

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biologie

Katedra antropologie a genetiky člověka



Diplomová práce

Predikce diabetes mellitus 1. typu pomocí expresního profilu periferních leukocytů

Prediction of type 1 diabetes mellitus by expression profile of peripheral leukocytes

Bc. Veronika Šornová

Školitelka: Ing. Anna Katarzyna Kotrbová-Kozak, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 29.4.2016

.....

Bc. Veronika Šornová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Anně Katarzyně Kotrbové-Kozak, Ph.D. za věnovaný čas, odborné vedení v průběhu celého zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala všem členům laboratoře Obecné biologie a genetiky na 3. lékařské fakultě za cenné rady, trpělivost a pomoc při zpracovávání výsledků a doc. MUDr. Marii Černé, CSc. za umožnění vypracování této práce na jejím oddělení.

V neposlední řadě děkuji celé své rodině za podporu a pomoc v průběhu celého studia.

Abstrakt

Úvod: Diabetes 1. typu (T1D) je autoimunitní onemocnění, kdy buňky vlastního imunitního systému napadají β -buňky pankreatu. Tím že dojde k destrukci β -buněk, tak nedojde k tvorbě inzulínu, který slouží ke snižování hladin cukru v krvi. Jedná se o komplexní onemocnění, kdy na jeho patogenezi se účastní jak genetické faktory tak i vnější prostředí. Navíc v posledních letech narůstá počet jedinců s T1D na celé planetě.

Cíle: Cílem této diplomové práce je zjistit zda lze využít expresní profil kandidátních genů *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3P*, *EIF3A* a *TXNDC5*, které se určitým způsobem podílejí na vývoji buněk imunitního systému nebo tvorbě inzulínu, za účelem predikce onemocnění T1D. Dalším cílem je porovnat expresi kandidátních genů mezi dětmi (první záchyt onemocnění) a dospělými (dlouhodobější projev T1D). Posledním cílem je porovnat expresi jednotlivých kandidátních genů u jedinců s rizikovými HLA alely *DR04*, *DR03*, *DQA*05:01* a *DQB*0302*.

Metody: Z krve pacientů s T1D a ZK byla izolována DNA a RNA. Získaná DNA byla využita k HLA genotypizaci. RNA byla po izolaci přepsána do cDNA pomocí reverzní transkripce a poté použita na real-time PCR pro zjištění relativní úrovně exprese mRNA kandidátních genů.

Závěr: Byly pozorované signifikantní rozdíly v expresi genů *BACH2*, *CDC20* a *TXNDC5* mezi nemocnými dětmi a nemocnými dospělými. Je to zřejmě dáno odlišnou expresí před a po léčbě inzulínem. Dále byly zjištěny signifikantní rozdíly v expresi genu *BACH2* u jedinců nesoucích rizikové alely HLA *DR03* a *DQA1*05:01*, (druhý nejfrekventovanější haplotyp ve studii) a významné rozdíly v expresi genu *IGLL3P* u osob s haplotypem *DR04-DQB1*03:02* (nejfrekventovanější haplotyp ve studii).

Klíčová slova: Diabetes 1. typu, predikce, *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3P*, *EIF3A*, *TXNDC5*, HLA haplotypy

Abstract

Background: Type of 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease in which the cells of immune system attack the β -cells of pancreas. Consequently, destroyed β -cells do not produce insulin to reduce blood sugar levels. This disease is very complex, the pathogenesis is contributed by both genetic factors and environmental factors. In recent years, the number of individuals with T1D is increasing worldwide.

Aims: The aim of this thesis was to investigate whether it is possible to predict T1D based on the expression profile of *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3P*, *EIF3A* and *TXNDC5* genes, which are involved in the development of immune system cells and insulin production. Another aim was to compare the expression of selected genes in children, in which the first detection of the disease may be done, and adults who suffer from prolonged T1D. The final goal was to compare the expression of individual selected genes in the HLA risk alleles *DR04*, *DR03*, *DQA*05:01* and *DQB*03:02*.

Methods: The DNA and RNA of patients with T1D and healthy individuals was isolated from blood. DNA was used to HLA genotyped. Isolated RNA was reverse transcribed into cDNA and then used in real-time PCR to determine the relative levels of gene expression.

Conclusion: Significant results were obtained when the expression of *BACH2*, *CDC20* and *TXNDC5* genes was compared between T1D children and T1D adults. It is probably because of different expression before and after treatment with insulin. Significant differences were further recorded with *BACH2* expression in the individuals harboring risk HLA alleles *DR03* and *DQA1*05:01* (the second most frequent haplotype in the study) and *IGLL3P* expression in the *DR04* and *DQB1*03:02* individuals (the most frequently haplotype in the study).

Key words: Type of 1 diabetes, prediction, *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3P*, *EIF3A*, *TXNDC5*, HLA haplotype

Obsah

Seznam zkratk.....	8
Literární úvod	9
1.1 Diabetes mellitus.....	9
1.2 Epidemiologie T1D.....	10
1.3 Léčba T1D	12
1.4 Predispozice k T1D.....	14
1.4.1 Genetické faktory	14
1.4.2 Vnější faktory prostředí	16
1.5 Kandidátní geny pro vznik T1D	16
1.5.1 Gen <i>TXNCD5</i>	18
1.5.2 Gen <i>CDC20</i>	18
1.5.3 Gen <i>IGLL3</i>	19
1.5.4 Gen <i>EIF3A</i>	19
1.5.5 Gen <i>BACH2</i>	19
2 Cíle a hypotézy.....	21
3 Materiál a metody	22
3.1 Subjekt studie	22
3.2 Použité laboratorní přístroje a vybavení	22
3.3 Použité počítačové programy.....	23
3.4 Použité chemikálie, enzymy a komerční soupravy.....	23
3.4.1 Obecné chemikálie	25
3.5 Metody	26
3.5.1 Izolace DNA vysolovací metodou	26
3.5.2 Izolace DNA kolonkovou metodou	27
3.5.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA	28
3.5.4 Genotypizace HLA.....	28
3.5.5 Elektroforetická separace DNA	29
3.5.6 Izolace RNA z leukocytů z periferní krve	30
3.5.7 Reverzní transkripce	31
3.5.8 Real-time PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase)	32
3.6 Statistické zpracování	33
4 Výsledky.....	34

4.1 HLA Genotypizace.....	34
4.2 Kvantitativní PCR	36
4.2.1 Výběr endogenní kontroly.....	37
4.2.2 Analýza úrovně exprese mRNA genu <i>BACH2</i>	37
4.2.3 Analýza úrovně exprese mRNA genu <i>CDC20</i>	43
4.2.4 Analýza úrovně exprese mRNA genu <i>IGLL3P</i>	48
4.2.5 Analýza úrovně exprese mRNA genu <i>EIF3A</i>	53
4.2.6 Analýza úrovně exprese mRNA genu <i>TXNDC5</i>	58
5 Diskuze.....	63
6 Souhrn	67
Seznam použité literatury	68
Internetové zdroje.....	74

Seznam zkratk

BMI	Index tělesné hmotnosti
DNA	Deoxyribonukleotidová kyselina
EDTA	Etylenediaminetetraacetic acid
GAD65	Dekarboxyláza kyseliny glutamové
HLA	Lidský leukocytární antigen
IA-2	Tyrosin fosfatáza
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
LADA	Latentní autoimunitní diabetes v dospělosti
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RNA	Ribonukleotidová kyselina
T1D	Diabetes 1. typu
T2D	Diabetes 2. typu
WHO	Světová zdravotnická organizace

Literární úvod

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je klasifikován do 4 základních typů: diabetes mellitus 1. typu (T1D), diabetes mellitus 2. typu (T2D), ostatní specifické typy diabetu a gestační diabetes mellitus.

Podle statistik organizace WHO (World Health Organization, Světová zdravotnická organizace) v roce 2014 bylo zjištěno, že 9 % dospělých starších 18 let trpí diabetem, v roce 2012 bylo odhadnuto, že 1,5 miliónu úmrtí způsobil diabetes a že zdravá strava, pravidelná fyzická aktivita, udržování normální tělesné hmotnosti a omezení užívání tabáku může zabránit nebo oddálit nástup diabetu 2. typu (WHO, [online]).

Diabetes 1. typu (T1D) je chronické multifaktoriální autoimunitní onemocnění, kdy dochází k destrukci endokrinních β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, které produkují inzulín. Imunitní systém, buněčného i protilátkového typu, začne reagovat a ničit vlastní buňky těla. Absolutní nedostatek inzulínu vede k tomu, že se zvýší hladina glukózy v krvi (hyperglykémie) a posléze dojde k překročení prahu v ledvinách a glukóza se dostane do moče (glykosurie). Ideální hladina glukózy v krvi na lačno je 4 až 5 mmol/l, lehce zvýšená hladina je 5,6 až 7 mmol/l a při hladině glukózy nad 7 mmol/l je diagnostikován T1D.

Patogeneze T1D zahrnuje komplexní souhru genetických a environmentálních faktorů. Manifestace onemocnění je provázena nízkou hladinou cirkulujícího inzulínu v krvi, vysokými hyperglykémiami a subjektivními potížemi jako je polydipsie (nadměrná žízeň), polyurie (vyučování více než 150 % obvyklého objemu moči za časovou jednotku v závislosti na příjmu potravin), únava a hubnutí. Prvním příznakem onemocnění může být ketoacidóza (vysoká koncentrace ketolátek v těle), která nastává při nedostatku glukózy ve tkáních. Markery imunitní destrukce β -buněk zahrnují sérové autoprotilátky proti inzulínu, *GAD65* (glutamic acid decarboxylase, dekarboxyláze kyseliny glutamové) a tyrozin-fosfatáze (*IA-2*).

T1D se objevuje v dětství, kdy je jedním z nejčastějších onemocnění, ale i v období dospívání. Pokud se T1D projeví v pozdějším věku, je nazýván LADA (latent autoimmune diabetes in adults). Jedná se o pomalu progresující autoimunitní diabetes s postupným zánikem sekrece inzulínu. Postižení pacienti bývají často diagnostikovány jako T2D, kvůli manifestaci až v dospělém věku a léčby bez inzulínu. LADA je charakterizován nástupem po 30. roce, absencí ketoacidózy, inzulínovou nezávislostí po dobu alespoň 6 měsíců a přítomností cirkulujících protilátek *GADA* (glutamic acid decarboxylase

antibody), (Fourlanos et al., 2005). Odlišení pacientů s LADA od pacientů s T1D je na základě doby nasazení léčby inzulínem, kdy pacienti s T1D vyžadují inzulín hned od doby stanovení diagnózy.

Bylo zjištěno, že podskupiny autoimunitního diabetu mají částečně odlišné imunogenetické predispozice. U pacientů s LADA byla zjištěna jako predispoziční HLA alela *DRB1*03*, u jedinců s T1D je riziková alela *DRB1*04*, která je ve vazebné nerovnováze s *DQB1*03:02* (Černá et al., 2007).

Ani u diabetes 2. typu (T2D) nejsou jednoznačně vysvětleny všechny etiopatologické aspekty. Jde o chronické komplexní onemocnění, kdy hlavními rizikovými faktory jsou pohybová neaktivita, vysokotučná strava, věk nad 45, alkoholismus, BMI (body mass index, index tělesné hmotnosti) nad 27, centrální typ obezity a výskyt T2D v rodinné anamnéze. Příčinou onemocnění je rezistence vůči působení inzulínu a nedostatečná odpověď inzulínové sekrece. Jde o formu diabetu, která se vyskytuje u 90 - 95 % pacientů s diabetem. Většina pacientů je obézních a obezita způsobuje určitý stupeň inzulínové rezistence. Hyperglykémie se u těchto pacientů vyvíjí postupně a na nižším stupni, proto může být delší dobu u pacientů nedagnostikována. Pacienti s T2D mají vysoké riziko rozvoje vaskulárních komplikací (Chen et al., 2015; Rigato et al., 2015). Inzulínová rezistence se může zlepšit snížením tělesné hmotnosti.

Byl prokázán mírně příznivý vliv příjmu ovsa, který má vysoký obsah rozpustné vlákniny, beta-glukanu a některých stopových prvků jako je hořčík, na kontrolu glykémie a lipidového profilu u pacientů s T2D. S příjmem ovsa je spojeno i mírné snížení tělesné hmotnosti a BMI, ale je nutné přesné vážení spotřeby ovsa u jednotlivců (Hou et al., 2015).

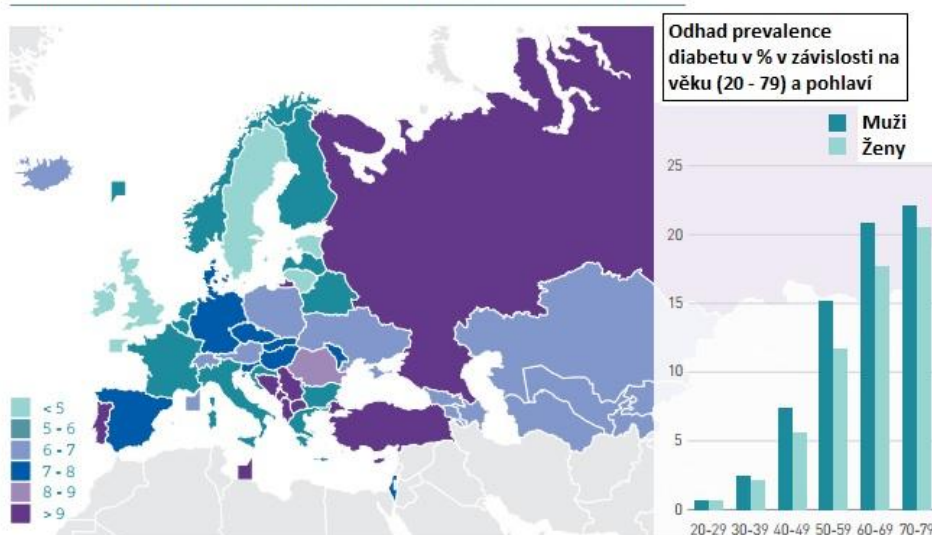
1.2 Epidemiologie T1D

V posledních letech bylo zjištěno, že v průmyslově vyspělých zemích se zvyšuje výskyt autoimunitních onemocnění jako je T1D. To naznačuje, že jen genetická predispozice nestačí, ale má zde také důležitou roli environmentální prostředí. Vnější prostředí může působit jako spouštěč onemocnění. Příkladem může být znečištěné ovzduší, stres, virové a bakteriální onemocnění a špatný životní styl. Výskyt T1D u dětí se neustále zvyšuje.

V minulých letech byla zhotovena studie, která zjišťovala nárůst T1D u evropských dětí v období 1989 - 2003. Bylo zjištěno, že nárůst byl o 3,9 % a na základě těchto údajů byla

předložena hypotéza, že mezi roky 2005 a 2020 se výskyt u dětí v Evropě zdvojnásobí (Patterson et al., 2009). V roce 2015 byl proveden odhad jedinců s diabetickým onemocněním pro evropskou populaci. Nejnižší prevalence, pod 5 %, je ve Velké Británii, Irsku a Švédsku, viz **obrázek č. 1**.

Odhad komparativní prevalence diabetu v % (věk 20 - 79), rok 2015



Obrázek č. 1: Odhad výskytu diabetu v % v evropské populaci a odhad prevalence diabetu v závislosti na pohlaví a věku (20 - 79). Nejnižší prevalence je zobrazena světle modrou, čím tmavší odstín modré až fialový odstín, tím vyšší prevalence diabetu v Evropě. Ve sloupcovém grafu je vidět se zvyšujícím věkem zvyšující se riziko onemocnění diabetu. Muži mají častější výskyt než ženy i se zvyšujícím se věkem. (Upraveno podle International Diabetes Federation [online]).

V rámci statistického zjišťování v roce 2013 bylo zjištěno, že v České republice narůstá počet lidí s diagnostikovaným diabetem, jak je vidět v **tabulce č. 1**. Celkový počet pacientů s diabetem v České republice bylo 861 647, T1D mělo 58 901 pacientů a T2D mělo 789 900 pacientů.

Pohlaví	Diabetes mellitus celkem	Primární diabetes mellitus				Sekundární diabetes mellitus		Porucha glukózové tolerance
		I. typu		II. typu		počet pacientů	%	
	počet pacientů	počet pacientů	%	počet pacientů	%			počet pacientů
Muži	411 968	29 798	7,2	375 153	91,1	7 017	1,7	29 991
Ženy	449 679	29 103	6,5	414 747	92,2	5 829	1,3	35 278
Celkem	861 647	58 901	6,8	789 900	91,7	12 846	1,5	65 269

Tabulka č. 1 – Počet diabetiků v České republice (upraveno podle Ústavu zdravotnických informací a statistik ČR [online]).

1.3 Léčba T1D

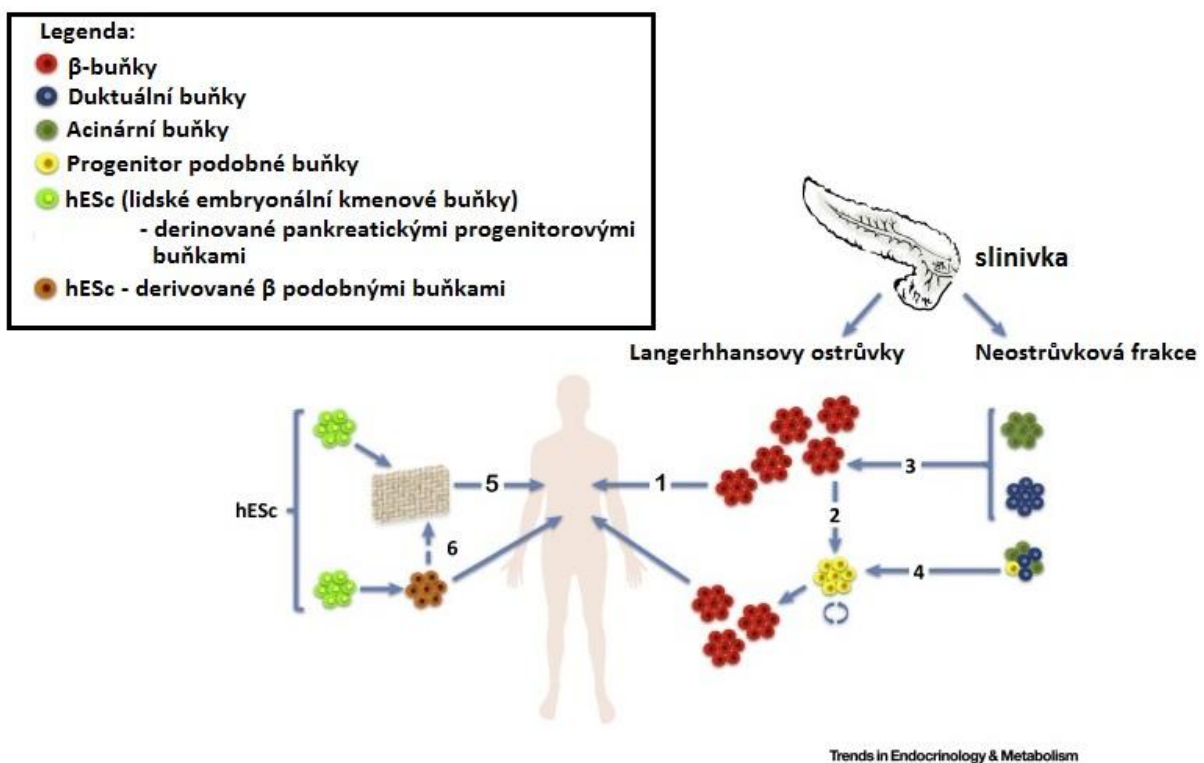
V poslední době je mnoho výzkumů ohledně léčby autoimunitních chorob včetně T1D. Jelikož β -buňky pankreatu, zničené imunitním systémem, neprodukují inzulín, základní léčba T1D je injekční podání inzulínu. Obvykle se aplikuje podkožně, do svalů.

Pokud pacient nedokáže zlepšit svou glykémii, doporučuje se aplikovat inzulínovou pumpu. Inzulínová pumpa je malé elektronické zařízení, které může pomoci věrněji napodobit sekreci inzulínu z pankreatu. Kontinuální podkožní inzulínová infuze nahrazuje potřebu častého podání injekcí. Pumpa neustále dodává do těla přesné množství inzulínu odpovídající potřebám organismu. V 70. letech 20. století byly první experimenty s inzulínovou pumpou. Cílem bylo dosáhnout dlouhodobější období, kdy by se udržela glykémie přibližně v normě (Pickup et al., 1978). V České republice proběhlo v roce 2014 monitorování diabetických pacientů léčených inzulínovou pumpou. Bylo zjištěno, že pacienti s pumpou si poměrně často kontrolují glykovaný hemoglobin a průměrně si měří glykémii 2 až 3 krát denně (Rušavý et al., 2015). Inzulínové pumpy jsou používány jak u dětí, tak u dospívajících s T1D (Sherr et al., 2016).

Jednou z léčebných možností u pacientů s těžkým průběhem choroby a komplikacemi je transplantace celého pankreatu nebo jen samostatných Langerhansových ostrůvků. Transplantace celého pankreatu je sice náročnější kvůli operaci, možným komplikacím a složitému uchycení nového pankreatu, za to úspěšnější než transplantace samostatných Langerhansových ostrůvků, kdy pacient se nemusí definitivně zbavit injekčního podávání inzulínu. V České republice probíhá intenzivní výzkum v Institutu klinické a experimentální medicíny, IKEM, (Girman and Saudek, 2011). U pacientů s dlouhodobě zvýšenou glykemií může dojít k rozvoji chronického onemocnění ledvin, diabetické nefropatie, a ke konečnému selhání ledvin. U těchto pacientů se transplantují kromě pankreatu i ledviny. Je to technicky náročný postup, který je spojen s komplikacemi, ale je považován za lepší variantu než celoživotní dialýza (Chan et al., 2016).

Současným standardem je transplantace Langerhansových ostrůvků (**obrázek č. 2**, krok 1). Langerhansovy ostrůvky s β -buňkami (červené buňky) jsou čištěny a izolovány z mrtvého pankreatu (Shapiro et al., 2000) a dány do jater pacienta prostřednictvím infuze

přes portální žílu. Strategie, kdy dojde k dediferenciaci buněk ostrůvků do progenitor podobných buněk s následnou proliferací a rediferenciací, stejně jako replikace β -buněk (**obrázek č. 2**, krok 2), jsou v současné době studovány před transplantací. Neostrůvková frakce obsahuje více subpopulací, které podléhají konverzi na β -buňky. Příkladem jsou acinární (tmavě zelené buňky) nebo duktuální buňky (tmavě modré buňky), (**obrázek č. 2**, krok 3). Progenitor podobné buňky přítomné v exokrinním prostoru (žluté buňky) by mohly být in vitro namnoženy k transplantaci (**obrázek č. 2**, krok 4). Nejrozvinutějším alternativním zdrojem nových β -buněk pankreatu jsou lidské embryonální kmenové buňky (světle zelené buňky), hESc (human embryonic stem cells). Existují slibné klinické studie zkoumající kmenové buňky, které se mění v buňky produkující inzulín (Kroon et al., 2008; Pagliuca et al., 2014; Rezania et al., 2014), což by mohla být revoluční změna v léčbě T1D.



Obrázek č. 2 : Grafické znázornění potenciální buněčné terapie výměny β -buněk (Upraveno podle Domínguez-Bendala et al., 2016).

Vědci se rovněž snaží vynalézt nové způsoby aplikace inzulínu do těla. Mezi nové trendy pro systém aplikátoru inzulínu bez jehly patří inzulínový inhalátory (Kugler et al., 2015), ústní sprej (Modi et al., 2002), transdermální inzulín (Park et al., 2008) a

orální aplikace inzulínu, kdy je nutno překonat jeho destrukci kyselým prostředím žaludku. Zatím je nejčastější metodou podání inzulínu injekční aplikátor.

1.4 Predispozice k T1D

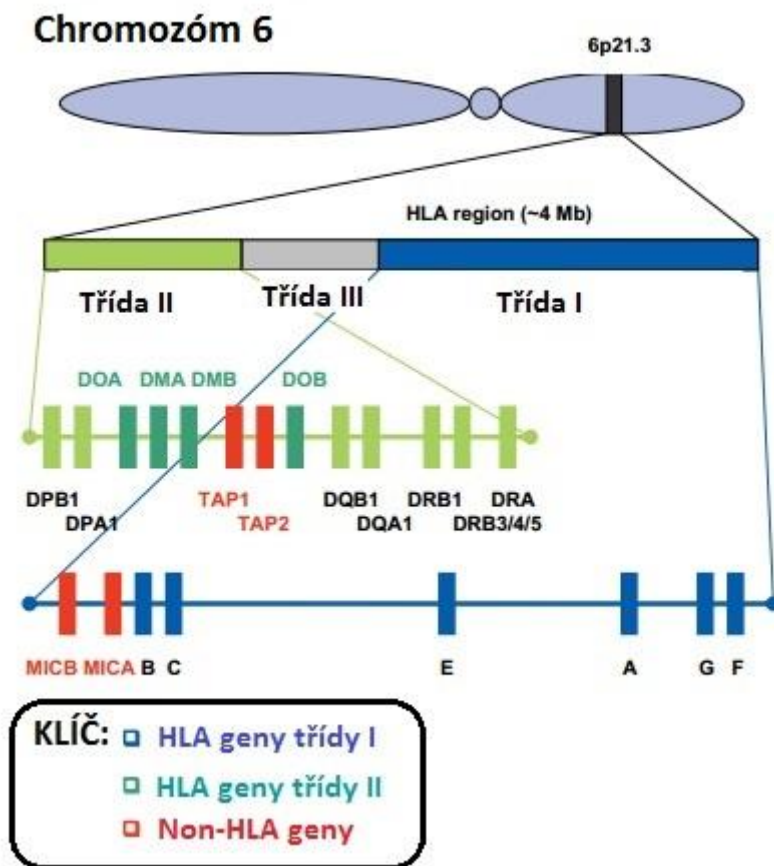
T1D je dědičné onemocnění, na kterém se podílí více genů, je to tedy polygenní charakter dědičnosti. Daný jedinec může mít genetickou predispozici k rozvoji T1D, ale pouze genetika nemusí mít za následek manifestaci onemocnění. Genetické faktory mohou za rozvoj T1D přibližně z 50 %, zbytek se podílí zevní faktory prostředí. Patří tedy mezi choroby s multifaktoriální dědičností. Manifestace T1D je v následující posloupnosti dějů:

1. působení neznámého faktoru vnějšího prostředí u geneticky rizikového jedince,
2. chybná odpověď imunitního systému na faktor vnějšího prostředí,
3. postupná destrukce vlastních pankreatických buněk buňkami imunitního systému,
4. pokles tvorby inzulínu až úplná ztráta.

Významný je familiární výskyt T1D s průměrným rizikem prevalence u sourozenců 7 %, dítě diabetika má 6% šanci na projev T1D ve srovnání s běžnou populací, kdy je riziko 0,4 %. Pokud jsou sourozenci a jeden z nich má T1D, tak je u druhého asi 15 krát větší pravděpodobnost vzniku T1D než u jednotlivců z obecné populace. Genetická citlivost u rodinných členů je závislá na stupni genetické podobnosti s probandem. Riziko T1D v rodinách má nelineární korelaci s počtem alel sdílených s probandem. Nejvyšší riziko mají monozygotní dvojčata (sdílejí 100 % alel), poté jsou jedinci prvního (sdílení 50 % alel) a druhého (sdílení 25 % alel) stupně příbuznosti (Černá, 2008; Tandon, 2015).

1.4.1 Genetické faktory

Genetické faktory jsou studovány v celosvětových studiích v různých etnikách, kdy jsou porovnáváni diabetičtí pacienti se zdravými kontrolami. Riziko dědičnosti T1D mezi příbuznými jedinci stoupá oproti dědičnosti jednotlivců v populaci. Nejvýznamnější asociaci s T1D mají geny hlavního histokompatibilního komplexu, MHC (Major histocompatibility complex) molekuly II. třídy. U člověka se tento systém nazývá HLA (Human leukocyte antigens, lidské leukocytární antigeny) a je lokalizovaný na chromozómu 6, v oblasti 6p21 (obrázek č. 3).



Obrázek č. 3: Oblast HLA genů na chromozómu 6. HLA oblast je rozdělena do tří tříd: I. třída, II. třída a III. třída. Geny I. třídy a II. třídy kódují transmembránové molekuly, které se účastní imunitního rozpoznávání. Geny HLA I. třídy kódují těžký alfa řetězec genů HLA-A, HLA-B, HLA-C. Geny HLA II. třídy kódují heterodimerické proteiny skládající se z alfa a beta řetězců. Molekuly HLA II. třídy jsou exprimovány na antigen prezentujících buňkách (dendritické buňky, makrofágy, B lymfocyty) a na buňkách aktivovaných interferonem gama. Mezi molekuly HLA II. třídy patří HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP a jejich hlavní funkcí je prezentovat antigenní peptidy CD4+ T-lymfocytům. **(Upraveno podle Černá, 2008).**

Hlavní genetické markery T1D jsou HLA alely genů DQB1 a DQA1 s přispěním alel genu DRB1. Bylo ověřeno studii, že *DQB1*03:02* je nejsilněji asociovaná alela s T1D. Heterozygotní kombinace haplotypů *DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02* a *DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01* vysoce zvyšují riziko T1D (Černá, 2008). Naopak významně protektivní je HLA alela *DQB1*06:02*, která je dominantní vůči všem predispozičním alelám (Pugliese et al., 1995).

1.4.2 Vnější faktory prostředí

Podrobná etiopatogeneze T1D je zatím stále nejasná. Možné potenciální faktory vnějšího prostředí mohou být kojenecká a dětská strava, hygienická hypotéza a infekce. Relativní přínos vnějších faktorů zatím není stoprocentně přesvědčivý.

Pomocí hygienické hypotézy byl nejprve vysvětlen vznik alergických nemocí a astmatu (Strachan, 1989). Později byla rozšířena na vznik autoimunitních chorob v průmyslově vyspělých zemích. Klíčem je zlepšení hygieny a lékařského vzdělání, kdy člověk se snaží žít v co nejčistějším prostředí a málo přijde do styku s různými virovými i bakteriálními infekcemi. To má za následek, že buňky imunitního systému nemohou reagovat proti určitým mikroorganismům, jelikož nebyly jimi dostatečně vystaveny.

Mezi další potenciální spouštěč autoimunitních chorob patří viry, které obsahují molekulární mimikry s různými lidskými antigeny a tím umožňují zkříženou reakci imunitního systému. Zatím ale vztah mezi virovým onemocněním a zahájením T1D je nepřímý. Příkladem může být cytomegalovirová infekce (Pak et al., 1988), retroviry (Conrad et al., 1997), virus encefalomyokarditidy (Craighead and McLane, 1968) a rotaviry, které u dětí nejčastěji způsobují gastroenteritidu (Honeyman et al., 2000). Všechny byly detekovány u pacientů s T1D a mají afinitu k β -buňkám pankreatu.

Doba kojení se také ukázala jako jeden z možných faktorů způsobujících rozvoj T1D. Zřejmě to je proto, že mateřské mléko stimuluje funkci β -buněk a poskytuje imunitní podporu prostřednictvím protilátek a imunokompetentních buněk (Juto, 1985). U vysoce rizikových dětí, rostoucí doba kojení může snížit riziko rozvoje T1D (Hall et al., 2015).

1.5 Kandidátní geny pro vznik T1D

Vznik T1D je velice komplexní. Podle článku Risk of type 1 diabetes progression in islet autoantibody-positive children can be further stratified using expression patterns of multiple genes implicated in peripheral blood lymphocyte activation and function (Riziko progresu diabetu 1. typu u autoprotiátek-pozitivních dětí mohou být dále použity pomocí expresních vzorů mnoha genů podílejících se na aktivaci a funkci lymfocytů v periferní krvi) od Y. Jin a kolektivu z roku 2014 však můžeme považovat expresi některých genů za korelující s T1D. Jsou to geny *TXNDC5*, *CDC20*, *IGLL3*, *EIF3A*, *BACH2*, *LHPP*, *ETS2*, *TMEM91*, *RNF167*, *ATP6V1F*, *ANKRD9*, *CHCHD5*, *DOCK8*, *ESAM*, *F5*, *HP*, *ITGB5*, *KHDRBS1*, *LY6G6F*, *MAP2K1*, *NFE2*, *PLD3*, *PRDX5*, *TRAPPC5*, *TSC1*, *TSPAN33*, *UBP1*. Z toho 3 geny, *BACH2*, *TXNDC5* a *CDC20*, mají

vysoké HR (hazard ration = poměr rizika), 3,9, 3,3 a 2,8, a signifikantní P hodnotu ($P < 0,05$). Další 2 geny, *IGLL3* a *EIF3A*, mají střední HR, 2,6 a 2,3, a marginální P hodnotu ($P = 0,06$ a $P = 0,07$). U ostatních 22 kandidátních genů nebyly nalezeny signifikantní P hodnoty ($P > 0,1$) a byl detekován nekonzistentní HR, viz **tabulka č. 2** (Jin et al., 2014).

RT-PCR		
Gen	HR (95% CI)	P hodnota
<i>TXNDC5</i>	3.30 (1.17–9.32)	1.80E-02
<i>CDC20</i>	2.82 (1.04–7.67)	3.46E-02
<i>IGLL3</i>	2.64 (0.94–7.42)	5.54E-02
<i>EIF3A</i>	2.37 (0.90–6.28)	7.37E-02
<i>BACH2</i>	3.94 (1.39–11.21)	5.71E-03
<i>LHPP</i>	0.84 (0.33–2.15)	7.17E-01
<i>ETS2</i>	0.54 (0.21–1.41)	2.02E-01
<i>TMEM91</i>	0.63 (0.24–1.63)	3.34E-01
<i>RNF167</i>	0.83 (0.33–2.10)	6.95E-01
<i>ATP6V1F</i>	0.65 (0.25–1.69)	3.77E-01
<i>ANKRD9</i>	2.56 (0.90–7.31)	6.91E-02
<i>CHCHD5</i>	1.55 (0.59–4.07)	3.72E-01
<i>DOCK8</i>	0.61 (0.24–1.59)	3.10E-01
<i>ESAM</i>	0.85 (0.33–2.14)	7.24E-01
<i>F5</i>	0.49 (0.18–1.30)	1.43E-01
<i>HP</i>	1.20 (0.40–3.61)	7.36E-01
<i>ITGB5</i>	0.64 (0.25–1.65)	3.51E-01
<i>KHDRBS1</i>	1.61 (0.62–4.15)	3.21E-01
<i>LY6G6F</i>	1.23 (0.46–3.23)	6.81E-01
<i>MAP2K1</i>	1.39 (0.54–3.61)	4.91E-01
<i>NFE2</i>	0.58 (0.23–1.49)	2.53E-01
<i>PLD3</i>	1.56 (0.60–4.03)	3.60E-01
<i>PRDX5</i>	1.62 (0.62–4.20)	3.17E-01
<i>TRAPPC5</i>	1.64 (0.62–4.33)	3.13E-01
<i>TSC1</i>	1.49 (0.59–3.81)	3.98E-01
<i>TSPAN33</i>	1.10 (0.43–2.79)	8.44E-01
<i>UBP1</i>	1.04 (0.41–2.62)	9.33E-01

Tabulka č. 2: Výsledné hodnoty HR a P hodnota z RT-PCR pro kandidátní geny (Upraveno podle Jin et al., 2014)

Je známo, že u komplexních onemocnění prediktivní síla pomocí více genů je významnější než pouze prediktivní síla jednoho genu. V posledních letech se objevují celogenomové asociační studie, které identifikovaly mnoho lokusů lidského genomu spojených s rizikem T1D (Barrett et al., 2009; Bergholdt et al., 2012).

V této diplomové práci se zaměříme na expresi genů *TXNDC5*, *CDC20*, *IGLL3*, *EIF3A* a *BACH2* u pacientů s T1D již dlouhodobě diagnostikovaným a u dětských pacientů s nově diagnostikovaným T1D.

1.5.1 Gen *TXNCD5*

Jedním z kandidátních genů hrající roli v progresi T1D je *TXNCD5*, také známý jako *ERp46*. Tento gen je umístěn na chromozómu 6, 6p24.3. Gen kóduje disulfid izomerázy, které se nacházejí v endoplazmatickém retikulu (Knoblach et al., 2003) a jeho exprese je indukována hypoxií, takže jeho role může být v ochraně hypoxických buněk před apoptózou (Sullivan et al., 2003).

Ukázalo se, že *ERp46* je vysoce exprimován v pankreatických buňkách. Jeho exprese je korelována s pankreatickou glukózovou toxicitou β -buněk a může být zapojen do tvorby inzulínu na posttranslační úrovni (Alberti et al., 2009). Tato zjištění ukazují na možnou roli v metabolických onemocnění a u diabetu (Chen et al., 2012).

Gen *TXNCD5* se uplatňuje i u dalších chorob. Příkladem jsou studie exprese *TXNCD5* v různých typech nádorů. Zvýšená exprese tohoto genu, která nemusí být závislá na hypoxii, byla zjištěna u nádorových buněk plic a tlustého střeva (Vincent et al., 2011). Dále se ukázalo, že je zvýšená exprese u nádorových buněk děložního čípku, dělohy, žaludku a plic (Sullivan et al., 2003). V dalších experimentech bylo prokázáno, že *TXNCD5* podporuje růst a proliferaci buněk žaludku a navíc může zvýšit invazi nádorových buněk žaludku (Zhang et al., 2010). Nedávno vyšla studie, kde byla poprvé prokázána zvýšená exprese *TXNCD5* u karcinomu ledvin (Duivenvoorden et al., 2014). Nemalou roli má tento gen i u revmatoidní artritidy, kdy jeho zvýšenou expresí se zvyšuje i riziko vzniku revmatoidní artritidy (Chang et al., 2011; Wang et al., 2013).

1.5.2 Gen *CDC20*

Gen *CDC20* (cell division cycle 20), také znám jako *p55CDC*, je lokalizován na chromozómu 1, 1p34.1. Zdá se, že působí jako regulační protein interagující s několika dalšími proteiny v různých bodech buněčného cyklu. Je důležitý v procesech závislých na mikrotubulech, při pohybu jádra před anafází (Fang et al., 1998) a při separaci chromozomů.

Tento gen může souviset nejen s T1D (Jin et al., 2014), ale i s chromozomální nestabilitou u pacientů s myelodysplastickým syndromem (Genga et al., 2015), s aneuploidií u nádorových buněk děložního čípku (Kim et al., 2014), při progresi u hepatocelulárního karcinomu (Li et al., 2014) a v dalších typech rakovin.

1.5.3 Gen *IGLL3*

IGLL3 (immunoglobulin lambda-like polypeptide 3) je pseudogen umístěný na chromozomu 22, 22q11.23, který je exprimován v pre- β -buňkách a podílí se na jejich vývoji (Bauer et al., 1993).

1.5.4 Gen *EIF3A*

EIF3A (eukaryotický translační iniciační faktor 3 podjednotka A) je gen lokalizovaný na chromozómu 10, 10q26.11. Co se týče funkce jeho proteinu při T1D, tak zatím není tolik studií, kolik by bylo třeba. Bylo zjištěno, že gen kódující jinou podjednotku, a to *EIF3E*, může hrát roli u napětově řízených Ca^{2+} kanálů β -buněk. Tím, že dojde k umlčení *EIF3E*, je narušena vápníková výměna v buňce a dochází k zvýšení intracelulárního Ca^{2+} . To narušuje homeostázu vápníku β -buněk a může mít vliv na jejich funkci a produkci inzulínu u T2D (Buda et al., 2013).

Vzhledem k jiným chorobám je lépe ověřen, převážně u různých typů rakovin. Zjistilo se, že koreluje s nasofaryngeálním karcinomem, kde má důležitou roli při nukleotidové excizní opravě při potlačení proteinů potřebných k excizní opravě (Liu et al., 2011).

1.5.5 Gen *BACH2*

Gen *BACH2* (basic leucine zipper transcription factor 2) je umístěn na chromozómu 6, 6q15, a je vysoce exprimován v lidských B-lymfocytárních liniích (Sasaki et al., 2000). *BACH2* působí jako transkripční faktor, který vykonává svou funkci v imunitním systému. Příkladem může být represe tohoto faktoru, která se podílí na predispozici *IgG1* paměťových buněk se diferencovat v plazmatické buňky (Kometani et al., 2013) nebo se podílí negativní selekci klonů pre-B lymfocytů (Swaminathan et al., 2013). V poslední době proběhlo několik asociačních studií, ve kterých je gen *BACH2* popsán ve vztahu k T1D (Cooper et al., 2008; Grant et al., 2009). Bylo pozorováno, že *BACH2* je regulovaný prozánětlivými cytokiny a jeho inhibicí specifickými siRNA se zvyšuje vnímavost pankreatických β -buněk na apoptózu indukovanou cytokiny. To naznačuje, že *BACH2* může podporovat nebo inhibovat apoptózu specifickým způsobem (Marroquí et al., 2014).

I tento gen souvisí s více nemocemi, než jenom s T1D. V nedávné studii byla zjištěna redukce transkriptů genu *BACH2* v krevních buňkách u pacientů s roztroušenou sklerózou, což omezuje diferenciaci T lymfocytů (Perga et al., 2015). Jiná studie prokázala, že exprese

genu *BACH2* může být predikčním markrem pro pacienty s difúzním velkým B buněčným lymfomem (Ichikawa et al., 2014).

2 Cíle a hypotézy

Jelikož T1D je komplexní autoimunitní onemocnění a do dnešního dne není zcela známo co všechno z vnějších a genetických faktorů může přispět k rozvoji onemocnění, je důležité postupovat krůček po krůčku. Tato diplomová práce se zabývá predikcí T1D na základě genové exprese pěti kandidátních genů. Mezi vybrané kandidátní geny patří *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3*, *EIF3A* a *TXNDC5*, které se určitým způsobem podílejí na rozvoji imunitního systému a nebo na tvorbě inzulínu. Tato studie byla kromě dětí rozšířena i na dospělé jedince, kde manifestace T1D je dlouhodobá v porovnání studie, kterou vytvořil Y. Jin a spol. (Jin et al., 2014).

Naše cíle jsou:

1. Zjistit, zda genová exprese kandidátní geny *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3*, *EIF3A* a *TXNDC5* se dá považovat za vztáhnout k predikci T1D,
2. porovnat exprese kandidátních genů mezi dětmi, kde je první záchyt onemocnění, a dospělými, kde je již dlouhodobější průběh onemocnění,
3. zjistit, zda exprese kandidátních genů závisí na jednotlivých haplotypech.

3 Materiál a metody

3.1 Subjekt studie

Vyšetřovaný soubor pacientů s T1D tvořil 39 jedinců (probandů). Z toho bylo 15 žen a 24 mužů. Následně byli rozděleni dle věku, dětí bylo 8 ve věku 2 - 15,9 let a dospělých 31 ve věku 16 a více. Krev pacientům byla odebrána v nemocnici Královské Vinohrady.

Při zohledňování kritéria zdravého jedince jsme vycházeli z vyplněného dotazníku osobní anamnézy. K porovnávání nám sloužili zdraví jedinci, kterých bylo 38. Z toho bylo 25 žen a 13 mužů. Byli rozděleni dle věku, dětí bylo 8 ve věku 2 - 15,9 let, dospělých 30 ve věku 16 a více.

Počet jedinců a jsou zahrnuty v **tabulce č. 3**. Účastníkům studie bylo odebráno 4 - 6 ml krve. Všichni pacienti nebo jejich zákonní zástupci a zdraví jedinci byli podrobně seznámeni s výzkumem a podepsali informovaný souhlas k použití DNA. Experimenty byly schváleny etickou komisí 3. LF UK (3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy).

Věková kategorie	Počet jedinců s T1D	Počet zdravých kontrol
Děti (2 - 15,9 let)	8	8
Dospělí (16 - více let)	31	30

Tabulka č. 3: Počet účastníků studie rozdělen na 2 věkové kategorie, děti a dospělí.

3.2 Použité laboratorní přístroje a vybavení

Autokláv Systec DE-23 (Systec)

Automatické pipety jednokanálové (0.1 – 2, 2 – 20, 20 – 200, 100 – 1000) (Nichiryo)

Shaker&Incubator NB-205 QF (N-BIOTEK)

Centrifuga chlazená Z 300 (Hermle)

Centrifuga MPW-51 (Mechanika Precyzyjna)

Elektroforetické vany (Sigma Aldrich)

Hlubokomrazící box U410 (New Brunswick)

Chladnička ARC (Whirlpool)

Kamera Gel logic 1500 (Kodak)

Laminární box Auramini (Bioair) a HERAsafe (Heraeus)

Mikrovlnná trouba (Zanussi)
Minicentrifuga Z 100 (Hermle)
Mraznička (Whirlpool)
Plynový kahan Schuett phoenix (Schuett-biotec)
PowerPac zdroj napětí pro elektroforézu (Bio-Rad)
Stolový vortex (Scientific industries)
7000 Sequence Detection Software 1.2.3 (Applied Biosystems)
Termocycler C1000TM (Bio-Rad) a LabCycler gradient (SensoQuest)
UV Transluminátor MUVB20 (UltraLum)
Váhy digitální 40SM-200A (Precisa)

3.3 Použité počítačové programy

NanoPhotometr TM PVC software 5.2.2.2 (Implen, Německo)
Kodak Molecular Imaging software 5.0. (Kodak, Německo)
GraphPad Prism 3.00 (GraphPad Software, USA)

3.4 Použité chemikálie, enzymy a komerční soupravy

Zde je uveden seznam použitých chemikálií, enzymů a komerčních souprav a jejich původ. Veškeré používané chemikálie dosahovaly analytického stupně čistoty a dle potřeby byly certifikovány pro elektroforézu nebo molekulární biologii. Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda. Pokud není uvedeno jinak, byly komerční soupravy použité v souladu s doporučením výrobce.

Izolace DNA vysolovací metodou

RCLB (roztok pro lýzu erytrocytů)	5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O (Serva, Německo) 320 mM sacharóza (Sigma Aldrich, USA) 1% Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA) 12 mM Tris-HCl pH = 7,5 (Sigma Aldrich, USA)
WCLB (roztok pro lýzu leukocytů)	120 mM EDTA pH = 8 (Sigma Aldrich, USA)
Proteinasa K 30 U/mg (QIAGEN)	

Izolace DNA kolonkovou metodou (QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Německo)

Buffer AL

Buffer AW1 (koncentrát, naředěn etanolem dle instrukcí výrobce)

Buffer AW2 (koncentrát, naředěn etanolem dle instrukcí výrobce)

Buffer AE

QIAGEN Protease

Protease Solvent (roztok na ředění proteázy QIAGEN Protease)

PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Taq Polymerasa 500 U, 5 U/μl (Fermentas, Kanada)

Master Mix bez Taq Polymerázy (Genovision, USA)

HLA genotypizační kity (Olerup SSP™, USA)

Olerup SSP™ DR low resolution kit

Olerup SSP™ DQ low resolution kit

Olerup SSP™ DQB1*02

Olerup SSP™ DQB1*03

Olerup SSP™ DQB1*04

Olerup SSP™ DQB1*05

Olerup SSP™ DQB1*06

Olerup SSP™ DQA1

Elektroforetická separace DNA

TBE pufr

890 mM Tris báze (Sigma Aldrich, USA)

890 mM kyselina boritá (Amresco, USA)

20mM EDTA pH = 8,0 (Sigma Aldrich, USA)

Izolace RNA (QIAamp RNA Blood Mini Kit, QIAGEN, USA)

Pufr EL

Pufr RLT (smíchan s β -merkaptetanolem dle pokynů výrobce)

Pufr RW1

Pufr RPE (smíchan s 96% etanolem dle pokynů výrobce)

Reverzní transkripce (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, USA)

10x RT pufr

25x dNTP mix (100 mM)

10x RT náhodné primery

MultiScribe reverzní transkriptáza

Real-time PCR (LifeTechnologies, USA)

Taqman Gene Expression Master Mix

Assay ID: Hs00426680_mH CDC20

Assay ID: Hs00222364_m1 BACH2

Assay ID: Hs01046710_m1 TXNDC5

Assay ID: Hs01025769_m1 EIF3A

Assay ID: Hs03025896_sH IGLL3P

3.4.1 Obecné chemikálie

Agaróza (Serva, Německo)

CH₃COOH (kyselina octová) (Lach-Ner, ČR)

EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová), (Sigma Aldrich USA)

Etanol (96%, 70%) (FNKV, ČR)

Etanol absolutní (100%) (Sigma Aldrich, USA)

GelRed (interkalační činidlo) (Biotium, USA)

HCl (kyselina chlorovodíková) (Sigma Aldrich, USA)

NaCl (chlorid sodný) (Serva, Německo)

NaOH (hydroxid sodný) (Penta, ČR)

SDS (dodecylsulfát sodný) (Sigma Aldrich, USA)

Tris báze (Carl Roth, Německo)

Voda bez RNase, DNase (Sigma Aldrich, USA)

3.5 Metody

Od 39 pacientů s T1D byla odebrána periferní krev do zkumavky s antikoagulačním činidlem EDTA. Z 1,5 ml krve byla izolována RNA za účelem stanovení expresního profilu kandidátních genů. Po získání RNA byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA. Zbytek krve byl použit k izolaci DNA za účelem HLA genotypizace. DNA byla izolována kolonkovou i vysolovací metodou.

3.5.1 Izolace DNA vysolovací metodou

Periferní krev byla odebrána do zkumavky s antikoagulačním činidlem EDTA. K izolaci DNA byla použita modifikovaná vysolovací metoda dle Millera (Miller et al., 1988). Veškeré centrifugační kroky proběhly při teplotě 20° C.

1. K 0,5 ml nesrážlivé krve v ependorfce byl přidán 1 ml roztoku RCLB (dezintegrace membrány erytrocytů). Vzorky byly lehce protřepány obrácením po dobu 30 sekund, následně inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Vzorky byly následně stočeny při 16 000 g po dobu 5 minut. Poté byl odstraněn supernatant.
2. K sedimentu bylo přidáno 1 ml dH₂O. Poté byly vzorky centrifugovány při 18 000 g po dobu 2 minut a získaný supernatant odstraněn. Promytí sedimentu bylo opakováno ještě jednou přidáním 1 ml dH₂O.
3. K sedimentu bylo přidáno 235 μl dH₂O, 80 μl WCLB, 40 μl 10% SDS a 15 μl Proteinasy K.
4. Vzorky byly umístěny do otáčecího rotátoru a inkubovány při teplotě 55° C po dobu 30 minut. Poté získaná směs byla zchlazena na laboratorní teplotu.
5. Ke vzorkům byl přidán 120 μl roztoku 5M NaCl. Následně byly vzorky silně ručně protřepány po dobu 15 sekund a centrifugovány při 16 000 g po dobu 6 minut. Získaný supernatant byl přenesen do nové ependorfky.
6. Vzorky byly centrifugovány při 16 000 g po dobu 3 minut. Supernatant byl přenesen do nové ependorfky.

7. V ependorfce byl k supernatantu přidán 1 ml vychlazeného absolutního etanolu. Vzorky byly následně inkubovány při teplotě 4° C po dobu 20 minut pro větší výtěžnost. Poté byly vzorky stočeny při 16 000 g po dobu 3 minut. Supernatant byl odstraněn.
8. K peletě byl přidán 1 ml 70% etanolu a vzorky byly promíchávány na otáčecím rotátoru po dobu 3 minut. Poté byly vzorky centrifugovány při 16 000 g po dobu 3 minut. Supernatant byl odstraněn. DNA byla vysušována v laminárním boxu.
9. Po vysušení byla DNA rozpuštěna v 50 μ l dH₂O a uschována při teplotě 4° C.
10. Koncentrace a čistota byla měřena na spektrofotometru.

3.5.2 Izolace DNA kolonkovou metodou

1. Na dno mikrocentrifugační zkumavky bylo napipetováno 20 μ l QIAGEN Proteázu.
2. K proteáze bylo přidáno 200 μ l periferní krve.
3. Následně ke směsi byl přidán 200 μ l Buffer AL a 15 sekund byla směs míchána v ruce.
4. Směs byla inkubována 20 - 30 minut při teplotě 56° C.
5. Poté směs byla 30 sekund centrifugována, aby byly odstraněny kapičky z víčka.
6. Ke směsi byl přidán 200 μ l 96% etanolu a poté 15 sekund byla směs míchána v ruce.
7. Celá směs byla opatrně přenesena na kolonku bez potřísnění okrajů zkumavky.
8. Směs byla 1 minutu centrifugována při 6000 g. Poté byl filtrát odstraněn a kolonka vložena do nové čisté sběrné zkumavky.
9. Do kolonky byl přidán 500 μ l Buffer AW1 a 1 minutu směs byla centrifugována při 6000 g. Opět byl filtrát vyhozen a kolonka přemístěna do nové sběrné zkumavky.
10. Do kolonky byl přidán 500 μ l Buffer AW2 a směs byla centrifugována 3 minuty při 18000 g.
11. Filtrát byl vyhozen a kolonka přemístěna do nové sběrné zkumavky. Do kolonky byla přidána 200 μ l PCR H₂O.
12. Vzorek byl 1 minutu inkubován při pokojové teplotě a poté centrifugován 1 minutu při 6000 g.

3.5.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Kvalita a kvantita DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí nanofotometru při vlnové délce λ 260 a 280 nm. Kontaminace DNA proteiny a RNA byla určena porovnáním absorbancí A260/A280 a A260/240 . Za čistotu byla DNA považována, pokud podíl absorbancí byl v doporučeném rozmezí 1,8 – 2.

3.5.4 Genotypizace HLA

HLA genotypizace byla prováděna pomocí HLA Olerup SSPTM kitů (Genovision, USA), které obsahují sekvenčně specifické primery pro amplifikaci alel HLA II. třídy. Byla prováděna HLA genotypizace u alel *HLA DQA1*, *HLA DQB1*, *HLA DRB1* genů. V prvním kroku s využitím HLA DQ low resolution kitu byly určeny sérologické skupiny HLA DQB1. Konkrétní podtypy jednotlivých alel HLA DQB1 byly určeny za použití kitů high resolution HLA DQB*02, 03, 04, 05, 06. Genotypizace HLA DRB1 byla určena pouze na úrovni sérologické podskupiny a nebyla již dále rozlišena.

1. Na ledě byly rozmraženy komponenty PCR reakce a reakční směs byla rozpipetována do mikrozkušavek po 10 μ l. Reakční směs pro jednu PCR reakci byla připravena podle **tabulky č. 4**. Počet reakcí se lišil podle genotypizačního kitu (min. 8 - max. 32 PCR reakcí). Objem DNA vložený do PCR reakce byl přepočítán na koncentraci 30 ng/ μ l.

Složka reakce	Objem (μ l)
Voda	5,166
PCR Master mix	3,15
DNA (c = 30 ng/ μ l)	2,1
Taq Polymeráza	0,084
Celkový objem	10,5

Tabulka č. 4: Reakční směs pro provedení genotypizace HLA II. třídy.

2. Po amplifikační reakci, podle **tabulky č. 5**, byly PCR produkty ověřeny elektroforézou v 1,7% TBE agarózovém gelu.

Reakční krok	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet opakování
1. Počáteční denaturace	94	120	
2. Denaturace	94	10	
3. Hybridizace a elongace	65	60	
4. Opakování kroku 2 a 3			9x
5. Denaturace	94	10	
6. Hybridizace	61	50	
7. Elongace	72	30	
8. Opakování kroku 5 až 7			19x

Tabulka č. 5: Teplotní program pro HLA genotypizaci.

3. Na agarózový gel byl nanesen celý reakční objem 10 µl.
4. Amplifikované HLA alely byly určeny dle interpretačních tabulek daného HLA kitu od Olerup SSPTM.

3.5.5 Elektroforetická separace DNA

Pro identifikaci a separaci jednotlivých fragmentů DNA byla použita horizontální elektroforéza (Thermo Scientific) v 1,7% TBE agarózovém gelu.

1. 1,7% agarózový gel byl připraven z příslušného množství agarózy a rozpuštěn v 1x koncentrovaném TBE pufru (5,1 g agarózy smícháno s 300 ml TBE pufru).
2. Heterogenní směs byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě.
3. Po ochlazení gelu na cca 60°C, bylo ke směsi bylo přidáno interkalační barvivo GelRed (2,5 µl na 100 ml TBE).
4. Následně byla směs nalita do elektroforetické vany a na gel byly umístěny hřebeny.
5. Po ztuhnutí gelu byly hřebeny vyndány, vana byla naplněna TBE puftrem a do jamek byly nanесeny vzorky.
6. Elektroforetická separace DNA probíhala za konstantního napětí 170 V po dobu 45 - 50 minut.
7. Po elektroforetické separaci byly DNA fragmenty vizualizovány pomocí UV a gel byl vyhozen.

3.5.6 Izolace RNA z leukocytů z periferní krve

Celková RNA byla izolována z periferní krve ihned po obdržení krve. Veškeré centrifugační kroky probíhaly při teplotě 4°C. Izolace RNA byla prováděna pomocí QIAamp RNA Blood Mini Kitu (QIAGEN, USA) podle postupu, který doporučuje výrobce.

1. 1 objem periferní krve byl smíchán s 5 objemy EL pufru.
2. Vzorky byly inkubovány 10 až 15 minut na ledě. Během lýze erytrocytů byly vzorky lehce míchány v ruce, dokud zakalená suspenze nebyla průsvitná.
3. Vzorky byly centrifugovány při 500 g po dobu 10 minut. získaný supernatant byl odstraněn.
4. K peletě byly přidány 2 objemy EL pufru. Vzorky byly jemně resuspendovány pipetou.
5. Vzorky byly centrifugovány při 500 g po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn.
6. K peletě leukocytů bylo přidán 600 µl RLT pufr.
7. Lyzáty byly přepipetovány do QIAshredder kolonky umístěné ve 2ml sběrné zkumavce a centrifugovány při 16 000 g po dobu 2 minut. QIAshredder kolonky byly odstraněny a lyzát byl ponechán.
8. K lyzátu bylo přidáno 600 µl 70% etanolu a vzorky byly promíchány.
9. 700 µl vzorku bylo přepipetováno do QIAamp kolonky umístěné ve 2ml sběrných zkumavkách a centrifugovány při 8 000 g po dobu 15 sekund. Vzhledem k tomu, že objem lyzátu s etanolem byl větší než 700 µl, zbylý aliquot byl naplňován na tu samou kolonku a centrifugován ještě jednou při 8 000 g po dobu 15 sekund.
10. QIAamp kolonka byla umístěna v nové 2ml sběrné zkumavce. Na kolonku bylo nanášeno 700 µl RW1 pufru a vzorky byly centrifugovány při 8 000 g po dobu 15 sekund.
11. QIAamp kolonka byla přenesena do nové 2ml sběrné zkumavky. Na kolonku bylo nanášeno 500 µl RPE pufru a vzorky byly centrifugovány při 8 000 g po dobu 15 sekund.
12. Na kolonky bylo napipetováno 500 µl RPE pufru a následně byla stočena při 18 000 g po dobu 3 minut.
13. Kolonka byla umístěna do nové 2ml sběrné zkumavky a stočena při 17 000 g po dobu 1 minuty. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a na střed membrány

kolonky bylo nanášeno 33 µl Rnase-free vody. RNA byla eluována v centrifugaci při 12 000 g po dobu 1 minuty.

14. Koncentrace vyizolované RNA byla měřena nanofotometrem a následně použita pro reverzní transkripci a nebo skladována při teplotě -80° C.

3.5.7 Reverzní transkripce

Vyizolovaná RNA byla přepisována do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu (Applied Biosystems, USA). Jednotlivé reakční kroky reverzní transkripce a příprava RT reakční směsi byla prováděna na ledě.

1. RT reakční směs byl namíchán dle **tabulky č. 6**, viz níže.

Složka	Objem (µl)
dH ₂ O	4,2
10x RT pufr	2,0
25x dNTP mix	0,8
10x RT primery	2,0
MultiScribe reverzní transkriptáza	1,0

Tabulka č. 6: Reakční směs pro reverzní transkripci.

2. Připravená reakční směs byla promíchána a bylo přidáno tolik µl RNA, aby její celkové množství v reakci odpovídalo 250 ng nebo 200 ng. Reakční směs byla doplněna dH₂O do celkového objemu 20 µl. Zkumavky byly krátce stočeny.
3. Vzorky byly poté vloženy do termocykleru a byl spuštěn teplotní program pro reverzní transkripci dle **tabulky č. 7**.

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)
Hybridizace	25	10
Reverzní transkripce	37	120
Inaktivace enzymu	85	5

Tabulka č. 7: Teplotní program pro reverzní transkripci.

4. Získaná cDNA byla skladována v mrazáku při teplotě -20°C.

3.5.8 Real-time PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase)

K zjištění úrovně exprese jednotlivých genů *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3P*, *EIF3A* a *TXNDC5* byly použity fluorescenční TaqMan™ Gene Expression assay (LifeTechnologies, USA).

Nejprve byla vybrána jedna ze tří endogenních kontrol *huTBP*, *B-aktin* a *HPRT1*.

cDNA získaná z reverzní transkripce byla naředěna 10x (20 µl + 180 µl dH₂O). Příprava reakcí probíhala na ledě.

1. cDNA byla rozmrazena a po 5 µl rozpipetována do 96 jamkové destičky.

Dle **tabulky č. 8** byl připraven amplifikační mix pro kvantitativní PCR.

Složka reakce	Objem (µl)
Gene expression master mix	6,25
20* assay	0,625
dH ₂ O	0,625
cDNA	5

Tabulka č. 8: Reakční směs pro jednu reakci kvantitativní PCR.

2. K 5 µl cDNA bylo přidáno 7,5 µl reakční směsi. reakce byly připravované v tripletech.
3. Destička byla přelepena fólií a stočena při 2 000 g na 1 minutu.
4. Amplifikace proběhla v přístroji 7000 SDS ABI Prism 1.2.3 dle teplotního programu uvedeného v **tabulce č. 9**.

Reakční krok	Teplota (°C)	Čas	Počet opakování
Krok 1	50	2 min	
Krok 2	95	10 min	
Krok 3	95	15 s	
Krok 4	60	1 min	
Opakování kroku 3 až 4			55x

Tabulka č. 9: Teplotní program pro amplifikaci kvantitativní PCR genů *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3P*, *EIF3A*, *TXNDC* a endogenních kontrol.

3.6 Statistické zpracování

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu GraphPad Prism 3.0. Při porovnávání dvou skupin při nenormálním rozložení dat byl použit neparametrický nepárový Mann-Whitneyův test na hladině významnosti 0,05. Při porovnávání více skupin byla použita neparametrická one-way ANOVA test Kruskal-Wallis.

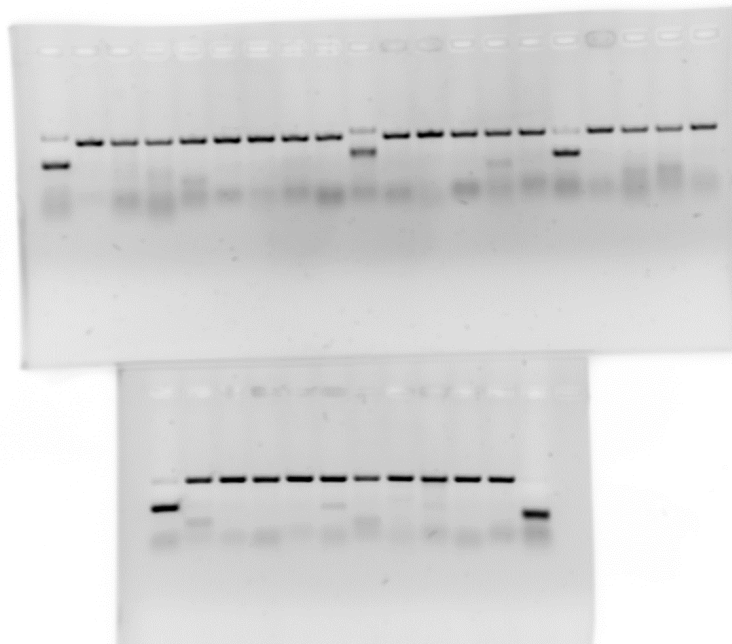
Míra signifikance (P) je v grafech znázorněna symbolem hvězdičky: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, *** $P \leq 0,0005$.

4 Výsledky

4.1 HLA Genotypizace

Alely genů HLA II. třídy (*HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRA*) byly určeny pomocí sekvenčně specifických primerů a zpracované u 39 dárců krve s T1D a všechny jsou uvedeny v příloze č. 1. Na **obrázku č. 4** je příklad HLA genotypizace alely *DRA* od pacienta PRED4 s T1D, která byla vyhodnocena přesně podle pracovního listu na komerční soupravu kitu DR 09Y od společnosti Olerup SSPTM viz příloha 2. Zkoumaný soubor obsahuje 8 dětí ve věku 3 - 11 let a 30 dospělých ve věku 22 - 72 let. U jednoho pacienta nemohl být vyhodnocen celý HLA genotyp z důvodu nekvalitní DNA. Četnosti jednotlivých haplotypů jsou zobrazeny v **tabulce č. 10**. Nejfrekventovanějším haplotypem je *DQA1*03:01-DQB1*0302 s DR04*, která je riziková pro T1D (Černá, 2008).

V **tabulce č. 11** jsou zobrazeny frekvence a četnost rizikových alel HLA II. třídy u zdravých kontrol. Nejfrekventovanějším haplotypem je *DQA1*05:05-DQB1*03:01 s DR11*.



Obrázek č. 4: HLA genotypizace alely *DRA* u pacienta 6 s T1D vyhodnocené přesně podle pracovního listu (viz příloha č. 2) na komerční soupravu kitu DR 09Y od společnosti Olerup SSPTM. Jde o horizontální elektroforetickou separaci DNA provedené na 1,7% TBE agarózovém gelu. PCR produkty se nacházejí v horní řadě a představují pozitivní kontroly (gen pro růstový hormon). Pod nimi se nachází specifické PCR produkty různé velikosti. Kit DR 09Y má 32 jamek, specifické bandy vyšly na pozici 1, 10, 16, 21 a 32. jamka je negativní kontrola. Jedná se o heterozygota jehož alely jsou *DR 01* a *DR 08*.

Genotyp			Počet haplotypů	Frekvence (%)
DRA	DQA1	DQB1		
04	03:01	03:02	24	31,58
03	05:01	02:01	18	23,68
01	01:01	05:01	6	7,89
04	03:03	03:01	5	6,58
13	01:02	06	4	5,26
07	02:01	02:02	4	5,26
16	01:02	05:02	3	3,95
08	04:01	04:02	2	2,63
11	05:05	03:01	2	2,63
07	02:01	03:03	2	2,63
01	03:01	03:02	1	1,32
13	05:05	03:01	1	1,32
14	03:01	03:02	1	1,32
15	01:01	05	1	1,32
04	03:03	03:02	1	1,32
13	01:03	06	1	1,32

Tabulka č. 10: Výsledky genotypizace HLA genů. Tabulka znázorňuje frekvence v % a četnost haplotypů u jedinců s T1D. Celkově bylo detekováno 76 haplotypů, které jsou seřazeny sestupně od nejvyššího počtu zastoupení.

Genotyp			Počet haplotypů	Frekvence (%)
DRA	DQA1	DQB1		
11	05:05	03:01	17	22,37
07	02:01	02:02	12	15,38
03	05:01	02:01	8	10,26
15	01:02	06:02	7	8,97
13	01:03	06:03	7	8,97
01	01:01	05:01	5	6,41
04	03:01	03:02	4	5,26
16	01:02	05:02	3	3,85
12	05:05	03:01	3	3,85
08	04:01	04:02	2	2,56
15	03:02	06:02	1	1,28
15	01:03	06:01	1	1,28
13	01:02	06:09	1	1,28
13	01:02	06:04	1	1,28
04	03:01	01:02	1	1,28
04	03:03	03:01	1	1,28
10	01:05	06:02	1	1,28
14	01:04	05:03	1	1,28

Tabulka č. 11: Výsledky genotypizace HLA genů. Tabulka znázorňuje frekvence v % a četnost haplotypů u zdravých kontrol. Celkově bylo detekováno 78 haplotypů, které jsou seřazeny sestupně podle nejvyššího zastoupení.

4.2 Kvantitativní PCR

RNA izolovaná z leukocytů pacientů s T1D byla přepsána do cDNA pomocí reverzní transkripce. Následně byla cDNA použita společně s TaqMan™ assay ke zjištění exprese jednotlivých kandidátních genů. Všechny reakce byly připravené v tripletech. Odlehle hodnoty byly vyřazeny a ze zbylých hodnot Ct byla vypočítána průměrná hodnota Ct pro daný vzorek. Hladina exprese jednotlivých kandidátních genů byla počítána vzhledem

k expresi endogenní kontroly *HPRT1*. Relativní exprese jednotlivých kandidátních genů byla vypočítána podle vzorce:

$$\frac{n_{\text{kandidátní gen}}}{n_{\text{HPRT1}}} = \frac{(1 + U_{\text{HPRT1}})^{Ct}}{(1 + U_t)^{Ct \text{ kandidátní gen}}}$$

Písmeno *n* označuje množství genu, které vstupuje do real-time PCR reakce a *U* označuje účinnost assaye. Dle vyjádření výrobce účinnost jednotlivých assay je rovna 1 (*U* = 1).

4.2.1 Výběr endogenní kontroly

Jedním z hlavních předpokladů je správné vybrání endogenní kontroly. Kandidáty na endogenní kontrolu byly *HPRT1* (hypoxantin fosforibosyltransferáza 1), *huTBP* (lidský TATA box vázající protein) a *B-aktin*. Těmito geny jsme otestovaly 2 vzorky a sledovaly pozitivitu signálu, efektivitu reakce a směrodatnou odchylku.

Nejstabilnějším genem byl vyhodnocen *HPRT1*. Geny *huTBP* a *B-aktin* vykazovaly slabou efektivitu reakce.

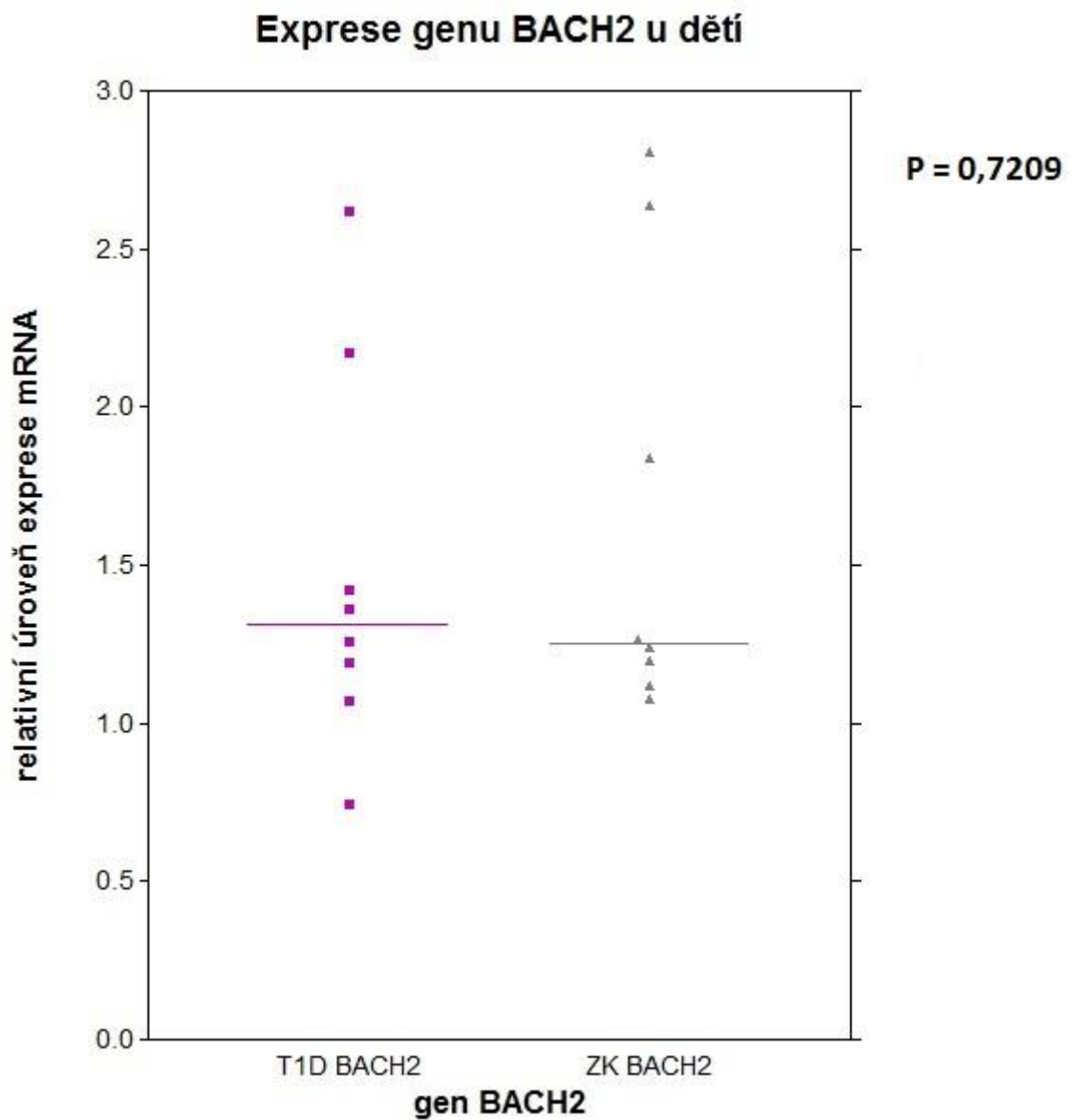
4.2.2 Analýza úrovně exprese mRNA genu *BACH2*

Expresе genu *BACH2* byla vztažena k expresi endogenní kontroly *HPRT1*. Nejdříve byly porovnané rozdíly v expresi mezi skupinami zdravých a nemocných jedinců, následně byly obě skupiny rozděleny na dvě věkové kategorie:

- děti 3 - 16 let,
- dospělí 17 - 72 let.

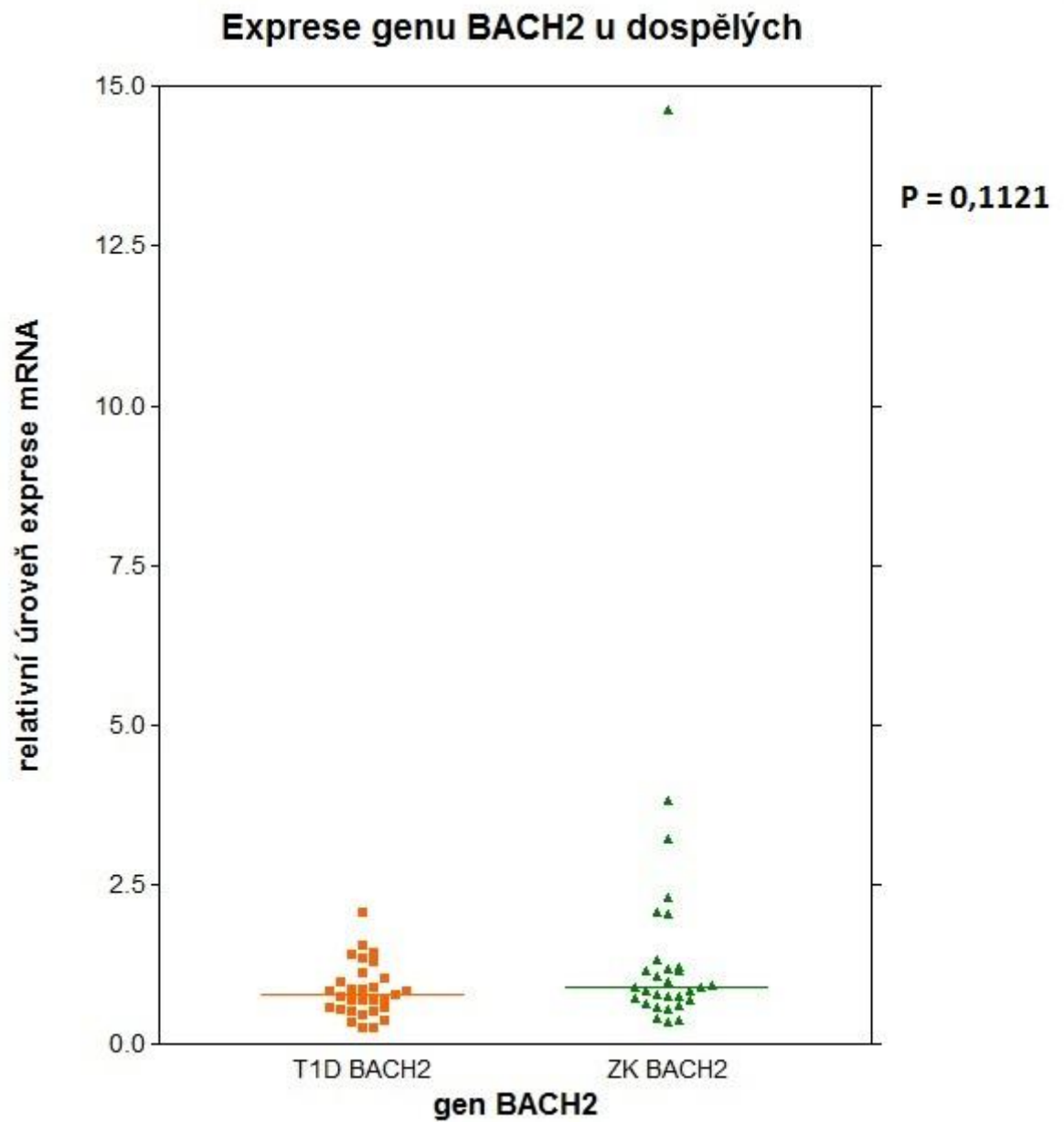
Skupiny byly porovnávány pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$.

Výsledky porovnání exprese genu *BACH2* u nemocných a zdravých dětí jsou uvedeny v grafu č. 2. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P > 0,05$).



Graf č. 2: Porovnání relativní exprese genu *BACH2* u dětí s T1D (fialově) ke zdravým dětem (šedivá); vodorovné čáry značí medián.

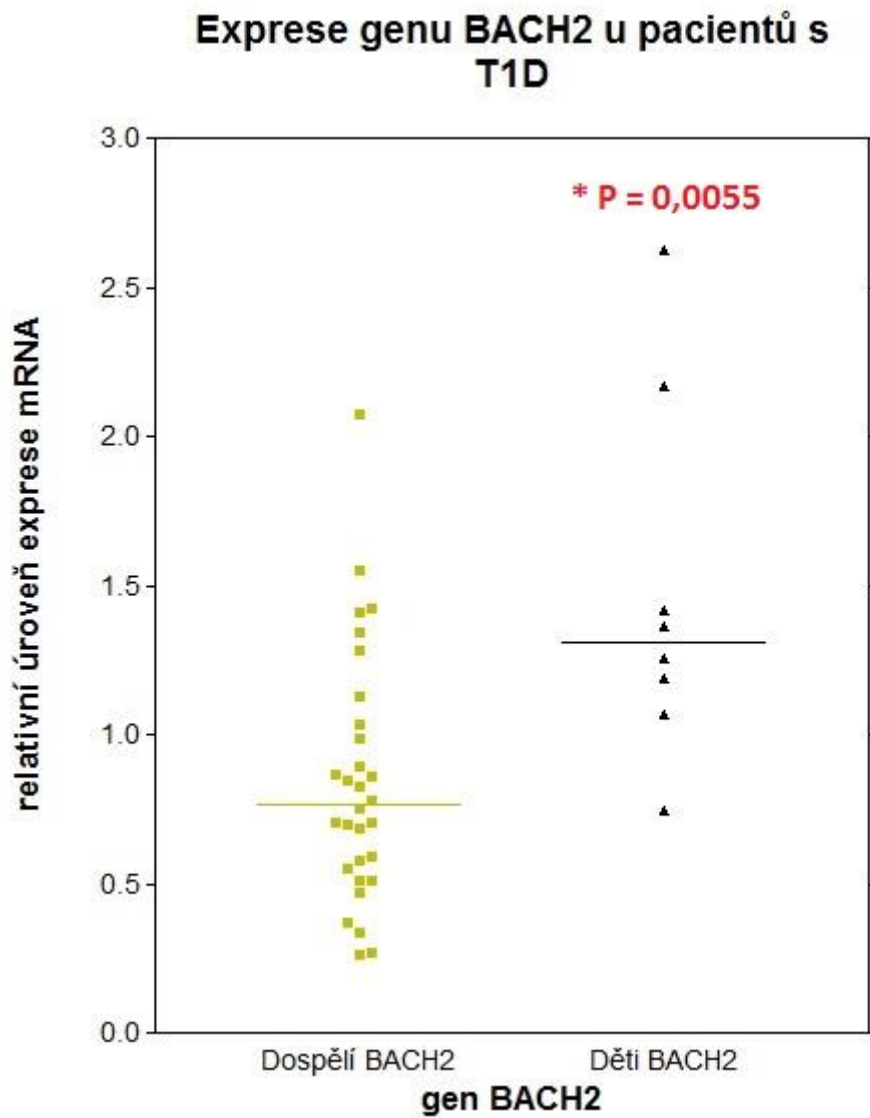
Výsledky porovnání exprese genu *BACH2* mezi dospělými s T1D ke zdravým dospělým jsou uvedeny v **grafu č. 3**. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,1121$).



Graf č. 3: Porovnání relativní exprese genu *BACH2* u dospělých s T1D (oranžově) ke zdravým kontrolám (zeleně).

Dále byla porovnávána exprese genu *BACH2* v rámci skupiny pacientů s T1D, ale rozdělení bylo na děti a dospělé. Cílem bylo zjistit, zda se liší expresní profil na počátku onemocnění a v průběhu onemocnění. Výsledky jsou zobrazeny v **grafu č. 4**.

Výsledky jsou statisticky významné, jelikož je hladina významnosti pod 5 %, $P = 0,0055$.

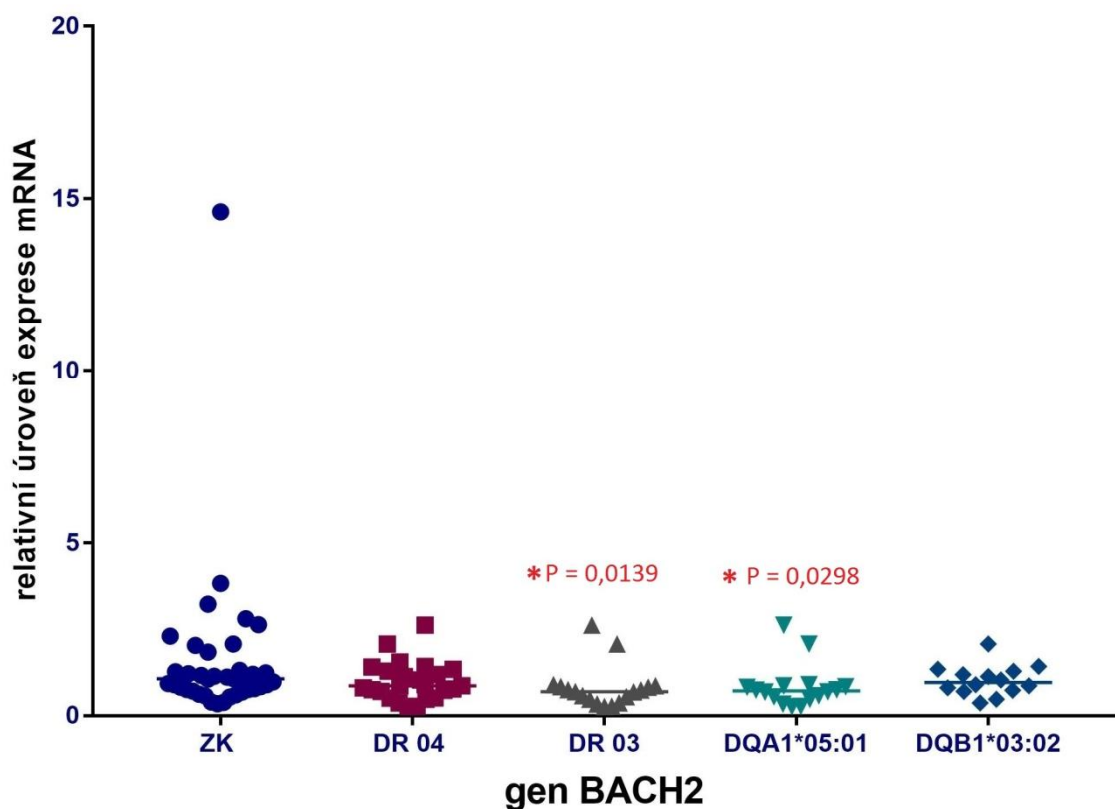


Graf č. 4: Porovnání relativní exprese genu *BACH2* u dětí (černá) a dospělých s T1D (žlutá); vodorovné čáry značí medián; hvězdička značí míru signifikance.

Nakonec bylo zjišťováno, zda se liší exprese genu *BACH2* u rizikových HLA alel *DR04*, *DR03*, *DQA1*0501* a *DQB1*0302*. Rizikové HLA alely byly porovnávány se zdravými kontrolami. Výsledky jsou zobrazeny v **grafu č. 5**. Na zpracování výsledků byl použit neparametrický one-way ANOVA test Kruskal-Wallis. Hladina významnosti byla stanovena na 5 %.

Statisticky významné výsledky byly u rizikových alel *DR 03* ($P = 0,0139$) a *DQA1*05:01* ($P = 0,0298$). Nebyly zjištěny statisticky významné výsledky u alel *DR 04* ($P = 0,8481$) a *DQB1*0302* ($P > 0,999$).

Exprese genu *BACH2* u rizikových alel T1D



Graf č. 5: Porovnání relativní exprese genu *BACH2* u rizikových HLA alel. ZK jsou zdravé kontroly; vodorovné čáry značí medián; hvězdičkou je značena míra signifikance s využitím Mann-Whitneyho testu.

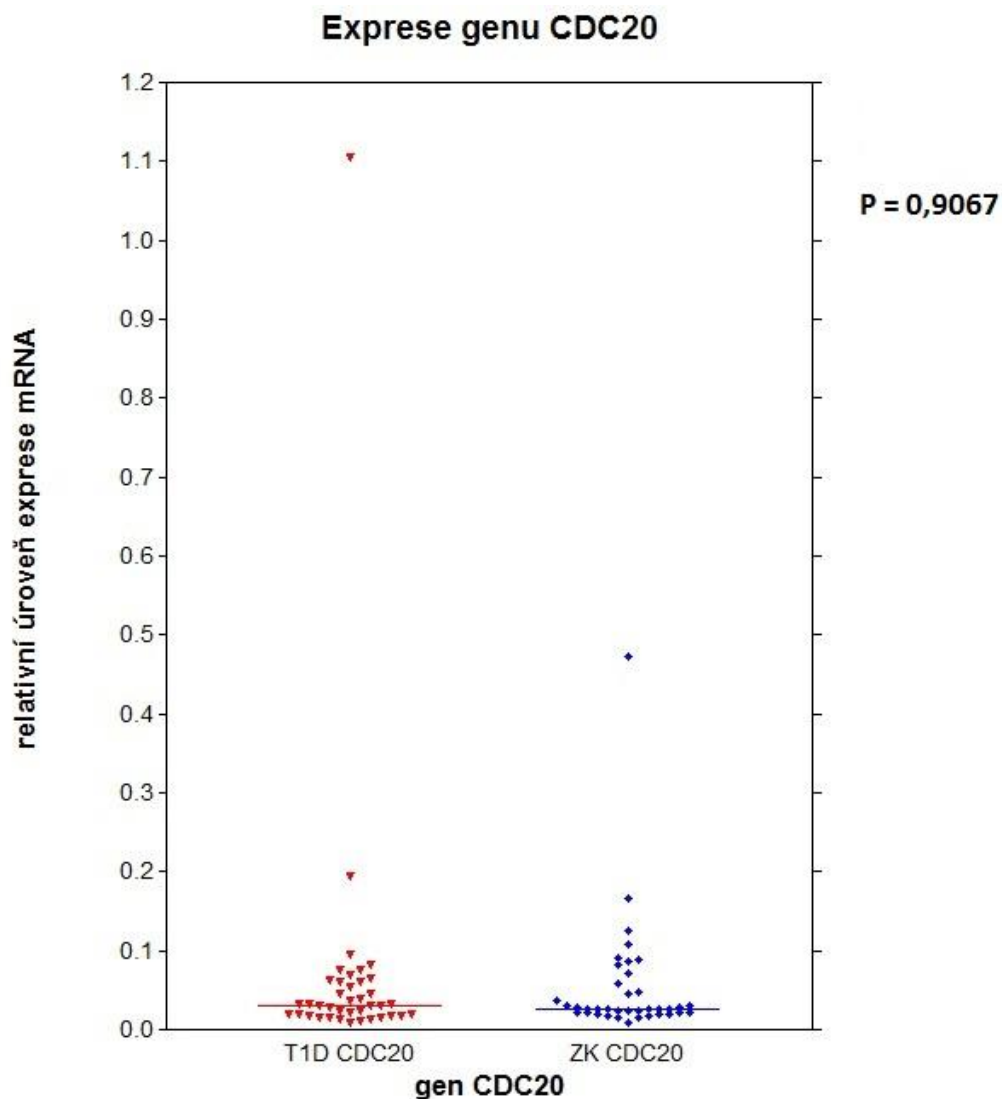
4.2.3 Analýza úrovně exprese mRNA genu *CDC20*

Expresi genu *CDC20* byla vztažena k expresi endogenní kontroly *HPRT1*. Nejdříve byly porovnané rozdíly v expresi mezi skupinami zdravých a nemocných jedinců, následně byly obě skupiny rozděleny na dvě věkové kategorie:

- děti 3 - 16 let,
- dospělí 17 - 72 let.

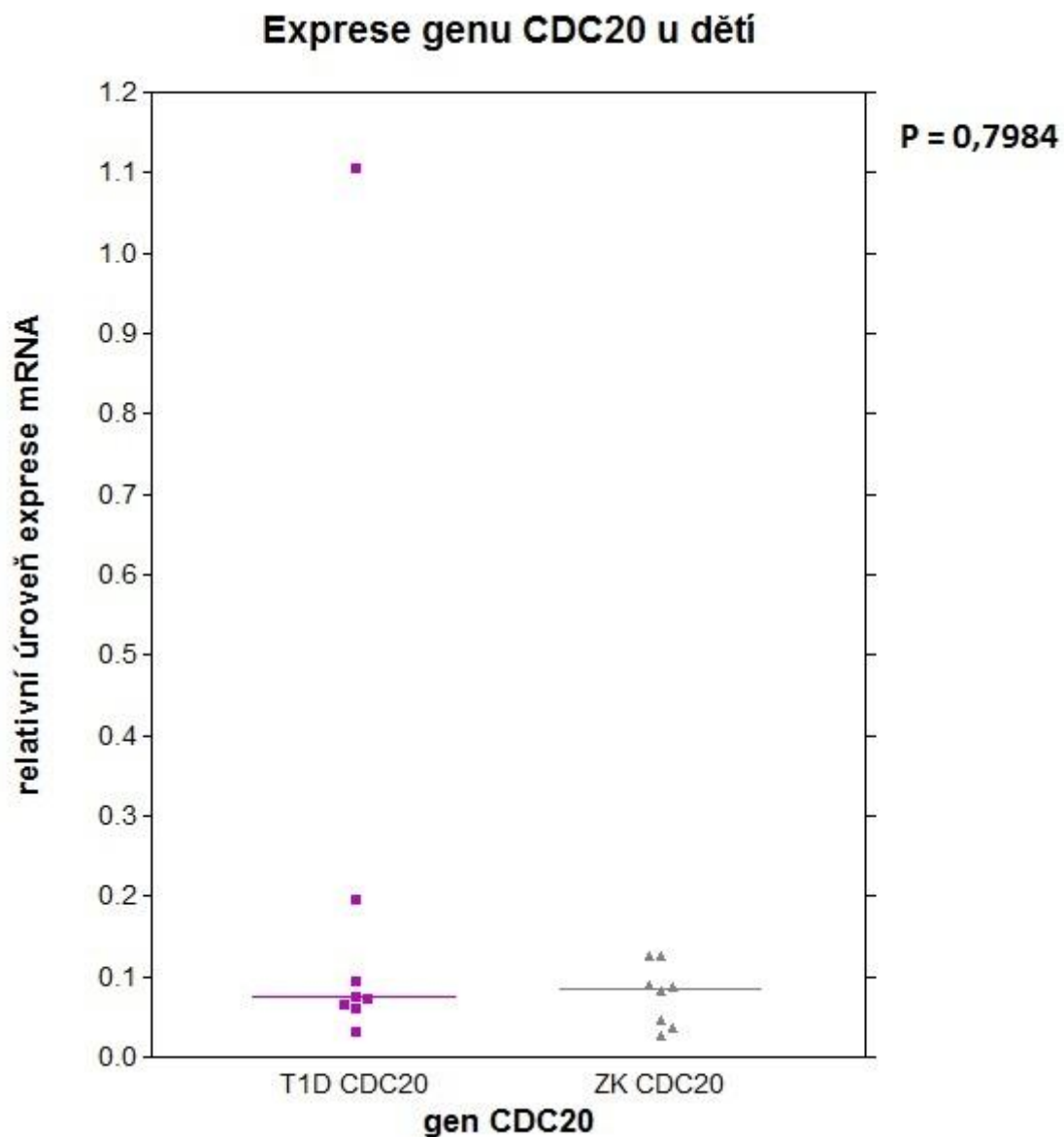
Skupiny byly porovnávány pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$.

Výsledky exprese genu *CDC20* u všech nemocných porovnaných se zdravými jsou zobrazeny v **grafu č. 6**. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,9067$).



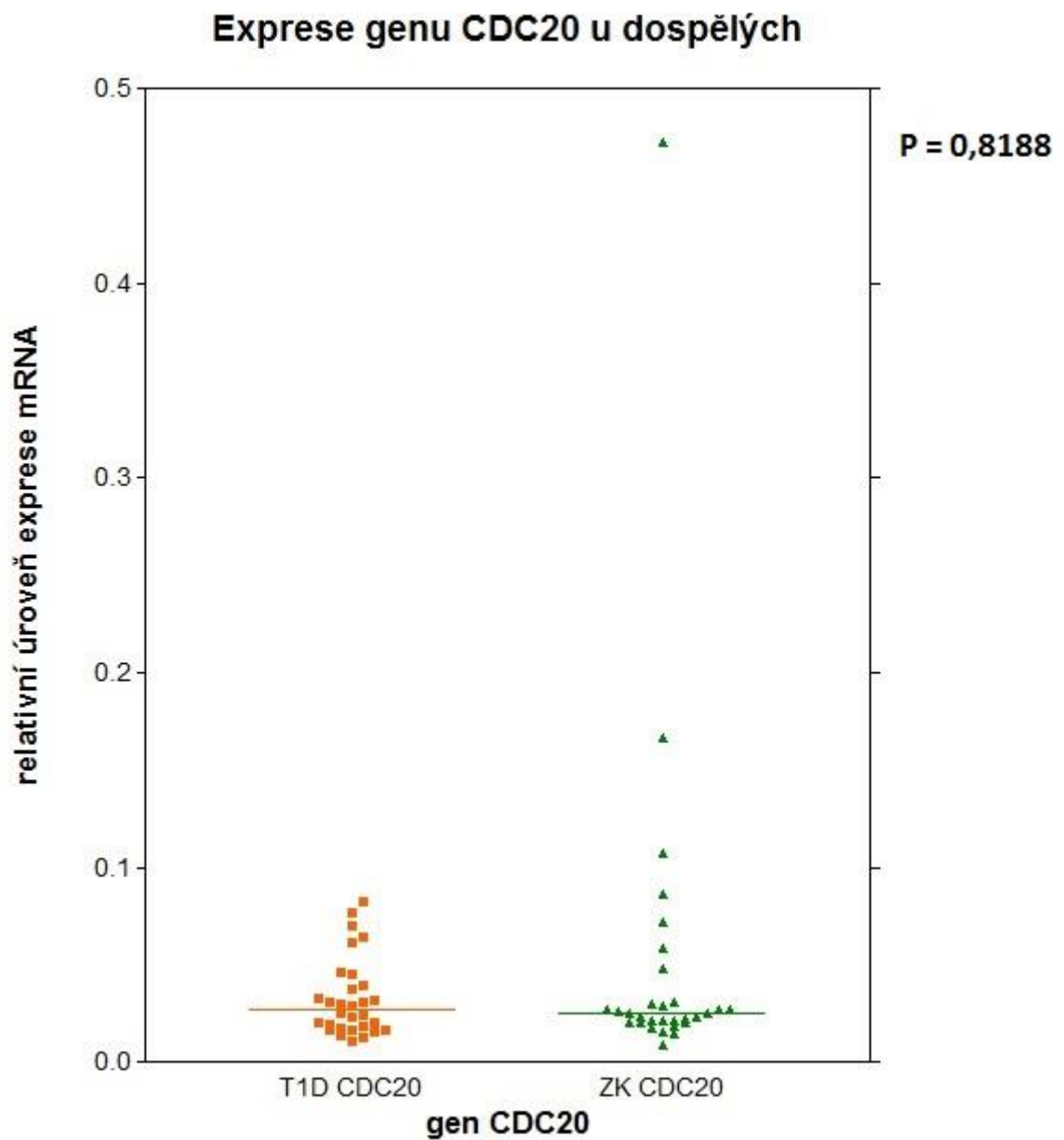
Graf č. 6: Relativní exprese genu *CDC20* u nemocných s T1D (červená) a zdravých kontrol (modrá); vodorovné čáry značí medián.

Výsledky porovnání exprese genu *CDC20* u nemocných a zdravých dětí jsou uvedeny v grafu č. 7. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,7984$).



Graf č. 7: Porovnání relativní exprese genu *CDC20* u dětí (fialová) s T1D ke zdravým dětem (šedivá); vodorovné čáry značí medián.

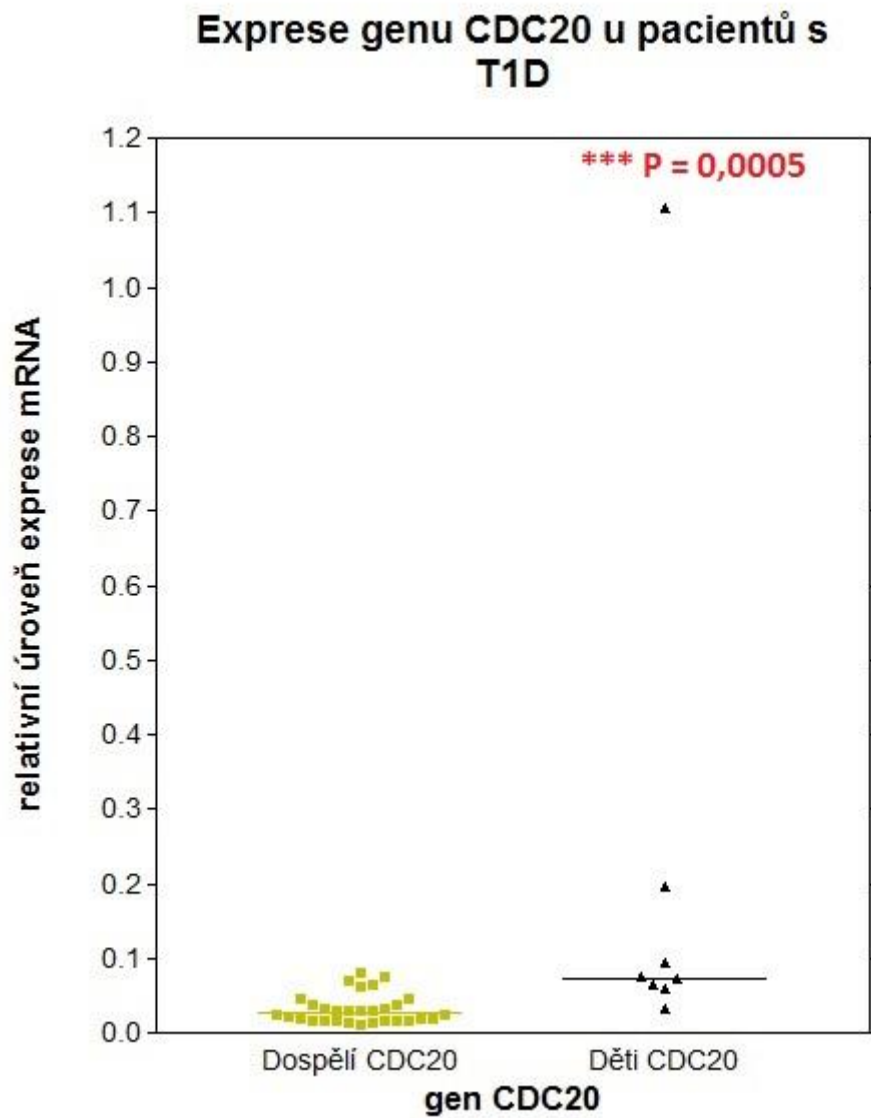
Výsledky porovnání exprese genu *CDC20* mezi dospělými s T1D ke zdravým dospělým jsou uvedeny v **grafu č. 8**. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,8188$).



Graf č. 8: Porovnání relativní exprese genu *CDC20* u dospělých s T1D (oranžová) ke zdravým kontrolám (zelená); vodorovné čáry značí medián.

Dále byla porovnávána exprese genu *CDC20* v rámci skupiny pacientů s T1D, ale rozdělení bylo na děti a dospělé. Cílem bylo zjistit, zda se liší expresní profil na počátku onemocnění a v průběhu onemocnění. Výsledky jsou zobrazeny v **grafu č. 9**.

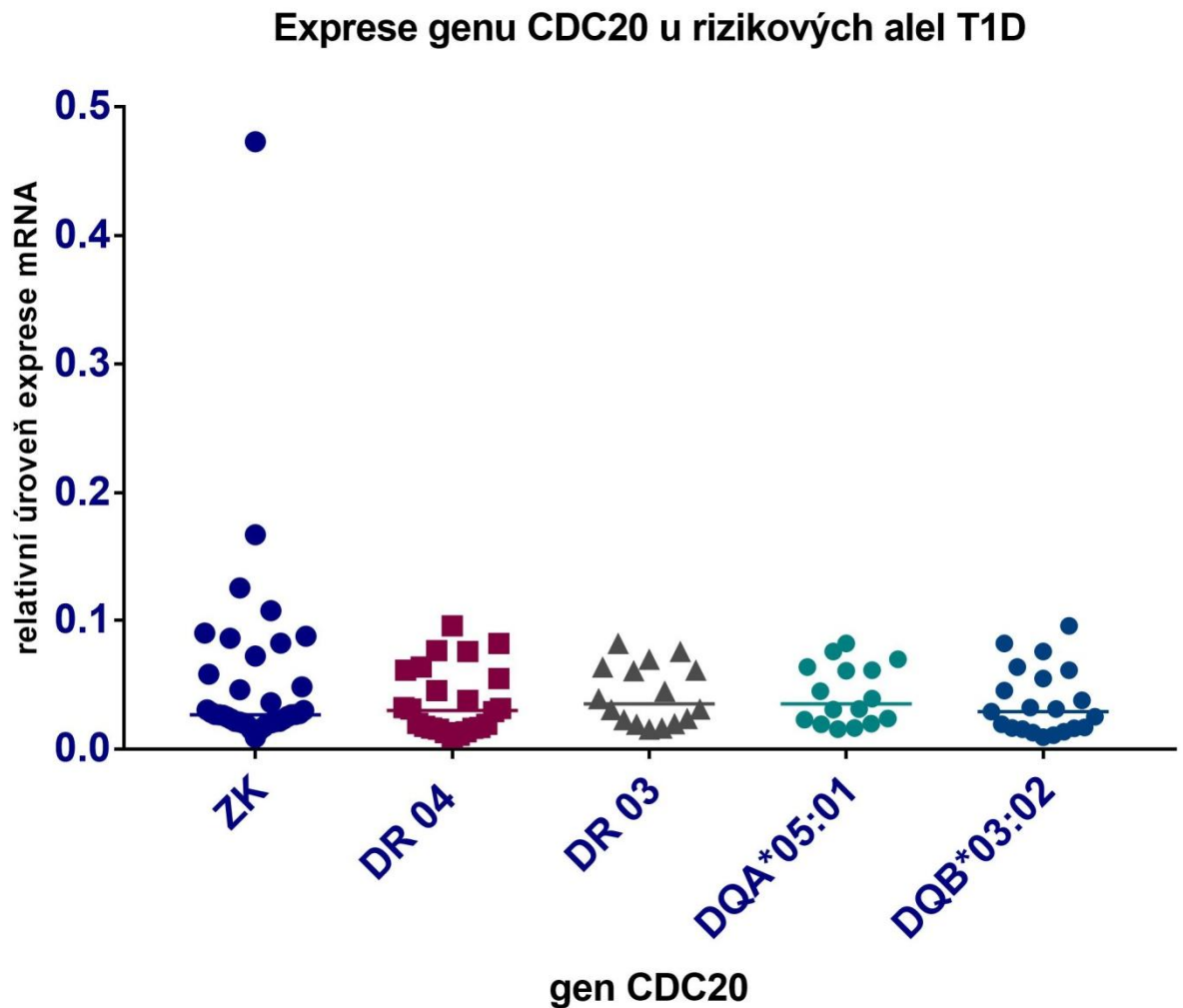
Výsledky jsou statisticky významné, jelikož je hladina významnosti pod 5 %, $P = 0,0005$.



Graf č. 9: Porovnání relativní exprese genu *CDC20* u dětí (černá) a dospělých s T1D (žlutá); vodorovné čáry značí medián; hvězdičky značí míru signifikance.

Dále bylo zjišťováno, zda se liší exprese genu *CDC20* u rizikových HLA alel *DR04*, *DR03*, *DQA1*0501* a *DQB1*0302*. Rizikové HLA alely byly porovnávány se zdravými kontrolami. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 10. Na zpracování výsledků byl použit neparametrický one-way ANOVA test Kruskal-Wallis. Hladina významnosti byla stanovena na 5 %.

U všech rizikových HLA alel nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P > 0,05$).



Graf č. 10: Porovnání relativní exprese genu *CDC20* u rizikových HLA alel. ZK jsou zdravé kontroly.

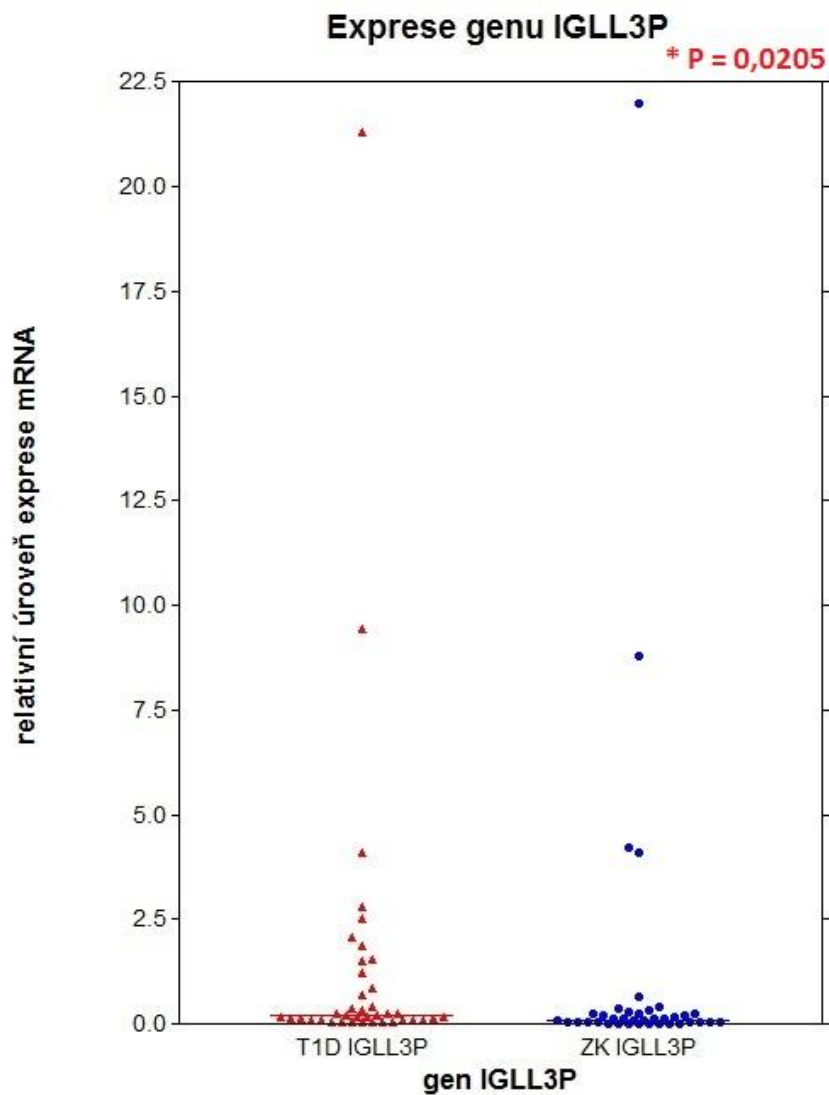
4.2.4 Analýza úrovně exprese mRNA genu *IGLL3P*

Expresce genu *IGLL3P* byla vztažena k expresi endogenní kontroly *HPRT1*. Nejdříve byly porovnané rozdíly v expresi mezi skupinami zdravých a nemocných jedinců, následně byly obě skupiny rozděleny na dvě věkové kategorie:

- děti 3 - 16 let,
- dospělí 17 - 72 let.

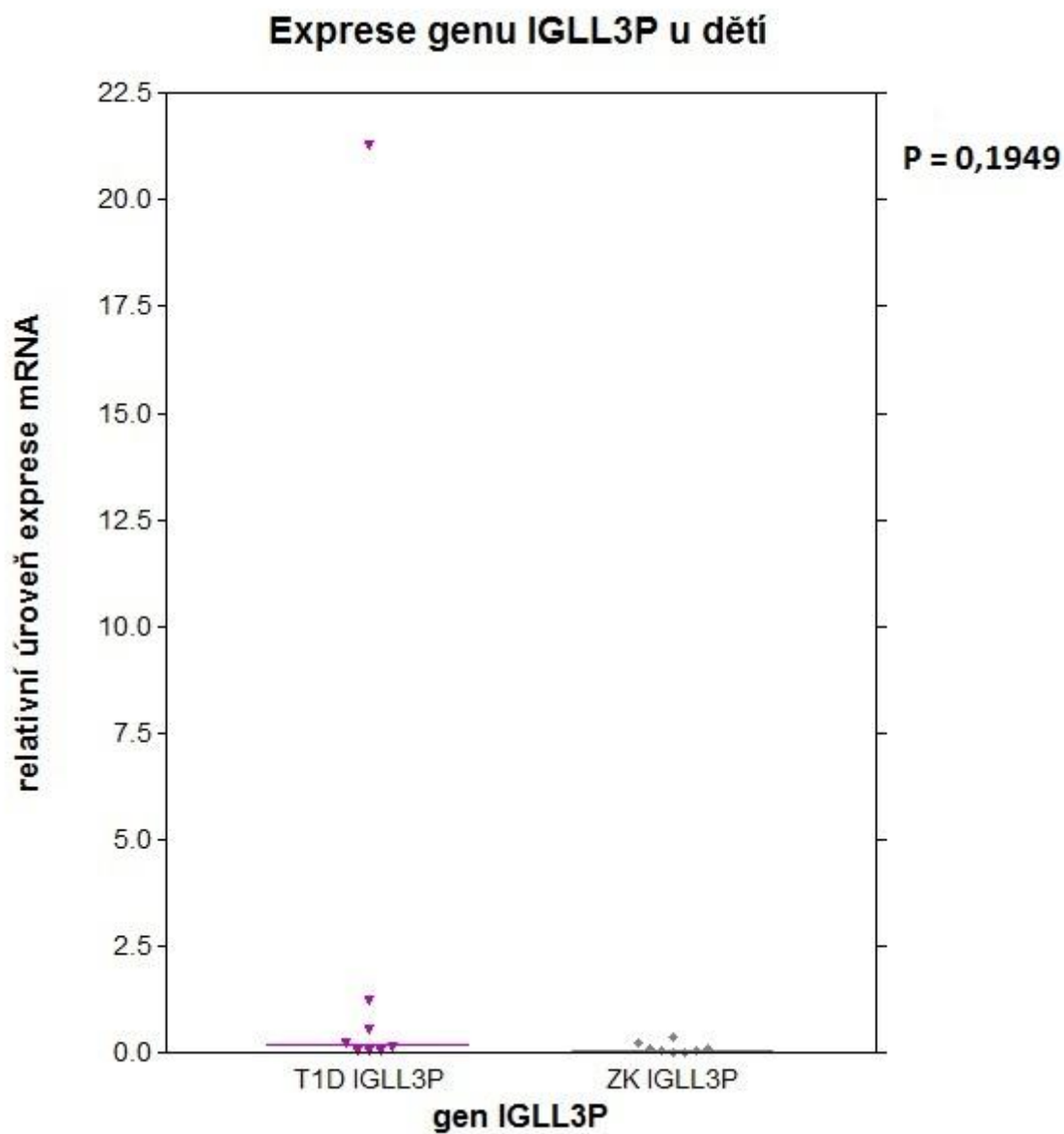
Skupiny byly porovnávány pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$.

Výsledky exprese genu *IGLL3P* u všech nemocných porovnaných se zdravými jsou zobrazeny v **grafu č. 11**. Hladina významnosti byla pod 5 %, $P = 0,0205$, tudíž jsou výsledky statisticky významné.



Graf č. 11: Relativní exprese genu *IGLL3P* u nemocných s T1D (červená) a zdravých kontrol (modrá) vodorovné čáry značí medián; hvězdička značí míru signifikance.

Výsledky porovnání exprese genu *IGLL3P* u nemocných a zdravých dětí jsou uvedeny v grafu č. 12. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,1949$).



Graf č. 12: Porovnání relativní exprese genu *IGLL3P* u dětí (fialová) s T1D ke zdravým dětem (šedivá); vodorovné čáry značí medián.

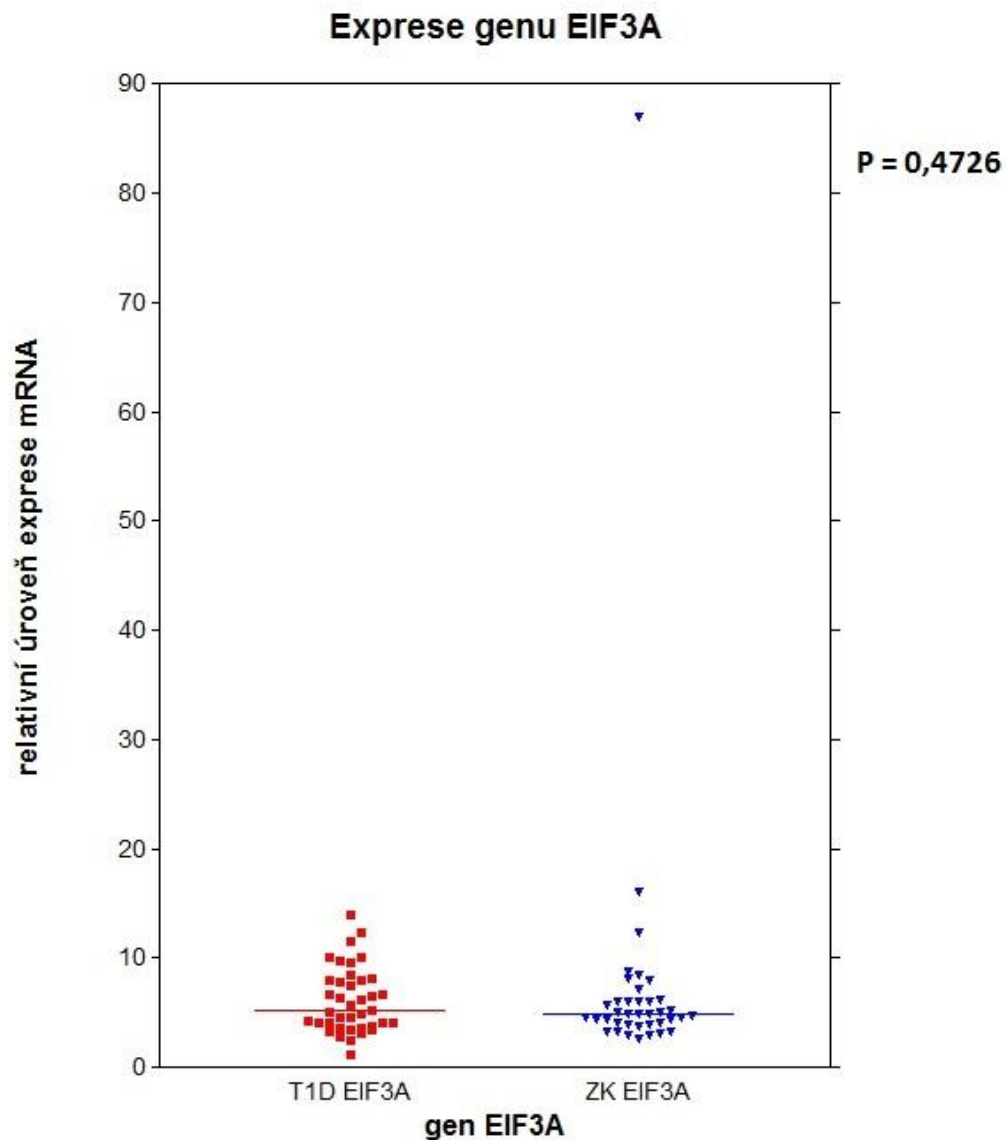
4.2.5 Analýza úrovně exprese mRNA genu *EIF3A*

Expresi genu *EIF3A* byla vztažena k expresi endogenní kontroly *HPRT1*. Nejdříve byly porovnané rozdíly v expresi mezi skupinami zdravých a nemocných jedinců, následně byly obě skupiny rozděleny na dvě věkové kategorie:

- děti 3 - 16 let,
- dospělí 17 - 72 let.

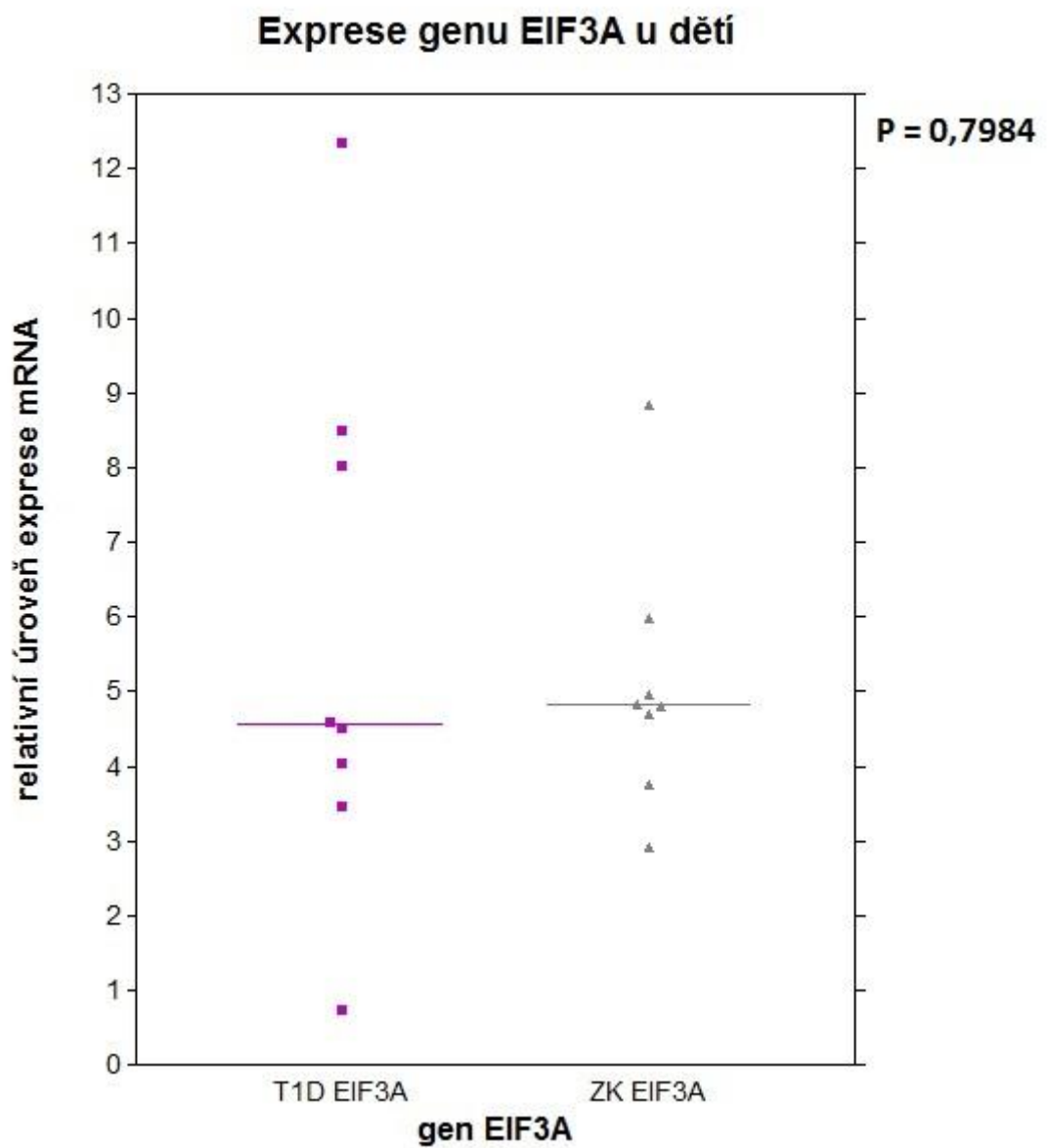
Skupiny byly porovnávány pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$.

Výsledky exprese genu *EIF3A* u všech nemocných porovnaných se zdravými jsou zobrazeny v **grafu č. 16**. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,4726$).



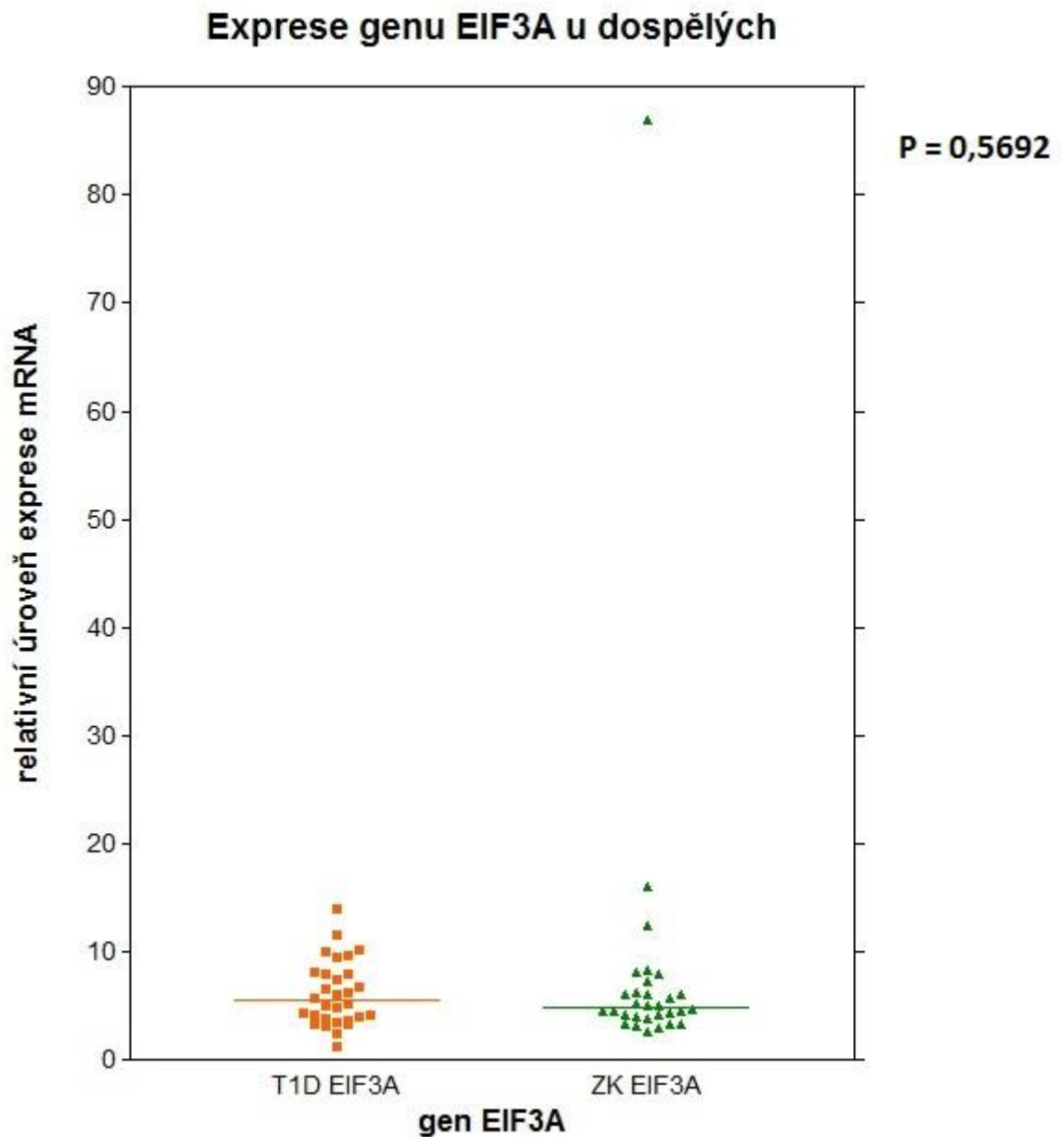
Graf č. 16: Relativní exprese genu *EIF3A* u nemocných s T1D (červená) a zdravých kontrol (modrá); vodorovné čáry značí medián.

Výsledky porovnání exprese genu *EIF3A* u nemocných a zdravých dětí jsou uvedeny v grafu č. 17. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,7984$).



Graf č. 17: Porovnání relativní exprese genu *EIF3A* u dětí s T1D (fialová) ke zdravým dětem (šedivá); vodorovné čáry značí medián.

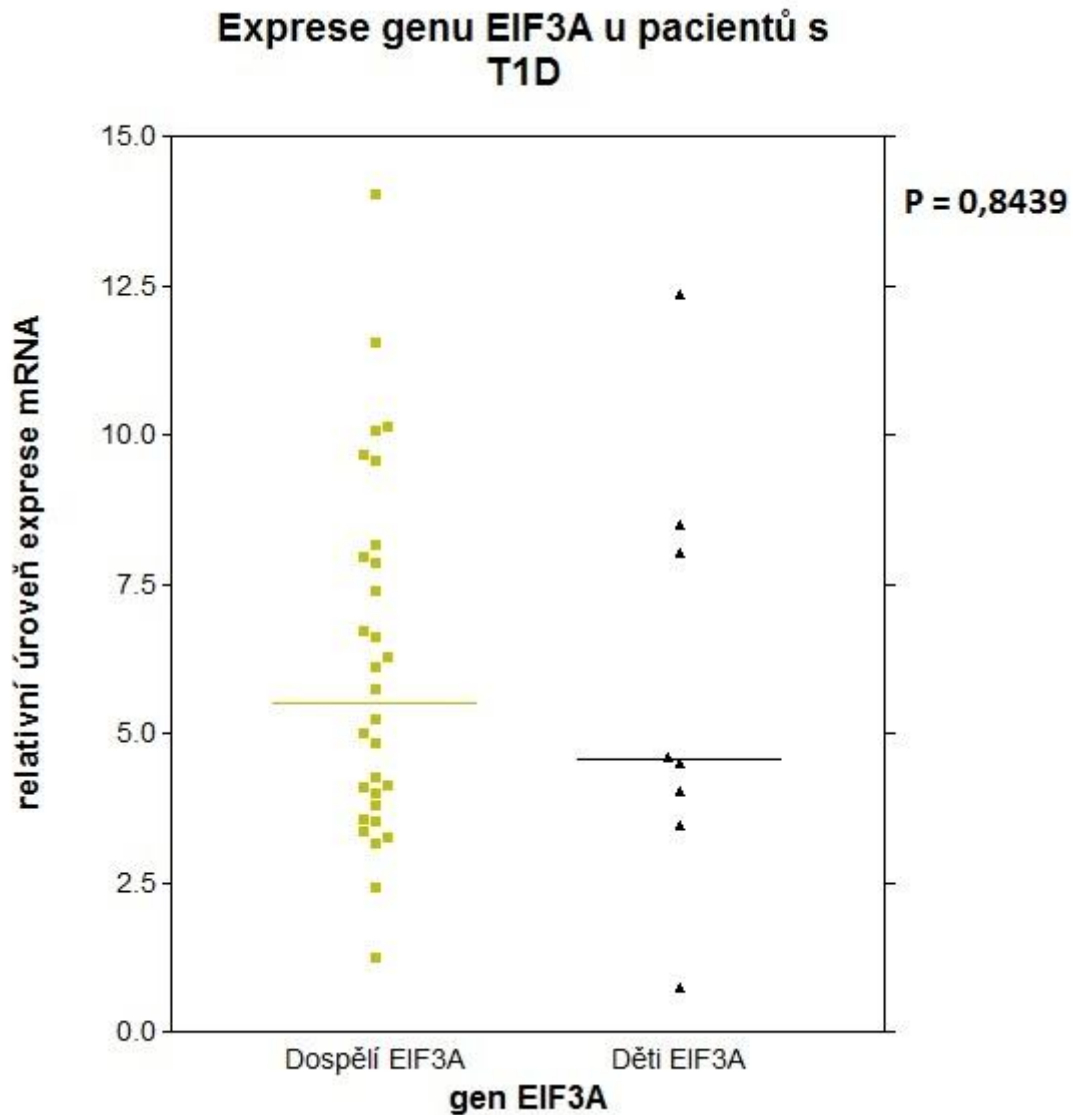
Výsledky porovnání exprese genu *EIF3A* mezi dospělými s T1D ke zdravým dospělým jsou uvedeny v **grafu č. 18**. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,5692$).



Graf č. 18: Porovnání relativní exprese genu *EIF3A* u dospělých s T1D (oranžová) ke zdravým dospělým kontrolám (zelená); vodorovné čáry značí medián.

Dále byla porovnávána exprese genu *EIF3A* v rámci skupiny pacientů s T1D, ale rozdělení bylo na děti a dospělé. Cílem bylo zjistit, zda se liší expresní profil na počátku onemocnění a v průběhu onemocnění. Výsledky jsou zobrazeny v **grafu č. 19**.

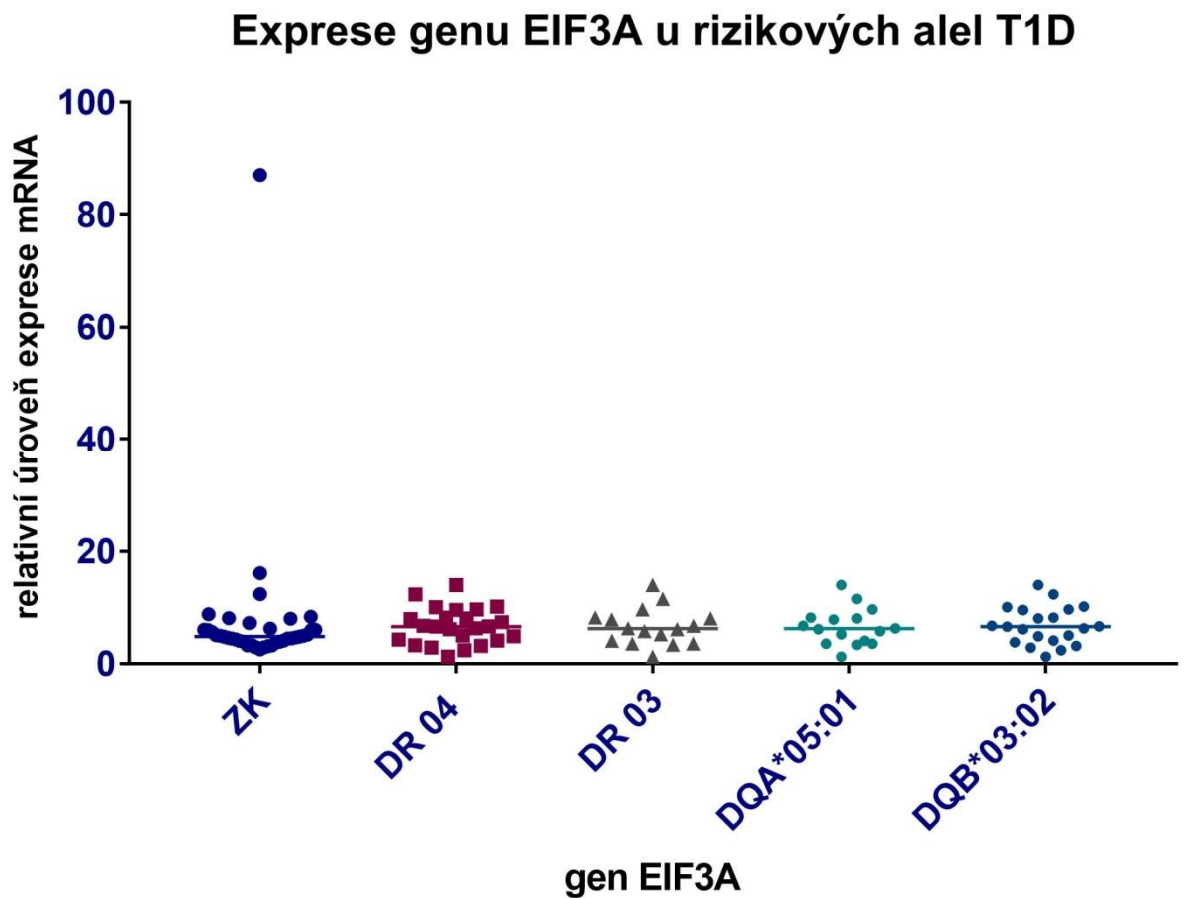
Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,8439$).



Graf č. 19: Porovnání relativní exprese genu *EIF3A* u dětí (černá) a dospělých s T1D (žlutá); vodorovné čáry značí medián.

Poté bylo zjišťováno, zda se liší exprese genu *EIF3A* u rizikových HLA alel *DR04*, *DR03*, *DQA1*0501* a *DQB1*0302*. Rizikové HLA alely byly porovnávány se zdravými kontrolami. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 20. Na zpracování výsledků byl použit neparametrický one-way ANOVA test Kruskal-Wallis. Hladina významnosti byla stanovena na 5 %.

U rizikových alel nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P > 0,05$).



Graf č. 20: Porovnání relativní exprese genu *EIF3A* u rizikových HLA alel. ZK jsou zdravé kontroly; vodorovné čáry značí medián.

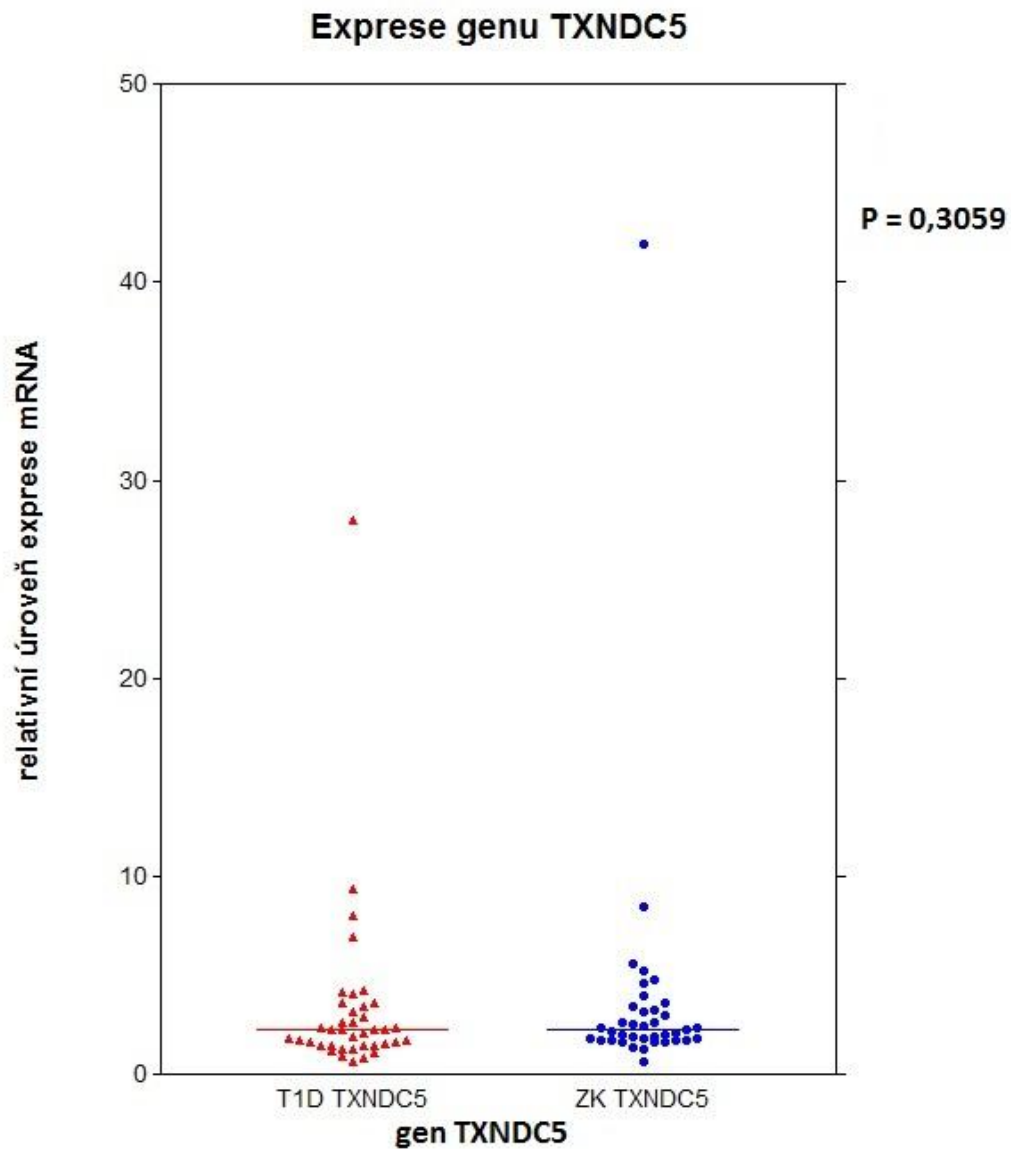
4.2.6 Analýza úrovně exprese mRNA genu *TXNDC5*

Expres genu *TXNDC5* byla vztažena k expresi endogenní kontroly *HPRT1*. Nejdříve byly porovnané rozdíly v expresi mezi skupinami zdravých a nemocných jedinců, následně byly obě skupiny rozděleny na dvě věkové kategorie:

- děti 3 - 16 let,
- dospělí 17 - 72 let.

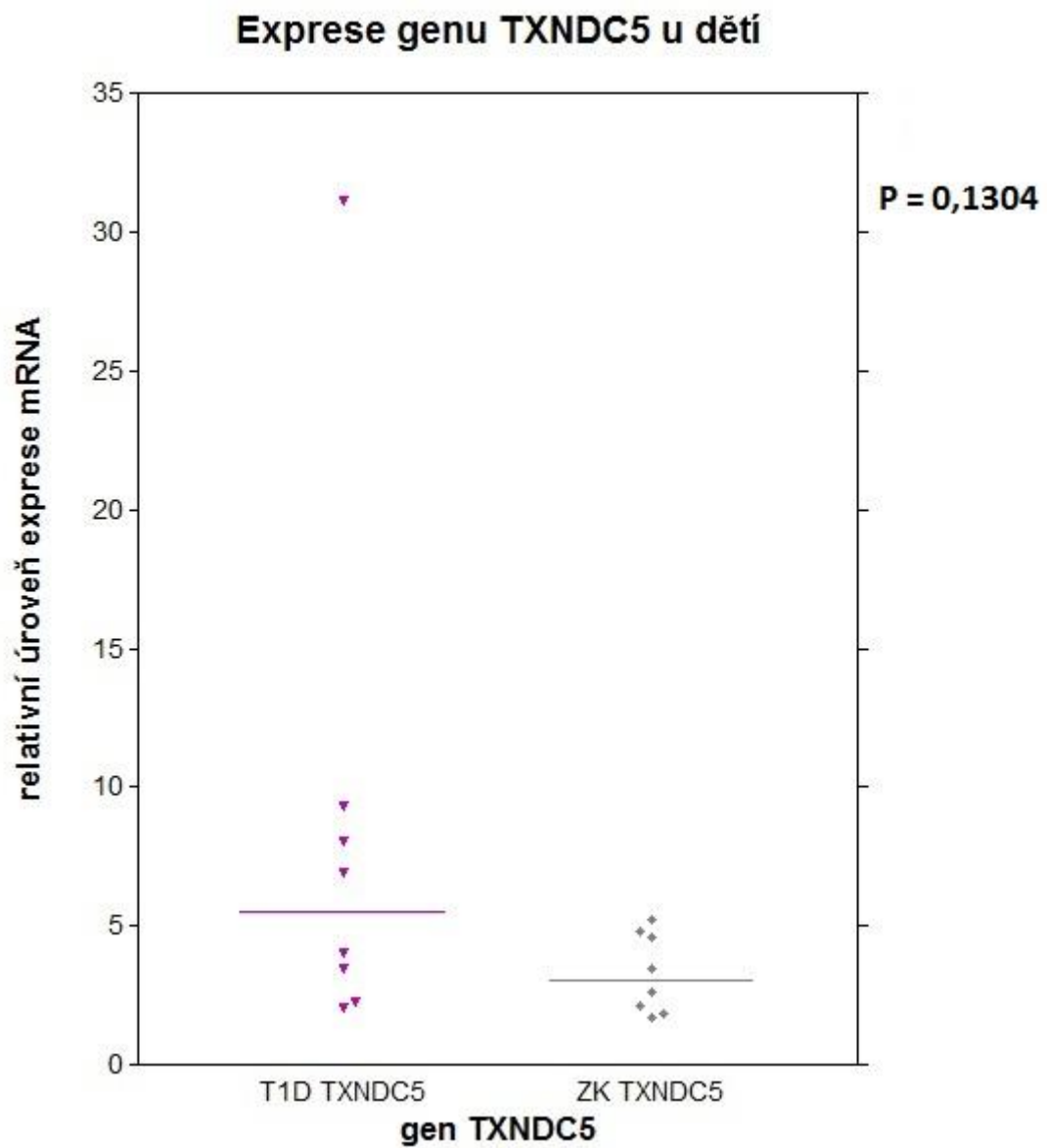
Skupiny byly porovnávány pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$.

Výsledky exprese genu *TXNDC5* u všech nemocných porovnaných se zdravými jsou zobrazeny v **grafu č. 21**. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,3059$).



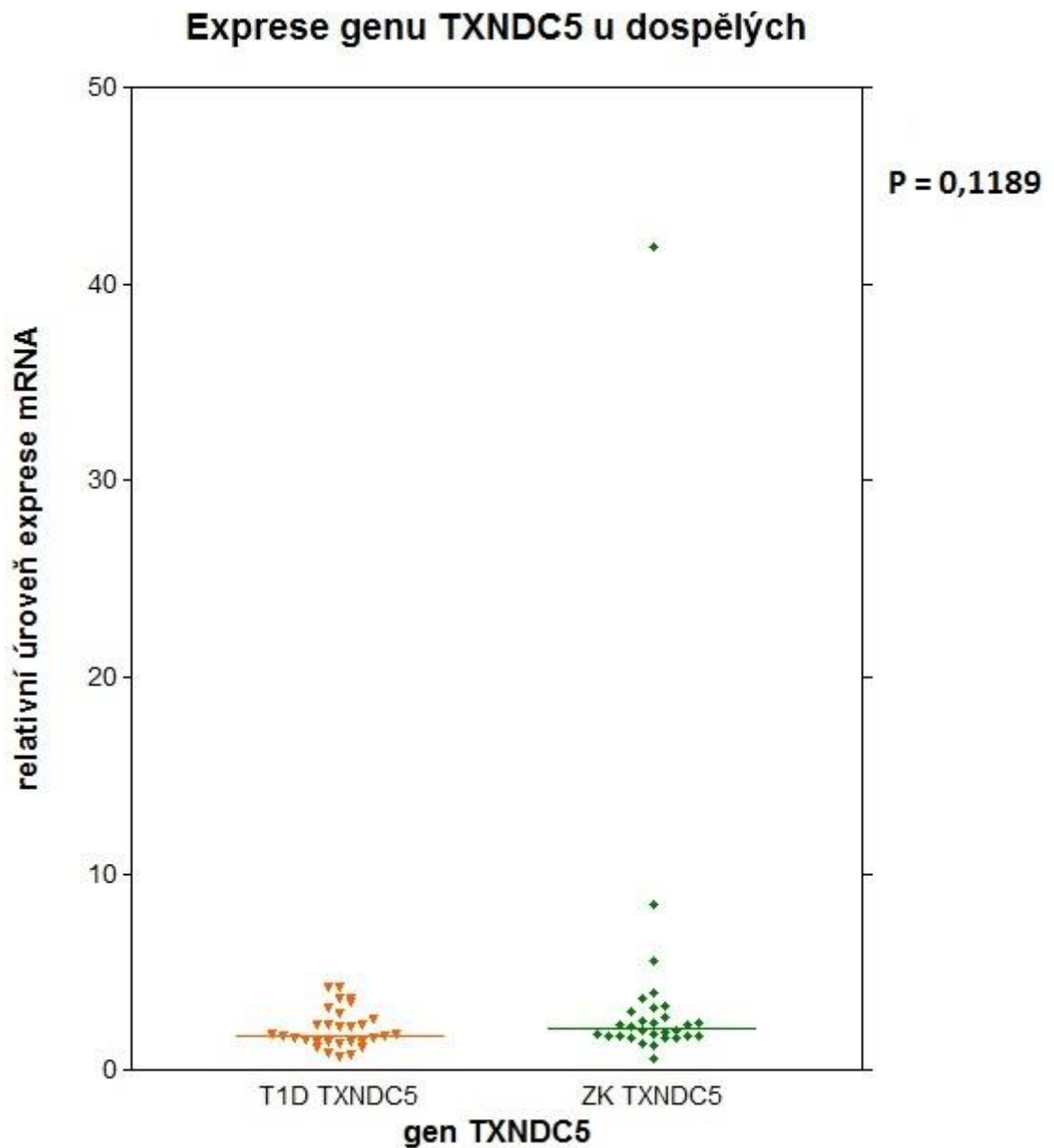
Graf č. 21: Relativní exprese genu *TXNDC5* u nemocných s T1D (červená) a zdravých kontrol (modrá); vodorovné čáry značí medián.

Výsledky porovnání exprese genu *TXNDC5* u nemocných a zdravých dětí jsou uvedeny v grafu č. 22. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,1304$).



Graf č. 22: Porovnání relativní exprese genu *TXNDC5* u dětí s T1D (fialová) ke zdravým dětem (šedivá); vodorovné čáry značí medián.

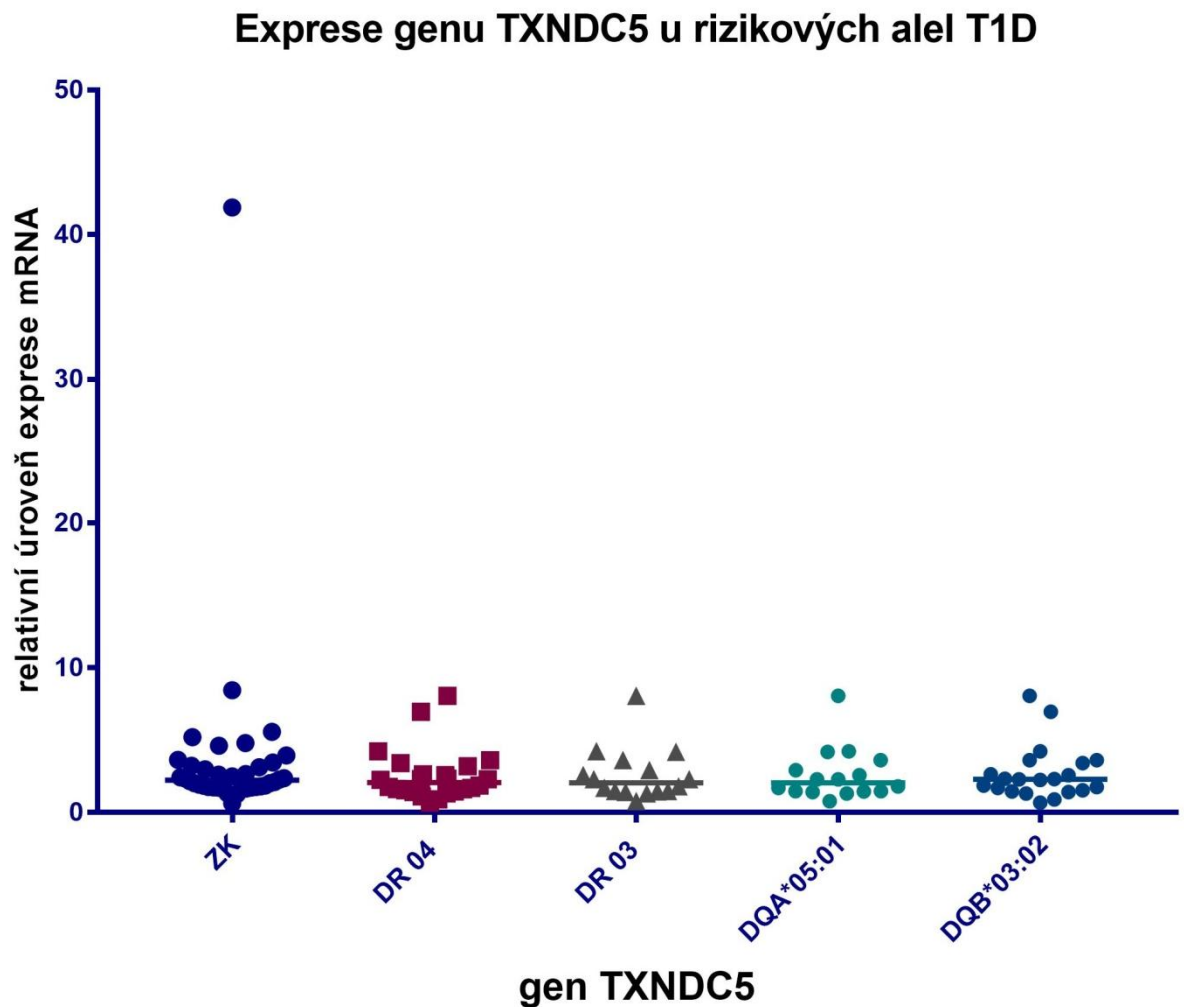
Výsledky porovnání exprese genu *TXNDC5* mezi dospělými s T1D ke zdravým dospělým jsou uvedeny v grafu č. 23. Nebyly nalezeny statisticky významné výsledky ($P = 0,1189$).



Graf č. 23. Porovnání relativní exprese genu *TXNDC5* u dospělých s T1D (oranžová) ke zdravým dospělým kontrolám (zelená); vodorovné čáry značí medián.

Nakonec bylo zjišťováno, zda se liší exprese genu *TXNDC5* u rizikových HLA alel *DR04*, *DR03*, *DQA1*0501* a *DQB1*0302*. Rizikové HLA alely byly porovnávány se zdravými kontrolami. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 25. Na zpracování výsledků byl použit neparametrický one-way ANOVA test Kruskal-Wallis. Hladina významnosti byla stanovena na 5 %.

U rizikových alel nebyly zjištěny statisticky významné výsledky ($P > 0,05$).



Graf č. 25: Porovnání relativní exprese genu *TXNDC5* u rizikových HLA alel. ZK jsou zdravé kontroly; vodorovné čáry značí medián.

5 Diskuze

Predikce komplexního onemocnění T1D, ve kterém hrají roli nejen genetické faktory, ale jako spouštěč zde působí vnější prostředí, je složitá. V této studii se hlavně zaměřilo na genetickou predikci. Bylo vybráno pět kandidátních genů, u kterých se zkoumala jejich exprese. Byly to *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3P*, *EIF3A* a *TXNDC5* na základě vědecké práce od Y. Jin a spol. ve které zkoumaly tyto geny vzhledem k možné predikci T1D (Jin et al., 2014). Gen *BACH2* působí jako transkripční faktor (Kometani et al., 2013), podílí se na negativní selekci pre-B buněk (Swaminathan et al., 2013) a při apoptóze (Marroquí et al., 2014). Gen *CDC20* interaguje spolu s jinými proteiny a účastní se při buněčném cyklu. Gen *IGLL3P* se podílí na vývoji B-buněk imunitního systému (Bauer et al., 1993). Gen *EIF3* iniciuje translaci a zřejmě jeho různé podjednotky se podílejí u napětově řízených Ca^{2+} kanálů u β -buněk. Gen *TXNDC5* může hrát roli v ochraně hypoxických buněk před apoptózou (Sullivan et al., 2003). Tato diplomová práce porovnává exprese kandidátních genů u dětí ve věku 3 - 11 let, u dospělých ve věku 22 - 72 let a dále porovnává změnu exprese u jednotlivých rizikových HLA alel *DR04*, *DR03*, *DQA1*0501* a *DQB1*0302*.

Výsledky genotypizace ukazují, které haplotypy byly v této studii nejčastěji obsaženy. Nejfrekventovanějším haplotypem u pacientů s T1D byl *DQA1*03:01-DQB1*03:02* s *DR04*, druhý nejčastější haplotyp byl *DQA1*05:01-DQB1*02:01* s *DR03*, což jsou rizikové haplotypy spojené s progresí T1D (Černá, 2008). U zdravých jedinců byl nejfrekventovanějším haplotypem *DQA1*05:05-DQB1*03:01* s *DR11* stejně jako ve studii M. Zajacové a spol., kde testovaly nejčastější haplotyp HLA genů u české populace (Zajacova et al., 2016) a druhým nejčastějším haplotypem byl *DQA1*02:01-DQB1*02:02* s *DR07*.

V této studii u kvantitativní PCR byla použita endogenní kontrola genu *HPRT1* (tento gen se exprimuje u všech buněk ve stejném množství), která byla vztažena k jednotlivým kandidátním genům pro predikci T1D.

V dnešní době jsou autoprotilátky na inzulín, *GAD65*, *IA-2* a *IA2p* standardními biomarkery k odhadu rizika pro rozvoj T1D. Tyto auto protilátky jsou čtyři hlavní molekulární markery, které se alespoň u 94 % pacientů s T1D exprimují a na jejich základě se diagnostikuje T1D (Wenzlau and Hutton, 2013). Nicméně, testování těchto autoprotilátek není úplně konkrétní i když je detekováno více autoprotilátek. Cílem naší studie bylo zjistit,

zda se společně se standardními biomarkery dá využít exprese kandidátních genů k vylepšení odhadu rizika nástupu a rozvoji T1D jako ve studii, kterou provedl vědecký tým Y. Jin a spol. V jejich práci bylo zjištěno, že geny *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3P*, *EIF3A* a *TXNDC5* mají signifikanci a dají se společně s klasickými biomarkery použít k lepší prognóze T1D (Jin et al., 2014). Naše studie byla rozšířena na dospělé jedince s dlouhodobějším projevem T1D a zjišťování exprese u rizikových HLA alel spojené s T1D.

Při porovnávání exprese genu *BACH2* byly výsledky mezi celkovým počtem pacientů s T1D a zdravými kontrolami a mezi dospělými s T1D a zdravými dospělými statisticky nevýznamné. Dále jsme porovnávaly expresi nemocných dětí se zdravými dětmi a výsledky také nebyly statisticky významné jako to bylo ve studii Y. Jin a spol., ve které vyšla signifikance $P = 0,00571$ (Jin et al., 2014). Je to zřejmě způsobené tím, že v naší studii byl malý vzorek dětských pacientů. Co se týče porovnávání nemocných dětí s nemocnými dospělými vyšla nám P-hodnota 0,0055, tedy výsledek je statisticky významný. Může to být tím, že u dětí je první záchyt onemocnění T1D a proto mohou mít vyšší expresi genu *BACH2*, kdežto u dospělých už je dlouhodobý průběh a navíc je onemocnění léčeno podáním inzulínu. Je známo, že expresní profily se během věku mění, což může být i tento případ. U porovnání exprese genu *BACH2* mezi jednotlivými rizikovými HLA alelami vyšly statisticky významné výsledky u alely *DR03* ($P = 0,0139$) a u alely *DQA1*05:01* (0,0298). Obě tyto alely se často vyskytují společně v haplotypu.

Dále se porovnávala exprese kandidátního genu *CDC20*. Statisticky nevýznamné výsledky byly mezi celkovým počtem vybraných jedinců s T1D a zdravými kontrolami a mezi nemocnými dospělými a zdravými dospělými. Ani u tohoto genu v naší práci nevyšla statisticky významná hodnota při porovnávání nemocných dětí se zdravými dětmi jako to bylo ve studii Y. Jin a spol. ($P = 0,0346$) (Jin et al., 2014). U tohoto genu vyšly statisticky významné výsledky ($P = 0,0005$) při porovnání nemocných dětí a nemocných dospělých. I zde to může mít za následek odlišný expresní profil mezi prvopočátkem a dlouhodobějším průběhem onemocnění, během něhož jsou jedinci delší dobu léčeni inzulínem. U porovnání exprese genu *CDC20* mezi jednotlivými rizikovými alelami, byly výsledky vysoko nad hladinou významnosti a proto jsou statisticky nevýznamné.

Následně se porovnávala exprese genu *IGLL3P*. Ke statisticky významným výsledkům došlo při porovnávání mezi celkovým počtem jedinců s T1D a zdravými kontrolami ($P = 0,0205$) oproti porovnání skupin dle jednotlivých věkových kategorií (dětí, dospělí).

Může to být velkým rozptylem v celkové skupině, kdy u pár jedinců došlo k významné expresi genu *IGLL3P* a vyšším mediánem oproti zdravým kontrolám. U porovnání mezi nemocnými dětmi a nemocnými dospělými bylo zjištěno, že P-hodnota (0,6037) je nad 5 %, tudíž jsou statisticky nevýznamné. Při porovnávání exprese genu *IGLL3P* u jednotlivých rizikových HLA alel vyšly statisticky významné výsledky u *DR04* (P = 0,0012) a u *DQB1*03:02* (P = 0,0109). Tyto rizikové alely spolu často tvoří haplotyp a jsou nejfrekventovanějším haplotypem v této studii.

U genu *EIF3A* nebyly statisticky významné výsledky u žádného typu porovnávání, proto se na základě výsledků v této práci nedá gen *EIF3A* použít jako kandidátní gen u predikce T1D. Ve studii Y. Jin a spol. však gen *EIF3A* vyšel jako statisticky významný a jeho P hodnota byla těsně nad hranicí hladiny významnosti 0,0737 (Jin et al., 2014).

Nakonec se porovnávala exprese genu *TXNDC5*. Opět byly statisticky nevýznamné výsledky mezi celkovým počtem jedinců s T1D a zdravými kontrolami a mezi nemocnými dospělými a zdravými dospělými. Ani u tohoto genu nám nevyšla signifikance u dětí s T1D v porovnání se zdravými dětmi jako v práci Y. Jin a spol. (P = 0,0180) (Jin et al., 2014). U porovnání exprese genu *TXNDC5* vyšly statisticky významné hodnoty mezi nemocnými dětmi a nemocnými dospělými (P = 0,0012). I tento výsledek může být ovlivněn různým expresním profilem mezi doposud neléčeným prvním záchytem u dětí, kdy je exprese vyšší, a u dospělých dlouhodobě léčených inzulínem. U porovnání, zda exprese genu *TXNDC5* je vyšší u některé z rizikových HLA alel, vyšly výsledky vysoko nad hladinou významnosti 5%, proto jsou statisticky nevýznamné.

Na závěr celé této studie je důležité říci, že námi vybrané kandidátní geny *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3P*, *EIF3A* a *TXNDC5* se na základě našich výsledků nedají použít jako genetické markery pro predikci T1D. Může to být způsobeno tím, že jsme měly malý počet dětských pacientů a proto doporučujeme, aby tato vědecká studie pokračovala a rozšířila ji o větší počet mladých jedinců s prvopočátkem rozvoje T1D. Dalším faktorem může být dlouhodobá léčba u dospělých jedinců, kdy se exprese kandidátních genů na základě léčby snížila.

Je ale zajímavý fakt, že se liší exprese genů *BACH2*, *CDC20* a *TXNDC5* mezi nemocnými dětmi a nemocnými dospělými. Může to být právě výše zmíněným odlišným expresním profilem v různém věku a tím, že u zatím neléčených dětí byl první záchyt onemocnění T1D a u dospělých se exprese může snížit díky léčbě inzulínem.

Pokud jde o porovnání exprese kandidátních genů u rizikových HLA alel u T1D, bylo zjištěno, že je vyšší exprese genu *BACH2* u *DR03* a *DQA1*05:01* (tyto alely tvoří druhý nejfrekventovanější haplotyp v této studii) a u genu *IGLL3P* u *DR04* a *DQB1*03:02* (tyto alely tvoří nejfrekventovanější haplotyp v této studii).

6 Souhrn

Tato studie navazuje na vědeckou práci Y. Jin a spol., kteří si zvolili kandidátní geny k určení predikce T1D (Jin et al., 2014) a rozšířila ji o dospělé pacienty s T1D, u kterých je dlouhodobá manifestace T1D.

V rámci diplomové práce jsem stanovila relativní úroveň exprese kandidátních genů *BACH2*, *CDC20*, *IGLL3P*, *EIF3A* a *TXNDC5*. Expresi kandidátních genů jsem rozdělila na dvě věkové kategorie, děti ve věku 2 - 15,9 let a dospělé ve věku 16 a více let. Dále jsem analyzovala relativní úroveň exprese kandidátních genů ve vztahu k rizikovým HLA alelám *DR04*, *DR03*, *DQA1*0501* a *DQB1*03:02*. Výsledná data byla porovnáována mezi jedinci s T1D a zdravými kontrolami a byly vyvozeny tyto závěry:

- Nejčastější rizikový HLA haplotyp našeho souboru odpovídá haplotypu potvrzenému studii.
- Expresi kandidátních genů u dětí nekoreluje s publikovanými výsledky Y. Jin a spol. (Jin et al., 2014), ale zřejmě je to způsobené malým počtem vzorků.
- Významné rozdíly úrovně exprese kandidátních genů byly zjištěny mezi dětmi s T1D a dospělými s T1D.
- Statisticky významné vyšly výsledky u genu *BACH2* a rizikových HLA alel *DR03* a *DQA1*05:01* a dále u genu *IGLL3P* u rizikových HLA alel *DR04* a *DQB1*03:02*.

Seznam použité literatury

- Alberti, A., Karamessinis, P., Peroulis, M., Kypreou, K., Kavvadas, P., Pagakis, S., Politis, P.K., and Charonis, A. (2009). ERp46 is reduced by high glucose and regulates insulin content in pancreatic - cells. *AJP Endocrinol. Metab.* *297*, E812–E821.
- Barrett, J.C., Clayton, D.G., Concannon, P., Akolkar, B., Cooper, J.D., Erlich, H.A., Julier, C., Morahan, G., Nerup, J., Nierras, C., et al. (2009). Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat. Genet.* *41*, 703–707.
- Bauer, T.R., McDermid, H.E., Budarf, M.L., Van Keuren, M.L., and Blomberg, B.B. (1993). Physical location of the human immunoglobulin lambda-like genes, 14.1, 16.1, and 16.2. *Immunogenetics* *38*, 387–399.
- Bergholdt, R., Brorsson, C., Palleja, A., Berchtold, L.A., Fløyel, T., Bang-Berthelsen, C.H., Frederiksen, K.S., Jensen, L.J., Størling, J., and Pociot, F. (2012). Identification of novel type 1 diabetes candidate genes by integrating genome-wide association data, protein-protein interactions, and human pancreatic islet gene expression. *Diabetes* *61*, 954–962.
- Buda, P., Reinbothe, T., Nagaraj, V., Mahdi, T., Luan, C., Tang, Y., Axelsson, A.S., Li, D., Rosengren, A.H., Renström, E., et al. (2013). Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit e controls intracellular calcium homeostasis by regulation of cav1.2 surface expression. *PLoS One* *8*, e64462.
- Černá, M., Kolostova, K., Novota, P., Romzova, M., Cejkova, P., Pinterova, D., Pruhova, S., Treslova, L., and Andel, M. (2007). Autoimmune diabetes mellitus with adult onset and type 1 diabetes mellitus in children have different genetic predispositions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1110*, 140–150.
- Černá, M. (2008). Genetics of autoimmune diabetes mellitus. *Wien. Med. Wochenschr.* *158*, 2–12.
- Conrad, B., Weissmahr, R.N., Böni, J., Arcari, R., Schüpbach, J., and Mach, B. (1997). A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* *90*, 303–313.
- Cooper, J.D., Smyth, D.J., Smiles, A.M., Plagnol, V., Walker, N.M., Allen, J.E., Downes, K., Barrett, J.C., Healy, B.C., Mychaleckyj, J.C., et al. (2008). Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat. Genet.* *40*, 1399–1401.

Craighead, J.E., and McLane, M.F. (1968). Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science* 162, 913–914.

Domínguez-Bendala, J., Lanzoni, G., Klein, D., Álvarez-Cubela, S., and Pastori, R.L. (2016). The Human Endocrine Pancreas: New Insights on Replacement and Regeneration. *Trends Endocrinol. Metab.*

Duivenvoorden, W.C.M., Paschos, A., Hopmans, S.N., Austin, R.C., and Pinthus, J.H. (2014). Endoplasmic reticulum protein ERp46 in renal cell carcinoma. *PLoS One* 9, e90389.

Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1998). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol. Cell* 2, 163–171.

Fourlanos, S., Dotta, F., Greenbaum, C.J., Palmer, J.P., Rolandsson, O., Colman, P.G., and Harrison, L.C. (2005). Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent. *Diabetologia* 48, 2206–2212.

Genga, K.R., Filho, F.D.R., Ferreira, F.V. de A., de Sousa, J.C., Studart, F.S., Magalhães, S.M.M., Heredia, F.F., and Pinheiro, R.F. (2015). Proteins of the mitotic checkpoint and spindle are related to chromosomal instability and unfavourable prognosis in patients with myelodysplastic syndrome. *J. Clin. Pathol.* 68, 381–387.

Girman, P., and Saudek, F. (2011). The IKEM pancreas and islet transplant program as part of healthcare for type 1 diabetes patients: retrospective analysis of outcome from 1983 to 2010. *Rev. Diabet. Stud.* 8, 35–43.

Grant, S.F.A., Qu, H.-Q., Bradfield, J.P., Marchand, L., Kim, C.E., Glessner, J.T., Grabs, R., Taback, S.P., Frackelton, E.C., Eckert, A.W., et al. (2009). Follow-up analysis of genome-wide association data identifies novel loci for type 1 diabetes. *Diabetes* 58, 290–295.

Hall, K., Frederiksen, B., Rewers, M., and Norris, J.M. (2015). Daycare attendance, breastfeeding, and the development of type 1 diabetes: the diabetes autoimmunity study in the young. *Biomed Res. Int.* 2015, 203947.

Honeyman, M.C., Coulson, B.S., Stone, N.L., Gellert, S.A., Goldwater, P.N., Steele, C.E., Couper, J.J., Tait, B.D., Colman, P.G., and Harrison, L.C. (2000). Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* 49, 1319–1324.

Hou, Q., Li, Y., Li, L., Cheng, G., Sun, X., Li, S., and Tian, H. (2015). The Metabolic Effects of Oats Intake in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 7, 10369–10387.

Chan, C.M., Chim, T.M., Leung, K.C., Tong, C.H., Wong, T.F., and Leung, G.K. (2016). Simultaneous pancreas and kidney transplantation as the standard surgical treatment for diabetes mellitus patients with end-stage renal disease. *Hong Kong Med. J.*

Chang, X., Zhao, Y., Yan, X., Pan, J., Fang, K., and Wang, L. (2011). Investigating a pathogenic role for TXNDC5 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 13, R124.

Chen, D.-L., Xiang, J.-N., and Yang, L.-Y. (2012). Role of ERp46 in β -cell lipoapoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway as well as the protective effect of exendin-4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426, 324–329.

Chen, Y.-W., Wang, Y.-Y., Zhao, D., Yu, C.-G., Xin, Z., Cao, X., Shi, J., Yang, G.-R., Yuan, M.-X., and Yang, J.-K. (2015). High prevalence of lower extremity peripheral artery disease in type 2 diabetes patients with proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One* 10, e0122022.

Ichikawa, S., Fukuhara, N., Katsushima, H., Takahashi, T., Yamamoto, J., Yokoyama, H., Sasaki, O., Fukuhara, O., Nomura, J., Ishizawa, K., et al. (2014). Association between BACH2 expression and clinical prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 105, 437–444.

Jin, Y., Sharma, A., Bai, S., Davis, C., Liu, H., Hopkins, D., Barriga, K., Rewers, M., and She, J.-X. (2014). Risk of type 1 diabetes progression in islet autoantibody-positive children can be further stratified using expression patterns of multiple genes implicated in peripheral blood lymphocyte activation and function. *Diabetes* 63, 2506–2515.

Juto, P. (1985). Human milk stimulates B cell function. *Arch. Dis. Child.* 60, 610–613.

Kim, Y., Choi, J.-W., Lee, J.-H., and Kim, Y.-S. (2014). MAD2 and CDC20 are upregulated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Int. J. Gynecol. Pathol.* *33*, 517–523.

Knoblach, B., Keller, B.O., Groenendyk, J., Aldred, S., Zheng, J., Lemire, B.D., Li, L., and Michalak, M. (2003). ERp19 and ERp46, new members of the thioredoxin family of endoplasmic reticulum proteins. *Mol. Cell. Proteomics* *2*, 1104–1119.

Kometani, K., Nakagawa, R., Shinnakasu, R., Kaji, T., Rybouchkin, A., Moriyama, S., Furukawa, K., Koseki, H., Takemori, T., and Kurosaki, T. (2013). Repression of the Transcription Factor Bach2 Contributes to Predisposition of IgG1 Memory B Cells toward Plasma Cell Differentiation. *Immunity* *39*, 136–147.

Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., et al. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat. Biotechnol.* *26*, 443–452.

Kugler, A.J., Fabbio, K.L., Pham, D.Q., and Nadeau, D.A. (2015). Inhaled technosphere insulin: a novel delivery system and formulation for the treatment of types 1 and 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* *35*, 298–314.

Li, J., Gao, J.-Z., Du, J.-L., Huang, Z.-X., and Wei, L.-X. (2014). Increased CDC20 expression is associated with development and progression of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* *45*, 1547–1555.

Liu, R.-Y., Dong, Z., Liu, J., Yin, J.-Y., Zhou, L., Wu, X., Yang, Y., Mo, W., Huang, W., Khoo, S.K., et al. (2011). Role of eIF3a in regulating cisplatin sensitivity and in translational control of nucleotide excision repair of nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* *30*, 4814–4823.

Marroquí, L., Santin, I., Dos Santos, R.S., Marselli, L., Marchetti, P., and Eizirik, D.L. (2014). BACH2, a candidate risk gene for type 1 diabetes, regulates apoptosis in pancreatic β -cells via JNK1 modulation and crosstalk with the candidate gene PTPN2. *Diabetes* *63*, 2516–2527.

Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* *16*, 1215.

Modi, P., Mihic, M., and Lewin, A. (2002). The evolving role of oral insulin in the treatment of diabetes using a novel RapidMist System. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* *18 Suppl 1*, S38–S42.

Pagliuca, F.W., Millman, J.R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J.H., Peterson, Q.P., Greiner, D., and Melton, D.A. (2014). Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro. *Cell* *159*, 428–439.

Pak, C.Y., Eun, H.M., McArthur, R.G., and Yoon, J.W. (1988). Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet (London, England)* *2*, 1–4.

Park, E.-J., Dodds, J., and Smith, N.B. (2008). Dose comparison of ultrasonic transdermal insulin delivery to subcutaneous insulin injection. *Int. J. Nanomedicine* *3*, 335–341.

Patterson, C.C., Dahlquist, G.G., Gyürüs, E., Green, A., and Soltész, G. (2009). Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet (London, England)* *373*, 2027–2033.

Perga, S., Montarolo, F., Martire, S., Berchiolla, P., Malucchi, S., and Bertolotto, A. (2015). Anti-inflammatory genes associated with multiple sclerosis: a gene expression study. *J. Neuroimmunol.* *279*, 75–78.

Pickup, J.C., Keen, H., Parsons, J.A., and Alberti, K.G. (1978). Continuous subcutaneous insulin infusion: an approach to achieving normoglycaemia. *Br. Med. J.* *1*, 204–207.

Pugliese, A., Gianani, R., Moromisato, R., Awdeh, Z.L., Alper, C.A., Erlich, H.A., Jackson, R.A., and Eisenbarth, G.S. (1995). HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes* *44*, 608–613.

Rezania, A., Bruin, J.E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., O'Dwyer, S., Quiskamp, N., Mojibian, M., Albrecht, T., et al. (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* *32*, 1121–1133.

Rigato, M., Bittante, C., Albiero, M., Avogaro, A., and Fadini, G.P. (2015). Circulating Progenitor Cell Count Predicts Microvascular Outcomes in Type 2 Diabetic Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *100*, 2666–2672.

Rušavý, Z., Honěk, P., Dušek, L., Pavlík, T., Žďarská, D.J., and Kvapil, M. (2015). [Monitoring of diabetes compensation in patients treated with an insulin pump in the Czech Republic]. *Vnitřní Lékařství* 61 Suppl 3, 39–43.

Sasaki, S., Ito, E., Toki, T., Maekawa, T., Kanezaki, R., Umenai, T., Muto, A., Nagai, H., Kinoshita, T., Yamamoto, M., et al. (2000). Cloning and expression of human B cell-specific transcription factor BACH2 mapped to chromosome 6q15. *Oncogene* 19, 3739–3749.

Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., and Rajotte, R. V (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 343, 230–238.

Sherr, J.L., Hermann, J.M., Campbell, F., Foster, N.C., Hofer, S.E., Allgrove, J., Maahs, D.M., Kapellen, T.M., Holman, N., Tamborlane, W. V, et al. (2016). Use of insulin pump therapy in children and adolescents with type 1 diabetes and its impact on metabolic control: comparison of results from three large, transatlantic paediatric registries. *Diabetologia* 59, 87–91.

Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259–1260.

Sullivan, D.C., Huminiecki, L., Moore, J.W., Boyle, J.J., Poulosom, R., Creamer, D., Barker, J., and Bicknell, R. (2003). EndoPDI, a novel protein-disulfide isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor. *J. Biol. Chem.* 278, 47079–47088.

Swaminathan, S., Huang, C., Geng, H., Chen, Z., Harvey, R., Kang, H., Ng, C., Titz, B., Hurtz, C., Sadiyah, M.F., et al. (2013). BACH2 mediates negative selection and p53-dependent tumor suppression at the pre-B cell receptor checkpoint. *Nat. Med.* 19, 1014–1022.

Tandon, N. (2015). Understanding type 1 diabetes through genetics: Advances and prospects. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 19, S39–S43.

Vincent, E.E., ELDER, D.J.E., PHILLIPS, L., HEESOM, K.J., PAWADE, J., LUCKETT, M., SOHAIL, M., MAY, M.T., HETZEL, M.R., and TAVARE, J.M. (2011). Overexpression of the TXNDC5 Protein in Non-small Cell Lung Carcinoma. *Anticancer Res* 31, 1577–1582.

Wang, L., Zheng, Y., Xu, H., Yan, X., and Chang, X. (2013). Investigate Pathogenic Mechanism of TXNDC5 in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 8, e53301.

Wenzlau, J.M., and Hutton, J.C. (2013). Novel diabetes autoantibodies and prediction of type 1 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 13, 608–615.

Zajacova, M., Kotrbova-Kozak, A., and Cerna, M. (2016). HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 genotyping of 180 Czech individuals from the Czech Republic pop 3. *Hum. Immunol.* 77, 365–366.

Zhang, L., Hou, Y., Li, N., Wu, K., and Zhai, J. (2010). The influence of TXNDC5 gene on gastric cancer cell. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 1497–1505.

Internetové zdroje

World Heald Organisation

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> staženo dne 13.4.2016

International Diabetes Federation

<http://www.diabetesatlas.org/> staženo dne 13.4.2016

Ústav zdravotních informací a statistiky ČR

<http://www.uzis.cz/rychle-informace/cinnost-oboru-diabetologie-pece-diabetiky-roce-2013>
staženo dne 18.10.2015

Přílohy

Příloha 1

Tabulka HLA haplotypů u jedinců s T1D

Vzorek	DQB1	DQA1	DRA	Vzorek	DQB1	DQA1	DRA
PRED1	03:02	03:01	04	PRED20	03:01	03:03	04
	04:02	04:01	08		02:02	02:01	07
PRED2	03:01	05:05	11	PRED21	03:01	03:03	04
	03:02	03:01	04		05:02	01:02	16
PRED3	06	01:02	13	PRED22	05:01	01:01	01
	02:01	05:01	03		03:01	03:03	04
PRED4	05:01	01:01	01	PRED23	02:01	05:01	03
	04:02	04:01	08		03:02	03:01	04
PRED5	05:01	01:01	01	PRED24	03:01	03:03	04
	03:02	03:01	04		06	01:02	13
PRED6	02:02	02:01	07	PRED25	02:01	05:01	03
	03:02	03:01	04		02:02	02:01	07
PRED7	02:01	05:01	03	PRED26	03:01	05:05	11
	03:02	03:01	04		06	01:03	13
PRED8	03:02	03:01	04	PRED27	02:01	05:01	03
	03:02	03:01	04		03:02	03:01	04
PRED9	03:02	03:01	04	PRED28	02:02	02:01	07
	03:02	03:01	04		03:02	03:01	01
PRED10	05:01	01:01	01	PRED29	02:01	05:01	03
	03:02	03:01	04		06	01:02	13
PRED11	03:01	05:05	13	PRED30	06	01:02	13
	03:02	03:01	04		02:01	05:01	03
PRED12	05:01	01:01	01	PRED31	02:01	05:01	03
	05:01	01:01	01		05:02	01:02	16
PRED13	02:01	05:01	03	PRED32	03:02	03:01	04
	03:02	03:01	04		03:02	03:01	04
PRED14	02:01	05:01	03	PRED33	0201	0501	03
	05:02	01:02	16		0303	0201	07
PRED15	02:01	05:01	03	PRED34	0301	0303	04
	02:01	05:01	03		01:	0301	14
PRED16	02:01	05:01	03	PRED35	0201	05:01	03
	03:02	03:01	04		0302	03:01	04
PRED17	03:02	03:01	04	PRED36	03:02	03:01	04
	03:02	03:01	04		02:01	05:01	03
PRED18	03:02	03:01	04	PRED37	0302	0301	04
	05	01:01	15		0201	0501	03
PRED19	02:01	05:01	03	PRED38	0302	0301	04
	03:02	03:03	04		0303	0201	07

Tabulka HLA haplotypů u zdravých kontrol

Vzorek	DQB1	DQA1	DRA	Vzorek	DQB1	DQA1	DRA
ZK1	05:02	01:02	16	ZK20	0501	0101	01
	03:02	03:01	04		0202	0201	07
ZK2	03:02	03:01	04	ZK21	0301	0505	11
	06:02	01:02	15		0602	0105	10
ZK3	06:02	01:02	15	ZK22	0501	0101	01
	03:02	03:01	04		0301	0505	11
ZK4	02:01	0501	03	ZK23	0301	0303	04
	0603	0103	13		0603	0103	13
ZK5	0102	0301	04	ZK24	0202	0201	07
	0602	0302	15		0301	0505	11
ZK6	0201	0501	03	ZK25	0301	0505	12
	0609	0102	13		0602	0102	15
ZK7	0301	0505	11	ZK26	0202	0201	07
	0603	0103	13		0301	0505	11
ZK8	0202	0201	07	ZK27	0202	0201	07
	0202	0201	07		0402	0401	08
ZK9	0501	0101	01	ZK28	0301	0505	11
	0503	0104	14		0602	0102	15
ZK10	0402	0401	08	ZK29	0301	0505	11
	0301	0505	11		0603	0103	13
ZK11	0202	0201	07	ZK30	0603	0103	13
	0202	0201	07		0502	0102	16
ZK12	0501	0101	01	ZK31	0302	0301	04
	0301	0505	11		0301	0505	12
ZK13	0202	0201	07	ZK32	0301	0505	11
	0301	0505	11		0502	0102	16
ZK14	0201	0501	03	ZK33	0201	0501	03
	0202	0201	07		0201	0501	03
ZK15	0202	0201	07	ZK34	0201	0501	03
	0602	0102	15		0301	0505	11
ZK16	0301	0505	11	ZK35	0301	0505	11
	0601	0103	15		0604	0102	13
ZK17	0603	0103	13	ZK36	0301	0505	11
	02:01	0501	03		0603	0103	13
ZK18	0301	0505	11	ZK37	0603	0102	15
	0602	0102	15		0301	0505	12
ZK19	0202	0201	07	ZK38	0301	0505	11
	0501	0101	01		0201	0501	03

Příloha 2

Pracovní list DR 09Y pro vyhodnocení HLA alely DRA (Olerup™, USA), viz následující strana