). Naše funkční data navíc vyvrací hypotézu o lokální účasti CR1 při rozvoji granulomů v plicích u sarkoidózy. Námi získané výsledky naopak podporují teorii, že funkční alely genu *CR1* nemají přímý (kvantitativní) vliv na úroveň transkripce tohoto genu. Naše nálezy dále zdůrazňují důležitost komplexního vyhodnocení jednotlivých genetických variant, jako faktorů vnímavosti k chorobám u jednotlivých kavkazoidních subpopulací a potřebu replikace genetických studií napříč populacemi různého etnického původu. Velmi důležitá je adekvátní definice klinických fenotypů jako jeden z hlavních předpokladů provedení a vyhodnocení genetických asociačních studií, zvláště u komplexních onemocnění (Cordell et al., 2005; Ioannidis et al., 2001; Iannuzzi et al., 2000; Whitsett et al., 2004; Janssen et al., 2004).

8.2.2. Idiopatická plicní fibróza

Naše výsledky, založené na replikační genetické asociační studii vedené u dvou evropských populací, nepotvrzují nálezy italské publikace (Zorzetto et al., 2003), která zjistila souvislost polymorfismu genu pro CR1 s vnímavostí k IPF. Podobně jako u sarkoidózy tedy nemůžeme potvrdit hypotézu přímého zapojení variant *CR1* C5507G při rozvoji idiopatické plicní fibrózy.

Současné biologické koncepty idiopatické plicní fibrózy nepovažují imunokomplexy (ICs) za podstatné faktory zapojující se v patogenezi tohoto onemocnění (Hunninghake et al.,

2007; Studer et al., 2007). I z tohoto důvodu nelze *CRI* gen, jehož produkt je mj. zodpovědný za odstraňování imunokomplexů z cirkulace, považovat za klasický kandidátní gen, který může svými variantami přispívat k vnímavosti k idiopatické plicní fibróze. Přesto je známo, že řada genových variant, jež nejsou z „klasického“ pohledu považovány za primární kandidáty v patogenezi onemocnění, byla nedávno potvrzena jako markery vnímavosti v celogenomových asociačních studiích komplexních onemocnění (Samani et al., 2007).

Na základě dosavadních zkušeností získaných studiem genetické komponenty komplexních nemocí byla zformulována doporučení o nutnosti nezávislé replikace výsledků (Chanock et al., 2007; von El met al., 2009; Little et al., 2009). Toto doporučení se opírá o skutečnost, že jen menší část originálních studií, které popisují asociaci genového polymorfismu s komplexními chorobami, je nezávisle (a souhlasně) potvrzeno v následujících studiích. Obecně jsou uvedené diskrepance vysvětlovány několika možnými faktory: 1) chyby v definici a zajištění homogenity fenotypu nemoci, 2) falešná pozitivita (negativita) dat v důsledku náhodné fluktuace, 3) vazebná nerovnováha markeru se skutečnou příčinnou variantou, omezená na určitou populaci, 4) stratifikace ve výběru kontrolních jedinců a 5) rozdíly v genetickém pozadí populací (např. „*gene-gene interaction*“) (Cordell, 2005). V této souvislosti je nutno zmínit, že rozdíl mezi mediánem věku českých pacientů s IPF a kontrolních subjektů (53 *versus* 33 let) a nedostatek údajů o věkovém rozložení u anglických kontrol, mohou být považovány za limitující faktor pro interpretaci výsledků této studie. Vzhledem k tomu, že je prevalence idiopatické plicní fibrózy velmi nízká a *CRI C5507G* polymorfismus nesouvisí s věkem (dle četných předchozích publikací, např. Zorzetto et al., 2002, 2003), je možnost ovlivnění (bias) našich výsledků rozdíly ve věkovém složení skupin nemocných a kontrol velmi nepravděpodobná.

Přestože jsou kritéria pro diagnózu idiopatické plicní fibrózy obecně akceptována (ATS/ERS 2002), uvažují někteří autoři nad možností, že se IPF skládá z několika nemocí,

vedoucích ke stejným nebo podobným klinickým i histopatologickým projevům (Grutters et al., 2005). Například „rodinná“ forma plicní fibrózy může být odlišována od sporadické idiopatické plicní fibrózy na základě principu epidemiologického vymezení (Lawson et al., 2006; Grutters et al., 2005). V této souvislosti stojí za zmínku publikace asociace mezi rodinnou formou plicní fibrózy a mutací genu pro surfaktantový protein C (Nogee et al., 2001). Tyto mutace však pravděpodobně nemají podíl na vnímavosti ke sporadické formě IPF (Xiang et al., 1999). Na základě tohoto konceptu bychom mohli spekulovat, že se v italské skupině IPF pacientů mohl v jiném poměru vyskytovat specifický „podtyp“ IPF. Hypoteticky tak mohou genové varianty CR1 ovlivňovat např. vnímavost k jednomu z environmentálních spouštěčů IPF, kterému byla vystavena pouze italská populace (interakce „*gene-environment*“). Protože byli pro obě studie vybráni IPF pacienti (fenotypy) podle stejných kritérií (ATS/ERS, 2002), nemůže být tato domněnka potvrzena, dokud nebude provedena detailní stratifikace nemoci v souladu s fenotypem a etiologií (dosud neznámá). Pokud jde o možnost získání falešně negativních (nebo pozitivních) nálezů, výpovědní síla této studie spočívá ve dvoukohortovém designu, který značně snižuje možnost výskytu falešně negativních dat, a to tím spíše, že obě populace mají dostatečnou statistickou sílu replikovat výsledky původní práce (Zorzetto et al., 2003). V naší studii jsme se omezili na vyšetření *CR1* C5507G polymorfismu ve studovaných populacích, přestože Zorzetto a spol. vyšetřoval ještě další dvě SNP varianty a provedl analýzu haplotypů. Vzhledem k tomu, že uvedené *CR1* varianty studované v italské populaci jsou v silné vazebné nerovnováze (viz také souhlasné výsledky výše uvedené studie *CR1* polymorfismu a sarkoidózy), nepřepokládáme, že by izolované vyšetření „klíčového“ *CR1* SNP omezovalo zásadně výsledky naší práce (Zorzetto et al., 2003; Xiang et al., 1999).

Závěr: Přestože naše práce disponovala dostatečnou statistickou silou k replikaci předchozích nálezů v italské populaci, neprokázali jsme žádný vztah mezi C5507G polymorfismem *CR1*

genu a vnímavostí k IPF u dvou kavkazoidních populací (české a anglické). Naše výsledky tedy svědčí proti teorii o zapojení uvedené varianty *CRI* genu v predispozici k idiopatické plicní fibróze.

