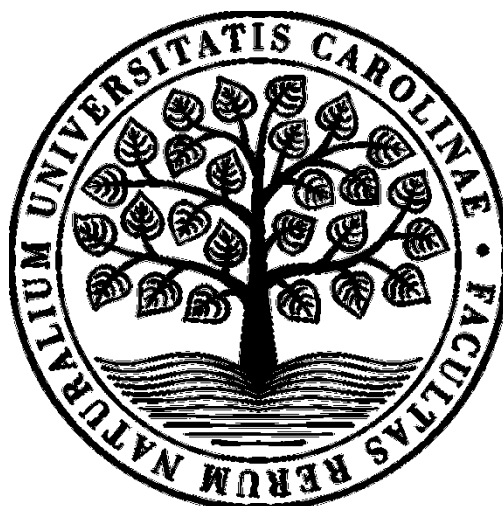


**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Aneta Buchtelová

Glaukom – genetická analýza rodiny ve vztahu k autoimunitnímu pozadí

Glaucoma – family-based genetic analysis in relation to autoimmunity

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Dominika Mravec Bencúrová

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 8.8.2019

Aneta Buchtelová

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí své práce RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. a své konzultantce Mgr. Dominice Mravec Bencúrové za cenné rady, připomínky, ochotu a čas vynaložený při vypracování mé diplomové práce. Také bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za neskutečnou podporu a dávku pozitivní energie, kterou mi věnovali během celého mého studia.

Abstrakt

Úvod: Současné poznatky o patogenezi glaukomu již prokázaly přítomnost autoimunitních mechanismů. Typickým rysem autoimunitních onemocnění je jejich častá vzájemná koincidence, např. celiakie a diabetes mellitus 1. typu či psoriáza. Tato souvislost může být vysvětlena například sdílením některých rizikových variant HLA molekul II. třídy. Budeme-li glaukom považovat za autoimunitní nemoc, vyvstává otázka, jaký vliv mohou mít kandidátní geny pro glaukom na fenotyp jiného autoimunitního onemocnění, či naopak, zdali rizikové genetické varianty asociované s celiakií mohou ovlivňovat fenotyp glaukomu.

Cíle: Cílem práce bylo i) na základě dostupné literatury vytipovat genetické rizikové markery pro vznik glaukomu a zmapovat jejich výskyt mezi členy třígenerační rodiny s glaukomem a vícečetnými autoimunitními chorobami, ii) u téže rodiny najít nositele HLA-DQ2/DQ8, iii) ověřit, zda genotyp jedince koreluje s jeho fenotypem, a iv) stanovit případný vliv alel HLA na fenotyp glaukomu.

Materiál a metody: Do studie byla zavzata třígenerační rodina (34 jejích členů), ve které se vyskytuje glaukom a zároveň autoimunitní onemocnění celiakie, diabetes mellitus 1. typu a psoriáza. Bylo vybráno 8 rizikových markerů (jednonukleotidových polymorfismů (SNP)) doposud spojovaných s glaukomem: rs74315329, rs74315329 (*MYOC*); rs28939688, rs11258194, rs75654767 (*OPTN*); rs1057517785 (*PAX6*); rs4986790 (*TLR4*); rs34595252 (*WDR36*). Genotypizace byla provedena metodami PCR-RFLP a analýzou HRM a výsledky následně ověřovány sekvenováním. Zároveň byla provedena typizace HLA na přítomnost pro celiakii rizikových molekul HLA II. třídy: HLA DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2 antigen) a DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8 antigen).

Výsledky: Všichni probandi jsou ve všech zkoumaných SNP asociovaných s glaukomem nositeli majoritní alely v homozygotní formě. HLA typizace na přítomnost DQ2 a DQ8 antigenu prokázala silnou korelaci mezi výskytem celiakie a antigenu DQ2 ($P_k=0,001$, $OR=62,33$, $CI=2,91-1335$), stejně tak pro jednotlivé rizikové alely DQA1*0501 ($P_k=0,004$, $OR=49$, $CI=2,34-1024$) a DQB1*0201 ($P_k=0,004$, $OR=49$, $CI=2,34-1024$). Závislost mezi výskytem autoimunitních onemocnění a glaukomu ($P_k=1,548$) či mezi některým z rizikových antigenů pro celiakii (DQ2 nebo DQ8) a glaukomem nebyla pozorována ($P_k=1,630$).

