

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra antropologie a genetiky člověka



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Expresní profily vybraných kandidátních genů celiakie
Expression profiles of selected celiac disease candidate genes

Mgr. Šárka Okruhlicová

Školitelka: RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Expresní profily vybraných kandidátních genů celiakie“ vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavlíny Daňkové, Ph.D., a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne.....

Podpis.....

Šárka Okruhlicová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. za věnovaný čas, odborné vedení a trpělivost v průběhu celého zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala členům laboratoře molekulární antropologie a všem dárcům za poskytnutí krve.

Abstrakt

Úvod: Celiakie je multifaktoriální autoimunitní onemocnění, které je vyvoláno reakcí na gluten a s ním související proteiny u geneticky vnímavých jedinců. Genetické studie prokázaly vysokou asociaci celiakie s geny HLA (lidské leukocytární antigeny) II. třídy. Přibližně 90-95 % pacientů má HLA-DQ2 haplotyp (DQA1*05/DQB1*02), zbývajících 5-10 % je nositeli HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*03) nebo zdědili pouze jednu alelu haplotypu HLA-DQ2. Přibližně 30 % zdravé populace má tento haplotyp, ale pouze u 1 % se vyvine celiakie. Pokud se u 30 % zdravých jedinců vyskytuje rizikový haplotyp a nevyvine se u nich celiakie, může to být ovlivněno odlišnou mírou exprese u zdravých a nemocných jedinců. Zda se u této skupiny celiakie projeví či nikoliv, může být ovlivněno odlišnou mírou exprese.

Cíle: Cílem bylo navrhnout a otestovat systém primerů a sond pro kvantitativní PCR (QPCR), který bude amplifikovat všechny vybrané alely HLA-DQA1 a HLA-DQB1 kandidátních genů rizikových pro celiakii, a tento systém ověřit prostřednictvím kvantifikace relativní exprese rizikových genů u zdravých dárců a pacientů s celiakií.

Metody: Do studie bylo zahrnuto 10 pacientů s recentní celiakií a 15 zdravých dárců, kteří byli vybráni z databáze Ústavu lékařské genetiky 3. LF UK na základě jejich genotypu HLA-DQA1 a HLA-DQB1. U pacientů byl nejprve zjištěn jejich genotyp HLA II. třídy pomocí sekvenčně specifických primerů. Z odebrané krve byla u obou skupin vyizolována mRNA, která byla následně transkribována do cDNA. QPCR byla měřena relativní úroveň exprese vybraných rizikových genů HLA-DQ.

Závěr: Byl navržen a optimalizován systém primerů a sond pro QPCR, který umožňuje měřit relativní expresi vybraných kandidátních genů celiakie. Systém byl navržen pro alely HLA-DQA1 (DQA1*05, DQA1*02:01, DQA1*03:01) a alely HLA-DQB1 (DQB1*02, DQB1*03:02). Dále byl navržen systém do intronové oblasti HLA-DQA1, který umožňuje zjistit míru kontaminace gDNA ve vzorku. Pro otestování navržených systémů byla změřena exprese zájmových alel u pilotního souboru zdravých dárců a pacientů s celiakií. Cílem práce nebylo už vzhledem k počtu jedinců s jednotlivými haplotypy z výsledků vyvozovat závěry, nicméně získaná data naznačují, že lze očekávat odlišnou expresi rizikových alel u neléčených celiaků, a že bude zajímavé zaměřit se také na variabilitu exprese v rámci jednotlivých skupin.

Klíčová slova: celiakie, HLA II. třídy, HLA-DQA1, HLA-DQB1, polymorfismus, genetická exprese

Abstract

Introduction: Celiac disease is a multifactorial autoimmune disease that is caused by a response to gluten and related proteins in genetically susceptible individuals. Genetic studies have demonstrated a high association of celiac disease with HLA genes (human leukocyte antigens) II. Class. Approximately 90-95% of the patients have a HLA-DQ2 haplotype (DQA1*05/DQB1*02), the remaining 5-10% are carriers of HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*03) or inherited only one allele of HLA-DQ2 genotype. Approximately 30% of the healthy population has this haplotype and only 1% develops celiac disease. If 30% of healthy individuals have this haplotype and do not develop celiac disease, this may be affected by a different level of expression in healthy and diseased individuals.

Aims: The aim was to design and test a primer and probe system for QPCR that will amplify all selected HLA-DQA1 and HLA-DQB1 candidate genes at risk for celiac disease and use this system to measure the relative level of expression of risk genes in healthy donors and patients with celiac disease.

Methods: The study included 10 patients with recent celiac disease and 15 healthy donors who were selected from the database of the Institute of Medical Genetics of the 3.LF UK based on their genotypes HLA-DQA1 and HLA-DQB1. Patients were first detected their HLA II. Class genotype by sequence-specific primers. From the collected blood, mRNA was isolated and subsequently transcribed into the cDNA. Using QPCR, the relative level of expression of selected HLA-DQ risk genes was measured.

Conclusion: A primer and probe system for QPCR has been designed and optimized to measure the relative expression of selected candidate celiac genes. The system was designed for HLA-DQA1 alleles (DQA1 * 05, DQA1 * 02: 01, DQA1 * 03: 01) and HLA-DQB1 alleles (DQB1 * 02, DQB1 * 03: 02). Additionally, the system was designed to the HLA-DQA1 intron domain, which makes it possible to determine the degree of contamination of the gDNA in the sample. To test proposed systems, the expression of interest alleles in the pilot set of healthy donors and patients with celiac disease was measured. The aim of the work was not to draw conclusions from the results of the individual haplotypes, but the data obtained suggest that a different expression of the risky alleles in untreated celiac disease can be expected and that it will also be interesting to focus on the variability of expression within the groups.

Key words: celiac disease, HLA II. Class, HLA-DQA1, HLA-DQB1, polymorphism, genetic expression

Obsah

1. Úvod	8
2. Celiakie	9
2.1. Klinické projevy	9
2.2. Patogeneze celiakie	10
2.2.1. Lepek (gluten).....	10
2.2.2. Imunologické faktory.....	11
2.2.3. Genetické faktory.....	12
2.2.4. Zapojení adaptivní a vrozené imunity.....	12
2.3. Diagnostika.....	15
2.4. Léčba celiakie.....	16
3. HLA komplex a jeho asociace s celiakií.....	17
3.1. HLA komplex	17
3.2. Struktura HLA molekul.....	18
3.3. Nomenklatura HLA.....	20
3.4. Typy HLA alel zapojené v patogenezi celiakie.....	21
4. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (QPCR)	
a návrh primerů a sond.....	26
4.1. QPCR.....	26
4.1.1. Princip QPCR.....	26
4.1.2. Vizualizace produktu.....	27
4.1.3. Kvantifikace.....	27
4.1.4. Analýza dat.....	28
4.2. Návrh primerů a sond.....	30
4.2.1. Návrh primerů.....	30
4.2.2. Návrh sondy.....	32
5. Hypotézy a cíle.....	34
6. Materiál a metody.....	35

6.1. Pacienti a zdraví dárci.....	35
6.2. Návrh primerů a optimalizace PCR reakcí.....	36
6.3. Izolace periferních mononukleárních buněk (PBMCs) z plné krve.....	37
6.4. Izolace DNA z PBMCs.....	38
6.5. Izolace mRNA z PBMCs.....	38
6.6. HLA genotypizace.....	40
6.7. Elektroforetická separace.....	41
6.8. Reverzní transkripce (RT).....	42
6.9. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (QPCR).....	44
6.10. Statistické zpracování.....	46
7. Výsledky.....	47
7.1. HLA genotypizace.....	47
7.2. Návrh primerů a sond.....	48
7.2.1. Návrh primerů a sond pro vybrané alely HLA-DQA1 a HLA-DQB1.....	52
7.2.2. Návrh primerů a sondy pro genomickou DNA.....	57
7.2.3. Efektivita PCR reakce.....	58
7.2.4. Výběr endogenní kontroly.....	58
7.3. Kvantifikace exprese vybraných alel HLA-DQA1 a HLA-DQB1.....	59
8. Diskuze.....	63
9. Závěr.....	67
10. Seznam zkratk.....	68
11. Seznam literatury.....	70

1. Úvod

Celiakie je multifaktoriální orgánově specifické autoimunitní onemocnění. Imunitní reakci, která vyústí v poškození střev a atrofii klků střevní sliznice, vyvolávají peptidy lepku. Onemocnění se vyvine u geneticky predisponovaných jedinců. Studie uvádějí, že onemocněním trpí 1 % populace, ale procento bude zřejmě podstatně vyšší (Green et al., 2001). Celiakie je charakterizována produkcí protilátek proti transglutamináze a anti-endomysialních protilátek. Její jedinou léčbou je celoživotní dodržování bezlepkové diety.

Celiakie se nejčastěji vyvine u jedinců s haplotypem HLA-DQ2 (DQA1*05; DQB1*02), u zbývajících pacientů se vyskytuje haplotyp HLA-DQ8 (DQA1*03; DQB1*03:02). Tato asociace souvisí s faktem, že DQ2 a DQ8 heterodimery zprostředkovávají aktivaci gluten-senzitivních CD4+ T-lymfocytů ve střevě (Risch, 1987).

Molekuly HLA-DQ asociované s onemocněním jsou exprimovány na antigen prezentujících buňkách a váží specificky glutenové peptidy, které jsou modifikované pomocí tkáňové transglutaminázy, a prezentují je střevním T-lymfocytům. Výsledná odezva T-lymfocytů vede k produkci protilátek specifických pro celiakii a sekreci prozánětlivých cytokinů. To následně vede k atrofii klků a dalším klinickým projevům onemocnění (Karell et al., 2003).

Rizikové alely pro vznik celiakie nese i velké procento zdravé populace, u které onemocnění nikdy nevypukne. HLA geny přispívají ke vzniku onemocnění ve 40 % a non-HLA geny ve 14 % (Trynka et al., 2011). Do vzniku onemocnění je tak zapojeno více genů, ale hlavní jsou právě již zmíněné HLA-DQ geny.

Dosud nebylo uspokojivě objasněno, z jakého důvodu onemocní pouze malý počet jedinců s genetickou predispozicí a u zbytku se nemoc nikdy neprojeví. Porozuměním tomuto principu by bylo možné zlepšit diagnostiku a diagnostikovat onemocnění ještě před nástupem klinických projevů.

2. Celiakie

Celiakie, též známá jako gluten-senzitivní enteropatie, je autoimunitní porucha, která je vyvolána reakcí na gluten a s ním související proteiny u geneticky vnímavých jedinců. Imunitní odpověď zahrnuje jak adaptivní tak vrozenou imunitu. Je charakterizována přítomností anti-glutenových a anti-transglutaminázových protilátek, infiltrací lymfocytů přes epiteliální membránu a *lamina propria*, dále pak expresí mnoha cytokinů a ostatních signálních proteinů. Onemocnění vede ke vzniku zánětu, atrofii klků a hyperplasii krypt v tenkém střevě. Mimo tyto symptomy je celiakie asociována s mnoha extraintestinálními komplikacemi, zahrnující anemie, endokrinní poruchy a neurologické deficity. Bezlepková dieta je v současnosti jediná efektivní metoda léčby.

Symptomy odpovídající celiakii byly popsány už ve 2. století. V 19. století Samuel Gee definoval symptomy a charakterizoval onemocnění (Dowd & Walker-Smith, 1974), nicméně Willem Karel Dicke byl první, kdo rozpoznal, že odstranění obilí z jídelníčku je důležité pro léčbu (shrnuto v Goh & Werlin, 2011). John W. Paulley popsal histologické změny v tenkém střevě spojené s onemocněním. Objevení asociace HLA a gluten-specifických T-lymfocytům asociovaných s celiakií a rozpoznání, že transglutamináza 2 (TG2) je cílem autoproti látek, proběhlo v 80. a 90. letech 20. století (Briani et al., 2008).

Nejprve byla celiakie považována za vzácné onemocnění projevující se u dětí, nyní je odhadováno, že 1 ze 100 lidí trpí celiakií. Může se projevit v jakémkoliv věku, častěji u žen než u mužů v poměru 3:1 (Green et al., 2001). Celiakie je onemocnění spojené s geny hlavního histokompatibilního systému HLA II. třídy. Primární asociace je s HLA DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) a DQ8 (DQA1*0301/DQB1*0302) (Sollid & Thorsby, 1993). Povrchové proteiny antigen prezentujících buněk jsou důležité při prezentování specifických imunogenních glutenových peptidů gluten specifickým T-lymfocytům v tenkém střevě. Zatímco přítomnost specifických HLA proteinů je nezbytná pro rozvoj onemocnění, není dostačující. Za genetické riziko vzniku celiakie jsou také považovány různorodé non-HLA geny.

2.1. Klinické projevy

Klinické projevy celiakie jsou velice variabilní. V dětství se onemocnění běžně projevuje malým vzrůstem, zpožděním puberty, chronickým průjemem, abdominální distenzí a anémií. U dospělých jedinců se může objevit chronický průjem, abdominální distenze a

bolestivost, slabost a malabsorpce. Nicméně mnoho pacientů má slabé nebo žádné gastrointestinální symptomy, zatímco se vyskytují symptomy extra-intestinální jako je dermatitis herpetiformis, anemie, osteoporosa, neplodnost a neurologické problémy. Proto se o celiakii uvažuje jako o multisystémové poruše spíše než jen o gastrointestinálním onemocnění. Zatímco některé extraintestinální manifestace celiakie jako anemie a osteoporosa jsou primárně důsledkem malnutrice způsobené lézemi sliznice střeva, ostatní mají mnohem komplexnější spojitost (Husby et al., 2012; Ribes-Koninckx et al., 2012).

2.2. Patogeneze celiakie

Celiakie, podobně jako jiná autoimunitní onemocnění, má multifaktoriální charakter. To znamená, že k porušení mechanismů autotolerance a rozvoji nepřiměřené imunitní reakce je nezbytné působení více faktorů zároveň (Di Sabatino & Corazza, 2009). Na vzniku a projevu celiakie se podílejí environmentální, imunologické a genetické faktory. Z environmentálních faktorů je hlavní lepek. Dále se zdá, že k rozvoji onemocnění by mohly přispívat doba kojení a věk, kdy je dítěti zařazen lepek do stravy (Ivarsson et al., 2002). Riziko celiakie je vysoké u geneticky vnímavých dětí, pokud se u nich objeví gluten v prvních 3 měsících života, o něco menší je pak při prvním podávání glutenu až po 7. měsíci (Tye-Din & Anderson, 2008). Studie naznačují, že kojení a zároveň podávání malého množství glutenu v potravě má protektivní účinky a vede ke snížení počtu dětí trpících celiakií (Di Sabatino & Corazza, 2009). Dalším rizikovým faktorem jsou virové infekce (Stene et al., 2006.). Časté gastrointestinální infekce způsobené bakteriemi a rotaviry mohou také zvýšit riziko vzniku celiakie u predisponovaných dospělých jedinců. Mohlo by se tak dít narušením integrity střevní sliznice a dočasným zvýšením její permeability, to vede k uvolnění tkáňové transglutaminázy a zesílení imunogenicity glutenu (Di Sabatino & Corazza, 2009). Dále pak může být rizikovým faktorem kouření (Vazquez et al., 2001).

2.2.1. Lepek (gluten)

Lepek neboli gluten je u predisponovaných jedinců primární spouštěč onemocnění. Lepek se nachází ve všech formách pšenice čili v krupici, špaldě, sladu, kuskusu, bulgaru, žitu a ječmeni (Kagnoff et al., 2007). Jedná se o směs zásobních bílkovin v povrchových částech obilných zrn. Tyto bílkoviny se dělí do dvou skupin podle jejich schopnosti se rozpouštět v ethanolu. Rozpustné bílkoviny jsou označovány jako prolaminy a nerozpustné jsou gluteniny. Především prolaminy jsou považovány za hlavní toxické komponenty v

patogenezi celiakie. Do této skupiny patří gliadin, který se nachází v pšenici, sekalin v žitě a hordein v ječmeni. Toxicita aveninu, který je obsažen v ovsu, není jednoznačná. Gliadiny obsahují až sto různých komponent, dělí se na toxické a imunogenní. Toxické mají přímý cytotoxický efekt na sliznici tenkého střeva, zatímco imunogenní působí prostřednictvím různých mediátorů jako je interferon γ (INF- γ), interleukin 2 a 4 (IL-2 a IL-4) a způsobují tak zánětlivé reakce (Di Sabatino & Corazza, 2009; Tye-Din & Anderson, 2008). Imunogenní gliadiny jsou schopny specificky stimulovat HLA-DQ2 (Sjostrom et al., 1998) nebo DQ8 (van de Wal et al., 1999) na T-lymfocytických liniích. Některé imunogenní fragmenty mohou vyvolat silnou reakci T-lymfocytů a zároveň specifickou T-lymfocytickou odpověď u téměř všech pacientů na rozdíl od jiných imunogenních fragmentů, které spouští tyto reakce pouze u některých pacientů. Tyto gliadiny se silnou reaktivitou se nazývají imunodominantní (Stern et al., 2001).

V lepku je vysoký podíl prolinu, ten zajišťuje rezistenci proti proteolýze žaludečními pankreatickými enzymy a enzymy na povrchu mikroklků epiteliálních buněk (tzv. brush border enzymy). Proto je pro trávení glutenu důležitá tkáňová transglutamináza, ta zajišťuje rozštěpení glutenu pomocí dvou mechanismů, v závislosti na pH a koncentraci glutenu. Transglutamináza 2 (TG2) katalyzuje transaminaci a deaminaci zbytků glutaminu v proteinech. Při sníženém pH je preferována deaminace. U celiakie se vytvoří protilátky proti TG2, jsou zničeny enterocyty a dochází k vzniku příznaků celiakie: nadýmání, křeče, mastná stolice a narušená architektura střevních klků (Stern et al., 2001).

2.2.2. Imunologické faktory

Celiakie je zánětlivé střevní onemocnění, které je spojené s vysokou expresí INF- γ ve střevní sliznici (Nilsen et al., 1998). Z imunologického pohledu celiakie odpovídá spíše orgánově specifickému autoimunitnímu onemocnění, než zánětlivému onemocnění. U autoimunitního onemocnění dochází k destrukci tkáně a autoimunitní reakce může být jak humorálního, tak i buněčného typu (Ciccocioppo et al., 2005).

Byl zaznamenán zvýšený transport toxických i imunogenních fragmentů lepku přes střevní epitel. Předpokládá se, že za to může být zodpovědný zánět, nebo nezralost enterocytů (Matysiak et al., 2003). Peptidy lepku jsou schopny vyvolat zranění a expresi kostimulačních molekul dendritickými buňkami, dále pak sekreci chemokinů odpovědných za aktivaci leukocytů (Nikulina et al., 2004).

2.2.3. Genetické faktory

Poměrně vysoký výskyt mezi monozygotními dvojčaty a familiární agregace svědčí pro to, že genetické faktory jsou jednou z příčin vzniku celiakie (Di Sabatino & Corazza, 2009). Společný výskyt celiakie u monozygotních dvojčat je až 75 %. U dizygotních dvojčat je přibližně 11%. Rodinné studie ukázaly na vysokou heritabilitu (Heap & van Heel, 2009). Sourozenci pacienta s celiakií mají nejméně 20× větší riziko onemocnění než jedinec z běžné populace (Risch, 1987).

Celiakie je polygenní onemocnění, což znamená, že se na jejím vzniku podílí více genů. Výsledky genetických studií ukázaly vysokou asociaci celiakie s určitými geny hlavního histokompatibilního systému (Heap & van Heel, 2009). Hlavní jsou geny HLA (human leukocyte antigens) II. třídy (Hourigan, 2006). Přibližně 90–95 % pacientů má HLA-DQ2 heterodimer (DQA1*05/DQB1*02) a zbývajících 5–10 % jsou nositeli HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*03), nebo zdědili pouze jednu alelu z HLA-DQ2, to znamená buď DQA1*05 nebo DQB1*02. Kombinace zděděných alel určuje výši rizika pro vznik celiakie. HLA geny reprezentují přibližně 40 % dědičnosti celiakie (Risch, 1987). U HLA-DQ2 se zděděnými oběma alelami je riziko 4-6× vyšší než u jiných kombinací (Heap & van Heel, 2009). Právě přítomnost těchto alel je nezbytná, ale ne dostačující k fenotypovému projevu celiakie (Karell et al., 2003).

Vzhledem k tomu, že HLA-DQ2 se vyskytuje i u třetiny normální populace, je zřejmé, že jsou v tomto onemocnění zapojené ještě jiné genové oblasti mimo HLA geny (non-HLA geny).

Non-HLA oblastí asociovaných s celiakií doposud bylo objeveno několik. Patří sem například oblast na dlouhém raménku 5. chromosomu (5q31-33), která obsahuje geny pro tvorbu cytokinů podílejících se na imunitních odpovědích, dále pak oblast na chromosomu 4 (4q27), na které jsou kódovány interleukiny 2 a 21. Ty se zapojují do rozvoje zánětu sliznice tenkého střeva.

Oblasti genů HLA a non-HLA asociovaných s celiakií jsou pojmenovány jako lokusy COELIAC (Di Sabatino & Corazza, 2009).

2.2.4. Zapojení adaptivní a vrozené imunity

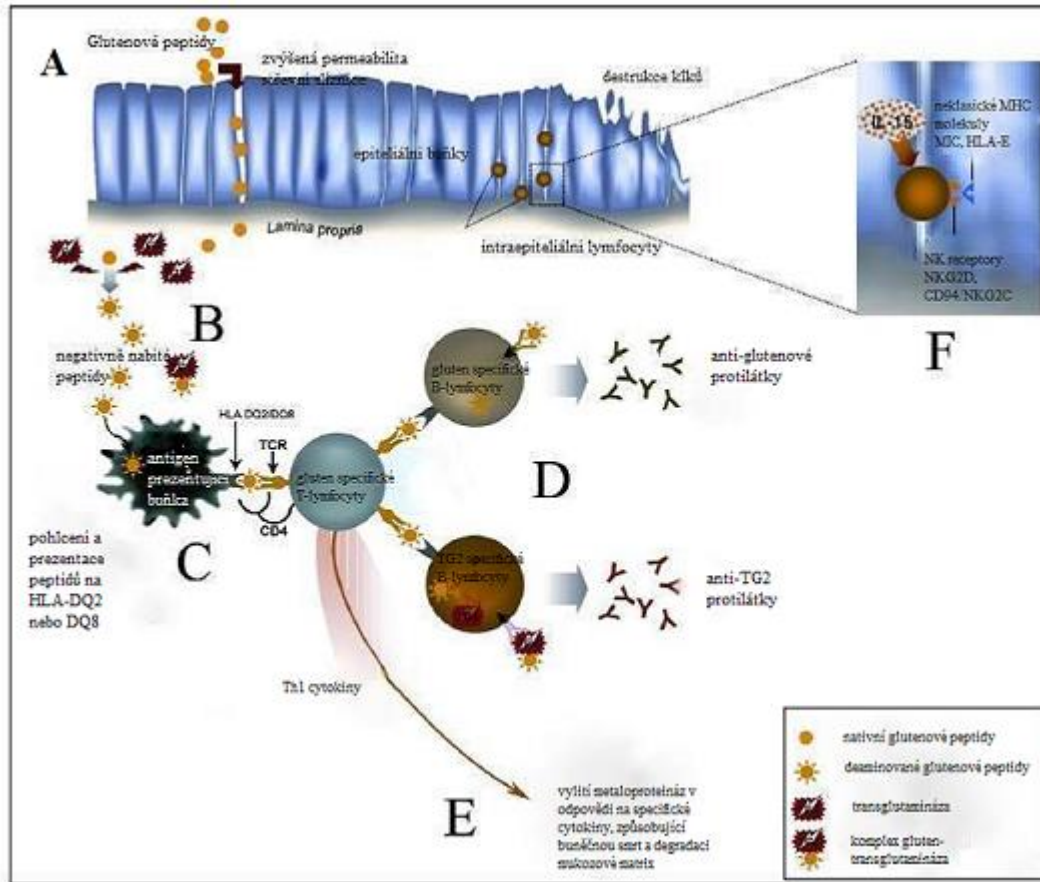
Imunologická odpověď na gluten zahrnuje reakci protilátek na glutenové proteiny a reakci autoantigenů proti TG2, reakci CD4⁺ T-lymfocytů na gluten a zvýšení hladiny

intraepiteliálních CD8⁺ T-lymfocytů (Jabri et al., 2005). Některé kompletně nestrávené glutenové peptidy mohou za určitých podmínek prostupovat přes epitely a vstupovat do *lamina propria* tenkého střeva. Spekuluje se o tom, že stresové faktory vedou ke změnám v střevní propustnosti, což vede k možnosti prostupu glutenových peptidů do *lamina propria* (Alaedini & Green, 2005).

Přirozená imunitní odpověď na gluten může také být prekurzorem změn a zvyšovat permeabilitu střev. Neutrální glutaminové zbytky mohou být konvertovány na negativně nabitou kyselinu glutamovou přes deaminaci transglutaminasou 2. Antigen prezentující buňky exprimující molekuly HLA-DQ2 a HLA-DQ8 mají zvýšenou afinitu pro tyto neaminované peptidy. Navázání imunogenních peptidů na molekuly HLA formuje komplex, který může aktivovat gluten specifické CD4⁺ T-lymfocyty v *lamina propria*. Aktivace těchto lymfocytů je následována produkcí velkého množství cytokinů, což může vyústit v zánět a zničení klků v tenkém střevě, vypuštěním metaloproteináz fibroblasty a zánětlivými buňkami (Jabri et al., 2005). Gluten indukuje expresi IL-15 cytokinu, MIC (MHC-class I related chain) a HLA-E stresovanými epiteliálními buňkami tenkého střeva. To zřejmě vede k aktivaci antigen nespecifické intraepiteliální expresi natural killer receptorů (NK), NK buňky aktivující receptor typu 2D (NKG2D) a diferenciační antigen 94 (CD94/NKG2C) na CD8⁺ lymfocytech. Interakce těchto lymfocytů s epiteliálními buňkami vyústit v uvolnění IFN- γ a cytotoxických molekul, což způsobí zničení epiteliálních buněk (Jabri et al., 2005). Glutenové peptidy mohou být také rozpoznávány receptory skupiny Toll-like (TLR) nebo dalšími receptory makrofágů střeva schopnými rozeznávat konzervované struktury určitých patogenů (Schuppan et al., 2003). Pokud se peptidová částice naváže na TLR, dochází k ovlivnění exprese některých prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Jabri et al., 2005).

Aktivace CD4⁺ T-lymfocytů může také stimulovat B-lymfocyty a to vede k produkci anti-glutenových a anti-TG2 protilátek. Při absenci TG2-specifických T-lymfocytů je odpověď anti-TG2 protilátek zřejmě řízena intermolekulární pomocí, kdy gluten-specifické T-lymfocyty poskytují pomoc TG2-specifickým B-lymfocytům, zaručující, že bude vznikat komplex TG2-gluten (Fleckenstein et al., 2004). Takto řízený mechanismus gluten-specifických T-lymfocytů by vedl k anti-TG2 imunitní reakci, aniž by bylo potřeba TG2-specifických T-lymfocytů. Závislost anti-TG2 protilátek na příjmu glutenu u celiaků, jak se zdá, tento mechanismus podporuje (Sulkanen et al., 1998). Zatímco TG2 může formovat komplexy s glutenovými peptidy, může také propojovat gluten s proteiny matrix, čímž zadržuje gluten ve tkáni a generuje molekulární komplexy,

kteřé mohou vyvolat imunitní odpověď dalších autoantigenů (Alaedini & Green, 2008). Bylo prokázáno, že anti-TG2 protilátky mohou interferovat s aktivitou TG2 a mají škodlivý dopad na diferenciaci epitelálních buněk (Esposito et al., 2002; Halttunen & Mäki, 1999). Působení imunitních odpovědí je znázorněno na obr. 1.



Obr.1 Schéma procesů přirozené a adaptivní imunity (převzato a upraveno (Briani et al., 2008))

Toto zjednodušené schéma popisuje proces humorální a buněčné imunitní odpovědi a znázorňuje následné poškození sliznic u jedinců s celiakií. A: Glutenové peptidy odolné vůči trávicím enzymům prostupují epitelární bariérou. B: Glutenové peptidy jsou deaminovány pomocí TG2, dochází tak ke vzniku epitopů se zvýšeným imonostimulačním potenciálem. Tyto peptidy se také mohou kovalentně spojit s TG2 nebo jinými enzymatickými peptidy. C: Deaminované peptidy jsou prezentovány antigen prezentujícími buňkám (dendritické buňky, makrofágy, B-lymfocyty a CD4+ T lymfocyty). D: Přispěním gluten-specifických T lymfocytů dochází ke klonování a vylíčení antiglutenových protilátek. TG2 specifické B lymfocyty mohou být také aktivovány gluten-specifickými T lymfocyty pomocí intramolekulárních interakcí. E: Exprese prozánětlivých cytokinů aktivovanými T lymfocyty podporuje uvolňování metaloproteináz, které způsobují poškození sliznic a remodelaci tkáně. F: Reakce na gluten také zahrnuje vrozený imunitní systém. Epiteliální buňky vylučují interleukin 15 (IL-15) a exprimují neklasické MHC molekuly I. třídy v odpovědi na vystavení glutenu. Toto aktivuje CD8+ cytotoxické T lymfocyty. Ty mohou zacílit a zničit epitelární buňky.

2.3. Diagnostika

Podezření na celiakii vzniká u pacientů s charakteristickými symptomy, nebo pokud jsou v rizikové skupině. Do rizikové skupiny jsou zahrnuti jedinci, kteří mají onemocnění asociovaná s celiakií a jedinci, kteří jsou příbuzní pacienta s celiakií. Diagnostická kritéria pro celiakii (CD) podle Evropské společnosti pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu (ESPGHAN) byla přijata v roce 1990. Od té doby byla jako antigen spojený s celiakií identifikována TG2 a celiakie byla uznána jako multiorgánové onemocnění související s haplotypy HLA-DQ2 a HLA-DQ8 (Husby et al., 2012). Při podezření na toto onemocnění se nejprve provádí serologický test. Zjišťuje se přítomnost protilátek IgA proti transglutamináze 2 (anti-TG2) a anti-endomysialní protilátky (EMA) (Rostami, 1999). Oba tyto testy detekují protilátky proti stejnému antigenu, TG2 (Alaedini & Green, 2005). Pro počáteční screening se doporučuje IgA izotyp, protože se jeví jako citlivější a specifitější u tohoto onemocnění (Rostom et al., 2006). Dále se k diagnostice mohou používat serologické testy založené na detekci anti-gliadinových antigenů (Reeves et al., 2006).

Po pozitivním výsledku serologického testu by měla následovat biopsie tenkého střeva. Biopsie se při vysokém klinickém podezření může provádět i v případě negativního serologického testu. Charakteristika histologického nálezu může sahát od téměř normální stavby klků se zvýšeným výskytem intraepiteliálních lymfocytů až k totální atrofii klků (Marsh, 1992). Při pozitivním nálezu je předpokládáno onemocnění celiakií a měla by být zavedena bezlepková dieta. Konečná diagnóza je stanovena až po té, zda došlo ke zlepšení symptomů na základě změny stravy. Pokud je biopsie negativní, ale serologické testy vycházejí pozitivně, měla by se zvážit možnost testování HLA alel (Karell et al., 2003). Nepřítomnost HLA alel asociovaných s celiakií má velmi vysokou negativní prediktivní hodnotu. HLA genotypizace může proto sloužit k diagnostice celiakie při sporných výsledcích testů (Kaukinen et al., 2007).

Na základě rozvoje technik a nových postupů byly v roce 2012 revidovány postupy pro diagnostiku celiakie. Byla použita serologická diagnostika skupiny symptomatických dětí pomocí použití titru anti-TG2, anti-EMA a zjišťování přítomnosti rizikových haplotypů (Paul et al., 2017).

Řada důkazů podporuje názor, že diagnostiku celiakie lze provést pouze sérologickými testy, bez nutnosti biopsie tenkého střeva. Tento přístup ale není ještě široce akceptován (Holmes et al., 2017).

Diagnostika CD pomocí serologických testů na TG2 je citlivá a spolehlivá, ale

pozitivní predikce se může zpřesnit pomocí EMA (Gidrewicz et al. , 2015).

Od roku 2012, kdy byla upravena metoda pro diagnostiku celiakie u dětí, se doporučuje, aby byla u symptomatických dětí diagnostikována celiakie bez biopsie tenkého střeva. To platí za předpokladu, jsou protilátky proti TG2 více než 10x vyšší než je normální limit a byly zjištěné anti-endomysální protilátky. Dále by se měla ověřit přítomnost HLA-DQ2/DQ8. Přibližně 25-40 % populace má tento haplotyp a pouze u 0,1-1 % se vyvine celiakie. Z tohoto důvodu nelze diagnostikovat celiakii jen na základě přítomnosti těchto haplotypů a u pediatrů by se měla genotypizace používat pouze pro potvrzení diagnostiky u dětí, u kterých se neprovádí biopsie a celiakie je diagnostikována pouze na základě serologických testů (Paul et al., 2017).

2.4. Léčba celiakie

V současnosti je jediná účinná léčba celiakie úplné vyřazení glutenu a s ním související proteiny z jídelníčku. To znamená eliminace produktů obsahujících pšenici, žito a ječmen. Ke zlepšení symptomů dochází v rozmezí dnů až týdnů od zahájení bezlepkové diety, zatímco obnovení klků v tenkém střevě trvá delší dobu (Lee et al., 2003; Briani et al., 2008).

Anti-TG2 a anti-gliadinové protilátky se snižují, ale může trvat měsíce až roky, než kompletně vymizí. Jako náhrada za zakázané potraviny může být do jídelníčku zavedena rýže, pohanka, kukuřice, quinoa nebo amarant (Green & Cellier, 2007). Také oves je považován za možnou náhradu, ačkoliv u některých pacientů není tolerován (Högberg et al., 2004; Janatuinen et al., 1995). Byla tedy vedena diskuze o zařazení ovsu do bezlepkové diety. Nejnovější studie uvádějí, že ani při dlouhodobém požívání ovsu nedochází k poškození sliznice ani objevení symptomů spojených s celiakií, naopak může zvyšovat kvalitu života vzhledem ke svým výživovým vlastnostem (Aaltonen et al., 2017). Lepší porozumění patofyziologii celiakie na molekulární úrovni by mohlo vést k vyvinutí nových účinných metod léčby. Tyto léčebné metody by mohly zahrnovat změny na úrovni lepku nebo na úrovni imunitní reakce nemocných jedinců. Mohla by být využita možnost enzymatické úpravy lepku zničením toxických peptidů, selektivní modulace činnosti TG2 nebo zabránění vazby peptidů gliadinu na HLA molekuly (Briani et al., 2008).

3. HLA komplex a jeho asociace s celiakií

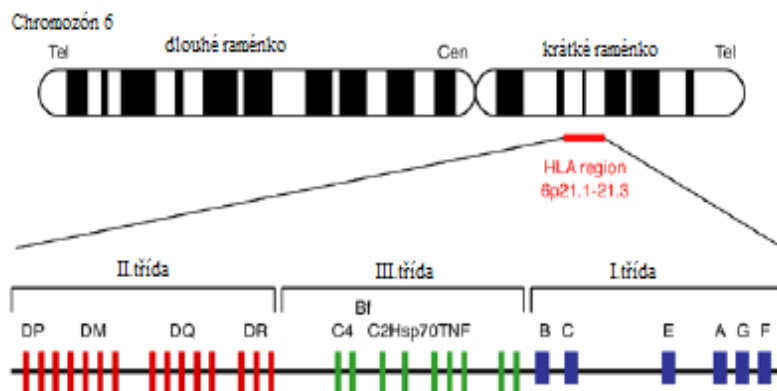
3.1. HLA komplex

Roku 1956 poprvé popsal Jean Dausset histokompatibilní antigeny na lidských leukocytech. Tyto antigeny byly nazvány lidské leukocytární antigeny (human leukocyte antigens, HLA).

Postupem času se ukázalo, že alely HLA mají souvislost s různými onemocněními. Nejprve se zdálo, že tato asociace je s HLA antigeny I. třídy, později byla zaznamenána souvislost i s HLA antigeny II. třídy. Antigeny II. třídy představují vyšší rizikový faktor pro autoimunitní onemocnění než antigeny HLA I. třídy (Babbitt et al., 1985; Kappler et al., 1987).

V systému HLA je 21 polymorfních HLA genů, které se nalézají na krátkém raménku 6. chromosomu v regionu 6p21.3 (obr. 2). Produkty těchto genů zprostředkovávají odpověď na infekční onemocnění a ovlivňují transplantaci buněk a orgánů. Úroveň polymorfismu pozorovaná u těchto genů je velmi vysoká, například u HLA-B bylo pozorováno více než 3000 variant. Tato úroveň je považována za hyperpolymorfní ve srovnání s jinými systémy genů (URL1).

V MHC byly identifikovány tři odlišné oblasti. Oblast I. třídy, která je umístěna na telomérním konci chromosomu a kóduje geny pro molekuly HLA I. třídy: HLA-A, -B, -C, -E, -F a -G. Ty jsou společně exprimované na povrchu jednotlivých buněk a jsou odpovědné za prezentaci intracelulárně derivovaných peptidů CD8⁺ T-lymfocytům. Region II. třídy leží v centromerické oblasti a kóduje geny HLA II. třídy: HLA-DRA, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 a DPB1. Expres HLA II. třídy je omezena na antigen prezentující buňky, které prezentují extracelulárně derivované peptidy CD4⁺ T-lymfocytům. Mezi I. a II. třídou leží oblast III. třídy, kde se nachází řada non-HLA genů s imunitní funkcí (Robinson et al., 2000). HLA geny III. třídy kódují například cytokíny (tumor necrosis factor α a β ; TNF α a TNF β), chaperony (Hsp 70, HLA-DM) a dále pak složky komplementu (C2, C4A, C4B, properdin, faktor B) (Černá, 2008).



Obr. 2: Genová mapa HLA komplexu: poloha genů I., II. a III. třídy od centromery (Cen) po telomeru (Tel) (převzato a upraveno (Mehra & Kaur, 2003)).

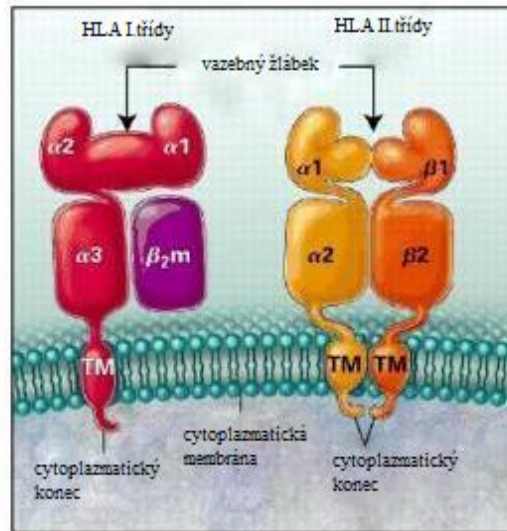
3.2. Struktura HLA molekul

Molekuly I. třídy jsou exprimovány hlavně somatickými buňkami. Stupeň exprese ale závisí na jednotlivém tkáňovém typu (Klein, 1986). Na svůj povrch váží peptidy produkované buňkou. Molekuly HLA I. třídy se skládají z α řetězce a beta2-mikroglobulinu (obr. 3). Geny HLA I. třídy kódují α polypeptidový řetězec, zatímco β_2 -mikroglobulin je kódován na chromosomu 15 (Mackay et al., 2000). Lokusy HLA I. třídy jsou tvořeny z 25 % variabilní částí ($\alpha 1$ a $\alpha 2$, kódovány exóny 2 a 3) a ze 75 % tvoří konstantní část ($\alpha 3$, kódovaná exónem 4, transmembránový a cytoplazmatický exon). Vazebné místo tvoří β -skládaný list se dvěma α -šroubovicemi, které ho obklopují. Vazebné místo má stabilní velikost, a proto se na něj mohou navazovat pouze fragmenty peptidů o velikosti 8-10 aminokyselin (Falk et al., 1991; Hunt et al., 2007).

HLA molekuly II. třídy se nacházejí na povrchu buněk prezentujících antigen. Do této skupiny se řadí makrofágy, dendritické buňky, monocyty, B lymfocyty a aktivované T lymfocyty. Tyto buňky prezentují fragmenty peptidů, které pohltily (Mackay et al., 2000).

Geny HLA II. třídy se dělí mezi tyto typy molekul: HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, DO a DM. Všechny se skládají z α a β polypeptidového řetězce (obr. 3). Každý řetězec se skládá ze čtyř domén: peptidovazebné ($\alpha 1$ nebo $\beta 1$) a imunoglobulinové domény ($\alpha 2$ nebo $\beta 2$), transmembránové oblasti a cytoplazmatického konce (Mackay et al., 2000). Distální domény $\alpha 1$ a $\beta 1$ tvoří vazebné místo pro peptidy. Na tomto místě se nejprve nachází invariantní řetězec, který pomáhá navádět molekulu HLA II. třídy do Golgiho aparátu a poté endosomální nebo lysozomální cestou na povrch buňky. Ve váčcích je řetězec

proteolyticky rozštěpen a zbyte z něj CLIP (class II-associated invariant chain peptide). Výměnu CLIPu za antigenní peptid zajišťuje lyzozomální chaperon HLA-DM. U HLA II. třídy není vazebné místo ohraničeno, a proto se do něj mohou navázat různě dlouhé peptidy. Nejčastěji jsou však dlouhé 15-35 aminokyselin (Mackay et al., 2000).



Obr. 3: Struktura HLA molekul I. a II. třídy.

Beta₂-mikroglobulin (β_{2m}) je lehký řetězec molekul I. třídy. α -řetězec molekul I. třídy má dvě peptidové domény ($\alpha 1$ a $\alpha 2$), imunoglobulinovou doménu ($\alpha 3$), transmembránovou část (TM) a cytoplazmatický konec. Každý z α a β řetězců molekul II. třídy má čtyři domény: peptidovazebnou ($\alpha 1$ nebo $\beta 1$), imunoglobulinovou doménu ($\alpha 2$ nebo $\beta 2$), transmembránový region (TM) a cytoplazmatický konec (převzato a upraveno podle Mackay et al., 2000).

HLA molekuly II. třídy jsou velice polymorfní. Tento polymorfismus se projevuje záměnami jednotlivých nukleotidů v DNA molekule. Změna aminokyseliny pak má za následek odlišnou slabou vazebnou interakci mezi řetězci, tím se částečně změní terciární struktura molekuly a následně i funkce HLA (Brown et al., 1993; Stern et al., 1994).

Lokus DR je největší a je tvořený komplexem 9 genů. HLA-DRB1 je nejpolymorfnější, má 2103 alel. Geny DQA1 mají 94 alel a DQB1 1142 alel (URL1). Míra polymorfismu jednotlivých genů je shrnuta v tabulce 1.

Tab. 1: Počty alel genů HLA II. třídy (URL1)

HLA II.třídy

Gen	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPA2	DPB1	DPB2	DMA	DMB	DOA	DOB
Počet alel	7	2376	94	1142	53	5	894	6	7	13	12	13
Gen	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DRB6	DRB7	DRB8	DRB9			
Počet alel	2103	1	145	66	54	3	2	1	1			

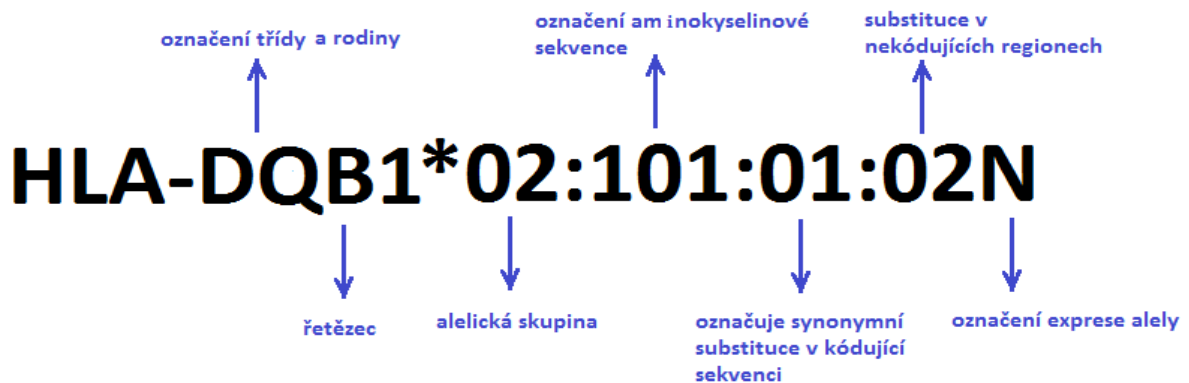
3.3. Nomenklatura HLA

Kvůli složitosti systému a vysokému polymorfismu bylo třeba zavést jednotnou nomenklaturu. Složitější nomenklatura je u genů II. třídy, které kódují α i β řetězec. Každá HLA alela je pojmenována unikátním číslem. Délka označení alely závisí na její sekvenci. Všechny alely získají přinejmenším čtyřčíselný název, delší jména jsou pak přiřazována pouze v případě potřeby.

První písmeno (D) označuje třídu, druhé (M, O, P, Q a R) značí rodinu a třetí řetězec A nebo B (Mackay et al., 2000). Nejprve je písmenem označen lokus, pak následuje hvězdička a dále kombinace čtyř, nebo pokud je potřeba, i více čísel (např. HLA-DQB1*05:01). První číslice před hvězdičkou značí, jestli je tato sekvence exprimována. Číslo 1 znamená, že sekvence DQB nebo DQA je exprimována. U sekvencí, u kterých není známo zda exprimovány jsou, se používají číslice 2 nebo 3. Číslice před první dvojtečkou (obr. 4) popisují typ, který často odpovídá sérologickému antigenu, který nese alotyp. Následující sada čísel slouží k odlišení podtypů, čísla jsou přiřazena v pořadí, ve kterém byly sekvence DNA popsány. Alely, jejichž čísla se liší ve dvou sadách číslic, mají jednu nebo více nukleotidových substitucí, které mění aminokyselinovou sekvenci kódovaného proteinu. Alely, které se liší pouze synonymními substitucemi nukleotidů (tiché substituce) v rámci kódující sekvence, se odlišují pomocí třetí sady číslic. Alely, které se liší pouze sekvencním polymorfismy v intronech nebo v 5' nebo 3' netranslatovaných oblastech lemujících exony a introny, se odlišují použitím čtvrtého souboru číslic.

Vedle čísla alely existují i další možnosti, které mohou být do označení alely přidány. Alely, u kterých bylo zjištěno, že se neexprimují (nulové alely), mají příponu „N“. Alely, u nichž se prokázalo, že jsou exprimovány alternativně, používají přípony „L, S, C,

A“ nebo „Q“. L se používá pro označení alely s nízkou expresí, S se používá k označení alely produkující protein, který je rozpustný a není přítomen na povrchu molekul, ale je vylučován. Přípona C je přiřazena alelám, které produkují proteiny přítomné v cytoplazmě. A označuje aberantní expresi a udává se, pokud jsou pochyby o tom, zda je protein opravdu exprimován. Q se používá, pokud je exprese alely sporná, tedy pokud pozorovaná mutace ovlivňuje normální hladiny exprese u jiných alel (URL1.). Pro lepší pochopení je na obrázku č. 4 znázorněn popis názvu jedné alely.

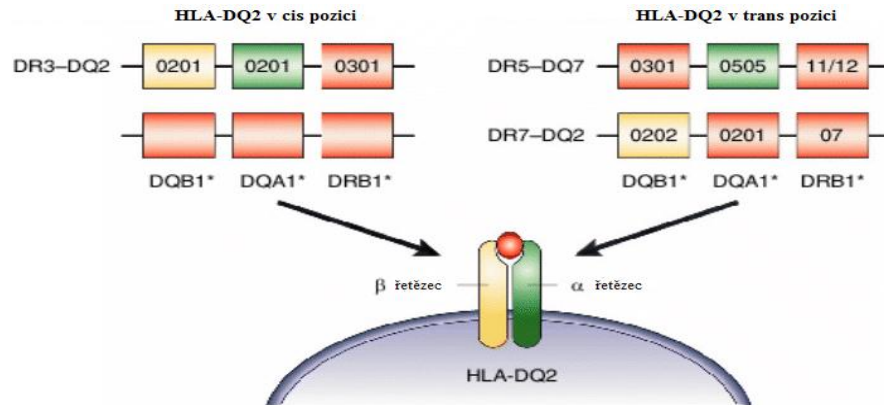


Obr. 4: Příklad HLA alely s vysvětleným označením.

3.4. Typy HLA alel zapojené v patogenezi celiakie

První zjištění, že hlavní histokompatibilní komplex (MHC) ovlivňuje riziko rozvoje celiakie, se objevilo téměř o 50 let dříve, než objev asociace tohoto onemocnění s HLA-B8 (Falchuk et al., 1972; Stokes et al., 1972). Později bylo objeveno, že jsou s nemocí asociovány HLA-A, HLA-DR3 a HLA-DR7, stejně jako HLA-DQ2 (Betuel et al., 2008; DeMarchi et al., 2008; Keuning et al., 1976; Solheim et al., 2008; Tosi et al., 1983). Asociace s HLA-A1, -B8, -DR3 a -DQ2 je skrze vazebnou nerovnováhu. Kvůli silné vazebné nerovnováze, která se vyskytuje v regionu HLA, je těžké zjistit, která alela nebo lokus jsou za onemocnění zodpovědné. Nicméně u celiakie bylo zjištěno, že podstatná část pacientů jsou heterozygoti DR5/DR7 (Mearin et al., 1983; Trabace et al., 1984). Jedinci, kteří nesou haplotyp DR7, jsou ohroženi pouze tehdy, jsou-li nositeli haplotypů DR3 nebo DR5, a jedinci, kteří nesou haplotyp DR5, jsou ohroženi, pokud nesou haplotypy DR3 nebo DR7. Vysvětlení pro tato pozorování se stalo zřejmé, když byly charakterizovány alely DQA1 a DQB1 z haplotypů DR3, DR7 a DR5. Alela DQB1 haplotypu DR3-DQ2 (DQB1*02:01) se od alely DQB1 haplotypu DR7-DQ2 liší pouze jediným zbytkem v poloze 135 v membránové proximální doméně. DR3-DQ2 jedinec a DR5-DQ7 / DR7-DQ2 jedinec tak exprimuje téměř identickou molekulu HLA-DQ, buď exprimovanou v cis nebo

trans konfiguraci (Sollid et al., 1989). Tato molekula je v současné době často označována jako HLA-DQ2.5 (obr. 5).



Obr. 5: Haplotypy, predispoziční pro celiakii: *DQA1*05* a *DQB1*02* kódované v cis pozici, na jednom chromosomu, nebo v trans pozici, na dvou jednotlivých chromosomech. Mohou kódovat DQ2 heterodimer.

(převzato a upraveno z Louka & Sollid, 2003)

Obvykle více než 90 % pacientů s celiakií nese haplotyp HLA-DQ2.5. Pacienti, kteří neexprimují HLA-DQ2.5, většinou buď exprimují HLA-DQ2.2 (kódován alely DQA1*02:01 a DQB1*02:02 haplotypu DR7-DQ2), nebo exprimují HLA-DQ8 (DQA1*03 a DQB1*03:02 alely haplotypu DR4-DQ8) (Karell et al., 2003; Spurkland et al., 1992). Je velmi málo pacientů, kteří nemají žádný z těchto tří HLA-DQ alotypů a exprimují HLA-DQ7.5 (DQA1*05:05 a DQB1*03:01, obvykle haplotyp DR5-DQ7) (Karell et al., 2003). Distribuce DQ2.5, DQ2.2 a DQ8 mezi pacienty s celiakií se v určité míře liší mezi různými populacemi. Například obzvláště vysoký podíl pacientů nesoucí DQ8 se nachází mezi Ashkenazskými Židy (Tighe et al., 1993) a americkými indiány v Chile (Araya et al., 2000).

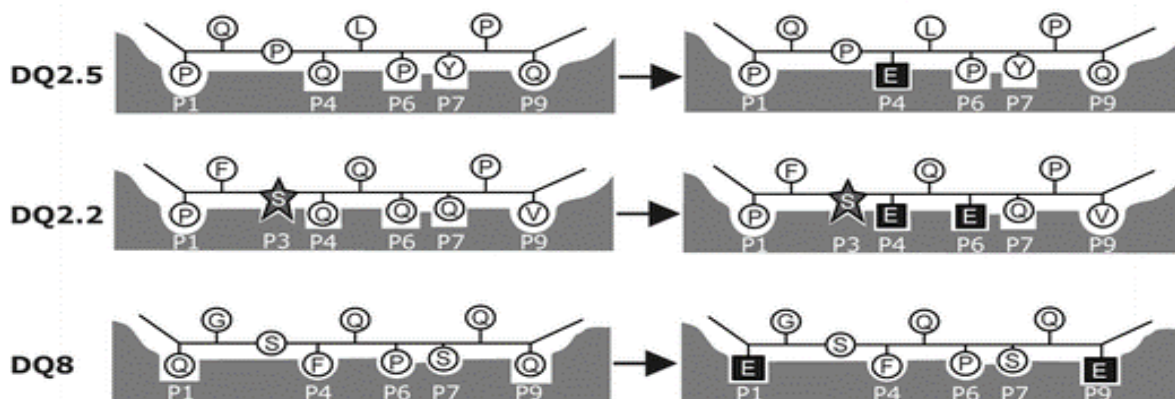
Výskyt pacientů s celiakií, kteří by nenesli ani jednu variantu z DQ2.5, DQ2.2 nebo DQ8, je velmi nízký. Nicméně u mnoha jedinců nesoucích rizikové HLA-DQ molekuly se celiakie nikdy neobjeví. Většina pacientů s celiakií má variantu DQ2, tu však můžeme nalézt i u 20-30 % zdravých jedinců (Sollid et al., 1989). Tyto HLA geny jsou tedy nezbytné, ale ne dostačující pro rozvoj celiakie. Vysvětlením může být zapojení non-HLA genů a environmentálního prostředí. Jen u 0,4 % jedinců, kteří vykazovali příznaky

celiakie, nebyla nalezena ani jedna riziková alela (Karell et al., 2003). V dalších studiích se uvádí, že negativita pro rizikové alely byla nalezena u 0,16-0,9 % jedinců (Megiorni et al., 2009; Pietzak et al., 2009).

Během posledních několika desetiletí se podařilo shromáždit značné informace o non-HLA genech podílejících se na onemocnění celiakií, které pocházejí převážně z genomových asociačních studií (Dubois et al., 2010; Hunt et al., 2008; Trynka et al., 2011). V roce 2016 bylo identifikováno 42 lokusů souvisejících s tímto onemocněním (Withoff et al., 2016). Efekt každého z těchto lokusů je velmi malý ve srovnání s efektem HLA. Odhaduje se, že zatímco HLA přispívá ke genetickému riziku 40 %, 37 non-HLA lokusů společně přispívá ke vzniku onemocnění s 14% rizikem (Trynka et al., 2011). Co se týká příspěvku dědičnosti rizikových genů, Gutierrez-Achury et al.(2015) odhadují, že 23 % přispívají HLA-DQ geny, 18 % by mohlo být přičteno non-DQ HLA genům a 7 % non-HLA genům. Následně se ukázalo, že odhad příspěvku non-DQ HLA genů byl špatný, a ve skutečnosti přispívají pouze 2 % (Gutierrez-Achury et al., 2015). V regionu HLA je převažující rizikový efekt pro celiakii zprostředkován HLA-DQ alotypy s malým příspěvkem HLA genů jiných než DQ.

Riziko celiakie je výrazně zvýšeno u jedinců, kteří jsou homozygotní pro DQ2.5 (DQA1*05-DQB1*02) a DQ8 (DQA1*03-DQB1*03:02). Jednotlivci, kteří jsou homozygotní pro DQB1*02, ale heterozygotní pro DQA1*05 (např. DQA1*05-DQB1*02:02 / DQA1*0201-DQB1*02:02) mají také zvýšené riziko celiakie (Ploski et al., 1993).

Při výzkumu molekul HLA-DQ byly zkoumány vazebné motivy peptidů, které tyto molekuly asociované s celiakií váží. Bylo zjištěno, že DQ2.5 a DQ8 přednostně váží negativně nabitě zbytky peptidů, i když v různých polohách. Právě peptidy deaminované tkáňovou transglutaminázou 2 mají negativní náboj DQ2.5 preferuje negativní náboj v pozicích P4, P6 a P7 (Johansen et al., 1996; Vartdal et al., 1996; van de Wal et al., 1996, 1997), zatímco DQ8 v pozicích P1 a P9 (Godkin et al., 1997; Kwok et al., 1996), viz obr. 6. V důsledku je pak většina glutenových epitopů prezentovaných DQ2.5 odlišná od těch prezentovaných DQ8 (Tollefsen et al., 2006). Ačkoliv bylo zjištěno, že DQ2.5 a DQ2.2 mají podobné vazebné motivy s preferencí negativních nábojů u P4, P6 a P7, vazebné experimenty naznačují, že DQ2.2 na rozdíl od DQ2.5 má ještě přidavnou kapsu na P3 s preferencí serinu a treoninu a nevýhodnou pro prolin (van de Wal et al., 1997).



Obr. 6: Všechny molekuly DQ asociované s celiakií preferenčně váží peptidy s negativně nabitými zbytky. V DQ2.5 a DQ2.2 jsou kapsy P4, P6 a P7, které mají přednost pro negativně nabitě kotevní zbytky, zatímco v DQ8 jsou to kapsy P1 a P9, které mají tuto přednost. Hlavní kapsa pro peptidy vázající se na DQ2.2 je umístěna v P3 a tato kapsa přednostně váže serinové (S) a threoninové zbytky. Nativní glutenové peptidy jsou bohaté na zbytky prolinu (P) a glutaminu (Q), avšak v záporně nabitých zbytcích jsou vzácné. Po deamidaci transglutaminasou 2 se glutaminové zbytky způsobem závislým na sekvenci převedou na glutamát (E). Deamidované glutenové peptidy se zavedenými negativně nabitými zbytky glutamátu se lépe váží na molekuly HLA-DQ asociované s celiakií. Schematicky jsou znázorněny nativní a deamidované varianty imunodominantních epitopů DQ2.5-glia-a2, DQ2.2-glut-L1 a DQ8-glia-a1 (Fleckenstein et al., 2004).

Při testu funkční stability se zjistilo, že serinový zbytek je důležitý pro vazbu peptidu na DQ2.2, ale ne na DQ2.5 (Bergsens et al., 2015). Serin a treonin jsou zřídka přítomné v glutenových peptidech, takže množství peptidů v TG2 modifikovaném proteómu, které by bylo schopné se vázat na HLA-DQ, je menší pro DQ2.2, než pro DQ2.5. To pravděpodobně vysvětluje rozdílná rizika pro celiakii spojená s těmito dvěma variantami DQ2 (Pisapia et al., 2016). HLA molekuly na antigen prezentujících buňkách (APC) prezentují gluten CD4+ T lymfocytům a aktivují je (Molberg et al., 1997). Velikost fragmentů definuje stimulační aktivitu, delší fragmenty vykazují zvýšení stimulace CD4+ T-lymfocytů oproti menším fragmentům (Arentz-Hansen et al., 2000).

Pro vznik patologické odpovědi T-lymfocytů existuje práh vyžadující určité množství komplexů HLA-peptid. V poslední době se diskutovalo o efektu dávky genů, protože se zdá, že je podobná hladina exprese molekuly DQ2.5 na povrchu buněk u homozygotů i heterozygotů. Není zde tedy pozorován žádný rozdíl ve schopnosti prezentace antigenu u

gluten-specifických CD4+ T lymfocytech (Pisapia et al., 2016). Absence genové dávky je překvapivá vzhledem k tomu, že tento jev byl prokázán u myši (Berg et al., 1990). Stále je nejasné, proč u jedinců homozygotních pro DQB1*02, ale heterozygotních pro DQA1*05 (tj. DQA1*05-DQB1*02:01/DQA1*02:01-DQB1*02:02) je riziko zvýšené.

4. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (QPCR) a návrh primerů a sond

4.1. QPCR

Za vynálezce polymerázové řetězové reakce (PCR) je považován Dr. Kary Banks Mullis, který roku 1983 seznámil vědeckou komunitu s první polymerázovou řetězovou reakcí. Při této reakci docházelo k namnožení vybraného úseku DNA. Aby tohoto bylo dosaženo, navrhnul dva oligonukleotidy, tzv. primery. Každý z těchto primerů byl komplementární vždy k jednomu vlákně dvouřetězcové DNA. Pomocí DNA polymerázy byl amplifikován úsek, který se mezi těmito dvěma primery nacházel (Mullis, 1990).

4.1.1. Princip QPCR

QPCR je modifikací klasické PCR, při které jde především o namnožení vstupní DNA a detekci výsledného produktu (McPherson & Møller, 2000). Při QPCR se měří fluorescence v každém cyklu PCR a zároveň umožňuje sledovat přírůstky DNA. Detekuje produkt i v počáteční fázi reakce, a tím umožňuje kvantifikaci i relativně malého množství templátu (VanGuilder et al., 2008).

Ke kvantifikaci výsledného produktu dochází pomocí specifických fluorescenčních sond (Logan et al., 2009), které nasedají ve druhé fázi PCR společně s primery (Birmingham & Luetlich, 2003).

Přístroj pro QPCR tzv. cykler dokáže fluorescenci sond detekovat, určit množství fluorescence v reakci a podle toho upravit pozadí reakce (tzv. background). To zajišťuje vysokou přesnost (Logan et al., 2009). Detekovat nárůst fluorescence způsobený odštěpením značené sondy během amplifikace fragmentu v každém cyklu lze pomocí softwaru. Cykler má optický systém, který je tvořen např. xenonovou lampou nebo halogenovou zářivkou či excitačním laserem. Zdroj osvětí reakční směs světlem o určité vlnové délce a excituje fluorescenční sondu. Vzniklé záření je vedeno systémem optických vláken, zrcadel a filtrů do měřících kanálů CCD kamery (Logan et al., 2009). V naší laboratoři využíváme LightCycler® 480 (LC 480) Instrument od firmy Roche Applied.

QPCR se používá především k měření genové exprese. Analýza genové exprese probíhá na úrovni mRNA. Ještě před zahájením QPCR je nutné přepsat mRNA do komplementární cDNA, k tomu slouží reverzní transkripce s následnou polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR). RT-PCR je další modifikací PCR, při které se využívá reverzní

transkriptáza a random primery pro přepis mRNA do cDNA a její následné amplifikaci pomocí PCR (Nolan et al., 2006). RT a QPCR mohou probíhat současně, ale výhodou oddělené RT a QPCR je vyšší účinnost reakce a možnost uchování cDNA (Leutenegger et al., 1999).

4.1.2. Vizualizace produktu

Dříve se k vizualizaci produktu QPCR vyžívala interkalační činidla (Syber Green I) (Arya et al., 2005). V současnosti je nejpoužívanějším barvivem SYBR Green I, BEBO, GelRed nebo GelGreen (Kaltenboeck & Wang, 2005). Jako další typ můžeme uvést jednoduše značené hybridizační sondy fungující na principu FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Používají se ve dvojicích, kdy po nasednutí sond na DNA předá donorová sonda svoji energii akceptorové, a ta emituje fluorescenci (Didenko, 2001).

Dále se používají hydrolyzační sondy, které jsou založené na systému duálně značených sond nazývajících se TaqMan[®] sondy. Tyto sondy využívají 5'→3' exonukleázovou aktivitu Taq DNA polymerázy, která má schopnost odštěpit z templátového řetězce sondu (Holland et al., 1991). TaqMan sonda je oligonukleotid se zhášečem (quencher) na 3' konci a reportérem na 5' konci (Meksem et al., 2001). V současnosti se jako zhášeče používají tzv. dark quenchers. Mezi ně patří například Black Hole Quencher, Iowa Black nebo Dabsyl. Tyto zhášeče nemají na rozdíl od dříve používaného zhášeče TAMRA (tetramethylrhodamine) přirozenou fluorescenci (Dorak, 2007).

4.1.3. Kvantifikace

Hlavním využitím QPCR je kvantifikace produktu. Provádí se matematickou analýzou amplifikačních křivek. Křivka má sigmoidální tvar a lze jí rozdělit na několik částí: background fázi, exponenciální fázi, lineární fázi a fázi plató.

Při background fázi se produkt amplifikuje, ale fluorescence nepřekročí prahovou hodnotu. Obvykle se jedná o prvních 10-15 cyklů a na amplifikační křivce tuto část označujeme jako baseline (Wong & Medrano, 2005).

V exponenciální fázi křivky množství produktu roste exponenciálně. Při 100% účinnosti reakce dochází během každého cyklu ke zdvojnásobení produktu. V této fázi se

určuje Ct hodnota (cycle treshold). Tato hodnota nám udává cyklus, ve kterém byl překročen limit pro detekci fluorescence. Ct odráží množství vstupního materiálu, čím více materiálu vstupuje do reakce, tím dříve je detekován fluorescenční signál a naopak (Ginzinger, 2002). Platí tedy, že čím vyšší je koncentrace mRNA cílového genu, tím nižší je hodnota Ct.

V lineární fázi díky snižování účinnosti reakce dochází pouze k lineárnímu nárůstu produktu. Poslední fází je fáze plató, kdy postupným vyčerpáním jednotlivých složek reakční směsi nevzniká další produkt a fluorescence již neroste (McPherson & Møller, 2000).

Existuje několik způsobů vyhodnocení Ct pro kvantifikaci. Ct se může určit manuálně, kdy se amplifikační křivka proloží regresní přímkou. V místě překřížení přímky s prahem se nachází hodnota Ct. Většina cyklerů už má tuto metodu ve svých softwarech automatizovanou. Další možností je určení maxima druhé derivace. Ct se určuje jako bod, ve kterém dochází k strmému stoupání amplifikační křivky (URL2).

Vstupní množství molekul lze vypočítat pomocí vzorce $N_c = N_0 \times E^C$. N_c vyjadřuje počet amplifikovaných molekul po C cyklech. Za N_0 se dosadí výchozí počet molekul, eff označuje efektivitu a C počet cyklů. Teoreticky je efektivita stoprocentní, to znamená, že v každém cyklu vzniknou 2 kopie, reálně ale bývá nižší. I nepatrné snížení efektivity má velký vliv na množství výsledného produktu (Bustin, 2004; Karlen et al., 2007). Efektivita se stanovuje empiricky vytvořením ředící řady cDNA jednoho vzorku. Získáme standardní křivku. Podle vzorce $eff = 10^{-1/slope}$ vypočítáme reálnou efektivitu daného genu. Tuto efektivitu pak dosazujeme do vztahu $2^{-\Delta Ct}$ místo hodnoty 2 (Pfaffl, 2001) nebo do vzorce $N_c = N_0 \times E^C$.

4.1.4. Analýza dat

Při analýze dat se používá buď absolutní, nebo relativní kvantifikace produktu zájmového genu. U absolutní kvantifikace se stanovuje reálný počet ampliconů vstupního produktu, který je porovnáván se standardy o známé koncentraci (Giulietti et al., 2001). Z kalibrační křivky, kterou získáme zanesením Ct standardů, lze porovnáním hodnot Ct odečíst koncentraci neznámého vzorku (Bustin, 2004). Standardy o známé koncentraci musí být amplifikovány za stejných podmínek jako vzorek o neznámé koncentraci (Wong & Medrano, 2005).

Pro určení míry genové exprese se nejčastěji využívá relativní kvantifikace. Ta

stanovuje relativní poměr množství sledovaného genu vůči endogenní kontrole v rámci každého vzorku (Dorak, 2007). Ct amplifikační křivky je vztaženo k Ct referenčního genu. Jako referenční geny se používají tzv. endogenní kontroly. Tyto geny by měly mít u všech typů pozorovaných vzorků stálou úroveň exprese. Endogenní kontroly patří mezi geny, udržující základní funkce buňky a exprimují se za normálních i patologických podmínek (Eisenberg & Levanon, 2003). Nemusí být tedy vytvořena kalibrační křivka, jako se vyžaduje u absolutní kvantifikace. Používá se v případech, ve kterých je dostačujícím vyjádřením poměr expresí.

Pro výpočet relativní kvantifikace se používá komparativní metoda delta-delta ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) bez korekce efektivity a metoda podle Pfaffla s korekcí efektivity (Pfaffl, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). V případě, že se efektivita cílového genu a referenčního genu liší, používá se vztah podle Pfaffla. Normalizovaný expresní profil (NEP) se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\text{NEP} = (E_{\text{cílový}})^{\Delta Ct \text{ cílový (kalibrátor - vzorek)}} \div (E_{\text{referenční}})^{\Delta Ct \text{ referenční (kalibrátor - vzorek)}}$$

Díky tomuto vztahu jsou zohledněny efektivity jednotlivých genů. Metodu delta-delta lze pojmut jako speciální případ metody podle Pfaffla, ve kterém se efektivita cílového a referenčního genu rovná číslu 2 (Pfaffl, 2001).

Výhodou QPCR je její vysoká citlivost. K jejímu provedení stačí jen velmi malé množství vstupní templátové nukleové kyseliny. Na druhou stranu se projeví i malé množství kontaminace nežádoucí genomické DNA i cDNA (Aslanzadeh, 2004). Hlavní výhodou je tedy přesná kvantifikace, absence manipulací po PCR, její vysoká kapacita screeningu a stupeň automatizace, možnost připravit test s minimálním množstvím vzorku DNA během několika hodin.

4.2. Návrh primerů a sond

4.2.1. Návrh primerů

Pro PCR amplifikaci zájmového genu jsou klíčové optimálně navržené primery, což jsou uměle nasyntetizované krátké úseky DNA neboli oligonukleotidy, které jsou komplementární k cílovému úseku DNA.

Pokud je známa sekvence templátového vlákna, lze navrhnout vhodné primery a sondy, které s ním budou hybridizovat. Sekvence genů jsou dostupné v online databázích, kde dochází k jejich neustálé aktualizaci. Genetické sekvence lze dohledat například pomocí databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information). Pro HLA geny existují databáze hla.alleles.org (URL1) a IPD-IMGT/HLA (URL3).

Při návrhu primerů jsou důležité především dva cíle: specifita a efektivita amplifikace. Specifita je definována jako frekvence, se kterou se vyskytuje specifické navázání primerů. Efektivita je definována jako schopnost PCR reakce amplifikace produktu vzhledem k teoretickému optimu, kdy se zdvojnásobuje produkt v každém PCR cyklu. Je několik proměnných, které ovlivňují rovnováhu mezi těmito dvěma cíli. Tyto proměnné mají předvídatelné účinky na specifitu a efektivitu amplifikace (Dieffenbach et al., 1993).

Je důležité pečlivě zvážit umístění a charakteristiku primerů, sond a amplikonu před začátkem QPCR experimentu. Zásadní je přiměřená teplota tání (T_m), která určuje podmínky, za kterých se budou primery a sonda vázat na cílovou sekvenci. Při používání programu pro návrh primeru se mohou zadat proměnlivé parametry reakce, jako jsou koncentrace hořčíku, nukleotidů (dNTPs), díky tomu je možné T_m spočítat relativně přesně (URL4).

Délka primerů, anelační teplota a teplota tání

Specifita je zajišťována délkou primeru a anelační teplotou PCR reakce, souvisí přímo s jeho délkou. Každý přidaný nukleotid zajišťuje primeru čtyřikrát vyšší specifitu (Dieffenbach et al., 1993).

Oligonukleotid dlouhý 18 až 24 bází má tendenci být dostatečně sekvenčně specifický, jestliže je anelační teplota (T_a) PCR reakce nastavena v rozmezí několika stupňů Celsia kolem teploty tání T_m primeru. T_a by neměla být nižší než T_m primerů o více jak 5°C než T_m primerů. Důsledkem nízké T_a může být, že se jeden nebo oba primery

budou vázat k jiným sekvencím, než bylo původně zamýšleno, protože může být tolerováno pouze částečné nasednutí primerů nebo chybného (mismatch) párování, to pak může vést k nespecifické amplifikaci. Pokud je T_a příliš vysoká, je snížena efektivita reakce. Optimální T_a tedy zajistí vyšší výtěžnost produktu a namnožení správného amplikonu (URL4).

Oligonukleotid se sekvencí kratší než 15 bazí je užitečný pouze pro limitovaný počet PCR protokolů, jako je například použití náhodných krátkých primerů při mapování jednoduchých genů (Liang & Pardee, 1992; Williams et al., 1990). Horní limit délky primeru je méně kritický a souvisí s efektivitou reakce. Kratší primer bude mnohem rychleji navázán na cílovou DNA a bude formovat stabilní dvouvláknový templát, od kterého může začít polymerizace DNA (Dieffenbach et al., 1993).

Optimální T_m primerů je mezi 60 – 64°C, ideální je 62°C, to je optimální teplota pro nejlepší funkci PCR enzymů. Ideálně by se teplota sady primerů neměla lišit o více než 2°C, aby se oba primery mohly vázat simultánně (Dieffenbach et al., 1993).

Pro primery kolem 20 bazí lze stanovit T_m pomocí výpočtu $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$, zatímco u delších primerů se musí brát v úvahu termodynamické parametry a jsou proto využívány počítačové programy pro návrh primerů (Breslauer et al., 1986; Freier et al., 1986). Kwok et al. ukázali, že pozice 3' konce primeru je důležitá pro správný průběh reakce (Kwok et al., 1990). Dokonalé párování 3' konce primeru a templátu je důležité pro získání optimálních výsledků. Pokud je to možné, alespoň pro prvních 6 nukleotidů by měl primer na 3' konci nasedat perfektně (Dieffenbach et al., 1993).

Další na co se při návrhu primerů musí dát pozor je, aby primery nevytvářely dimery, případně vlásenky (Chou et al., 1992). Na efektivitu amplifikace má vliv i délka produktu reakce (Rychlik et al., 1990).

Délka amplikonu

Délka amplikonu má dopad na efektivitu amplifikace (Rychlik et al., 1990). Délka závisí na účelu PCR a použitém materiálu. Pro účel detekce DNA sekvence je produkován PCR amplikon v délce 150-1000 bp. Pokud chceme detekovat specifický DNA fragment, je optimální malý amplikon v délce 120-300 bp (Dieffenbach et al., 1993).

Pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci by měl být amplikon kratší, ideálně mezi 50-150 bp (Smith & Osborn, 2009). Amplikony o velikosti mezi 70-150 bp zajišťují dostatečnou nukleotidovou sekvenci, v níž mohou být primery a sondy navrženy s odpovídající T_m a jsou nejsnadněji amplifikovatelné při standartních podmínkách. Mohou

být amplifikovány i amplicony delší než 500 bp ale podmínky PCR reakce musí být upraveny.

Pro kvantitativní PCR musí být primery a sondy navrhovány do kódujícího regionu mRNA. Pokud je to možné, je dobré navrhovat systém do místa spojení exonů, aby se snížila možnost detekce případné kontaminace genomickou DNA (URL4) .

Obsah Guanosinu a Cytosinu (GC)

Primery by měly obsahovat přiměřený obsah GC. Obsah GC by měl ideálně být 50 %, ale může se pohybovat v rozmezí 35-65 %. Sekvence primerů by neměly obsahovat oblasti se 4 nebo více po sobě jdoucími G (URL4).

4.2.2. Návrh sondy

Pro návrh sondy je důležité promyslet si její umístění. V ideálním případě by měla sonda být blízko přímého nebo zpětného primeru, ale neměla by se překrývat s vazebným místem primeru na stejném vlákně (URL4).

T_m sondy by měla být o 6-8°C vyšší než primerů. Pokud je teplota příliš nízká, procento navázané sondy bude nízké. V tomto případě mohou primery amplifikovat produkt, ale citlivost reakce může být kompromitována, jelikož se na všechna cílová místa nenaváže sonda, což povede ke snížení fluorescenčního signálu. To pak může zkreslit výsledky a dochází k špatné reprezentaci skutečného množství cílového produktu ve vzorku.

Anelační teplota by se neměla lišit o více než 5°C od T_m primeru. Obsah GC by stejně jako u primerů měl být v rozmezí 35-65 %. Neměl by se na 5' konci vyskytovat G, aby se předešlo možnému zhášení 5' fluoroforu (URL4).

U sond a primeru je potřeba zkontrolovat, jestli netvoří homo- nebo heterodimery a vlásenky. Hodnota ΔG (změny Gibbsovi energie) dimeru nebo vlásenek by měla být pozitivní. Pozitivní čísla naznačují, že sekundární struktura se nebude vytvářet. Pro tyto výpočty lze používat počítačové softwary (např. OligoAnalyzer).

Pro ověření specifity je třeba provést porovnání v databázi sekvencí nukleových kyselin BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; URL5), nebo zkontrolovat možné navázání na jiné sekvence manuálně. Zajistí se tak, že se nebude sonda vázat mimo žádaný cíl a nedojde ke snížení efektivity reakce.

Existuje mnoho softwaru pro navrhování systému primerů a sondy, které využívají

algoritmus pro design několika vhodných primerů pro cílové sekvence, mají ale svá omezení. Nelze je použít pro tak polymorfní geny, které se vyskytují v HLA systému. Softwarem navržené primery by nemusely nasedat na všechny žádoucí varianty daného genu.

5. Hypotézy a cíle

Kvůli lepšímu pochopení genetického pozadí vzniku celiakie a případně včasné diagnostice onemocnění jsme se v této práci zaměřili na expresi vybraných kandidátních genů, které se u tohoto onemocnění vyskytují. Lze totiž předpokládat, že pokud se u 30 % zdravých jedinců vyskytuje rizikový haplotyp a nevyvine se u nich během života celiakie, může to být ovlivněno odlišnou mírou exprese u zdravých a nemocných jedinců.

Byly stanoveny následující cíle práce:

- Navrhnout a otestovat systém primerů a sond pro QPCR, který bude
 - amplifikovat všechny alely HLA-DQA1 a HLA-DQB1 kandidátních genů rizikových pro celiakie,
 - schopen rozlišovat až na úroveň HLA-DQA1*05:01 a HLA-DQA1*05:05 u alfa řetězce a HLA-DQB1*02:01 a HLA-DQB1*02:02 u beta řetězce molekuly HLA-DQ.
- Navržený systém optimalizovat a verifikovat na pilotním souboru dat získaných ze vzorků od zdravých dárců a pacientů s celiakií.

6. Materiál a metody

Výchozím materiálem pro výzkum byla periferní krev získaná od pacientů s celiakií a krev od zdravých dárců se zájmovými alelami spojenými s celiakií. Krev byla u obou skupin zpracovávána stejnými postupy. Od zdravých dárců byla získávána krev pouze za účelem izolace mRNA, protože jejich genotyp nám už byl znám. Tito zdraví jedinci byly vybráni na základě jejich haplotypů HLA-DQA1 a HLA-DQB1 z databáze Ústavu lékařské genetiky 3.LF UK. Od pacientů jsme odebírali přibližně 8ml periferní krve do vakuet s EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) pro izolaci DNA, která byla následně použita při genotypizaci, a dalších přibližně 8ml odebraných do vakuet s antikoagulačním činidlem citrátem sodným sloužilo pro izolaci mRNA. Z krve byly nejprve izolovány mononukleární buňky (PBMCs), které byly pak dále zpracovávány.

6.1. Pacienti a zdraví dárce

Vzorky krve pacientů byly získávány ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Královské Vinohrady v Praze a Všeobecnou fakultní nemocnicí. Všichni účastníci studie byli seznámeni s výzkumem a podepsali informovaný souhlas.

U pacientů i zdravých dárců jsme v rámci dotazníku zjišťovali: pohlaví, věk, BMI, zdravotní stav, medikaci, očkování a životní styl, kam patří stravovací návyky, fyzická zátěž, kouření apod. Biologický materiál byl získán od 10 pacientů s nově diagnostikovanou, tedy neléčenou celiakií. Z toho bylo 6 mužů a 4 ženy. Zdravých jedinců bylo 15, z toho 4 muži a 11 žen. Věkové rozmezí dárců bylo 33-69 let. U pacientů to bylo 23-61 let. Pro zařazení do studie museli zdraví dárce splnit několik kritérií: nesměli trpět autoimunitními onemocněními ani poruchami imunity, dále byli dotazováni, na subjektivní posouzení zdravotního stavu, nesměli být dva předcházející týdny nemocní ani užívat antibiotika či antivirotika. U pacientů se vyskytovaly nejčastěji alergie, ekzémy. Průměrné BMI v obou skupinách bylo okolo 25.

V zájmu ochrany osobních dat byly vzorky krve po odběru zakódovány: pacienti byly označeni kódem EPEXCD(1-10) a zdraví jedinci EPEXHC(1-15). Pod tímto kódem byly vzorky dále zpracovávány.

6.2. Návrh primerů a optimalizace PCR reakcí

Primery byly navrhovány na základě sekvencí dostupných v internetových databázích a podle všeobecně používaných pravidel, viz kap. 4.2. Pro získání sekvencí HLA-DQ alel byly využívány databáze Allele Frequencies net database, EMBL-EBI (IPD-IMGT/HLA database) a Ensembl. Sekvence navržených primerů byly poté zadány do programů pro návrh primerů Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator a OligoAnalyzer 3.1, aby se zjistilo, zda nevytvářejí dimery, vlásenky apod. Algoritmus Blast, aplikace na stránkách National Center for Biotechnology Information (blast.ncbi.nlm.nih.gov) umožnil ověřit, jestli vytvořené primery nejsou komplementární a neváží se i na jiná místa v genomu než je cílová sekvence.

Navržení systému primerů a sondy, které se vážou na intronovou část genu pro HLA-DQA1, umožňuje odhalit ve vzorku případnou kontaminaci genomickou DNA (gDNA) a její míru.

Pro vytvořené primery byly poté optimalizovány podmínky PCR reakce; testovány byly zejména různé koncentrace primerů a anelační teploty. Výsledky byly elektroforeticky ověřovány a na jejich základě bylo vybráno optimální nastavení každé PCR reakce.

Následně byly provedeny optimalizace za účelem zjištění neoptimálnější koncentrace sond pro jednotlivé systémy. Poté, co byla provedena QPCR s různými koncentracemi sond, byla na základě míry fluorescence a hodnoty Ct stanovena optimální koncentrace sondy. Dále byla ověřována specifita jednotlivých systémů, kdy primery a sondy byly použity v reakci s jinými rizikovými alelami pro celiakii.

6.3. Izolace periferních mononukleárních buněk (PBMCs) z plné krve

Izolace PBMCs byla prováděna pomocí gradientové centrifugace přes Ficoll-Paque. Tato tekutina umožňuje rozvrstvit jednotlivé krevní elementy na základě hustotního gradientu.

Chemikálie:

PBS pH=7,4 (Phosphate Buffered Saline 10×) (Invitrogen, Gibco, USA) - pracujeme s 1× PBS
FicollPaque PLUS (GE Healthcare Bio-Science AB)

Pracovní postup:

1. Nejprve jsme naředili v 15 ml zkumavce 2 ml plné krve s 2 ml PBS.
2. Tuto směs jsme pomalu navrstvili na 3 ml FicollPaque PLUS a centrifugovali na 1800 rpm při 4°C na 30 minut.
3. V průběhu centrifugace došlo na základě gradientu k vytvoření vrstev, pipetou jsme opatrně odebrali prstenec mononukleárních buněk bez kontaminace Ficollem.
4. Odsáté PBMCs jsme promyli v cca 20-25 ml PBS a centrifugovali při 1500 rpm na 10 minut, tentokrát již za pokojové teploty (RT).
5. Supernatant jsme odlili, vzniklou peletu buněk jsme opatrně vortexovali, ještě jednou promyli v cca 20-25 ml PBS a centrifugovali na 1250 rpm na 10 minut při RT.
6. Opět jsme supernatant odstranili, peletu vortexovali, promyli v cca 20-25 ml PBS a centrifugovali na 800 rpm na 10 minut při RT.
7. Na závěr jsme supernatant odlili, peletu vortexovali, doplnili do 1 ml PBS a vyizolované buňky spočítali pomocí Bürkerovy komůrky.

6.4. Izolace DNA z PBMCs

DNA byla izolována vysolovací metodou neboli izolací pomocí proteinázy K.

Chemikálie:

WCLB (white cell lysis buffer) – příprava 500 ml roztoku

120 mM EDTA PH=8 (120 ml 0,5 EDTA, PH=8)

375 mM NaCl (chlorid sodný) (37,5 ml 5 M NaCl)

do 500 ml doplnit dH₂O

proteináza K (Sigma-Aldrich)

10% SDS anebo 20% SDS (dodecylsírán sodný)

6 M NaCl

čistý ethanol

70% ethanol

dH₂O

Pracovní postup:

1. K získaným PBMCs jsme přidali 235 μ l H₂O, 80 μ l WCLB; sediment jsme resuspendovali. Přidali jsme 40 μ l 10% SDS a 15 μ l proteinázy K (20 mg/ml v dH₂O).
2. Inkubovali jsme na otáčecím rotátoru 17 otáček/min při 55°C 30 min. Vzorek byl zchlazen na pokojovou teplotu.
3. Přidali jsme 100 μ l 6 M NaCl. Silně jsme třepali v ruce 15 s, stočili jsme 6 min na mikrocentrifuze při 18000 g, pomocí pipety byl supernatant přenesen do nové centrifugační zkumavky
4. Stočili jsme 3 min na mikrocentrifuze, pomocí pipety jsme supernatant opět přenesli do nové zkumavky. V centrifugační zkumavce byl supernatant smísen s 1 ml čistého ethanolu (-20°C). Vysráželi jsme DNA lehkým obracením a inkubovali na ledu 5-10 min.
5. Vzorek jsme stočili 3 min na mikrocentrifuze, slili jsme supernatant.
6. K sedimentu jsme přidali 1 ml 70 % ethanolu. Stočili jsme 3 min na mikrocentrifuze a slili supernatant.
7. DNA jsme vysušili v boxu s laminárním prouděním a rozpustili DNA ve 100 μ l H₂O. DNA byla uchovávána při -20°C.

6.5. Izolace mRNA z PBMCs

RNA byla izolována z PBMCs. Izolace byla prováděna přes kolonky se silikagelovou membránou. Na ní byla RNA zachycena a následně promýváním zbavena kontaminací.

K uvolnění RNA došlo přidáním vody.

Chemikálie:

GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

Součást kitu:

- lyzační roztok
- 2-merkaptoetanol
- promývací roztok 1
- promývací roztok 2

70% etanol, připravený naředěním z 96% etanolu, P-LAB a.s., Praha

Voda ze systému MILLIPORE Gradient; Milli-Q

Pracovní postup:

1. K PBMCs jsme přidali 500 ml lyzačního roztoku a 5 μ l 2-merkaptoetanolu, důkladně jsme zvortexovali.
2. Vzniklou suspenzi jsme napipetovali do GenElute filtrační kolonky a centrifugovali na 14000 \times g po dobu 2 minut.
3. Kolonku jsme odstranili a do přefiltrovaného roztoku jsme přidali 500 μ l 70% etanolu, následně jsme zvortexovali.
4. Do GenElute Binding kolonky jsme napipetovali 500 μ l vzniklého roztoku; roztoku bylo více než 500 μ l, musel být proto napipetován na kolonku ve dvou krocích.
5. Centrifugovali jsme na 14000 \times g po dobu 15 vteřin, filtrát jsme vylili, sběrnou zkumavku jsme vrátili zpět pod kolonku a veškerý zbývající roztok jsme napipetovali do kolonky.
6. Opět jsme centrifugovali na 14000 \times g po dobu 15 vteřin, filtrát jsme vylili, sběrnou zkumavku jsme vrátili zpět pod kolonku.
7. Do kolonky jsme napipetovali 500 μ l promývacího roztoku 1 a centrifugovali na 14000 \times g po dobu 15 vteřin.
8. Kolonku jsme přenesli do čisté sběrné zkumavky a napipetovali 500 μ l promývacího roztoku 2 a centrifugovali 14000 \times g po dobu 15 vteřin.
9. Sběrnou zkumavku jsme vylili, vrátili pod kolonku a opět napipetovali 500 μ l

promývacího roztoku 2 a centrifugovali 14000× g po dobu 2 minut.

10. Poté jsme sběrnou zkumavku vylili, vrátili pod kolonku a znovu centrifugovali na 14000 × g po dobu 1 minuty, abychom membránu úplně zbavili promývacího roztoku.

11. Přenesli jsme kolonku do čisté sběrné zkumavky, napipetovali 40 µl vody a nechali 1 minutu inkubovat při pokojové teplotě.

12. Na závěr jsme centrifugovali na 14000× g po dobu 1 minuty, vyzolovaná RNA byla obsažena ve filtrátu. Koncentraci a čistotu RNA jsme změřili na nanofotometru (NanoPhotometer™ Pearl, Implen) a RNA uchováváme při -80°C.

6.6. HLA genotypizace

Genotypizace HLA byla prováděna pomocí kitu DQA1*02,05;DQB1*02,03:02 (Olerup SSP, Německo)

Pracovní postup:

1. Pro typizaci jsme potřebovali DNA optimálně o čistotě $A_{260}/A_{280} = 1,6-2,0$ a koncentraci 30 ng/µl.

2. Master mix a DNA jsme nechali roztát při pokojové teplotě.

3. Reakční směs pro jeden strip jsme si připravili následovně:

69 µl Master Mix

46 µl DNA

115 µl dH₂O

4. Směs jsme vortexovali po dobu 5s a následně stočili na mikrocentrifuze. Do každé jamky jsme napipetovali 10 µl směsi. Do 21. jamky jsme napipetovali 8 µl Master Mixu a 2 µl dH₂O (negativní kontrola).

5. Vložili jsme do termocycleru s programem nastaveným dle pokynů výrobce následovně:

1. 1 cyklus 94°C 2 min

2. 10 cyklů 94°C 10 s
65°C 60 s

3. 20 cyklů 94°C 10 s
61°C 50 s
72°C 30 s

4. End – hold RT do 8 hodin
4°C déle než 8 hodin

Objem reakce 10µl, víko předeřháté na 104°C.

6. Výsledky se vizualizují elektroforeticky.

7. Vyhodnocování HLA alel provádíme pomocí interpretační tabulky.

Příklad vyhodnocení je znázorněn na obr. 7:

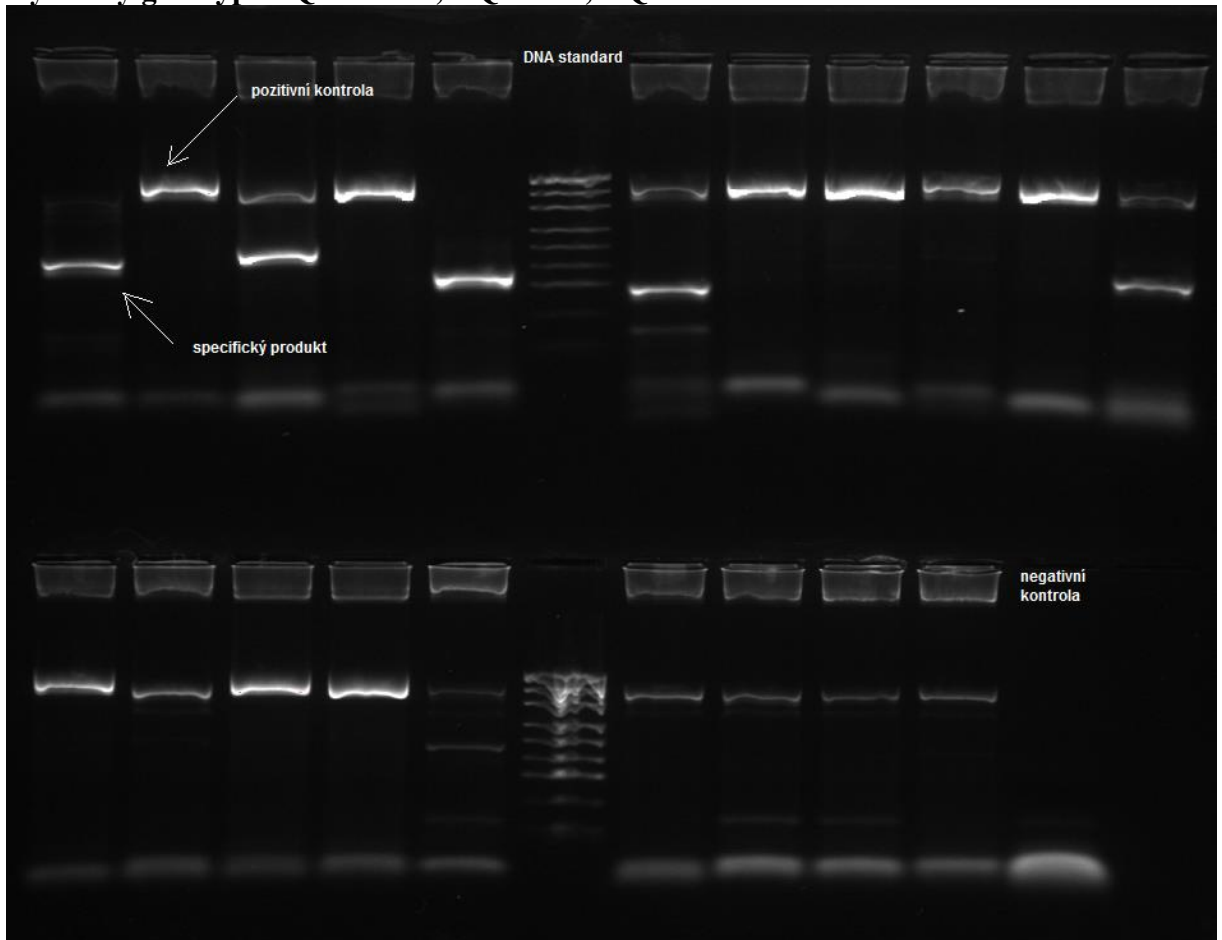
Vzorek EPEXCD03

Pozitivní dráhy 1: DQA1*0201

3,5: DQB1*02:01:01-02:01:06, 02:01:08- 02:02:02, 02:04-02:16, 02:18N-02:29

5,6,11: DQB1*03:02:01-03:02:07

Výsledný genotyp: DQA1*0201, DQB1*02, DQB1*03:02



Obr. 7: Elektroforetické zobrazení výsledku genotypizace jedince EPEXCD03

6.7. Elektroforetická separace

Pomocí elektroforetické separace jsme hodnotili kvalitu produktů PCR, zjišťovali optimální podmínky PCR reakcí pro jednotlivé primery a stanovovali genotypy vzorků.

Chemikálie:

Agaróza; Serva Electrophoresis GmbH, Německo

10 × TBE pufr (Tris-borátový pufr) – připravili jsme smícháním:

500 ml vody

108 g Tris (890 mM Tris base; Amresco, USA)

55 g kyseliny borité (890 mM kyselina boritá; Serva Electrophoresis GmbH, Německo)

40 ml EDTA (20 mM EDTA pH=8; Roth, Německo)

Doplnili jsme do 1000 ml vodou (Voda z MILLIPORE Gradient systému; Milli-Q)
GelRed, 10000× concentrated in water; C-Consulting, Slovensko
6× Loading Dye Solution; Fermentas, Kanada
Marker pUC19 DNA/MspI; Fermentas, Kanada

Pracovní postup:

1. Ve 100ml 0,5× TBE pufru jsme rozpustili 2 gramy agarózy.
2. Roztok jsme pomalu povařili v mikrovlnné troubě, přidali 2,5 µl GelRed, promíchali a nalili do vaničky s vloženými hřebeny na vytvoření jamek. Směs jsme nechali cca 20–30 minut ztuhnout.
3. Elektroforetickou vanu jsme naplnili 0,5× TBE pufrém, přičemž jsme dbali na to, aby byl gel zcela ponořen v TBE pufru.
4. Do jamek jsme pipetovali 10ul produktu PCR s 2 µl nanášecího barviva; do jedné z jamek bylo napipetováno 1,2 µl DNA markeru.
5. Elektroforézu jsme nechali probíhat přibližně 30 minut při stejnosměrném napětí o velikosti 5 V/cm.
6. Po skončení jsme gel vyhodnocovali a fotografovali pod UV lampou pomocí systému GelDoc XR (Biorad), která umožňuje výsledek zviditelnit.

6.8. Reverzní transkripce (RT)

Pomocí RT jsme přepsali RNA do cDNA, která byla dále použita pro PCR v reálném čase. Celý postup byl prováděn v laminárním boxu.

Chemikálie:

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies-Thermo Fisher Scientific)

Součást kitu:

- 10× RT pufr
- 25× dNTP Mix (100mM)
- 10× RT náhodné primery
- MultiScribe Reverse Transcriptase

Voda ze systému MILLIPORE Gradient; Milli-Q

Pracovní postup:

1. Všechny komponenty kitu jsme nechali roztát na ledu.
2. Na základě počtu reakcí jsme si připravili základní reakční směs podle tabulky 2, kde je uvedeno množství na jednu reakci. Reakce bez reverzní transkriptázy slouží jako negativní kontrola.

Tab.2: Komponenty pro přípravu reakční směsi pro RT

Komponenty	Objem (μl)	
	Směs s reverzní transkriptázou	Směs bez reverzní transkriptázy
10× RT pufr	2,0	2,0
25× dNTP Mix (100nM)	0,8	0,8
10× RT náhodné primery	2,0	2,0
MultiScribe reverzní transkriptáza	1,0	-
Voda	4,2	5,2
Celkem	10	10

3. Reakční směs jsme vortexovali a udržovali na ledu.
4. Do každé mikrozkušavky jsme napipetovali 10 μl reakční směsi.
5. Přidali jsme 20 ng RNA a doplnili jsme do objemu reakce 20 μl vodou.
6. Zkušavky jsme krátce centrifugovali a do doby, než jsme je vložili do termocykleru, jsme je uchovávali na ledu.
7. V termocykleru (C1000TM Thermal Cycler; Biorad) jsme nastavili program:

1. krok (hybridizace s primery): 10 minut při 25°C
2. krok (extenze): 120 minut při 37°C
3. krok (denaturace enzymu): 5 vteřin při 85°C

8. Vložili jsme vzorky do termocykleru a proces spustili, po skončení reakce jsme vzorky uchovávali při -20°C.

6.9. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (QPCR)

Při měření exprese pomocí QPCR byl použit systém primerů a sond pro HLA-DQA1 a DQB1, který jsme navrhly. Jako endogenní kontrola byl vybrán gen *PGK1* (fosfoglycerát kináza 1). Dále byla pomocí primerů navržených do intronové části DQA1 řetězce sledována kontaminace vzorku genomickou DNA. Reakce pro každý vzorek byla prováděna v technických tripletech.

Chemikálie:

- LightCycler® 480 Probes Master 5 × 1 ml (master mix) (Roche Applied Science, USA)
- TaqMan® Gene Expression Assays (sondy s primery) (Life Technologies-Applied Biosystems, USA) PGK1: Hs99999906_m1
- navržené primery a sondy syntetizované Integrated DNA Technologies (IDT)
 - sondy značené 3' Iowa black hole FQ; 5' 6-FAM

Pracovní postup:

1. Po reverzní transkripci jsme 20 µl cDNA naředili 60 µl H₂O.
2. Master mix jsme nechali roztát při pokojové teplotě, naředěnou cDNA jsme udržovali na chladícím stojánku a směs sondy a primerů pro jednotlivé geny jsme nechali roztát ve tmě (přikryté alobalem), také při pokojové teplotě.
3. Na základě počtu reakcí jsme si připravili potřebné množství směsi podle tabulky 3.

Tab.3: Objemy jednotlivých součástí reakční směsi pro všechny geny a alely, které byly kvantifikovány pomocí QPCR.

Alela	Alfa řetězec HLA				Beta řetězec HLA			INT alfa	PGK 1
	DQA1* 0201	DQA1* 0301	DQA1* 0501	DQA1* 0505	DQB1* 0201	DQB1* 0202	DQB1* 0302		
T _m (°C)	60	60	58	58	58	58	60	60	60
přímý primer (μl)	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,7
zpětný primer (μl)	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	
sonda (μl)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	
Master Mix (μl)	7	7	7	7	7	7	7	7	7
dH ₂ O (μl)	2,85	2,73	2,85	2,85	2,85	2,85	2,85	2,85	2,3
celkem (μl)	10μl								

4. Celkové množství po 10 μl jsme napipetovali do 384 jamkové destičky (LightCycler® 480 Multiwell Plate 384).

5. Do příslušných jamek jsme přidali 4 μl cDNA a destičku přelepili optickou fólií a dali 2 minuty centrifugovat při 1500 g.

7. Destičku jsme vložili do přístroje LightCycler®480 System (Roche Applied) a pomocí softwaru nastavili protokol podle následujících parametrů:

1. krok: 2 minuty při 50°C
 2. krok (hot start): 10 minut při 95°C
 3. krok (denaturace): 15 vteřin při 95°C
 4. krok (hybridizace, extenze): 1 minuta při 58°C nebo 60°C
 5. krok (chlazení): 30 vteřin 40°C
- (kroky 3 a 4 se opakují 40×)

8. Po dokončení reakce jsme destičku vyjmuli z přístroje, data vyhodnotili pomocí druhé derivace a získali jsme hodnoty Ct (cycle treshold), průměrné Ct a směrodatnou odchylku. S těmito daty jsme později pracovali.

6.10. Statistické zpracování

Ke statistickému zpracování dat jsme použili program Statistica. Pro zjištění rozložení dat jsme použili test normality, Shapiro-Wilkův test. Při porovnání dvou skupin dat jsme při Gaussovském rozložení použili parametrický nepárový T-test. Při nenormálním rozložení dat jsme zvolili neparametrický Mann-Whitneyův test. Hranice statistické významnosti byla $P < 0,05$.

7. Výsledky

7.1. HLA genotypizace

U 10 pacientů s celiakií byly určeny genotypy za pomoci kitu Olerup SSP DQA1*02,05;DQB1*02,03:02, který umožňuje typizaci rizikových alel. Bohužel ale neumožňuje zjistit, jestli je jedinec pro danou alelu homozygotem nebo heterozygotem. V tabulce (tab.6) jsou uvedeny výsledky genotypizace pro jednotlivé pacienty. Častěji zastoupena byla alela DQA1*05 (n = 8), DQA1*02:01 (n = 4), pro beta řetězec se ve většině případů vyskytovala alela DQB1*02 (n = 10) a pouze tři pacienti měly alelu DQB1*03:02.

Zdraví dárči byly vybráni z databáze Ústavu lékařské genetiky 3. LF UK na základě jejich DQA1 a DQB1 haplotypů.

U alfa řetězce bylo zastoupení alel:

DQA1*05:01	7 ×
DQA1*05:05	7 ×
DQA1*02:01	6 ×
DQA1*03:01	4 ×

Pro beta řetězec bylo:

DQB1*02:01	8 ×
DQB1*02:02	6 ×
DQB1*03:02	3 ×

Jedince EPEXHC01 a EPEXHC06 jsme považovali za homozygota, vzhledem k tomu, že navržené primery nerozlišovaly DQA1*05 na vyšší úrovni, to samé platilo i pro EPEXHC16 u DQB1*02.

Konkrétní haplotypy zdravých dárců a pacientů jsou vypsány v tabulce 4.

Tab. 4: Genotypy zdravých kontrol (EPEXHC) a pacientů s celiakií (EPEXCD).

Kód	genotyp				Kód	genotyp			
	DQA1	DQB1	DQA1	DQB1		DQA1	DQB1	DQA1	DQB1
EPEXHC01	05:01	02:01	05:05	03:01	EPEXCD01	05	02		06:63
EPEXHC02	02:01	02:02	01:02	06:02	EPEXCD02	02:01	03:02		
EPEXHC03	05:01	02:01	01:03	06:03	EPEXCD03	02:01	02		03:02
EPEXHC04	02:01	02:02	01:03	06:03	EPEXCD04	05	02		03:02
EPEXHC05	05:01	02:01	01:02	06:09	EPEXCD05	05	02		
EPEXHC06	05:01	02:01	05:05	03:01	EPEXCD06	02:01	02	05	
EPEXHC07	02:01	02:02	05:05	03:01	EPEXCD07	05	02		
EPEXHC08	05:01	02:01	01:02	06:09	EPEXCD08	05	02		
EPEXHC09	02:01	02:02	04:01/04:03N	04:02	EPEXCD09	05	02		
EPEXHC10	03:01	03:02	05:05	03:01	EPEXCD10	05	02	05	
EPEXHC11	02:01	02:02	03:01	03:05	EPEXCD11	02:01	02		
EPEXHC12	01:01	05:01	05:01	02:01					
EPEXHC13	03:01	03:02	05:05	03:01					
EPEXHC14	01:01	05:01	05:01	02:01					
EPEXHC15	03:01	03:02	05:05	03:01					
EPEXHC16	05:05	02:01	02:01	02:02					

7.2. Návrh primerů a sond

Jak bylo zmíněno v teoretickém úvodu geny, které se podílí na vzniku celiakie, jsou z rodiny HLA-DQ. Patří sem tedy geny pro alfa řetězec DQA1*05:01, DQA1*05:05, DQA1*02:01 a DQA1*03:01. Pro beta řetězce jsou to pak DQB1*02:01, DQB1*02:02 a DQB1*03:02.

Při návrhu primerů jsme pracovali s nejaktuálnějšími sekvencemi, které jsme získali z databází hla.alleles.org a IPD-IMGT/HLA. Z počátku jsme měli v úmyslu vycházet z dostupných publikací, ale ukázalo se, že od jejich vzniku se objevily nové alelické sekvence pro naše zájmové geny, anebo že nedocházelo k rozlišení na stupni, jaký jsme požadovali.

Naším cílem bylo odlišit alely na úrovni A1*05:01 a A1*05:05 a beta řetězce B1*02:01 a B1*02:02.

V následujících tabulkách (tab. 5 a 6) jsou shrnuty sekvence primerů, které byly použity v publikacích, které se zabývaly expresí HLA alel. Sekvence použité v těchto publikacích autoři převzali zcela nebo částečně z publikace Olerup et al. (1993), jedná se tedy o sekvence navržené před 24 lety. Publikované sekvence primerů a sond tedy nemohou reflektovat současné znalosti sekvencí HLA genů a jejich jednotlivých alel. Ve

většině případů tak navržené systémy dnes není možné použít, neboť od jejich publikování byly jednak nalezeny nové alely, k nimž nejsou sekvence primerů komplementární, a nebylo možné je detekovat, jednak došlo ke zpřesnění sekvencí už známých alel. Některé z uvedených primerů nejsou zcela specifické a váží se i na jiné HLA-DQ alely než ty, pro které byly navrženy.

Primárním cílem diplomové práce bylo rozlišit alely na úrovni DQA1*05:01/DQA1*05:05 a DQB1*02:01/02:02. Z těchto a výše uvedených důvodů nebyly sekvence primerů převzaty z uvedených publikací, ale byl navržen originální systém jak pro DQA1, tak pro DQB1 řetězec. Vzhledem k velmi podobné sekvenci alel, které se lišily pouze jednonukleotidovými změnami, však rozlišení alel na zamýšlené úrovni nebylo možné. Bylo tedy nutné akceptovat nižší míru rozlišení studovaných alel a v důsledku toho navrhnout nový systém primerů/sond, které obsáhly celé spektrum DQA1*05 a DQB1*02 alel, ale nerozlišovaly alely na primárně zamýšlené úrovni. Tato skutečnost také umožnila použít některé z revidovaných sekvencí primerů z publikovaných v odborné literatuře uvedené v tabulkách 5 a 6.

Tab 5: Sekvence primerů pro kvantifikaci alel HLA-DQA1 včetně dalších charakteristik

HLA DQA1	Přímý primer	Zpětný primer	Publikace	Poznámky
AI*05:01/AI*05:05	ACGGTCCCTCTGGCCAGTA		(Selleski et al., 2015)	váže se na AI*01:01, AI*01:02, AI*04:01, AI*04:02
		AGTTGGAGCGTTTAATCAGAC		
	AGATGAGCAGTTCTACGTGGACC		(Fernandez et al., 2003)	Váže se na AI*01:01, AI*01:02, AI*01:03
		AGAGTTGGAGCGTTTAATCAGAC*		
	CACGTCGCCTCTTATGGTGTA		(Profaiser et al., 2011)	
	GACTGTTCAAGTTATGTTTTAGG			
AI*02:01	ACGGTCCCTCTGGCCAGTT *		(Fernandez, 2003)	
		TTGCGGGTCAAATCTAAGTCTGT		modifikováno a použito jako zpětný primer
AI*03:01	TTCACCTCGTCAGCTGACCAT		(Selleski et al., 2015)	v místě primeru z poloviny odlišná sekvence AAGACATTGTGGCTGACCAT
		CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT		
	GGTCCCTCTGGGCAGTACAG		(Fernandez et al., 2003)	Váže se na AI*03:02
		CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT*		

Žlutě jsou vyznačeny primery, které byly použité v této práci; primery publikované v (Olerup et al., 1993) jsou označeny hvězdičkou.

V poznámkách jsou uvedeny nespecifické vazby konkrétní alely DQA1, případně jejich další charakteristika.

Tab 6: Sekvence primerů pro kvantifikaci alel HLA-DQB1 včetně dalších charakteristik

HLA DQB1	Přímý primer	Zpětný primer	Publikace	Sekvence alel, u kterých se v místě komplementárním k primeru nachází polymorfismus	Poznámky
B1*02:01/B1*02:02	GTGCGTCTTGTGAGCAGAAG		(Selleski et al., 2015)	B1*02:01:18 AGCTCCGCACGACTTTGC	váže se na B1* 03:02
		GCAAGGTCGTGCGGAGCT			
	GGACAGAGCGCGTGCGTCTT		(Profaizer et al., 2011)	DQB1*02:01:04 CATCCTGGAAGGAAACGGG	
		GCCCGTTTCCTCTCCAGGATG			
	CGTGCGTCTTGTGAGCAGAAG		(Ferstl et al., 2004)	B1*02:01:02 TGCCTGCCGCCGAGTATT	
		AGTACTCGGCGGCAGGCA		B1*02:01:07 TGCCTGCTGCCGAGTACT	
		B1*02:01:11 TGCCTGCTGCCGAGTACT			
			B1*02:01:12 GCGCGTGACGCGAGTACT		
			B1*02:01:21 TGCCTGCCGCTGAGTACT		
	CGTGCGTCTTGTGAGCAGAA		(Říhová, 2015)		
		CCCGTTTCCTCTCCAGGAT			
B1*03:02	ACGGAGCGCGTGCGTCT		(Ferstl et al., 2004)	B1*03:02:14 CCGCGGAGTACTGGAACAGC	
		AGTACTCGGCGGCAGGCG			
	GCGCGTGCGTCTTGTGACC		(Profaizer et al., 2011)	DQB1*03:02:16 GCGCGTGCGTCTCGTGACC	
		CTGTTCCAGTACTCGGCGGCA		DQB1*03:02:10 TGCTGCCGAGTACTGGAACAG	
	GCCTTCGGGTAGCAACTGTG		(Říhová 2015)	DQB1*03:02:14 TGCCGCGGAGTACTGGAACAG	váže se na DQB1*02
	GCGTACTCCTCTCGGTTATAGATGTA	DQB1*03:02:04 TACATCTATAATCGAGAGGAGTACGC		váže se pouze na DQB1*03:02:01/11/12	
			DQB1*03:02:13 TACATCTATAACCGAGAAGAGTACGC		

Žlutě jsou vyznačeny primery, které byly použity v této práci; primery publikované v (Olerup et al., 1993) jsou označeny hvězdičkou.

V poznámkách jsou uvedeny nespecifické vazby konkrétní alely DQB1, případně jejich další charakteristika.

Uvedeny jsou také sekvence alel, u kterých se liší sekvence, pro kterou byl primer navržen.

7.2.1. Návrh primerů a sond pro vybrané alely HLA-DQA1 a HLA-DQB1

Specifita a jedinečnost sekvencí primerů a sond z výchozích publikací (tab. 7 a 8) byly komparativní analýzou ověřeny pomocí databází hla.alleles.org a IPD-IMGT/HLA. Pro představu, jak se postupovalo, jsou na obr. 8 uvedeny sekvence alel DQA1*05:01 a DQA1*05:05. Je patrné, že se liší pouze na třech místech jednonukleotidovými polymorfismy. Jelikož primárním cílem bylo rozlišovat tyto dvě alely, byl navržen systém primeru a sondy tak, že se využilo přítomnost polymorfismu a 3' konec zpětného primeru byl pro obě alely odlišný. Sekvence navržených oligonukleotidů byly zkontrolovány pomocí databáze NCBI a jejího algoritmu BLAST, který umožňuje srovnání dotazované sekvence se sekvencemi všech známých alel HLA-DQ dostupných v databázi, čímž byla ověřena jejich specifita v rámci systému HLA. Zároveň proběhlo ověřování jedinečnosti sekvence v rámci celého genomu člověka.

U alel DQA1*02:01 a DQA1*03:01 se sekvence lišila více, proto jsme měli větší možnost volby při výběru primerů.

DQA1*05:01:

DQA1*05:05:

```
5' ATGATCCTAAACAAAGCTCTGATGCTGGGGGCCCTTGCCCTGACCACCGTGATGAGCCCCTGTGGAGGTGAAGACATTGTGGCTGACCACGTCGCCTCTTATGGTGTAACCTTGTACCAGTCTTACG
5'-----A-----
GTCCCTCTGGCCAGTACACCCATGAATTTGATGGAGATGAGCAGTTCTACGTGGACCTGGGGAGGAAGGAGACTGTCTGGTGTTTGCCGTGTTCTCAGACAATTTAGATTTGACCCGCAATTTGCACTGA
-----
CAAACATCGCTGTCTTAAACATAACTTGAACAGTCTGATTAACGCTCCAACCTTACCGCTGCTACCAATGAGGTTCCAGGTCACAGTGTTCCTCAAGTCTCCCGTGACACTGGGTCAGCCCAACA
-----
TCCTCATCTGTCTTGTGGACAACATCTTCCCTCCTGTGGTCAACATCACATGGCTGAGCAATGGGCACTCAGTCACAGAAGGTGTTCTGAGACCAGCTTCCTCTCCAAGAGTGATCATTCCTTCTTCA
-----
AGATCAGTTACCTCACCCTCCTCCCTTCTGCTGAGGAGAGTTATGACTGCAAGGTGGAGCACTGGGGCCTGGACAAGCCTCTTCTGA AACACTGGGAGCCTGAGATTCCAGCCCCTATGTCAGAGCTCA
-----A-----
CAGAGACTGTGGTCTGCGCCCTGGGATTGTCTGTGGGCCTCGTGGGCATTGTGGTGGGCACTGTCTTCATCATCCGAGGCCTGCGTTCAGTTGGTGCTCCAGACACCAAGGGCCCTTGTGA 3'
-----G----- 3'
```

Obr. 8: Porovnání sekvencí alel HLA-DQA1*05:01 a DQA1*05:05. Navržené primery jsou vyznačeny barevně (modř: přímý primer; žlutě: zpětný primer; oranžově: sonda; (-) identická sekvence). Zdroj: databáze IPD-IMGT/HLA

Pro optimalizaci podmínek PCR reakcí navržených primerů jsme použili vzorky cDNA od zdravých dárců se žádaným genotypem. Byly testovány různé teploty T_a , koncentrace primerů nebo různé koncentrace hořčnatých kationtů. PCR reakce probíhaly v ThermoCycleru v laboratoři molekulární antropologie (LMA). Výsledné produkty jsme poté zkoumali za pomoci elektroforetické separace.

U sond jsme v rámci optimalizace testovali koncentrace 50 nM, 100 nM a 150 nM. Vyhodnotily jsme, že pro všechny námi navržené sondy byla nejvhodnější koncentrace 150 nM.

U primerů pro DQA1*02:01 a DQA1*03:01 jsme testovali v rámci optimalizací různé T_a , abychom stanovili optimální podmínky PCR reakce.

Používali jsme tento PCR profil:

50°C	2'
95°C	10'
95°C	15''
T_a	1'
<u>40°C</u>	<u>30''</u>

40× opakování 3. a 4. kroku

Zde byla testována teplota T_a od 50°C do 62°C.

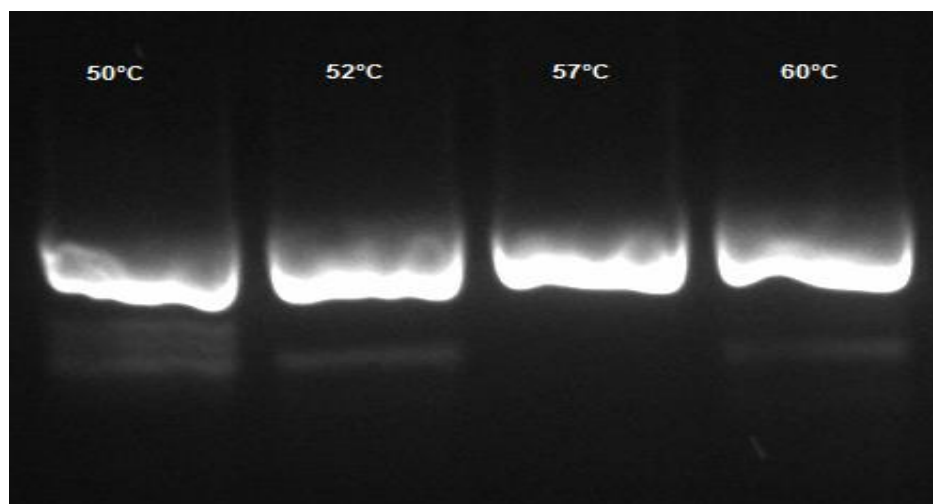
Byly použity chemikálie na QPCR od Roche. Testované koncentrace primerů v reakci byly 300 nM, 600 nM nebo 900 nM.

MasterMix	7 μ l
Přímý primer	0,084 μ l / 0,168 μ l / 0,252 μ l
Zpětný primer	0,084 μ l / 0,168 μ l / 0,252 μ l
<u>dH₂O</u>	<u>2,83 μl / 2,66 μl / 2,45 μl</u>

výsledný objem 10 μ l

Do reakce bylo přidáno 4 μ l cDNA ($c = 50$ ng).

Příklad optimalizace u alel DQA1*03:01 a DQB1*02:01 je zobrazen na obrázku 9.



*Obr. 9: Výsledky optimalizací PCR reakce pro DQA1*02:01 zobrazeny na agarózovém gelu. Neoptimálnější teplotní podmínky pro amplifikaci byly nalezeny při 57°C. Velikost amplikonu je 127 bp, pro porovnání je uveden DNA standard (pUC).*

Specifickým produktem primerů pro DQA1*05:01/05:05 byl amplikon o velikosti 69 bp. Stávající protokol vedl k produkci nespecifického fragmentu o velikosti 110 bp. Amplifikace nespecifického fragmentu byla neúspěšně řešena několika postupy: optimalizace T_a , změna dvoukrokového systému PCR na tříkrokový, změna chemie pro QPCR za chemii pro standardní PCR, Touch Down PCR a Touch Up PCR.

Byl proto navržen nový zpětný primer společný pro DQA1*05:01 a DQA1*05:05, který již neumožňuje tyto dvě alely rozlišit:

5'TGGAATCTCAGGTCCCAGT 3'

Systém s novým společným zpětným primerem úspěšně amplifikoval cílový specifický produkt na klasickém termocykleru, avšak ne na cyklerech pro QPCR LC480 (Roche), iQ5 (Bio-Rad), kde docházelo k amplifikaci nespecifických produktů. Příčina zůstala neznámá.

Pro DQA1*05:01/05:05 byl proto navržen nový systém, který vycházel z publikace Fernandez et al. (2003) :

Přímý primer	5' AGATGAGCAGTTCTACGTGGACC 3'
Zpětný primér	5' AGAGTTGGAGCGTTTAATCAGAC 3'
Sonda	5' ACTGTCTGGTGTTCCTGTTCTCA3'

Tento systém po základních optimalizacích fungoval a byl použit pro měření exprese.

Pro kvantifikaci vybraných alel HLA-DQA1 tedy byly navrženy systémy uvedené v tabulce 7. Systémy byly navrženy do exonu 2 nebo exonu 3.

Tab 7: Systémy primerů a sond pro vybrané alely HLA-DQA1

HLA-DQ alely	Přímý primer (5'→3')	Zpětný primer (5'→3')	Sonda (5'→3')
A1*05:01/05:05	AGATGAGCAGTTCTACGTGGACC	AGAGTTGGAGCGTTTAATCAGAC	ACTGTCTGGTGTTCCTGTTCTCA
A1*03:01	GGTCCCTCTGGGCAGTACAG	CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT	CCAGACAGTCTCCTTCCTC
A1*02:01	ACGGTCCCTCTGGCCAGTT	TTGCGGGTCAAATCTAAGTCTGT	CCAGACAGTCTCCTTCCTC

Specifita systému DQA1*03:01 byla prověřena reakcí s cDNA pocházející od jedince nesoucího non-DQA1*03:01 genotyp. Tento postup byl proveden u všech navržených primerů a sond. Systémy vykazovaly specifickou vazbu na alely, pro které byly navrženy.

DQB1 je vysoce polymorfní systém. Bylo proto zásadní navržení takových primerů, které by byly schopné nasedat na všechny doposud známé sekvence. Například u DQB1*02:01 je známo kolem 20 sekvencí s většinou jednonukleotidovou změnou, u DQB1*03:02 je to 17 sekvencí. Většina sekvencí je ověřena, což znamená, že jejich sekvence byla získána a potvrzena nezávisle v různých laboratořích.

U DQB1*02:01/02:02 se nepodařilo navrhnout primery, které by obsáhly všechny polymorfismy a byly schopné odlišovat tyto dvě alely. Byl tedy navržen systém pro obě společný. Dále byl navržen systém pro DQB1*03:02. Systémy byly navrženy do exonu 2 a jsou popsány v tabulce 8.

Tab. 8: Systémy primerů a sond primárně navržených pro vybrané alely DQB1

HLA-DQ alely	Přímý primer (5'→3')	Zpětný primer (5'→3')	Sonda (5'→3')
B1*02:01/02:02	CGTCTTGTGAGCAGAAG	CTGGTAGTTGTGTCTGCAC	AGCCAGAAGGACATCCTGGAGA
B1*03:02	GTGCGTCTTGTGACCAGAT	TGTCTGCACACCGTGTCC	TGGAACAGCCAGAAGGAAGTCCT

Po optimalizacích, bylo zjištěno, že systém pro B1*02:01/02:02 není dostatečně specifický. Pro B1*02:01/02:02 byly tedy navrženy nové primery, které byly vycházely z práce Selleski et al., 2015, zatímco sonda byla originálně navržena. Systém pro B1*03:02 sice při optimalizacích na ThermoCycleru fungoval, ale po spuštění na LightCycleru nebyla detekována fluorescence. Pro B1*03:02 byl proto navržen nový systém, kde

primery vycházely z publikace Ferst et al., 2004, zatímco sonda byla opět originální. Nově navržené systémy jsou uvedeny v tabulce 9.

Tab. 9: Systémy primerů a sond pro vybrané alely HLA-DQB1

HLA-DQ alely	Přímý primer (5'→3')	Zpětný primer (5'→3')	Sonda (5'→3')
B1*02:01 /02:02	CGTCTTGTGAGCAGAAG	GCAAGGTCGTGCGGAGCT	TCTCCAGGATGTCCTTCTGGCT
B1*03:02	ACGGAGCGCGTGCGTCT	AGTACTCGGCGGCAGGCG	CGAGAGGAGTACGCACGCTTCGAC

V následující tabulce 10 jsou shrnuty výsledné systémy primerů a sond s jejich specifikací.

Tab. 10: Výsledné sekvence a charakteristiky primerů a sond pro HLA-DQ alely

HLA-DQ	Primery a sondy	Sekvence (5'→3')	Ta (°C)	délka ampliconu (bp)
DQA1*05:05/05:01	DQA1*05 F DQA1*05 sonda DQA1*05 R	AGATGAGCAGTTCTACGTGGACC ACTGTCTGGTGTTCCTGTTCTCA AGAGTTGGAGCGTTAATCAGAC	58	153
DQA1*02:01	DQA1*02:01 F DQA1*02:01 sonda DQA1*02:01 R	ACGGTCCCTCTGGCCAGTT CCAGACAGTCTCCTTCCTC TTGCGGGTCAAATCTAAGTCTGTCT	60	122
DQA1*03:01	DQA1*03:01 F DQA1*03:01 sonda DQA1*03:01 R	GGTCCCTCTGGGCAGTACAG CCAGACAGTCTCCTTCCTC CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT	60	127
DQB1*02:01/02:02	DQB1*02 F DQB1*02 sonda DQB1*02 R	CGTCTTGTGAGCAGAAG TCTCCAGGATGTCCTTCTGGCT GCAAGGTCGTGCGGAGCT	58	205
DQB1*03:02	DQB1*03:02 F DQB1*03:02 sonda DQB1*03:02 R	ACGGAGCGCGTGCGTCT CGAGAGGAGTACGCACGCTTCGAC AGTACTCGGCGGCAGGCG	60	121

F značí přímý primer, *R* zpětný primer, *Ta* je anelační teplota. Sondy jsou značené 3'Iowa Black FQ; 5'6-FAM.

7.2.2. Návrh primerů a sondy pro genomickou DNA

Abychom zabránili kontaminaci vzorku RNA genomickou DNA, použili jsme na vzorky DNázu. Bohužel některé vzorky degradovala.

Pro stanovení míry kontaminace vzorku genomickou DNA jsme proto navrhli systém primerů a sondy do intronové sekvence HLA-DQA1. Systém byl navržen do prvního intronu, který se nachází mezi exony 1 a 2. Amplicon je dlouhý 108bp a *Ta* je 60°C.

Přímý primer 5' AGGTCTCTATGTCGTTCCAT 3'

Zpětný primér 5' GAAATTTGAGAATGACACTTCA 3'

Sonda

5' TAGTGAGGTTTCCATCAGTGGATA 3'

7.2.3. Efektivita PCR reakce

Stanovili jsme efektivitu PCR reakce pro všechny námi navržené primery. Pro zjištění efektivity PCR byla vytvořena ředící řada vždy jednoho vzorku cDNA příslušného genotypu. Ředící řada byla: 1×, 10×, 100×, 1000× a 10 000×. Na základě Ct hodnot jednotlivých ředění jsme vypočítali hodnotu efektivity za pomoci vztahu $eff = 10^{(-1/slope)}$ (Pfaffl, 2001).

Pro primery navržené pro DQA1*05:01 byla efektivita 2, pro DQA1*05:05 byla 2,1, dále pak DQA1*03:01 2,2 a DQA1*02:01 1,935. Pro primery navržené pro beta řetězec byla stanovena efektivita pro DQB1*02:01 jako 1,872, DQB1*02:02 2,4 a pro DQB1*03:02 1,961. Pro PGK1 byla efektivita 1,89 a pro primery pro intronovou DQA1 $eff = 1,979$.

7.2.4. Výběr endogenní kontroly

Výběr vhodné endogenní kontroly je důležitým předpokladem pro správné zhodnocení genové exprese. Studie zabývající se expresí používají jako endogenní kontroly například *18S RNA*, *GAPDH* (*glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa*) nebo *TBP* (*TATA-Box binding protein*), *PGK1* (*fosfoglycerat kinasa 1*), *PPIB* (*peptidylprolyl izomeráza B*) a *B2M* (*beta 2 mikroglobulin*). Některé z těchto používaných kontrol jsme zámítli vzhledem k některým vlastnostem genů a tedy ani netestovali. *18S RNA* je vysoce exprimována v eukaryotických buňkách a je tedy nevhodná k použití u genů, které mají Ct hodnoty kolem 30 a vyšší. *GAPDH* komerčně nabízená assay (AOD) se váže i na pseudogen. Po studiu literatury, předchozích experimentech v LMA, zabývajících se celiakií a vlastním otestování jsme vybírali ze tří genů: *PGK1*, *PPIB* a *B2M*. Tyto geny jsme testovali na 15 vzorcích od zdravých dárců a sledovali Ct a především směrodatnou odchylku dat.

Jako nejstabilnější gen pro analýzu se jevil *PGK1*, kdy Ct všech vzorků bylo v průměru 28,596 se směrodatnou odchylkou 0,789, a pozitivní signál byl u nejvyššího počtu vzorků (93 %). Toto zjištění bylo konzistentní s výzkumem, který prováděla Falkenberg et.al., kde zjistili, že právě *PGK1* se jeví jako vhodný referenční gen pro měření genové exprese u PBMC (Falkenberg et.al., 2011).

7.3. Kvantifikace exprese vybraných alel HLA-DQA1 a HLA-DQB1

U všech těchto zájmových genů byla měřena exprese vždy v technických tripletech za podmínek stanovených jako výstup optimalizací. Pro každý vzorek byla provedena QPCR reakce s HLA-DQA intronovým systémem a endogenní kontrolou kvantifikující expresi *PGK1*. QPCR reakce probíhaly při 58°C nebo 60°C. Do reakce byla přidávána cDNA o koncentraci 50 ng.

Rozdíly exprese jednotlivých alel DQ byly vztaženy vůči endogenní kontrole *PGK1* a vůči expresi intronové DQA1. Systém intronové DQA1 sloužil pro výpočet procenta kontaminace genomickou DNA, po odečtení této kontaminace jsme získali míru exprese alely.

Pro výpočet exprese byl použit následující postup:

Podle vzorce $\Delta Ct(\text{goi} - \text{hk})$ byl vypočten rozdíl mezi Ct zájmového genu (goi) a Ct endogenní kontroly (hk), tedy *PGK1*.

Následně byla spočítána exprese alely vzorcem $\text{eff}^{-\Delta Ct}$, kdy namísto eff (efektivita) byla dosazena efektivita jednotlivých primerů, pokud se lišila od $\text{eff} = 2$, pokud byla efektivita stoprocentní, byla dosazena hodnota 2. Stejný postup byl použit i pro zjištění exprese intronové DQA1. Poté byla odečtena exprese dané alely od exprese intron alfa DQA1 pomocí vztahu

$$\text{eff}^{-\Delta Ct(\text{DQ})} - 2^{-\Delta Ct(\text{intron alfa DQA1})}$$

Z této hodnoty jsme zjistily procento kontaminace. To pak bylo použito pro výpočet exprese u DQB1. Po eliminaci vzorků, jejichž míra kontaminace genomickou DNA byla vyšší než 15%, byl počet jedinců zařazených do analýzy u skupiny

DQA1*02:01 pacienti (n = 2), zdraví jedinci (n = 6);

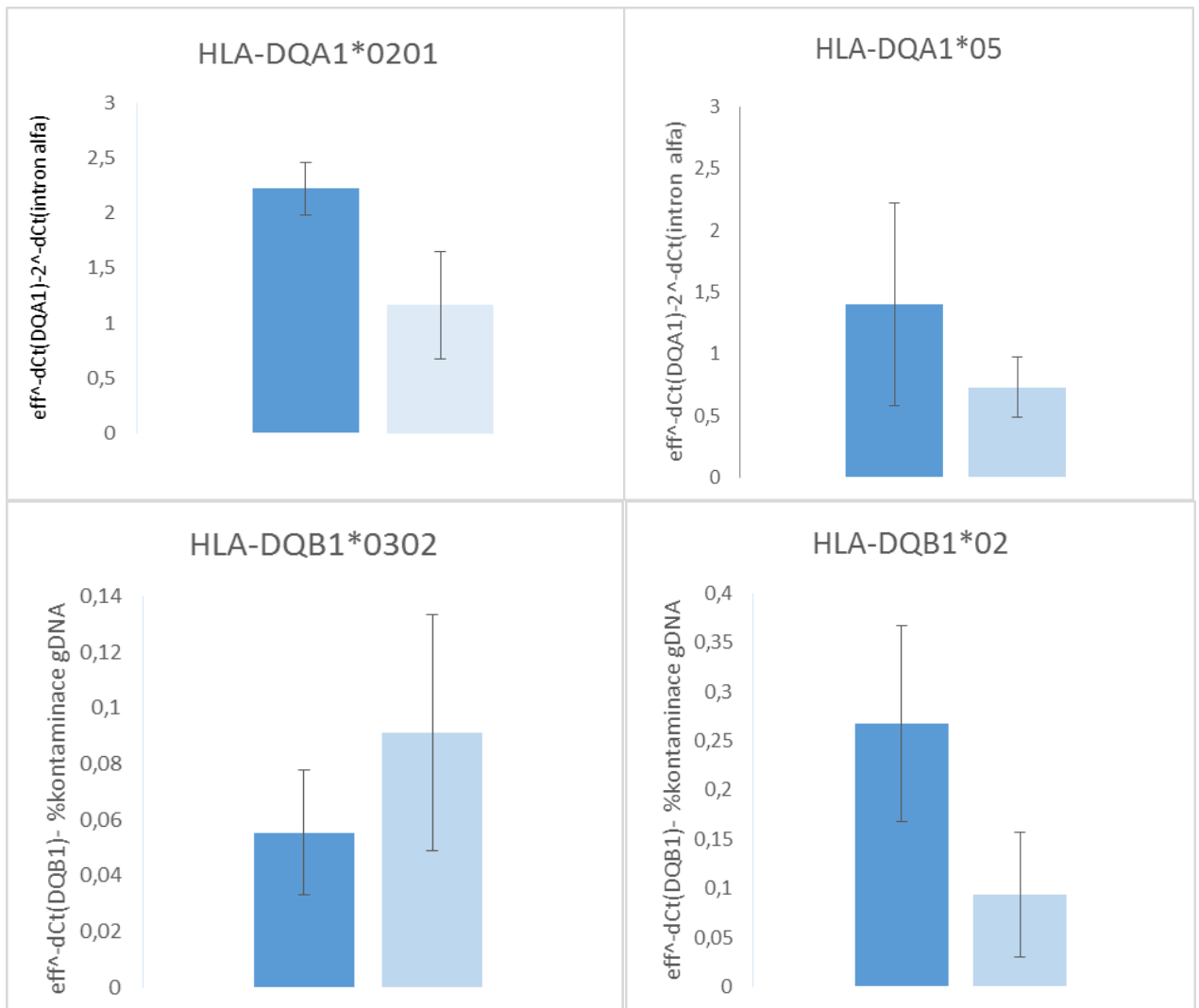
DQA1*05 pacienti (n = 3), zdraví jedinci (n = 13);

DQB1*02 pacienti (n = 4), zdraví jedinci (n = 13);

DQB1*03:02 pacienti (n = 2), zdraví jedinci (n = 3).

Na následujících grafech je zobrazena míra exprese jednotlivých alel u zdravých jedinců (HC) a celiaků (CD) (obr. 9). Z důvodů nízkého počtu jedinců s konkrétními haplotypy v této pilotní studii nebylo možné zhodnotit míru exprese mezi oběma sledovanými skupinami statisticky. Lze tedy s opatrností hovořit pouze o určitých trendech mezi skupinami. Pouze v případě DQB1*03:02 se zdá, že exprese alely bude vyšší u pacientů s celiakií; v ostatních případech je tomu naopak. Ve skupině pacientů pozorujeme tendence k téměř 2× nižší expresi alel DQA1*02:01 a DQA1*05 oproti zdravým, a k 2,9×

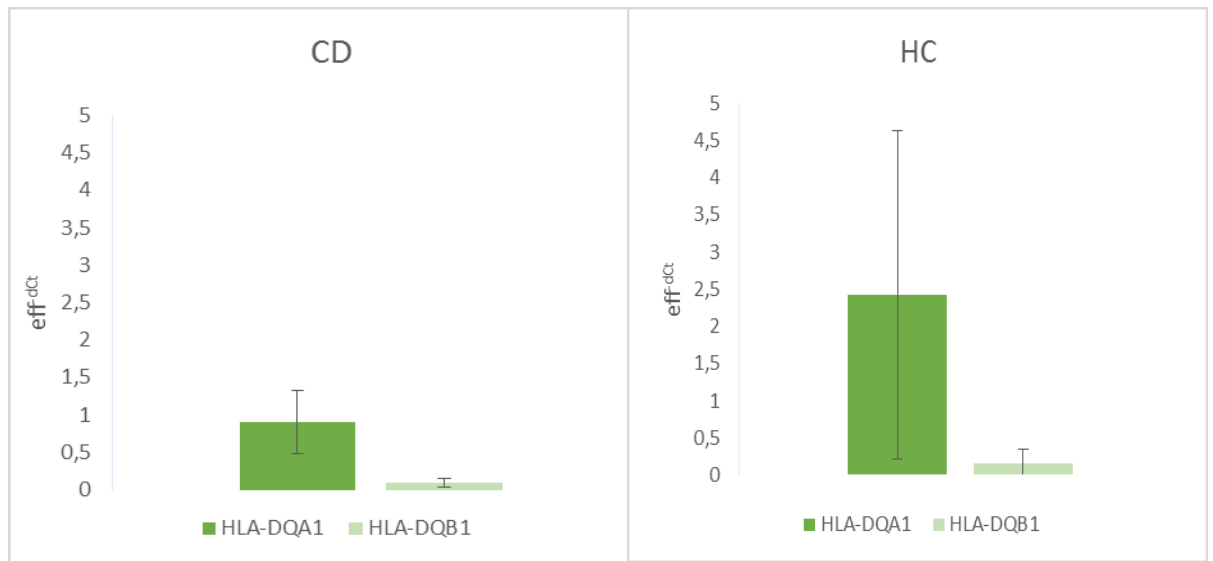
nižší expresi alel DQB1*02. Oproti tomu u alely DQB1*03:02 se zdá být exprese u pacientů s celiakií zvýšena. Ve skupině nemocných se nevyskytoval žádný vzorek s alelou DQA1*03:01, proto nebylo možné posoudit expresi této alely.



Obr. 9: Rozdíly expresí u zdravých kontrol a pacientů s celiakií (konec boxu značí průměr hodnot; chybová úsečka značí směrodatnou odchylku; tmavě modře – zdraví jedinci, světle modře - pacienti s celiakií). Počet jedinců zařazených do analýzy byl u skupiny DQA1*02:01 pacientů ($n = 2$), zdraví jedinci ($n = 6$); DQA1*05 pacienti ($n = 3$), zdraví jedinci ($n = 13$); DQB1*02 pacienti ($n = 4$), zdraví jedinci ($n = 13$); DQB1*03:02 pacienti ($n = 2$), zdraví jedinci ($n = 3$).

Na dalších grafech (obr. 10) je zdázorněna celková exprese DQA1 a DQB1 u pacientů a zdravých kontrol. Celková exprese DQA1 byla stanovena součtem a zprůměrováním Ct hodnot DQA1*05 a DQA1*02:01; stejně tak pro DQB1 (DQB1*02 a DQB1*03:02). V obou skupinách je exprese rizikových alel vyšší u DQA1. U pacientů

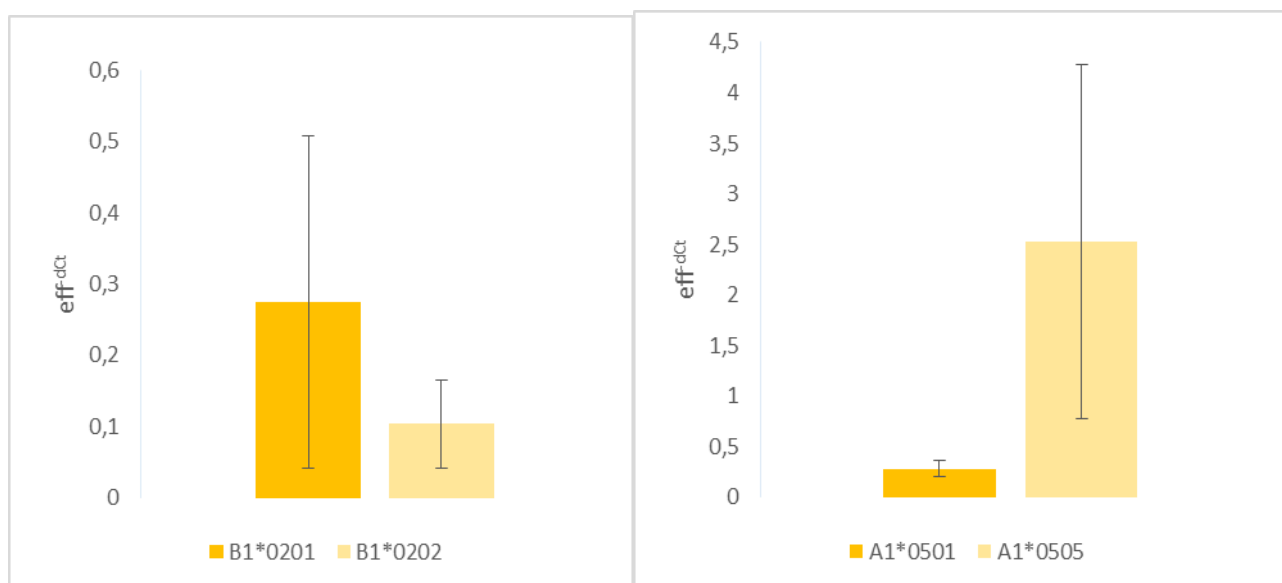
můžeme pozorovat statisticky významné, skoro 10násobné zvýšení exprese alel DQA1 ($p = 0,0092$) skoro 10násobné oproti expresi alel DQB1, u zdravých jedinců 15násobné ($p = 0,0015$). Za povšimnutí stojí také větší míra variability v expresi alel obou řetězců u zdravých jedinců, než jakou pozorujeme u nemocných. Při srovnání exprese alel DQA1 mezi skupinou pacientů a kontrol se exprese DQA1 jeví u celiaků jako 2,8× snížena, ale tento rozdíl. Není statisticky významný. U pacientů byla pozorována také (statisticky nevýznamně) nižší exprese alel DQB1 a to 1,7×.



Obr. 10: Celková exprese DQA1 a DQB1 u pacientů s celiakií (CD) a zdravých kontrol (HC; konec boxu značí průměr hodnot; chybová úsečka značí směrodatnou odchylku).

Počet jedinců ve skupinách byl pro pacienty: DQA1 $n = 5$; DQB1 $n = 6$; u zdravých jedinců byl počet pro DQA1 $n = 20$; DQB1 $n = 13$.

Dále jsme se pokusili vzájemně posoudit míru exprese obou alel DQA1*05, tedy DQA1*05:01 s DQA1*05:05, a míru exprese alel DQB1*02, tedy DQB1*02:01 s DQB1*02:02. Zhodnocení bylo provedeno na souboru zdravých jedinců, protože u celiaků genotypizace nedovolovala rozlišit tyto dvě varianty. U obou skupin alel se alely lišily pouze v jednonukleotidových polymorfismech, přesto míra exprese byla rozdílná. U alfa řetězce byla signifikantně vyšší exprese alely DQA1*05:05 a to 9× oproti DQA1*05:01 ($p = 0,042$). U beta řetězce byla exprese 2,7× vyšší u DQB1*02:01 oproti DQB1*02:02 ($p = 0,033$; znázorněno na obr. 11).



*Obr. 11: Srovnání exprese DQB1*02:01/02:02 a DQA1*05:01/05:05 u zdravých kontrol (konec boxu značí průměr hodnot; chybová úsečka značí směrodatnou odchylku) Počet jedinců ve skupinách byl: DQA1*05:01 $n = 5$; DQA1*05:05 $n = 5$; DQB1*02:01 $n = 6$; DQB1*02:02 $n = 5$.*

Analyzovali jsme míru exprese heterozygotů a homozygotů. K dispozici jsme měli pouze dva homozygoty DQA1*05 a jednoho DQB1*02. Úroveň exprese u homozygotů A1*05 byla 0,5654 a 0,6314 oproti průměrné expresi heterozygotů A1*05 1,4011 jeví se tedy snížena. To může být ale dáno velkou směrodatnou odchylkou, díky rozdílné expresi A1*0501 a A1*0505. Jediný homozygot pro B1*02 vykazoval expresi 1,5641. U heterozygotů byla průměrná exprese 0,2676. U homozygotů se tedy míra exprese zdá být 5,8× vyšší.

8. Diskuze

Celiakie patří mezi multifaktoriální onemocnění, na jehož rozvoj mají vliv genetické i negenetické faktory. Mnoho studií poukázalo na to, že hlavní podíl, co se týká genetických faktorů, mají HLA-DQ geny. Rizikovými haplotypy jsou HLA-DQ2 a HLA-DQ8, to znamená alely DQA1*05:01/05:05, DQA1*02:01 a DQA1*03:01 pro řetězec alfa a DQB1*02:01/02:02 a DQB1*03:02 pro řetězec beta, z nichž vznikají HLA molekuly na antigen prezentujících buňkách. Tento haplotyp má přibližně 20-30 % populace, přičemž pouze u 0,1-1 % se vyvine souhrou všech faktorů celiakie (Sollid et al., 1989; Trynka et al., 2010). Vycházeli jsme z výše uvedených závěrů a formulovali jsme pro tuto diplomovou práci hypotézu, že u pacientů s celiakií by mohla být vyšší exprese rizikových alel než u zdravých jedinců s tímto haplotypem. Mohlo by to tak být zejména proto, že pro vznik patogenní odpovědi T-lymfocytů existuje práh vyžadující určité množství komplexů HLA-peptid (Pisapia et al., 2016). Dále pak molekuly DQ2.5 a DQ8 váží přednostně negativně nabitě peptidy, tedy také peptidy deaminované tkáňovou transglutaminázou (van de Wal et al., 1996, 1997). V patogenezi onemocnění by tedy mohlo hrát roli množství molekul na povrchu APC.

Cílem práce bylo navrhnout fungující systém primerů a sond, který by sloužil k změření exprese rizikových alel pro celiakii. Chtěli jsme specificky odlišovat alely na vyšším stupni, než jak bylo doposud uvedeno v předchozích studiích (Fernandez, 2003; Ferstl et al., 2004, Selleski et al., 2015, Profaizer et al., 2011). Zároveň jsme z těchto prací nemohli vždy vycházet, protože od jejich vzniku byly nalezené další varianty alel, pro které nebyly publikované primery vhodné. Sekvence použité v publikacích Selleski et al. (2015) a Fernandez et al. (2011) byly převzaty zcela nebo částečně z publikace Olerup et al. (1993), jedná se tedy o sekvence navržené před 24 lety. Jen od června 2016 do června 2017 bylo objeveno a nově pojmenováno přibližně 500 alel HLA II. třídy (URL1). Takže k roku 2017 bylo objeveno 94 alel pro DQA1 a 1142 alel pro DQB1 (URL6). U DQA1*05:01/05:05 a DQB1*02:01/02:02 se vyskytuje polymorfismus v tak malé míře, že se nepodařilo navrhnout fungující systém specifický natolik, aby dokázal tyto formy odlišit a zároveň se nenavázal nespecificky i na jiná místa v genomu.

Diplomová práce byla zadána s navrhnout a otestovat systém, jenž by umožnil vysvětlit za pomoci měření exprese rizikových alel, proč jedinec se stejným haplotypem jaký má až 30% zdravé populace onemocní celiakií. Stanovením exprese rizikových alel u pacientů s celiakií a zdravých kontrol v našem testovacím souboru jsme zjistili, že ve většině případů se objevuje trend snížení exprese u pacientů oproti zdravým kontrolám. Je tomu tak u alel DQA*02:01 a DQA1*05, u nichž se exprese snížila 2× oproti kontrolám, u DQB1*02 pak byla tendence k 2,9× nižší expresi. Naopak exprese alely DQB1*03:02 jako jediné se zdála být u pacientů s celiakií vyšší. Ve srovnání celkové exprese rizikových DQA1 u pacientů a zdravých kontrol se exprese DQA1 jeví 2,8× vyšší u zdravých a u DQB1 byla také pozorována zvýšená exprese 1,7×, rozdíl ale není statisticky významný.

U pacientů můžeme pozorovat statisticky významné zvýšení exprese alel DQA1 skoro 10× oproti expresi alel DQB1 a u zdravých jedinců je exprese vyšší 15násobně.

Pokud by tyto předběžné výsledky odrážely skutečnost, což bude možné ověřit poze kvantifikací studovaných alel u několikrát většího souboru jedinců, byla by naše domněnka předpokládající zvýšenou expresi u pacientů s celiakií, je mylná. Vzhledem k tomu, že celiakie je zánětlivé onemocnění, je tedy spojené s vysokou produkcí INF- γ (Nilsen et al., 1998), u kterého je známo, že ovlivňuje expresi molekul HLA II. třídy na APC (Hillman et al., 1994), by se dalo předpokládat, že jen z tohoto hlediska by exprese u pacientů zvýšená být měla. Právě TNF- α , vyskytující se u zánětlivých onemocněních, sám o sobě nebo v kombinaci s IFN- γ může expresi HLA antigenů modifikovat (Maio et al., 1989). Bylo zjištěno, že TNF- α reversibilně zvyšuje INF- γ indukovanou expresi HLA genů na úrovni mRNA transkripce (Pfizenmaier et al., 1987). Tato zjištění však současné výsledky nepodporují.

V publikacích Kelly et al. (1988) a Scott et al. (1981) bylo poukázáno na zvýšenou expresi molekul HLA II. třídy u lézí neléčených pacientů s celiakií. Je možné, že zvýšení exprese HLA je tedy patrné pouze v místě lézí a není přítomno v periferní krvi, kterou jsme používali pro náš výzkum. To by mohlo být vysvětleno zjištěním, že tato nezvyklá exprese souvisí s densitou intraepiteliálních paměťových T-lymfocytů. Tyto buňky sekretují značné množství INF- γ a TNF- α (shrnuto v Beverley, 1991). Další studie, potvrzující, že u celiakie může docházet pouze k lokálnímu zvýšení exprese molekul HLA II. třídy, je studie Steinigera et al. (1989), která uvádí, že intravenózní infuze INF- γ potkanům způsobila do tří dnů zvýšenou expresi HLA molekul II. třídy v duodenu a na epitelu krypt. V naší studii nebyly u subjektů kvantifikovány sérové hladiny TNF- α ani IFN- γ , a proto jsme k závěru, že by mělo docházet alespoň k sekundárnímu zvýšení hladin exprese molekul HLA

působením TNF- α a IFN- γ , vycházeli pouze z publikovaných dat. Naše předpoklady se týkaly primárně zvýšené exprese HLA alel, takové která není vyvolána probíhajícím zánětem, ale bude vlastní každému jedinci. Míru exprese jedince by mohl ovlivnit například polymorfismus v promotorové oblasti nebo úroveň metylace regulačních oblastí, ovlivňující vazbu transkripčních faktorů. Metylace v proximální oblasti promotoru může ovlivňovat vazbu hlavních transkripčních faktorů, regulujících transkripci genů HLA-DQA1 (Majumder & Boss, 2011). Metylační variabilita v promotorech byla nalezena například u genu DQB1*03:02 (Toyoda et al., 1992) a u alely HLA DQA1*02:01 bylo objeveno, že je obecně méně exprimovaná než ostatní HLA-DQA1 alely. Zvýšená promotorová aktivita byla zjištěna u alely HLA-DQA1*03 (Britten et al., 2009).

Je možné, že zvýšená exprese se může týkat jiných HLA alel, které jsou se zájmovými rizikovými alelami v silné vazebné nerovnováze, a vyskytují se tedy společně u zdravých i nemocných jedinců. Pokud by se exprese u těchto dvou skupin lišila u DR3, DR7 nebo DR5 (Sollid et al., 1989), dalo by se tím vysvětlit, proč některý jedinec se stejným haplotypem onemocní celiakií a jiný je zdravý. Dalším důvodem, proč by se mohla u jedinců se stejným haplotypem, který je u velkého procenta zdravých jedinců, mohla vyvinout celiakie je, že konečným rizikovým faktorem by mohlo být environmentální prostředí (Karell et al., 2003).

Díky malému vzorku pacientů, kteří byli nakonec kvůli vysoké kontaminaci genomickou DNA zařazeni do analýzy, nelze ale vyvozovat přesnější závěry. Do výsledného zpracování byly zařazeny vzorky s procentem kontaminace nižším než 15 %, zbyly tedy 4 vzorky pro DQB1*02, 2 pro DQB1*03:02, 2 Pro DQA1*02:01 a 3 vzorky pro DQA1*05.

Je možné, že vyšší procento kontaminace bylo způsobeno pozdějším přepisem mRNA do cDNA, mRNA mohla tedy více zdegradovat. Nicméně velké procento kontaminace se objevilo i u vzorků, které byly izolovány nejpozději a ihned přepsány do cDNA. U zdravých dárců byl z důvodů větší kontaminace z analýzy vyřazen pouze jeden vzorek. Vzhledem k tomu, že při zpracování vzorků zdravých kontrol i celiaků byly použity stejné postupy, nemůžeme říct, jakým způsobem mohlo dojít k tak velkému počtu vzorků kontaminovaných větším procentem gDNA u pacientů.

DQA1*05:01 DQA1*05:05 jsou téměř identické, proto jsme analyzovali jejich míru exprese, zda se bude odlišovat. Podobný případ se vyskytuje u alel DQB1*02:01 a DQB1*02:02. U alfa řetězce byla signifikantně vyšší exprese alely DQA1*05:05 a to 9 \times , u DQB1 byla exprese 2,7 \times vyšší u DQB1*02:01 než u DQB1*02:02, což se také ukázalo

jako statisticky významné.

Riziko celiakie je výrazně zvýšeno u jedinců homozygotních pro DQ2.5 a DQ8. Jedinci, kteří jsou homozygotní pro DQB1*02, ale heterozygotní pro DQA1*05, mají také zvýšené riziko rozvoje celiakie (Ploski et al., 1993). Očekávali jsme tedy zvýšenou expresi u homozygotů, už jen z hlediska dávky genu, nicméně se zdá, že je podobná exprese molekuly DQ2.5 na povrchu buněk u homozygotů i heterozygotů (Pisapia et al., 2016). Exprese u homozygotů A1*05 se jevila oproti průměrné expresi heterozygotů A1*05 snížena. Jediný homozygot pro B1*02 vykazoval expresi 5,8× vyšší než byla průměrná exprese heterozygotů. Selleski et al. (2015) zjistili, že jejich systém, ze kterého jsme při návrhu primerů pro DQB1*02 vycházeli, není schopen určit homozygoty pro DQB1*02. Nicméně náš navržený systém je s nově designovanou sondou, zatímco v jejich studii byl použit SYRB Green. Náš systém by mohl být tedy citlivější a zachytit rozdíl v expresi mezi heterozygoty a homozygoty pro tuto konkrétní alelu. Na základě jedno vzorku ovšem toto nelze relevantně zhodnotit. Ve studii z roku 2003 (Fernandez, 2003) nebyl zjištěn rozdíl v expresi u homozygotů a heterozygotů. Jelikož se zdá, že exprese u homozygotů není zvýšená, nelze tímto vysvětlit vyšší riziko rozvoje celiakie pro jedince homozygotní pro DQB*02 a DQA*05 (Vader et al., 2003).

V současné době probíhá sběr dalších vzorků, který by mohl tuto pilotní studium posunout a rozdílné tendence, které jsme v expresi mezi skupinami objevili, by se mohly ověřit i za použití statistických analýz.

Hlubší znalosti o expresi rizikových HLA-DQ alel, by mohly objasnit, proč se u některých jedinců s rizikovým haplotypem celiakie rozvine a u mnoha dalších se toto onemocnění celý život neprojeví.

9. Závěr.

V rámci této diplomové práce byl navržen systém primerů a sond pro QPCR, který umožňuje měřit expresi vybraných kandidátních genů zodpovědných za vznik celiakie. Jsou to geny haplotypů HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Systém, který by rozlišoval alely HLA až na úroveň HLA-DQA1*05:01/05:05 a HLA-DAB1*02:01/02:02 se nepodařilo za současných znalostí navrhnout. Bylo navrženo 6 primerů a 2 sondy pro HLA-DQA1 (DQA1*05, DQA1*02:01, DQA1*03:01) a 4 primery a 2 sondy pro HLA-DQB1 (DQB1*02, DQB1*03:02). Dále byl navržen systém do intronové oblasti HLA-DQA1, který umožňuje zjistit procentuální zastoupení kontaminace gDNA ve vzorku.

Tento systém byl optimalizován a verifikován na pilotním souboru zdravých jedinců a pacientů s celiakií. Přesto, že vzhledem k počtu jedinců v jednotlivých, haplotypem podmíněných skupinách nelze v některých případech činit statisticky podpořené závěry, bylo pozorováno několik skutečností:

- Zdá se, že exprese rizikových alel je u pacientů s neléčenou celiakií odlišná v porovnání s mírou exprese u zdravých jedinců. Povaha změny (nárůst × snížení) je alelově specifická.
- Celková exprese rizikových alel DQA1 je bez ohledu na onemocnění vyšší než celková exprese DQB1 rizikových alel.
- Exprese DQA1*05:05 je oproti DQA1*05:01 signifikantně vyšší. Rozdílná míra exprese je zjištěna i u alel DQB1*02, kdy vyšší exprese je u alely DQB1*02:01.
- Míra exprese alely DQA1*05 homozygotů je oproti průměrné expresi heterozygotů snížena, zatímco u DQB1*02 se jeví exprese oproti heterozygotům zvýšena.

10. Seznam zkratek

A	adenin
Anti-TG2	protilátky proti transglutamináze 2
APC	antigen prezentující buňky
B2M	beta2 mikroglobulin
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
bp	páry bází
C	cytosin
CD	celiakie
CD94/NK62C	diferenciační antigen 94
cDNA	komplementární deoxyribonukleotidová kyselina
CLIP	invariantní peptidový řetězec asociovaný s HLA II. třídy
Ct	prahový cyklus (treshold cycle)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EMA	anti-endomysialní protilátky
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie
G	guanosin
gDNA	genomická deoxyribonukleová kyselina
GOI	gen zájmu (gen of interest)
HC	zdravá kontrola
HK	endogenní kontrola
HLA	lidské leukocytární antigeny
IL	interleukin
INF γ	interferon gama
Mg ²⁺	hořečnatý kationt
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MIC	MHC-class I related chain
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
N ₀	výchozí počet molekul
NaCl	chlorid sodný
N _c	počet molekul po C cyklech

NEP	normalizovaný expresní profil
NK	natural killer
NKG2D	NK buňky aktivující receptor typu 2D
PBMC	periferní mononukleární buňky
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PGK1	fosfoglycerát kináza 1
PIPB	peptidylpropyl izomeráza B
QPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleotidová kyselina
RT PCR	reverznětranskriptázová polymerázová řetězová reakce
SDS	dodecylsírán sodný
T	thymín
Ta	anelační teplota
TAMRA	carboxytetramethylrhodamine
TBE	trisborátový pufr
TG2	transglutamináza 2
TLR	toll-like receptor
TM	transmembránová část
Tm	teplota tání
TNF	faktor nádorové nekrózy
WCLB	buffer pro lýzu bílých krvinek

11. Seznam literatury

- Aaltonen, K., Laurikka, P., Huhtala, H., Mäki, M., Kaukinen, K., Kurppa, K. (2017). The Long-Term Consumption of Oats in Celiac Disease Patients Is Safe: A Large Cross-Sectional Study. *Nutrients*, 9(6), 611.
- Alaedini, A., & Green, P. H. R. (2005). Narrative Review: Celiac Disease: Understanding a Complex Autoimmune Disorder. *Annals of Internal Medicine*, 142, 289–298.
- Araya, M., Mondragón, A., Pérez-Bravo, F., Roessler JL., Alarcón T., Rios G., Bergenfreid C. (2000). Celiac disease in a Chilean population carrying Amerindian traits. *Journal of Pediatric gastroenterology and nutrition*, 31(4), 381-386.
- Arentz-Hansen, E. H., McAdam, S. N., Molberg, O., Kristiansen, C., & Sollid, L. M. (2000). Production of a panel of recombinant gliadins for the characterisation of T cell reactivity in coeliac disease. *Gut*, 46(1), 46–51.
- Arentz-Hansen, E. H., McAdam, S. N., Molberg, O., Kristiansen, C., Sollid, L. M. (2000). Production of a panel of recombinant gliadins for the characterisation of T cell reactivity in coeliac disease. *Gut*, 46(1), 46–51.
- Aslanzadeh, J. (2004). Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 34(4), 389-96.
- Babbitt, B., Allen, P., Matsueda, G., & Haber, E. (1985). Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature*, 317(6035), 359-61.
- Berg, L., Frank, G., & Davis, M. (1990). The effects of MHC gene dosage and allelic variation on T cell receptor selection. *Cell*, 60(6), 1043–1053.
- Bergseng, E., Dørum, S., Arntzen, M. Ø., Nielsen, M., Nygård, S., Buus, S., de Souza, GA., Sollid, L. M. (2015). Different binding motifs of the celiac disease-associated HLA molecules DQ2.5, DQ2.2, and DQ7.5 revealed by relative quantitative proteomics of endogenous peptide repertoires. *Immunogenetics*, 67(2), 73–84.
- Bermingham, N., & Luetlich, K. (2003). Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology*, 9(3), 159-164.
- Betuel, H., Gebuhrer, L., Descos, L., Percebois, H., Minaire, Y., Bertrand, J. (2008). Adult Celiac Disease Associated with HLA-DRw3 and -DRw7. *Tissue Antigens*, 15(3), 231–238.
- Beverly, P. (1991). Immunological memory in T cells. *Current Opinion in Immunology*, 3(3), 355–360.
- Breslauer, K., Frank, R., & Blöcker, H. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 3746-50.
- Briani, C., Samaroo, D., & Alaedini, A. (2008). Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 7(8), 644–650.
- Britten, A. C., Mijovic, C. H., Barnett, A. H., & Kelly, M. A. (2009). Differential expression of

- HLA-DQ alleles in peripheral blood mononuclear cells: alleles associated with susceptibility to and protection from autoimmune type 1 diabetes. *International Journal of Immunogenetics*, 36(1), 47–57.
- Brown, J., Jardetzky, T., Gorga, J., Stern, L., Urban, R. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 364(6432), 33-39.
- Bustin, S. (2004). AZ of quantitative PCR. *Internacional University Line 2004.IUL biotechnology series*, 5.
- Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A., & Corazza, G. R. (2005). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 140(3), 408–416.
- Černá, M. (2008). Genetics of autoimmune diabetes mellitus. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 158(1–2), 2–12.
- DeMarchi, M., Borelli, I., Olivetti, E., Richiardi, P., Wright, P., Ansaldi, N., Barbera, C., Santini, B. (2008). Two HLA-D and DR Alleles are Associated with Coeliac Disease. *Tissue Antigens*, 14(4), 309–316.
- Di Sabatino, A., & Corazza, G. R. (2009). Coeliac disease. *The Lancet*, 373(9673), 1480–1493.
- Didenko, V. V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *BioTechniques*, 31(5), 1106–16, 1118, 1120–1.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR methods and applications*, 3(3), 30-37.
- Dorak, M. (2007). Real-time PCR. *New York: Taylor and Francis*, 2007.
- Dowd, B., & Walker-Smith, J. (1974). Samuel Gee, Aretaeus, and the coeliac affection. *British Medical Journal*, 2(5909), 45–7.
- Dubois, P., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, GA., Adány, R., Aromaa, A., Bardella, MT., van de Berg, LH., Bockett, NA., de la Concha, EG, Dema, B., Fermann RS., Fernandez-Arquero, M., Fiatal, S., Gradone, E., Green, PM., Groen, HJ., Gwilliam, R., Houwen, RH., Hunt, SE., Kaukinen, K., Kelleher, D., Korponay-Szabo, I., Kurppa, K., MacMathuna, P., Maki, M., Mazzilli, MC., McCann, OT., Maerin, ML., Mein, CA, Mirza, MM., Mistry, V., Mora, B., Morley, Ki., Mulder, CJ., Murray, JA., Núñez, C., Oosterom, E., Ophoff, RA., Polanco, I., Peltonen, L., Plateel, M., Rybak, A., Salomaa, V., Schweizer, JJ., Sperandeo, MP., Tack, GJ., Turner, G., Veldink, JH., Verbeek, WH, Weersma, RK., Wolters, VM., Urcelay, E., Cukrowska, B., Greco, L., Neuhausen, SL., McManus, R., Barisani, D., Barrett, C., Saavalainen, P., Wijmenga, C., van Heel, DA. (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature Genetics*, 295-302.
- Eisenberg, E., & Levanon, E. (2003). Human housekeeping genes are compact. *Trends in Genetics*, 19(7), 362-365.
- Esposito, C., Paparo, F., Caputo, I., Rossi, M., Maglio, M., Sblattero, D., Not, T., Porta, R., Auricchio, S., Marzari, R., Troncone, R. (2002). Anti-tissue transglutaminase antibodies from coeliac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. *Gut*, 51, 177–181.

- Falchuk, Z. M., Rogentine, G. N., & Strober, W. (1972). Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 51(6), 1602–5.
- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanović, S., Jung, G., Rammensee, H. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351(6324), 290-296.
- Falkenberg, V., Whistler, T., Murray, R., Unger, E., Rajeevan, S. (2011). Identification of Phosphoglycerate Kinase 1 (PGK1) as a reference gene for quantitative gene expression measurements in human blood RNA. *BMC Research Notes*, 4(1), 324-31.
- Fernandez, S. (2003). Relative quantification of HLA-DRA1 and -DQA1 expression by real-time reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT – PCR). *European journal of immunogenetics*, 30(2), 141–148.
- Ferstl, B., Zacher, T., Lauer, B., Blagitko-Dorfs, N., Carl, A., Wassmuth, R. (2004). Allele-specific quantification of HLA-DQB1 gene expression by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Genes and Immunity*, 5, 405–416.
- Fleckenstein, B., Qiao, S.-W., Larsen, M. R., Jung, G., Roepstorff, P., Sollid, L. M. (2004). Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17607–16.
- Freier, S., Kierzek, R., Jaeger, J., Sugimoto, N., Caruthers, MH., Neilson, T., Turner, DH. (1986). Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America*, 83(24), 9373-7.
- Gidrewicz, D., Potter, K., Trevenen, C. L., Lyon, M., Butzner, J. D. (2015). Evaluation of the ESPGHAN Celiac Guidelines in a North American Pediatric Population. *The American Journal of Gastroenterology*, 110(5), 760–767.
- Ginzinger, D. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6), 503-512.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25(4), 386-401.
- Godkin, A., Friede, T., Davenport, M., Stevanovic, S., Willis, A., Jewel, D., Hill, A., Rammensee, HG. (1997). Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ 3.2). *International immunology*, 9(6), 905-11.
- Goh, V. L., & Werlin, S. L. (2011). Discovery of gluten as the injurious component in celiac disease. *Nutrition in Clinical Practice : Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 26(2), 160–2.
- Green, P. H. R., & Cellier, C. (2007). Celiac Disease. *New England Journal of Medicine*, 357(17), 1731–1743.

- Green, P. H. R., Stavropoulos, S. N., Panagi, S. G., Goldstein, S. L., McMahon, D. J., Absan, H., Neugut, A. I. (2001). Characteristics of Adult Celiac Disease in the USA: Results of a National Survey. *The American Journal of Gastroenterology*, 96(1), 126-131.
- Gutierrez-Achury, J., Zhernakova, A., Pulit, S., Trynka, G., Hunt, K.A., Romanos, J., Raychaudhuri, S., van Heel, D.A., Wijmenga, C., de Bakker, P.I. (2015). Fine mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease. *Nature genetics*, 47(6), 577-578.
- Halttunen, T., & Mäki, M. (1999). Serum immunoglobulin a from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology*, 116(3), 566-572.
- Heap, G. A., & van Heel, D. A. (2009). Genetics and pathogenesis of coeliac disease. *Seminars in Immunology*, 21(6), 346-354.
- Hillman, G. G., Puri, R. K., Kukuruga, M.A., Pontes, J., Haas, G. (1994). Growth and major histocompatibility antigen expression regulation by IL-4, interferon-gamma (INF-gamma) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) on human renal cell carcinoma. *Clinical and experimental immunology*, 96(3), 476-483.
- Högberg, L., Laurin, P., Fälth-Magnusson, K., Grant, C., Grodzinsky, E., Jansson, G., Ascher, H., Browaldh, L., Hammersjö, A., Lindberg, E., Myrdal, U., Stenhammar, L. (2004). Oats to children with newly diagnosed coeliac disease: a randomised double blind study. *Gut*, 53(5), 649-54.
- Holland, P., Abramson, R., Watson, R., Gelfand, D. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 7276-80.
- Holmes, G. K. T., Forsyth, J. M., Knowles, S., Seddon, H., Hill, P. G., Austin, A. S. (2017). Coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 29(6), 640-645.
- Hourigan, C. S. (2006). The molecular basis of coeliac disease. *Clinical and Experimental Medicine*, 6(2), 53-59.
- Hunt, D. F., Henderson, R. A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A., Appella, E., Engelhard, V. H. (2007). Pillars article: Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Journal of Immunology*, 179(5), 2669-71.
- Hunt, K. A., Zhernakova, A., Turner, G., Heap, G. A. R., Franke, L., Bruinenberg, M., Romanos, J., Dinesen, L., Ryan, A., Panesar, D., Gwilliam, R., Takeuchi, F., McLaren, W., Holmes, G., Howdill, P., Walters, J., Sanders, D., Playford, R., Trynka, G., Mulder, C., Mearin, M., Verbeek, W., Trimble, V., Stevens, F., O'Morain, C., Kennedy, N., Kelleher, D., Pennington, D., Strachan, D., McArdle, W., Mein, C., Wapenaar, M., Deloukas, P., McGinnis, R., McManus, R., Wijmenga, C., van Heel, D. A. (2008). Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nature Genetics*, 40(4), 395-402.
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Mearin, M. L., Phillips, A., Shamir, R., Trocena, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., Lelgeman, M., Maki, M., Ribes-Koninckx, C., Ventura, A., Zimmer, K., European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. (2012). European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and*

- Nutrition*, 54(1), 136–160.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D., Raymond, J., Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids research*, 20(7), 1717-23.
- Ivarsson, A., Hernell, O., Stenlund, H., Persson, L. A. (2002). Breast-feeding protects against celiac disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5), 914–21.
- Jabri, B., Jabri, B., Kasarda, D. D., Kasarda, D. D., Green, P. H. R., Green, P. H. R. (2005). Innate and adaptive immunity: the yin and yang of celiac disease. *Immunological Reviews*, 206, 219–31.
- Janatuinen, E. K., Pikkarainen, P. H., Kemppainen, T. A., Kosma, V.-M., Järvinen, R. M. K., Uusitupa, M. I. J., & Julkunen, R. J. K. (1995). A Comparison of Diets with and without Oats in Adults with Celiac Disease. *New England Journal of Medicine*, 333(16), 1033–1037.
- Johansen, B. H., Vartdal, F., Eriksen, J. A., Thorsby, E., & Sollid, L. M. (1996). Identification of a putative motif for binding of peptides to HLA-DQ2. *International Immunology*, 8(2), 177–182.
- Kagnoff, M. F., Kagnoff, M. F., Green, P. H., Rostom, A., Serre, N. P.-M. De, Cellier, C., Siegel, M. (2007). Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 41–9.
- Kaltenboeck, B., & Wang, C. (2005). Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Advances in Clinical Chemistry*, 40, 219-59.
- Kappler, J. W., Wade, T., White, J., Kushnir, E., Blackman, M., Bill, J., Roehm, N., Marrack, P. (1987). A T cell receptor V β segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell*, 49(2), 263–271.
- Karell, K., Louka, A. S., Moodie, S. J., Ascher, H., Clot, F., Greco, L., Ciclitira, P., Solid, L., Partanen, J. (2003). HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1 *05-DQB1 *02 (DQ2) heterodimer: Results from the European genetics cluster on celiac disease. *Human Immunology*, 64(4), 469–477.
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 131.
- Kaukinen, K., Peraaho, M., Lindfors, K., Partanen, J., Woolley, N., Pikkarainen, P., Karvonen, A., Laasanen, T., Sievanen, H., Maki, M., Collin, P. (2007). Persistent small bowel mucosal villous atrophy without symptoms in coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 25(10), 1237–1245.
- Keuning, J. J., Peña, A. S., Van Hooff, J. P., Van Leeuwen, A., & Van Rood, J. J. (1976). HLA-DW3 associated with coeliac disease. *The Lancet*, 307(7958), 506–508.
- Klein, J. (1986). Natural history of the major histocompatibility complex. New York. *John Wiley and Sons*, 1988.
- Kwok, S., Kellogg, D., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J. (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human

- immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids research*, 18(4), 999-1005.
- Kwok, W. W., Domeier, M. E., Johnson, M. L., Nepom, G. T., Koelle, D. M. (1996). HLA-DQB1 codon 57 is critical for peptide binding and recognition. *Journal of Experimental Medicine*, 183(3) 1253-8.
- Lee, S. K., Lo, W., Memeo, L., Rotterdam, H., Green, P. H. R. (2003). Duodenal histology in patients with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Gastrointestinal Endoscopy*, 57(2), 187–191.
- Leutenegger, C., Mislin, C., Sigrist, B., Ehrenguber, M., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H. (1999). Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71 (3-4), 291-305.
- Liang, P., & Pardee, A. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257 (5072), 967-71.
- Logan, J., Edwards, K., Saunders, N., (2009). Real-time PCR. Current Technology and Application. Norfolk, UK: *Caister Academic Press* 2009.
- Louka, A. S., & Sollid, L. M. (2003). HLA in coeliac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens*, 61(2), 105–117.
- Mackay, I. R., Rosen, F. S., Klein, J., Sato, A. (2000). The HLA System. *New England Journal of Medicine*, 343(10), 702–709.
- Maio, M., Gulwani, B., Morgano, A., Ferrone, S. (1989). Differential modulation by tumor necrosis factor and immune interferon of HLA class-II antigens expressed by melanoma cells. *International Journal of Cancer*, 44(3), 554–559.
- Majumder, P., & Boss, J. M. (2011). DNA methylation dysregulates and silences the HLA-DQ locus by altering chromatin architecture. *Genes and Immunity*, 12(4), 291–299.
- Marsh, M. N. (1992). Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. *Gastroenterology*, 102(1), 330–354.
- Matysiak-Budnik, T., Candalh, C., Dugave, C., Namane, A., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M. (2003). Alterations of the Intestinal Transport and Processing of Gliadin Peptides in Celiac Disease. *Gastroenterology*, 125 (3), 696-707.
- McPherson, M., & Møller, S. (2000). PCR. New York: *Taylor & Francis*, 2000, 71-222.
- Mearin, M., Biemond, I., Pena, A., Polanco, I., Vazquez, C. (1983). HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease. *Gut*, 24 (6), 532-7.
- Megiorni, F., Mora, B., Bonamico, M., Barbato, M., Nenna, R., Maiella, G., Lulli, P., Mazzilli, M. C. (2009). HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Human Immunology*, 70(1), 55–59.
- Mehra, N. K., & Kaur, G. (2003). MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(7), 1–17.
- Meksem, K., Ruben, E., Hyten, D., Schmidt, M., Lightfoot, D. (2001). High-throughput genotyping

- for a polymorphism linked to soybean cyst nematode resistance gene Rhg4 by using Taqman™ probes. *Molecular Breeding*, 7 (1), 63-71.
- Molberg, Ø., Kett, K., Scott, H., Thorsby, E., Sollid L., Lundin, K. (1997). Gliadin Specific, HLA DQ2-Restricted T Cells are Commonly Found in Small Intestinal Biopsies from Coeliac Disease Patients, but not from Controls. *Scandinavian journal of immunology*, 46 (3), 103-9.
- Mullis, K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262 (4), 64-5.
- Nikulina, M., Habich, C., Flohé, S. B., Scott, F. W., Kolb, H. (2004). Wheat Gluten Causes Dendritic Cell Maturation and Chemokine Secretion. *The Journal of Immunology*, 173(3), 1925-33.
- Nilsen, E. M., Jahnsen, F. L., Lundin, K. E. A., Johansen, F., Fausa, O., Sollid, L. M., Jahnsen, J., Scott, H., Brandtzaeg, P. (1998). Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology*, 115(3), 551–563.
- Nolan, T., Hands, R., Bustin, S. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3), 1559-1582.
- Olerup, O., Aldener, A., & Fogdell, A. (1993). HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*, 41(3), 119–134.
- Paul, S. P., Harries, S. L., & Basude, D. (2017). Barriers to implementing the revised ESPGHAN guidelines for coeliac disease in children: a cross-sectional survey of coeliac screen reporting in laboratories in England. *Archives of Disease in Childhood*, 102 (10), 942-946.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45.
- Pfizenmaier, K., Scheurich, P., Schlüter, C., Kroken, M. (1987). Tumor necrosis factor enhances HLA-A, B, C and HLA-DR gene expression in human tumor cells. *The Journal of immunology*, 138(3), 975-80.
- Pietzak, M. M., Schofield, T. C., McGinniss, M. J., Nakamura, R. M. (2009). Stratifying Risk for Celiac Disease in a Large At-Risk United States Population by Using HLA Alleles. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(9), 966–971.
- Pisapia, L., Camarca, A., Picascia, S., Bassi, V., Barba, P., Del Pozzo, G., Gianfrani, C. (2016). HLA-DQ2.5 genes associated with celiac disease risk are preferentially expressed with respect to non-predisposing HLA genes: Implication for anti-gluten T cell response. *Journal of Autoimmunity*, 70, 63–72.
- Ploski, R., Ek, J., Thorsby, E., & Sollid, L. M. (1993). On the HLA-DQ(α 1*0501, β 1*0201)-associated susceptibility in celiac disease: A possible gene dosage effect of *DQB1*0201*. *Tissue Antigens*, 41(4), 173–177.
- Profaizer, T., Eckels, D., & Delgado, J. C. (2011). Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. *Tissue Antigens*, 78(1), 31–37.

- Reeves, G., Squance, M., Duggan, A., Murugasu, R., Wilson, R., Wong, R., Gibson, R., Steele, R., Pollock, W., the Multicentere Cooliac Study Group. (2006). Diagnostic accuracy of coeliac serological tests: a prospective study. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18(5), 493–501.
- Ribes-Koninckx, C., Mearin, M., Korponay-Szabó, I., Shamir, R., Husby, S., Ventura, A., Branski, D., Catassi, C., Koletzko, S., Maki, M., Trocone, R., Zimmer, K. (2012). Coeliac Disease Diagnosis: ESPGAN 1990 criteria or need for a change? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(1), 15–19.
- Risch, N. (1987). Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *American Journal of Human Genetics*, 40(1), 1–14.
- Robinson, J., Malik, A., Parham, P., Bodmer, J., Marsh, S. (2000). IMGT/HLA database - a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue antigens*, 55(3), 280-287.
- Rostami, K. (1999). Sensitivity of antiendomysium and antigliadin antibodies in untreated celiac disease: disappointing in clinical practice. *The American Journal of Gastroenterology*, 94(4), 888–894.
- Rostom, A., Murray, J. A., & Kagnoff, M. F. (2006). American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technical Review on the Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology*, 131(6), 1981–2002.
- Rychlik, W., Spencer, W., & Rhoads, R. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6409-12.
- Říhová, A. (2015). Epigenetická regulace genů pro HLA II. třídy ve vztahu ke stárnutí organismu. *Praha, 2015. Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie. Vedoucí práce: Kotrbová-Kozak, Anna Katarzyna.
- Selleski, N., Almeida, L. M., Almeida, F. C. de, Gandolfi, L., Pratesi, R., Nóbrega, Y. K. de M. (2015). Simplifying celiac disease predisposing HLA-DQ alleles determination by the Real Time PCR method. *Arquivos de Gastroenterologia*, 52(2), 143–146.
- Schmittgen, T., & Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Schuppan, D., Esslinger, B., & Dieterich, W. (2003). Innate immunity and coeliac disease. *The Lancet*, 362, 3-4.
- Sjostrom, H., Lundin, K., Molberg, O., Korner, R., Mcadam, S., Anthonsen, D., Quarsten, H., Norén, O., Roepstorff, P., Thorsby, E., Sollid, L. (1998). Identification of a Gliadin T-Cell Epitope in Coeliac Disease: General Importance of Gliadin Deamidation for Intestinal T-Cell Recognition. *Scandinavian Journal of Immunology*, 48(2), 111–115.
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6–20.
- Solheim, B. G., Albrechtsen, D., Thorsby, E., Thune, P. (2008). Strong Association between an HLA-Dw3 Associated B Cell Alloantigen and Dermatitis Herpetiformis. *Tissue Antigens*, 10(2), 114–118.

- Sollid, L. M., Markussen, G., Ek, J., Gjerde, H., Vartdal, F., Thorsby, E. (1989). Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *Journal of Experimental Medicine*, 169(1), 345-50.
- Sollid, L. M., & Thorsby, E. (1993). HLA susceptibility genes in celiac disease: Genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology*, 105(3), 910-922.
- Spurkland, A., Sollid, L. M., Polanco, I., Vartdal, F., Thorsby, E. (1992). HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 or non-DR5/7. *Human Immunology*, 35(3), 188-192.
- Stene, L. C., Honeyman, M. C., Hoffenberg, E. J., Haas, J. E., Sokol, R. J., Emery, L., Taki, I., Norris, J., Erlich H., Eisenbarth, G., Rewers, M. (2006). Rotavirus Infection Frequency and Risk of Celiac Disease Autoimmunity in Early Childhood: A Longitudinal Study. *American Journal of Gastroenterology*, 101(10), 2333-2340.
- Stern, L., Brown, J., Jardetzky, T., Gorga, J., Urban, R., Strominger, J., Wiley, D. (1994). Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, 368(6468), 215-221.
- Stern, M., Ciclitira, P., van Eckert, R., Feighery, C., Janssen, F., Mendez, E., Mothes, T., Trocone, R., Wieser, H. (2001). Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatolog*, 13(6), 741-747.
- Stokes, P., Holmes, G., Asquith, P., Mackintosh, P., Cooke, W. (1972). Histocompatibility antigens associated with adult coeliac disease. *The Lancet*, 2 (7769), 162-164.
- Sulkanen, S., Halttunen, T., Laurila, K., Kolho, K.-L., Korponay-Szabó, I. R., Sarnesto, A., Savilahti, E., Colin, P., Mäki, M. (1998). Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*, 115(6), 1322-1328.
- Tighe, M. R., Hall, M. A., Ashkenazi, A., Siegler, E., Lanchbury, J. S., Ciclitira, P. J. (1993). Celiac disease among Ashkenazi Jews from Israel. *Human Immunology*, 38(4), 270-276.
- Tollefsen, S., Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Molberg, O., Ráki, M., Kwok, W. W., Jung, G., Lundin, K., Sollid, L. M. (2006). HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(8), 2226-36.
- Tosi, R., Vismara, D., Tanigaki, N., Ferrara, G., Cicimarra, F., Buffolano, W., Follo, D., Auricchio, S. (1983). Evidence that celiac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity. *Clinical Immunology and immunopathology*, 28(3), 395-404.
- Toyoda, H., Redford, A., Magalong, D. (1992). Allele-specific methylation in the 5'-regulatory region of class II DQ beta genes in human major histocompatibility complex (MHC): relationship to autoimmune disease susceptibility. *Disease markers*, 10(1), 7-18.
- Trabace, S., Giunta, A., Rosso, M., Marzorati, D., Cascino, I., Tettamanti, A., Mazzilli, M., Gandini, E. (1984). HLA-ABC and DR Antigens in Celiac Disease. *Vox Sanguinis*, 46(2), 102-106.
- Trynka, G., Hunt, K., Bockett, N., Romanos, J., Mistry, V., Szperl, A., Bakker, S., Bardella, M., Bhaw-Rosun, L., Castillejo, G., de la Concha, E., dse Almeida, R., Dias, K., van Diemen, C., Dubois, P., Duerr, R., Edkins, S., Franke, L., Fransen, K., Gutierrez, J., Heap, G., Hrdlickova,

- B., Hunt, S., Plaza Izurieta, L., Izzo, V., Joosten, L., Langford, C., Mazzilli, M., Mein, C., Midah, V., Mitrovic, M., Mora, B., Morelli, M., Nutland, S., Núñez, C., Onengut-Gumuscu, S., Pearce, K., Plateel, M., Polanco, I., Potter, S., Ribes-Koninckx, C., Ricano-Ponce, I., Rich, S., Rybak, A., Santiago, J., Senapati, S., Sood, A., Szajewska, H., Troncone, R., Varadé, J., Wallace, C., Wolters, V., Zhernakova, A., Thelma, B., Cukrowska, B., Urcelay, E., Bilbao, J., Mearin, M., Barisani, D., Barrett, J., Plagnol, V., Deloukas, P., Wijmenga, C., van Heel, D. (2011). Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nature genetics*, 43(12), 1193-1201.
- Trynka, G., Wijmenga, C., & Heel, D. van. (2010). A genetic perspective on coeliac disease. *Trends in Molecular Medicine*, 16(11), 537-50.
- Tye-Din, J., & Anderson, R. (2008). Immunopathogenesis of celiac disease. *Current Gastroenterology Reports*, 10(5), 458–465.
- Vader, W., Stepniak, D., Kooy, Y., Mearin, L., Thompson, A., van Rood, J. J., Spaenji, A., Koning, F. (2003). The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12390–12395.
- van de Wal, Y., Kooy, Y., van Veelen, P., Vader, W., August, S., Drijfhout, J. W., Pena, S., Koning, F. (1999). Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *European Journal of Immunology*, 29, 3133–3139.
- VanGuilder, H., Vrana, K., & Freeman, W. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5), 619-626.
- Vartdal, F., Johansen, B., Friede, T., Thorpe, C., Stevanovic, S., Eriksen, J., Sletten, K., Thorsby, E., Rammensee, H., Sollid, L., (1996). The peptide binding motif of the disease associated HLA-DQ ($\alpha 1^* 0501$, $\beta 1^* 0201$) molecule. *European Journal of immunology*, 26(11), 2764-2772.
- Vazquez, H., Smecuol, E., Flores, D., Mazure, R., Pedreira, S., Niveloni, S., Maurino, S., Bai, J. C. (2001). Relation between cigarette smoking and Celiac disease: evidence from a case-control study. *The American Journal of Gastroenterology*, 96(3), 798–802.
- Wal, Y. van de, Kooy, Y., Drijfhout, J., Amons, R., Koning, F. (1996). Peptide binding characteristics of the coeliac disease-associated DQ ($\alpha 1^* 0501$, $\beta 1^* 0201$) molecule. *Immunogenetics*, 44(4), 246-253.
- Wal, Y. van de, Kooy, Y., Drijfhout, J., Amons, R., Papadopoulus, G., Koning, F. (1997). Unique peptide binding characteristics of the disease-associated DQ ($\alpha 1^* 0501$, $\beta 1^* 0201$) vs the non-disease-associated DQ ($\alpha 1^* 0201$, $\beta 1^* 0202$) molecule. *Immunogenetics*, 46(6), 484-492.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535.
- Withoff, S., Li, Y., Jonkers, I., & Wijmenga, C. (2016). Understanding Celiac Disease by Genomics. *Trends in Genetics*, 32(5), 295–308.
- Wong, M., & Medrano, J. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.

Internetové zdroje

URL1: HLA Nomenclature @ hla.alleles.org. (<http://hla.alleles.org/genes/index.html>)
citováno dne 8.7.2017

URL2: Roche Life Science | Tools And Resources (https://lifescience.roche.com/en_cz/tools-and-resources.html) citováno dne 10.8.2017

URL3: IMGT/HLA; IPD; EMBL-EBI. (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) citováno dne 4.7.2017

URL4: Designing PCR primers and probes. (<http://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/pipet-tips/decoded/2013/10/21/designing-pcr-primers-and-probes>)
citováno dne 20.7.2017

URL5: BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
citováno dne 20.6.2017

Internetové databáze a programy

HLA Nomenclature
(<http://hla.alleles.org>)

Ensembl
(<http://ensembl.org>)

OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator
(<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)

Oligoanalyzer 3.1
(<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool - NCBI
(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cg>)

National Center for Biotechnology Information, Gene database
(<http://ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)