9. VYSVĚTLIVKY POUŽÍVANÝCH ZKRATEK:

bp – párové báze (z angl. base pairs)

MALDI-TOF MS - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry - ionizační technika, používaná v hmotnostní spektrometrii, umožňující analýzu biomolekul a velkých organických molekul

PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR-RFLP - polymerázová řetězová reakce-polymorfismus délky restrikčních fragmentů

PCR-SSO - polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými oligonukleotidy

PCR-SSP - polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery

qRT-PCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

RT-PCR – reverzní transkripce-polymerázová řetězová reakce

SBT - sequence-based typing - sekvenování

SNP(s) – jednonukleotidový polymorfismus (polymorfismy)

10. CITACE

Ambruzova Z, Mrazek F, Raida L, Jindra P, Vidan-Jeras B, Faber E, Pretnar J, Indrak K, Petrek M. Association of IL6 and CCL2 gene polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009 ; 44: 227-35.

American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277–304.

American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277-304.

Angelini G, de Preval C, Gorski J, Mach B. High-resolution analysis of the human HLA-DR polymorphism by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 1986; 83: 4489-93.

Ask K, Martin GE, Kolb M, Gauldie J. Targeting genes for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis: challenges and opportunities, promises and pitfalls. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3:389-93.

Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M, Ehrentreich-Förster E, Reiss E, Henkel J, Strehlow R et al. DNA microarrays. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008; 109: 433-53.

Baughman RP, Lower EE, du Bois RM. Sarcoidosis. *Lancet* 2003; 361: 1111–8.

Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M.F. et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and Immunity*, 1999, 1, 3.

Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M.F. et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases (Suppl. 1). *Genes and Immunity*, 2001, 2, 61.

Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M, Ehrentreich-Forster E, Reiss E, Henkel J, Strehlow R et al. DNA microarrays. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008; 109: 433-53.

Biglino A, Albera C, Cariti G, Giannini P. Relationship between circulating immune complexes, serum interferon and clinical features in sarcoidosis. *Respiration* 1985; 47: 293–8.

Bogunia-Kubik K, Koscińska K, Suchnicki K, Lange A. HSP70- hom gene single nucleotide (+2763 G/A and 12437 C/T) polymorphisms in sarcoidosis. *Int J Immunogenet.* 2006; 33: 135-40.

Bochud PY, Bochud M, Telenti A, Calandra T. Innate immunogenetics: a tool for exploring new frontiers of host defence. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7: 531-42.

Bunce M, O’Neil CM, Barnardo MCNM et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995; 46: 355–67.

Cinek, O., Vavrinčová, P., Striz, I., Drevinek, P., Sedlakova, P., Vavrinec, J. & Slavcev, A. (2004) Association of single nucleotide polymorphisms within cytokine genes with juvenile idiopathic arthritis in the Czech population. *Journal of Rheumatology*, 3, 1206.

Clayton D. Whole genome association studies. Diabetes and Inflammation Laboratory Cambridge Institute for Medical Research. Presentation at „Whole-genome“ Florence, 2005.

Cockburn IA, Rowe JA. Erythrocyte complement receptor 1 (CR1) expression level is not associated with polymorphisms in the promoter or 3' untranslated regions of the CR1 gene. *Int J Immunogenet* 2006; 33: 17–20.

Conner BJ, Reyes AA, Morin C, Itakura K, Teplitz RL, Wallace RB. Detection of sickle cell beta S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 1983; 80: 278-82.

Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet* 2005; 366: 1121–31.

Costeas, P.A., Koumas, L., Koumouli, A., Kyriakou-Giantsiou, A. & Papaloizou, A. Cytokine polymorphism frequencies in Greek Cypriots. *European Journal of Immunogenetics*, 2003, 30, 341.

Daly MJ. Assessing significance in genetic association studies. *CSH Protoc.* 2009; 8: pdb. top 58.

Danis, V.A., Millington, M., Hyland, V.J. & Grennan, D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clinical and Experimental Immunology*, 1995, 99, 303.

Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, and Novartis Institutes of BioMedical Research, Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 2007; 316: 1331-6.

Dickinson, A.M., Middleton, P.G., Rocha, V., Gluckman, E., Holler, E. & Eurobank members Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *British Journal of Haematology*, 2004, 127, 479.

Dinarello ChA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503 – 508.

du Bois RM, Beirne PA, Anevlavis SE. Genetics. In: Drent M, Costabel U, eds. *Sarcoidosis – European Respiratory Monograph*. Sheffield: European Respiratory Journals 2005: 3 64–81.

Edenberg HJ, Liu Y. Laboratory methods for high-throughput genotyping. *CSH Protoc.* 2009 Nov;2009(11):pdb.top62.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 2005;1:47-50.

Fiedler, Z. Ethics of working with DNA in health care (in Czech). *Casopis Lekaru Ceskych*, 2001, 1, 54.

Franca LT, Carrilho E, Kist TB. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys.* 2002; 35: 169-200.

Gallo J, Mrazek F, Petrek M. Variation in cytokine genes can contribute to severity of acetabular osteolysis and risk for revision in patients with ABG 1 total hip arthroplasty: a genetic association study. *BMC Med Genet.* 2009; 10:109.

Grutters JC, Sato H, Pantelidis P, Lagan AL, McGrath DS, Lammers JW et al. Increased frequency of the uncommon tumor necrosis factor -857T allele in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 1119-24.

Grutters JC, du Bois RM. Genetics of fibrosing lung diseases. *Eur Respir J* 2005; 25: 915–27.

Hamsten A, Eriksson P. Identifying the susceptibility genes for coronary artery disease: from hyperbole through doubt to cautious optimism. *J Intern Med.* 2008; 263: 538-52.

Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007; 316: 1491-3.

Herrera AH, Xiang L, Martin SG, Lewis J, Wilson JG. Analysis of complement receptor type 1 (CR1) expression on erythrocytes and of CR1 allelic markers in Caucasian and African American populations. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 87: 176–83.

Hinohara K, Nakajima T, Takahashi M, Hohda S, Sasaoka T, Nakahara K et al. Replication of the association between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations. *J Hum Genet.* 2008; 53: 357-9.

Hodgson U, Tukiainen P, Laitinen T. The polymorphism C5507G of complement receptor 1 does not explain idiopathic pulmonary fibrosis among the Finns. *Respir Med* 2005; 99: 265–7.

Hoffmann, S.C., Stanley, E.M., Cox, E.D., Di Mercurio, B.S., Koziol, D.E., Harlan, D.M., Kirk, A.D. & Blair, P.J. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. *American Journal of Transplantation*, 2002, 2, 560.

Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM et al. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. *Am J Transplant*. 2002; 2: 560-7.

Hamsten A, Eriksson P. Identifying the susceptibility genes for coronary artery disease: from hyperbole through doubt to cautious optimism. *J Intern Med*. 2008; 263: 538-52.

Hunninghake GW, Schwarz MI. Does current knowledge explain the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? A perspective. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 449–52.

Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M et al. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 2007; 447: 655–60.

Chapuis J, Hannequin D, Pasquier F, Benthay P, Brice A, Leber I et al. Association study of the GAB2 gene with the risk of developing Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2008; 30: 103-6.

Checa M, Ruiz V, Montaña M, Velázquez-Cruz R, Selman M, Pardo A. MMP-1 polymorphisms and the risk of idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet*. 2008;124:465-72.

Cheng BW, Chen GD, Zhang HJ. A study of forensic individual identification used STR locus with silver staining and multiplex PCR methods. *Yi Chuan*. 2002; 24: 15-8.