Závěr: V třígenerační rodině s mnohonásobným výskytem autoimunitních onemocnění a glaukomu byla zjištěna silná genetická predispozice pro celiakii, a to konkrétně ve vztahu

k antigenu HLA-DQ2. U členů zkoumané rodiny nebyla prokázána žádná korelace mezi výskytem glaukomu a vytipovaných jednonukleotidových polymorfismů rizikových pro glaukom, ani mezi glaukomem a výskytem autoimunitních onemocnění.

Klíčová slova: glaukom, autoimunitní, celiakie, T1D, HLA II. třídy, polymorfismus, asociace

Abstract

Introduction: Recent findings about the pathogenesis of glaucoma have already demonstrated the presence of some specific autoimmune mechanisms. It has also been shown that autoimmune diseases often manifest in co-occurrence, such as celiac disease and type 1 diabetes mellitus or psoriasis. This association can be explained by sharing some of the risk variants of HLA molecules class II. Considering glaucoma an autoimmune disease, the question raises how the glaucoma genetic risk factors affect the phenotype of another autoimmune disease or *vice versa*, whether genetic risk variants associated for example with celiac disease can affect the glaucoma phenotype.

Aims: The aims of this study were to i) identify possible genetic risk markers associated with the development of glaucoma, based on the available literature, and to map their occurrence among members of a three-generation family suffering from glaucoma and multiple autoimmune diseases, ii) find carriers of HLA-DQ2/DQ8 among the members of the same family, iii) verify whether an individual's genotype correlates with his/her phenotype, and iv) determine the potential effect of specific HLA alleles on the glaucoma phenotype.

Material and methods: This study used DNA samples derived from 34 members of a three-generation family, in which coeliac disease, type 1 diabetes mellitus and psoriasis can be found. Eight genetic risk markers (single nucleotide polymorphisms (SNP)) that have so far been associated with glaucoma have been selected: rs74315329, rs74315329 (*MYOC*); rs28939688; rs11258194; rs75654767 (*OPTN*); rs1057517785 (*PAX6*); rs4986790 (*TLR4*); rs34595252 (*WDR36*). Genotyping was performed using the PCR-RFLP method and the HRM analysis, and the results were subsequently verified by sequencing. The DNA samples were also tested for the presence of HLA class II molecules DQ2 (DQA1*0501-DQB1*0201) and DQ8 (DQA1*0301-DQB1*0302), which are associated with coeliac disease.

Results: In all of the examined SNPs associated with glaucoma, all probands were found to be carriers of the major allele in homozygous form. HLA typing for proof of the presence of DQ2 and DQ8 antigens showed a strong correlation between the occurrence of coeliac disease and the presence of DQ2 antigen ($P_k=0.001$, OR=62.33, CI=2.91–1335). Same correlation with coeliac disease was found also for individual risk alleles DQA1*0501 ($P_k=0,004$, OR=49, CI=2.34–1024) and DQB1*0201 ($P_k=0.004$, OR=49, CI=2.34–1024). There was no correlation between the incidence of any autoimmune disease and glaucoma

($P_k=1.548$) or between either of the coeliac disease risk antigens (DQ2 or DQ8) and glaucoma ($P_k=1.630$).

Conclusion: In a three-generation family with a multiple incidence of autoimmune diseases and glaucoma, a strong genetic predisposition to coeliac disease was observed, specifically in relation to the HLA-DQ2 antigen. There was no correlation between glaucoma and the selected single nucleotide polymorphisms which have so far been associated with glaucoma, nor was there any correlation between glaucoma and autoimmune disease in family members.

Key words: glaucoma, autoimmunity, coeliac disease, T1D, HLA class II, polymorphism, association

Obsah

1	Úvod.....	10
1.1	Glaukom	12
1.1.1	Patofyziologie	12
1.1.1.1	Příznaky	13
1.1.1.2	Diagnostika a léčba glaukomu	13
1.1.2	Typy glaukomu	15
1.1.3	Autoimunitní mechanismy v patogenezi glaukomu.....	17
1.1.4	Genetika glaukomu.....	19
1.1.4.1	<i>MYOC</i>	20
1.1.4.2	<i>OPTN</i>	21
1.1.4.3	<i>PAX6</i>	23
1.1.4.4	Další kandidátní geny.....	24
1.2	Celiakie a další autoimunitní onemocnění.....	26
1.2.1	Patofyziologie a negenetické rizikové faktory celiakie.....	26
1.2.1.1	Příznaky	27
1.2.1.2	Diagnostika a léčba celiakie	27
1.2.2	Genetika celiakie.....	28
1.2.2.1	HLA antigeny asociované s celiakií.....	28
1.2.3	Úloha vrozené a adaptivní imunity v patogenezi celiakie	30
1.2.4	Asociace celiakie s dalšími autoimunitními nemocemi.....	32
1.2.4.1	Diabetes mellitus 1. typu	32
1.2.4.2	Psoriáza.....	33
2	Předpoklady a cíle diplomové práce	35
3	Materiál a metody.....	36
3.1	Probandi	36
3.2	Sběr materiálu	38
3.3	Izolace DNA	38
3.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	40
3.4.1	Návrh primerů a optimalizace PCR	40
3.4.2	PCR pro jednotlivé SNP	42

3.5	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)	47
3.6	HLA genotypizace	51
3.7	Elektroforetická separace	52
3.8	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)	53
3.9	Sekvenování.....	55
3.10	Statistické zpracování	56
4	Výsledky	57
4.1	Návrhy primerů a optimalizace PCR reakcí	57
4.2	HLA genotypizace	62
4.3	Štěpení pomocí restrikčních endonukleáz	68
4.4	HRM analýza.....	69
4.5	Sekvenování.....	71
5	Diskuze	73
5.1	Dědičnost vybraných rizikových markerů pro glaukom	73
5.2	Dědičnost a rizikovost HLA molekul II. třídy	78
6	Závěr.....	81
7	Seznam použitých zkratk.....	82
8	Seznam použité literatury	84

1 Úvod

Autoimunitní onemocnění jsou pro současnou společnost velmi často diskutovaným tématem. A to platí jak pro veřejnost odbornou, tak i pro laickou. Incidence i prevalence těchto onemocnění v posledních dekadách značně vzrůstá, jako příklad můžeme uvést diabetes mellitus prvního typu (T1D), celiakii nebo Crohnovu chorobu (Grode et al., 2018; Loftus et al., 1998; Shaw, Sicree, & Zimmet, 2010). Díky tomu je tento druh onemocnění stále častěji předmětem mnoha výzkumů. Je snaha především o lepší či úplné pochopení patofyziologických mechanismů vedoucích ke vzniku projevů choroby, ale také o prozkoumání možných příčin jejich vzniku. Ty jsou dvojího druhu a to environmentální, kdy může hrát roli strava, pohyb, místo pobytu (myšleno především ve smyslu znečištěného ovzduší ve městech), hygiena a s ní související možná expozice infekčním nemocem, a příčiny genetické. Jedná se však o multifaktoriální onemocnění – důležitý je tedy vliv obou mechanismů (environmentálních i genetických). Během patogeneze autoimunitních onemocnění dochází k narušení správné funkce imunitního systému a ten pak nesprávně vyhodnocuje tělu vlastní buňky jako cizorodé – označí je jako cíl ke zničení. Proto u pacientů, kteří trpí nějakým autoimunitním onemocněním, můžeme detekovat tzv. autoproti látky – proti látky namířené proti strukturám vlastním danému organismu.

Ať už jde o stránku genetickou nebo tu environmentální, doslova každý den se objevují nové poznatky ohledně těchto nemocí. A nemusí se jednat pouze o dosud nepoznané příčiny jejich vzniku, ale i objev samotného onemocnění jako takového. Mám na mysli odhalení role autoimunitních mechanismů při patogenezi některé choroby, pro kterou dosud nebyly známy. Tak je tomu například u glaukomu.

Glaukom, jakožto klíčový hráč v této diplomové práci, představuje skupinu závažných oftalmologických onemocnění, která v krajních případech mohou vést až k úplné slepotě pacienta. Jedná se dokonce o jednu z nejčastějších příčin slepoty celosvětově (Quigley, 1996). Léčba tohoto onemocnění nevede k úplnému uzdravení, jedná se pouze o zpomalení progresu onemocnění a zmírnění příznaků, byť v dnešní době jsou výsledky terapie velmi dobré (Leske et al., 2003). Incidence glaukomu stoupá se zvyšujícím se věkem, a s ohledem na to, že obyvatelé především rozvinutých zemí se díky lepší dostupnosti zdravotní péče a lepším

životním podmínkám dožívají stále vyššího věku, je nutné tomuto onemocnění věnovat patřičnou pozornost (Mukesh, McCarty, Rait, & Taylor, 2002). Donedávna nebyly známe žádné zjevné evidence, že by se v případě glaukomu mohlo jednat o autoimunitní mechanismy vzniku onemocnění. V minulých letech se však řadě výzkumných týmů podařilo prokázat přítomnost určitých autoprotilátek u glaukomatických pacientů (Wax, Barrett, & Pestronk, 1994). Nápadná je také koincidence glaukomu s některými dalšími autoimunitními onemocněními (Cartwright, Grajewski, Friedberg, Anderson, & Richards, 1992).

Samozřejmě i pro vznik a manifestaci glaukomu jakožto autoimunitního onemocnění hrají důležitou roli jak faktory prostředí, tak genetické vlohy jedince. Právě vztah genetického pozadí jedince a výskytu glaukomu spolu s některými dalšími autoimunitními nemocemi je hlavní náplní této diplomové práce. Pro případný průkaz vzájemného vztahu jednotlivých onemocnění bylo vybráno 34 členů jedné třígenerační rodiny, ve které se vyskytuje jak glaukom, tak celiakie, T1D a psoriáza.

Zvolený přístup by mohl pomoci odhalit konkrétní vztah mezi genotypem jedinců a jejich fenotypem u výše zmíněných autoimunitních chorob. To by mohlo vést k lepšímu pochopení provázanosti vzniku autoimunitních chorob, jejich odlišné manifestace nebo penetrance, odhalení genetické příčiny a zároveň přinést další důkaz pro hypotézu, že některé typy glaukomu opravdu jsou autoimunitními chorobami a ve studované rodině jsou podmíněny konkrétními vybranými genetickými markery.

Pokud by tomu tak skutečně bylo, mohlo by to přispět k dřívějšímu odhalení daných přidružených autoimunitních nemocí a tím ke zlepšení kvality života pacientů v podobě brzké (a to v mnohých případech znamená účinnější a úspěšnější) léčby daných chorob a také k rozšíření a lepšímu zacílení diagnostických postupů.

1.1 Glaukom

Glaukom, též zelený zákal, je souhrnné označení pro skupinu neurodegenerativních onemocnění vyznačujících se progresivním poškozením zrakového nervu vedoucí k poruše až úplné ztrátě zraku. V současnosti se jedná také o druhou nejčastější příčinu slepoty a do roku 2020 se očekává nárůst pacientů s touto diagnózou na cca 80 miliónů na celém světě, a přitom téměř 50 % z nich budou tvořit obyvatelé Asie (Quigley & Broman, 2006). Prevalence glaukomu se uvádí cca 2 % pro osoby nad 45 let věku (Marx-Gross et al., 2017), přičemž její čísla se liší především v závislosti na etnické příslušnosti a věku jedince. Pro evropskou populaci se dokonce uvádí prevalence až 10 % u osob nad 75 let (Quigley & Broman, 2006).

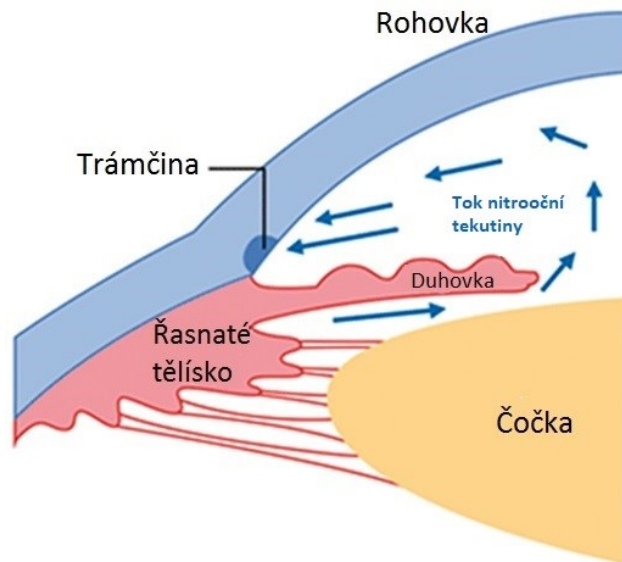
Příčin vzniku může být několik – od pozitivní rodinné anamnézy, kde hrají hlavní roli genetické faktory, až po environmentální příčiny, kde může mít vliv riziko vyššího věku související také s hypertenzí nebo například mírou oxidativního poškození.

1.1.1 Patofyziologie

Mezi hlavní rizikové faktory glaukomu patří zejména zvýšený nitrooční tlak (IOP). Ten je zapříčiněn nesprávnou cirkulací nitrooční tekutiny v přední a zadní komoře oční.

Nitrooční tekutina je produkována řasnatým tělískem do zadní komory oční. Z ní proudí dále do přední komory oční a následně je odváděna především pomocí tzv. trámčiny do Schlemmova kanálu, kudy se navrací zpět do celkového oběhu. Schéma toku nitrooční tekutiny je znázorněno na obrázku číslo 1 (Wiggs & Pasquale, 2017). Její hlavní funkcí je udržování stálého optimálního nitroočního tlaku.

V případě, že je nitrooční tekutina nesprávně odváděna z přední oční komory, dochází k jejímu hromadění a tím k nárůstu tlaku, který je vyvíjen na sítnici a tím i na optický disk – místo výstupu zrakového nervu. Příčinou poškození zrakového nervu je smrt (apoptóza) gangliových buněk sítnice a jejich axonů, což v konečném důsledku může vést až k úplné ztrátě zraku pacienta (Quigley et al., 1995).



Obrázek 1 - Schéma cirkulace nitrooční tekutiny u zdravého člověka, upraveno podle Wiggs & Pasquale, 2017

Za normální hodnotu je považován nitrooční tlak do 21 mm Hg, hodnoty nad touto hranicí jsou typické právě pro určité typy glaukomu (L. K. Mao, Stewart, & Shields, 1991), nicméně existuje i typ glaukomu, pro který je charakteristické, že pacienti mají nitrooční tlak v normě (Sommer et al., 1991).

Zrádnost onemocnění spočívá především v tom, že pacienti dlouho nepociťují žádné příznaky a pokud nemají pozitivní rodinou anamnézu a nejsou pro glaukom nebo jiné oční nemoci dlouhodobě sledováni na oftalmologickém pracovišti, často se dostanou k lékaři s již pokročilým poškozením vidění.

1.1.1.1 Příznaky

Mezi hlavní příznaky glaukomu tedy patří výpadky vidění, výrazné zúžení zorného pole, zpočátku hlavně v periferních oblastech. V pokročilejších stádiích mohou pacienti pociťovat náhlou bolest oka, bolesti hlavy a s tím i související nauzeu.

1.1.1.2 Diagnostika a léčba glaukomu

Diagnostika je prováděna na specializovaných oftalmologických pracovištích měřením nitroočního tlaku, vyšetřením zorného terče zrakového nervu, perimetrickým vyšetřením nebo případně za použití dalších speciálních vyšetřovacích metod, např. gonioskopii.

Léčba glaukomu je možná několika způsoby – záleží na typu onemocnění, jeho stádiu (tedy míře poškození zrakového nervu v době stanovení diagnózy a zahájení léčby) a také věku a celkovém zdravotním stavu pacienta. V případě, že má pacient zvýšený nitrooční tlak, je nasazena nejprve neinvazivní léčba pomocí očních kapek, jejichž účelem je právě snížení nitroočního tlaku buď ovlivněním tvorby nitrooční tekutiny, regulací jejího odtoku nebo kombinací obou mechanismů. Dalšími možnostmi, jak snížit nitrooční tlak, jsou laserové korekce oka či následně ještě chirurgické zákroky za účelem mechanického odstranění zábrany odtoku nitrooční tekutiny, u kterých je již vyšší riziko vedlejších a nežádoucích účinků. Indikací k posledním dvěma možnostem bývá hlavně selhání konzervativní léčby pomocí očních kapek.

Současné poznatky ohledně příčin vzniku glaukomu otevírají nové možnosti potenciální diagnostiky a terapie, a to především směrem k podpoření přirozených protektivních imunitních mechanismů (Fisher et al., 2001). Testování genetických markerů je vhodné především u časných (manifestace před 40 rokem života jedince) forem glaukomu, až 20 % pacientů s časnou formou glaukomu má jednu ze známých genetických variant asociovaných s glaukomem (Allen, Gaier, & Wiggs, 2015). Tomuto tématu se však budu ještě rozsáhleji věnovat v následujících kapitolách.

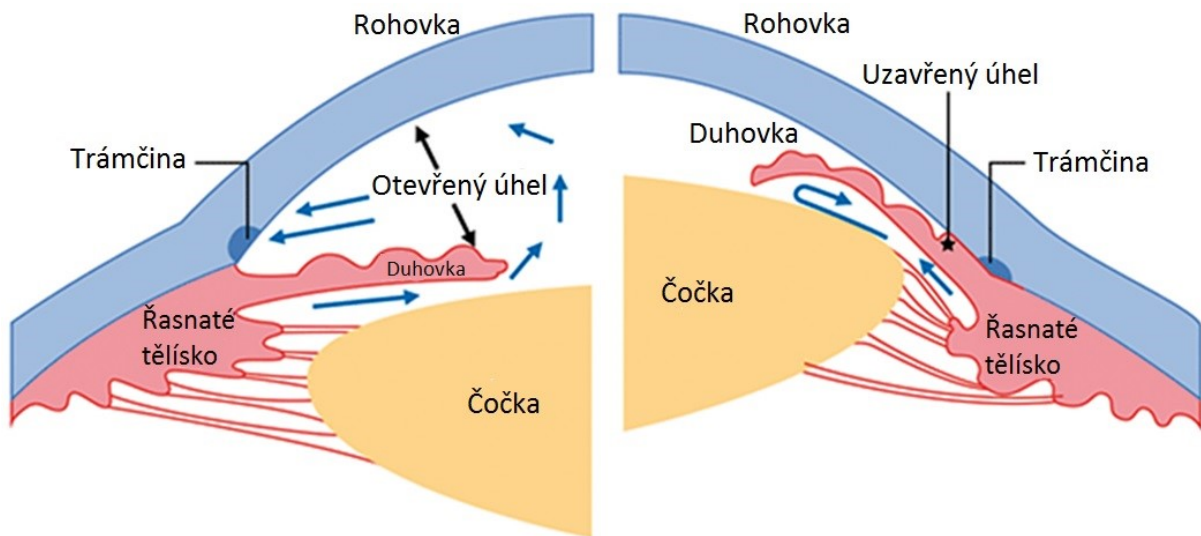
1.1.2 Typy glaukomu

Glaukom lze klasifikovat na základě několika kritérií – hodnoty nitroočního tlaku, věku manifestace choroby či způsobu narušení odtoku nitrooční tekutiny z očních komor.

Pro potřeby této diplomové práce bych zde ráda zmínila následující typy:

- Primární glaukomy
 - Primární glaukom s otevřeným komorovým úhlem (POAG)
 - Primární glaukom s uzavřeným komorovým úhlem (PACG)
- Sekundární glaukomy
- Glaukom s normální hodnotou nitroočního tlaku (NTG)
- Časně formy a juvenilní glaukom (JOAG)

POAG neboli primární glaukom s otevřeným komorovým úhlem je charakteristický především zvýšeným nitroočním tlakem (hodnota nad 21 mm Hg) a pozdějším nástupem – tedy po 40. roce života jedince. Zásadní je porucha odtoku nitrooční tekutiny. V případě POAG zůstává úhel mezi duhovkou a rohovkou zachovaný (tedy otevřený) a porucha je v odvodu tekutiny drenážním systémem trámčiny. Tento typ glaukomu je často spojovaný s pozitivní rodinnou anamnézou (Tielsch, Katz, Sommer, Quigley, & Javitt, 1994). Naproti tomu PACG je způsoben téměř úplným zamezením odtoku nitrooční tekutiny v důsledku uzavření úhlu přední komory oční mezi periferní částí duhovky a trabekulární sítí. To může být způsobeno například větší velikostí čočky nebo jejím posunem vpřed, čímž dojde k mechanickému zamezení odtoku nitrooční tekutiny. Pro PACG je tudíž charakteristický výrazný vzestup nitroočního tlaku. Rozdíl mezi POAG a PACG je patrný z obrázku číslo 2. Mechanismus, kterým zvýšený nitrooční tlak způsobuje poškození buněk sítnice a axonů zřetivého nervu, však zatím bohužel není zcela objasněn (Wiggs & Pasquale, 2017). Na místě je také zmínit, že pacienti s PACG tvoří přibližně jednu třetinu všech pacientů s glaukomem na celém světě (Quigley & Broman, 2006).



Obrázek 2 - Rozdíl mezi POAG a PACG, upraveno podle Wiggs & Pasquale, 2017

Samostatně lze vyčlenit skupinu tzv. sekundárních glaukomů, které jsou přidružené k jinému očnímu onemocnění nebo traumatu.

Dalším typem je normotenzní glaukom – tedy glaukom, při němž nedochází ke zvýšení hodnot nitroočního tlaku, a přesto je poškozen zrakový nerv. K tomuto poškození může docházet například působením některých autoprotilátek, jejichž přítomnost byla prokázána v séru pacientů s tímto typem glaukomu (Wax et al., 1998).

Časně formy glaukomu jsou takové, jejichž nástup je před 40. rokem života pacienta. Definice kongenitálního glaukomu uvádí věk nástupu do 3 let věku (Wiggs, 2015). Nakonec JOAG je řazen mezi glaukomy dětského věku, k jejich manifestaci tedy dochází již v průběhu dětství nebo puberty (Aponte, Diehl, & Mohny, 2010).

1.1.3 Autoimunitní mechanismy v patogenezi glaukomu

Jako první popsal výskyt zvýšených hladin některých autoprotilátek v séru glaukomatických pacientů Wax a spol. v roce 1998. Jednalo se o nález protilátek proti Heat Shock Proteinu 60 (HSP60) u pacientů s NTG (Wax et al., 1998). Díky nim se také podařilo odhalit další autoprotilátky, jejichž hladina je v séru glaukomatiků zvýšená oproti zdravým jedincům – mezi nimi například autoprotilátky proti α -A- a α -B-crystallinu, Heat Shock Proteinu 27 (HSP27) (Tezel, Seigel, & Wax, 1998), glykosaminoglykanům, vimentinu, Heat Shock Proteinu 70 (HSP70) (Joachim, Bruns, Lackner, Pfeiffer, & Grus, 2007), fosfatidylserinu, gliálnímu fibrilárnímu kyselému proteinu (GFAP) (Joachim, Reichelt, Berneiser, Pfeiffer, & Grus, 2008), glutathionu S-transferáze (Yang, Tezel, Patil, Romano, & Wax, 2001), neuronu specifické enoláze a mnoha dalším (Maruyama, Ikeda, Nakazawa, & Ohguro, 2002). Není však zcela objasněno, zda zvýšení autoprotilátek v séru lze považovat za příčinu nemoci anebo za důsledek jejího propuknutí.

Podstatné je ale také zmínit, že některé autoprotilátky mohou hrát i protektivní roli, a to nejen při patogenezi glaukomu, ale i dalších onemocnění. Pro normální fungování organismu je důležitá rovnováha mezi protektivními a destruktivními mechanismy – pokud je tato rovnováha narušena a dojde například ke snížení hladiny protektivních protilátek, může to vést ke spuštění patologických procesů a rozvoji choroby (Grus, Joachim, Wuenschig, Rieck, & Pfeiffer, 2008).

Na základě výsledků studií zejména skupiny Wax a spol. lze glaukom označit za orgánově specifické autoimunitní onemocnění, pro něž je typické zvýšení hladin konkrétních autoreaktivních protilátek, a naopak pokles hladin protilátek neuroprotektivních (Wax et al., 1994). Vykazuje známky klasického zánětlivého onemocnění, přičemž je na místě podotknout, že oblast sítnice a zřetivého nervu je stejně jako mozek považována za imunologicky privilegovanou tkáň. Buněčných typů podílejících se na tvorbě zánětlivého prostředí v imunoprivilegované části těla je několik – jedná se o astrocyty, které komunikují s neurony a zároveň i krevními cévami, dále mikroglální buňky (mikroglie) fungující jako antigenprezentující buňky (APC) a neméně důležité jsou také endoteliální buňky cévních stěn zprostředkovávající transmigraci dalších pomocníků do místa zánětu. Ostatní buňky imunitního systému jako jsou monocyty, makrofágy a dendritické buňky se v CNS nacházejí

pouze pod vlivem zánětlivého stimulačního signálu v podobě chemotaxe od cytokiny produkujících gliových buněk (Ransohoff & Engelhardt, 2012). Produkce prozánětlivých cytokinů mikroglie je podmíněna stimulem těchto buněk a to díky receptorům rozpoznávajícím cizorodé částice (tzv. PRRs – z anglického Pattern Recognition Receptors). Mezi ně patří Toll-like receptory (TLRs) nebo NOD-like receptory (NLRs). Tyto receptory mohou rozpoznávat molekuly pocházející jak z extra-, tak i z intracelulárního prostředí. