

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2013

Bc. Tereza Matošková

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Vybrané genetické faktory ovlivňující
vnímavost k sarkoidóze**

Diplomová práce

Bc. Tereza Matošková

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Dr. Eva Kriegová

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu navazujícího magisterského studia pod vedením Dr. Evy Kriegové za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Chtěla bych poděkovat Dr. Evě Kriegové za její odborné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala během vypracovávání této diplomové práce. Poděkování patří také kolegyním z Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za jejich pomoc a rady.

Práce vznikla za grantové podpory Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví IGA MZ ČR NT/11117 (Studium mediátorů fibrotizačních procesů u pacientů s difúzními plicními nemocemi a jejich aplikace v diagnostice, 2010-2015) a projektů IGA_PU_LF_2013_13 a CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

SOUHRN

Sarkoidóza je zánětlivé, systémové, granulomatózní onemocnění. Ukazuje se, že v patogenezi sarkoidózy hrají důležitou roli genetické faktory. Kandidátní geny mohou být jak predisponující, tak i modifikující toto onemocnění. Ve své diplomové práci jsem se zabývala studiem vybraných jednonukleotidových polymorfismů v genech asociovaných se sarkoidózou a jejich využitelností k predikci vývoje onemocnění.

Ke studiu byla využita DNA izolovaná z periferní krve pacientů. Soubor tvořilo 123 pacientů s plicní sarkoidózou, u kterých byl znám vývoj onemocnění po 2 letech. Regrese (spontánní nebo po léčbě) byla pozorována u 49 jedinců, progresse u 74 pacientů. Genotypizace kandidátních jednonukleotidových polymorfismů rs2076530 (*BTNL2*), rs1049550 (*ANXA11*), rs916977 (*HERC2*), rs11209026 (*IL-23R*) a rs1040461 (*RAB23*) byla provedena pomocí technologie MassArray (Sequenom). Pro studované polymorfismy byly stanoveny alelické a genotypové frekvence.

Rozložení genotypů všech vyšetřovaných polymorfismů bylo v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. U žádného studovaného polymorfismu rs2076530 (*BTNL2*), rs1049550 (*ANXA11*), rs916977 (*HERC2*), rs11209026 (*IL-23R*) a rs1040461 (*RAB23*) nebyl nalezen signifikantní rozdíl ve frekvenci alel mezi podskupinami pacientů s regresí a progresí onemocnění. Mezi skupinami pacientů, u kterých došlo k regresí a progresí onemocnění během dvou let sledování, nebyly nalezeny ani rozdíly v genotypových frekvencích.

V rámci testovaného souboru pacientů se sarkoidózou, u kterých byl znám vývoj onemocnění po dvou letech, se nepodařilo objevit žádné genetické markery, které by mohly být využity k predikci vývoje onemocnění a identifikaci pacientů, u kterých dochází k progresí onemocnění.

SUMMARY

Sarcoidosis is an inflammatory, systemic granulomatous disease. The genes play a pivotal role in the pathogenesis of sarcoidosis. These genes can be predisposing as well as modifying the disease. The aim of this thesis was to assess suitability of the candidate single nucleotide polymorphisms in genes associated with sarcoidosis for the prediction of disease development.

DNA was obtained from peripheral blood of 123 patients with sarcoidosis. The patients were divided according to the disease development after 2-years. Regression (spontaneous or after treatment) of the disease was achieved in 49 patients, the progression of the disease in 74 patients. Five single-nucleotide polymorphisms associated with sarcoidosis and its clinical phenotypes, namely rs2076530 (*BTNL2*), rs1049550 (*ANXA11*), rs916977 (*HERC2*), rs11209026 (*IL-23R*), rs1040461 (*RAB23*) were tested using MassArray technology (Sequenom).

All studied polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. We did not detect any significant difference in allele frequencies for all studied polymorphisms (rs2076530 (*BTNL2*), rs1049550 (*ANXA11*), rs916977 (*HERC2*), rs11209026 (*IL-23R*) and rs1040461 (*RAB23*)) between subgroups of sarcoidosis patients with regression and progression of disease. Also the distribution of genotype frequencies did not differ between patients with regression and progression of disease.

In conclusion, none of studied polymorphisms may serve as a genetic marker suitable for the prediction of the disease development, and thus identify patients with the progressive disease status.

OBSAH

1	ÚVOD.....	- 7 -
2	CÍLE PRÁCE.....	- 8 -
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	- 9 -
3.1	Sarkoidóza	- 9 -
3.1.1	Orgány postižené při sarkoidóze.....	- 10 -
3.2	Etiologie sarkoidózy	- 11 -
3.3	Epidemiologie sarkoidózy	- 11 -
3.4	Patogeneze	- 12 -
3.5	Diagnostické metody	- 13 -
3.5.1	Laboratorní vyšetření.....	- 13 -
3.5.2	Imunologické vyšetření.....	- 14 -
3.5.3	Zobrazovací metody	- 14 -
3.5.4	Funkční vyšetření plic.....	- 16 -
3.5.5	Bronchoalveolární laváž (BAL).....	- 16 -
3.5.6	Biopsie	- 17 -
3.6	Léčba sarkoidózy	- 17 -
3.7	Sarkoidóza a genetika	- 17 -
3.8	Detekce bodových mutací a polymorfismů	- 19 -
3.9	Technologie MassArray.....	- 22 -
4	MATERIÁL A METODIKA.....	- 27 -
4.1	Biologický materiál.....	- 27 -
4.2	Schéma experimentu.....	- 27 -
4.3	Izolace DNA	- 28 -
4.4	Genotypizace pomocí technologie MassArray	- 29 -
4.5	Statistika.....	- 34 -
4.6	Použité chemikálie.....	- 35 -
4.7	Příprava roztoků.....	- 36 -
4.8	Laboratorní přístroje a pomůcky.....	- 38 -
4.9	Spotřební materiál.....	- 39 -
5	VÝSLEDKY	- 40 -
6	DISKUZE	- 51 -
7	ZÁVĚR	- 54 -
8	SEZNAM ZKRATEK	- 55 -
9	POUŽITÁ LITERATURA	- 56 -

1 ÚVOD

Sarkoidóza je multisystémové zánětlivé onemocnění, jehož příčina zatím není známa. Pro sarkoidózu je charakteristická tvorba granulomů, proto bývá řazena mezi granulomatózní choroby. V alveolitické fázi onemocnění jsou akumulovány T-lymfocyty a aktivované makrofágy, které produkují cytokiny a chemokiny, prostřednictvím kterých je aktivován imunitní systém a dochází k tvorbě granulomů. Nejčastěji postiženým orgánem jsou plíce, ale můžeme se setkat i s formou mimoplicní (oči, kůže, srdce, nervová soustava).

Podle dosavadních výzkumů se na rozvoji onemocnění podílí jak environmentální vlivy, tak genetické faktory (komplexní onemocnění). Byla popsána řada genů asociovaných se sarkoidózou, které predisponují k onemocnění anebo modifikují průběh nemoci.

Ve své diplomové práci se věnuji studiu polymorfismů kandidátních genů, které jsou asociovány se sarkoidózou a ovlivňují vnímavost k sarkoidóze. Ke studiu byla využita DNA izolována z periferní krve pacientů, u nichž jsme znali vývoj onemocnění po 2 letech. Jedná se o retrospektivní studii. Ke studiu bylo vybráno pět genů a jejich jednonukleotidových polymorfismů, u nichž byla prokázána spojitost se sarkoidózou již v dřívějších publikacích, a to *BTNL2* (rs2076530), *ANXA11* (rs1049550), *HERC2* (rs916977), *IL-23R* (rs11209026) a *RAB23* (rs1040461). Polymorfismy byly analyzovány pomocí technologie MassArray. Cílem studie bylo nalézt genetické markery, které by umožnily předpovědět průběh sarkoidózy, a tak i odhalit pacienty, u kterých dochází k progresi onemocnění.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování rešerše zabývající se charakteristikou sarkoidózy, genovými polymorfismy asociovanými se sarkoidózou a technologiemi genotypizace pomocí dostupných literárních zdrojů.
2. Izolace DNA z periferní krve pacientů se sarkoidózou pomocí vysolovací techniky.
3. Genotypizace polymorfismů rs2076530 (*BTNL2*), rs1049550 (*ANXA11*), rs916977 (*HERC2*), rs11209026 (*IL-23R*) a rs1040461 (*RAB23*) pomocí technologie MassArray.
4. Statistické vyhodnocení alelických a genotypových frekvencí u podskupin pacientů dle vývoje onemocnění po 2 letech, analýza Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

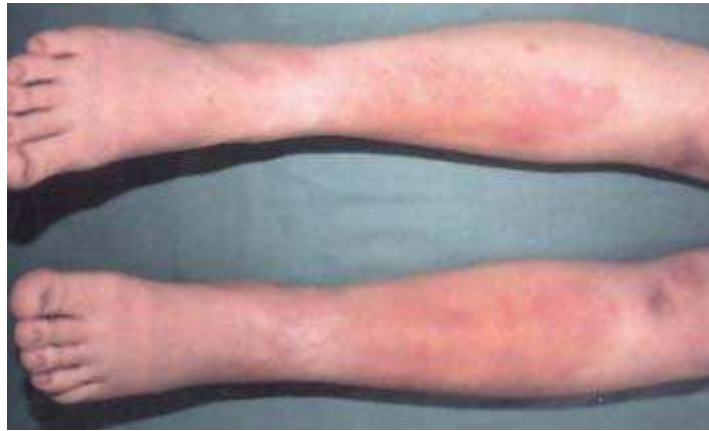
3.1 Sarkoidóza

Sarkoidóza je multisystémové zánětlivé granulomatózní onemocnění, jehož etiologie je neznámá (Kolek, 2007). Poprvé byla sarkoidóza popsána londýnským dermatologem Dr. Jonathanem Hutchinsonem v roce 1877 (Ma *et al.*, 2007). Jako samostatná klinická jednotka byla sarkoidóza vyčleněna až v roce 1958. Příznaky tohoto onemocnění popsali Hutchinson, Besnier, Boeck, Jüngling, Heerfordt a jiní (Kolek, 2006). Nejčastěji postihuje plíce, ale se sarkoidózou se můžeme setkat také v mnoha dalších tkáních (svaly, kůže, srdce, oči, nervová soustava). Toto onemocnění postihuje zejména mladé dospělé ve věku 30 až 50 let. Častěji jsou postiženy ženy než muži. U dětí je sarkoidóza diagnostikována zcela vzácně. Mezi nemocnými převažují nekuřáci. Na našem území je roční incidence sarkoidózy 3,1/100 000 obyvatel (Keane *et FitzGerald*, 2012; Kolek, 2007).

U lidí postižených sarkoidózou dochází zatím z neznámých příčin k aktivaci imunitního systému a tvorbě charakteristických útvarů, tzv. granulomů. V centru granulomu se akumulují CD4+ T_h-lymfocyty a aktivované makrofágy. Dochází k expresi cytokinů: IL-12, IL-18, INF- γ , TNF- α a chemokinů: CCL5, CXCR3, CXCR6. Periferní oblasti granulomu jsou tvořeny CD8+ T_c-lymfocyty a B-lymfocyty (Lošťáková *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2007; Spagnolo *et du Bois*, 2007).

Sarkoidózu dělíme podle průběhu onemocnění na dvě formy - akutní a chronickou. Akutní forma má příznaky infekčního onemocnění. Pacienti trpí horečkou, bolestmi kloubů a svalů, trpí únavou, malátností, dochází také k úbytku hmotnosti. V oblasti bérce se objevuje kožní výsev zvaný nodózní erytém (viz Obrázek 1), dochází ke zvětšení nitrohručních uzlin (na rentgenovém snímku hrudníku lze zjistit bilaterální hilovou lymfadenopatii) a tuberkulinový test, který slouží k průkazu tuberkulózy je negativní. Tuto formu označujeme jako tzv. Löfgrenův syndrom, který signalizuje dobrou prognózu, kdy obvykle dochází k spontánní remisi onemocnění. (Kolek, 2007; Lošťáková *et al.*, 2011).

U chronické formy je nástup onemocnění pozvolný, pomalu se objevují respirační a jiné orgánové příznaky. Onemocnění se považuje za chronické, trvá-li alespoň dva roky. Chronická forma už vyžaduje léčbu (Lošťáková *et al.*, 2011).



Obrázek 1: Nodózní erytém (převzato z Kolek, 2007).

3.1.1 Orgány postižené při sarkoidóze

Nejčastěji postiženým orgánem při sarkoidóze bývají plíce (90 %), oči a kůže. V období dvou až pěti let od projevu prvního symptomu se více jak 60 % pacientů zcela uzdraví. U některých pacientů přechází onemocnění do stádia chronického, které může být následováno rozvojem plicní fibrózy (Fabrellas, 2007).

Mezi klinické příznaky plicní formy sarkoidózy patří dušnost (v pozdějších stádiích přechází námahová dušnost v klidovou) a suchý kašel. Může se i objevit bolest za hrudní kostí. Pokud je zahájena terapie pomocí kortikosteroidů, kašel během několika dní mizí. Kašel bývá také indikátorem recidivy onemocnění po vysazení léků. Míra postižení plic se stanovuje pomocí vyšetření, jako rentgen hrudníku, vyšetření funkcí plic, HRCT, bronchoalveolární laváž a biopsie plic (Kolek, 2007). Většina pacientů s plicní sarkoidózou má dobrou prognózu a v časovém úseku 2 až 5 let dochází k remisi. U 30 % pacientů ale dochází k rozvoji onemocnění, který může vést k různým stupňům plicní fibrózy (Lockstone *et al.*, 2010).

Postižení očí při sarkoidóze se vyskytuje asi u čtvrtiny pacientů. Tato forma sarkoidózy je spojena se zánětem spojivek, tvorbou granulomů na spojivce (6-40 % případů). Objevuje se šedý nebo zelený zákal, vzácně i atrofie optického nervu, které mohou vést až ke slepotě (Kolek, 2007; Nunes *et al.*, 2007).

Kožní sarkoidóza se v akutní formě projevuje tvorbou nodózního erytému v oblasti bérce (viz Obrázek 1). Jedná se o podkožní skvrny, které jsou bolestivé na dotek. Zpočátku mají narůžovělou barvu, ta po několika týdnech zhnědne a připomíná vstřebávající se hematom. S tímto projevem se u nás setkáváme u více jak 30 % pacientů. V rámci chronické formy se lze setkat s projevy, které bývají označovány jako znetvořující. Vzácným projevem je tzv. sarkom v jizvě. Ve starých jizvách dochází k tvorbě načervenalých infiltrátů (Kolek, 2007).

Mezi nejnebezpečnější formy patří sarkoidóza srdce. S touto formou se podle epidemiologických studií setkáváme nejčastěji v Japonsku. Projevuje se poruchami srdečního rytmu, které mohou způsobit náhlou smrt. Při podezření na srdeční formu sarkoidózy je potřeba provést rentgenové vyšetření, echokardiografické vyšetření a vyšetření podle Holtera (činnost srdce je sledována 24 hodin při běžné denní činnosti) (Kolek, 2007; Nunes *et al.*, 2007).

3.2 Etiologie sarkoidózy

Etiologie sarkoidózy není dosud známá. Mezi majoritní agens vyvolávající onemocnění jsou řazeny mikroorganismy, organické a anorganické látky. Tyto agens mohou spustit u jedinců s genetickou dispozicí rozvoj onemocnění.

Mezi mikroorganismy, které mohou stát za rozvojem onemocnění, patří *Mycobacterium tuberculosis*, *Propionibacterium acnes*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia helvetica*, virus Epstein-Barrové.

Z organických agens to je pyl borovice a z anorganických látek kovy jako hliník, nikl či beryllium (Kolek, 2007; Lazarus, 2009).

3.3 Epidemiologie sarkoidózy

Sarkoidóza je celosvětově rozšířené onemocnění. Je řazena mezi nejčastější difúzní infiltrativní plicní onemocnění. Postihuje muže i ženy do věku 50 let (Ortega *et* Gonzáles, 2011; Lazarus, 2009; Luisetti *et al.*, 2000).

Incidence (počet nově vzniklých případů dané nemoci ve vybrané populaci za určité období) závisí na věku, pohlaví a rase. Celosvětově se incidence odhaduje na 16,5/100 000 obyvatel u mužů a 19/100 000 obyvatel u žen. U dětí se téměř s onemocněním nesetkáme. U dětí do 15 let je incidence 1/100 000 obyvatel (Nunes *et al.*, 2007). Vysoká míra výskytu byla zaznamenána v severní Evropě (60/100 000 obyvatel). (Ortega *et Gonzáles*, 2011). Naopak ve Španělsku byla zaznamenána nízká incidence, pouze 1,36/100 000 obyvatel. Ve Spojených státech amerických byla zjištěná odlišná incidence u bělochů (10,9/100 000 obyvatel) a černochů (35,5/100 000 obyvatel) (Fabrellas, 2007). U nás je incidence 3,1/100 000 obyvatel (Kolek, 2007).

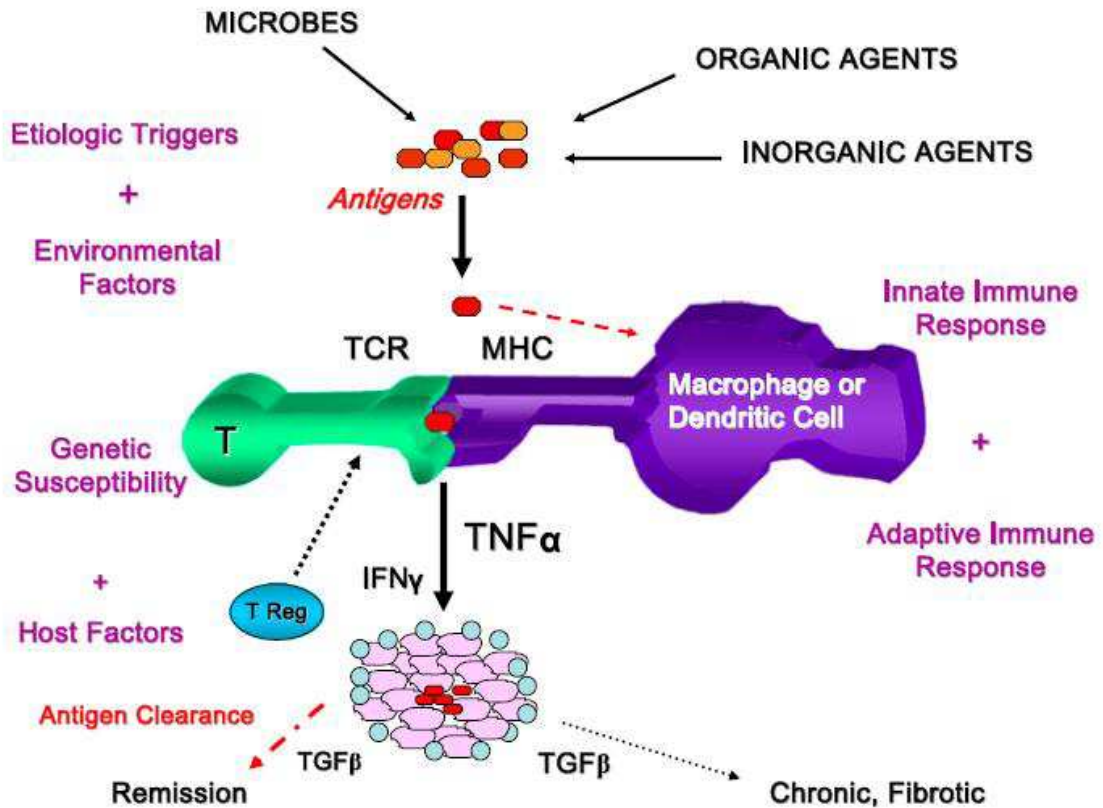
3.4 Patogeneze

Sarkoidóza je zánětlivé granulomatózní onemocnění. Granulomy vznikají v organismu běžně při zánětlivých onemocněních, aby zabránily šíření patogenů. Avšak při sarkoidóze jsou tvořeny granulomy jako reakce na zatím neznámý podnět (Stříž, 2008).

V centru granulomu se akumuluje CD4⁺ T_h-lymfocyty (pomocné) a aktivované makrofágy. Periferní oblasti granulomu jsou tvořeny CD8⁺ T_c-lymfocyty (cytotoxické) a B-lymfocyty (Lošťáková *et al.*, 2011). CD8⁺ T_c-lymfocyty ničí buňky napadené virem, parazity a také nádorové buňky. CD4⁺ T_h-lymfocyty produkují cytokiny. Jedná se o proteiny působící ve velmi nízkých koncentracích prostřednictvím receptorů. Cytokiny regulují rozsah a dobu trvání imunitní reakce (Ferenčík *et al.*, 2005; Mačák *et al.*, 2012).

Granulom vzniká v několika fázích (viz Obrázek 2). Na počátku stojí antigen prezentující buňky (APC, antigen presenting cells). Mezi tyto buňky jsou řazeny makrofágy, dendritické buňky a monocyty (Ferenčík *et al.*, 2005). Důležitou součástí APC jsou MHC glykoproteiny (major histocompatibility komplex), které se nacházejí na povrchu těchto buněk. Komplex, který je tvořen antigen prezentující buňkou, MHC molekulou a antigenem, reaguje s T-lymfocyty, které jsou tímto aktivovány a diferencují se do různých typů (Th1, Th2, Th17). Diferencované T-lymfocyty produkují signální proteiny, které aktivují imunitní odpověď. Th1 lymfocyty produkují cytokiny: interferon gama (IFN- γ) a interleukin-2 (IL-2). Th2 lymfocyty sekretují IL-4, IL-5 a IL-13, které aktivují B-lymfocyty a také vznikají při alergických reakcích. Th17 lymfocyty produkují IL-17, který se uplatňuje při akutním zánětu. Makrofágy tvoří chemokiny

CCL5, CCL3, CCL2 a CXCL8, díky kterým buňky migrují do místa vznikajícího granulomu (Ferenčík *et al.*, 2005; Mačák *et al.*, 2012; Stříž, 2008).



Obrázek 2: Vznik granulomu (převzato z Morgenthau *et al.*, 2011).

3.5 Diagnostické metody

Při diagnostice sarkoidózy se využívá kombinace laboratorních vyšetření, zobrazovacích metod, bronchoalveolární laváže, funkčního vyšetření plic a biopsie.

3.5.1 Laboratorní vyšetření

Během akutní formy sarkoidózy bývá zvýšena sedimentace erytrocytů a CRP (C-reaktivní protein, jehož zvýšená hladina ukazuje na přítomnost akutního zánětu).

Pomocí biochemických vyšetření bývá odhalena zvýšená hladina sérové alkalické fosfatázy.

V granulomech je tvořen vitamin D₃, což se projevuje hyperkalcémií (zvýšená hladina vápníku v krvi) a hyperkalciurií (zvýšené vylučování vápníku močí).

Ukazatelem aktivity sarkoidózy je hladina enzymu konvertující angiotensin (SACE). Dalším ukazatelem je sérová koncentrace receptoru pro interleukin 2 (Kolek, 2007; Keane *et FitzGerald*, 2012).

3.5.2 Imunologické vyšetření

Velmi častým nálezem při imunologickém testování je zvýšená hladina IgG, IgA a IgM. Dále jsou zvýšeny cirkulující imunokomplexy při akutní fázi. Sérologickým vyšetřením bývají nalezeny protilátky proti virům a mykobakteriím.

Tuberkulinový kožní test (test na tuberkulózu) bývá u nemocných sarkoidózou v 70 % případů negativní.

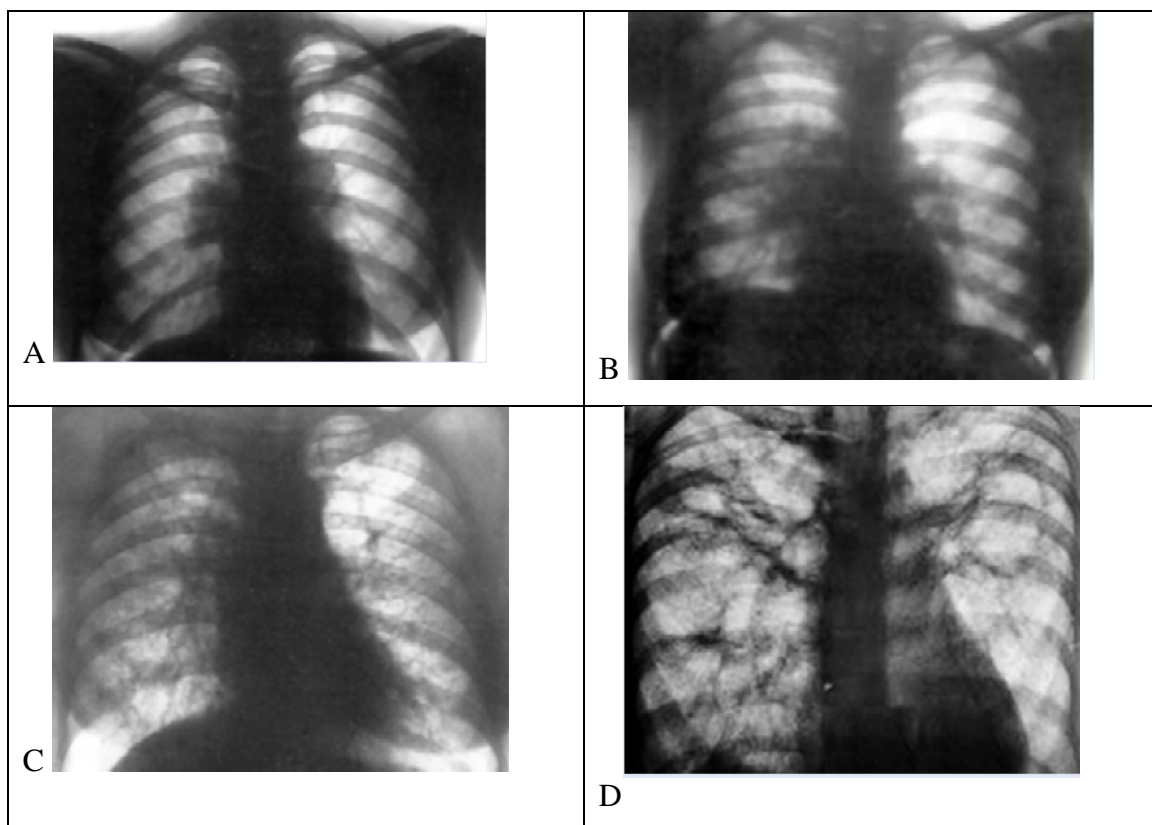
Dále se stanovuje imunoregulační index (CD4+/CD8+). V krvi dochází k výraznější redukci absolutního množství CD4+ T-lymfocytů než CD8+ T-lymfocytů.

Dříve se také prováděl Kveimův test, který je v dnešní době z etických důvodů zakázán. V rámci tohoto testu se na kůži aplikoval antigen. Po 4 až 6 týdnech se v místě jeho aplikace vytvořily malé uzlíky. Byla provedena biopsie z místa aplikace, která u nemocných sarkoidózou odhalila sarkoidní granulomy. Jako antigen byl využit homogenát z lymfatických uzlin nebo sleziny pacienta postiženého sarkoidózou (Kolek, 2007; Keane *et FitzGerald*, 2012; Lošťáková *et al.*, 2011).

3.5.3 Zobrazovací metody

Rentgenové zobrazení hrudníku je základním vyšetřením pro stanovení diagnózy, ale i pro zjištění stádia nemoci. Sarkoidózu lze rozdělit podle rentgenologického nálezu do pěti stádií. Stádium 0, kdy na rentgenovém snímku hrudníku nejsou pozorovány žádné změny, avšak pomocí HRCT lze změny prokázat. V prvním stádiu jsou postiženy hilové lymfatické uzliny, které jsou oboustranně zvětšené. Hovoříme o tzv. bilaterální hilové lymfadenopatii (BHL) (viz Obrázek3A). Ve druhém

stádiu jsou nitrohruční uzliny stále zvětšené, ale navíc jsou postiženy i plíce (viz Obrázek 3B). Ve třetím stádiu jsou postiženy už jenom plíce (viz Obrázek 3C) a ve čtvrtém stádiu mají změny v plicním parenchymu charakter plicní fibrózy (plicní tkáň je postupně nahrazována vazivem) (viz Obrázek 3D) (Lošťáková *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2007).



Obrázek 3: Rtg hrudníku při sarkoidóze. A: stádium 1. B: stádium 2. C: stádium 3. D: stádium 4 (převzato z Kolek, 2007).

V dnešní době k rozhodujícím vyšetřením patří HRCT (výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností). Toto vyšetření umožňuje stanovit diagnózu i aktivitu sarkoidózy s vysokou pravděpodobností. S pomocí HRCT lze zobrazit i uzliny, které na rentgenovém snímku hrudníku rozlišit nelze.

Galliová scintigrafie patří mezi vyšetření, která už v dnešní době nejsou využívána, a to kvůli radiační zátěži. Toto vyšetření je založeno na akumulaci ^{67}Ga -citrátu v ložiscích sarkoidózy.

Při podezření na sarkoidózu nervové soustavy se také využívá magnetická rezonance (Kolek, 2007; Keane *et FitzGerald*, 2012).

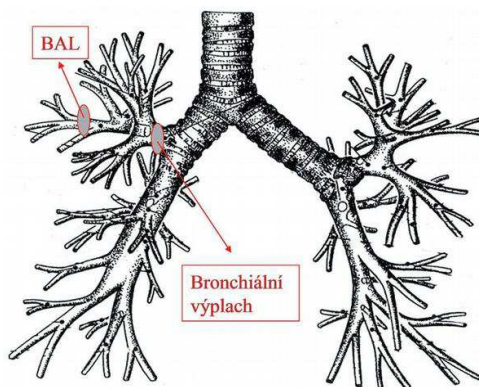
3.5.4 Funkční vyšetření plic

Zhoršené plicní funkce lze pozorovat u 20 % až 30 % pacientů se sarkoidózou. Pro posouzení postižení funkce plic se provádí vyšetření difuzní kapacity plic pro oxid uhelnatý. U 60 % pacientů, a to i u pacientů se stádiem 1, lze odhalit sníženou plicní difuzi. Dále se stanovuje vitální kapacita plic. Výsledky těchto vyšetření bohužel často nekorelují s rozsahem postižení plic stanoveného pomocí rentgenového vyšetření. Přesto jsou tato vyšetření důležitá, protože umožňují stanovit výchozí hodnoty a následně sledovat další vývoj nemoci (Costabel *et al.*, 2009; Lošťáková *et al.*, 2011).

3.5.5 Bronchoalveolární laváž (BAL)

Bronchoalveolární laváž je diagnostické bronchoskopické vyšetření. Jedná se o bezpečný a minimálně invazivní postup, který umožňuje získat vzorek užitečný pro diagnostiku sarkoidózy. BAL se nejčastěji odebírá ze středního laloku nebo linguly (viz Obrázek 4). Během vyšetření je do dýchacích cest aplikováno 100 až 200 ml fyziologického roztoku s cílem získat bronchoalveolární tekutinu, která obsahuje buněčné i nebuněčné složky z alveolů. Vyšetření se provádí ambulantně, pomocí bronchoskopu po lokální anestezii. Bronchoalveolární tekutina je následně vyšetřena cytologicky a mikrobiologicky.

Typickým nálezem cytologického vyšetření je zvýšený počet leukocytů, převážně lymfocytů. Až u 90 % postižených sarkoidózou lze sledovat zvýšený počet lymfocytů. Charakteristická je také převaha pomocných CD4+ T-lymfocytů nad cytotoxickými CD8+ T-lymfocyty. Můžeme pozorovat také zvýšené hodnoty TNF- α (Costabel *et al.*, 2009; Kolek, 2007; Tomíšková *et Skříčková*, 2010).



Obrázek 4: Lokalizace provedení BAL (převzato z <http://zdravi.e15.cz>).

3.5.6 Biopsie

Diagnóza sarkoidózy by se měla opírat o histopatologické vyšetření. Nejvhodnější místo pro odběr bioptického vzorku se stanovuje na základě klinického obrazu. Pokud je postižen plicní parenchym, provádí se tzv. transbronchiální biopsie (TBB) pomocí endoskopu. Rizika u tohoto zákroku jsou velmi nízká. Bioptický vzorek může být dále odebrán z rostoucích granulomů (bronchiální biopsie), z periferní uzliny, z kůže nebo bukalní sliznice (Lošťáková *et al.*, 2011).

3.6 Léčba sarkoidózy

Současné znalosti a názory týkající se diagnostiky a léčby sarkoidózy shrnuje doporučení Americké hrudní společnosti (ATS), Evropské respirační společnosti (ERS) a Asociace sarkoidózy a jiných granulomatózních nemocí (WASOG) (Statement on sarcoidosis, 1999; Kolek, 2006).

Prognóza bývá u sarkoidózy většinou příznivá. U 30 % až 50 % pacientů dochází ke spontánní remisi nebo zhojení po užití kortikosteroidů. U 30 % pacientů se setkáváme s chronickou, progredující formou nemoci. K recidivě onemocnění dochází nejčastěji do dvou let od ukončení kortikoterapie (Lošťáková *et al.*, 2011).

3.7 Sarkoidóza a genetika

Sarkoidóza je komplexní onemocnění. Bylo prokázáno, že za klinickými projevy sarkoidózy a její prognózou stojí kromě environmentálních vlivů i faktory genetické. Teorie genetických faktorů se opírá o dva argumenty, a to rasové rozdíly v epidemiologii onemocnění a přítomnost onemocnění v rodinách (Luisetti *et al.*, 2000). Genetické faktory se pravděpodobně podílejí na klinických projevech, progresi a prognóze onemocnění (Spagnolo *et du Bois*, 2007). Mezi kandidátní geny patří zejména polymorfní geny pro MHC, cytokiny, chemokiny a geny receptorů T-buněk (Kolek, 2007; Luisetti *et al.*, 2000; Spagnolo *et du Bois*, 2007). Geny lze rozdělit do dvou skupin, a to na geny modifikující anebo predisponující onemocnění.

Tabulka 1: Vybrané geny, které byly studovány v rámci diplomové práce. V tabulce je uveden název genu asociovaného se sarkoidózou, jeho polymorfismus, populace a počet pacientů, na kterých byl gen analyzován v předchozích studiích a zdroj.

gen	polymorfismus	studovaná populace	počet pacientů	autor, rok publikace
<i>BTNL2</i>	rs2076530	německá	366	Rybicki <i>et al.</i> , 2005
<i>ANXA 11</i>	rs1049550	česká	245	Mrázek <i>et al.</i> , 2011
<i>HERC2</i>	rs916977	německá	1 996	Fischer <i>et al.</i> , 2011
<i>IL-23R</i>	rs11209026	německá	1 996	Fischer <i>et al.</i> , 2011
<i>RAB23</i>	rs1040461	německá	381	Hofmann <i>et al.</i> , 2011

Velké množství genů, které jsou spojeny se sarkoidózou, byly objeveny díky celogenomovým asociačním studiím GWAS. Nejnovější GWAS studie identifikovaly další nové geny asociované s tímto onemocněním. Patří mezi ně gen *NOTCH4* (rs 715299) (Adrianto *et al.*, 2012) a gen *OS9* (rs 1050045), který kóduje protein *osteosarcoma amplified 9*. Tento protein má důležitou roli při degradaci proteinů a také se podílí na aktivaci myeloidních buněk (Hofmann *et al.*, 2013).

Mezi geny, u kterých byla potvrzena spojitost se sarkoidózou, patří *BTNL2*. Gen *BTNL2* leží na krátkém raménku šestého chromozomu a kóduje protein (butyrophilin like protein 2), který je řazen do skupiny receptorů B7 a zřejmě funguje jako koaktivátor T-lymfocytů. Na pátém exonu genu *BTNL2* byla zjištěna existence SNP rs2076530 (jednonukleotidový polymorfismus, *Single Nucleotide Polymorphism*). Konkrétně se jedná o tranzici G (guanin) → A (adenin), což vede ke vzniku alternativního místa sestřihu, a tím i k syntéze jiného proteinu. Tento dysfunkční *BTNL2* by mohl narušit správnou regulaci T-lymfocytů (Rybicki *et al.*, 2005). Podařilo se prokázat spojitost mezi sarkoidózou a rs2076530. U postižených pacientů byl zjištěn signifikantně vyšší výskyt alely A (Morais *et al.*, 2012).

Dalším genem spojeným se sarkoidózou je *ANXA11*. Tento gen leží na dlouhém raménku desátého chromozomu. Produkt tohoto genu - annexin 11 patří do skupiny proteinů závislých na vápníku. Annexin 11 je regulátorem buněčného dělení a apoptózy. V sekvenci genu *ANXA11* se nachází jednonukleotidový polymorfismus rs1049550 (*ANXA11*), jedná se o záměnu thyminu (T) za cytosin (C). Bylo prokázáno, že přítomnost

alely T zajišťuje ochranu před sarkoidózou. Míra ochrany byla závislá na počtu alel T v genotypu. U pacientů s Löfgrenovým syndromem (akutní forma s příznivou prognózou onemocnění) byla zjištěna přítomnost genotypu TT (Mrázek *et al.*, 2011).

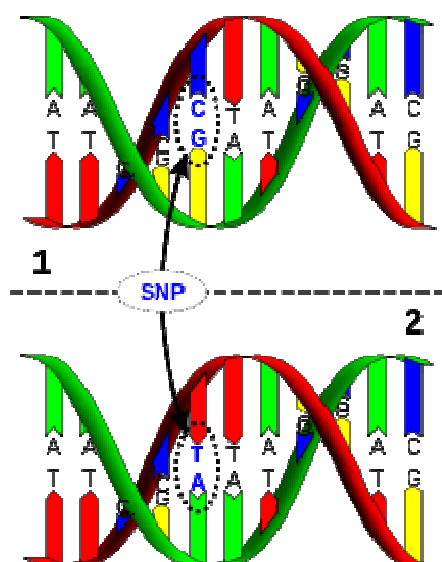
Na dlouhém raménku patnáctého chromozomu má svůj lokus gen s označením *HERC2* (Cerri *et al.*, 2011). Fischer *et al.* (2011) identifikovali *HERC2* jako další gen vnímavosti k sarkoidóze. Na dvanáctém intronu genu *HERC2* se nachází jednonukleotidový polymorfismus rs916977.

Výsledky Fischera *et al.* (2011) prokázaly významnou roli signální dráhy IL-23/IL-23R v rozvoji chronické sarkoidózy. Jednonukleotidový polymorfismus rs11209026 v genu pro receptor IL-23R způsobuje záměnu aminokyseliny argininu na glutamin v intracelulární doméně receptoru IL-23R. Záměna vede k narušení přenosu signálu mezi transmembránovou doménou a místem vazby JAK2 na cytoplazmatické doméně, a tím k nedostatečné fosforylaci STAT3 transkripčních faktorů. Důsledkem je tedy snížená hladina prozánětlivých cytokinů (IL-17A) (Cerri *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2011).

Hofmann *et al.* (2011) prokázali spojitost genu *RAB23* se sarkoidózou. Tento gen se nachází na krátkém raménku šestého chromozomu. Jednonukleotidový polymorfismus rs1040461 v exonu 7 tohoto genu způsobuje, že v sekvenci proteinu dochází k záměně aminokyseliny glycinu za serin. U mnoha pacientů se sarkoidózou se můžeme setkat s přítomností mikrobiálního agens v tkáních. *RAB23* hraje důležitou roli v antibakteriální ochraně. Je tedy možné, že dysfunkce tohoto genu může vést k narušení antibakteriální ochrany.

3.8 Detekce bodových mutací a polymorfismů

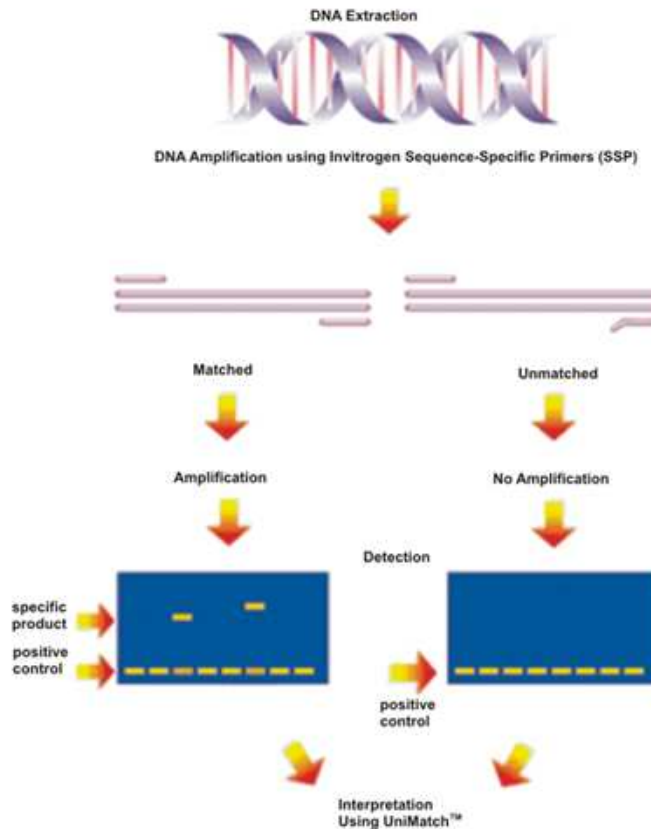
Bodový polymorfismus bývá také označován jako jednonukleotidový polymorfismus (SNP, single nucleotide polymorphism) (Rosypal *et al.*, 2003) (viz Obrázek 5). Hledáním spojitostí mezi SNP a nejčastějšími onemocněními se v současnosti zabývají zejména studie GWAS (Campbell *et al.*, 2007).



Obrázek 5: Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) (převzato z <http://cs.wikipedia.org>)

V současné době lze k identifikaci jednonukleotidových polymorfismů využít celou řadu technik. Nejčastěji se využívají techniky genotypizace založené na principu PCR. V posledních letech se začínají uplatňovat techniky vysokokapacitní a také sekvenování nové generace.

Mezi techniky založené na PCR patří PCR-RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů, *polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism*). Nejdříve se provede PCR amplifikace požadovaného úseku DNA, který obsahuje studovaný polymorfismus. Následuje štěpení PCR produktů pomocí restrikčních endonukleáz, které štěpí DNA, jestliže obsahuje určitou přesně definovanou sekvenci nukleotidů. Pokud alela obsahuje tuto rozpoznávací sekvenci, bude její DNA rozštěpena. Při elektroforéze fragmentů nalezneme v gelu pro rozštěpenou alelu dva proužky, zatímco nerozštěpená DNA vytváří na gelu pouze jeden proužek. Další využívaná technika je PCR-SSP (PCR se sekvencně-specifickými primery, *polymerase chain reaction with sequence specific primers*) (viz Obrázek 6). Při této technice se využívají specifické primery obsahující polymorfismus. PCR amplifikace proběhne pouze za podmínky, že dojde k úplné hybridizaci mezi primerem a sekvencí DNA. Pokud tato podmínka splněná není, neproběhne amplifikace, reakce je negativní, nevzniká žádný PCR produkt. Detekce pozitivních a negativních reakcí probíhá opět pomocí elektroforézy (Petřek, 2000).



Obrázek 6: Princip PCR-SSP (převzato z <http://www.topdiag.com>).

Identifikaci polymorfismů umožňuje také PCR s detekcí v reálním čase (real-time PCR). Tato technika umožňuje sledovat nárůst amplifikovaného produktu v každém cyklu reakce a to díky fluorescenčním sondám, které hybridizují s DNA v místě polymorfismu. Ve chvíli, kdy je sonda degradována díky 5'-exonukleázové aktivitě termostabilní DNA polymerázy, dochází k nárůstu fluorescence. Fluorescence je měřena v každém cyklu a je vytvářena amplifikační křivka. (<http://www.generibiotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr>).

Pro genotypizaci většího počtů SNP v jedné reakci jsou vhodné microarray techniky. Tyto techniky vychází z principu PCR-SSO (PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy, *polymerase chain reaction with sequence specific oligonucleotides*). Reakce probíhá na čipu s velkým počtem nukleotidových sond. Musí dojít k úplné hybridizaci sondy se studovanou DNA. Detekce se provádí pomocí speciálního zařízení umožňujícího čtení čipů.

V rámci praktické části diplomové práce byla ke genotypizaci využita moderní technika MassArray, která umožňuje rychlou a snadnou analýzu. Mezi výhody této

metody patří, že nevyžaduje velké množství DNA, můžeme analyzovat v jedné reakci až 36 různých variant DNA a tato technika je schopna detekovat i vícealelické polymorfismy.

3.9 Technologie MassArray

Technologie MassArray kombinuje polymerázovou řetězovou reakci (PCR) s citlivou a vysoce specifickou hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF MS).

Výhody této technologie jsou:

- rychlá, přesná analýza pomocí hmotnostní spektrometrie
- široké využití - genotypizace, analýza somatických mutací, metylací, kvantitativní genové exprese
- identifikace nejen bialelických, ale i vícealelických polymorfismů
- úspora času - umožňuje analyzovat až 36 různých variant DNA v jedné reakci

Prvním krokem je provedení PCR reakce k amplifikaci analyzované DNA. Primery jsou navrženy tak, aby ohraničily úseky DNA obsahující studované SNP (viz Obrázek 12).

Ve druhém kroku se produkty PCR inkubují s enzymem SAP (shrimp alkaline phosphatase). Tento enzym inaktivuje defosforylací nezabudované deoxyribonukleotidy, které se díky tomu nemohou účastnit další reakce (viz Obrázek 12).

Následuje další PCR. Součástí mixu jsou extenční primery o dané molekulové hmotnosti, které se váží na DNA a končí jednu bázi před studovaným SNP. K extenčním primerům jsou poté připojeny terminační dideoxyribonukleotidy o známé molekulové hmotnosti na principu komplementarity s templátovým řetězcem (viz Obrázek 12) (Gabriel *et al.*, 2009).

Posledním krokem je analýza studované DNA. Pomocí přístroje MassArray Nanodispenser se vzorky (produkty PCR) přenesou z PCR-destičky na chip s nanosenou maticí pro MALDI-TOF detekci (viz Obrázek 7). Objemy přenesených vzorků jsou řádově v nanolitrech a doba přenosu nepřesahuje 10 minut. Následně je chip vložen do MassArray analyzátoru (viz Obrázek 7). Jednonukleotidové polymorfismy jsou

detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, která umožňuje denně analyzovat desítky až tisíce vzorků.

Hmotnostní spektrometrie (MS, Mass Spectrometry) je analytická metoda, která umožňuje stanovit hmotnost částic, elementární složení vzorku nebo objasnění chemické struktury molekul. Principem této metody je ionizace vzorku, vznik nabitých molekul či fragmentů molekul a měření jejich hmotnosti vzhledem k náboji (poměr m/z).

Postup hmotnostní spektrometrie:

- 1) Umístění vzorku do přístroje a jeho odpaření.
- 2) Ionizace a tvorba nabitých částic - iontů.
- 3) Oddělení iontů na základě poměru m/z v analyzátoru.
- 4) Detekce iontů.
- 5) Zpracování iontů hmotnostním spektrometrem.

MALDI-TOF spektrometry jsou založeny na kombinaci ionizace laserem za účasti matrice (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) a analyzátoru doby letu (TOF, Time of Flight) (viz Obrázek 8).

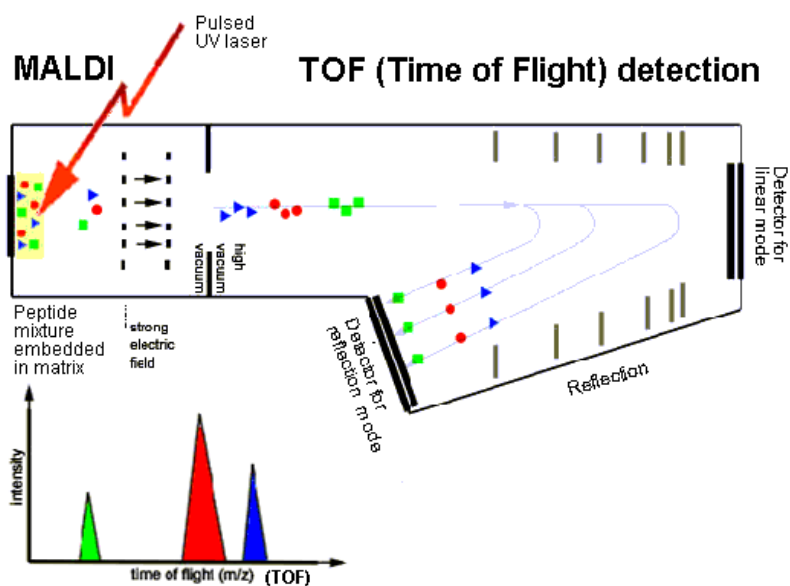
Analyzovaný vzorek je smíchán s vhodnou matricí a dochází ke ko-krystalizaci. Takto připravený vzorek je poté vystaven krátkým laserovým pulsům, které způsobí ionizaci molekul a přechod do plynné fáze. Za oba tyto děje je zodpovědná matrice, která je tvořena molekulami schopnými uvolnit velice rychle energii, což vede k rozbití krystalické struktury a přechodu molekul do plynné fáze.

Analyzátor doby letu rozděluje ionty podle poměru m/z na základě doby, za kterou iont proletí od zdroje k detektoru. Ionty s nižším poměrem m/z o stejné kinetické energii se pohybují analyzátozem rychleji.

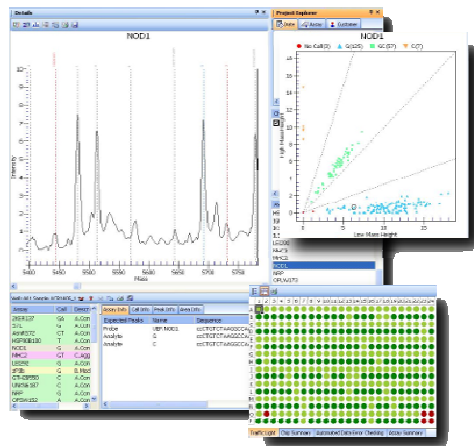
Po ukončení analýzy jsou získána hmotnostní spektra pro alely jednotlivých polymorfismů (viz Obrázek 9, 10, 11). Na základě velikosti molekulové hmotnosti lze jednotlivé alely identifikovat.



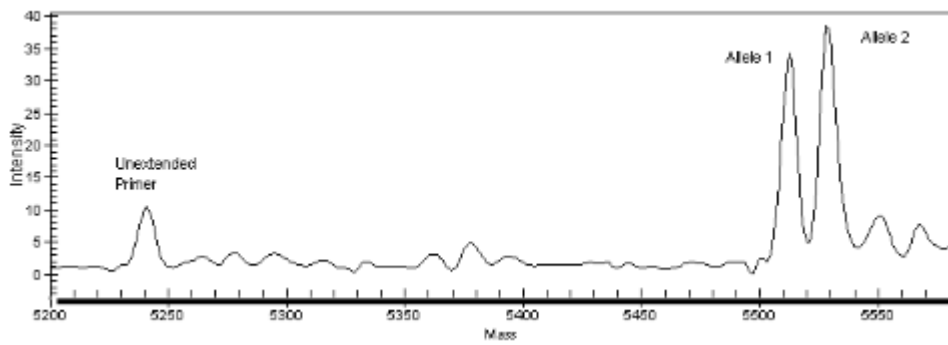
Obrázek 7: MassArray nanodispenser a MassArray analyzátor (převzato z www.sequenom.com)



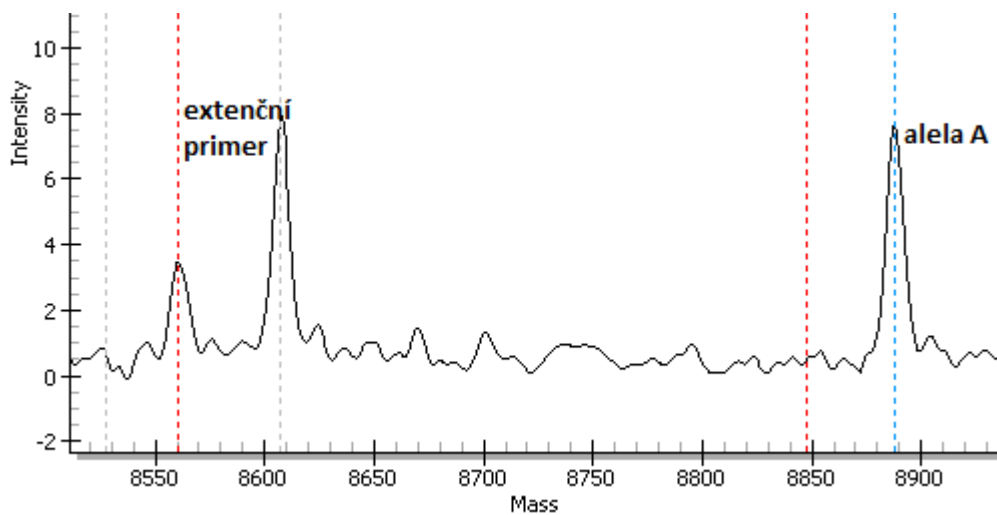
Obrázek 8: Princip MALDI-TOF. Vzorek je odpařen působením laseru za účasti matrice (MALDI), vznikají ionty, které jsou v analyzátoru odděleny na základě poměru m/z a detekovány detektorem a je zpracováno hmotnostní spektrum (převzato z www.ru.nl).



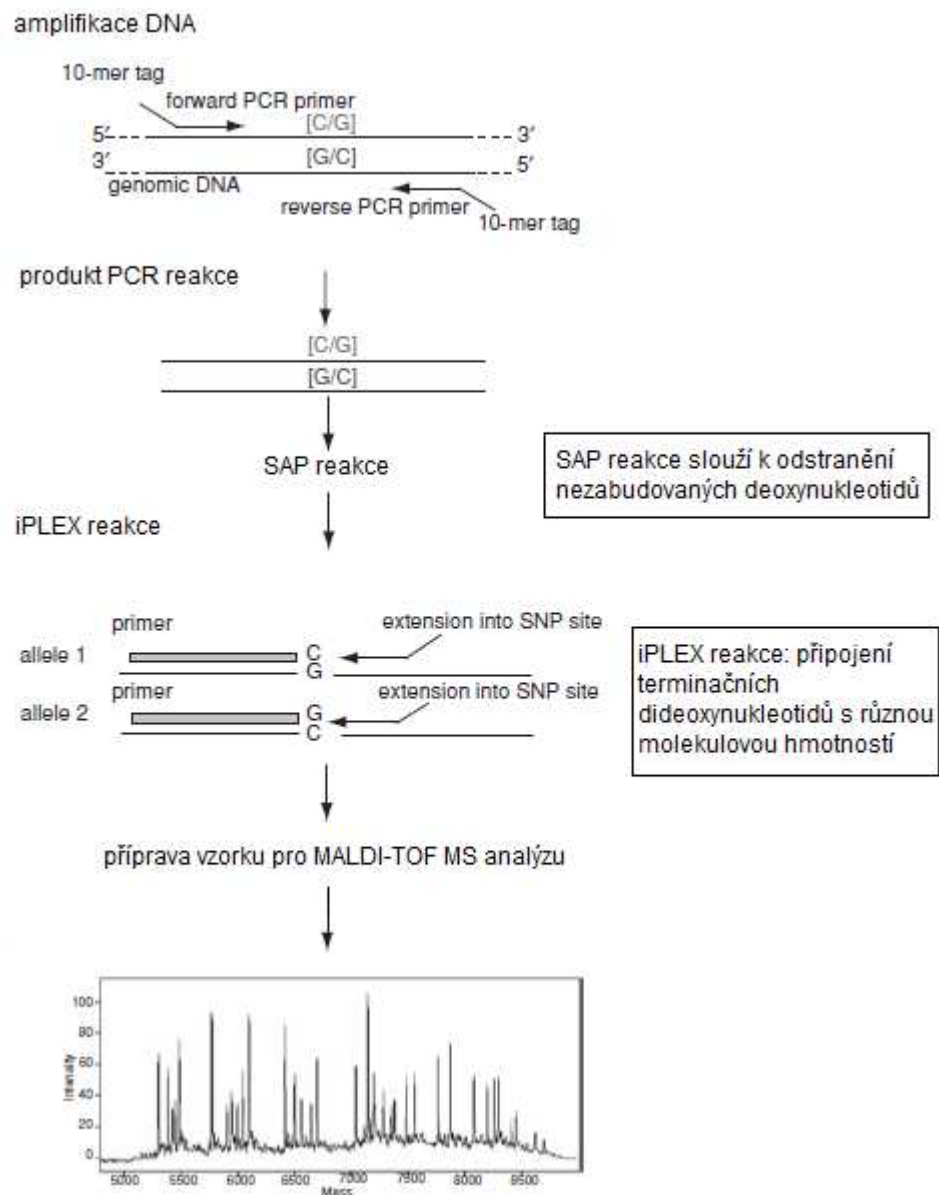
Obrázek 9: Výstup získaný po analýze (převzato z <http://uagc.arl.arizona.edu/kontent>).



Obrázek 10: Zobrazení heterozygota pro alely 1 a 2 (převzato z www.sequenom.com)



Obrázek 11: Zobrazení homozygota pro alelu A (převzato z Paulů, 2012).



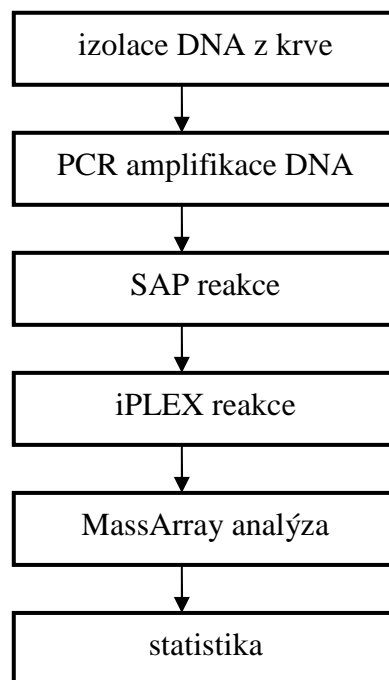
Obrázek 12: Schéma postupu genotypizace (upraveno dle Gabriel *et al.*, 2009)

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál byla využita periferní krev 123 pacientů, která byla odebrána do zkumavek s protisrážlivým činidlem EDTA (ethylendiamintetraacetát). Jedná se retrospektivní studii - do studie byli zahrnuti pacienti s plicní sarkoidózou, u kterých byl znám vývoj onemocnění po 2 letech (progrese/regrese). Všichni pacienti byli diagnostikováni podle mezinárodních kritérií (Statement on sarcoidosis, 1999) na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy v Olomouci (přednosta: prof. MUDr. V. Kolek, DrSc.). Pomocí vysolovací techniky (Miller *et al.*, 1988) byla izolována z periferní krve pacientů DNA, která byla využita ke studiu vybraných predisponujících a modifikujících genů a jejich polymorfismů asociovaných se sarkoidózou (*BTNL2* (rs2076530), *ANXA11* (rs1049550), *HERC2* (rs916977), *IL-23R* (rs11209026) a *RAB23* (rs1040461)).

4.2 Schéma experimentu



Obrázek 13: Jednotlivé kroky analýzy jednonukleotidových polymorfismů kandidátních genů asociovaných se sarkoidózou technikou MassArray.

4.3 Izolace DNA

1) Ze zkumavky s protisrážlivým činidlem EDTA (5-10 ml) přelít periferní krev do 50 ml zkumavky. Do objemu cca 45 ml přidat vychlazený lyzační roztok (LB). Zkumavku uzavřít a protřepat. Dochází k lyzi erytrocytů a projasnění roztoku. Centrifugovat 5 minut při 4000 rpm (1700g). Leukocyty obsahující DNA klesají ke dnu zkumavky.

2) Vylít supernatant a přidat k sedimentu 5 ml roztoku R (resuspendační roztok: 10 mM TRIS pH 7,5), protřepat. Centrifugovat 5 min při 4000 rpm (1700g). Odsát supernatant pomocí pasteuovy pipety. Jádra leukocytů s DNA tvoří sediment.

3) Přidat 930 μ l roztoku R k sedimentu a protřepat (dojde k rozbití sedimentu). Postupně přidat 370 μ l roztoku P (obsahuje detergent SDS, který způsobí popraskání jader) a 40 μ l proteinázy K (štěpí bílkoviny). Promíchat otáčením. Roztok nesmí příliš pěnit. Inkubovat při 37 °C přes noc.

4) Druhý den vytáhnout vzorky z inkubátoru a nechat vychladnout na laboratorní teplotu. Ve zkumavce se nachází směs naštěpených bílkovin, detergovaných lipidů, polysacharidů a DNA. Přidat 400 μ l 5M NaCl ke vzorkům a třepat 15 s na třepačce. Dochází k vysrážení proteinů.

5) Centrifugovat 15 minut při 4000 rpm (1700g). Přelít supernatant do mikrozukavky (2 ml), centrifugovat 10 minut při 14 000 rpm (18 000g). Krok slouží k odstranění proteinů.

6) Připravit pro každý vzorek 15 ml zkumavku s 3,5 ml 96 % etanolu. Do těchto připravených zkumavek přelít supernatant. Převracet zkumavku. Dochází k vysrážení DNA (vzniká chuchvalec).

7) Připravit pro každý vzorek 2 sterilní mikrozukavky s 0,5 ml 70 % etanolu, jednu šroubovací mikrozukavku (1,5 ml) se 700 μ l 10 mM TRIS (pH 8,0). Objem použitého TRIS pufru se sníží, pokud je chuchvalec DNA malý.

8) Na jednorázovou inokulační kličku nabrat chuchvalec DNA, promýt ve zkumavkách se 70 % etanolem. Otrít chuchvalec o stěnu zkumavky (vymačkat etanol) a poté ponořit kličku s DNA do šroubovací mikrozukavky a uvolnit DNA do roztoku. DNA se při pokojové teplotě přes noc rozpustí. Rozpouštění lze také urychlit např. zahřátím na 70 °C po dobu 5 minut.

9) Skladovat v chladničce při 4 °C. Pro dlouhodobé skladování zamrazit na -20 °C.

Pomocí spektrofotometru Nanodrop, který umožňuje měřit absorbanci ve velmi malých objemech vzorku (2-5 µl), byla měřena koncentrace a čistota izolované DNA. Pomocí automatického výpočtu z absorbance vzorku DNA při vlnové délce 260 nm (absorpční maximum dsDNA) byla stanovena koncentrace DNA v roztoku. Čistota DNA je ovlivněna tím, do jaké míry se podařilo odstranit proteiny (absorbují záření o vlnové délce 280 nm). Poměr absorbancí A_{260}/A_{280} určuje čistotu DNA. Pokud získáme hodnoty nižší než 1,8, je potřeba DNA přečistit.

Pomocí vysolovací techniky lze obvykle získat z 3-10 ml krve DNA o koncentraci 100-1000 ng/µl. Čistota DNA (A_{260}/A_{280}) se pohybuje v rozmezí hodnot 1,8-2.

4.4 Genotypizace pomocí technologie MassArray

Příprava ředěných vzorků DNA: vzorky izolované DNA se naředí PCR-vodou na koncentraci cca 10 ng/µl (2-20 ng/µl).

Příprava směsi primerů pro PCR: primery jsou dodávány v lyofilizované formě. Přidáním vypočteného množství PCR-vody se připraví zásobní roztoky primerů o koncentraci 100 pmol/µl. Z jednotlivých zásobních roztoků se připraví směs, která obsahuje 1 pmol/µl každého primeru.

Příprava reakční směsi pro PCR: směs obsahuje vodu, pufr, primery (viz Tabulka 4), chlorid hořečnatý, deoxyribonukleotidy a enzym Taq DNA-polymerázu (viz Tabulka 2). Do 96-jamkové PCR-destičky se nejprve pipetují po 1 µl naředěné vzorky DNA. Poté se do jamek přidá po 4 µl reakční směs. PCR-destička se zakryje samolepící fólií, krátce se stočí na centrifuze (5s/4000rpm) a vloží se do termocykléru. Probíhá polymerázová řetězová reakce podle teplotního a časového profilu uvedeného v Tabulce 3.

Tabulka 2: Složení PCR mixu. V tabulce jsou uvedeny jednotlivé složky obsažené v PCR mixu, jejich koncentrace a množství na reakci.

	koncentrace	1 reakce (μl)
H ₂ O		2,4
10x pufr		0,5
MgCl ₂	25mM	0,4
dNTP mix	25mM	0,1
směs primerů	1,0μM	0,5
HotStart <i>Taq</i> polym.	5U/μl	0,1
DNA (ng/μl)	10	1

Tabulka 3: Teplotní a časový profil PCR reakce

teplota (°C)	doba cyklu
94	2 min
94	20 s
56	30 s 44x
72	1 min
72	3 min
4	hold

Tabulka 4: Sekvence použitých primerů

název SNP	sekvence primerů 5'-3'		velikost amplikonu (bp)
rs2076530	F:ACGTTGGATGCAGTACCGCTGCCTTTTGG	R:ACGTTGGATGGGAAGTAGCATATTAAGTGG	152
rs1049550	F:ACGTTGGATGTTCTCCAGGGACGGATGAG	R:ACGTTGGATGAAGTAGGATCTGCTGCCGCT	100
rs916977	F:ACGTTGGATGTTGGCAAACCTCCACAGTGGG	R:ACGTTGGATGTTCTGTTCTTCTTGACCCCG	99
rs11209026	F:ACGTTGGATGAAATTCTGCAAAAACCTAC	R:ACGTTGGATGGCTGTTATGTTGTCAATTC	98
rs1040461	F:ACGTTGGATGGTTTGGTGGTCTAAGATTG	R:ACGTTGGATGACATCTGGTGGGAAGTCACTC	99

Po skončení PCR reakce se mikrotitrační destička stočí v centrifuze (5s/4000rpm). Poté se připraví reakční směs obsahující enzym SAP (viz Tabulka 5) a po 2 μl se přidá k produktům PCR v destičce. PCR-destička se zakryje samolepící fólií, krátce se stočí (5s/4000rpm) na centrifuze a inkubuje se v termocykleru 45 minut při 37 °C. Ihned následuje inkubace v 85 °C po dobu 5 minut k inaktivaci enzymu. Po ukončení inkubace se opět destička centrifuguje (5s/4000rpm).

Tabulka 5: Složení SAP mixu. V tabulce jsou uvedeny jednotlivé složky SAP mixu, jejich koncentrace a množství.

	koncentrace	1 reakce (μl)
H ₂ O		1,53
TS pufr	10x	0,17
SAP	1,7 U/μl	0,30

Příprava směsi extenčních primerů pro iPLEX-reakci: primery jsou dodávány v lyofilizované formě. Přidáním vypočteného množství PCR-vody se připraví zásobní roztoky primerů o koncentraci 400 pmol/μl. Z jednotlivých zásobních roztoků se připraví směs obsahující primery různých koncentrací (viz Tabulka 6).

Následujícím je příprava reakční směsi pro iPLEX-reakci, která obsahuje vodu, pufr, směs extenčních primerů (viz Tabulka 9), iPLEX-enzym a terminační mix (viz Tabulka 7). Reakční směs se po 2 μl přidá k produktům v destičce. PCR-destička se zakryje samolepící fólií, krátce se stočí na centrifuze (5s/4000rpm). Mikrotitrační destičku opět vložíme do termocykléru a probíhá reakce podle teplotního a časového profilu uvedeného v Tabulce 8.

Tabulka 6: V tabulce je uvedena koncentrace extenčních primerů a jejich množství na reakci. Kvůli citlivosti detektoru primery o vyšší molekulové hmotnosti jsou pipetovány ve vyšších koncentracích.

koncentrace (μM)	objem (μl/primer)	skupina primerů	Objem (μl/skupina)
7	3,50	2,0	7,00
9,33	4,67	1,0	4,67
11,66	5,83	1,0	5,83
14	7,00	1,0	7,00
		H ₂ O	175,51
		Celkem	200,00

Tabulka 7: Složení iPLEX mixu. V tabulce jsou uvedeny jednotlivé složky mixu, jejich koncentrace a množství.

	koncentrace	1 reakce (μl)
H ₂ O		0,739
iPLEX pufr	10x	0,100
iPLEX Term. mix		0,200
mix extenčních primerů *	7/9,3/11,6/14	0,940
iPLEX enzym		0,021

* viz Tabulka 6

Tabulka 8: Teplotní a časový profil iPLEX reakce.

teplota (°C)	doba cyklu
94	30 s
94	5 s
52	5 s 40x
80	5 s
72	3 min
4	hold

Tabulka 9: Sekvence použitých extenčních primerů a jejich molekulová hmotnost.

název SNP	sekvence 5'-3'	molekulová hmotnost (Da)
rs2076530	TTGGATCTGAAGGTGGTA	5609,7
rs1049550	CGTCATTGACTGCCTGGGGAGT	6782,4
rs916977	AAAGTGGGGATGCAGTTTGTAGTAGA	7850,1
rs11209026	GCAAAAACCTACCCAGTT	5436,6
rs1040461	CCCCTACATCTCCACCATTGAGGGTAC	8140,3

Tabulka 10: Očekávané molekulové hmotnosti jednotlivých alel.

název SNP	molekulová hmotnost extenčních primerů (Da)	molekulová hmotnost alely G (Da)	molekulová hmotnost alely A (Da)
rs2076530	5609,7	5896,9	5880,9
rs916977	7850,1	8097,3	8177,2
rs11209026	5436,6	5683,8	5763,7
název SNP	molekulová hmotnost extenčních primerů (Da)	molekulová hmotnost alely C (Da)	molekulová hmotnost alely T (Da)
rs1049550	6782,4	7029,6	7109,5
rs1040461	8140,3	8387,5	8467,4

Po ukončení iPLEX reakce se mikrotitrační destička centrifuguje (5s/4000rpm). V dalším kroku se k produktům přidá Resin, který odstraní Na^+ , K^+ a Mg^{2+} ionty. Resin se nanese na formu s 96 jamkami. Každá jamka obsahuje 15 mg Resinu. K produktům se přidá 41 μl vody a destička se krátce centrifuguje (5s/4000rpm). Destička s Resinem se převrátí na destičku s produkty a tím se Resin dostane do jamek s produkty. Následně se destička s produkty a Resinem nechá rotovat po dobu 30 minut a poté se centrifuguje 5 minut při 4000 rpm.

Na závěr jsou vzorky pomocí MassArray nanodispenseru přeneseny na chip a analyzovány v MassArray analyzátoru pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

Ze získaných hmotnostních spekter jsou jednotlivé genotypy vyhodnoceny pomocí softwaru Typer 4.0.5, který analyzuje všechny píky v hmotnostním spektru a na základě molekulových hmotností rozliší jednotlivé genotypy.

4.5 Statistika

Genotypová frekvence - vyjadřuje zastoupení jedinců s daným genotypem v celkovém počtu genotypizovaných jedinců.

$$f_g = n_x / n_{\text{celk.}}$$

f_g ...genotypová frekvence

n_x ...počet pacientů/kontrolních jedinců pro daný genotyp

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

Alelická frekvence - vyjadřuje podíl zastoupení alely na celkovém počtu alel v populaci.

$$f_a = (2n_x + n_y) / 2n_{\text{celk.}}$$

f_a ...alelická frekvence

n_x ...počet homozygotních pacientů/kontrolních jedinců pro danou alelu

n_y ...počet heterozygotních pacientů/kontrolních jedinců

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

Fenotypová frekvence - vyjadřuje podíl zastoupení nosičů dané alely.

$$f_f = (n_x + n_y) / n_{\text{celk.}}$$

f_f ...fenotypová frekvence

n_x ...počet homozygotních jedinců pro danou alelu

n_y ...počet heterozygotních jedinců

$n_{\text{celk.}}$...celkový počet genotypizovaných jedinců

Hardy-Weinbergův zákon - vyjadřuje teoretické rozložení alel v populaci, vychází z frekvence genotypů v ideální populaci.

$$p + q = 1$$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p ...frekvence alely A

q ...frekvence alely a

p^2 ...frekvence genotypu AA

$2pq$...frekvence genotypu Aa

q^2 ...frekvence genotypu aa

Chí-kvadrát test - neboli test dobré shody je statistická metoda, která umožňuje stanovit, zda mezi dvěma znaky existuje prokazatelně výrazný vztah. Pomocí chí-kvadrát testu ověřujeme shodu mezi očekávanými a pozorovanými počty jedinců v jednotlivých fenotypových nebo genotypových třídách. Získaná hodnota se srovnává s kritickou hodnotou odpovídající zvolené hladině významnosti. Chí-kvadrát test byl využit k ověření, zda genotypové a alelické frekvence jsou v Hardy-Weinbergově rovnováze ($p > 0,05$).

$$\chi^2 = \sum (x_i - e_i)^2 / e_i$$

x_i ...naměřené hodnoty

e_i ...očekávané hodnoty

N ...počet stupňů volnosti ($N=n-1$)

n ...počet genotypových/fenotypových tříd

4.6 Použité chemikálie

Deoxyribonukleotidy pro PCR	Sequenom, USA
Ethanol 96 %	Lach:ner, Česká republika
EDTA	Serva
Hydroxid sodný	Lach:ner, Česká republika
Glycerol 40 %	Sigma Aldrich, USA
Chlorid hořečnatý	Sequenom, USA
Chlorid sodný	Sigma Aldrich, USA
Chlorid vápenatý	Sigma Aldrich, USA
CLEAN Resin	Sequenom, USA
iPLEX enzym	Sequenom, USA
iPLEX pufr	Sequenom, USA
iPLEX terminační mix	Sequenom, USA
PCR enzym	Sequenom, USA
PCR pufr (20mM MgCl ₂)	Sequenom, USA
PCR voda	Prime, Německo
Proteináza K	Serva
SAP enzym	Sequenom, USA
SAP pufr	Sequenom, USA

SDS (dodecylsulfát sodný)	Sigma Aldrich, USA
Sacharóza	Sigma Aldrich, USA
Triton X100	Sigma Aldrich, USA
Trizma base	Sigma Aldrich, USA
Trizma.HCl	Sigma Aldrich, USA

4.7 Příprava roztoků

1M TRIS (pH 7,5) 250 ml

250 ml H₂O

31,75 g Trizma.HCl

5,9 g Trizma base

Po rozpuštění přefiltrovat.

1M TRIS (pH 8,0) 5 ml

5 ml H₂O

0,444 g Trizma.HCl

0,265 g Trizma base

Po rozpuštění přefiltrovat.

0,5 M EDTA (pH 8) 100 ml

18,62 g EDTA

50 ml H₂O

přidávat NaOH dokud se EDTA nerozpustí

Upravit pH na 8 pomocí kyseliny octové a NaOH. Doplnit H₂O do 100 ml.

Přefiltrovat.

0,5 M MgCl₂ , 200 ml

200 ml H₂O

20,32 g MgCl₂.6H₂O

Po rozpuštění roztok autoklávovat.

0,1 M CaCl₂, 10 ml

10 ml H₂O

0,147 g CaCl₂·2H₂O

Po rozpuštění přefiltrovat.

25% SDS, 20 ml

15 ml H₂O

5 g SDS

Rozpustit zahřátím na cca 37 °C.

5 M NaCl, 200 ml

200 ml H₂O

58,44 g NaCl

Roztok autoklávovat.

Skladovací roztok pro proteinázu K

14,5 ml H₂O

10 ml glycerol (40 %)

250 µl 1 M TRIS, pH 7,5

250 µl 0,1 M CaCl₂

Roztok LB, 1000 ml

500 ml H₂O

102,7 g sacharózy

po rozpuštění: 10 ml 1 M TRIS, pH 7,5

10 ml 0,5 M MgCl₂

10 ml Triton X100

H₂O do 1000 ml

Roztok R, 1000 ml

990 ml H₂O

10 ml 1 M TRIS, pH 7,5

Roztok P, 50 ml

32,5 ml H₂O

0,5 ml 1 M TRIS, pH 7,5

4 ml 0,5 M EDTA

2 ml 0,1 M CaCl₂

3 ml 5 M NaCl

8 ml 25% SDS

Proteináza K, 5 ml

100 mg proteinázy K (originální lahvička)

5 ml skladovacího roztoku pro proteinázu K

Roztok rozalíkvotovat (např 5 x 1 ml).

Etanol 70%, 500 ml

135 ml H₂O

365 ml 96% etanolu

TE pufr, 50 ml

98,8 ml H₂O

1 ml 1 M TRIS

0,2 ml 0,5 M EDTA

4.8 Laboratorní přístroje a pomůcky

Automatické pipety	Eppendorf, Česká republika
Centrifuga	Spectrafuge 16M, Labnet, USA
Centrifuga mini	Labnet, Korea
Dávkovače na roztoky s nastavitelným objemem	
Filtr Sterivex GP (Milipore)	
Inkubátor pro inkubaci při cca 37 °C	
Laboratorní sklo	
Laminární box	BIOAIR, Itálie
MassARRAY Analyzer Compact	Sequenom, USA
MassARRAY Nanodispenser	RS1000, Sequenom, USA

Spektrofotometr Nanodrop ND-1000 Thermo Scientific

Termoblok pro inkubaci při cca 70 °C

Mastercycler pro

Eppendorf, Česká republika

Váhy

Vortex

Labnet, USA

Termoblok pro inkubaci při cca 70 °C

4.9 Spotřební materiál

reakční destička (96 jamek)

špičky s filtrem (10, 20, 200, 1000 µl)

špičky bez filtru (10, 20, 200, 1000 µl)

mikrozkumavky (1,5 ml a 2 ml)

zkumavky o objemu 50 ml

zkumavky o objemu 15 ml

Pasteurovy pipety

inokulační kličky

5 VÝSLEDKY

V rámci praktické části diplomové práce bylo studováno pět vybraných polymorfismů genů asociovaných se sarkoidózou. Ke studiu byla využita DNA izolovaná z periferní krve pacientů. Všichni pacienti byli diagnostikováni podle mezinárodních kritérií (Statement on sarcoidosis, 1999) na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy v Olomouci (přednosta: prof. MUDr. V. Kolek, DrSc.).

Soubor pacientů byl tvořen ze 123 jedinců, z toho bylo 58 mužů a 65 žen. Průměrný věk jedinců byl 55 let. Nejmladší pacient měl 31 let, nejstarší 83 let. U všech pacientů jsme znali vývoj onemocnění po 2 letech. Regrese (spontánní nebo po léčbě) byla pozorována u 49 jedinců. K progresi (zhoršení) onemocnění během 2 let sledování došlo u 74 pacientů.

Všechny studované polymorfismy byly v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou.

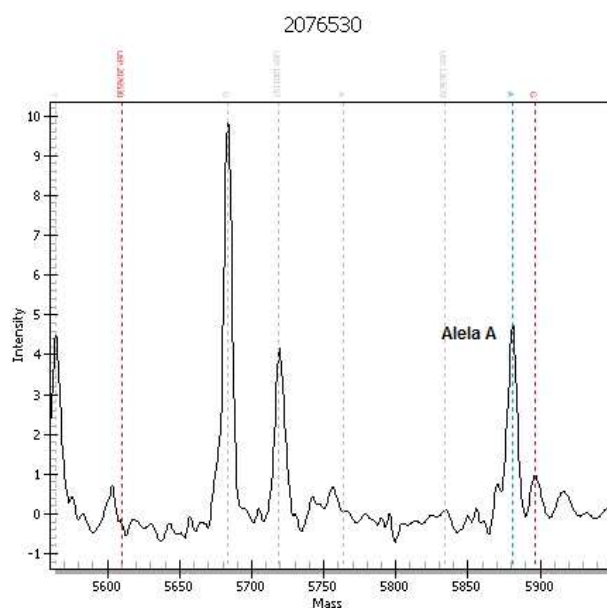
rs2076530 v genu *BTNL2*

Prvním studovaným polymorfismem byl rs2076530 v genu *BTNL2*. U pacientů s regresí se vyskytoval genotyp AA v 50,0 %, genotyp AG v 37,5 % a genotyp GG v 12,5 % případů. V 40,5 % případů byl u pacientů s progresí přítomen genotyp AA, genotyp AG v 47,3 % a genotyp GG v 12,2 % případů. Přítomnost rizikové alely A u pacientů s regresí byla 68,8 %. Výskyt této alely u pacientů s progresí byl 64,2 % (viz Tabulka 11). Nebyl zjištěn rozdíl v alelických ani genotypových frekvencích mezi skupinami pacientů s regresí a progresí onemocnění po 2 letech sledování ($p > 0,05$).

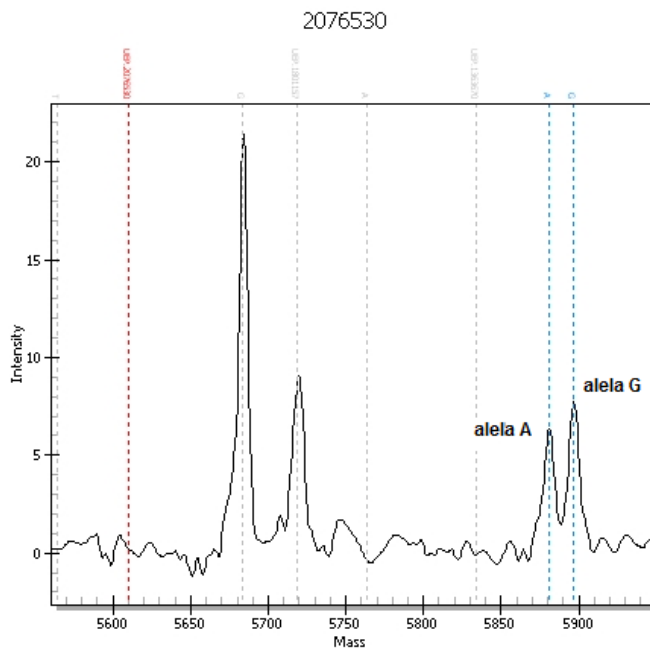
Tabulka 11: Získané hodnoty alelických a genotypových frekvencí u rs2076530 (*BTNL2*).

genotypová frekvence	regrese (n=48)*	progrese (n=74)
AA	24 (0,500)	30 (0,405)
AG	18 (0,375)	35 (0,473)
GG	6 (0,125)	9 (0,122)
	p = 0,31	
nosičství		
A	42 (0,875)	65 (0,878)
G	24 (0,500)	44 (0,595)
	p = 0,60	
alelická frekvence		
A	66 (0,688)	95 (0,642)
G	30 (0,313)	53 (0,358)
	p = 0,46	

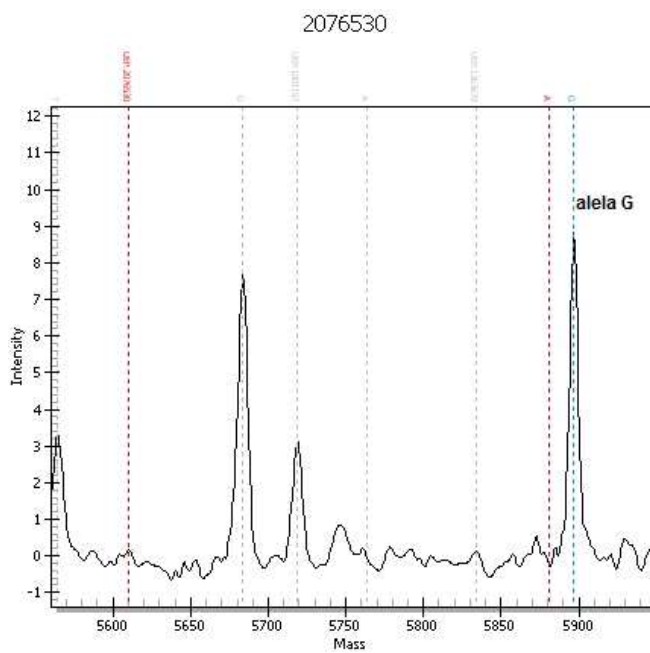
* U jednoho pacienta s progresí onemocnění se nepodařilo stanovit genotyp.



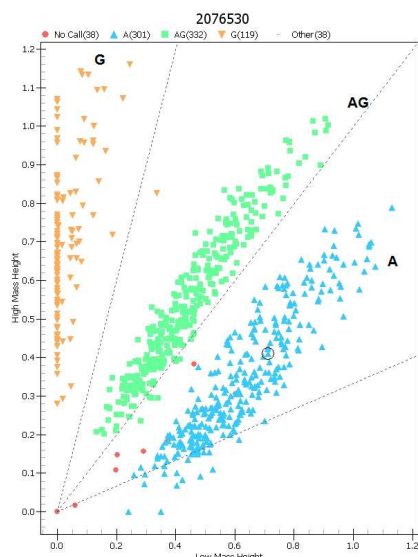
Obrázek 14: Hmotnostní spektrogram homozygota pro alelu A u rs2076530 (*BTNL2*).



Obrázek 15: Hmotnostní spektrogram heterozygota pro alely AG u rs2076530 (*BTNL2*).



Obrázek 16: Hmotnostní spektrogram homozygota pro alelu G u rs2076530 (*BTNL2*).



Obrázek 17: Diagram zastoupení genotypů u rs2076530 (*BTNL2*).

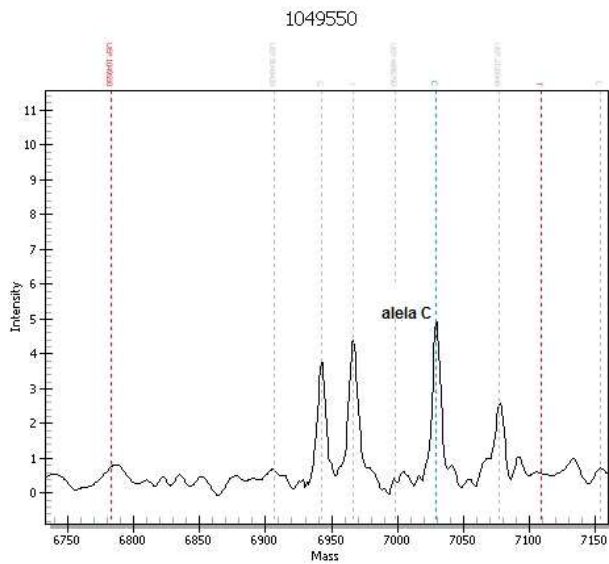
rs1049550 v genu *ANXA11*

Dalším studovaným polymorfismem byl rs1049550 v genu *ANXA11*. U 31,5 % pacientů s regresí byla přítomna alela T. Frekvence této alely u pacientů s progresí byla 24,3 %. V 6,5 % případů byl u pacientů s regresí přítomen genotyp TT, genotyp CT v 50,0 % a genotyp CC 43,5 % případů. U pacientů s progresí byl genotyp TT přítomen v 2,8%, genotyp CT 43,1 % a genotyp CC v 54,2 % případů (viz Tabulka 12). Nebyl zjištěn rozdíl v alelických ani genotypových frekvencích mezi skupinami pacientů s regresí a progresí onemocnění po 2 letech sledování ($p > 0,05$).

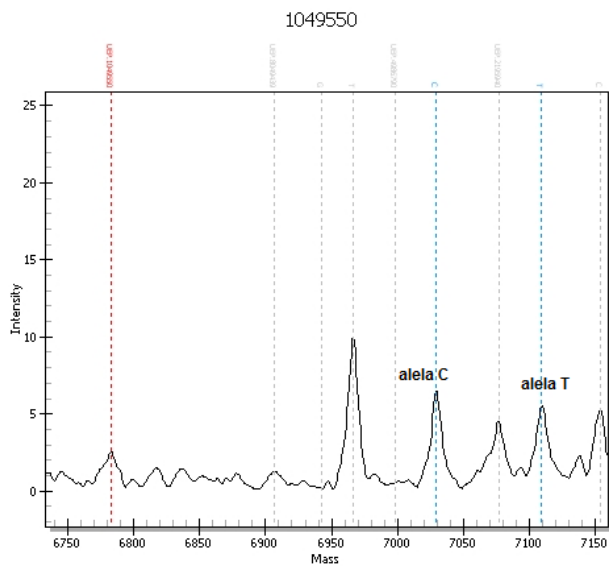
Tabulka 12: Genotypové a alelické frekvence pro rs1049550 (*ANXA 11*).

genotypová frekvence	regrese (n=46)*	progrese (n=72)*
CC	20 (0,435)	39 (0,542)
CT	23 (0,500)	31 (0,431)
TT	3 (0,065)	2 (0,028)
	$p = 0,09$	
nosičství		
C	43 (0,935)	70 (0,972)
T	26 (0,565)	33 (0,458)
	$p = 0,44$	
alelická frekvence		
C	63 (0,685)	109 (0,757)
T	29 (0,315)	35 (0,243)
	$p = 0,22$	

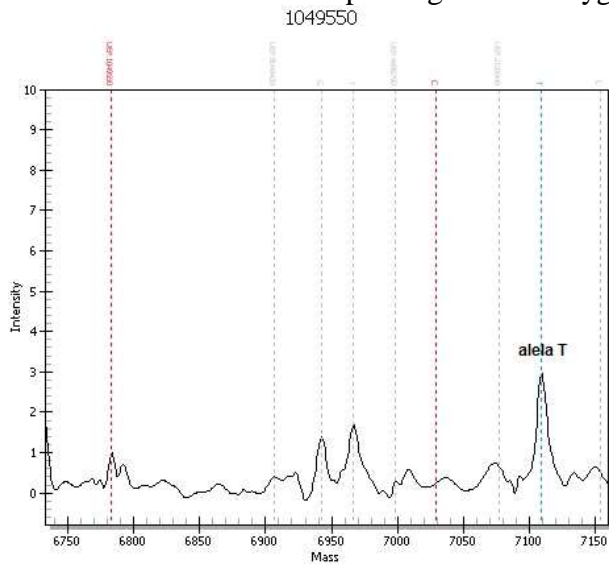
* U tří pacientů s regresí a dvou pacientů s progresí onemocnění se nepodařilo stanovit genotypy.



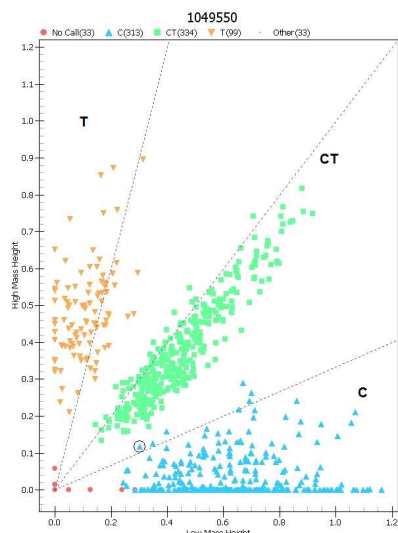
Obrázek 18: Hmotnostní spektrogram homozygota pro alelu C u rs1049550(*ANXA 11*).



Obrázek 19: Hmotnostní spektrogram heterozygota pro alely CT u rs1049550(*ANXA 11*).



Obrázek 20: Hmotnostní spektrogram homozygota pro alelu T u rs1049550(*ANXA 11*).



Obrázek 21: Diagram zastoupení genotypů u rs1049550(*ANXA 11*).

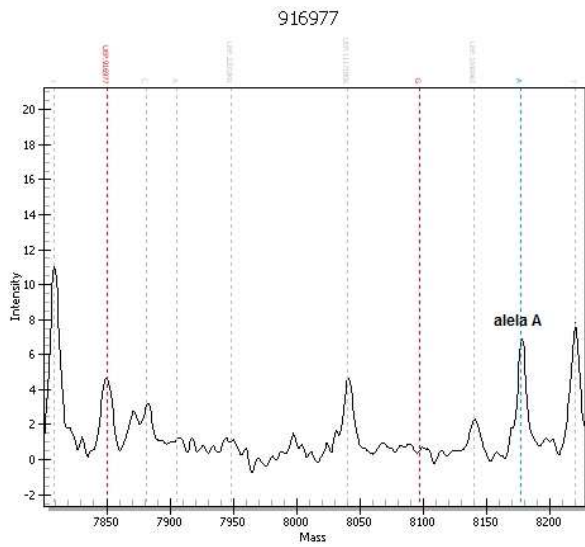
rs916977 v genu *HERC2*

U polymorfismu rs916977 v genu *HERC2* byla minoritní alela A přítomna v 18,1 % případů u pacientů s regresí. U pacientů s progresí byla frekvence této alely 14,6 %. Genotyp AA byl přítomen u pacientů s regresí v 4,3 %, genotyp AG v 27,7 % a genotyp GG v 68,1 % případů. U 1,4 % pacientů s progresí byl přítomen genotyp AA, genotyp AG byl přítomen v 26,4 % a genotyp GG v 72,2 % případů (viz Tabulka 13). Nebyl zjištěn rozdíl v alelických ani genotypových frekvencích mezi skupinami pacientů s regresí a progresí onemocnění po 2 letech sledování ($p > 0,05$).

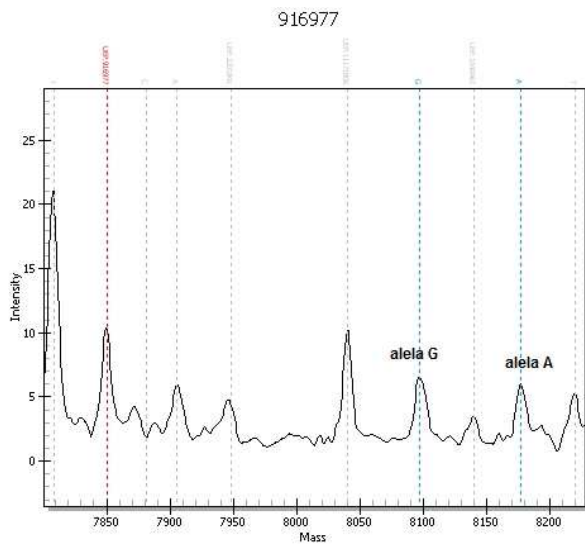
Tabulka 13: Získané hodnoty alelických a genotypových frekvencí pro rs916977 (*HERC2*).

genotypová frekvence	regrese (n=47)*	progrese (n=72)*
AA	2 (0,043)	1 (0,014)
AG	13 (0,277)	19 (0,264)
GG	32 (0,681)	52 (0,722)
	$p = 0,98$	
nosičství		
A	15 (0,319)	20 (0,278)
G	45 (0,957)	71 (0,986)
	$p = 0,67$	
alelická frekvence		
A	17 (0,181)	21 (0,146)
G	77 (0,819)	123 (0,854)
	$p = 0,47$	

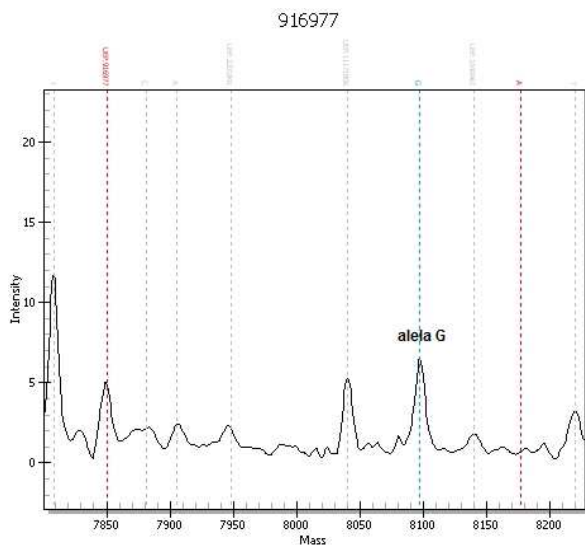
* U dvou pacientů s regresí a dvou pacientů s progresí onemocnění se nepodařilo stanovit genotyp.



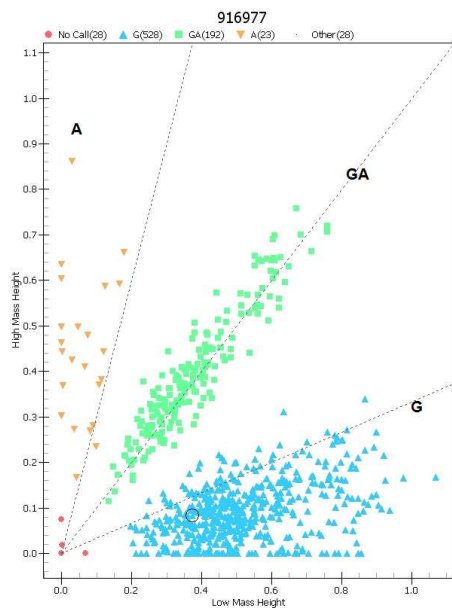
Obrázek 22: Hmotnostní spektrogram homozygota pro alelu A u rs916977 (*HERC2*).



Obrázek 23: Hmotnostní spektrogram heterozygota pro alely AG u rs916977 (*HERC2*).



Obrázek 24: Hmotnostní spektrogram homozygota pro alelu G u rs916977 (*HERC2*).



Obrázek 25: Diagram zastoupení genotypů u rs916977 (*HERC2*).

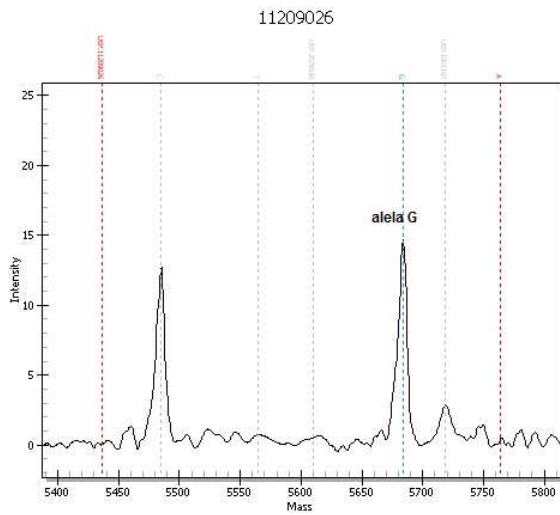
rs11209026 v genu pro *IL-23R*

V případě polymorfismu rs11209026 v genu pro *IL-23R* byla přítomna vzácná alela A u 7,1 % pacientů s regresí. Výskyt této alely, byl u pacientů s progresí 6,3 %. Genotyp GG byl u pacientů s regresí přítomen v 85,7 %, genotyp GA v 14,3 %. U 87,5 % pacientů s progresí byl přítomen genotyp GG, genotyp GA pak v 12,5 % případů (viz Tabulka 14). Nebyl zjištěn rozdíl v alelických ani genotypových frekvencích mezi skupinami pacientů s regresí a progresí onemocnění po 2 letech sledování ($p > 0,05$).

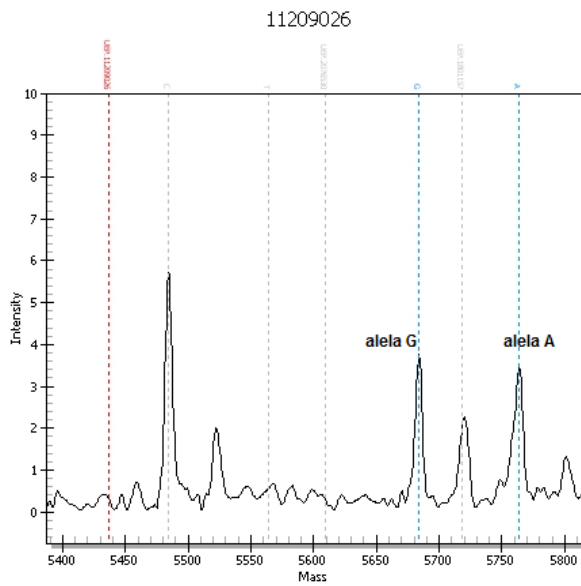
Tabulka 14: Hodnoty alelických a genotypových frekvencí pro rs11209026 (*IL-23R*).

genotypová frekvence	regrese (n=49)	progrese (n=72)*
AA	0	0
AG	7 (0,143)	9 (0,125)
GG	42 (0,857)	63 (0,875)
	$p = 0,44$	
nosičství		
A	7 (0,143)	9 (0,125)
G	49 (1,000)	72 (1,000)
	$p = 0,76$	
alelická frekvence		
A	7 (0,071)	9 (0,063)
G	91 (0,929)	135 (0,937)
	$p = 0,78$	

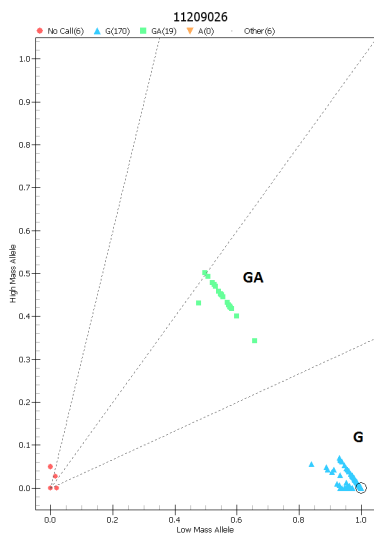
* U dvou pacientů s progresí onemocnění se nepodařilo stanovit genotyp.



Obrázek 26 :Hmotnostní spektrograf homozygota pro alelu G u rs11209026 (*IL-23R*).



Obrázek 27: Hmotnostní spektrograf heterozygota pro alely AG u rs11209026 (*IL-23R*).



Obrázek 28: Diagram zastoupení genotypů u rs11209026 (*IL-23R*).

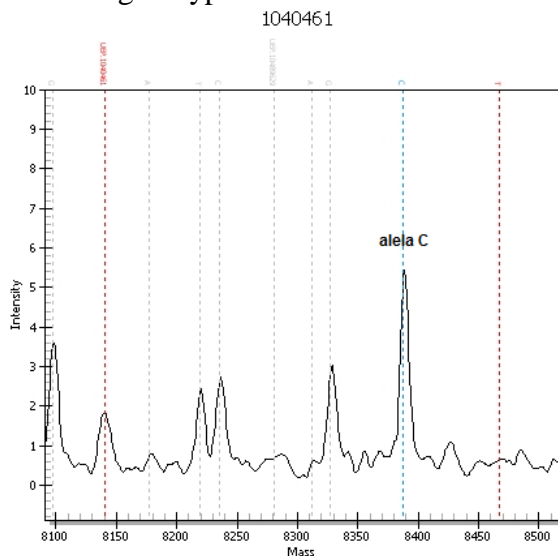
rs1040461 v genu *RAB23*

Posledním studovaným polymorfismem byl rs1040461 v genu *RAB23*. Frekvence minoritní alely T u pacientů s regresí byla 11,5 %. Frekvence této alely u pacientů s progresí byla 15,1 %. U 77,1 % pacientů byl přítomen genotyp CC, genotyp CT byl v 22,9 % případů a genotyp TT nebyl přítomen. V případě pacientů s progresí byl genotyp CC přítomen v 74,0 %, genotyp CT v 21,9 % a genotyp TT v 4,1 % případů (viz Tabulka 15). Nebyl zjištěn rozdíl v alelických ani genotypových frekvencích mezi skupinami pacientů s regresí a progresí onemocnění po 2 letech sledování ($p > 0,05$).

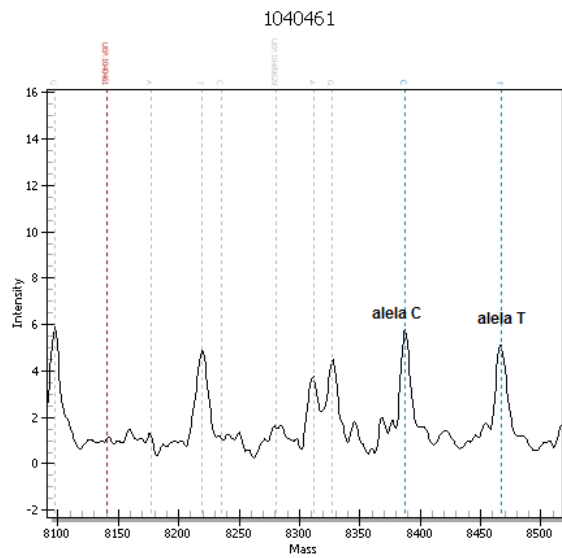
Tabulka 15: Genotypové a alelické frekvence pro rs1040461 (*RAB23*).

genotypová frekvence	regrese (n=48)*	progrese (n=73)*
CC	37 (0,771)	54 (0,740)
CT	11 (0,229)	16 (0,219)
TT	0	3 (0,041)
$p = 0,56$		
nosičství		
C	48 (1,000)	70 (0,959)
T	11 (0,229)	19 (0,260)
$p = 0,69$		
alelická frekvence		
C	85 (0,885)	124 (0,849)
T	11 (0,115)	22 (0,151)
$p = 0,42$		

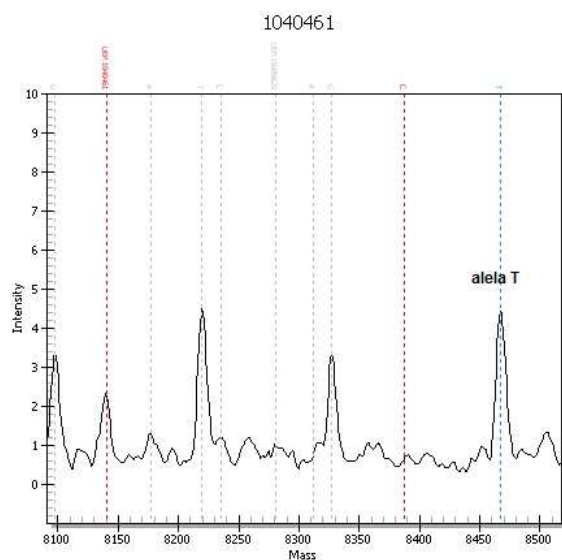
* U jednoho pacienta s regresí a jednoho pacienta s progresí onemocnění se nepodařilo stanovit genotyp.



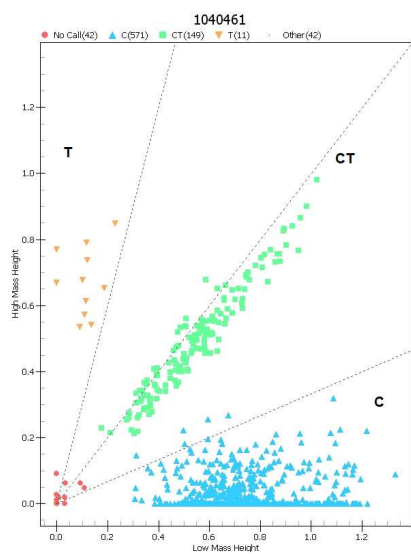
Obrázek 29: Hmotnostní spektrogram homozygota pro alelu C u rs1040461 (*RAB23*).



Obrázek 30: Hmotnostní spektrogram heterozygota pro alely CT u rs1040461 (*RAB23*).



Obrázek 31: Hmotnostní spektrogram homozygota pro alelu T u rs1040461 (*RAB23*).



Obrázek 32: Diagram zastoupení genotypů u rs1040461 (*RAB23*).

6 DISKUZE

Diplomová práce byla zaměřena na studium kandidátních genů a jejich polymorfismů asociovaných se sarkoidózou a jejich využitelností k predikci vývoje onemocnění. Studie byla retrospektivní, tedy u pacientů jsme znali vývoj onemocnění po 2 letech. U některých pacientů dochází spontánně, či po léčbě k remisi onemocnění, avšak u 30 % pacientů je pozorována progresse onemocnění. Cílem studie bylo nalézt genetické markery, které by umožnily zjistit, zda se jedná o pacienta s horší prognózou, u kterého hrozí riziko progresse. Díky tomu by mohl být včas zahájen nejvhodnější způsob léčby.

Sarkoidóza je řazena mezi polygenní onemocnění, což znamená, že rozvoj sarkoidózy je ovlivněn působením většího počtu genů. Podařilo se popsat nejen geny predisponující k tomuto onemocnění, ale i celou řadu genů modifikujících toto onemocnění. Velké množství genů, které jsou spojeny se sarkoidózou, byly objeveny díky celogenomovým asociačním studiím GWAS. Mezi nejnovější identifikované geny asociované se sarkoidózou patří gen *NOTCH4* (rs 715299) (Adrianto *et al.*, 2012) a gen *OS9* (rs 1050045), který kóduje protein *osteosarcoma amplified 9*. Tento protein má důležitou roli při degradaci proteinů a taky se podílí na aktivaci myeloidních buněk (Hofmann *et al.*, 2013).

Z genů, u nichž byla v dřívějších publikacích prokázána spojitost se sarkoidózou, bylo vybráno pět genů a jejich polymorfismů a ty byly analyzovány. Analyzovanými geny a jejich polymorfismy byly: *BTNL2* (rs2076530), *ANXA11* (rs1049550), *HERC2* (rs916977), *IL-23R* (rs11209026) a *RAB23* (rs1040461).

Ke studiu jsme využili soubor 123 pacientů, u kterých jsme znali vývoj onemocnění po 2 letech. K regresí došlo u 49 jedinců, k progresí u 74 pacientů. Soubor pacientů je poměrně malý, jelikož se jedná o vzácné onemocnění.

Prvním studovaným polymorfismem byl rs2076530 v genu *BTNL2*. Rybicki *et al.* (2005) prokázali asociaci polymorfismu rs2076530 v genu *BTNL2* se sarkoidózou. Polymorfismus vede k záměně guaninu za adenin, dochází ke změně sestřihového místa a tím je syntetizován jiný protein. Dysfunkční *BTNL2* narušuje aktivační dráhu T-lymfocytů. Riziko sarkoidózy se zvyšuje s přítomností alely A. Pro polymorfismus rs2076530 nebyly v rámci testovaného souboru nalezeny signifikantní rozdíly v alelických frekvencích. Přítomnost rizikové alely A u pacientů s regresí byla 68,8 %.

Výskyt této alely u pacientů s progresí byl 64,2 %. Z našich výsledků vyplývá, že alela A nemá modifikující účinek na rozvoj onemocnění.

Dalším studovaným polymorfismem byl rs1049550 v genu *ANXA11*. Asociaci rs1049550 v genu *ANXA11* se sarkoidózou prokázali Hofmann *et al.* (2008) na souboru 499 německých pacientů. Na tuto práci navázali Mrázek *et al.* (2011), kterým se podařilo prokázat spojitost polymorfismu rs1049550 v genu *ANXA11* se sarkoidózou na souboru 245 českých pacientů. Dále prokázali, že přítomnost alely T zajišťuje ochranu před sarkoidózou. Míra ochrany je závislá na počtu alel T v genotypu. Přítomná alela T chrání před postižením plicního parenchymu. Proto jsme očekávali asociaci tohoto polymorfismu s lepší prognózou. Výskyt alely T v našem souboru pacientů se shoduje s výsledky Mrázka *et al.* (2011). U 31,5 % pacientů s regresí byla přítomna alela T. Frekvence této alely u pacientů s progresí byla 24,3 %. Mezi podskupinami s progresí a regresí nebyly rozdíly ve frekvenci alel.

Dále byl studován polymorfismus rs916977 v genu *HERC2*. Fischer *et al.* (2011) prokázali spojitost polymorfismu rs916977 v genu *HERC2* s vnímavostí k sarkoidóze na souboru 1 996 německých pacientů. Výskyt minoritní alely A v našem souboru pacientů odpovídá výskytu této alely v německé populaci (Fischer *et al.*, 2011). Nebyly nalezeny rozdíly ve frekvenci alel v rámci studovaného souboru pacientů. V 18,1 % případů u pacientů s regresí byla přítomna alela A. U pacientů s progresí byla frekvence této alely 14,6 %. Naše výsledky naznačují, že ani tento studovaný polymorfismus nemůže být využit k predikci vývoje onemocnění, protože alelické ani genotypové frekvence se nelišily mezi pacienty, u kterých došlo k regresí a progresí nemoci.

Studován byl také polymorfismus rs11209026 v genu pro IL-23R. Asociaci polymorfismu rs11209026 v genu pro IL-23R s chronickou formou sarkoidózy prokázali Fischer *et al.* (2011) na německé populaci. Tento funkční polymorfismus vede k záměně aminokyseliny argininu za glutamin, čímž je narušen přenos signálu. Výskyt vzácné alely A v našem souboru pacientů odpovídá výskytu této alely v německé populaci (Fischer *et al.*, 2011). U 7,1 % pacientů s regresí byla přítomna vzácná alela A. Výskyt této alely byl u pacientů s progresí 6,3 %. Mezi podskupinou s regresí a progresí nebyly nalezeny rozdíly v alelických ani genotypových frekvencích, a tudíž ani tento marker není využitelný k předpovědi vývoje sarkoidózy.

Posledním kandidátním studovaným polymorfismem byl rs1040461 v genu *RAB23*. Asociace polymorfismu rs1040461 v genu *RAB23* se sarkoidózou se podařila identifikovat autorům Hofmann *et al.* (2011) na 381 německých pacientech. Přítomnost

polymorfismu vede ke změně v sekvenci proteinu a dochází k záměně aminokyseliny glycinu za serin. Dysfunkčnost genu *RAB23* může vést k narušení antibakteriální ochrany. V rámci testovaného souboru pacientů nebyly nalezeny rozdíly v alelických ani genotypových frekvencích mezi podskupinou s progresí a regresí. Frekvence minoritní alely T u pacientů s regresí byla 11,5 %. Frekvence této alely u pacientů s progresí byla 15,1 %. Hofmann *et al.* (2011) stanovili frekvenci této minoritní alely na 8 % u pacientů německého původu. Ani tento genetický marker není využitelný k prognózování pacientů.

Limitací této studie je relativně malý soubor pacientů. Důvodem je fakt, že sarkoidóza se řadí mezi vzácná onemocnění. Navíc u všech pacientů zařazených do studie musí být znám vývoj onemocnění po dvou letech. Situaci komplikuje skutečnost, že u více než poloviny pacientů dochází k regresi onemocnění a ústupu zdravotních komplikací, a proto po dvou letech už na kontroly často nepřichází. Bude tedy potřeba získané výsledky ověřit na větším počtu pacientů. Dále musíme mít na zřeteli, že sarkoidóza je řazena mezi polygenní onemocnění, tedy je ovlivněna působením většího počtu genů, ale účinky jednotlivých genů mohou být minimální.

K analýze genotypů byla využita technologie MassArray. Jedná se o novou techniku, která umožňuje rychlou a snadnou analýzu. Technika MassArray nevyžaduje velké množství DNA, v jedné reakci může být analyzováno až 36 různých variant DNA, technika je schopna analyzovat i vícealelické polymorfismy, má široké uplatnění (genotypizace, analýza somatických mutací, metylací, genové exprese) a jedná se o techniku, která splňuje požadavky na uplatnění v klinické diagnostice (Gabriel *et al.*, 2009; www.sequenom.cz). Další využívané techniky genotypizace jsou PCR-RFLP, PCR-SSP, PCR s detekcí v reálném čase nebo microarray techniky (Petřek, 2000). Tyto techniky jsou však ve srovnání s technologií MassArray časově a materiálově náročné, vyžadují použití většího množství DNA, neumožňují analýzu většího počtu variant DNA a jsou schopny analyzovat pouze bialelické polymorfismy.

V rámci testovaného souboru pacientů se sarkoidózou, u kterých byl znám vývoj onemocnění po dvou letech, se nepodařilo objevit žádné genetické markery, které by mohly být využity k predikci vývoje onemocnění a identifikaci pacientů, u kterých dochází k progresi onemocnění.

7 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byly s pomocí dostupných literárních zdrojů shrnuty poznatky týkající se sarkoidózy, polymorfismů asociovaných se sarkoidózou a technik genotypizace.

V rámci praktické části diplomové práce bylo testováno pět polymorfismů asociovaných se sarkoidózou. Cílem bylo nalézt genetické markery, které by umožnily předpovědět průběh sarkoidózy, a tak i identifikovat pacienty s progresí onemocnění. U těchto pacientů by tak mohl být včas zahájen nejvhodnější způsob léčby. K testování byla využita DNA izolovaná z periferní krve pacientů. Soubor pacientů byl tvořen ze 123 jedinců, u kterých byl znám vývoj onemocnění po dvou letech (regrese/progrese). Regrese (spontánní nebo po léčbě) byla pozorována u 49 jedinců. K progresi (zhoršení) onemocnění během 2 let sledování došlo u 74 pacientů.

Jednotlivé genotypy byly analyzovány s využitím techniky MassArray. Mezi výhody této technologie patří: rychlá a přesná analýza, široké využití (genotypizace, analýza somatických mutací, metylací, genové exprese), robustní metoda - splňuje požadavky na uplatnění v klinické diagnostice.

Prvním analyzovaným polymorfismem byl rs2076530 genu *BTNL2*. Přítomnost rizikové alely A u pacientů s regresí byla 68,8 %. Výskyt této alely u pacientů s progresí byl 64,2 %. Dále to byl polymorfismus rs1049550 genu *ANXA11*. U 31,5 % pacientů s regresí byla přítomna alela T. Frekvence této alely u pacientů s progresí byla 24,3 %. U polymorfismu rs916977 genu *HERC2* byla minoritní alela A přítomna v 18,1 % případů u pacientů s regresí. U pacientů s progresí byla frekvence této alely 14,6 %. Dalším studovaným polymorfismem byl rs11209026 v genu pro IL-23R. Výskyt vzácné alely A byl 7,1 % u pacientů s regresí a 6,3 % u pacientů s progresí. Posledním studovaným polymorfismem byl rs1040461 genu *RAB23*. Frekvence minoritní alely T u pacientů s regresí byla 11,5 %, u pacientů s progresí byla 15,1 %. Mezi podskupinami s progresí a regresí se nezdařilo nalézt signifikantní rozdíly v alelických frekvencích ani u jednoho z testovaných polymorfismů.

V rámci testovaného souboru pacientů se sarkoidózou se nepodařilo objevit žádné genetické markery, které by mohly být využity k identifikaci pacientů s progresí onemocnění.

8 SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
APC	antigen prezentující buňky
BAL	bronchoalveolární laváž
BHL	bilaterální hilová lymfadenopatie
C	cytosin
CRP	C-reaktivní protein
CCL5	chemokin (C-C motiv) ligand 5
CXCR3	chemokin (C-X-C motiv) receptor 3
CXCR6	chemokin (C-X-C motiv) receptor 6
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	thylendiamintetraacetát
G	guanin
HRCT	výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností
IL-12	cytokin, interleukin 12
IL-18	cytokin, interleukin 18
INF- γ	cytokin, interferon gamma
TNF- α	cytokin, tumor nekrotizující faktor
LINEs	dlouhé rozptýlené jaderné elementy
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR-RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
PCR-SSO	PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy
PCR-SSP	PCR se sekvenčně specifickými primery
GWAS	<i>genome-wide association studies</i>
SINEs	krátké rozptýlené jaderné elementy
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
T	tymin
TOF	<i>time of flight</i>

9 POUŽITÁ LITERATURA

- Adrianto, I., Lin, C.P., Hale, J.J., Levin, A.M., Datta, I., Parker, R., Adler, A., Kelly, J.A., Kaufman, K.M., Lessard, C.J., Moser, K.L., Kimberley, R.P., Harley, J.B., Iannuzzi, M.C., Rybicki, B.A., Montgomery, C.G. (2012): Genome-wide association study of African and European americans implicates multiple shared and ethnic specific loci in sarcoidosis susceptibility. *PLoS ONE* 7(8): e43907.
- American Thoracic Society, European Respiratory Society and World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (1999): Joint Statement on sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 160, 736-755.
- Anonymous (2013): MassArray. Publikováno online: <http://www.sequenom.com/Sites/Genetic-Analysis/MassARRAY-Analyzer-4>. Navštíveno 2. 5. 2013.
- Anonymous (2013): Real-time PCR. Publikováno online www.generibiotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr. Navštíveno 2. 5. 2013.
- Campbell, N.A., Reece, J.B. (2007): Biologie. Computer Press, Brno.
- Cerri, S., du Bois, R.M., Spagnolo, P. (2011): Genetic commonality between inflammatory bowel disease and sarcoidosis: the beginning of the end or the end of the beginning? *Eur Respir J.* 37 (3), 489-491.
- Costabel, U., Ohshimo, S., Guzman, J. (2009): Diagnostika sarkoidózy. *Curr Opin Pulm Med/CS* 6, 1-7.
- Fabrellas, E.F. (2007): Epidemiology of Sarcoidosis. *Arch Bronconeumol.* 43(2), 92-100.
- Ferenčík, M., Rovenský, J., Shoenfeld, Y., Mařha, V. (2005): Imunitní systém-informace pro každého. Grada Publishing a.s., Praha.
- Fischer, A., Nothnagel, M., Franke, A., Jacobs, G., Saadati, H.R., Gaede, K.I., Rosenstiel, P., Schürmann, M., Müller-Quernheim, J., Schreiber, S., Hofmann, S. (2011): Association of inflammatory bowel disease risk loci with sarcoidosis, and its acute and chronic subphenotypes. *Eur Respir J.* 37 (3), 610-616.

- Gabriel, S., Ziaugra, L., Tabbaa, D. (2009): SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr Protoc Hum Genet.*, 2.12.1-2.12.18.
- Hofmann, S., Franke, A., Fischer, A., Jacobs, G., Nothnagel, M., Gaede, K.I., Schürmann, M., Müller-Quernheim, J., Krawczak, M., Rosenstiel, P., Schreiber, S. (2008): Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. *Nat Genet.* 40 (9), 1103-1106.
- Hofmann, S., Fischer, A., Till, A., Müller-Quernheim, J., Häsler, R., Franke, A., Gäde, K.I., Schaarschmidt, H., Rosenstiel, P., Nebel, A., Schürmann, M., Nothnagel, M., Schreiber, S. (2011): A genome-wide association study reveals evidence of association with sarcoidosis at 6p12.1. *Eur Respir J.* 38 (5), 1127-1135.
- Hofmann, S., Fischer, A., Nothnagel, M., Jacobs, G., Schmid, B., Wittig, M., Franke, A., Gaede, K.I., Schürmann, M., Petrek, M., Mrazek, F., Pabst, S., Grohé, C., Grunewald, J., Ronninger, M., Eklund, A., Rosenstiel, P., Höhne, K., Zissel, G., Müller-Quernheim, J., Schreiber, S. (2013): Genome-wide association analysis reveals 12q13.3-q14.1 as new risk locus for sarcoidosis. *Eur Respir J.* 41 (4), 888-900.
- Keane, M.P., FitzGerald, M.X. (2012): Pulmonary sarcoidosis. *Medicine* 40 (6), 322-328.
- Kolek, V. (2006): Sarkoidóza. *POSTGRADUÁLNÍ MEDICÍNA* 6, 656.
- Kolek, V. (2007): Sarkoidóza - dosud nepoznána (1). *Interní Med.* 9 (6), 276-279.
- Kolek, V. (2007): Sarkoidóza - dosud nepoznána (2). *Interní Med.* 9 (7-8), 310-313.
- Lazarus, A. (2009): Sarcoidosis: Epidemiology, Etiology, Pathogenesis and Genetics. *Dis Mon.* 55 (11), 649-660.
- Lockstone, H.E., Sanderson, S., Kulakova, N., Baban, D., Leonard, A., Kok, W.L., McGovan, S., McMichael, A.J., Ho, L.P. (2010): Gene set analysis of lung samples provides insight into pathogenesis of progressive, fibrotic pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 181 (12), 1367-1375.

- Lošťáková, V., Kolek, V., Vašáková, M. (2011): Sarkoidóza - doporučený postup diagnostiky, terapie a sledování vývoje onemocnění. Publikováno online: <http://www.pneumologie.cz/odborne/doporucene-postupy.php>. Navštíveno 2. 5. 2013.
- Luisetti, M., Beretta, A., Casali, L. (2000): Genetic aspects in sarcoidosis. *Eur Respir J.* 16 (4), 768-780.
- Ma, Y., Gal, A., Koss, M.N. (2007): The pathology of pulmonary sarcoidosis: update. *Semin Diagn Pathol.* 24 (3), 150-161.
- Mačák, J., Mačáková, J., Dvořáčková, J. (2012): Patologie, 2. doplněné vydání. Grada Publishing a.s., Praha.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16 (3), 1215.
- Morais, A., Lima, B., Peixoto, M.J., Alves, H., Marques, A., Delgado, L. (2012): BTNL2 gene polymorphism associations with susceptibility and phenotype expression in sarcoidosis. *Respir Med.* 106 (12), 1771-1777.
- Morgenthau, A. S., Iannuzzi, M. C. (2011): Recent advances in sarcoidosis. *Chest.* 139 (1), 174–182.
- Mrázek, F., Štahelová, A., Kriegová, E., Fillerová, R., Žurková, M., Kolek, V., Petřek, M. (2011): Functional variant ANXA11 R230C: true marker of protection and candidate dinase modifier in sarcoidosis. *Genes Immun.* 12 (6), 490-494.
- Nunes, H., Bouvry, D., Soler, P., Valeyre, D. (2007): Sarcoidosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2, 46.
- Ortega, I.H., Gonzáles, L.L. (2011): Update thoracic sarcoidosis. *Radiología* 53 (5), 434-448.
- Petřek, M. (2000): Hlavní histokompatibilní komplex člověka (HLA) v klinické imunologii: nomenklatura a možnosti laboratorní diagnostiky. Publikováno online http://www.tigis.cz/images/stories/Alergie/2000/03/02_03_2000.pdf. Navštíveno 2. 5. 2013.
- Paulů, D. (2012): Expres vybraných cytokinů a signálních molekul u plicních onemocnění se zánětlivou složkou. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci na katedře Biochemie.

- Rosypal, S. a kolektiv (2003): Nový přehled biologie. Nakladatelství Scientia, spol. s r.o., Praha.
- Rybicki, B.A., Walewski, J.L., Maliarik, M.J., Kian, H., Iannuzzi, M.C (2005): The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites. *Am J Hum Genet.* 77 (3), 491–499.
- Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2009): Genetika. Masarykova univerzita, Brno.
- Spagnolo, P., du Bois, R.M. (2007): Genetics of sarcoidosis. *Clin Dermatol.* 25, 242-249.
- Stříž, I (2008): Proč a jak vznikají v plicích granulomy. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL.* Supplementum 2. Publikováno online: http://www.geum.org/pneumo/abst_08.htm. Navštíveno 2. 5. 2013.
- Šeda, O., Liška, F., Šedová, L. (2005): Aktuální genetika - Multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a genomiky. Publikováno online: <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/>. Navštíveno 4. 7. 2011.
- Tomíšková, M., Skříčková, J (2010) : Bronchoalveolární laváž - možnosti a rizika provedení, interpretace některých výsledků. *POSTGRADUÁLNÍ MEDICÍNA* 5, 36.