Iannuzzi MC. Genetics of sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28: 15–21.

Iannuzzi MC, Maliarik M, Rybicki BA. Nomination of a candidate susceptibility gene in sarcoidosis. The complement receptor 1 gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 27: 3–7.

Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. Sarcoidosis. *N Engl J Med*. 2007; 357: 2153-65.

Iannuzzi MC, Rybicki BA Genetics of Sarcoidosis. Proceedings of the American Thoracic Society. 2007; Vol 4. p 108-116.

Ioannidis JP. Why most published research findings are false. PLoS Med. 2005; 2: e124.

Ioannidis JPA, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. Nat Genet 2001; 29: 306–9.

Ishihara M, Ohno S, Ishida T, Mizuki N, Ando H, Naruse T et al. Genetic polymorphisms of the TNFB and HSP70 genes located in the human major histocompatibility complex in sarcoidosis. Tissue Antigens 1995; 46: 59-62.

Janssen R, Sato H, Grutters JC et al. The Clara cell10 adenine38guanine polymorphism and sarcoidosis susceptibility in Dutch and Japanese subjects. AmJ Respir Crit Care Med 2004; 170: 1185–7.

Jorde LB. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. Genome Res 2000; 10: 1435–44.

Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. Annu Rev Biomed Eng. 2007; 9: 289-320.

Kim KM, Park SH, Kim JS, Lee WK, Cha SI, Kim CH et al. Polymorphisms in the type IV collagen alpha3 gene and the risk of COPD. Eur Respir J. 2008; 32: 35-41.

Knight, J.C. Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. Journal of Molecular Medicine. 2005, 83, 97.

Knight, J.C. & Kwiatkowski, D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. Proceedings of Association of American Physicians. 1999, 111, 290.

Konenkov, V.I. & Smolnikova, M.V. Polymorphism of promotor sites of interleukins-4 and -10 and tumor necrosis factor- α genes in HIV-infected patients. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2002, 133, 389.

Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie*. Nucleus, Hradec Králové; 2004.

Kruit A, Grutters JC, Ruven HJ, Sato H, Izumi T, Nagai S et al. Chymase gene (CMA1) polymorphisms in Dutch and Japanese sarcoidosis patients. *Respiration*. 2006; 73: 623-33.

Krych-Goldberg M, Atkinson JP. Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol Rev* 2001; 180: 112–22.

Kurzawski, M., Pawlik, A., Czerny, B., Domanski, L., Rozanski, J. & Drozdik, M. Frequencies of the common promoter polymorphisms in cytokine genes in a Polish population. *International Journal of Immunogenetics*. 2005, 32, 285.

Kwok PY. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2001; 2: 235-58.

Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol*. 2003; 5:43-60. Review.

Lalouel JM, Rohrwasser A. Power and replication in case-control studies. *Am J Hypertens* 2002; 15: 201–5.

Lango H, Weedon MN. What will whole genome searches for susceptibility genes for common complex disease offer to clinical practice? *J Intern Med*. 2008; 263: 16-27.

Lawson WE, Grant SW, Ambrosini V et al. Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax* 2004; 59: 977–80.

Lawson WE, Loyd JE. The genetic approach in pulmonary fibrosis: can it provide clues to this complex disease? *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 345–9.

Lee JE. High-throughput genotyping. *Forum Nutr.* 2007; 60: 97-101.

Lee CI, Leong SH, Png AE, Choo KW, Syn C, Lim DT et al. An isothermal method for whole genome amplification of fresh and degraded DNA for comparative genomic hybridization, genotyping and mutation detection. *DNA Res.* 2006; 13: 77-88.

Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, Khoury MJ, Cohen B, Davey-Smith G, Grimshaw J, Scheet P, Gwinn M, Williamson RE, Zou GY, Hutchings K, Johnson CY, Tait V, Wiens M, Golding J, van Duijn C, McLaughlin J, Paterson A, Wells G, Fortier I, Freedman M, Zecevic M, King R, Infante-Rivard C, Stewart A, Birkett N. Strengthening the reporting of genetic association studies (STREGA): an extension of the STROBE Statement. *Hum Genet.* 2009 Mar; 125(2):131-51.

Liu YJ, Liu XG, Wang L, Dina C, Yan H, Liu JF et al. Genomewide association scans identified CTNBL1 as a novel gene for obesity. *Hum Mol Genet.* 2008; 17: 1803-13.

Loeuillet C, Deutsch S, Ciuffi A, Robyr D, Taffe P, Munoz M et al. In vitro whole-genome analysis identifies a susceptibility locus for HIV-1. *PLoS Biol.* 2008; 6: e32.

Louie, L.G., Silver, E.W., Direskeneli, G.S., Kearney, F.C., Spiroski, M.Z., Peste-Tsilimidou, C. et al. Worldwide variation in cytokine genes. In: *HLA 2002 — Immunobiology of the Human MHC* (ed. by J. A. Hansen & B. Dupont). IHWG Press, Seattle, 2005.

Maliarik MJ, Rybicki BA, Malvitz E, Scheffer RG, Major M, Popovich J Jr et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and risk of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 1566-70.

Maresso K, Broeckel U. Genotyping platforms for mass-throughput genotyping with SNPs, including human genome-wide scans. *Adv Genet.* 2008; 60: 107-39.

Marodi L, Notarangelo LD. Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 851-61.

Maver A, Medica I, Salobir B, Sabovic M, Tercej M, Peterlin B. Polymorphisms in genes coding for mediators in the interleukin cascade and their effect on susceptibility to sarcoidosis in the Slovenian population. *Int J Mol Med*. 2007; 20: 385-90.

McCarroll SA, Kuruvilla FG, Korn JM, Cawley S, Nemesh J, Wysoker A, Shaperro MH, de Bakker PI, Maller JB, Kirby A, Elliott AL, Parkin M, Hubbell E, Webster T, Mei R, Veitch J, Collins PJ, Handsaker R, Lincoln S, Nizzari M, Blume J, Jones KW, Rava R, Daly MJ, Gabriel SB, Altshuler D. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet*. 2008 Oct;40(10):1166-74. Epub 2008 Sep 7.

McGuigan FE, Ralston SH. Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan. *Psychiatric Genetics* 2002; 12: 133-136.

McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007; 316: 1488-91.

Meenagh, A., Williams, F., Ross, O.A., Patterson, Ch, Gorodezky, C., Hammond, M., Leheny, W.A. & Middleton, D. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Human Immunology*. 2002, 63, 1055.

Mihailova, S., Ivanova, M., Mihaylova, A., Quin, L., Mikova, O. & Naumova, E. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Bulgarian multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*. 2005, 168, 138.

Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*. 1988, 16; 3; 1215.

Moller DR: Pulmonary fibrosis of sarcoidosis. New approaches, old ideas. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29:S37-41.

Mrazek, F. & Petrek, M. Polymorphisms of the cytokine genes and their implication in transplantation (in Czech). *Alergie*, 2004, 6, 58.

Mrazek, F., Tudos, Z., Ambruzova, Z., Mytilineos, J. & Petrek, M. Distribution of 22 cytokine polymorphisms in the normal Czech population (Abstract). *Genes and Immunity*, 2004, 5 (Suppl. 1), S59.

Mrazek F, Holla LI, Hutyrova B, Znojil V, Vasku A, Kolek V et al. Association of tumour necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha and HLA-DRB1 gene polymorphisms with Lofgren's syndrome in Czech patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2005; 65: 163-71.

Mrazek F, Kvezereli M, Garr E, Kubistova Z, Kriegova E, Fillerova R et al. Complement receptor 1 single nucleotide polymorphisms in Czech and Dutch patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2008; 71: 77-80.

Mytilineos, J., Laux, G. & Opelz, G. Relevance of IL 10, TGF β 1, TNF α , and IL4R α gene polymorphisms in kidney transplantation: a collaborative transplant study report. *American Journal of Transplantation*, 2004, 4, 1684.

Navratilova Z, Mrazek F, Kriegova E, Hutyrova B, Kolek V, du Bois RM et al. The MCP- 1-2518 (A to G) single nucleotide polymorphism in Czech patients with pulmonary sarcoidosis: association with Lofgren's syndrome. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2007; 24: 33-8.

NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies, Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter DJ, Thomas G t al. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature.* 2007; 447: 655-60.

Nogee LM, Dunbar AE 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 573-9.

Ohchi T, Shijubo N, Kawabata I, Ichimiya S, Inomata S, Yamaguchi A et al. Polymorphisms of Clara cell 10-kD protein gene of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169: 180-6.

Oishi T, Iida A, Otsubo S, Kamatani Y, Usami M, Takei T et al. A functional SNP in the NKX2.5-binding site of ITPR3 promoter is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *J Hum Genet.* 2008; 53: 151-62.

Okayama H, Curiel DT, Brantly ML, Holmes MD, Crystal RG. Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 105–13.

Ollier, W.E. Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokine*, 2004, 28, 174.

Opal SM., DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117: 1162 – 1172.

Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protoc.* 2007; 2: 2857-64.

Pantelidis P, Fanning GC, Wells AU, Welsh KI, Du Bois RM. Analysis of tumor necrosis factor- α , lymphotoxin- α , tumor necrosis factor receptor II, and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1432-6.

Petrek M, Drabek J, Kolek V, Zlamal J, Welsh KI, Bunce M et al. CC chemokine receptor gene polymorphisms in Czech patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162 (3 Pt 1): 1000-3.

Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D et al. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007; 132:1665-71.

Ragoussis J, Elvidge GP, Kaur K, Colella S. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry in genomics research. *PLoS Genet.* 2006; 2: e100.

Rapley R, Harbron S. *Molecular analysis and genome discovery.* Wiley; 1 edition May 26 2004. Rapley R, Harbron S, editors. Wiley; 2004.

Rihet P. Innate immunity genes as candidate genes: searching for relevant natural polymorphisms in databases and assessing familybased association of polymorphisms with human diseases. *Methods Mol Biol.* 2008; 415: 17-48.

Robin NH, Tabereaux PB, Benza R, Korf BR. Genetic testing in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50: 727-37.

Rooney DP, Finch MB, Elborn JS, Stanford CF. Circulating immune complexes in sarcoidosis, a clinical role for the Raji assay? *Eur Respir J* 1990; 3: 760–4.

Ropers HH. New perspectives for the elucidation of genetic disorders. *Am J Hum Genet.* 2007; 81: 199-207.

Rutherford RM, Brutsche MH, Kearns M, Bourke M, Stevens F, Gilmartin JJ. HLA-DR2 predicts susceptibility and disease chronicity in Irish sarcoidosis patients. *Sarcoidosis Vasc Difuse Lung Dis.* 2004; 21: 191-8.

Rybicki BA, Walewski JL, Maliarik MJ, Kian H, Iannuzzi MC; ACCESS Research Group. The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 491-9.

Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2007; 357: 443-53.

Sato H, Grutters JC, Pantelidis P, Mizzon AN, Ahmad T, Van Houte AJ et al. HLA-DQB1*0201: a marker for good prognosis in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 27: 406-12.

Schoenfeld N, Schmolke B, SchmittMet al. Specification and quantitation of circulating immune complexes in the serum of patients with active pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 1994; 49: 688–91.

Schunkert H, Gotz A, Braund P, McGinnis R, Tregouet DA, Mangino M et al. Repeated replication and a prospective metaanalysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation* 2008; 117: 1675-84.

Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods*. 2008; 5: 16-8.

Schwartz DA. The genetics of innate immunity. *Chest* 2002; 121 (3 Suppl): 62S-68S.

Silverman EK. Haplotype thinking in lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 4–8.

Spagnolo P, Renzoni EA, Wells AU, Sato H, Grutters JC, Sestini P et al. C-C chemokine receptor 2 and sarcoidosis: association with Lofgren's syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168: 1162-6.

Spagnolo P, Sato H, Grutters JC, Renzoni EA, Marshall SE, Ruven HJ et al. Analysis of BTNL2 genetic polymorphisms in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2007; 70: 219-27.

Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 736–55.

Studer SM, Kaminski N. Towards systems biology of human pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 85–91.

Sun J, Purcell L, Gao Z, Isaacs SD, Wiley KE, Hsu FC et al. Association between sequence variants at 17q12 and 17q24.3 and prostate cancer risk in European and African Americans. *Prostate* 2008; 68: 691-7.

Svejgaard, A. & Ryder, L.P. HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens*, 1994, 43, 18.

Swider C, Schnittger L, Bogunia-Kubik K, Gerdes J, Flad H, Lange A et al. TNF-alpha and HLA-DR genotyping as potential prognostic markers in pulmonary sarcoidosis. *Eur Cytokine Netw.* 1999; 10: 143-6.

Syvänen AC. Accessing genetic variation : genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* 2001; 2: 930 - 942.

Tang WC, Yap MK, Yip SP. A review of current approaches to identifying human genes involved in myopia. *Clin Exp Optom.* 2008; 91: 4-22.

Trajkov, D., Arsov, T., Petlichovski, A., Strezova, A., Efinska- Mladenovska, O. & Spiroski, M. (2005) Cytokine gene polymorphisms in population of ethnic Macedonians. *Croatian Medical Journal*, 46, 685.

Trejaut, J.A., Tsai, Z.-U., Lee, H.-L., Chen, Z.-X. & Lin, M. Cytokine gene polymorphisms in Taiwan. *Tissue Antigens*, 2004, 64, 492.

Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A et al. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet.* 2005; 37: 357-64.

Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Striz I. Cytokine gene polymorphisms and BALF cytokine levels in interstitial lung diseases. *Respir Med.* 2009;103:773-9.

Von Elm E, Moher D, Little J; STREGA collaboration. Reporting genetic association studies: the STREGA statement. *Lancet.* 2009; 374:98-100.

Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447:661-78.

Whitsett JA, Bachurski CJ, Barnes KC et al. Functional genomics of lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31 (Suppl): S1.

Wilson JG, Murphy EE, Wong WW, Klickstein LB, Weis JH, Fearon DT. Identification of a restriction fragment length polymorphism by a CR1 cDNA that correlates with the number of CR1 on erythrocytes. *J Exp Med* 1986; 164: 50–9.

Xiang L, Rundles JR, Hamilton DR, Wilson JG. Quantitative alleles of CR1: coding sequence analysis and comparison of haplotypes in two ethnic groups. *J Immunol* 1999; 163: 4939–45.

Yang HH, Hu N, Taylor PR, Lee MP. Whole genome-wide association study using affymetrix SNP chip: a two-stage sequential selection method to identify genes that increase the risk of developing complex diseases. *Methods Mol Med*. 2008; 141: 23-35.

Zorzetto M, Bombieri C, Ferrarotti I, Medaglia S, Agostini C, Tinelli C et al. Complement receptor 1 gene polymorphisms in sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002; 27: 17-23.

Zorzetto M, Ferrarotti I, Trisolini R et al. Complement receptor 1 gene polymorphisms are associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 330–4.

Zorzetto M, Ferrarotti I, Campo I, Luisetti M. CR1 gene polymorphism in Finland. *Respir Med* 2006; 100: 186–7.

11. TABULKY

Tabulka 1: Vybrané studie zaměřené na možnou asociaci kandidátních genů a jejich variant s vnímavostí k plicní sarkoidóze.

ODKAZ	GEN	SNP/VARIANTA	VNÍMAVOST/KLINICKÉ STÁDIUM
Navratilova Z a spol. (2007)	MCP-1 - 2518	A/G	Löfgrenův syndrom
Maver A a spol. (2007)	IL6-174	G/C	Sarkoidóza
Valentonyte R a spol. (2005)	BTNL2 (rs2076530)	G/A	Sarkoidóza
Zorzetto M a spol. (2002)	CR1 C5507G	C/G	Sarkoidóza
Kruit A a spol. (2006)	CMA1	C/T	Vitální kapacita plic (funkční projev plicní sarkoidózy)
Mrazek F a spol. (2005)	TNF α LT α	G/A A/G	Löfgrenův syndrom
Spagnolo P a spol. (2003)	CCR2	T/G A/G T/C G/C T/A	Löfgrenův syndrom
Swider C a spol. (1999)	TNF α HLA	-308 DRB1	Löfgrenův syndrom
Rutherford RM a spol. (2004)	HLA	DR2	Chronická sarkoidóza
Sato H a spol. (2002)	HLA	DQB1	Löfgrenův syndrom a progrese nemoci
Rybicki BA a spol. (2005)	BTNL2	rs2076530	Sarkoidóza
Spagnolo P a spol. (2007)	BTNL2 HLA	rs2076530 DRB1	Sarkoidóza bez Löfgrenova syndromu

Tabulka 2: Srovnání alelických frekvencí polymorfismů cytokinových genů zjištěných u české populace (Olomouc) s odpovídajícími daty publikovanými u zdravých jedinců následujících populací: makedonské, řecké, kyperské, bulharské, polské a ruské. Data jsou uvedena v relativních hodnotách alelických frekvencí.

Pozn.: U bulharské / polské / ruské populace byla pro srovnání dostupná pouze data osmi / čtyř / tří polymorfismů.

Polymorfismus cytokinového genu	Olomouc (česká populace)		Makedonská populace		Řecká populace		Kyperská populace		Bulharská populace		Polská populace		Ruská populace	
		alelická frekvence		alelická frekvence		alelická frekvence		alelická frekvence		Alelická frekvence		alelická frekvence		alelická frekvence
IL-1 α -889	C	0.72	C	0.91	C	0.63	C	0.70						
	T	0.28	T	0.09***	T	0.37	T	0.30						
IL-1 β -511	C	0.67	C	0.65	C	0.67	C	0.65						
	T	0.33	T	0.35	T	0.33	T	0.35						
IL-1 β +3962	C	0.77	C	0.68	C	0.77	C	0.76						
	T	0.23	T	0.32	T	0.23	T	0.24						
IL-1R pst 1 1970	C	0.70	C	0.64	C	0.67	C	0.63						
	T	0.30	T	0.36	T	0.33	T	0.37						
IL-1RA mspa1 11100	T	0.69	T	0.72	T	0.75	T	0.80						
	C	0.31	C	0.28	C	0.24	C	0.20						
IL-4 R α +1902	A	0.80	A	0.82	A	0.85	A	0.84						
	G	0.20	G	0.18	G	0.15	G	0.16						
IL-12-1188	A	0.78	A	0.70	A	0.77	A	0.70						
	C	0.22	C	0.30	C	0.23	C	0.30						
γ -IFN+874	T	0.48	T	0.51	T	0.52	T	0.51	T	0.49				
	A	0.52	A	0.49	A	0.48	A	0.49	A	0.51				
TGF β 10. codon	C	0.48	C	0.51	C	0.48	C	0.46	T	0.53				
	T	0.52	T	0.49	T	0.52	T	0.54	C	0.47				
TGF β 25. codon	G	0.91	G	0.97	G	0.94	G	0.94	G	0.91				
	C	0.09	C	0.03	C	0.06	C	0.06	C	0.09				
TNF α -308	G	0.79	G	0.87	G	0.93	G	0.96	G	0.86	G	0.85	G	0.94

	A	0.21	A	0.13	A	0.07**	A	0.04***	A	0.14	A	0.15	A	0.06*
TNF α -238	G	0.96	G	0.92	G	0.98	G	0.96						
	A	0.04	A	0.08	A	0.02	A	0.04						
IL-2-330	T	0.66	T	0.59	T	0.62	T	0.57			T	0.65		
	G	0.34	G	0.41	G	0.38	G	0.43			G	0.35		
IL-2+166	G	0.65	G	0.78	G	0.73	G	0.81						
	T	0.35	T	0.22*	T	0.27	T	0.19**						
IL-4-1098	T	0.92	T	0.91	T	0.91	T	0.88						
	G	0.08	G	0.09	G	0.09	G	0.12						
IL-4-590	C	0.83	C	0.84	C	0.84	C	0.91			C	0.80	C	0.79
	T	0.17	T	0.16	T	0.16	T	0.09			T	0.20	T	0.21
IL-4-33	C	0.81	C	0.85	C	0.85	C	0.93						
	T	0.19	T	0.15	T	0.14	T	0.07*						
IL-6-174	G	0.61	G	0.71	G	0.76	G	0.82	G	0.63	G	0.53		
	C	0.39	C	0.29	C	0.24*	C	0.18***	C	0.37	C	0.47		
IL-6 nt 565	G	0.61	G	0.72	G	0.77	G	0.81						
	A	0.39	A	0.28	A	0.23**	A	0.18***						
IL-10-1082	A	0.54	A	0.63	A	0.64	A	0.66	A	0.69				
	G	0.46	G	0.37	G	0.36	G	0.34	G	0.31				
IL-10-819	C	0.75	C	0.72	C	0.65	C	0.76	C	0.59				
	T	0.25	T	0.28	T	0.34	T	0.24	T	0.41*				
IL-10-592	C	0.76	C	0.72	C	0.66	C	0.76	C	0.62			C	0.87
	A	0.24	A	0.28	A	0.34	A	0.24	A	0.38			A	0.13

* hodnota P pro srovnání alelické frekvence konkrétního polymorfismu u dané populace s českou populací menší než 0.01

** hodnota P pro srovnání alelické frekvence konkrétního polymorfismu u dané populace s českou populací menší než 0.001

*** hodnota P pro srovnání alelické frekvence konkrétního polymorfismu u dané populace s českou populací menší než 0.0001

Tabulka 3: Klinické charakteristiky pacientů se sarkoidózou a kontrolních jedinců (studie vztahu genu CR1 k vnímavosti k sarkoidóze).

	Čeští pacienti	České kontroly	Holandští pacienti	Holandské kontroly
N	210	203	116	112
Věk (medián)	45	33	35	47
Věk (rozmezí)	25-83	18-54	17-64	21-73
Muži / Ženy	98/112	105/98	65/51	58/54
RTG stádium (0/I/II/III/IV/NC)	8/93/84/16/1/8	N. A.	1/67/20/23/1/4	N. A.

N. C. = Počet pacientů, kteří nebyli z tohoto hlediska klasifikováni

N. A. = neaplikovatelné hodnocení

Tabulka 4: Genotypové a alelické frekvence C5507G jednonukleotidového polymorfismu CR1 genu u české, holandské a italské populace (pacienti se sarkoidózou a kontrolní jedinci). Data jsou uvedena jako poměry jednotlivých genotypů (alel) s jejich absolutními hodnotami (v závorkách).

	Čeští pacienti	České kontroly	Holandští Pacienti	Holandské kontroly	Italští pacienti	Italské kontroly
Genotypová frekvence	n=208*	n=203	n=116	n=112	n=91	n=94
CC	0.67(140)	0.66(133)	0.58(67)	0.57(64)	0.50(46)	0.64(60)
CG	0.30(62)	0.33(66)	0.39(45)	0.38(42)	0.32(29)	0.30(28)
GG	0.03(6)	0.02(4)	0.03(4)	0.05(6)	0.18(16)	0.06(6)

Alelická frekvence	2n=416	2n=406	2n=232	2n=224	2n=182	2n=188
C	0.82(342)	0.82(332)	0.77(179)	0.76(170)	0.66(121)	0.79(148)
G	0.18(74) [†]	0.18(74)	0.23(53) [‡]	0.24(54)	0.34(61)	0.21(40) [§]

* Genotypy nebyly určeny u dvou pacientů.

Alelické frekvence srovnány mezi skupinami pacientů a odpovídajících kontrol:

[†] $p=0.86$, [‡] $p=0.75$, [§] $p=0.01$.

Pozn.: Data italské populace převzata ze studie Zorzetto et al., 2002.

Tabulka 5: Genotypové a alelické frekvence A3650G jendonukleotidového polymorfismu CR1 genu u české a holandské populace (pacienti se sarkoidózou a kontrolní jedinci). Data jsou uvedena jako podíl jednotlivých genotypů (alel) s jejich absolutními hodnotami (v závorkách).

	Čeští pacienti	České kontroly	Holadští pacienti	Holandské kontroly
Genotypová frekvence	n=208	n=202	n=116	n=58
AA	0.66(137)	0.65(132)	0.57(66)	0.67(39)
AG	0.32(66)	0.33(66)	0.34(39)	0.24(14)
GG	0.02(5)	0.02(4)	0.09(11)	0.09(5)

Alelická frekvence	2n=416	2n=404	2n=232	2n=116
A	0.82(340)	0.82(330)	0.74(171)	0.79(92)
G	0.18(76)	0.18(74) [†]	0.26(61)	0.21(24) ^{††}

Alelické frekvence srovnány mezi skupinami pacientů a odpovídajících kontrolních jedinců:

[†] $p=0.98$, ^{††} $p=0.26$.

Tabulka 6: Odhad frekvencí CR1 A3650G – C5507G haplotypů CR1 genu pomocí algoritmu “estimation – maximization“ u české, holandské a italské populace (pacienti se sarkoidózou a kontrolní jedinci). Data jsou uvedena jako podíl haplotypů.

CR1 haplotypy	Čeští	České	Holandští	Holandské	Italští	Italské
	pacienti	kontroly	pacienti	kontroly	pacienti	kontroly
3650 – 5507	2n=412*	2n=404*	2n=232*	2n=116*	2n=168	2n=182
AC	0.810	0.817	0.737	0.793	0.661	0.775
AG	0.007	0	0	0	0.006	0.005
GC	0.012	0	0.034	0.009	0.006	0.016
GG	0.170	0.183	0.228	0.198	0.327	0.203

* Všichni pacienti se sarkoidózou a kontrolní jedinci, u nichž byly vyšetřeny oba CR1 C5507G a A3650G genotypy, byli zahrnuti do analýzy.

Pozn.: Data italské populace přepočítána podle studie Zorzetto et al., 2002

Tabulka 7: Genotypové, alelické a fenotypové frekvence CR1 C5507G jednonukleotidového polymorfismu u české, anglické a italské populace, uvedené v absolutních (*relat.*) číslech.

Populace		Česká (n = 256)		Anglická (n = 219)		Italská (n = 240)	
CR1 C5507G		kontroly	IPF pacienti	kontroly	IPF pacienti	kontroly	IPF pacienti
		absolutní (relativní)	absolutní (relativní)	absolutní (relativní)	absolutní (relativní)	absolutní (relativní)	absolutní (relativní)
	n	203	53	149	70	166	74
Genotypové frekvence	CC	133 (0.66)	31 (0.58)	106 (0.71)	53 (0.76)	111 (0.67)	35 (0.47)
	CG	66 (0.32)	22 (0.42)	41 (0.28)	15 (0.21)	50 (0.30)	27 (0.37)
	GG	4 (0.02)	0 (0.00)	2 (0.01)	2 (0.03)	5 (0.03)	12 (0.16)
<i>p</i> hodnoty*	GG genotypy	0.30		0.43		0.0002	
Alelické frekvence	C	332 (0.82)	84 (0.79)	253 (0.85)	121 (0.86)	272 (0.82)	97 (0.66)
	G	74 (0.18)	22 (0.21)	45 (0.15)	19 (0.14)	60 (0.18)	89 (0.34)
Fenotypové frekvence	C	199 (0.98)	53 (1.00)	147 (0.99)	68 (0.97)	161 (0.97)	62 (0.84)
	G	70 (0.34)	22 (0.42)	43 (0.29)	17 (0.24)	55 (0.33)	39 (0.53)

* *p* hodnoty pro srovnání podílu CR1 5507 GG homozygotů mezi skupinou pacientů s idiopatickou plicní fibrózou a odpovídajícími zdravými kontrolními jedinci u jednotlivých populací. Data italské populace převzata ze studie Zorzetto et al., 2003

Tabulka 8: Sekvence oligonukleotidových primerů použitých při genotypizaci CR1 jednonukleotidového polymorfismu polymerázovou řetězovou reakcí se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) a pro sledování exprese CR1 genu pomocí kvantitativní reverzní transkripce – polymerázové řetězové reakce (RT-PCR).

CR1 C5507G SNP genotypizační (PCR-SSP) primery		CR1 A3650G SNP genotypizační (PCR-SSP) primery	
Standardní alela – C (360 bp*)		Standardní alela – A (286 bp*)	
1	5'ATCCGCTGCACAAGTGACCC3'	1	5'CAGAAATCCTGCATGGTGAGCA3'
2	5'CCCTACTAAATCTGGACCTCATC3'	2	5'GTTGACCCAAGAAGTCATCACAG3'
Mutantní alela - G (360 bp*)		Mutantní alela – G (285 bp*)	
1	5'ATCCGCTGCACAAGTGACCG3'	1	5'AGAAATCCTGCATGGTGAGCG3'
2	5'CCCTACTAAATCTGGACCTCATC3'	2	5'GTTGACCCAAGAAGTCATCACAG3'
Primery a sondy pro kvantitativní RT-PCR			
CR1 (90 bp*)		PSMB2 (referenční gen) (72 bp*)	
1	5'TCATTTGGGATAATGAAACACCT3'	1	5'AGAGGGCAGTGGAACTCCTT3'
2	5'-TGTTGGTGCTAATGAAATCTCC3'	2	5'AGGTTGGCAGATTCAGGTG3'
sonda	LNA sonda: #09**	sonda	LNA sonda: #50**

* Velikosti amplifikačních produktů PCR-SSP a kvantitativní RT-PCR reakce, uvedené v párech bází (bp)

**Čísla Locked Nucleic (LNA) sond odpovídající označení ve veřejně dostupné databázi (www.universalprobelibrary.com)

Tabulka 9: Přehled vyšetřovaných jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) cytokinů a jejich receptorů s jejich genovým lokusem, označení v Cytokine CTS-PCR-SSP Tray Kit (University of Heidelberg), NCBI reference SNP cluster report (refSNP), a funkce/umístění jednotlivých jednonukleotidových polymorfismů v rámci konkrétních genů. Frekvence alely s nižší četností výskytu (vzácnější) u jednotlivých SNP polymorfismů je daná pro celou skupinu zdravých jedinců české národnosti (N=120).

Cytokin / Receptor	Genový lokus	SNP označení	Ref.SNP	Funkce/ umístění	Alela	Alelická frekvence
						Czech ref.*
IL-1 α	2q	-889 T/C	rs1800587	5'UTR ^{&}	T	0.28
IL-1 β	2q	-511 C/T	rs16944	Promoter	T	0.33
IL-1 β	2q	+3962 T/C	rs1143634	coding / synonymous	T	0.23
IL-1R	2q	pst1 1970 C/T	rs2234650	distal promoter	T	0.30
IL-1RA	2q	mspa1 11100 T/C	rs315952	coding / synonymous	C	0.31
IL-4R α	16p	+1902 G/A	rs1801275	coding / missense	G	0.20
IL-12	5q	-1188 A/C	rs3212227	3'UTR	C	0.22
IFN γ	12q	+874 A/T	rs2430561	intron	T	0.48
TGF β	19q	Codon 10 T/C	rs1800470	coding / missense	C	0.48
TGF β	19q	Codon 25 G/C	rs1800471	coding / missense	C	0.09
TNF- α	6p	-308 G/A	rs1800629	Promoter	A	0.21
TNF- α	6p	-238 G/A	rs361525	Promoter	A	0.04
IL-2	4q	-330 T/G	rs2069762	Promoter	G	0.34
IL-2	4q	+166 G/T	rs2069763	coding / synonymous	T	0.35
IL-4	5q	-1098 T/G	rs2243248	Promoter	G	0.08
IL-4	5q	-590 C/T	rs2243250	Promoter	T	0.17
IL-4	5q	-33 C/T	rs2070874	5'UTR	T	0.19
IL-6	7p	-174 G/C	rs1800795	promoter	C	0.39
IL-6	7p	nt 565 G/A	rs1800797	promoter	A	0.39
IL-10	1q	-1082 A/G	rs1800896	promoter	G	0.46
IL-10	1q	-819 C/T	rs1800871	promoter	T	0.25
IL-10	1q	-592 C/A	rs1800872	promoter	A	0.24

[&] UTR – „untranslated region“

12. PŘEHLED VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Původní práce *in extenso*, jejichž výsledky jsou součástí disertační práce (IF, impakt faktor):

Kubistova Z, Mrazek F, Tudos Z, Kriegova E, Ambruzova Z, Mytilineos J, Petrek M. Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in the healthy Czech population. *Int J Immunogenet.* 2006; 33(4):261-7.

IF 2006: 1,333

Mrazek F, Kvezereli M, Garr E, **Kubistova Z**, Kriegova E, Fillerova R, Arakelyan A, Ruven HJ, Drabek J, van den Bosch JM, Kolek V, Welsh KI, Grutters JC, du Bois RM, Petrek M. Complement receptor 1 single nucleotide polymorphisms in Czech and Dutch patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens.* 2008; 71(1):77-80.

IF 2008: 2,076

Kubistova Z, Mrazek F, Lympany PA, Lagan AL, Arakelyan A, Kriegova E, Welsh KI, Kolek V, Zatloukal J, Hutyrova B, du Bois RM, Petrek M. The CR1 C5507G polymorphism is not involved in susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis in two European populations. *Tissue Antigens.* 2008; 72(5):483-6.

IF 2008: 2,076

Kubistova Z, Mrazek F, Petrek M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009; 153(2):93-102.

IF 2010: 0,716

Ostatní práce *in extenso*:

Arakelyan A, Kriegova E, **Kubistova Z**, Mrazek F, Kverka M, du Bois RM, Kolek V, Petrek M. Protein levels of CC chemokine ligand (CCL)15, CCL16 and Macrophage Stimulating Protein in patients with sarcoidosis. *Clin and Exp Immunol.* 2009, 155(3): 457-65.

IF 2009: 3,009

Abstrakta v časopisech s IF:

Z. Ambruzova, J. Gallo, F. Mrazek, **Z. Kubistova**, J. Onderkova, M. Petrek. Association of cytokine gene polymorphisms with the expansive periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty. *Tissue Antigens*, 2006; 67(6): 528. 20th EFI Conference, June 8-11, 2006, Oslo, Norway.

Petrek M, Mrazek F, **Kubistova Z**, Lympany P. A., Lagan A, Kriegova E, Welsh K. I., Kolek V. and du Bois R. M: The Complement Receptor 1 C5507G Polymorphism Is Not Involved In Susceptibility To Idiopathic Pulmonary Fibrosis In Two European Populations. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007; 175: A986. ATS 2007 International Conference, May 18-23, 2007, San Francisco, California, USA

Mrazek F, Gallo J, Arakelyan A, **Kubistova Z**, Petrek M. Single nucleotide polymorphisms in genes for cytokines interleukin (IL)-2, IL-6 and TNFalpha influence severity of osteolysis after total hip arthroplasty. *Tissue Antigens* 2008; 71(4): 331-332, P-122. 22nd EFI Conference, April 2 – 5, 2008, Toulouse, France.

Abstrakta v časopisech bez IF:

Kubištová Z, Mrázek F, Lympany PA, Lagan A, Arakelyan A, Kriegová E, Welsh KI, Kolek V, du Bois RM, Petřek M. Polymorfismus C5507G genu pro komplementový receptor 1 u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou. *Alergie* 2006; 8(Suppl.2): 81-82. XXIII. sjezd ČSAKI a XI. Kongres českých a slovenských imunologů, 25. -28. října 2006, Hradec Králové.

Kubištová Z, Mrázek F, Kriegová E, Kolek V, Petřek M. Polymorfismus genu pro receptorovou tyroxin kinázu DDR1 u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou. *Alergie* 2008; 10(2 Suppl.): 149-150. XXV. sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, XII. kongres českých a slovenských imunologů s mezinárodní účastí, 29.října-1.listopadu 2008, Praha.

Ambrůzová Z, Gallo J, Mrázek F, **Kubištová Z**, Onderková J, Kriegová E, Petřek M. Význam polymorfismů cytokinových genů pro predikci závažné osteolýzy po totální endoprotéze kyčle. *Alergie* 2006; 8(Suppl.2): 46-47. XXIII. sjezd ČSAKI a XI. Kongres českých a slovenských imunologů, 25. -28. října 2006, Hradec Králové.

Mrázek F, Gallo J, Ambrůzová Z, **Kubištová Z**, Onderková J, Kriegová E, Petřek M. Souvislost polymorfismů cytokinových genů s periprotetickou osteolýzou po endoprotéze kyčelního kloubu. *Klinická imunologie a alergologie* 2007, 3: 40. XXIV. zjazd slovenských a českých alergológov a klinických imunológov, 24. -27. října 2007, Trnava.

Sťahelová A, Mrázek F, Petřková J, **Kubištová Z**, Petřek M. Re-sekvenační analýza promotorových oblastí genů pro chemokiny CCL19 a CCL21 u pacientů s infarktem myokardu. *Alergie* 2008; 10(2 Suppl.): 69 – *vyzvaná přednáška* (XXV. sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, XII. kongres českých a slovenských imunologů s mezinárodní účastí, 29.října-1.listopadu 2008, Praha)

Petřek M, Kráľová A, Arakelyan A, Kriegová E, **Kubištová Z**, Kolek V. Interleukin (IL)-17 v bronchoalveolární laváži pacientů s plicní sarkoidózou – pilotní studie. *Alergie* 2008; 10(2 Suppl.): 112. (XXV. sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, XII. kongres českých a slovenských imunologů s mezinárodní účastí, 29.10.-1.11.2008, Praha)

Sťahelová A, Mrázek F, Kriegová E, Hutyrová B, **Kubištová Z**, Kolek V, Petřek M. Funkční varianta genu ANXA11 snižuje riziko onemocnění sarkoidózou: potvrzení výsledků celogenomové asociační studie. *Klinická imunologie a alergologie* 2009; 19(3):41-42. (XXVI. kongres slovenských a českých alergológov a klinických imunológov, 14.-17. října 2009, Žilina)

Abstrakta v ostatních časopisech a sbornících:

Kubistova Z, Mrazek F, Lympany PA, Lagan A, Arakelyan A, Kriegova E, Welsh KI, Kolek V, du Bois RM, Petrek M. The Complement Receptor 1 C5507G Polymorphism is not Involved in Susceptibility to Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Book of abstracts 2006; 545. 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology Under the Auspices of EFIS, 16th European Congress of Immunology - ECI ,September 6-9, 2006, Paris, France.

Kubištová Z, Mrázek F, Petřek M. Distribuce 22 polymorfismů cytokinových genů v české populaci: evropské srovnání. Sborník abstrakt str. 19. Konference vědeckých prací studentů DSP, 11. -12. října.2006, LF UP Olomouc

Kubištová Z, Mrázek F, Kriegová E, Kolek V, Petřek M. Polymorfismus genu pro receptorovou tyroxin kinázu DDR1 u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou. Sborník abstrakt, str. 30. Konference vědeckých prací studentů DSP, 10. a 11. září 2007, LF UP Olomouc.

Gallo J, Mrazek F, Ambruzova Z, **Kubistova Z**, Onderkova J, Kriegova E, Petrek M. Single nucleotide polymorphisms in genes for cytokines IL-1 α , IL-6 and TNF α are associated with osteolysis in total hip arthroplasty. Sborník abstrakt, str. 213, P-067. EORS 2008, 17th Annual Meeting, 24. -26. květen 2008, Madrid, Španělsko.

Gallo J, Mrazek F, Ambruzova Z, **Kubistova Z**, Onderkova J, Kriegova E, Petrek M. Single nucleotide polymorphisms in genes for cytokines IL-1 α , IL-6 and TNF α are associated with osteolysis in total hip arthroplasty. Sborník abstrakt (elektronická podoba). EFORT , 9th EFORT congress, 29.5. -1. červen 2008, Nice, Francie)

Stahelova A, Mrazek F, Kriegova E, Hutyrova B, **Kubistova Z**, Kolek V, Petrek M. Functional variant of the ANXA11 gene: true marker of protection and candidate disease modifier in sarcoidosis. Final Programme - Sborník abstrakt str. 151. 8th ERS Lung Science Conference, March 26-28, 2010, Estoril, Portugal.

Anna Sťahelová, František Mrázek, Eva Kriegová, Beáta Hutyrová, **Zuzana Kubištová**, Vítězslav Kolek, Martin Petřek. Funkční varianta genu ANXA11 snižuje riziko onemocnění sarkoidózou: potvrzení výsledků celogenomové asociační studie. *Sborník abstrakt str. 48.* XIII. celostátní konference DNA diagnostiky, 26.-27. listopadu 2009, Olomouc.

13. PŘÍLOHY: Publikace předkládané v disertační práci

- Práce č. 1** **Kubistova Z**, Mrazek F, Tudos Z, Kriegova E, Ambruzova Z, Mytilineos J, Petrek M. Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in the healthy Czech population. *Int J Immunogenet.* 2006;33(4):261-7.
IF 2006: 1,333
- Práce č. 2** Mrazek F, Kvezereli M, Garr E, **Kubistova Z**, Kriegova E, Fillerova R, Arakelyan A, Ruven HJ, Drabek J, van den Bosch JM, Kolek V, Welsh KI, Grutters JC, du Bois RM, Petrek M. Complement receptor 1 single nucleotide polymorphisms in Czech and Dutch patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens.* 2008; 71(1):77-80.
IF 2008: 2,076
- Práce č. 3** **Kubistova Z**, Mrazek F, Lympany PA, Lagan AL, Arakelyan A, Kriegova E, Welsh KI, Kolek V, Zatloukal J, Hutyrova B, du Bois RM, Petrek M. The CR1 C5507G polymorphism is not involved in susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis in two European populations. *Tissue Antigens.* 2008; 72(5):483-6.
IF 2008: 2,076
- Práce č. 4** **Kubistova Z**, Mrazek F, Petrek M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009; 153(2):93-102.
IF 2010: 0,716