

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Expresse vybraných cytokinů a signálních  
molekul u plicních onemocnění se  
zánětlivou složkou**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Denisa Paulů</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Dr. Eva Kriegová</b>
Termín odevzdání práce:	23. 4. 2012

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Dr. Evy Kriegové za použití citované literatury.

V Olomouci dne 23. 4. 2012

Chtěla bych poděkovat své vedoucí diplomové práce Dr. Evě Kriegové za veškeré rady, připomínky a odborné vedení, které mi poskytla.

Děkuji také všem pracovníkům Laboratoře imunogenomiky a imunoproteomiky, Lékařská fakulta Palackého univerzity v Olomouci, za jejich ochotu kdykoliv poradit a pomoci, především Ing. Regině Fillerové a Mgr. Tereze Tománkové.

Práce vznikla za grantové podpory Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví IGA MZ ČR NT/11117 – 6 (Studium mediátorů fibrotizačních procesů u pacientů s difúzními plicními nemocemi a jejich aplikace v diagnostice) a Interní grantové agentury University Palackého IGA\_PU\_LF\_2012\_07 a IGA\_PU\_LF\_2010\_008.

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Bc. Denisa Paulů
Název práce	Expres vybraných cytokinů a signálních molekul u plicních onemocnění se zánětlivou složkou
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř imunogenomiky a imunoproteomiky, LF UP Olomouc
Vedoucí práce	Dr. Eva Kriegová
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	

Sarkoidóza patří mezi multisystémové zánětlivé onemocnění s neznámou příčinou. Toto onemocnění je typické Th1 imunitní odpovědí, přičemž důležitou roli v její patogenezi hrají imunitní buňky a cytokiny. Nedávné studie prokázaly také roli Th17 buněk v patogenezi sarkoidózy. Dosud je však velmi málo známo o molekulách účastnících se Th17 imunitní odpovědi u sarkoidózy a jejich klinických fenotypů. V první části diplomové práce byla proto zkoumána mRNA relativní exprese interleukinu (IL)-23 a jeho receptoru IL-23R v buňkách získaných bronchoalveolární laváží. Tyto molekuly by měly hrát důležitou roli ve směřování T-lymfocytů do fenotypu Th17 buněk a v jejich udržování a proliferaci. Soubor tvořilo sedmdesát čtyři pacientů s plicní sarkoidózou a sedmnáct kontrolních jedinců bez známek zánětu. Byla použita metoda kvantitativní reverzní transkripce-polymerázové řetězové reakce. Relativní exprese mRNA příslušných molekul byla hodnocena metodou druhé derivace s využitím PSBM2 jako referenčního genu a cDNA přepsané z lidské univerzální referenční RNA jako kalibrátoru. Naše studie prokázala zvýšenou mRNA expresi genu pro IL-23 ( $p=0,002$ ) i jeho receptoru IL-23R ( $p<0,0001$ ) u pacientů se sarkoidózou oproti kontrolním jedincům. Při srovnání pacientů dle klinického vývoje onemocnění po dvou letech jsme pozorovali zvýšenou mRNA expresi IL-23R u pacientů s progresí onemocnění oproti pacientům s regresí ( $p=0,02$ ). V druhé části diplomové práce byla studována možná souvislost mezi zvýšenou expresí IL-23R u pacientů s progresí a dvěma funkčními jednonukleotidovými polymorfismy v tomto genu. Genotypizace polymorfismů zkoumaného genu IL-23R byla provedena pomocí technologie MassArray a DNA byla získána z krve sto osmnácti pacientů, u kterých byl znám vývoj onemocnění po dvou letech. Alelické i genotypové frekvence běžné i vzácné alely se nelišily mezi skupinami pacientů, u kterých došlo k remisi a progresi onemocnění. V této práci jsme potvrdili zvýšenou expresi dvou klíčových molekul Th17 imunitní dráhy: IL-23 a IL-23R u plicní sarkoidózy. Expres IL-23R byla zvýšena u progredující formy onemocnění, neprokázali jsme však vliv studovaných funkčních polymorfismů na zvýšení mRNA exprese. Studium Th17 buněk a molekul asociovaných s Th17 imunitní odpovědí u sarkoidózy bude jistě předmětem dalšího výzkumu.

Klíčová slova	Sarkoidóza, interleukin 23, receptor pro interleukin 23, kvantitativní RT-PCR, genotypizace.
Počet stran	79
Počet příloh	0
Jazyk	Český

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname	Bc. Denisa Paulů
Title	Expression profiling of cytokines and signalling molecules in inflammatory lung diseases
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of immunogenomics and immunoproteomics
Supervisor	Dr. Eva Kriegová
The year of presentation	2012

**Abstract**

Sarcoidosis belongs among multisystemic inflammatory disease of unknown cause. This disease is typical for Th1 immune response. Important role in this phenotype play immune cells and cytokines. Recent studies have revealed the role of Th17 cells in sarcoidosis pathogenesis but there is limited information about molecules participating in Th17 immune response of sarcoidosis and its clinical phenotypes. In the first part of master thesis the relative expression of mRNA of interleukine IL-23 and its receptor IL-23R in cells obtained from bronchoalveolar lavage was studied. These molecules are suggested to play an important role in the development of T-lymphocytes into Th17 cell phenotypes, their maintenance and proliferation. The data were collected from 74 patients with lung sarcoidosis and 17 control subjects without inflammation. Quantitative reverse transcription – polymerase chain reaction was performed. The relative mRNA expression of studied molecules was quantified by second derivate method using PSMB2 as a reference gene and cDNA transcribed from human universal reference RNA as a calibrator. Our study revealed higher mRNA expression for IL-23 gene ( $p=0.002$ ) and its receptor IL-23R ( $p<0.0001$ ) in sarcoidosis patients when compared to control subjects. We observed higher IL-23R mRNA expression in patients after 2-year sarcoidosis with progression in comparison with regression ( $p=0.002$ ). The possible correlation between higher IL-23R expression in patients with progression and two functional single-nucleotide polymorphisms in this gene was studied in the second part of master thesis. Genotypization of IL-23R polymorphism was performed by MassArray technology. DNA was obtained from peripheral blood of 118 patients with 2-year sarcoidosis. The distribution of allele and genotype frequencies did not differ between our remitting and progressing patients. In conclusion we confirmed higher expression of two key molecules of Th17 immune pathway: IL-23 and IL-23R in lung sarcoidosis. The expression of IL-23R was higher in the progression form of disease, but we did not prove the influence of studied functional polymorphism on stimulation of the mRNA expression. The study of Th17 cells and molecules associated with Th17 immune responses in sarcoidosis will be the case of future studies.

Keywords	Sarcoidosis, interleukin 23, receptor for interleukin 23, real-time PCR, genotyping.
Number of pages	79
Number of appendices	0
Language	Czech

# Obsah

<b>1</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b>	<b>- 8 -</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>- 9 -</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>- 10 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Sarkoidóza</b>	<b>- 10 -</b>
<b>3.2</b>	<b>Historie sarkoidózy</b>	<b>- 11 -</b>
<b>3.3</b>	<b>Plicní forma sarkoidózy</b>	<b>- 12 -</b>
3.3.1	Epidemiologie	- 13 -
3.3.2	Etiologie	- 13 -
3.3.3	Patogeneze	- 14 -
3.3.3.1	Lymfocyty	- 14 -
3.3.3.1.1	Th17 lymfocyty	- 16 -
3.3.3.2	Interleukin 23 (IL-23) a jeho receptor (IL-23R)	- 18 -
<b>3.4</b>	<b>Diagnostické postupy u sarkoidózy</b>	<b>- 21 -</b>
3.4.1	Skiagram hrudníku	- 21 -
3.4.2	Funkční vyšetření plic	- 23 -
<b>3.5</b>	<b>Bronchoskopie a bronchoalveolární laváž</b>	<b>- 23 -</b>
3.5.1	Bronchoalveolární laváž (BAL)	- 23 -
<b>3.6</b>	<b>Genetika sarkoidózy</b>	<b>- 25 -</b>
3.6.1	Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs)	- 26 -
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>- 28 -</b>
<b>4.1</b>	<b>Chemikálie</b>	<b>- 28 -</b>
<b>4.2</b>	<b>Přístrojové vybavení</b>	<b>- 29 -</b>

<b>4.3</b>	<b>Metody</b>	<b>- 30 -</b>
4.3.1	Schéma experimentu	- 30 -
4.3.2	Izolace buněk z bronchoalveolární laváže (BAL)	- 30 -
4.3.3	Izolace RNA pomocí mirVana miRNA kitu	- 31 -
4.3.4	Reverzní transkripce	- 32 -
4.3.5	Kvantitativní PCR	- 34 -
4.3.5.1	Složení reakční směsi	- 35 -
4.3.5.2	Princip kvantitativní PCR	- 37 -
4.3.5.3	Příprava reakční směsi pro kvantitativní PCR	- 38 -
4.3.5.4	Vyhodnocení kvantitativní PCR	- 40 -
4.3.6	Izolace DNA z periferní krve	- 42 -
4.3.7	Měření koncentrace a čistoty vyizolované DNA	- 43 -
4.3.8	MassArray technologie	- 43 -
4.3.8.1	Příprava reakční směsi pro genotypizaci	- 43 -
4.3.8.2	Vyhodnocení polymorfismů	- 47 -
4.3.8.3	Výpočty frekvencí a statistika	- 47 -
<b>4.4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>- 49 -</b>
4.4.1	Soubor pacientů	- 49 -
4.4.2	Relativní mRNA exprese genu pro interleukin 23	- 50 -
4.4.3	Relativní mRNA exprese genu pro receptor pro interleukin 23 (IL-23R)	- 58 -
4.4.4	Genotypizace	- 64 -
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>- 68 -</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>- 72 -</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>- 73 -</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>- 79 -</b>

# 1 Cíle práce

- zpracování literární rešerše zabývající se tématy sarkoidóza a role imunitních buněk a klíčových cytokinů v její imunopatogenezi
- studium mRNA exprese genu pro interleukin 23 a jeho receptoru IL-23R pomocí kvantitativní RT-PCR v buňkách bronchoalveolární laváže u pacientů s plicní sarkoidózou
- porovnání exprese u podskupin pacientů dle klinického fenotypu (vývoj onemocnění po dvou letech, rentgenologické stádium, přítomnost akutní formy-Löfgrenův syndrom)
- genotypizace funkčních polymorfismů IL-23R u pacientů se sarkoidózou s různým klinickým průběhem nemoci a jejich asociace s mRNA expresí



## 2 Úvod

Sarkoidóza je řazena mezi multisystémové zánětlivé onemocnění s neznámou příčinou. Nejčastěji bývají postiženy plíce, ale setkáváme se i s mimoplicními projevy (játra, dýchací ústrojí, slezina, oči, kůže, nervová soustava a srdce). Při onemocnění se tvoří granulomy, proto se sarkoidóza řadí mezi granulomatózní choroby. Incidence se v různých populacích liší, především v závislosti na rase. V České Republice je incidence tohoto onemocnění 3,1 případů/100 000 obyvatel a prevalence okolo 70 případů/100 000 obyvatel.

Sarkoidóza je považována za typické Th1 imunitní onemocnění. V alveolitické fázi dochází k akumulaci T-lymfocytů a aktivovaných makrofágů a následně vzniku granulomů. Sarkoidóza je komplexní onemocnění, přičemž v imunopatogenezi hrají důležitou roli jak vnější faktory, tak i genetická predispozice. Nedávná studie prokázala, že v imunopatogenezi plicní sarkoidózy hraje roli i Th17 imunitní odpověď. Předpokládá se, že Th17 buňky se podílí na alveolitidě, tvorbě granulomů, ale zejména na progresi k závažnějším formám onemocnění. Dosud však nebyly popsány expresní profily klíčových molekul podílejících se na Th17 imunitní odpovědi u sarkoidózy a jejich klinických fenotypů.

Diplomová práce se zabývá studiem expresního profilu klíčových molekul, interleukinu (IL)-23 a jeho receptoru IL-23R, účastnících se Th17 imunitní odpovědi. Sledovali jsme expresní profily v buňkách získaných bronchoalveolární laváží u souboru pacientů se sarkoidózou. Kontrolní skupinu tvořili pacienti bez známek zánětu a s normálním buněčným profilem bronchoalveolární tekutiny. Dále jsme studovali rozdíly v expresních profilech u podskupin pacientů s různými klinickými fenotypy se zvláštním zaměřením na vývoj onemocnění po dvou letech. V druhé části studie jsme provedli genotypizaci dvou funkčních polymorfismů v genu pro IL-23R a sledovali jeho vliv na genovou expresi tohoto receptoru. Znalost molekul podílejících se na imunopatogenezi sarkoidózy a zejména na progresi k prognosticky horším formám by mohlo vést k návrhu nových léčebných přístupů.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Sarkoidóza

Sarkoidóza je multisystémové granulomatózní onemocnění s neznámou příčinou. Nejčastěji bývají postiženy plíce, ale s projevy sarkoidózy se můžeme setkat téměř v každé tkáni (dýchací ústrojí, slezina, oči, kůže, nervová soustava a srdce). V první fázi onemocnění dochází k akumulaci T-lymfocytů a aktivovaných makrofágů v postižených tkáních (Nunes *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2011, Kolek, 2007). V další fázi onemocnění se tvoří granulomy, což jsou ložiska v tkáni, v nichž dochází ke shluku buněk imunitního systému reagujících na neznámý podnět. Granulomy jsou velice malé a mohou být sledovány pouze pod mikroskopem (Kolek, 2007; Nunes *et al.*, 2007).

Projevy sarkoidózy nemusejí být zpočátku pozorovány, případně potom souvisejí přímo s místem postižení určité tkáně (orgánu). Nejvíce převažuje postižení dýchacího systému, konkrétně plic a nitrohručních uzlin. Sarkoidóza se vyskytuje častěji u žen, postihuje nemocné mladého a středního věku a především nekuřáky (Kolek, 2007; Nunes *et al.*, 2007).

Příznaky v plicích se nejprve projevují zvětšením plicních mízních uzlin. Tyto uzliny se nachází v místě vyústění trubicovitých průdušek do plic a jsou tak hluboko, že je nemůžeme nahmatat. Uzliny mohou dosáhnout poměrně velké velikosti a utlačit plíce. Člověk začne být dušný a má suchý kašel. Proces se poté přesune z uzlin do plic. K tomu nastoupí horečky a celková únava. Jsou to příznaky podobné atypickému zápalu plic (Lynch *et al.*, 2005).

Podle příznaků a délky onemocnění můžeme sarkoidózu rozdělit do tří forem. Asymptomatická forma sarkoidózy nemusí vyžadovat léčbu. Je to taková forma, kdy se postižení, nejčastěji nitrohručních lymfatických uzlin, nemusí klinicky projevit a jedná se o náhodný rentgenologický nález. Úplným opakem je forma s akutním průběhem a s příznaky infekčního onemocnění, tzv. Löfgrenův syndrom. Pacienti trpí horečkou, bolestmi v krku, bolestmi svalů a otoky kolem kotníků, na nohách se objeví kožní výsev zvaný nodózní erytém, dojde ke zvětšení nitrohručních uzlin a tuberkulinový test (sloužící k průkazu tuberkulózy) je negativní. Poslední průběhovou variantou sarkoidózy je chronická forma, za kterou je obvykle považován stav trvající alespoň dva roky, i když je často velmi obtížné stanovit počátek onemocnění. Průběh nemoci je pozvolný a přidávají se postižení i jiných orgánů. Onemocnění vyžaduje léčbu kortikoidy a prognóza je závažnější než u formy akutní (Kolek, 2007; Jansen *et al.*, 2005).

Podle rentgenologického nálezu je sarkoidóza dělena do čtyř stádií. V prvním

stádiu jsou postiženy pouze nitrohruční uzliny, které jsou nápadně a oboustranně zvětšeny. V druhém stádiu můžeme pozorovat stále zvětšené uzliny, ale méně než dříve, a jsou postiženy i plíce. Ve třetím stádiu jsou již postiženy pouze plíce a ve čtvrtém stádiu dojde ke vzniku fibrózy (nahrazování plicní tkáně vazivem). Mezi časté příznaky patří obvykle suchý kašel, dušnost, únava, někdy i nechutenství a ztráta váhy. Příznaky záleží na formě, kterou daný pacient prodělává (Lynch *et al.*, 2005).

Mezi další sarkoidózou postižené orgány mohou patřit dýchací ústrojí, slezina, oči, kůže, nervová soustava a srdce, ale v rámci své diplomové práce se budu zabývat pouze plicní sarkoidózou.

## 3.2 Historie sarkoidózy

V Anglii byly poprvé pozorovány příznaky sarkoidózy v roce 1869. Dělník, kterému bylo 58 let, navštívil lékaře J. Hutchinsona a stěžoval si na růžové skvrny na nohách, rukách a na obličeji (**Obr. 1**). Tento stav trval dva roky, přičemž pacient netrpěl bolestmi. Hutchinson nejdříve konstatoval, že potíže souvisí s onemocněním dna. Avšak objevilo se více pacientů s těmito příznaky a Hutchinson nazval toto onemocnění „forma kožního onemocnění, které doposud uniklo zvláštnímu uznání (Hutchinson, 1877; Sharma, 2005).



**Obrázek 1: J. Hutchinson a první pacient s kožním postižením** (převzato z Hutchinson, 1877).

Hutchinson navštívil v roce 1869 Oslo a sešel se s W. Bidekapem a C. W. Boeckem. Ti mu ukázali skupinu pacientů, v níž byl jeden muž, námořník, který měl stejné příznaky jako již zmíněný dělník v Anglii, ale netrpěl onemocněním dna. Boeck poprvé použil termín „sarkoid“, protože se onemocnění podobalo zhoubnému nádoru, který

však byl benigní. Těsně před svou smrtí Boeck publikoval článek o dvaceti čtyřech pacientech postižených sarkoidózou. Někteří nemocní měli i postižené plíce, spojivky, kosti, lymfatické uzliny, slezinu a nosní sliznici. To znamená, že choroba, která začala jako zvláštní kožní onemocnění v Londýně, se stala multisystémovým onemocněním v Oslu (Sharma, 2005).

J. Schaumann, švédský lékař, změnil termín maligní granulomy na benigní lymfatické granulomy (Sharma, 2005).

Další velice důležitou osobností v souvislosti se sarkoidózou byl S. Löfgren, který se narodil ve Stockholmu. Jeho studie ukázala, že s onemocněním může souviset zánět v podkoží a nespecifické onemocnění mízních uzlin. Společně s výsledkem z biopsie jater konstatoval, že se jedná o akutní formu sarkoidózy. Proto je dnes kombinace kožního postižení s postižením uzlin označováno jako Löfgrenův syndrom. Na první mezinárodní konferenci v Londýně, v roce 1958, tvrdil, že sarkoidóza není podobné onemocnění jako tuberkulóza a příčinou jsou viry. Také popsal sarkoidózu ledvin, biopsií prokázal granulomy a zjistil, že nemocní mají abnormální metabolismus vápníku (Sharma, 2005).

V roce 1960 byla uspořádána konference, jejímž místem konání byl Washington. Účastníci Chapman, Nelson, Michael, During a Siltzbach, který konferenci pořádal, zveřejnili souvislost angiotensinu konvertujícího enzymu se sarkoidózou. Enzym byl označen jako biochemický marker akutní sarkoidózy. Siltzbach také zavedl tzv. Kweimův test a potvrdil jeho účinnost ve své studii. Kweimův test, někdy také nazýván Kweimův-Siltzbachův test, byl popsán v roce 1941 a používal se pro diagnostiku sarkoidózy. Dalšími velice důležitými pokroky byly snímání pomocí gallia a analýza bronchoalveolární laváže (Sharma, 2005).

### **3.3 Plicní forma sarkoidózy**

U 90% pacientů postižených sarkoidózou dochází k postižení plic. Plicní forma sarkoidózy se dělí na asymptomatickou, akutní a chronickou. Chronický stav nastává, pokud onemocnění trvá alespoň dva roky, ale většinou je velice obtížné určit počáteční stádium nemoci. Během tohoto stavu je průběh nemoci pozvolný. Mezi objevující se příznaky patří dušnost, suchý kašel a bolesti na hrudníku. Poté mohou nastoupit i jiné orgánové příznaky. Onemocnění vyžaduje léčbu a prognóza je závažnější než u formy akutní (Kolek, 2007; Lynch *et al.*, 2005).

Akutní forma je charakteristická tzv. Löfgrenovým syndromem (LS). LS se častěji vyskytuje u žen a projevuje se zvětšením mízních uzlin v oblasti plicních hilů (místa

na vnitřní straně plic, kudy do plic vstupují průdušky a cévy) a objevením se kulatých zarudlých skvrn na kůži. Pacient může trpět horečkami, bolestmi v krku a svalů a otoky kolem kotníků. Diagnóza syndromu se stanovuje na základě kožního vyšetření, rentgenu plic a negativního tuberkulinového testu (Lynch *et al.*, 2005; Kolek, 2007; Nunes *et al.*, 2007; Jansen *et al.*, 2005).

### 3.3.1 Epidemiologie

Sarkoidóza se vyskytuje celosvětově. Je to onemocnění, které postihuje obě pohlaví, všechny rasy, všechny věkové skupiny a nejčastěji dospělé ženy mladší čtyřicet let. Vrchol výskytu je patrný mezi dvaceti až padesáti osmi lety života. Dědičná predispozice se vyskytuje asi u 4 % případů. Mezi nemocnými je pouze velice malé procento kuřáků.

Sarkoidóza je řazena jako druhé nejčastější intersticiální plicní onemocnění. Incidence (počet nově vzniklých případů dané nemoci ve vybrané populaci za určité časové období) se v různých populacích liší, především v závislosti na rase. Vyšší incidence je zaznamenána v severských zemích (až 14/100 000 obyvatel ve Švédsku), nižší incidence je v USA (6,3/100 000; Thomeer *et al.*, 2005). Ve Velké Británii a Japonsku je incidence 3/100 000 (Thomeer *et al.*, 2005). Nižší výskyt v tropických zemích je spojován s vyšším výskytem tuberkulózy. V České Republice je incidence 3,1/100 000 (Kolek, 2007). K poklesu došlo, když byla zrušena preventivní skiografie, neboť přestala být detekována I. stádia nemoci. Prevalence (udává poměr počtu všech existujících případů daného onemocnění k počtu obyvatel v dané lokalitě ve sledovaném časovém období) sarkoidózy klesá mezi 6-213/100 000 obyvatel a je také závislá na rase a pohlaví. U nás je prevalence přes 70/100 000 obyvatel (Kolek, 2007).

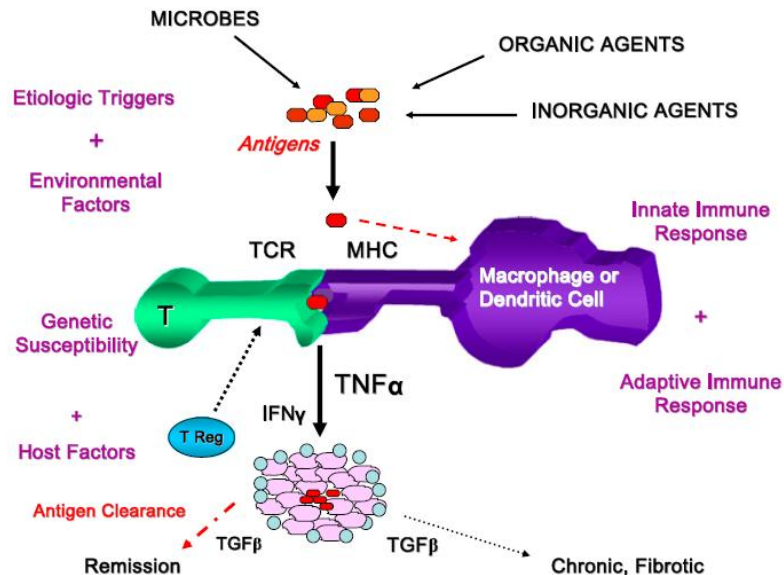
### 3.3.2 Etiologie

Etiologie sarkoidózy je dosud neznámá. Mezi kandidátní vyvolávací agens řadíme bakterie, organické nebo anorganické látky, které mohou spouštět sarkoidózu u geneticky predisponovaných jedinců (**Obr. 2**).

Mezi možné příčiny a spouštěče mohou patřit:

- bakterie – *Mycobacterium tuberculosis*, *Propionibacterium acnes*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma*, virus Epstein-Barrové, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Rickettsia helvetica*

- organické látky – borovicový pyl, škrob
- anorganické látky – hliník, křemík, zirkonium, minerální vlákna, silikon, jíl (Newman 2005; Kolek, 2007).



**Obrázek 2: Příčiny vzniku sarkoidózy.** Příčiny vzniku sarkoidózy nejsou dosud objasněné. Předpokládá se, že bakterie, organické nebo anorganické látky mohou spouštět sarkoidózu u geneticky predisponovaných jedinců. Antigen je prezentován na povrchu buněk a kaskádou reakcí dochází k tvorbě prozánětlivých cytokinů (převzato z Morgenthau *et al.*, 2011).

Sarkoidóza je onemocnění typické Th1 imunitní reakcí s charakteristickou akumulací CD4<sup>+</sup> Th1 T-lymfocytů a aktivovaných makrofágů v místě postižení. Zánětlivé buňky exprimují cytokiny: IL-12 (Moller *et al.*, 1996), IL-18 (Shigehara *et al.*, 2000), interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ; Robinson *et al.*, 1985), tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ; Spatafora *et al.*, 1989) a chemokiny: CCL5 (Petřek *et al.*, 2000), CXCR3 (Lewis *et al.*, 2003), CXCR6 (Agostini *et al.*, 2005) a jejich receptory. Současný výzkum také poukazuje na důležitou roli Th17 buněk v rozvoji granulomatózní a alveolitické fáze onemocnění a také v progresi onemocnění k fibróze (Fischer *et al.*, 2011, Facco *et al.*, 2011).

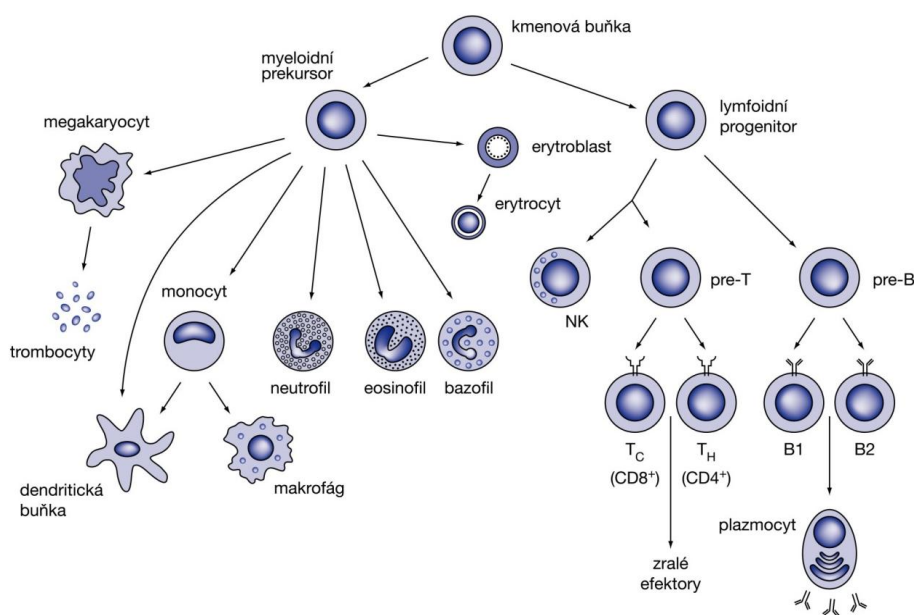
### 3.3.3 Patogeneze

#### 3.3.3.1 Lymfocyty

Dvě základní linie pro vývoj buněk, myeloidní a lymfoidní, vznikají z kmenové buňky. Myeloidní linie dává vzniku monocytům a třem druhům granulocytů: neutrofilů,

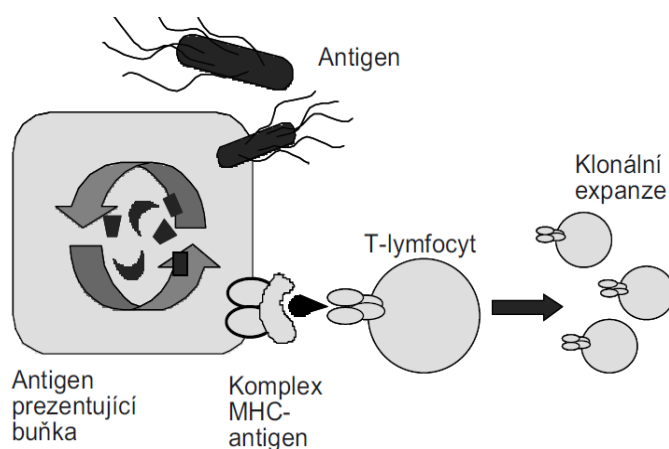
eozinofily a bazofily. Do této vývojové řady patří také dendritické buňky. NK (přirozeně cytotoxické) buňky, lymfocyty B a T se diferencují z lymfoidní linie. B-lymfocyty se vyvíjejí u lidí v kostní dřeni a vývoj je dokončen po setkání s antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech (uzliny, slezina, Payerovy plaky). Plazmatické buňky, které produkují protilátky, jsou konečným diferenciačním stádiem B-lymfocytů. Z monocytů vznikají makrofágy, které jsou schopné fagocytózy a hrají důležitou roli u sarkoidózy. K obnově populace makrofágů v plicích dochází přísunem monocytů z periferní krve (Hořejší *et al.*, 2010).

Hlavní část vývoje T-lymfocytů probíhá v brzlíku, ale některé subpopulace se mohou diferencovat mimo brzlík. V brzlíku vznikají dvě hlavní fenotypicky odlišné subpopulace a označují se jako prekurzory pomocných T buněk (Th, **Obr. 3**) a prekurzory cytotoxických T buněk (Tc). Th buňky mají na svém povrchu receptor zvaný CD4+ a Tc buňky mají místo receptoru CD4+ receptor CD8+. Cytotoxické lymfocyty ničí buňky vlastního těla, které jim prezentují cizorodý antigen a tím brání rozšiřování infekce. Pomocné lymfocyty produkují řadu cytokinů, což jsou proteiny sekretované leukocyty a jinými buňkami, které působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj (Hořejší *et al.*, 2009). Cytokiny stimulují další buňky k zásahu proti patogenu. Reakce organismu na přítomnost antigenu je vždy souborem dílčích reakcí a výsledkem vzájemných interakcí mezi jednotlivými buňkami imunitního systému (Vácha *et al.*, 2010; Hořejší *et al.*, 2009; Jílek, 2005).



**Obrázek 3: Vývoj buněk** (převzato z Hořejší *et al.*, 2009).

T-lymfocyty nejsou schopny reagovat s antigenem přímo jako B-lymfocyty a ke své stimulaci potřebují tzv. antigen prezentující buňky (APC). APC jsou buňky vlastního těla, především makrofágy, dendritické buňky a B-lymfocyty, které jsou schopné fagocytózy. Hlavní funkcí APC je rozklad částic, které pohltní ze svého okolí, na krátké polypeptidické sekvence. Důležitou součástí APC jsou MHC molekuly (major histocompatibility complex), které se vyskytují na jejich membránách. MHC molekuly jsou unikátní bílkovinné struktury přítomné na povrchu všech jaderných buněk organismu. Komplex tvořený MHC, antigenem a APC buňkou je schopen aktivovat příslušný T-lymfocyt (**Obr. 4**, Vácha *et al.*, 2010).



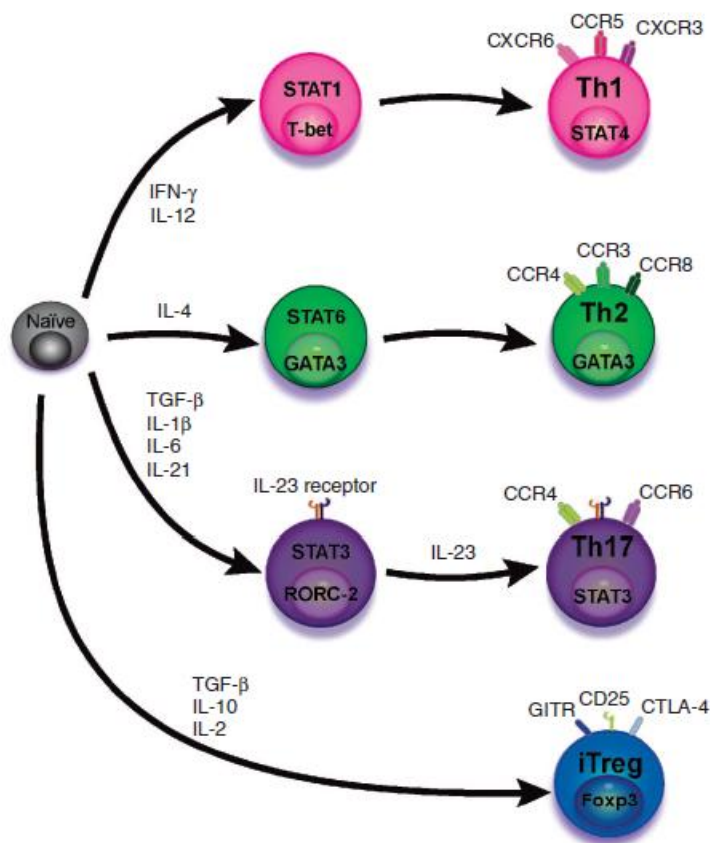
**Obrázek 4: Stimulace T lymfocytu.** Antigen je fagocytován APC buňkou, rozložen a jeho část se naváže na MHC protein. Celý komplex specificky stimuluje T-lymfocyt, který se dělí a produkuje cytokiny (převzato z Vácha *et al.*, 2010).

### 3.3.3.1.1 Th17 lymfocyty

V roce 1986 byly poprvé popsány dvě skupiny pomocných T-lymfocytů, a to Th1 a Th2 buňky (Mosmann *et al.*, 1986). Každá skupina těchto T-lymfocytů je charakteristická sekrecí specifických cytokinů. Th1 lymfocyty produkují IL-2, INF $\gamma$  a TNF $\beta$  a jsou důležité zejména v zásahu proti intracelulárním patogenům, např. virům a bakteriím. Vznik Th1 buněk je závislý na přítomnosti IL-12 a transkripčního faktoru T-bet (Cesare *et al.*, 2009). Druhou skupinou jsou Th2 lymfocyty sekretující IL-4, 5 a 13 a hrají důležitou roli v imunitní odpovědi proti parazitům, pomáhají aktivovat B-lymfocyty a vznikají při alergické odpovědi (Mosmann *et al.*, 1996; Boniface *et al.*, 2008; **Obr. 5**). Regulátory Th2 buněk jsou IL-4 a transkripční faktor GATA3 (Cesare *et al.*, 2009). Mezi další důležité skupiny T-lymfocytů patří Treg a Th17 lymfocyty. Treg buňky mají za úkol potlačovat imunitní reakce a skupina Th17 lymfocytů bude popsána podrobněji.



Fenotypická skupina T-lymfocytů produkujících IL-17 se nazývá Th17 a podporuje akutní zánět. V roce 1995 bylo poprvé publikováno, že Th lymfocyty jsou schopné produkovat tento interleukin, jehož původní název byl CTLA8 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 8; Rouvier *et al.*, 1993). Bylo také dokázáno, že tvorba IL-17 probíhá nezávisle na pomocných Th1 a Th2 lymfocytech (Yao *et al.*, 1995; **Obr. 5**).

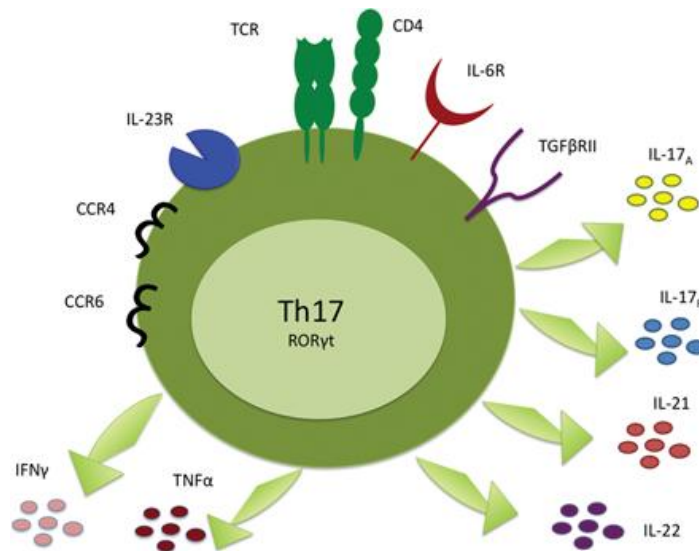


**Obrázek 5: Diferenciace naivních CD4+ buněk do fenotypu Th17 za přítomnosti aktivátorů TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1, IL-21, ROR $\gamma$ T, STAT3 a IL-23 (převzato z Cesare *et al.*, 2009).**

Transkripční faktory, které jsou nutné pro vývoj Th17 buněk, se nazývají ROR $\gamma$ T (retinoic orphan receptor  $\gamma$ T) a STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3; Ivanov *et al.*, 2007a; Judson *et al.*, 2011). Na svém povrchu buňky exprimují receptor pro transformační růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ R), receptor pro IL-6, IL-23, IL-21 a také chemokinové receptory CCR4 a CCR6 (Lane *et al.*, 2010; **Obr. 6**).

Vznik Th17 buněk je rovněž závislý na přítomnosti řady cytokinů, např. transformačního růstového faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a IL-6 (Mangan *et al.*, 2006; Ivanov *et al.*, 2007b). Společně s transkripčním faktorem STAT3 indukují expresi IL-21, který je potřebný pro diferenciaci buněk do fenotypu Th17. Kaskáda reakcí dále vyžaduje tran-

skripční faktory STAT3 a ROR $\gamma$ T, které stimulují expresi receptoru pro IL-23. TGF- $\beta$  je uvolňován dendritickými buňkami, makrofágy a Treg buňkami a společně s IL-23 zesiluje expresi ROR $\gamma$ T a produkci IL-17 (Akdis *et al.*, 2011). Diferenciace do fenotypů Th1 a Th2 je díky tomuto růstovému faktoru inhibována a je podpořen vznik Th17 buněk a uvolnění prozánětlivých cytokinů.



**Obrázek 6: Schematické znázornění Th17 lymfocytů: důležité receptory na povrchu Th17 buněk, transkripční faktor ROR $\gamma$ T a produkované cytokiny Th17 buňkami (převzato z Lane *et al.*, 2010).**

### 3.3.3.2 Interleukin 23 (IL-23) a jeho receptor (IL-23R)

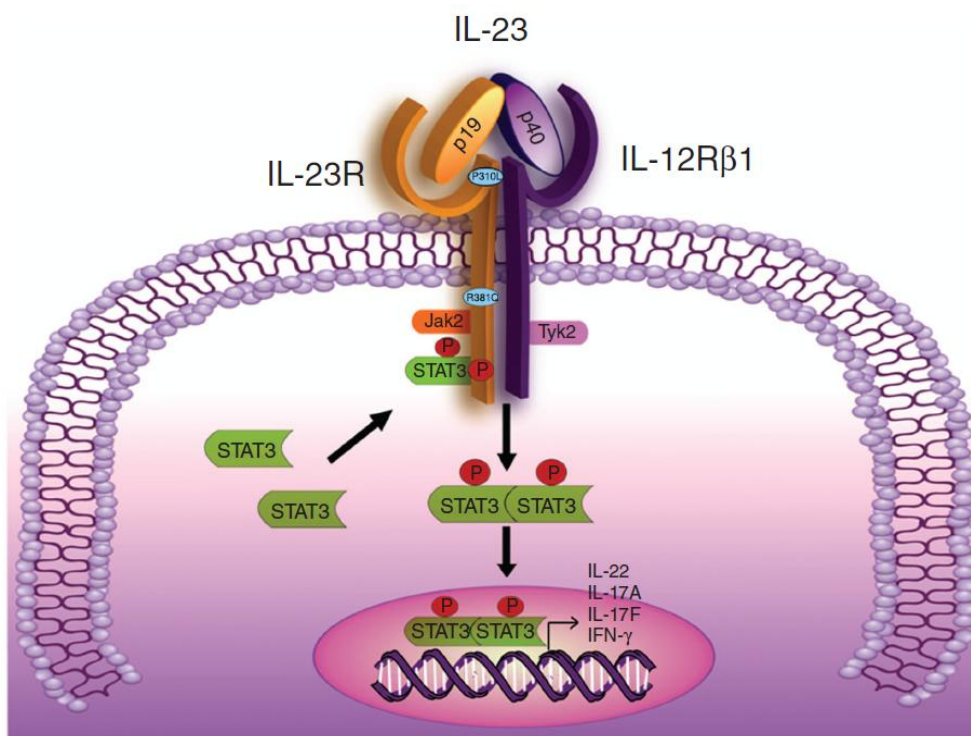
Interleukiny patří do skupiny cytokinů, které se podílejí na regulaci imunitních dějů. Z biochemického hlediska jsou to proteiny a řadíme je do několika skupin neboli rodin. Interleukiny jsou látky produkované leukocyty, ale i dalšími buňkami jako např. makrofágy, B a T-lymfocyty, dendritickými buňkami, které regulují jejich vzájemné interakce (Hořejší *et al.*, 2009).

IL-23 byl objeven v roce 2000 (Oppmann *et al.*, 2000) a patří do rodiny interleukinů číslo 12. Nejdříve byl identifikován nový protein IL-23p19, který neměl žádnou biologickou aktivitu. Bylo zjištěno, že pokud je protein ve spojení s podjednotkou IL-12p40 pomocí disulfidických můstků, vytváří aktivní heterodimerní cytokin, který byl nazván IL-23. Tento interleukin je exprimován u myši, u lidských monocytů, makrofágů, dendritických buněk, T buněk, B buněk a endoteliálních buněk v periférních tkáních (kůže, plíce a střevní sliznice; Oppmann *et al.*, 2000, Pirhonen *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2011). Díky IL-23 mohou Th17 buňky přežívat a fungovat (Cesare *et al.*, 2009).

IL-23 je tvořen podjednotkou IL-23p19, která má molekulovou hmotnost 19 000 a podjednotkou IL-12p40 s molekulovou hmotností 40 000. IL-23p19 podjednotka je produkována APC buňkami, T buňkami a endoteliálními buňkami. Její gen je umístěn na dvanáctém chromozomu a skládá se ze čtyř exonů a tří intronů. Tvorba podjednotky IL-12p40 je řízena pouze APC buňkami, mezi něž patří monocyty, makrofágy a dendritické buňky a obsahuje osm exonů a sedm intronů a její kódující gen je na prvním chromozomu (Tang *et al.*, 2011). Uspořádání podjednotek do aktivního komplexu IL-23 vyžaduje syntézu obou částí v rámci jedné buňky (Vosse *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2004). IL-23 se společně s IL-12 váže na IL-12R $\beta$ 1 receptor T buněk a NK buněk přes IL-12p40 podjednotku. Podjednotka IL-12p40 je tedy sdílená společně s IL-12 (Torti *et al.*, 2007).

IL-23 se váže na receptorový komplex skládající se z IL-12R $\beta$ 1 a IL-23R podjednotek (Parham *et al.*, 2002, **Obr. 7**). Podjednotka IL-23R, která váže IL-23p19, se skládá z extracelulární N-terminální domény a dvou cytokinových receptorových domén. Druhá podjednotka IL12R $\beta$ 1 obsahuje tři membránově-proximální domény fibronektinového typu III a dvě cytokinové receptorové domény, které interagují s IL-12/IL-23p40 (Vosse *et al.*, 2003). Obě podjednotky mají extracelulární vazebnou doménu, transmembránovou doménu a cytoplazmatickou (intracelulární) doménu, která obsahuje dvě oblasti, na které se vážou protein-tyrosinové kinasy Jak (Janus kinase) rodiny (Bacon *et al.*, 1995; Gubler *et al.*, 1996). Po agregaci receptoru vyvolané vazbou ligandu se tyto kinasy začnou vzájemně fosforylovat a tím aktivovat. Poté aktivované kinasy fosforylují cytoplazmatické proteiny zvané STAT, které dimerizují a přecházejí do jádra, kde působí jako transkripční faktory.

Po nasednutí ligandu (cytokinu) IL-23 na receptor dojde tedy k aktivaci Jak-STAT (Janus kinase – signal transducer and activator of transcription) dráhy. Obě podjednotky, IL-12R $\beta$ 1 a IL-23R, postrádají vnitřní signální aktivitu, a proto jsou propojeny s vnitrobuněčnými proteiny, aby mohla být spuštěna signální dráha. IL-23R $\beta$ 1 se váže na proteiny rodiny Jak nazývané Tyk2, zatímco IL-23R se spojuje s Jak2 (Zou *et al.*, 1997, Parham *et al.*, 2002). Jak2 fosforyluje tyrosinové zbytky umístěné na vnitřních doménách receptorových podjednotek. Tyto fosforylované zbytky slouží k přenosu signálu a aktivaci transkripčních molekul (STAT3), které se také fosforylují. Fosforylované STAT3 proteiny dimerizují a přesouvají se do jádra, aby došlo k transkripci určitých cytokinů jako IL17A, IL17F, IL22 a INF $\gamma$ . STAT3 hraje hlavní roli v signální dráze interleukinu 23 (**Obr. 7**; Cesare *et al.*, 2009).



**Obrázek 7: Signální dráha IL-23.** IL-23 je heterodimerní cytokin skládající se z podjednotek p19 a p40. Tyto podjednotky se vážou na receptorový komplex IL-23R obsahující podjednotky IL-12Rβ1 a IL-23R, které jsou spojeny s proteiny Jak rodiny, Tyk2 a Jak2. Dojde k přenosu signálu a k transkripci cytokinů (převzato z Cesare *et al.*, 2009).

## 3.4 Diagnostické postupy u sarkoidózy

Při stanovení diagnózy záleží na klinickém obrazu, histologickém průkazu granulomů a současném vyloučení jiných onemocnění s podobným klinickým i histologickým obrazem. Je důležité potvrdit diagnózu, stanovit rozsah orgánového postižení a posoudit aktivitu onemocnění.

### 3.4.1 Skiagram hrudníku

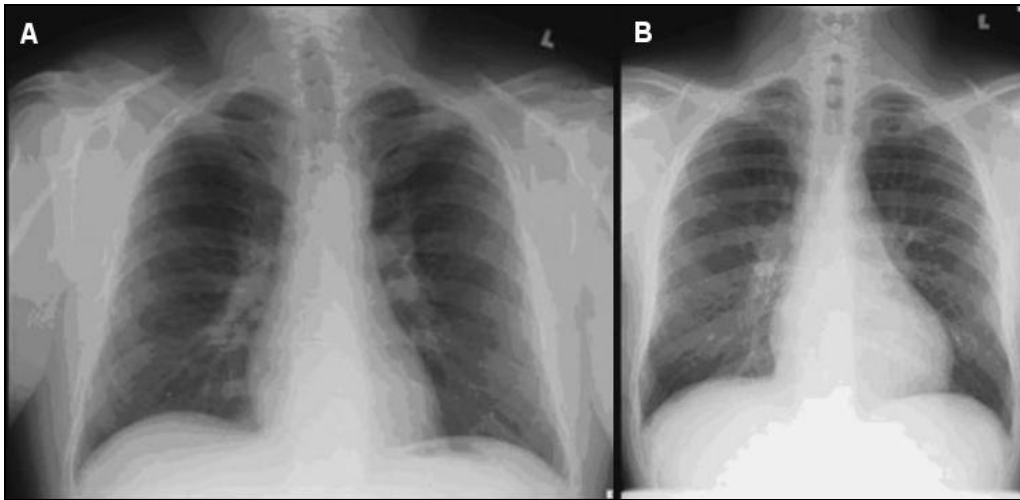
Základním vyšetřením nejenom pro určení diagnózy, ale i stádia nemoci, je skiagram hrudníku. Podle nálezu na skiagramu řadíme nemocné do čtyř stádií (**Tab. 1**)

**Tabulka 1: RTG stádia u plicní sarkoidózy**

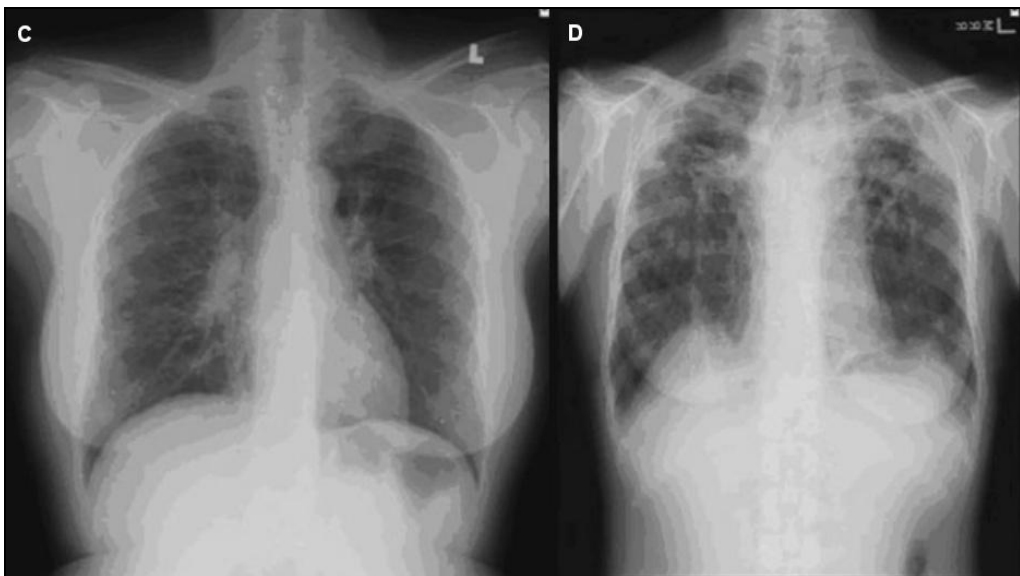
RTG stádium	forma postižení	procentuální zastoupení výskytu
<b>I</b>	postižení nitrohručních uzlin	50%
<b>II</b>	postižení nitrohručních uzlin a plic	25-30%
<b>III</b>	postižení plic	10-12%
<b>IV</b>	plicní fibróza	5%

**Stádium I:** Stádium I je označováno jako bilaterální hilová lymfadenopatie (zvětšení lymfatických uzlin) a spočívá v symetrickém zvětšení hilových lymfatických uzlin o průměru až 3 cm. Na skiagramu jsou patrné lymfatické uzliny. Při přechodu do chronické formy se někdy objevují kalcifikace uzlin, které mohou mít i skořápkovitý charakter. Asymetrické nebo jednostranné postižení lymfatických uzlin není tak časté (**Obr. 8**; Kolek, 2007; Lynch *et al.*, 2005).

**Stádium II:** Při této fázi postižení přetrvává bilaterální hilová lymfadenopatie, navíc však dochází k postižení plicního parenchymu (**Obr. 8**). Obvykle se jedná o symetrickou tvorbu granulomů. Vyskytuje se velké množství drobných ložisek o velikosti do 2 mm, ale mohou se také objevovat i menší infiltráty nebo uzly nad 5 mm. Když dochází ke změnám v plicním parenchymu a k postupnému zmenšování zvětšených mízních uzlin, můžeme někdy zaznamenat přechod ze stádia I do stádia II. Hovoří se o „útěku do plic“ (Kolek, 2007; Lynch *et al.*, 2005).



**Obrázek 8: Zobrazení stádia I (A - bilaterální hilová lymfadenopatie) a II (B - bilaterální hilová lymfadenopatie a plíce s infiltráty, převzato z Lynch *et al.*, 2005).**



**Obrázek 9: Zobrazení stádia III (postižení plicního parenchymu) a IV (fibróza, Lynch *et al.*, 2005).**

**Stádium III:** Typické pro toto stádium jsou změny v plicním parenchymu, bez výraznějších fibrózních změn. Na skiagramu hrudníku nejsou známky zvětšení lymfatických uzlin (**Obr. 9**; Lynch *et al.*, 2005).

**Stádium IV:** Změny v plicním parenchymu mají charakter plicní fibrózy. Dochází k rozšíření mediastina (prostor v hrudní dutině mezi pravou a levou plící), tvorbě bul, splývavých zastínění a průdušky jsou abnormálně rozšířeny (**Obr. 9**; Kolek, 2007; Lynch *et al.*, 2005).

U 5-15% případů se setkáváme s tzv. mimoplicní formou sarkoidózy (Kolek, 2007; Lynch *et al.*, 2005).

Mezi další zobrazovací vyšetřovací metody patří výpočetní tomografie, sonografické vyšetření a magnetická rezonance. Výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností (high resolution computed tomography – HRCT) představuje jedno z rozhodujících vyšetření při plicní lokalizaci sarkoidózy. Toto vyšetření umožňuje s vysokou pravděpodobností posouzení aktivity a také rozlišení stádií III a IV. Pomocí HRCT můžeme zobrazit všechny uzliny v mediastinu, z nichž některé nejsou patrné na skiagramu hrudníku. Reverzibilním projevem v plicním parenchymu jsou nodulace (granulomy), uložené hlavně podél lymfatických cév (Kolek, 2007; Lynch *et al.*, 2005). Sonografické vyšetření může být využíváno k ověření zvětšení a lokalizaci krčních lymfatických uzlin. Dále může být vyšetřováno břicho (např. postižení parenchymu ledvin sarkoidózou). Vyšetření pomocí magnetické rezonance se využívá především při podezření na neurosarkoidózu (mozek, mícha, optický nerv) a umožňuje přesnější posouzení sarkoidózy pohybového ústrojí, např. postižení kostí, kloubů a svalů (Kolek 2007).

### **3.4.2 Funkční vyšetření plic**

Do této skupiny řadíme vyšetření difúzní kapacity plic a plicní ventilace. Vyšetření difúzní kapacity plic patří mezi nejcitlivější klinicky využívanou vyšetřovací metodu pro posouzení funkčního postižení u sarkoidózy. Až u 60 % pacientů se nachází snížení plicní difúze a to včetně stádia I (Kolek, 2007).

Vyšetření plicní ventilace zobrazuje restriční poruchu se snížením vitální kapacity. I při poměrně rozsáhlém radiologickém nálezu však nemusí k tomuto snížení nutně dojít. U stádia I většinou nedochází ke změně vitální kapacity. U stádií II, III a IV bývá snížena až v 70 % případech (Kolek 2007).

## **3.5 Bronchoskopie a bronchoalveolární laváž**

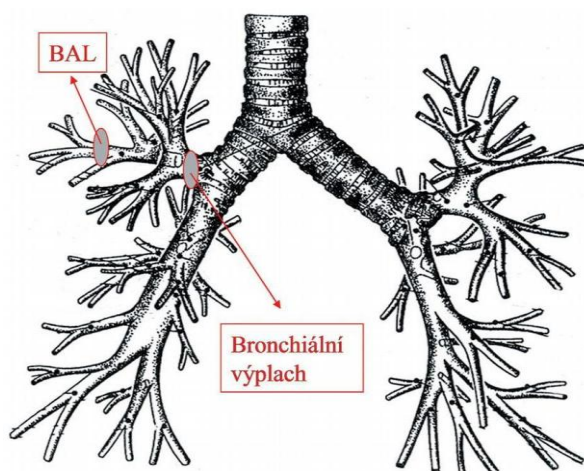
### **3.5.1 Bronchoalveolární laváž (BAL)**

Bronchoalveolární laváž je velice důležitým biologickým materiálem, který odráží veškeré děje v plicích. U některých pacientů může být bronchoskopický nález na sliznicích zcela normální, ale velice často se v hlavních bronších nacházejí nažloutlé uzlíky na bronchiální sliznici – granulomy.

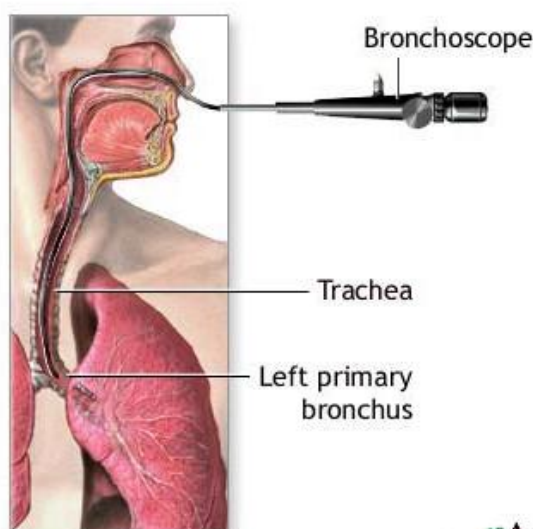
BAL je materiálem pro analýzu buněčného obsahu dolních dýchacích cest a alveolů, vyšetření nebuněčných složek má pouze výzkumný význam. Jedná se o metodu

nenáročnou, šetrnou, bezpečnou a opakovatelnou, proto je provedení BAL často vhodné pro posouzení aktivity onemocnění a určení odpovědi na léčbu. Všeobecnou indikací jsou intersticiální nebo difúzní plicní procesy.

Odběr se provádí většinou ze středního laloku nebo linguly (část levého plicního horního laloku) a provádí se nejčastěji na bronchoskopickém sálku (**Obr. 10**). Vyšetření se provádí bronchoskopem (**Obr. 11**) a výplachovou tekutinou je 100-300 ml fyziologického roztoku (0,9% roztok NaCl), který je zahřátý na 37 °C. Bal se provádí z té oblasti bronchiálního stromu, která ventiluje nejvíce postiženou oblast plic (Skříčková a Kolaříková).



**Obrázek 10: Lokalizace provedení BAL a bronchiálního výplachu** (převzato z <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/bronchoalveolarni-lavaz-moznosti-a-rizika-provedeni-interpretace-nekterych-vysledku-455842>).



ADAM.

**Obrázek 11: Schematické provedení bronchoskopického vyšetření** (převzato z <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/9138.htm>).



U všech stádií sarkoidózy, včetně asymptomatických forem, se nachází lymfocytární alveolitida (zánětlivé poškození plicních sklípků). V lavážní tekutině se obvykle vyskytuje 20-40% lymfocytů. Především převažují aktivované tzv. pomocné (helper) CD4+ T-lymfocyty nad cytotoxickými CD8+ T-lymfocyty. Imunoregulační index v bronchoalveolární tekutině je charakteristicky zvýšen a dosahuje hodnot 3,5 až 10. Zvýšení nad 6 se považuje za diagnostické. Snížení indexu však také nevylučuje sarkoidózu. Důležitým ukazatelem je vyšší hodnota TNF $\alpha$  v bronchoalveolární tekutině. U vyšších stádií III a IV s přechodem do fibrózy je navíc mírné až střední zastoupení neutrofilů. Z bronchoalveolární tekutiny lze vyšetřovat řadu dalších imunologických parametrů, které informují o patogenezi nemoci (Kolek, 2007; Bajčiová, 2008; Costabel *et al.*, 2005).

Diagnóza sarkoidózy by měla být podpořena histopatologickým vyšetřením. Tkáň k vyšetření se snažíme získat co nejméně invazivním způsobem. Při poškození plicního parenchymu je preferována transbronchiální biopsie, která se provádí bronchoskopickou cestou. Riziko komplikací je velice nízké a pozitivní výsledky bývají i u stádia I. Při odběru čtyř až šesti vzorků lze nalézt granulom u 40% až 90% pacientů (Kolek, 2007; Lynch *et al.*, 2005).

Sarkoidóza je zánětlivé onemocnění, u kterého zpravidla bývá v akutním stádiu zvýšená sedimentace erytrocytů a CRP (C-reaktivní bílkovina tvořená v játrech). Koncentrace těchto bílkovin začne v různé míře stoupat, když se v našem těle objeví zánětlivý proces. Další vyšetření, která potvrzují onemocnění, mohou být imunologické a laboratorní testy, mezi které patří vyšetření hypergamaglobulinémie (zvýšení hladiny imunoglobulinové frakce séra), hyperkalcinémie (nadměrné množství vápníku v krvi), hyperkalciurie (zvýšené vylučování vápníku močí), imunoregulační index CD4+/CD8+ T-lymfocytů, enzym konvertující angiotensin, tuberkulinový kožní test a Kveimův test (Kolek, 2007).

### 3.6 Genetika sarkoidózy

Sarkoidóza je řazena mezi komplexní onemocnění. Za jeho vznik odpovídají jak faktory vnější, tak i genetická predispozice. Epidemiologické studie jsou důkazem, že genetická predispozice hraje v imunopatogenezi onemocnění důležitou roli a podílí se na ní celá řada genů („multigenní“ onemocnění).

Mnoho výzkumů se v dnešní době zabývá studiem vnímavosti k sarkoidóze u Afroameričanů, kteří jsou více náchylní (až třikrát častěji) k tomuto onemocnění než jiné etnické skupiny (Rybicki *et al.*, 1997). Jeden z výzkumů prokázal spojitost mezi

vznikem onemocnění a alelami HLA-DQB1 v rodinách, kde se již sarkoidóza vyskytla. Výsledky ukázaly častější výskyt alely HLA-DQB1\*0602 v rodinách, kde byla sarkoidóza v minulosti zaznamenána. Naopak druhá varianta alely HLA-DQB1\*0201 se vyskytovala u těchto rodin méně než u rodin bez předchozího výskytu sarkoidózy (Iannuzzi *et al.*, 2003). K podobným závěrům dospěli i vědci při studiu nizozemských a britských pacientů. Alela HLA-DQB1\*0602 byla spojena s fibrózou a se stádiem II-IV. U mírného průběhu nemoci (stádium 0 nebo I) byla zaznamenána častěji alela HLA-DQB1\*0201 (Sato *et al.*, 2002).

V oblasti mezi geny HLA I. a II. třídy se nachází gen kódující butyrolin (BTNL2), u něhož byla prokázána spojitost mezi sarkoidózou a HLA oblastí. Polymorfismus rs2076530 se nachází ve funkční oblasti genu a způsobuje záměnu guaninu za adenin. Sestřihové místo se posune o čtyři báze dopředu a syntetizovaný protein postrádá na C konci imunoglobulinovou doménu (IgC) a transmembránovou helix. Náchyllost k sarkoidóze se díky tomuto polymorfismu zvýší, neboť dojde k absenci membránových proteinů ukotvených pomocí BTNL2 (Fischer *et al.*, 2011, Coudurier *et al.*, 2009).

Dalším polymorfismem ovlivňujícím vnímavost k sarkoidóze je nesynonymní polymorfismus v genu pro annexin A11 (rs1049550), u kterého dojde k záměně cytosinu za thymin (C>T, R230C). Poprvé byl popsán v asociaci se sarkoidózou u německé populace (Hofmann *et al.*, 2008). U českých pacientů byla frekvence alely T signifikantně snížena (35%) ve srovnání se zdravými kontrolami (42%, P=0,04; Mrázek *et al.*, 2011). Dále byla popsána celá řada polymorfismů podílejících se na modifikaci průběhu onemocnění, mezi něž patří např. HLA-DR3, HLA-B8 (Gardner *et al.*, 1984).

### 3.6.1 Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs)

Mezi nejčastější genetické variace v lidském genomu patří jednonukleotidové polymorfismy (SNP - single nucleotide polymorphism) a jsou asociovány s řadou imunitních nemocí. SNP vznikají záměnou jednoho nukleotidu v příslušné DNA sekvenci.

Polymorfismy se mohou vyskytovat v kódujících (exony) i v nekódujících oblastech (introny, regulační oblasti genu, negenová DNA). Pokud má daná genová varianta vliv na strukturu proteinů nebo jejich funkci, jedná se o funkční genový polymorfismus. Dále můžeme polymorfismy v kódující oblasti rozdělit na synonymní a nesynonymní. U skupiny synonymních polymorfismů nemá záměna nukleotidu vliv na sekvenci aminokyselin v polypeptidu (z důvodu degenerace genetického kódu). Druhým typem jsou polymorfismy nesynonymní, u kterých dochází ke změně kódované sekvence amino-

kyselin. Protein, který vznikne, může vykazovat kvalitativní nebo kvantitativní změnu funkce nebo může být nefunkční.

Každý gen se vyskytuje zpravidla alespoň ve dvou formách, které označujeme jako alely. Gen představuje určitý úsek molekuly DNA, proto se jednotlivé alely v tomto úseku budou lišit sekvencí nukleotidů (tedy primární strukturou). Může dojít ke kombinaci těchto alel a vzniká jedna ze tří možných kombinací (homozygot, heterozygot a dominantní homozygot), které určují tzv. genotyp. Jedná se tedy o konkrétní formu genomu jedince reprezentovanou určitou sestavou alel. Na základě porovnání genotypové a alelické frekvence ve skupinách pacientů a kontrolních jedinců bez známek zánětu se hodnotí vliv genetické varianty na vnímavost k nemoci. Můžeme tak určit, zda se v daném případě jedná o alelu predisponující k nemoci, alelu ochrannou nebo bez vlivu na onemocnění.

V rámci diplomové práce byly u sarkoidózy zkoumány dva funkční polymorfismy kandidátního genu pro receptor IL-23R. První z nich je nesynonymní polymorfismus rs11209026. U tohoto polymorfismu dojde k záměně guaninu za adenin (CGA>CAA), což vede v aminokyselinové sekvenci k záměně argininu za glutamin v pozici 381 v intracelulární doméně. R381Q vede k narušení přenosu signálu mezi transmembránovou doménou a místem vazby JAK2 na cytoplazmatické (intracelulární) doméně, a tím k nedostatečné fosforylaci STAT3 transkripčních faktorů. Důsledkem by tedy byla snížená hladina prozánětlivých cytokinů (IL-17A) vznikajících dráhou IL-23/Th17 (Pidasheva *et al.*, 2011). Do budoucna by mělo velký význam blokovat IL-23R a tím zabránit tvorbě prozánětlivých molekul, které se podílejí na vzniku daného onemocnění. Jedná se o kandidátní polymorfismus asociovaný s progresí sarkoidózy, popsany nedávno v celogenomové studii u německé populace (Fischer *et al.*, 2011).

Druhým sledovaným funkčním jednonukleotidovým polymorfismem u IL-23R byl rs10889677. Díky tomuto polymorfismu dojde k záměně cytosinu za adenin. Umístění tohoto SNP je v 3' oblasti (3'UTR, 309 bazí od stop kodónu) a obsahuje signál k polyadenylaci. Bylo zjištěno, že tento polymorfismus zvyšuje riziko Crohnovy choroby (Duerr *et al.*, 2006), ankylozující spondylitidy (Bechtěrevova nemoc – způsobuje záněty kloubů mezi obratli páteře; Brown, 2008) a ulcerózní kolitidy (Silverberg *et al.*, 2009). Další souvislost s tímto polymorfismem byla prokázána u rakoviny vaječnicků na čínské populaci; frekvence alely C byla významně zvýšena oproti zdravým jedincům (Zhu *et al.*, 2010). Tento polymorfismus dosud nebyl studován u plicní sarkoidózy.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Chemikálie

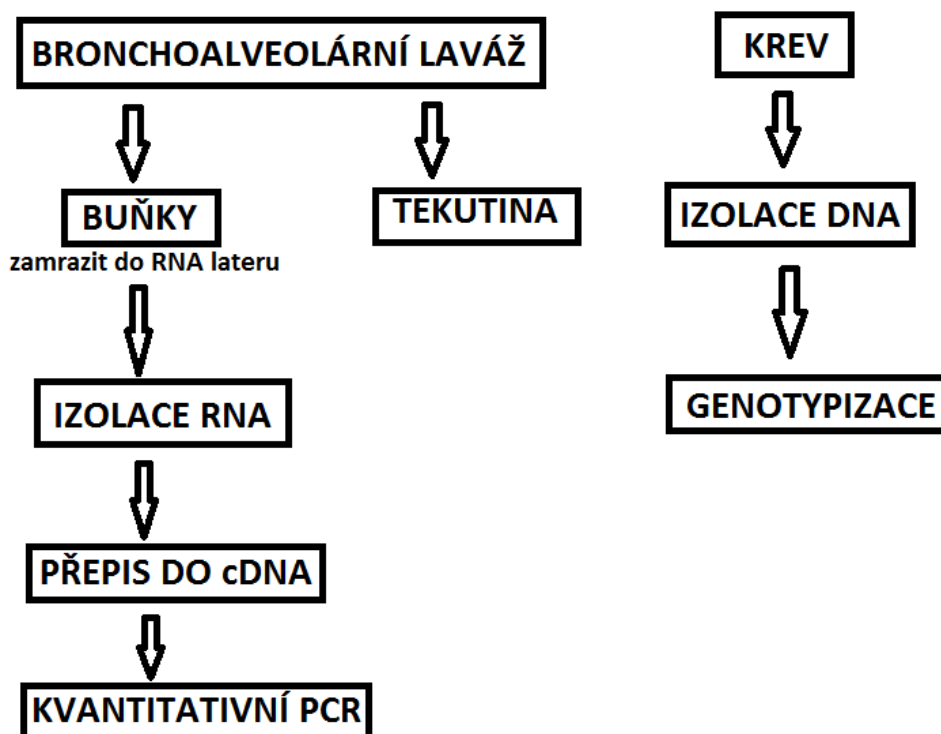
AB mix	Applied Biosystems, USA
Acid/fenol chloroform	Ambion, USA
Deoxynukleotidy pro PCR	Abgene, USA
Deoxynukleotidy pro reverzní transkripci	Roche, USA
DEPC (diethylpyrocarbonate)	Sigma Aldrich, USA
Eluční roztok	Ambion, USA
Ethanol 100%	Lach:ner, Česká republika
Hořečnaté ionty	Abgene, USA
Chlorid sodný	Sigma Aldrich, USA
Inhibitor Rnáz	Roche, USA
LB lyzační roztok	Sigma Aldrich, USA
(0,3 M sacharóza, 0,01 M Tris (pH 7,5), 5 mM MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 1 % Triton X100)	
Lyzační roztok	Ambion, USA
Methylenová modř	Sigma Aldrich, USA
Oligonukleotidová kotva	Roche, USA
P roztok	Sigma Aldrich, USA
(10 mM Tris, 40 mM EDTA, 4 mM CaCl <sub>2</sub> , 300 mM NaCl, 4%SDS)	
PBS – peroxohydrátboritanu sodného	Sigma Aldrich, USA
PCR voda	Prime, Německo
Promývací roztok 1	Ambion, USA
Promývací roztok 2/3	Ambion, USA
Proteinkinasa K	Sigma Aldrich, USA
(40% glycerol, 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 20 mg/ml Proteinasy K)	
Pufr pro PCR	Abgene, USA
R roztok (10 mM Tris pH 7,5)	Sigma Aldrich, USA
Reakční pufr pro reverzní transkripci	Roche, USA
Reverzní transkriptasa	Roche, USA
RNA later	Sigma Aldrich, USA
Rnazin	Invitrogen, USA
Taq polymerasa	Abgene, USA
TRIS	Sigma Aldrich, USA

## 4.2 Přístrojové vybavení

Centrifuga	Jouan, MR 1812
Centrifuga	Hermle Z300K, Německo
Centrifuga	Spectrafuge 16M, Labnet, USA
Centrifuga mini	Labnet, Korea
Vortex	Labnet, USA
Termoblok	Labnet, USA
Centrifuga	Hermle Z300, Německo
GeneAmp PCR systém 9600	Perkin ELMER, USA
Laminární box	BIOAIR, Itálie
RotorGene 3000	Corbett Research, Rakousko
Spektrofotometr nanodrop	ND-1000, Česká republika
Thermocycler	Eppendorf, Česká republika
Hmotnostní spektrometr	Bruker, Česká republika

## 4.3 Metody

### 4.3.1 Schéma experimentu



**Obrázek 12: Schéma experimentů prováděných v rámci diplomové práce.** Nejprve je provedena separace buněk získaných bronchoalveolární laváží od bronchoalveolární tekutiny. Poté se z těchto buněk izoluje RNA a pomocí reverzní transkripce se mRNA přepíše do cDNA. Relativní mRNA exprese kandidátních genů je měřena pomocí metody kvantitativní PCR. Dále byla izolována DNA z periferní krve pacientů a byla provedena genotypizace vybraných funkčních jednonukleotidových polymorfismů (SNPs). Detekce těchto SNPs byla provedena pomocí technologie MassArray.

### 4.3.2 Izolace buněk z bronchoalveolární laváže (BAL)

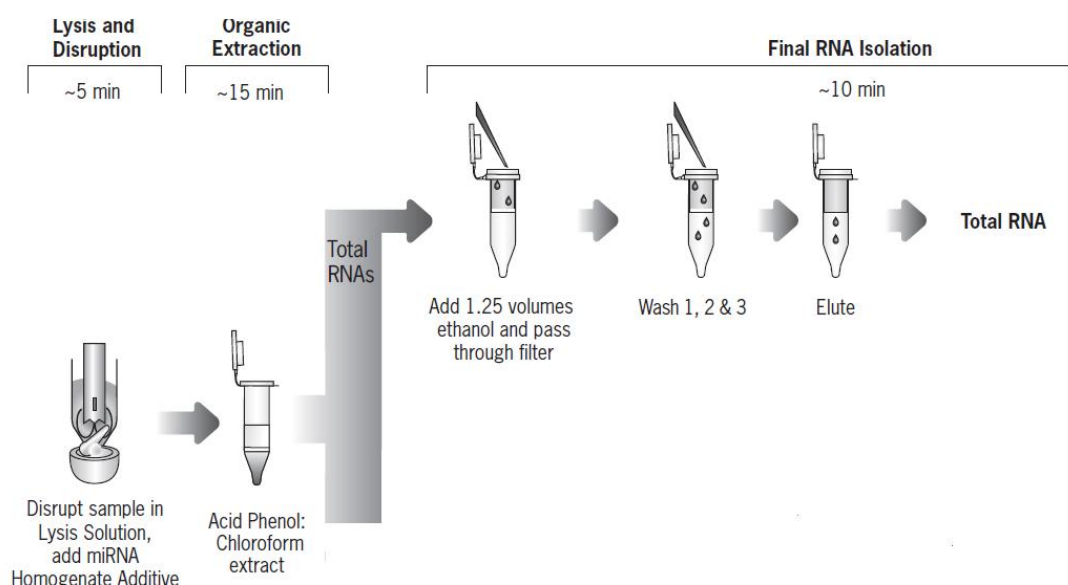
Bronchoalveolární lavážní tekutina slouží jako materiál pro analýzu buněčného i nebuněčného obsahu alveolů.

BAL zfiltrujeme přes sterilní gázu do falkonky a centrifugujeme 10 minut při 4000g. Centrifuga musí být vychlazena na 4 °C. Po centrifugaci supernatant rozpípetujeme do deseti mikrozkupek a zamrazíme na -80 °C pro další analýzy na úrovni proteinů. Peletu promyjeme 10 ml PBS s 0,1% DEPC, promícháme a centrifugujeme 10 minut při 4000g. Po druhé centrifugaci supernatant slijeme a k peletě přidáme PBS+0,1% DEPC (2000 µl), promícháme a přepípetujeme do mikrozkupek.

Z mikrozkušavky odebereme 5 µl vzorku, smícháme s 5 µl methylenové modří a dáme pod sklíčko Bürkerovy komůrky. Sečteme buňky (lymfocyty a makrofágy) v pěti velkých čtvercích a vypočítáme koncentraci buněk/ml. Mikrozkušavku centrifugujeme 20 minut při 3000g, odsajeme supernatant a přidáme RNA later (protektivní činidlo stabilizující RNA). Promícháme buňky s RNA laterem, necháme v lednici do druhého dne a poté zamrazíme do -20 °C dle doporučení výrobce. Takto stabilizované buňky jsou vhodné k izolaci intaktní RNA několik let.

### 4.3.3 Izolace RNA pomocí mirVana miRNA kitu

Celková RNA se izoluje z buněk získaných bronchoalveolární laváží pomocí kitu mirVana miRNA. V první fázi izolace se provede organická extrakce vedoucí k odstranění proteinů a buněčných složek. V druhé fázi se RNA uchytí na filtr ze skleněných vláken pomocí 100 % ethanolu. Ethanol snižuje afinitu RNA k vodě, což se projeví zvýšenou afinitou této molekuly k povrchu. Filtr je poté několikrát promyt a zachycená RNA je nakonec eluována roztokem o nízké iontové síle (**Obr. 13**, <http://www.ambion.cz>).



**Obrázek 13: Schéma izolace celkové RNA:** první fáze - extrakce, druhá fáze – uchycení RNA na filtru a promytí zachycené RNA, třetí fáze – eluce zachycené RNA (převzato z [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/fm\\_1560.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/fm_1560.pdf)).

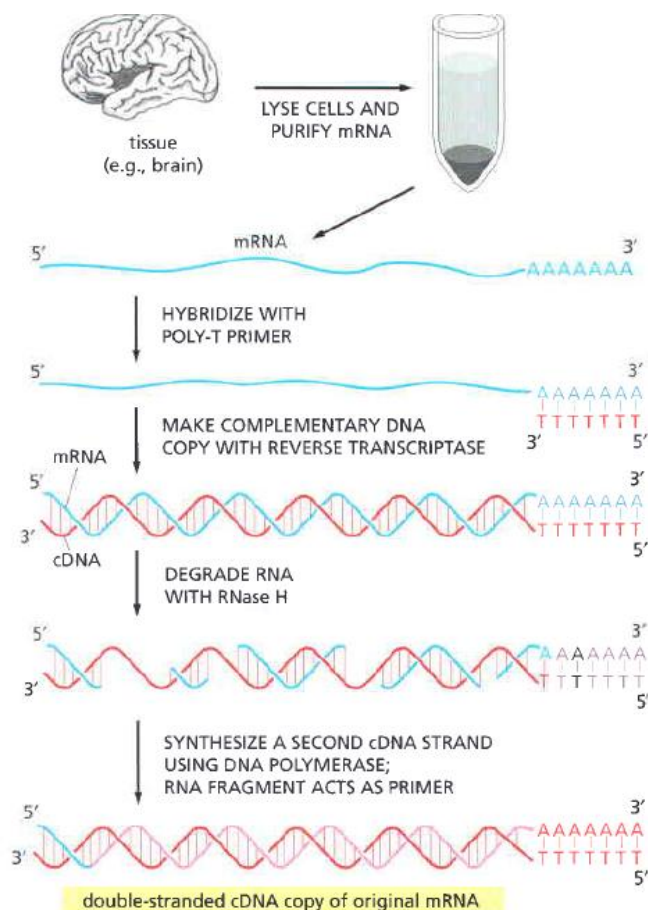
Nejdříve si připravíme roztoky z kitu (mirVANA, Ambion, kat. č. 1561), 100% ethanol a promývací roztok 1 a 2/3 vytemperujeme na pokojovou teplotu. Alikvot 700 µl elučního roztoku zahřejeme na 95 °C. Vzorky dáme na led a vychladíme centrifugu na

4 °C. K buňkám v RNA lateru přidáme vychlazený PBS+DEPC (1:1) a centrifugujeme při 4000g 30 minut. Supernatant odsajeme. Buňky narušíme přidáním lyzačního roztoku a důkladně zvortexujeme. Poté přidáme k lyzátu 1/10 objemu miRNA Homogenate Additive, dobře promícháme a necháme stát na ledu po dobu deseti minut. Přidáme Acid-Phenol/Chloroform ve stejném objemu jako byl původně lyzáat a vortexujeme 30-60 sekund. Dále centrifugujeme 5 minut při 10 000g při pokojové teplotě. Po centrifugaci musí být organická a vodná fáze odděleny, jinak točíme znovu. Opatrně odpipetujeme horní vodnou fázi a přeneseme ji do nové mikrozkušavky. Nesmíme narušit fázi organickou. Poznamenáme přenesený objem. Při izolaci RNA přidáme k vodné fázi 1,25 objemu 100% etanolu. Naneseme maximálně 700 µl směsi na filtr umístěný na kolonce. Centrifugujeme 15 sekund při 10 000g. Odsajeme tekutinu z kolonky a krok opakujeme, dokud nestočíme všechny vzorek. Poté naneseme 700 µl promývacího roztoku 1 na filtr kolonky a centrifugujeme 5-10 sekund při 10 000g. Opět odsajeme tekutinu v kolonce. Naneseme 500 µl promývacího roztoku 2/3 na filtr kolonky a centrifugujeme 5-10 sekund při 10 000g. Odsajeme tekutinu. Opakujeme nanesení promývacího roztoku 2/3, odsajeme tekutinu a ještě jednou centrifugujeme 1 minutu při 10 000g. Poté přeneseme filtr do nové mikrozkušavky a naneseme 100 µl předehřátého elučního roztoku na střed filtru. Centrifugujeme 20-30 sekund při maximální rychlosti. K 100 µl RNA přidáme 2 µl Rnazu, aby RNA nedegradovala, a uchovááme při -80 °C.

#### 4.3.4 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces přípravy cDNA podle templátového řetězce mRNA za pomoci reverzní transkriptasy. Tento enzym, který funguje jako RNA dependentní DNA polymerasa, vyžaduje přítomnost krátkého úseku DNA (primeru) připojeného na RNA, podle které vytváří komplementární vlákno DNA, tzv. cDNA. Krátký oligonukleotid, který jsme v této práci využívali jako primer, se nazývá oligo(dT). V průběhu reverzní transkripce vzniká heteroduplexní dvouřetězcová RNA-DNA molekula. RNA je poté naštěpena pomocí reverzní transkriptasy, která má také aktivitu RNasy H. Druhé vlákno je dosyntetizováno opět pomocí tohoto enzymu (**Obr. 14**, Alberts *et al.*, 2008). Syntéza vláken probíhá stejným způsobem jako u normální DNA polymerasy. Nukleotidy se přidávají ve směru 5'>3' při syntéze komplementárního vlákna (Bustin *et al.*, 2005; Bustin 2000).





#### Obrázek 14: Princip reverzní transkripce.

Podle templátového vlákna mRNA se vytvoří nové komplementární cDNA vlákno. V dalším kroku je dosyntetizováno druhé komplementární DNA vlákno pomocí enzymu reverzní transkriptasy. Ta má schopnost zároveň syntetizovat komplementární vlákno podle prvního cDNA vlákna, štěpit a postupně odbourat původní mRNA vlákna (převzato z Alberts *et al.*, 2008).

Na reverzní transkripci používáme Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, kat. č. 04897030001). Připravíme si templát-primer mix (**Tab. 2**) obsahující vyzolovanou RNA, oligonukleotidovou kotvu (anchored-oligo(dT)) a PCR vodu. Templát-primer mix zahřejeme na 65 °C na 10 minut. Mezitím je nutné si připravit RT mix (**Tab. 3**) obsahující reakční pufr, inhibitor RNas, deoxynukleotidový mix a reversní transkriptasu. Pak templát-primer mix umístíme na led po dobu 5 minut a stočíme. K templát mixu přidáme 7 µl RT mixu do každé zkumavky. Inkubujeme při 50 °C po dobu 60 minut. Inaktivace enzymu provedeme zahřátím na 85 °C na 5 minut. Poté dáme zkumavky na led, naředíme na 100 µl PCR vodou a přeneseme do 1,5 ml zkumavky.

**Tabulka 2: Množství reagensií v mixu používaných na jednu reakci.**

Templát-primer mix	1 reakce [ $\mu$ l]
total RNA (500 ng)	5
50 $\mu$ M Anchored-oligo(dT)	1
Water, PCR grade	7
Celkem	13

**Tabulka 3: Množství reagensií v RT mixu používaných na jednu reakci.**

RT mix	1 reakce [ $\mu$ l]
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5 $\times$ conc.	4,0
40 U/ $\mu$ l Protector RNase Inhibitor	0,5
10 mM Deoxynucleotide Mix	2,0
20 U/ $\mu$ l Transcriptor Reverse Transcriptase	0,5
Celkem	7,0

### 4.3.5 Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (real-time) je varianta PCR, která umožňuje kvantifikaci výsledného produktu přímo v reálném čase. Při reakci se využívá kombinace termocyklieru s fluorimetrem, který slouží k měření změny intenzity fluorescenčního záření. Fluorimetr je tvořen zdrojem excitačního záření, filtry nebo monochromátorem a detektorem záření. Záření, které vzniká ve zdroji excitačního záření, prochází filtrem nebo chromátorem, kde dochází k úpravě jeho vlnové délky. Poté vstupuje do vzorku a jeho interakcí s ním vzniká fluorescenční záření, které ze vzorku vychází a průchodem přes filtr dopadá na detektor záření. Chemické vlastnosti fluoroforu a zřášeče určují vznik fluorescenčního záření ve vzorku (Bustin 2002, 2004). Důležitými složkami rekační směsi jsou sonda, primery, již zmíněná polymerasa, nukleotidy, pufrující složka a hořečnaté ionty (Bustin *et al.*, 2005).

V reakci se měří fluorescence, která se uvolňuje v přímé úměře na množství amplifikované DNA. Substrátem může být barvivo interkalující s dvouvláknovou DNA.

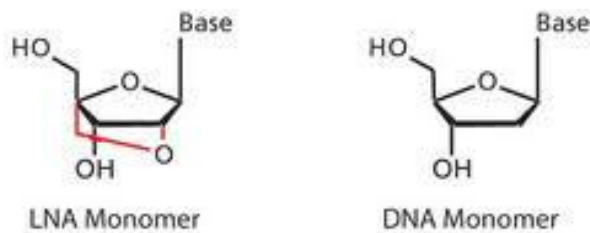
V tomto případě se jedná o nespecifický substrát (nejčastěji SYBR Green), který se váže na jakoukoliv dvouvláknovou DNA. Druhým typem jsou specifické fluorescenční sondy, které jsou komplementární k ampliconu a detekují pouze specifický amplicon a diskriminují tak jakékoliv jiné nespecifické amplifikace ve vzorku. Jejich sekvence musí být navržena tak, aby hybridizovala s templátovou cDNA mezi místy nasednutí obou protisměrně orientovaných primerů.

#### 4.3.5.1 Složení reakční směsi

##### Sondy

Existuje několik typů sond. Využívány jsou nejčastěji sondy nazývané FRET (fluorescence resonance energy transfer) nebo TaqMan sondy. V diplomové práci byly používány pouze TaqMan sondy (**Obr. 16**), proto je tato kapitola zaměřená pouze na tento typ sond. Jedná se o oligonukleotidy s navázaným fluorescenčním barvivem (fluoroforem) na 5'konci nukleotidového řetězce a se zhášecím na 3'konci řetězce. Nejčastěji používaným fluoroforem je fluorescein, jeho absorpční maximum je 492 nm a emisní maximum 520 nm. Ke zhášení (blokování emise barviva) dojde pouze tehdy, pokud je fluorofor v blízkosti zhášече na 3'konci sekvence sondy. Během PCR reakce dojde k doputování TaqDNA polymerasy k sondě a ta ji rozštěpí. Tím se fluorofor a zhášec od sebe oddálí a to se projeví rychlým nárůstem fluorescence (Parida *et al.* 2008, Bustin 2000, 2002; Bustin *et al.* 2009). Podmínkou optimálního zhášení je, aby absorpční spektrum zhášече překrývalo emisní spektrum fluorescenční barvy. Použití zhášече je velice výhodné, protože nevykazuje autofluorescenci a zháší rozsáhlé spektrum fluoroforů.

Klasické TaqMan sondy jsou dlouhé cca 20-25 nukleotidů. Komerčně jsou dostupné i sondy typu LNA (Locked Nucleic Acid – nukleové kyseliny s „uzamčenou“ konformací), které umožňují využití kratších sekvencí. Jedná se o druh LNA sondy, která má ve srovnání s jinými sondami zvýšenou stabilitu a hybridizační specifitu. Tento typ sondy je analog nukleových kyselin, který obsahuje mezi 2'hydroxylovou a 4'uhlíkem furanosového kruhu metylenový můstek uzamčený v 3'-endo konformaci (**Obr. 15**), což omezuje flexibilitu ribofuranosového cyklu a udržuje strukturu v rigidní bicyklické konformaci. Výhodou použití těchto sond je mimořádná biologická stabilita monomeru a zvýšená specifita i stabilita hybridizace (Braasch *et al.*, 2003; Latorra *et al.*, 2003). Teplota tání sond tvořených směsí DNA a LNA monomerů je na každý zařazený LNA nukleotid o několik °C (někdy až o 8 °C) vyšší než při použití fluorescenčních sond tvořených pouze DNA. Teplota tání tedy stoupá s každým přidaným monomerem.



**Obrázek 15: Srovnání struktur LNA a DNA monomerů** (převzato z <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/dna-probes/product-lines/lna-probes/locked-nucleic-acids-faq.html>).

## Primery

Jako primery se používají oligonukleotidy o délce 17-28 nukleotidů. Musejí být specifické pro amplifikovanou sekvenci, tj. komplementární k úseku, na který mají dosedat. Pro PCR reakci jsou nutné dva primery. Jeden, který začíná na 5' konci řetězce genu a druhý oligonukleotid začínající na 3' konci řetězce. Primery by spolu neměly být komplementární, jinak by se mohly chovat jako templáty a během PCR by se tvořily jejich dimery. Primery by neměly obsahovat vnitřně komplementární sekvence, aby nedocházelo k hybridizaci. Teploty, při kterých nasedají oba primery na DNA, by se neměly výrazně lišit. Rozložení CG a AT párů by mělo být rovnoměrné, zejména 3' konec by neměl být příliš bohatý na CG (Bustin 2000, 2002; Bustin *et al.* 2009).

## Taq polymerasa

Nejčastěji používanou DNA polymerasou je Taq polymerasa. Tato polymerasa je izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech, má enzymovou aktivitu a v důsledku její činnosti dochází k syntéze DNA. Polymerasa rozpoznává ssDNA jako templát, současně váže dNTP a prodlužuje vlákna DNA směrem od 5' konce k 3' konci. Optimální teplota pro aktivitu polymerasy je 68-78 °C a zůstává aktivní i po zahřátí na 95 °C, nutných k denuraci (Bustin 2004). K výzkumu byla použita Hot Start TaqDNA polymerasa, která se aktivuje až po zahřátí 10-15 minut při 95 °C. Výhody této polymerasy jsou: vyšší specifita, citlivost, výtěžnost a nižší pozadí.

## Nukleotidy

V PCR reakci se používají deoxynukleotidtrifosfáty, které se během prodlužování primerů vážou svou OH skupinou poslední kyseliny fosforečné na 3'OH konec posledního nukleotidu prodlužovaného řetězce. Váže se vždy ten nukleotid, který je komplementární k nukleotidu na templátovém řetězci.

## Hořčnaté ionty

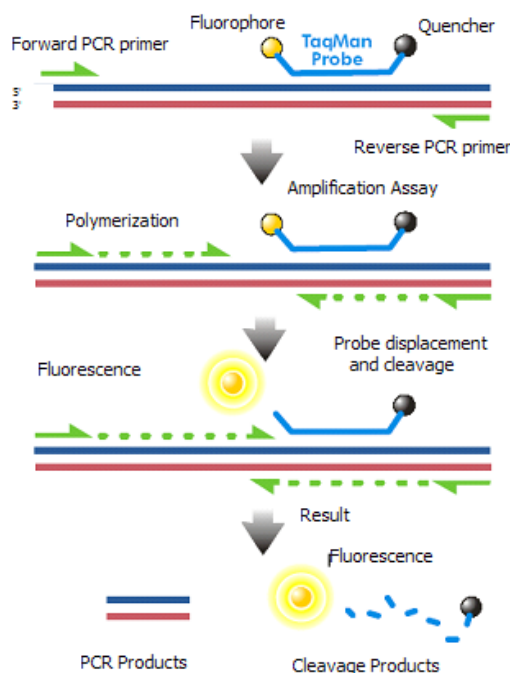
Přítomnost volných hořčnatých iontů je nezbytná pro aktivitu DNA polymerasy.

### 4.3.5.2 Princip kvantitativní PCR

Během PCR reakce dochází k cyklizačnímu procesu, při kterém se amplifikuje určitý úsek molekuly DNA. Každá PCR reakce začíná fází nazývanou počáteční denaturace. Musí dojít ke kompletní denaturaci, aby vznikla vazebná místa pro primery. Pokud by byla denaturace nekompletní, dojde k neúplnému použití templátu v prvním cyklu, a tím k nižšímu výtěžku PCR produktu (**Obr. 16**).

**Počáteční denaturace** se provádí při teplotě 95 °C po dobu 15 minut, aby se aktivovala TaqDNA polymerasa. Po počáteční denaturaci následuje cyklus skládající se z fází.

- **Denaturace** – reakční směs se zahřeje na 94 °C a dojde k denuraci molekuly dsDNA do dvou ssDNA. Když by DNA nebyla dostatečně denaturovaná, byl by omezen přístup primerů a naopak příliš dlouhá denaturace by mohla způsobit snížení aktivity DNA polymerasy.
- **Nasednutí primerů a syntéza DNA** – reakční směs se ochladí na 55 °C (60 °C) a dojde k nasednutí primerů a sondy k jejich komplementárním sekvencím na templátových ssDNA. Následuje navázání TaqDNA polymerasy a prodloužení DNA vlákna od každého primeru až na konce templátové DNA zabudováním dNTP. Tato reakce využívá 5' exonukleasové aktivity enzymu a tím ji rozštěpí. Nově syntetizovaná DNA slouží jako templát pro další cyklus reakce (Bustin 2002, 2004). Tyto cykly se opakují a během krátké doby dojde k mnohonásobné amplifikaci DNA sekvence (**Obr. 16**).



**Obrázek 16: Schéma kvantitativní PCR reakce:** první fáze – denaturace dvouvláknové DNA na jednovláknové DNA. Druhá fáze – navázání primerů, sondy a Taq polymerasy na templátovou DNA, dosyntetizování DNA a vznik nové dvouvláknové DNA (převzato z <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/0/07/Taqman.png>).

#### 4.3.5.3 Příprava reakční směsi pro kvantitativní PCR

Pro kvantitativní PCR si připravíme reakční mix obsahující vodu, pufr, nukleotidy,  $MgCl_2$ , specifické primery pro daný gen (**Obr. 16**), fluorescenčně značenou sondu a Hot Start Taq polymerasu. Do malých zkumavek napipetujeme reakční mix a přidáme cDNA vzorku (**Tab. 5**). V případě použití AB (Applied Biosystems) mixu jsou primery i sonda komerčně připravovány jako směs (**Tab. 6 a 7**). Amplifikace cDNA je zaznamenána pomocí přístroje RotorGene 3000 (**Tab. 4**) a ke kvantifikaci se používá metoda druhé derivace. V kompenzaci intra- a intervariability mezi běhy se používá kalibrační křivka sestavená pomocí cDNA přeepsané z referenční lidské RNA (Stratagene).

**Tabulka 4: Probíhající cykly během PCR reakce.**

cykly	teplota a doba cyklu
počáteční denaturace	95 °C 15 min
6x opakován cyklus	94 °C 30 s
	55 °C 45 s
40x opakován cyklus	94 °C 30 s
	60 °C 45 s

**Tabulka 5: Množství reagensií v jedné reakci používaných při RT-PCR při použití primerů od firmy Roche.**

<b>Roche</b>	<b>1reakce [μl]</b>
H <sub>2</sub> O	7,8
10x pufr	2,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3,5
10 mM dNTPs	1,0
Primer-L (10pmol/μl)	2,25
Primer-R (10pmol/μl)	2,25
10 μM Sonda	0,5
5 U/μl Hot Start TAQpolymerasa Abgene	0,2
Celkem	20,0

**Tabulka 6: Množství reagensií v jedné reakci při použití AB mixu (firma Applied Biosystems).**

<b>AB mix</b>	<b>1reakce [μl]</b>
H <sub>2</sub> O	11,55
10x ABpufr	2,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3,5
10 mM dNTPs	1,0
20x AB mix	1,25
5 U/μl Hot Start TAQpolymerasa Abgene	0,2
Celkem	20,0

**Tabulka 7: Základní informace k měřeným genům.**

<b>název genu a označení</b>	<b>výrobce</b>	<b>primery-sekvence a označení</b>	<b>LNA sonda</b>
PSMB2: NM_002794.3	Roche	5'-agagggcagtggaactcctt-3' 5'-aggttggcagattcaggatg-3'	50
IL-23: NM_016584.2	AB	- (Hs00372324_m1)	-*
IL-23R: NM_144701.2	AB	- (Hs00332759_m1)	-*

\* MGB sondy

#### 4.3.5.4 Vyhodnocení kvantitativní PCR

Při vyhodnocování metody kvantitativní PCR můžeme použít absolutní nebo relativní kvantifikaci. Absolutní kvantifikace přímo určuje výchozí počet kopií cílových molekul. Mezi logaritmem počátečního počtu templátových kopií a  $C_T$  příslušné amplifikační křivky existuje lineární vztah. Hodnota  $C_T$  (cycle threshold) se rovná počtu cyklů, který vznikající fluorescence potřebuje k překročení prahu detekce v exponenční fázi.

Při relativní kvantifikaci jsou využívány referenční geny, které slouží pro normalizaci množství mRNA vstupující do dané reakce.  $C_T$  ( $C_p$ ) amplifikační křivky daného genu se vždy normalizuje oproti  $C_T$  ( $C_p$ ) referenčního genu. Jako referenční gen, tzv. housekeepingový gen, jehož exprese je konstantní v buňkách bronchoalveolární laváže (Kriegova *et al.*, 2008), se používá PSMB2 (Proteasome subunit beta type-2). Všeobecně se tedy využívají takové geny, které jsou pro určitou populaci buněk a experimentální podmínky charakteristické tím, že je jejich exprese stabilní.

Relativní kvantifikace se využívá ke stanovení míry genové exprese sledovaných genů a k výpočtům se využívá v našem případě metoda maxima druhé derivace (RotorGene software 6.1.71). Tato kvantifikační metoda je založena na výpočtech druhé derivace amplifikační křivky. Metoda maxima druhé derivace umožňuje přesnější kvantifikaci. Využívá bod nazývaný „Taq off point“, který udává počet cyklů, při kterých dosáhne fluorescence 20% maximální hodnoty fluorescence. Ve srovnání s metodou  $C_t$  je výhodou této metody objektivita získaných výsledků.

Ke statistickému vyhodnocování se využívá Mann-Whitney U-test pro dva nezávislé soubory.

$$U_1 = mn + 1/2m(m+1) - T_1$$

$$U_2 = mn + 1/2n(n+1) - T_2$$

$$U_1 + U_2 = mn$$

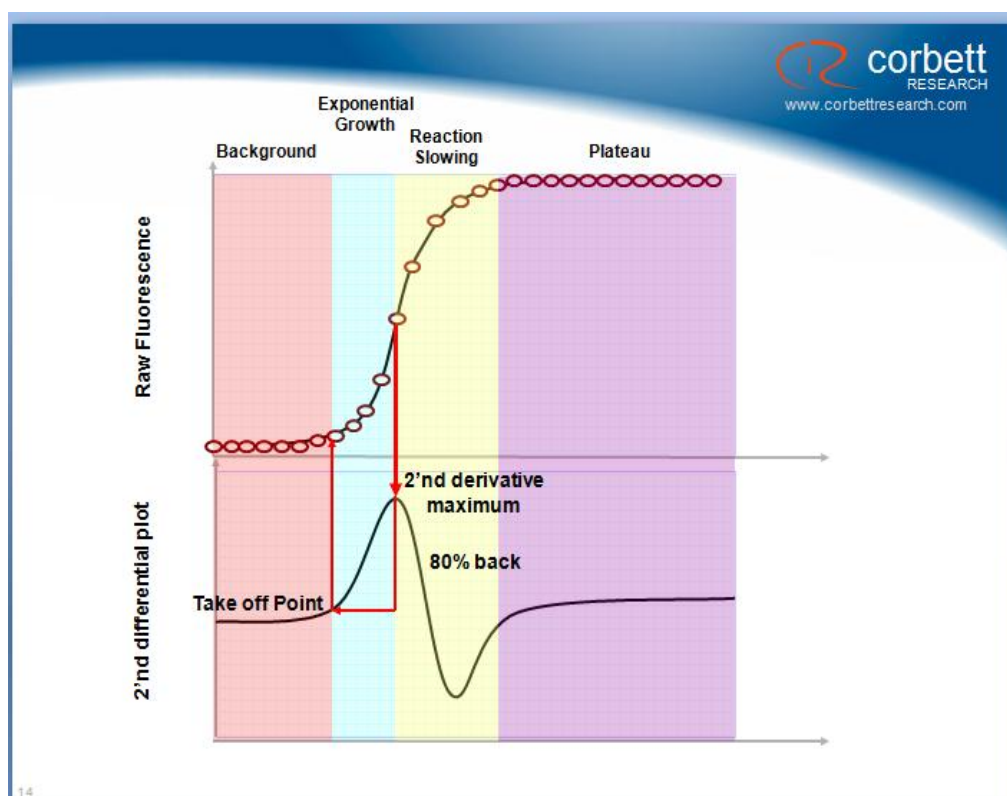
$m$ -počet hodnot ve skupině pacientů,  $n$ -počet hodnot ve skupině kontrolních jedinců,  $T_1$ -součet všech hodnot u pacientů,  $T_2$ -součet všech hodnot u kontrolních jedinců  
Pokud  $\min(U_1, U_2)$  je menší nebo rovno tabelované kritické hodnotě, zamítá se nulová hypotéza.

Jedná se o neparametrický statistický test, který slouží k porovnávání relativní mRNA exprese u dvou porovnávaných skupin. Tento test se používá v případě, kdy výběry pocházejí ze souborů, které nemají normální rozdělení nebo o jejich rozdělení nic nevíme. Výhodou testu je nezávislost na tvaru rozdělení a nevýhodou je menší schopnost odhalení nesprávných testovacích hypotéz pro danou hladinu významnosti (Nachar, 2008).



Výsledkem kvantitativní PCR je esovitá křivka, kterou lze rozdělit na čtyři části (Obr. 17)

- **baseline fáze:** v této fázi je namnožené cDNA tak málo, že jeho fluorescence nedosahuje měřitelných teplot
- **exponenciální fáze:** v této fázi množství produktu exponenciálně roste
- **lineární fáze:** jsou spotřebovávány reakční komponenty a PCR produkty začínají degradovat
- **fáze plateau:** během této fáze dojde k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní.



**Obrázek 17: Amplifikační křivka a znázornění metody druhé derivace. Take off point – počet cyklů, při kterém dosáhne fluorescence 20% maximální fluorescence (převzato z [www.corbettresearch.com](http://www.corbettresearch.com)).**

### 4.3.6 Izolace DNA z periferní krve

Při izolaci nukleových kyselin je velice důležité, aby byly v nativním stavu, v dostatečném množství a ve vysoké čistotě, protože kontaminace (např. proteiny, heparin) by mohla zabránit nebo ovlivnit PCR reakce.

Krev ze zkumavky (5-10 ml) přelijeme do 50 ml zkumavky a nalijeme na ni vychlazený lyzační roztok LB do celkového objemu přibližně 45 ml. Zkumavku uzavřeme a protřepeme, aby došlo k lýzi erytrocytů. Poté centrifugujeme při 1700 g po dobu 5 minut. Ke dnu klesají leukocyty, které obsahují DNA. Po centrifugaci se supernatant opatrně vylije do odpadu a k sedimentu se přidá 5 ml roztoku R a protřepe se. Tímto krokem se sediment promývá. Opět centrifugujeme 5 minut při 1700 g. Opatrně odsajeme supernatant Pasteurovou pipetou do odpadu. Sediment je tvořený koncentrovanými buněčnými jádry leukocytů s DNA. Poté k sedimentu přidáme 930  $\mu$ l roztoku R a sediment rozbijeme třepáním. Postupně přidáme 370  $\mu$ l roztoku P (obsahuje SDS – detergent, který umožní popraskání jader) a 40  $\mu$ l proteinasy K (štěpí bílkoviny). Promícháme otáčením, až roztok příliš nepění. Inkubujeme celou noc při cca 37 °C. Druhý den vytáhneme vzorky z inkubátoru a necháme zchladnout na laboratorní teplotu. Získali jsme hrubý lyzát (směs naštěpených bílkovin, detergentovaných lipidů, polysacharidů a DNA). Ke vzorku se přidá 400  $\mu$ l 5M NaCl a důkladně se protřepe na třepačce. Dojde k vysrážení proteinů, které se odstraní centrifugací. Nejprve centrifugujeme 15 min při 1700 g a supernatant přelijeme do 2 ml zkumavky. Poté centrifugujeme dalších 10 minut při 18000 g. Pro každý vzorek si připravíme 15 ml zkumavku s 3,5 ml 96 % etanolu. Supernatant z mikrozukavky přelijeme do zkumavky s etanolem. Převrácením zkumavky vysrážíme DNA do chuchvalce. Dále si pro každý vzorek připravíme dvě sterilní mikrozukavky s 0,5 ml 70 % etanolu a jednu šroubovací 1,5 ml mikrozukavku se 700  $\mu$ l 10 mM TRIS (pH 8,0). Pokud je chuchvalec malý, sníží se objem TRIS pufru. Chuchvalec DNA nabere na jednorázovou inokulační kličku a důkladně jej promyjeme ve dvou mikrozukavkách s etanolem (odstranění zbytků bílkovin). Ethanol vymačkáme otřením DNA chuchvalce o stěnu druhé mikrozukavky s ethanolem. Kličku s DNA ponoříme do šroubovací mikrozukavky a krouživými pohyby kličky uvolníme DNA do roztoku. DNA poté rozpouštíme při pokojové teplotě přes noc nebo ho můžeme urychlit např. při cca 70 °C 5 minut. Vyizolovanou DNA skladujeme v ledničce při cca 4 °C. Při dlouhodobém skladování se zamrazí DNA na -20 °C.

### 4.3.7 Měření koncentrace a čistoty vyzolované DNA

K měření absorbance byl použit spektrometr Nanodrop, který umožňuje měřit absorbanci ve velmi malých objemech vzorku (2-5  $\mu$ l). Na počítači spustíme software spektrofotometru ND 1000 a zvolíme „Nucleic Acid“. Poté napipetujeme 3  $\mu$ l PCR vody na měřící plošku spektrofotometru, přiklopíme rameno spektrofotometru a stiskneme „OK“. Otřeme měřící plochu buničinou a napipetujeme 3  $\mu$ l 10 mM TRIS pH 8,0 a stiskneme „blank“. Opět otřeme měřící plochu buničinou, nepipetujeme 3  $\mu$ l vzorku DNA a stiskneme „measure“. Výsledky měření se nám zobrazí na obrazovce (absorpční spektrum, vypočtená koncentrace v ng/ $\mu$ l a  $A_{260}/A_{280}$ ). Po každém měření očistíme rameno buničinou. Po ukončení měření očistíme rameno vodou a stiskneme „exit“ pro ukončení programu.

### 4.3.8 MassArray technologie

Technologie MassArray využívá kombinaci molekulárně-biologických a separačních technik. Pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS) můžeme analyzovat specifické amplikony vyšetřované DNA. Přístroj umožňuje detekovat až 36 různých variant DNA v jedné reakci.

Výhody používání přístroje MassArray:

- rychlá, přesná, efektivní analýza s vysoce citlivým a specifickým detekčním systémem fungujícím na principu hmotnostní spektrometrie
- využití při genotypizaci, při analýze somatických mutací, metylací a při kvantitativní genové expresi
- úspora času - několik variant DNA v jedné reakci, až 36
- nový software umožňuje snadné nastavení, rychlý sběr a analýzu dat.

#### 4.3.8.1 Příprava reakční směsi pro genotypizaci

Připravíme si PCR reakční mix obsahující vodu, pufr, nukleotidy,  $MgCl_2$ , specifickou směs primerů pro daný gen (**Tab. 8**; studovaný polymorfismus se nachází v oblasti ohraničené použitými primery) a Taq polymerasu (**Tab. 9**). Do mikrotitrační destičky napipetujeme 1  $\mu$ l DNA vzorku (cca 10 ng), přidáme 4  $\mu$ l PCR mixu a proběhne první PCR reakce (**Tab. 10**).

V druhém kroku k PCR produktu přidáme 2  $\mu$ l SAP mixu (**Tab. 11**) a inkubujeme 37 °C 40 minut a 85 °C 5 minut k deaktivaci enzymu. Základem SAP mixu je „shrimp alkaline phosphatase“ neboli alkalická fosfatasa z krevet. Tento enzym je důle-

žítý k odštěpení (defosforylaci) nezabudovaných deoxynukleotidů, tím vzniknou dNDP a nebudou se účastnit dalších reakcí (**Obr. 18:2**).

Poté napipetujeme k PCR produktu a SAP mixu 2 µl iPLEX mixu (**Tab. 12**). Součástí iPLEX terminačního mixu jsou dideoxynukleotidy. Po přidání iPLEX mixu polymerasa doplní k extenčnímu primeru terminační dideoxynukleotid na základě komplementarity s templátovým vláknem (**Obr. 18:3**). Důležitá je úprava koncentrace extenčních primerů podle molekulové hmotnosti.

Po proběhnutí PCR reakce (**Tab. 13**) se ke směsi přidá resin, který je důležitý pro odsolení vzorku. Po každém kroku se mikrotitrační destička centrifuguje. Analýza směsi extenčních primerů ukončených terminačním nukleotidem (odpovídá místu polymorfismu) je provedena pomocí MALDI-TOF.

**Tabulka 8: Základní informace k použitým primerům.**

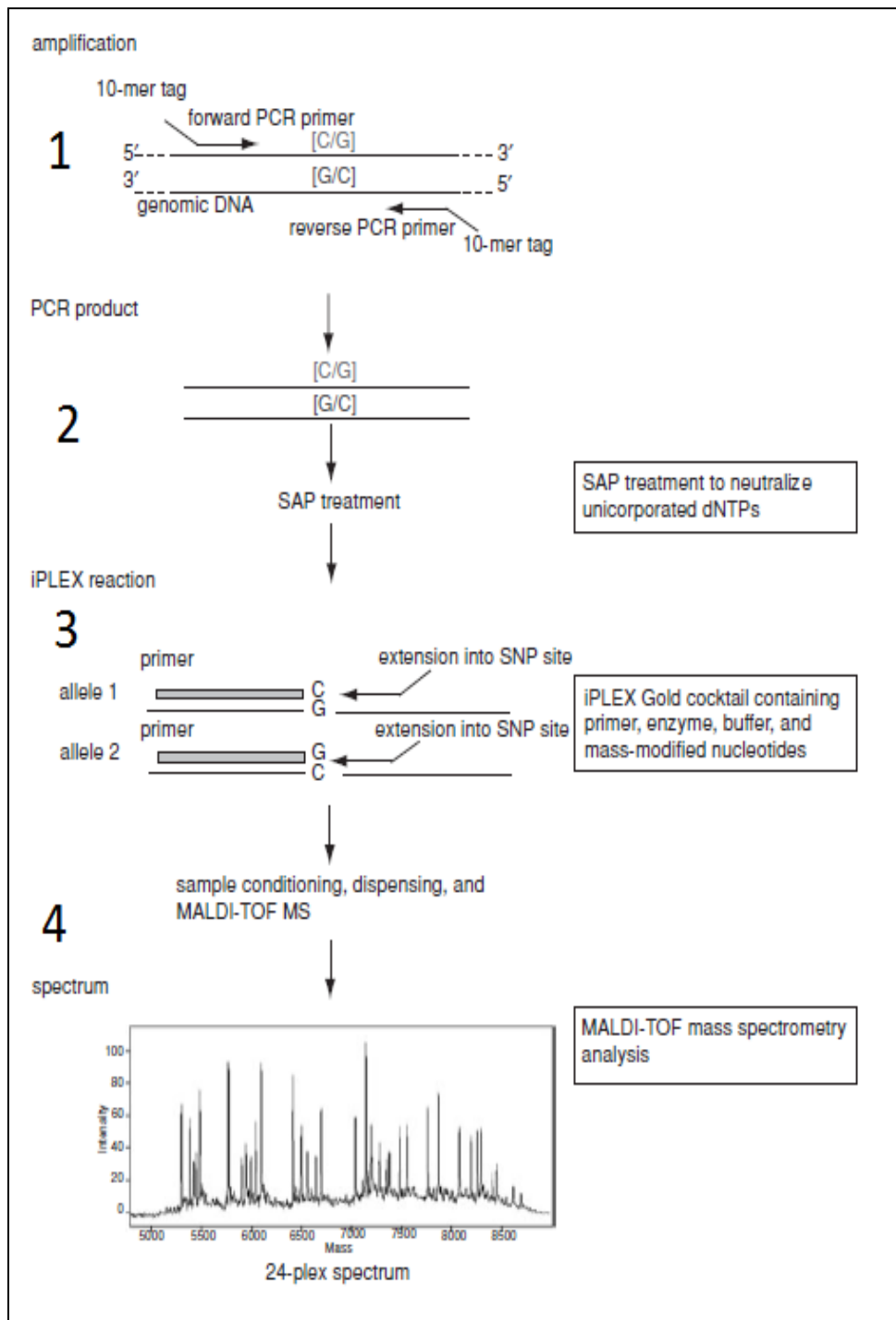
název SNP	sekvence primerů	
11209026	ACGTTGGATGAAATTCTGCAAAAACCTAC	ACGTTGGATGGCTGTTATGTTGTCAATTC
10889677	ACGTTGGATGCACCTTCGGGACCTTAATTC	ACGTTGGATGGGGAGCTCCATGCCTTTTA

	extenční primer-sekvence	molekulová hmotnost (Da)
11209026	GCAAAAACCTACCCAGTT	5436,6
10889677	GGACCTTAATTCTCTAATTTTAAGAAAT	8560,6

	molekulová hmotnost po přidání ddG (Da)	molekulová hmotnost po přidání ddA (Da)	molekulová hmotnost po přidání ddC (Da)
11209026	5683,8	5763,7	-
10889677	-	8887,7	8847,8



**Obrázek 18: Schematické znázornění genotypizace.** V prvním kroku dojde k namnožení oblastí, které obsahují studované polymorfismy. Druhým krokem po získání PCR produktu je přidání SAP fosfatasy, která odštěpí fosfát z nezabudovaných deoxynukleotidů (2). Dále po inkubaci přidáme iPLEX mix (extenční primer, enzym, pufr, di-deoxynukleotidy). Dojde k prodloužení extenčního primeru, který končí před místem polymorfismu, a zabudování terminačního nukleotidu na základě komplementarity bází (3). Detekce polymorfismu je provedena pomocí hmotnostní spektrometrie (4) (převzato z Gabriel *et al.*, 2009).

**Tabulka 9: Množství reagensií používaných při PCR reakci.**

<b>PCR mix</b>	<b>1 reakce [μl]</b>
H <sub>2</sub> O	2,4
10x buffer	0,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0,4
25 mM dNTPs	0,1
0,5 μM primer mix	0,5
5 U/μl HotStart Taq polymerasa	0,1
celkem	4

**Tabulka 10: Probíhající cykly s dobou trvání – fáze 1 (Obr. 18).**

<b>teplota</b>	<b>doba cyklu</b>
94°C	2 min
94°C	20 s
56°C	30 s
72°C	1 min
44x opakován krok 2,3,4	
72°C	3 min
4°C	5 min
15°C	udržovat

**Tabulka 11: Množství reagensií používaných při SAP mixu.**

<b>SAP mix</b>	<b>1 reakce [μl]</b>
H <sub>2</sub> O	1,53
SAP pufr	0,17
1,7 U/μl SAP	0,3
celkem	2

**Tabulka 12: Množství reagensií používaných při iPLEX mixu.**

<b>iPLEX mix</b>	<b>1 reakce [μl]</b>
H <sub>2</sub> O	0,619
iPLEX pufr	0,2
iPLEX terminační mix	0,2
7/9,3/11,6/14 μM primer mix	0,94
iPLEX enzym	0,041
celkem	2

**Tabulka 13: Probíhající cykly s dobou trvání – fáze 3 (Obr. 18).**

teplota	dobu cyklu
94 °C	30 s
94 °C	5 s
52 °C	5 s
80 °C	5 s
4x opakován krok 3 a 4	
39x opakován krok 2, 3, 4	
72 °C	3 min
4 °C	udržovat

#### 4.3.8.2 Vyhodnocení polymorfismů

Detekce polymorfismů probíhá pomocí hmotnostní spektrometrie. Jedná se o princip MALDI TOF. MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization) spolu s ionizací elektrosprejem je nejrozšířenější technikou tzv. měkké ionizace. V iontovém zdroji se přednostně tvoří intaktní molekuly analytu s výrazným potlačením fragmentace. Tohoto typu ionizace se využívá pro studium širokého spektra látek (proteiny, peptidy, sacharidy a nukleové kyseliny), syntetické polymery, farmaceutika atd.

MALDI je řazena mezi měkké ionizační techniky, u níž dochází přednostně k tvorbě molekulárních iontů analytu a stupeň fragmentace je nízký. Vzorek analytu se smíchá s nadbytkem matrice a je ozářen krátkými pulzy laseru. Energie laserového pulsu je absorbována převážně matricí, čímž dochází k její rychlé desorpci. Odpařující se částice matrice strhávají molekuly analytu s sebou a převádějí je do plynného stavu. Ionty generované MALDI byly v našem případě analyzovány průletovým hmotnostním analyzátozem (time of flight – TOF). Princip tohoto analyzátozu spočívá v měření času, který potřebuje ion k překonání vzdálenosti mezi iontovým zdrojem a detektorem, nazývaného doba letu  $t$ . Doba letu je funkcí měrné hmotnosti iontu ( $m/z$ ).

#### 4.3.8.3 Výpočty frekvencí a statistika

**Genotypová frekvence** vyjadřuje podíl zastoupení homozygotů polymorfismu např. pro alelu A, heterozygotů AG (AC) a homozygotů pro alelu G (C) na celkovém počtu genotypizovaných jedinců. Genotypové frekvence homozygotů se značí P a Q a heterozygotů H.

$$P, Q, H = f_g = n_x / n_{\text{celk.}}$$

$f_g$ ... 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 např. alely A nebo alely G (C) na celkovém počtu alel lokusu v populaci.

$$p, q = f_a = \frac{2n_x + n_y}{2n_{\text{celk}}}$$

$f_a$ ... 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

Př. Podíl alely A vypočítáme tak, že počet homozygotů pro alelu A vynásobíme dvěma (dvě kopie alely A), přičteme počet heterozygotních jedinců (jedna kopie alely A) a součet vydělíme celkovým počtem alel (dvojnásobek počtu pacientů nebo kontrolních jedinců).

**Zákon o genetické rovnováze v populacích: Hardy-Weinbergův zákon** je teoretické rozložení alel v populaci. Tento zákon je založen na popisu frekvence genotypů v ideální populaci. V případě, že frekvence alely **A** je  $p$  a frekvence alely **a** je  $q$ , tak platí, že frekvence tří možných fenotypů budou  $p^2=AA$ ,  $2pq=Aa$  a  $q^2=aa$  (nezávisle na přítomnosti dalších alel). Musejí být splněny určité podmínky: a) populace je nekonečně velká, b) jedinci se párují náhodně, c) na zkoumaný gen není selekce, d) neexistují mutace, e) neexistují migrace. Potom je populace pro gen v rovnováze a platí:  $p^2(AA)+2pq(Aa)+q^2(aa)=1$ .

**Chí-kvadrát test (test dobré shody)** je neparametrický statistický test, který se používá k zjištění, jestli mezi dvěma znaky existuje prokazatelně výrazný vztah. Testujeme shodu mezi očekávanými a pozorovanými počty jedinců v jednotlivých fenotypových nebo genotypových třídách. Vypočítaná hodnota se srovnává s kritickou hodnotou odpovídající zvolené hladině významnosti, v našem případě 5% při daném počtu stupňů volnosti.

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

$x_i$ ... naměřené hodnoty

$e_i$ ... očekávané hodnoty

$N$ ... počet stupňů volnosti,  $N=n-1$

$n$ ... počet fenotypových/genotypových tříd



## 4.4 Výsledky

### 4.4.1 Soubor pacientů

Soubor pacientů se skládá ze sedmdesáti čtyř jedinců postižených sarkoidózou s rentgenologickým stupněm I-IV (**Tab. 15**) a ze sedmnácti kontrolních jedinců bez známek zánětu (**Tab. 14**). Průměrný věk u obou skupin byl čtyřicet šest let. Mezi pacienty vykazující zánětlivou reakci bylo více žen a to v počtu čtyřicet čtyři. Počet mužů byl třicet. U kontrolních jedinců bylo žen osm a mužů devět. Celá skupina pacientů čítala devět kuřáků a šedesát pět nekuřáků. V rámci kontrolní skupiny kouřili čtyři jedinci a třináct bylo nekuřáků. Pacientů, kteří byli zařazeni podle rentgenologického vyšetření do stádia I, bylo dvacet šest. Počet pacientů patřících do stádia II bylo čtyřicet a zbytek pacientů byl řazen do stádia III-IV. Počet jedinců postižených akutní formou, tedy Löfgrenovým syndromem, bylo dvacet jedna. Dále byl hodnocen vývoj onemocnění během dvou let sledování. Po dvou letech byla remise (zlepšení) vyhodnocena u dvaceti šesti pacientů, progrese (zhoršení) nemoci u čtyřiceti pacientů a u osmi byla doba sledování kratší než dva roky. Diagnóza sarkoidózy byla stanovena dle mezinárodních kritérií (Statement on sarcoidosis, 1999). Bronchoalveolární laváž byla odebírána pacientům na Klinice plicních nemocí (přednosta Prof. MUDr. Vítězslav Kolek, DrSc.) ve Fakultní nemocnici Olomouc.

**Tabulka 14: Soubor kontrolních jedinců.**

<b>charakteristika</b>	<b>kontrolní jedinci</b>
počet kontrolních jedinců	17
průměrný věk	46,1±16,7 (20-75)
pohlaví žena/muž	8/9
kouření ano/ne	4/13

průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, v závorce minimum a maximum  
všichni kontrolní jedinci měli normální profil bronchoalveolární laváže

**Tabulka 15: Soubor pacientů se sarkoidózou.**

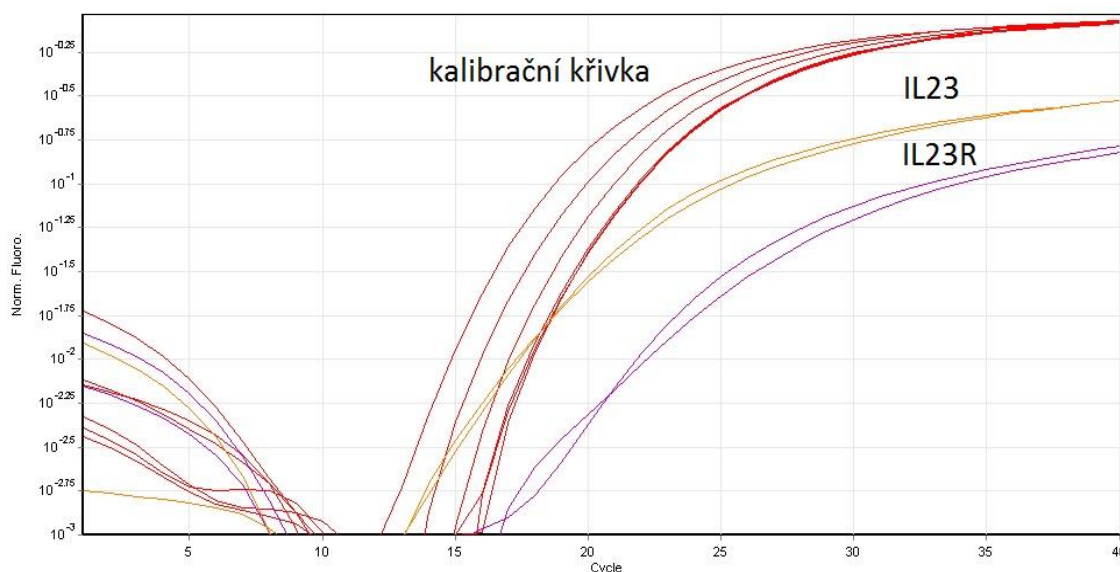
charakteristika	sarkoidóza
pacienti	74
průměrný věk	45,6±12,7 (20-77)
pohlaví žena/muž	44/30
kouření ano/ne	9/65
rtg stádium I/II/III-IV	26/40/8
vývoj onemocnění po dvou letech progrese/regrese	40/26*
Löfgrenův syndrom ano/ne	21/53
zastoupení buněk v BAL %	
makrofágy	77,9±10,4 (49,4-98)
lymfocyty	19,5±10,6 (2-49)
neutrofily	1,63±2,09 (0-11)
eosinofily	0,87±2,77 (0-17,3)
CD3+	82,9±13,11 (36-98)
CD4+	66,16±17,17 (23-92)
CD8+	15,73±10,63 (2-53)
CD19+	1,01±2,02 (0-14)
poměr CD4+/CD8+	7,2±7,00 (0,52-46)

průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, v závorce minimum a maximum

\*doba sledování byla kratší než 2 roky

#### 4.4.2 Relativní mRNA exprese genu pro interleukin 23

Relativní exprese mRNA studovaných molekul byla měřena pomocí přístroje RotorGene 3000 a její hodnocení proběhlo metodou druhé derivace (RotorGene software 6.1.71) s využitím PSBM2 jako referenčního genu a cDNA přepsané z lidské univerzální referenční RNA (Stratagene) jako kalibrátoru. Primery pro gen IL-23 a pro jeho receptor (IL-23R) byly pořízeny od firmy Applied Biosystems. Primery pro referenční gen PSMB2 byly zakoupeny od firmy Roche (**Obr. 19**). Porovnávání exprese mezi příslušnými skupinami bylo provedeno pomocí neparametrického Mann-Whitney U-testu. Hodnota  $p < 0,05$  byla považována za statisticky významnou a k vytvoření grafů byl použit program GraphPad Prism 5.



**Obrázek 19: Reprezentativní výsledek kvantitativní PCR: zkouška primerů a kalibrační křivky.**

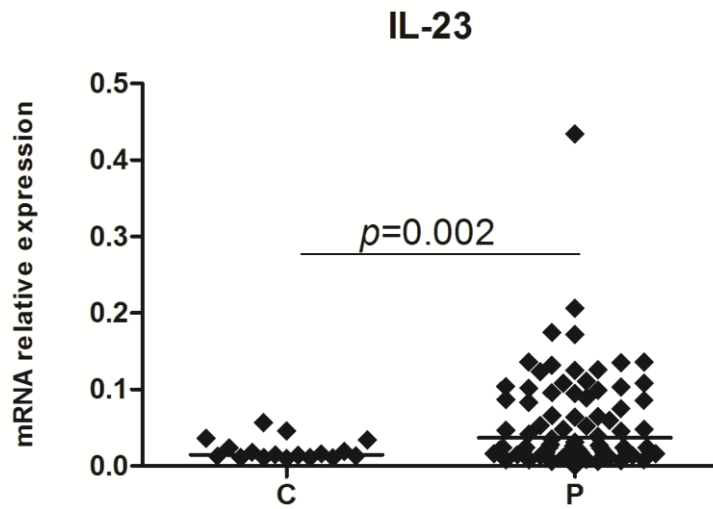
Relativní mRNA exprese genu pro IL-23 byla u pacientů zvýšena oproti kontrolním jedincům bez známek zánětu ( $p=0,002$ ; medián relativní exprese  $\pm$  SD: kontrolní jedinci:  $0,015 \pm 0,014$  a pacienti:  $0,037 \pm 0,065$ ; **Obr. 20**).

Relativní mRNA exprese genu pro IL-23 při porovnávání v rámci jednotlivých podskupin podle rentgenologického stádia byla také zvýšena oproti kontrolním jedincům. (rtgI vs. kontrolní jedinci:  $p=0,014$ ;  $0,041 \pm 0,054$ ; rtgII vs. kontrolní jedinci:  $p=0,005$ ;  $0,041 \pm 0,076$ ; rtgIII-IV vs. kontrolní jedinci:  $p=0,012$ ;  $0,036 \pm 0,041$ ; **Obr. 21**).

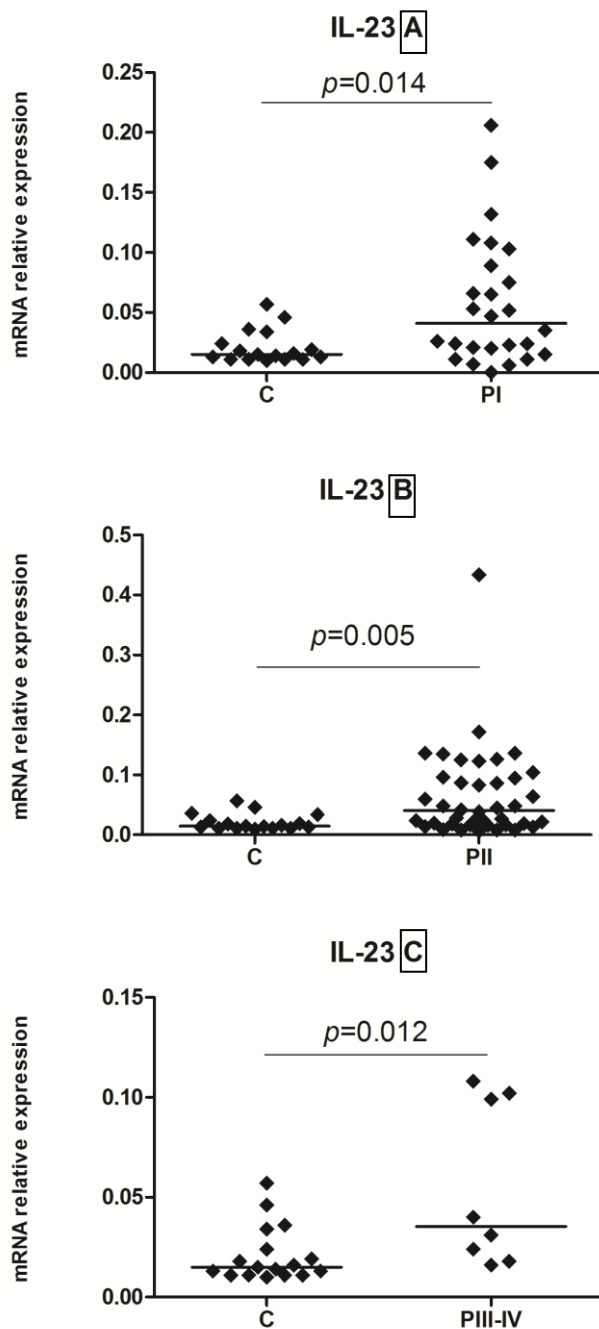
Při porovnávání mRNA relativní exprese genu pro IL-23 mezi rentgenologickými podskupinami navzájem nedosahoval výsledek signifikance ( $p=0,9$ ; **Obr. 22**).

Při hodnocení relativní mRNA exprese u pacientů s LS syndromem a kontrolních jedinců bez známek zánětu byla exprese zvýšena ( $p=0,04$ ;  $0,024 \pm 0,055$ ). U pacientů bez LS byla relativní mRNA exprese genu pro IL-23 rovněž zvýšena ( $p=0,0013$ ;  $0,042 \pm 0,069$ ). Při srovnání skupiny pacientů s LS a jedinců bez LS nedosahoval rozdíl v expresi signifikance ( $p=0,47$ ; **Obr. 23**).

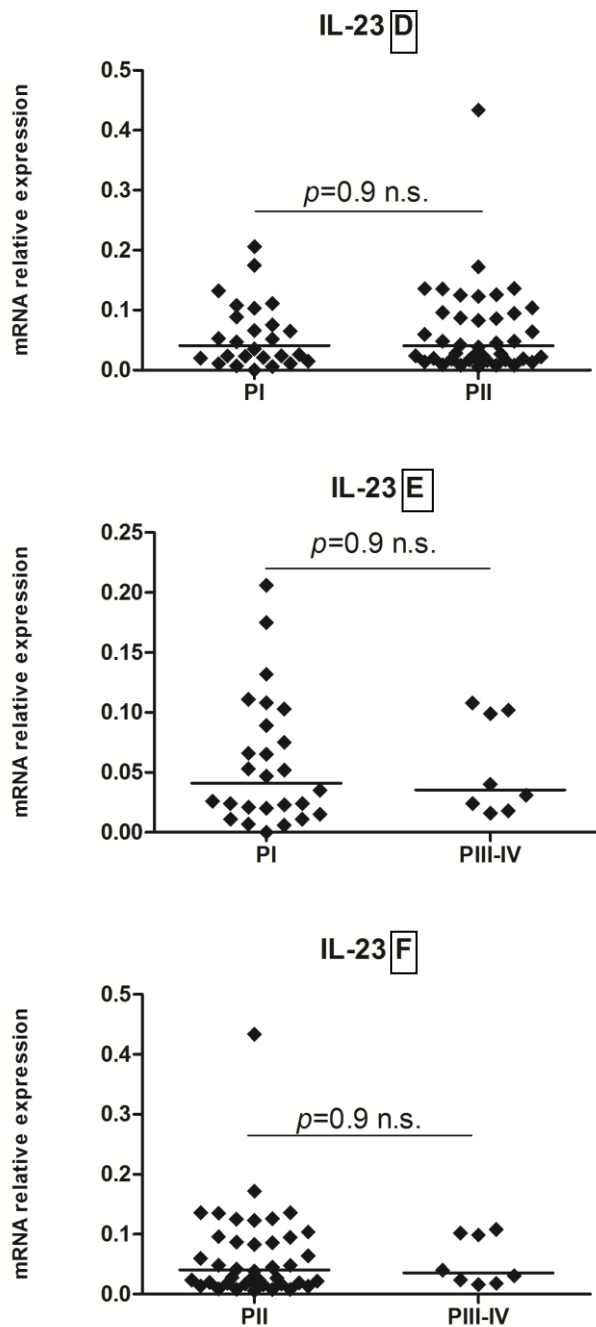
Dále byla u pacientů hodnocena progresse a regrese onemocnění po dvou letech. Relativní mRNA exprese genu pro IL-23 byla zvýšena u pacientů s progresí i s regresí oproti kontrolním jedincům (progrese vs. kontrolní jedinci:  $p=0,01$ ;  $0,024 \pm 0,08$  a regrese vs. kontrolní jedinci:  $p=0,07$ ;  $0,041 \pm 0,042$ ). Tato hodnota se blíží signifikanci a aby byl rozdíl významný, bylo by potřeba doměřit mRNA relativní expresi u dalších jedinců. mRNA relativní exprese pacientů s progresí nebyla snížena oproti pacientům s regresí ( $p=0,67$ ; **Obr. 24**).



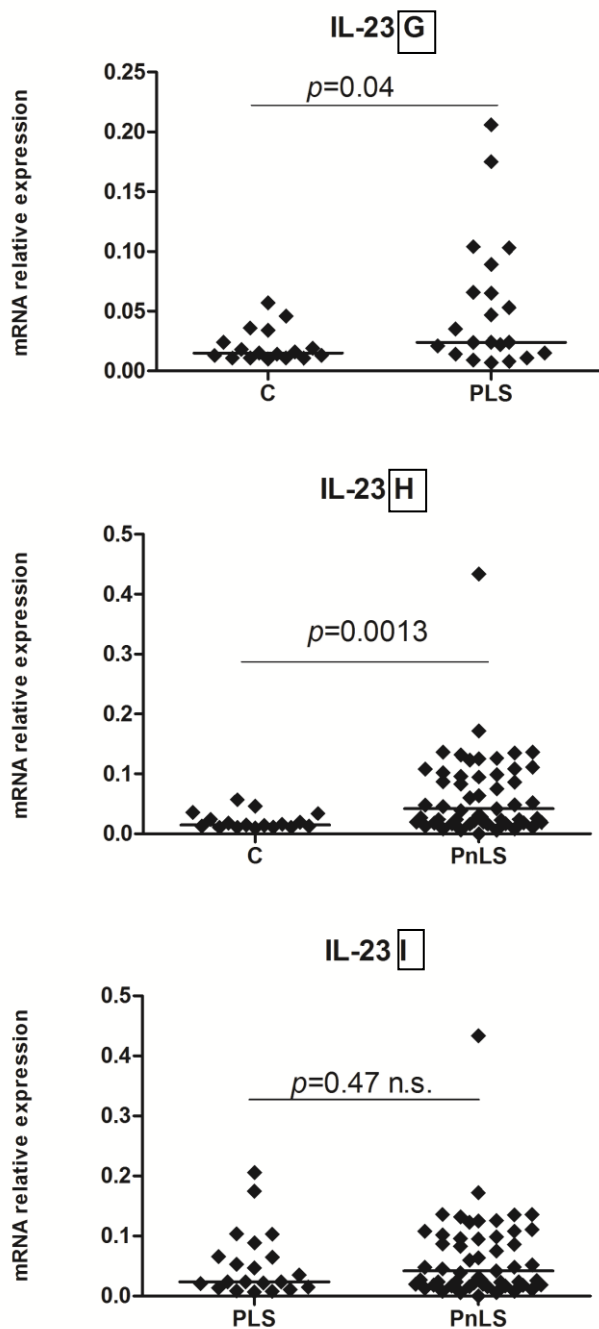
**Obrázek 20: Grafické znázornění relativní exprese mRNA genu pro IL-23 u kontrolních jedinců bez známek zánětu a pacientů se sarkoidózou (C-kontrolní jedinci bez známek zánětu, P-pacienti, medián znázorněn vodorovnou čarou).**



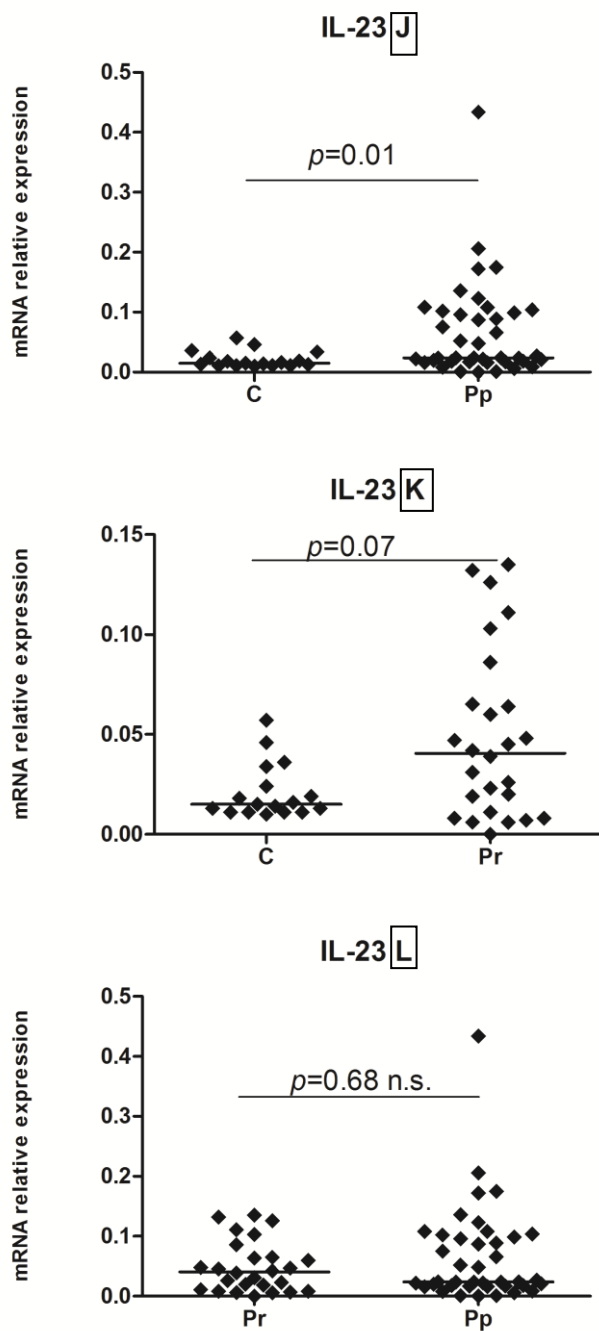
**Obrázek 21: Grafické znázornění mRNA relativní exprese genu pro IL-23 u kontrolních jedinců bez známek zánětu a pacientů podle rentgenologického stádia I (A), II (B) a III-IV (C; C-kontrolní jedinci bez známek zánětu, PI-pacienti s rentgenologickým stádiem I, PII-pacienti s rentgenologickým stádiem II, PIII-IV-pacienti s rentgenologickým stádiem III-IV, medián znázorněn vodorovnou čarou).**



**Obrázek 22: Grafické znázornění relativní mRNA exprese genu pro IL-23 u pacientů podle příslušného rentgenologického stádia: D – porovnání relativní mRNA exprese u rentgenologického stádia I a II, E – rtg I a III-IV, F – rtg II a III-IV (PI-pacienti s rentgenologickým stádiem I, PII-pacienti s rentgenologickým stádiem II, PIII-IV-pacienti s rentgenologickým stádiem III-IV, medián znázorněn vodorovnou čarou).**

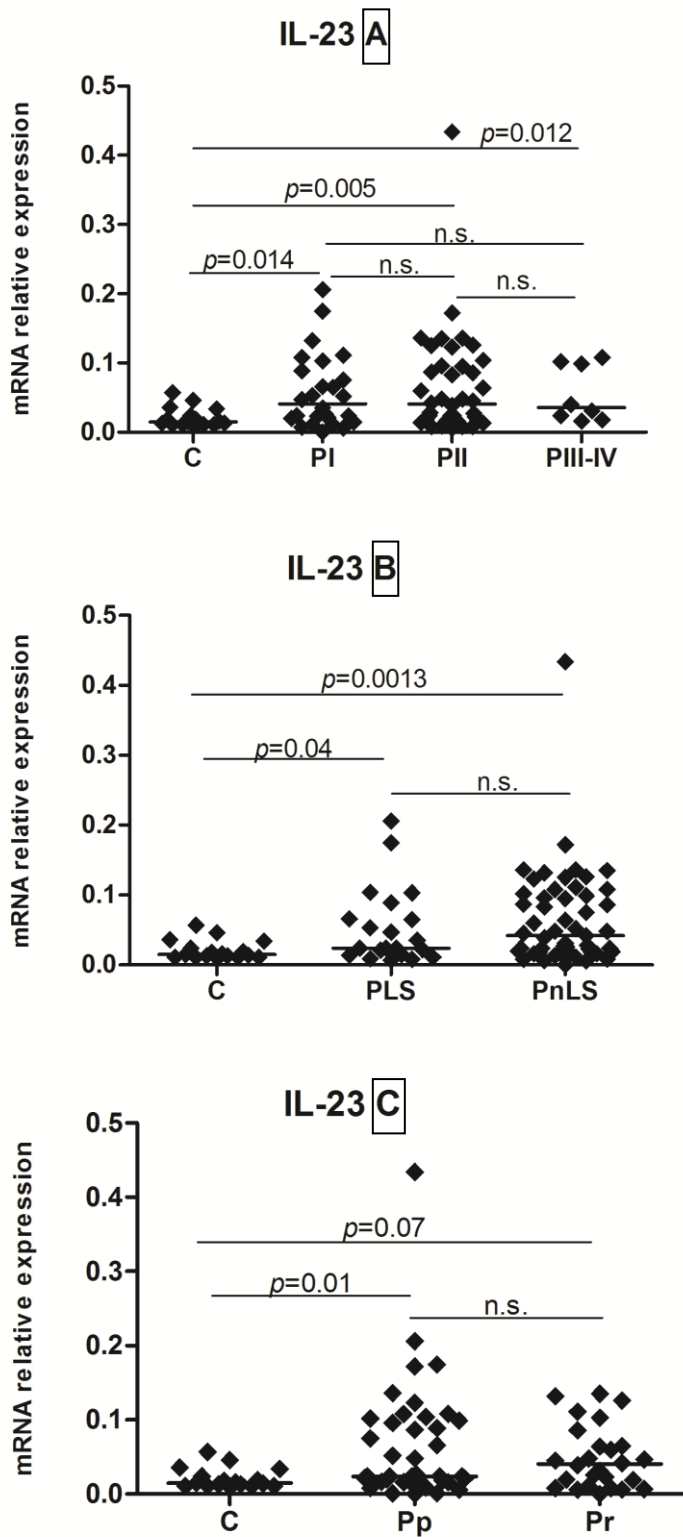


**Obrázek 23: Grafické znázornění relativní mRNA exprese genu pro IL-23 u kontrolních jedinců bez známek zánětu, u pacientů s Löfgrenovým syndromem (G) a bez syndromu (H) a navzájem mezi těmito dvěma skupinami (I; C-kontrolní jedinci bez známek zánětu, PLS-pacienti s Löfgrenovým syndromem, PnLS-pacienti bez Löfgrenova syndromu, medián znázorněn vodorovnou čarou).**



**Obrázek 24: Grafické znázornění relativní mRNA exprese genu pro IL-23 u pacientů s progresí (J), regresí (K) onemocnění po dvou letech a nevzájem mezi těmito skupinami (L; C-kontrolní jedinci bez známek zánětu, Pp-pacienti, u kterých nastala po dvou letech progresse onemocnění, Pr-pacienti, u kterých nastala po dvou letech regrese onemocnění, medián znázorněn vodorovnou čarou).**





Obrázek 25: Souhrnné znázornění mRNA relativní exprese genu pro interleukin 23.

### 4.4.3 Relativní mRNA exprese genu pro receptor pro interleukin 23 (IL-23R)

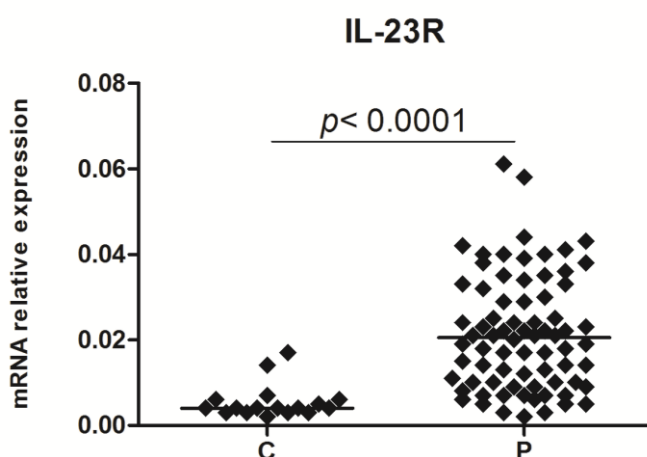
Relativní mRNA exprese genu pro receptor IL-23R byla zvýšena u celého souboru pacientů (medián relativní exprese  $\pm$  SD:  $0,021 \pm 0,013$ ) oproti kontrolním jedincům bez známek zánětu ( $0,004 \pm 0,004$ ,  $p < 0,0001$ ; **Obr. 26**).

Relativní mRNA exprese genu pro receptor IL-23R při porovnávání v rámci jednotlivých podskupin podle rentgenologického stádia byla zvýšena oproti kontrolním jedincům (rtgI vs. kontrolní jedinci:  $p < 0,0001$ ;  $0,0195 \pm 0,01$ ; rtgII vs. kontrolní jedinci:  $p < 0,0001$ ;  $0,021 \pm 0,015$ ; rtgIII-IV vs. kontrolní jedinci:  $p = 0,0002$ ;  $0,0195 \pm 0,013$ ; **Obr. 27**).

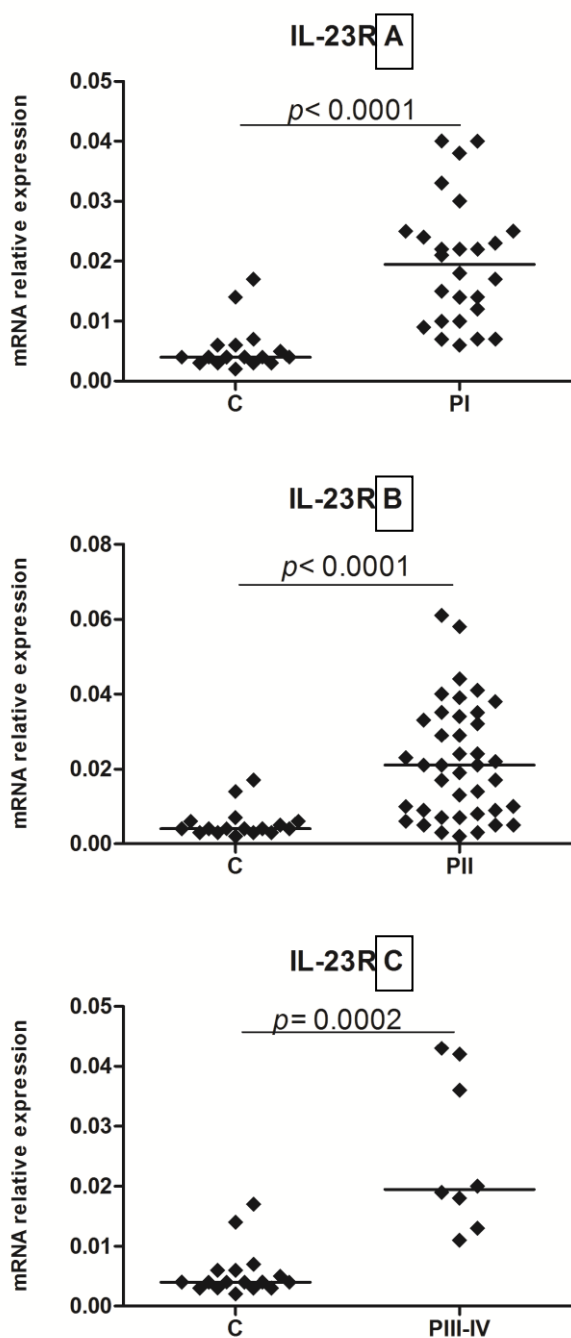
Při porovnávání mRNA relativní exprese genu pro receptor IL-23R mezi rentgenologickými podskupinami navzájem byla pozorována stejná množství transkriptů (rtgI vs. rtgII:  $p = 0,94$ ; rtgI vs. rtgIII-IV:  $p = 0,33$ ; rtgII vs. rtgIII-IV:  $p = 0,39$ ; **Obr. 28**).

Při hodnocení relativní mRNA exprese u pacientů s LS syndromem a bez LS (nLS) byla pozorována zvýšená exprese u obou skupin vůči kontrolním jedincům ( $p < 0,0001$  u obou skupin; LS:  $0,018 \pm 0,011$  a nLS:  $0,021 \pm 0,014$ ). Při srovnání skupiny pacientů s LS a jedinců bez LS nebyl výsledek statisticky významný ( $p = 0,54$ ; **Obr. 29**).

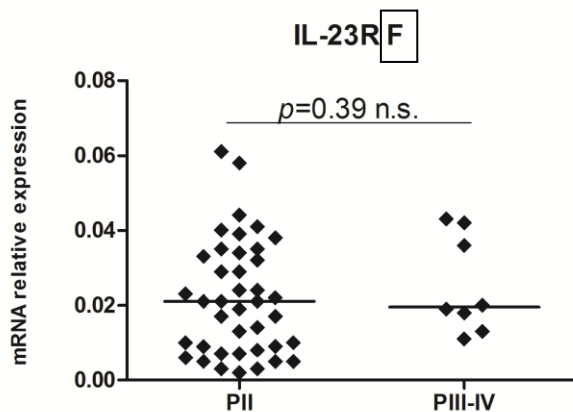
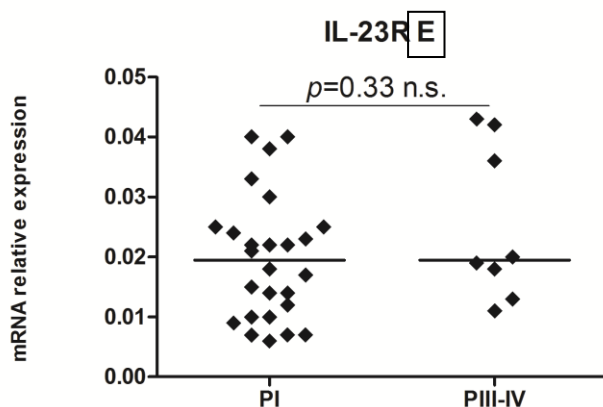
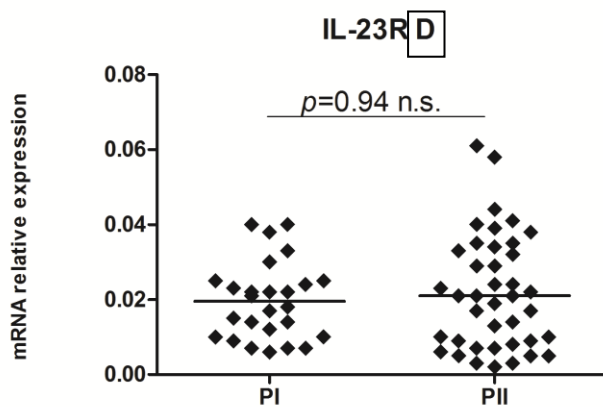
Dále byla u pacientů hodnocena regrese a progresse onemocnění po dvou letech. Relativní mRNA exprese genu pro receptor IL-23R byla zvýšena u obou skupin pacientů ( $p < 0,0001$ ; progresse:  $0,022 \pm 0,014$  a regrese:  $0,014 \pm 0,012$ ). Při porovnávání mRNA relativní exprese genu IL-23R byla exprese zvýšena u pacientů s progresí oproti pacientům s regresí ( $p = 0,02$ ; **Obr. 30**).



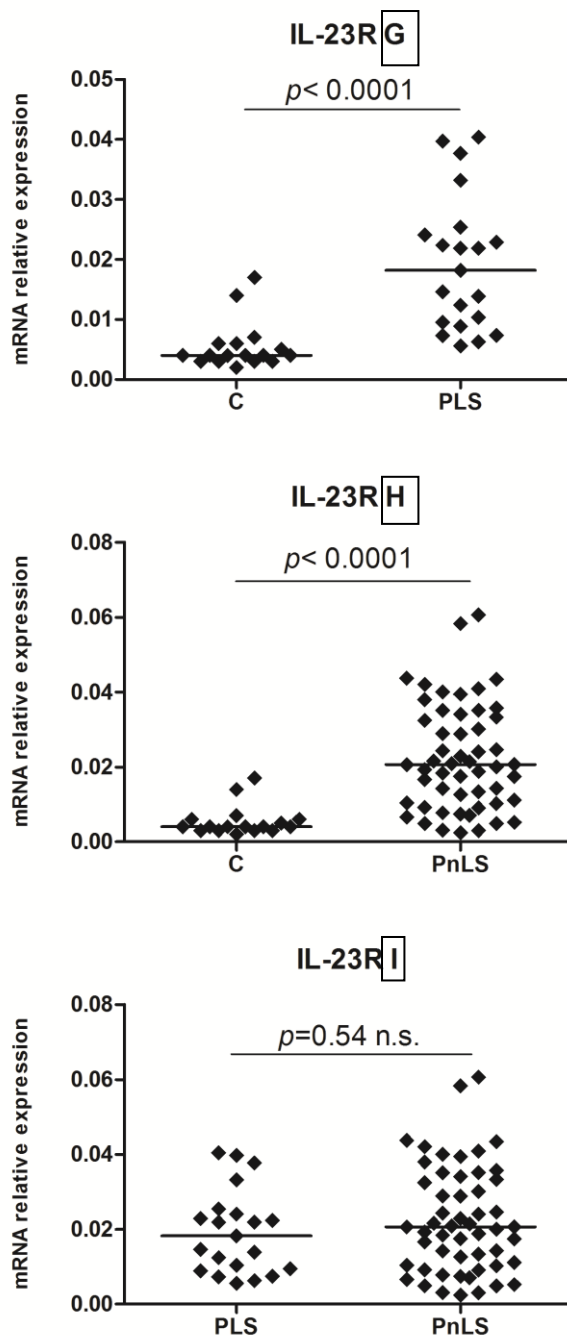
**Obrázek 26:** Grafické znázornění relativní mRNA exprese genu pro receptor (IL-23R) u kontrolních jedinců bez známek zánětu a všech skupin pacientů (C-kontrolní jedinci bez známek zánětu, P-pacienti, medián znázorněn vodorovnou čarou).



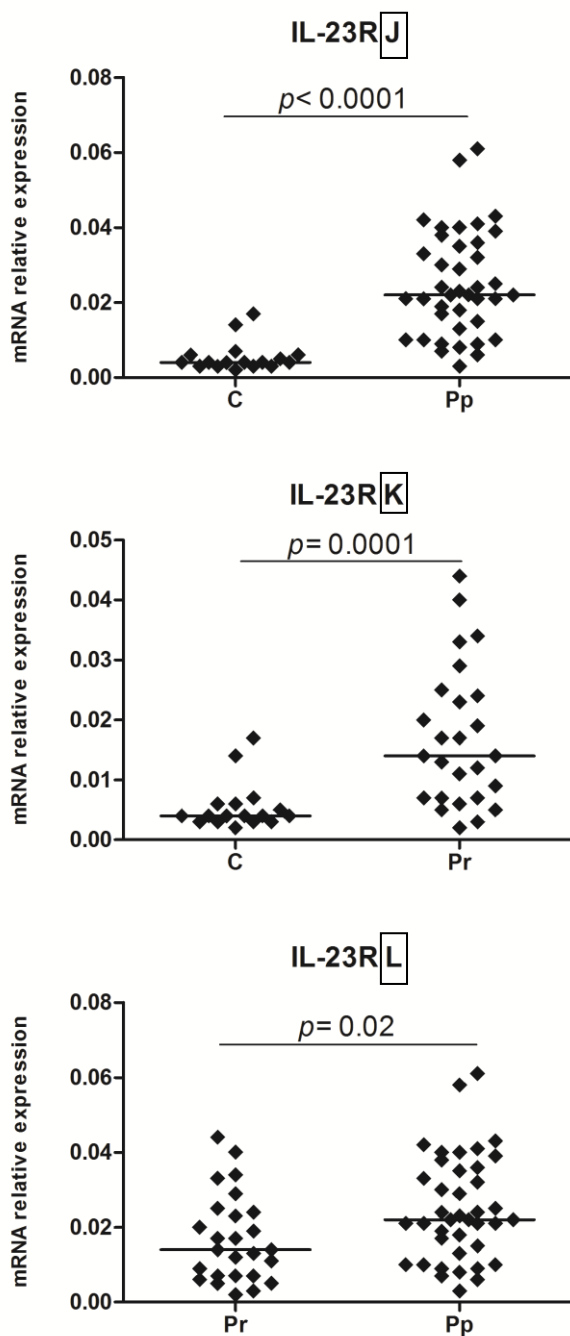
**Obrázek 27:** Grafické znázornění relativní mRNA exprese genu pro receptor (IL-23R) u kontrolních jedinců bez známek zánětu a pacientů podle příslušného rentgenologického stádia I (A), II (B) a III-IV (C; C-kontrolní jedinci bez známek zánětu, PI-pacienti s rentgenologickým stádiem I, PII- pacienti s rentgenologickým stádiem II, PIII-IV-pacienti s rentgenologickým stádiem III-IV, medián znázorněn vodorovnou čarou).



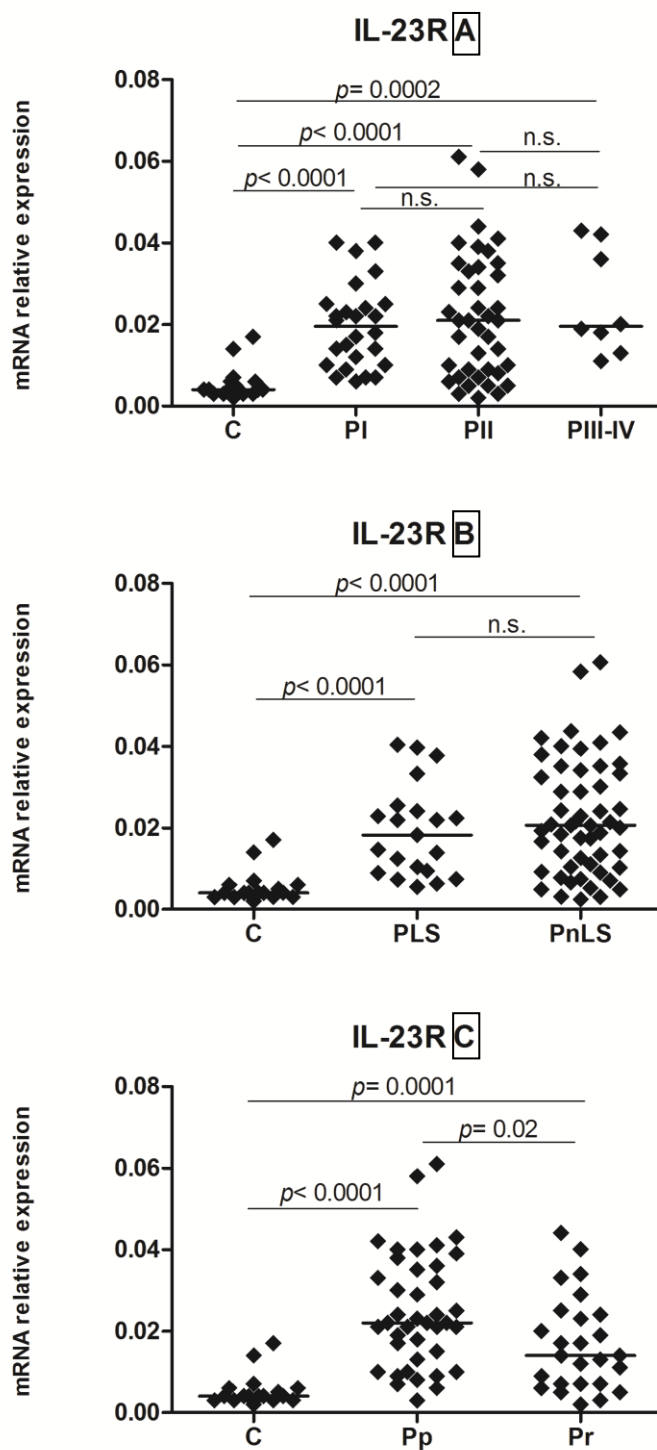
**Obrázek 28:** Grafické znázornění relativní mRNA exprese genu pro receptor (IL-23R) u pacientů podle rentgenologického stádia: porovnání mRNA relativní exprese u rentgenologického stádia I a II (D), rtg I a III-IV (E) a rtg II a III-IV (F; PI-pacienti s rentgenologickým stádiem I, PII-pacienti s rentgenologickým stádiem II, PIII-IV-pacienti s rentgenologickým stádiem III-IV, medián znázorněn vodorovnou čarou).



**Obrázek 29:** Grafické znázornění relativní mRNA exprese genu pro receptor (IL-23R) u kontrolních jedinců bez známek zánětu, u pacientů s Löfgrenovým syndromem (G) a bez syndromu (H) a navzájem u těchto podskupin (I; C-kontrolní jedinci bez známek zánětu –  $0,004 \pm 0,004$ , PLS-pacienti s Löfgrenovým syndromem, PnLS-pacienti bez Löfgrenova syndromu, medián znázorněn vodorovnou čarou).



**Obrázek 30:** Grafické znázornění relativní exprese mRNA genu pro receptor (IL-23R) u pacientů s progresí (J) a regresí (K) po dvou letech a u podskupin navzájem (L; C-kontrolní jedinci bez známek zánětu, Pp-pacienti, u kterých nastala po dvou letech progresse onemocnění, Pr-pacienti, u kterých nastala po dvou letech regrese onemocnění, medián znázorněn vodorovnou čarou).



Obrázek 31: Souhrnné znázornění mRNA relativní exprese genu pro receptor pro interleukin 23.

#### 4.4.4 Genotypizace

Jedním z možných důvodů zvýšené mRNA exprese IL-23R u pacientů s progredující formou je přítomnost funkčních polymorfismů v genu pro IL-23R. Asociace jednoho z funkčních polymorfismů v tomto genu (Agr381Gln, rs11209026) již byla nedávno popsána u pacientů s chronickou formou sarkoidózy na německé populaci (Fischer *et al.*, 2011). Zjišťovali jsme, zda tento polymorfismus a další funkční polymorfismus v tomto genu (rs10889677) hrají roli i u našich pacientů českého původu a mohou být příčinou jeho zvýšené genové exprese. Soubor pacientů, u kterých jsme provedli genotypizaci, tvořilo 118 pacientů, u nichž byl znám vývoj onemocnění po 2 letech (progrese n=67, regrese n=51).

Pro vybrané polymorfismy byly spočítány genotypové a alelické frekvence. Procentuální zastoupení genotypů u rs1120902 bylo GG 84%, GA 16% a AA 0% u regrese a GG 90%, GA 10% a AA 0% u progrese onemocnění. U druhého vybraného polymorfismu byly hodnoty procentuálního zastoupení genotypů CA 43%, AA 14% a CC 43% u regrese a CA 37%, AA 15% a CC 48% u progrese onemocnění. Zastoupení alel u rs11209026 bylo 92% alely G a 8% alely A u regrese a 95% alely G a 5% alely A u progrese. V případě druhého polymorfismu rs10889677 bylo 65% alely C a 35% alely A u regrese. U progrese byla alela C v zastoupení 66% a alela A 34% (**Tab. 16 a 17; Obr. 32-36**). Genotypové frekvence obou studovaných SNPs byly v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou ( $p > 0,05$ ). Ke statistickému vyhodnocení byl použit chí-kvadrát test. Alelické i genotypové frekvence se nelišily mezi pacienty se sarkoidózou, u kterých byla dosažena remise a u těch, kde došlo k progresi onemocnění.

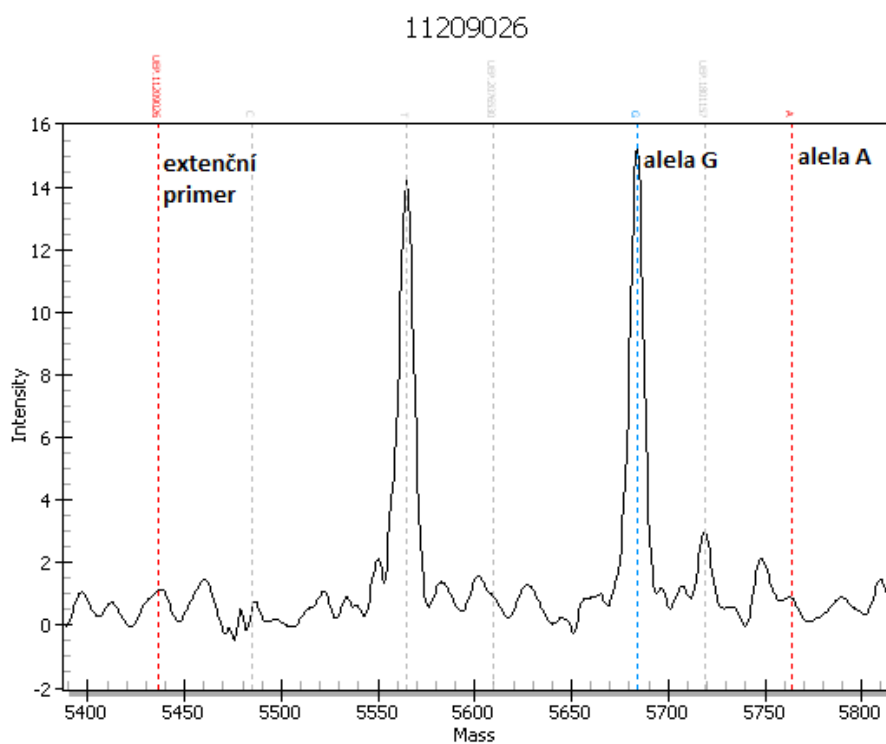
**Tabulka 16: Hodnoty vypočítaných frekvencí pro rs11209026.**

rs11209026	regrese		progrese	
	n (51)		n (67)	
<b>Genotypová frekvence</b>				
<b>GG</b>	43	0,84	60	0,90
<b>GA</b>	8	0,16	7	0,10
<b>AA</b>	0	0,00	0	0,00
<b>nosičství</b>				
<b>G</b>	51	1,00	67	1,00
<b>A</b>	8	0,16	7	0,10
<b>Alelická frekvence</b>				
<b>G</b>	94	0,92	127	0,95
<b>A</b>	8	0,08	7	0,05

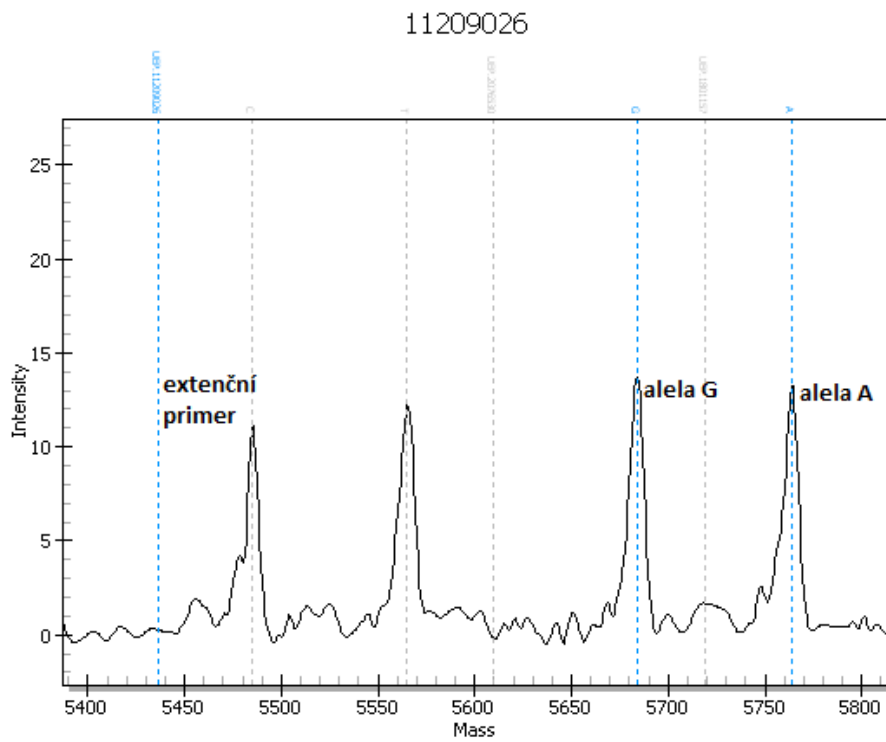


**Tabulka 17: Hodnoty vypočítaných frekvencí pro rs10889677**

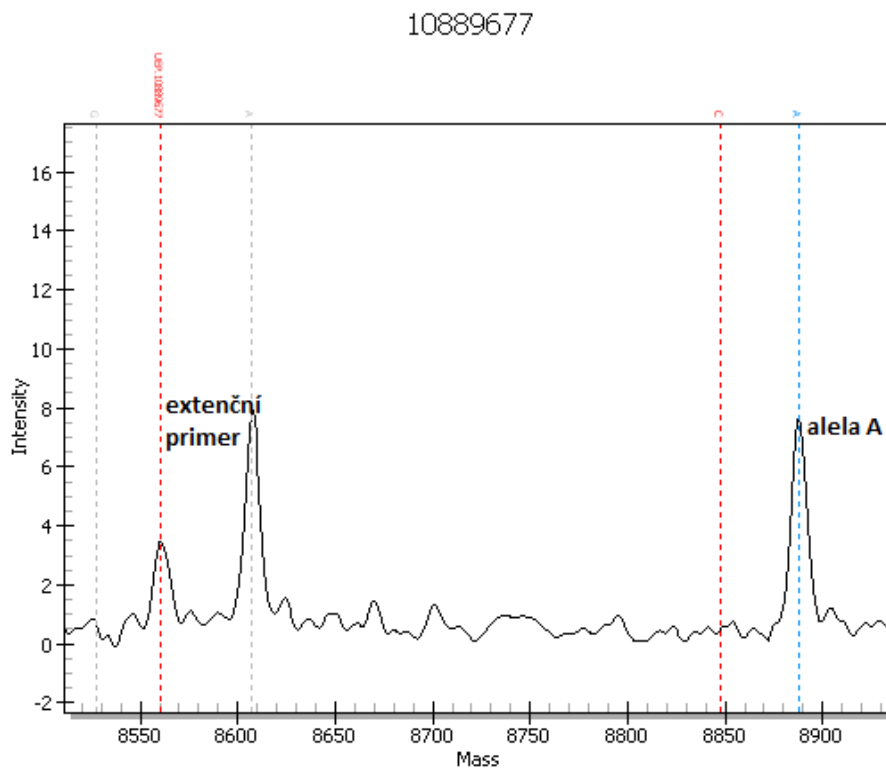
Rs10889677	Regrese		Progrese	
	n (51)		n (67)	
<b>Genotypová frekvence</b>				
CA	22	0,43	25	0,37
AA	7	0,14	10	0,15
CC	22	0,43	32	0,48
<b>nosičství</b>				
C	44	0,86	57	0,85
A	29	0,57	35	0,52
<b>Alelická frekvence</b>				
C	66	0,65	89	0,66
A	36	0,35	45	0,34



**Obrázek 32: Zobrazení homozygota pro alelu G u rs11209026.**

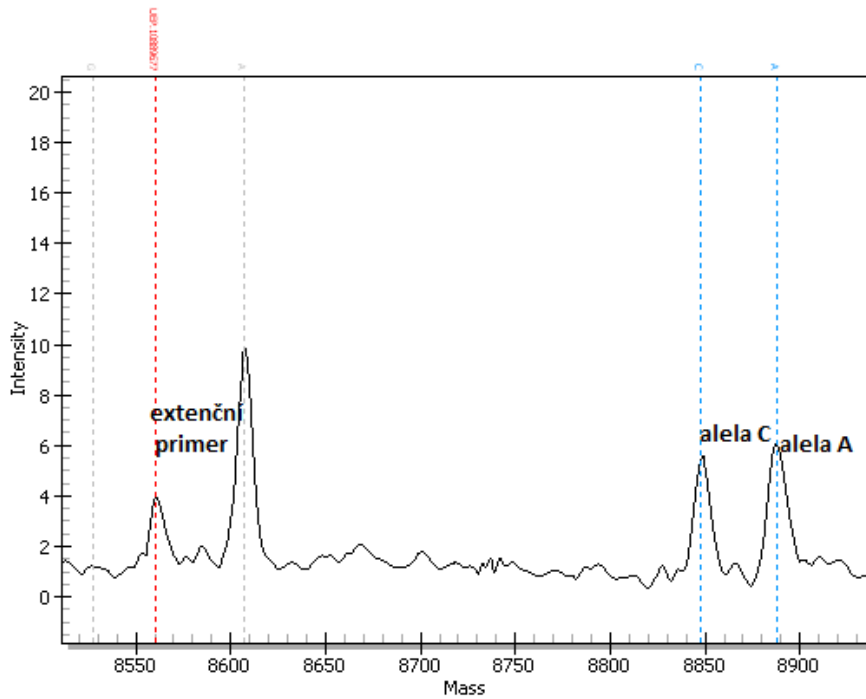


**Obrázek 33: Zobrazení heterozygota pro alely GA u rs11209026.**

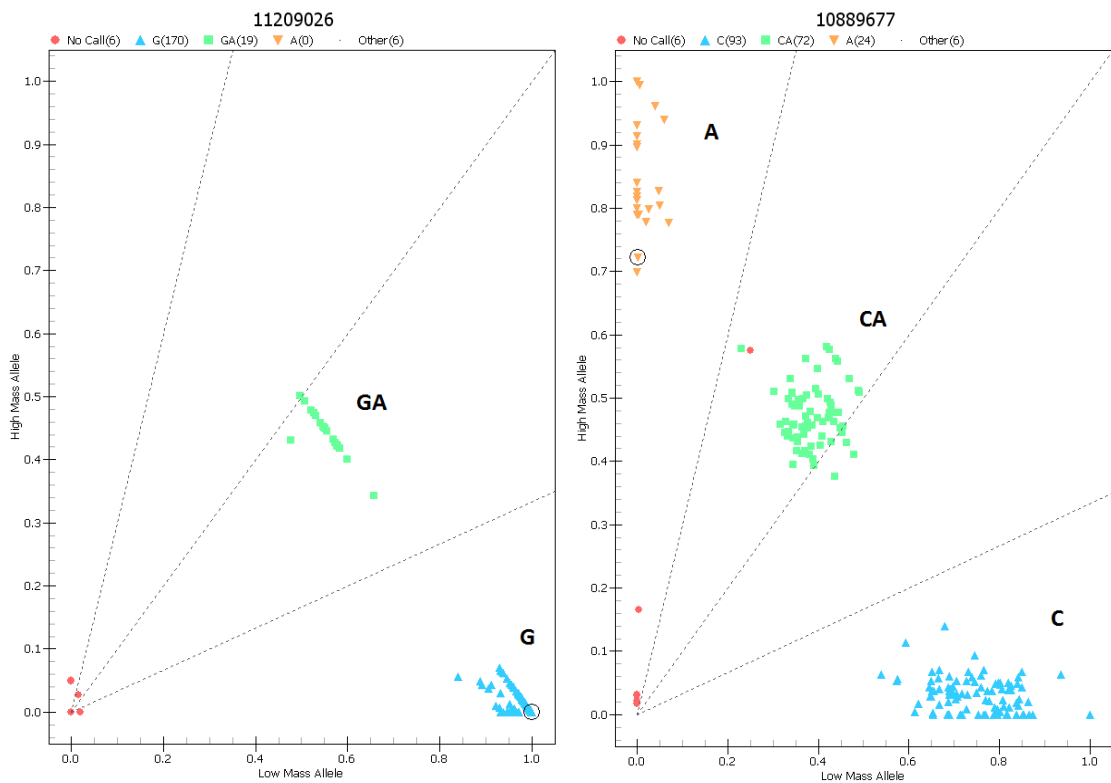


**Obrázek 34: Zobrazení homozygota pro alelu A u rs 10889677.**

10889677



Obrázek 35: Zobrazení heterozygota pro alely CA u rs10889677.



Obrázek 36: Diagram zastoupení příslušných genotypů u rs11209026 a rs10889677.

## 5 Diskuze

Diplomová práce se zabývá studiem kandidátních molekul účastnících se patogeneze onemocnění nazývaného sarkoidóza, která je řazena mezi multisystémové granulomatózní choroby s neznámou příčinou (Nunes *et al.*, 2007). Ačkoliv je sarkoidóza považována za Th1 imunitní onemocnění (Miyara *et al.*, 2006), nedávné studie prokázaly přítomnost Th17 buněk v patogenezi sarkoidózy (Facco *et al.*, 2011). Předpokládá se, že Th17 buňky by měly hrát velice důležitou roli v alveolitidě, tvorbě granulomů, ale zejména v progresivní formě onemocnění (Facco *et al.*, 2011; Judson *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2011).

V naší práci jsme se zaměřili na studium klíčových cytokinů v Th17 imunitní odpovědi, mezi něž patří interleukin 23 (IL-23) a jeho receptor (IL-23R). Dosud je velmi málo známo o úloze IL-23 a IL-23R u sarkoidózy. Z tohoto důvodu jsme sledovali expresní profil těchto dvou klíčových molekul v buňkách získaných bronchoalveolární laváží. Tato tekutina je vhodná pro sledování imunitní odpovědi přímo v místě, kde samotná zánětlivá reakce probíhá.

V našem souboru sedmdesáti čtyř pacientů se sarkoidózou a sedmnácti kontrolních jedinců bez známek zánětu jsme prokázali zvýšenou mRNA expresi IL-23 u sarkoidózy oproti kontrolním jedincům. Při srovnání s kontrolními jedinci byla pozorována zvýšená exprese IL-23 také u všech podskupin pacientů rozdělených dle rentgenologického stádia I-IV, přítomnosti Löfgrenova syndromu (LS) a vývoje onemocnění po dvou letech. Dále byla srovnána exprese u pacientů bez přítomnosti a s Löfgrenovým syndromem, což je akutní forma sarkoidózy s velmi dobrou prognózou. Exprese IL-23 se mezi těmito podskupinami pacientů nelišila. Stejný výsledek jsme získali u podskupin pacientů rozdělených dle vývoje onemocnění během dvou let sledování.

IL-23 je důležitým aktivátorem Th17 imunitní odpovědi a byla prokázána jeho klíčová role ve stabilizaci Th17 fenotypu (Yang *et al.*, 2007). Cytokin IL-23 je sekretován dendritickými buňkami a makrofágy po setkání s antigenem a přispívá k proliferaci Th17 lymfocytů (Oppmann *et al.*, 2000). Exprese IL-23 již byla studována u pacientů s kožní sarkoidózou (Judson *et al.*, 2011). Autoři popisují zvýšenou genovou expresi tohoto cytokinu v kožních lézích u osmi z dvanácti pacientů, ale rozdíl v expresi oproti kontrolním jedincům nedosahoval hladiny signifikance (Judson *et al.*, 2011). Jedná se však o velmi malý soubor, k získání větší výpovědní hodnoty týkající se IL-23 exprese by bylo nutné analyzovat větší soubor pacientů. U plicní sarkoidózy exprese tohoto cytokinu dosud nebyla sledována. Naše výsledky však prokázaly, že exprese IL-23 je zvýšena v buňkách bronchoalveolární laváže získaných u pacientů se sarkoidózou. Na

základě jeho popsané funkce aktivátoru Th17 buněk usuzujeme, že se může podílet na udržení a proliferaci Th17 buněk (Yang *et al.*, 2007) také u tohoto onemocnění. K podpoření této hypotézy bude nutno provést funkční studii.

Další ze studovaných molekul byl IL-23R, kterým je receptorem pro IL-23. Prokázali jsme zvýšenou mRNA expresi tohoto receptoru u pacientů se sarkoidózou oproti jedincům bez známek zánětu. Po rozdělení pacientů do podskupin dle rentgenologického stádia I-IV, přítomnosti Löfgrenova syndromu (LS) a vývoje onemocnění po dvou letech byla mRNA exprese zvýšena oproti kontrolním jedincům. Dále byla srovnána mRNA exprese u pacientů bez a s Löfgrenovým syndromem, která se nelišila mezi těmito dvěma skupinami. Velmi zajímavý byl nález zvýšené exprese IL-23R u pacientů s progresí onemocnění ve srovnání se skupinou pacientů, u nichž bylo dosaženo remise po dvou letech sledování.

IL-23R je exprimován na povrchu Th17 lymfocytů (Cesare *et al.*, 2009). Poslední výzkumy naznačují, že receptor IL-23R hraje důležitou roli ve směrování T-lymfocytů do fenotypu Th17 (Cesare *et al.*, 2009). Interakce mezi jeho ligandem IL-23 a IL-23R aktivuje JAK-STAT dráhu, při které dochází k regulaci transkripce některých genů (Cesare *et al.*, 2009). Jeden z nedávných výzkumů prokázal, že se Th17 buňky hromadí v granulomech společně s Th1 buňkami (Facco *et al.*, 2011). V této práci byla zkoumána skupina čtyřiceti pacientů se sarkoidózou a byli porovnáváni se zdravými kontrolami. Pacienti byli rozděleni na jedince s aktivní sarkoidózou, kteří měli vysoký stupeň alveolitidy, pacienty s inaktivní sarkoidózou a pacienty s chronickou formou nemoci. Byla zjištěna vyšší exprese receptoru IL-23R v alveolárních makrofázích i monocytech, získaných z periferní krve, u pacientů s aktivní formou sarkoidózy (Facco *et al.*, 2011). Mezi kontrolními jedinci a pacienty s inaktivní formou nebyl zjištěn rozdíl v mRNA expresi tohoto genu. V souladu s našimi výsledky italští autoři prokázali zvýšenou expresi IL-23R proteinu v bioptických tkáních pacientů s progredující formou nemoci (Facco *et al.*, 2011). U pacientů s regresí a lepší prognózou byla koncentrace IL-23R v plicní tkáni nízká. Tyto závěry podporují naše nálezy o klíčové roli IL-23R u progresu nemoci a bude určitě předmětem dalšího výzkumu.

Druhá část studie byla zaměřena na zkoumání možného vlivu dvou funkčních polymorfismů kandidátního genu IL-23R na jeho expresi. Přítomnost funkčních polymorfismů může ovlivňovat kvalitu i kvantitu mRNA, a tím i vzniklého proteinu. Proto jsme předpokládali, že námi zjištěná zvýšená exprese IL-23R může být důsledkem přítomnosti funkčních polymorfismů u pacientů s progresí nemoci. Navíc nedávná práce u německé populace prokázala asociaci rs11209026 v genu pro IL-23R s chronickou formou sarkoidózy (Fischer *et al.*, 2011).

První námi zkoumaný polymorfismus je rs10889677, který vede k záměně cyto-

sinu za adenin. Bylo zjištěno, že tento polymorfismus se podílí na imunopatogenezi řady onemocnění s imunitní složkou. Byla popsána jeho asociace s zvýšeným rizikem Crohnovy choroby (Duerr *et al.*, 2006), ankylozující spondylitidy (Brown, 2008) a ulcerózní kolitidy (Silverberg *et al.*, 2009). U sarkoidózy tento polymorfismus dosud studován nebyl. Genotypové frekvence tohoto SNP v našem studovaném souboru byly v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. U našich pacientů bylo zastoupení vzácné alely A 35% u pacientů s regresí a 34% u pacientů s progresí. Nanalezli jsme rozdíly mezi alelickou ani genotypovou frekvencí tohoto polymorfismu mezi oběma skupinami pacientů s různým vývojem onemocnění. Na základě našich výsledků usuzujeme, že se tento polymorfismus nepodílí na zvýšené expresi IL-23R u pacientů s progredující formou s horší prognózou.

Druhým studovaným funkčním polymorfismem v genu pro IL-23R byl polymorfismus rs11209026, který vede v aminokyselinové sekvenci k záměně argininu za glutamin v pozici 381 v intracelulární doméně IL-23R proteinu. Na německé populaci byla prokázána asociace tohoto polymorfismu s chronickou formou sarkoidózy (Fischer *et al.*, 2011). V rámci genomových studií byla prokázána asociace rs11209026 s ochrannou funkcí proti Crohnově chorobě (Duerr *et al.*, 2006). Z této studie vycházeli i Glas *et al.*, 2007, který asociaci s Crohnovou chorobou potvrdil. Také u ulcerózní kolitidy byla prokázána ochranná funkce alely A (Glas *et al.*, 2007). Na britské populaci byla popsána souvislost rs11209026 také s ochrannou funkcí proti psoriáze (Capon *et al.*, 2007). Záměna R381Q vede k narušení přenosu signálu mezi transmembránovou doménou a místem vazby JAK2 na cytoplazmatické doméně, a tím k nedostatečné fosforylaci STAT3 transkripčních faktorů. Důsledkem by tedy byla snížená hladina prozánětlivých cytokinů (IL-17A), které jsou charakteristickým znakem Th17 buněk (Pidashva *et al.*, 2011).

U našeho souboru pacientů se sarkoidózou jsme spočítali alelické a genotypové frekvence pro polymorfismus rs11209026. Genotypové frekvence tohoto SNP byly v našem studovaném souboru v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. Výskyt této vzácné alely v našem souboru pacientů českého původu odpovídá výskytu této alely v populaci německé (Fischer *et al.*, 2011). Nezaznamenali jsme však rozdíly mezi alelickými frekvencemi mezi oběma studovanými skupinami: výskyt vzácné alely A pro rs11209026 byl 8% u pacientů s regresí a 5% u pacientů s progresí onemocnění. Při srovnání genotypových frekvencí byl genotyp GG přítomen v 90% případů a genotyp GA u 10% případů progresivní sarkoidózy ve srovnání s přítomností genotypu GG v 84% a GA v 16% případů u remitujících pacientů s lepší prognózou. Naše výsledky podporují popsaný vliv alely A na vývoj onemocnění, jak bylo zjištěno v celogenomové studii u 1996 německých pacientů se sarkoidózou (Fischer *et al.*, 2011). Z důvodu na-

šeho malého souboru však genotypové frekvence rs11209026 u našich pacientů českého původu nedosáhly statistické significance mezi podskupinami s regresí a progresí. K potvrzení asociace rs11209026 s progresí sarkoidózy bude nutno do budoucnosti rozšířit skupinu pacientů.

V této práci jsme potvrdili zvýšenou expresi dvou klíčových molekul Th17 imunitní dráhy: IL-23 a IL-23R u plicní sarkoidózy. Exprese IL-23R byla zvýšena u progresující formy onemocnění, neprokázali jsme však vliv studovaných funkčních polymorfismů na zvýšení mRNA exprese. Studium Th17 buněk a molekul asociovaných s Th17 imunitní odpovědí u sarkoidózy bude jistě předmětem dalšího výzkumu.

## 6 Závěr

V teoretické části byly shrnuty dosavadní poznatky o plicním onemocnění sarkoidóza. Práce byla zaměřena na epidemiologii, etiologii a roli imunitních buněk a klíčových cytokinů v imunopatogenezi sarkoidózy. Sarkoidóza je řazena do komplexních chorob, což znamená, že v patogenezi onemocnění hrají důležitou roli jak vnější faktory, tak i genetická predispozice.

Cílem diplomové práce bylo studium mRNA relativní exprese cytokinu IL-23 a jeho receptoru pomocí kvantitativní RT-PCR v buňkách bronchoalveolární laváže u pacientů s plicní sarkoidózou a porovnání této exprese s jedinci bez známek zánětu. Dále porovnat expresi těchto molekul u podskupin pacientů dle klinického fenotypu (vývoj onemocnění po dvou letech, rentgenologické stádium, přítomnost akutní formy - Löfgrenův syndrom). Na závěr byla provedena genotypizace dvou funkčních polymorfismů v genu IL-23R u pacientů se sarkoidózou.

Naše studie prokázala zvýšenou mRNA expresi genu pro interleukin 23 ( $p=0,002$ ) i jeho receptoru ( $p<0,0001$ ) u pacientů se sarkoidózou oproti kontrolním jedincům. Při srovnání pacientů dle klinického vývoje onemocnění po dvou letech jsme pozorovali zvýšenou mRNA relativní expresi IL-23R u pacientů s progresí oproti pacientům s regresí ( $p=0,02$ ). Asociace zvýšené mRNA exprese IL-23R se zkoumanými funkčními polymorfismy v tomto genu (rs11289677 a rs10889677) nebyla potvrzena. V této práci jsme potvrdili zvýšenou expresi dvou klíčových molekul Th17 imunitní dráhy: IL-23 a IL-23R u plicní sarkoidózy, a to zejména u její progredující formy. Studium Th17 buněk a molekul asociovaných s Th17 imunitní odpovědí u sarkoidózy bude jistě předmětem dalšího výzkumu.

V rámci diplomové práce jsem se seznámila s následujícími technikami: zpracování biologického materiálu, izolace RNA z buněk bronchoalveolární laváže, izolace DNA z krve, reverzní transkripce, kvantitativní RT-PCR a genotypizací pomocí techniky MassArray, včetně statistického zpracování získaných dat a vedení klinické databáze.



## 7 Seznam použité literatury

- **Agostini C., Cabrelle A., Calabrese F., Bortoli M., Scquizzato E., Carraro S. et al.** (2005) Role for CXCR6 and its ligand CXCL16 in the pathogenesis of T-cell alveolitis in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* **172**: 1290–1298.
- **Akdis M., Burgler S., Cramer R., Eiwegger T., Fujita H., Gomez E. et al.** (2011) Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* **127**, 701-721.
- **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** (2008) Molecular biology of the cell. *Garland science*.
- **American Thoracic Society, European Respiratory Society and World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders.** Joint Statement on sarcoidosis. (1999) *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 736-755.
- **Bacon C., McVicar D., Ortaldo J., Rees R., O'Shea J., Johnston J.** (1995) Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J Exp Med* **181**, 399-404.
- **Bajčiová V.** (2008) Role bronchoalveolární laváže v diagnostice pneumopatií v dětské onkologii. *Onkologie* **2**, 117–121.
- **Boniface K., Blom B., Liu Y., Malefyt R.** (2008) From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited. *Immun reviews* **226**, 132-146.
- **Braasch D., Jensen S., Liu Y., Kaur K., Arar K., White M., Corey D.** (2003) RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* **42**, 7967-7975.
- **Brown M. A.** (2008) Breakthroughs in genetic studies of ankylosing spondylitis. *Rheumatol* **47**, 132–137.
- **Bustin S. A.** (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**, 169–193.
- **Bustin S. A.** (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* **29**, 23–39.
- **Bustin S. A.** (2004) A-Z of quantitative PCR. *Inter Univ Line* **5**, 4-29, 141–432.
- **Bustin S. A., Benes V., Garson J. A. et al.** (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinic Chem* **55**, 611-622.

- **Bustin S. A., Benes V., Nolan T., Pfaffl N. V.** (2005) Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol* **34**, 597-601.
- **Capon F., Di Meglio P., Szaub J., Prescott N. J., Dunster C., Baumber L., et al.** (2007) Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum Genet* **122**, 201-206.
- **Cesare A., Meglio P., Nestle F.** (2009) The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* **129**, 1339-1350.
- **Lewis C. I., Mattioli I., Gong J. H., Loetscher P.** (2003) Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* **3**, 289-295.
- **Costabel U., Guzman J., Drent M.** (2005) Diagnostic approach to sarcoidosis. *Eur Respir Mon* **32**, 259-264.
- **Coudurier M., Freymond N., Aissaoui S., Calender A., Pacheco Y., Devouassoux G.** (2009) Homozygous variant rs2076530 of BTNL2 and familial sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffus Lung Dis* **26**, 162-166.
- **Duerr R. H., Taylor K. D., Brant S. R., Rioux J. D., Silverberg M. S., Daly M. J., et al.** (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Sci* **314**, 1461-1463.
- **Facco M., Cabrelle A., Tfpieramo A., Olivieri V., Gnoato M., Teolato S., et al.** (2011) Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax* **66**, 144-150.
- **Fischer A., Nothnagel M., Franke A., Jacobs G., Saadati H. R., Gaede K. I. et al.** (2011) Association of inflammatory bowel disease risk loci with sarcoidosis, and its acute and chronic subphenotypes. *Eur respir j* **37**, 610-616.
- **Gabriel S., Ziaugra L., Tabbà D.** (2009) SNP Genotyping Using the Sequenom MassARRAY iPLEX Platform. *Curr Protoc Hum Genet* **60**, 2.12.1-2.12.18.
- **Gardner J., Kennedy H., Hamblin A., Jones E.** (1984) HLA association in sarcoidosis: a study of two ethnic groups. *Thorax* **39**, 19-22.
- **Glas J., Seiderer J., Wetzke M., Konrad A., Torok H. P., Schmechel S., et al.** (2007) rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS One* **2**, e819.
- **Gubler U., Presky D. H.** (1996) Molecular biology of interleukin-12 receptors. *Ann N Y Acad Sci* **795**, 36-40.

- **Hofmann S., Franke A., Fischer A., Jacobs G., Nothnagel M., Gaede K., et al.** (2008) Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. *Nat Genet* **40**, 1103-1106.
- **Hořejší V., Bartůňková J.** (2009) *Základy imunologie*, pp. 23-32. Triton, Praha.
- [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/fm\\_1560.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/fm_1560.pdf)
- <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/0/07/Taqman.png>
- <http://www.corbette-research.com>
- <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/dna-probes/product-lines/lna-probes/locked-nucleic-acids-faq.html>
- <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/bronchoalveolarni-lavaz-moznosti-a-rizika-provedeni-interpretace-nekterych-vysledku-455842>
- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/9138.htm>
- **Hutchinson J.** (1877) Anomalous diseases of skin and fingers: case of livid papillary psoriasis? *Illustrations of Clinical Surgery*. London, J and A Churchill pp. 42–43.
- **Iannuzzi M., Maliarik M., Poisson L., Rybicki B.** (2003) Sarcoidosis susceptibility and resistance HLA-DQB1 alleles in African Americans. *Am J Respir Crit Care Med*. **167**, 1225-1231.
- **Ivanov I. I., Zhou L., Littman D. R.** Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation (2007a) *Semin Immunol* **19**, 409-417.
- **Ivanov S., Bozinovski S., Bossios A., Valadi H., Vlahos R., Malmhäll C., et al.** (2007b) Functional relevance of the IL-23-IL-17 axis in lungs *in vivo*. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**, 442–451.
- **Jansen T. L., Geusens P.** (2005) Sarcoidosis: joint, muscle and bone involvement. *Eur Respir Mon* **10**, 210-219.
- **Jílek P.** (2005) *Základy imunologie*, pp. 6-16. Vydáno ve spolupráci se společností Ewopharma s. r. o.
- **Judson M. A., Marchell R. M., Mascelli M., Piantone A., Barnathan E. S., Petty K., et al.** (2011) Molecular profiling and gene expression analysis in cutaneous sarcoidosis: The role of interleukin-12, interleukin-23, and the T-helper 17 pathway. *J Am Acad Dermatol* (in press)
- **Kolek V.** (2007) Sarkoidóza – dosud nepoznaná (1) *Interní Med* **9 (6)**, 276-279.
- **Kolek V.** (2007) Sarkoidóza – dosud nepoznaná (2) *Interní Med*. **9 (7-8)**, 310-313.

- **Lane N., Robins R. A., Corne J., Fairclough L.** (2010) Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of regulatory T-cells and Th17 cells. *Clini Sci* **119**, 75-86.
- **Langrish C. L., McKenzie B. S., Wilson N. J., de Waal Malefyt R., Kastelein R. A., Cua D. J.** (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* **202**, 96–105.
- **Latorra D., Arar, K., Hurley, J.** (2003) Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol Cell Probes* **17**, 253-259.
- **Lynch J., White E.** (2005) Pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir Mon* **32**, 105-129.
- **Mangan P. R., Harrington L. E., O’Quinn D. B.** (2006) Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage. *Nature* **441**, 231–234.
- **Miyara M., Amoura Z., Parizot C., et al.** (2006) The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J Exp Med* **203**, 359-370.
- **Moller D. R., Forman J. D., Liu M. C., Noble P. W., Greenlee B., Vyas P., et al.** (1996) Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* **156**, 4952-4960.
- **Morgenthau A. S., Iannuzzi M. C.** (2011) Recent Advances in Sarcoidosis. *Chest* **139**, 174–182.
- **Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L.** (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-2357.
- **Mosmann T. R., Sad S.** (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* **17**, 138–146.
- **Mrázek F., Šťahelová A., Kriegová E., Fillerová R., Žurková M., Kolek V., Petřek M.** (2011) Functional variant ANXA11 R230C: true marker of protection and candidate disease modifier in sarcoidosis. *Genes Immun* **12**, 490-494.
- **Nachar N.** (2008) The Mann-Whitney U: A Test for Assessing Whether Two Independent Samples Come from the Same Distribution. *Tut Quant Met Psychol* **4**, 13-20.
- **Newman L. S.** (2005) Aetiologies of sarcoidosis. *Eur Respir Mon* **32**, 23-48.
- **Nunes H., Bouvry D., Soler P., Valeyre D.** (2007) Sarcoidosis. *Orphanet J Rare Dis* **2**, 46.
- **Oppmann B., Lesley R., Blom B., Timans J. C., Xu Y., Hunte B. et al.** (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**, 715–725.

- **Parham C., Chirica M., Timans J., Vaisberg E., Travis M., Cheung J., et al.** (2002) A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* **168**, 5699–5708.
- **Parida M. M., Santhosh S. R., Dash P. K., Lakshmana Rao P. V.** (2008) Assays for detection and quantification of chikungunya virus: TaqMan Real-time RT-PCR. *Future Virol* **3(2)**, 179-192.
- **Petřek M., Drábek J., Kolek V., Zlámál J., Welsh K. I., Bunce M., et al.** (2000) CC chemokine receptor gene polymorphisms in Czech patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 1000–1003.
- **Pidasheva S., Trifari S., Phillips A., Hackney J. A., Ma Y., Smith A., et al.** (2011) Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q. *PLoS ONE* **6**, e25038.
- **Pirhonen J., Matikainen S., Julkunen I.** (2002) Regulation of virus-induced IL-12 and IL-23 expression in human macrophages. *J Immunol* **169**, 5673–5678.
- **Robinson B. W. S., McLemore T. L., Crystal R. G.** (1985) Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest* **75**, 1488-1495.
- **Rouvier E., Luciani M. F., Mattéi M. G., Denizot F., Golstein, P.** (1993) CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* **150**, 5445–5456.
- **Rybicki B., Major M., Popovich J., Maliarik M., Iannuzzi M.** (1997) Racial Differences in Sarcoidosis Incidence: A 5-Year study in a health maintenance organization. *A J Epidemiol* **145**, 234–241.
- **Sato H., Grutters J., Pantelidis P., Mizzon A., Ahmad T., van Houte A., et al.** (2002) HLA-DQB\*0201: A marker for good prognosis in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**, 406-412.
- **Sharma O. P.** (2005) Renal sarcoidosis and hypercalcaemia. *Eur Respir Mon* **32**, 220-232.
- **Sharma O. P.** (2005) Definition and history of sarcoidosis. *Eur Respir Mon* **32**, 1–12.
- **Shigehara K., Shijubo N., Ohmichi M., Yamada G., Takahashi R., Okamura H., et al.** (2000) Increased Levels of Interleukin-18 in Patients with Pulmonary Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 1979–1982.

- **Silverberg M. S., Cho J. H., Rioux J. D., McGovern D. P., Wu J., Annese V., et al.** (2009) Ulcerative colitis loci on chromosomes 1p36 and 12q15 identified by genome-wide association study. *Nat Genet* **41**, 216–220.
- **Skříčková J., Kolaříková R.** Standardní postup při provádění bronchoalveolární laváže (BAL) a vyšetřování bronchoalveolární tekutiny (BAT).
- **Spatafora M., Merendino A., Chiappara G., Gjomarkaj M., Melis M., Bellia V., Bonsignore G.** (1989) Lung compartmentalization of increased TNF releasing ability by mononuclear phagocytes in pulmonary sarcoidosis. *Chest* **96**, 542-549.
- **Tang Ch., Chen S., Qian H., Huang W** (2011) Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunol* **135**, 112–124.
- **Thomeer M., Demedts M., Wuyts W.** (2005) Epidemiology of sarcoidosis. *Eur Respir Mon* **32**, 13-22.
- **Torti D. C., Feldman S. R.** (2007) Interleukin-12, interleukin-23, and psoriasis: current prospects. *J Am Acad Dermatol* **57**, 1059–1068.
- **Vácha M., Fellnerová I., Bičík V., Petrásek R., Šimek V.** (2010) Srovnávací fyziologie živočichů. Masarykova univerzita Brno.
- **Vosse E., Lichtenauer-Kaligis E. G., Dissel J. T., Ottenhoff T. H.** (2003) Genetic variations in the interleukin-12/interleukin-23 receptor (b1) chain, and implications for IL-12 and IL-23 receptor structure and function. *Immunogen* **54**, 817–829.
- **Yang L., Yang X., Panopoulos A., Nurieva R., Chang S., Wang D., Watowich S., et al.** (2007) STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* **282**, 9358-9363.
- **Yao Z., Painter S., Fanslow W. C., Ulrich D., Macduff B. M., Spriggs M., Armitage, R. J.** (1995) Human IL-17, novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* **155**, 5483–5486.
- **Zhu Z., Bin Z., Jian Z., Yue Ch., Ting L., Li Y., et al.** (2010) Association of interleukin-23 receptor gene polymorphisms with risk of ovarian cancer. *Elsevier Inc* **196**, 146-152.
- **Zou J., Presky D. H., Wu C. Y., Gubler U.** (1997) Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *J Biol Chem* **272**, 6073–6077.

## 8 Seznam použitých zkratek

APC	antigen prezentující buňky
CCL	chemokinový ligand
CCR	chemokinový receptor
CD4+	T-lymfocyty s CD4 receptorem na svém povrchu
CD8+	B-lymfocyty s CD8 receptorem na svém povrchu
CRP	C reaktivní protein
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 8
CXCR	chemokinový receptor (C-X-C motiv)
GATA3	transkripční faktor
IL	interleukin
INF	interferon
Jak	Janusova kinasa
LS	Löfgrenův syndrom
MHC	major histocompatibility systém, glykoproteiny exprimovány na všech jaderných buňkách
NK	natural killers (přírozeně cytotoxické buňky)
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tc	cytotoxické T-lymfocyty (cytotoxic)
Th	pomocné T-lymfocyty (helper)
TNF	tumor nekrotizující faktor
Treg	regulační T-lymfocyty
Tyk	tyrosin kinasa
HLA	hlavní histokompatibilní systém člověka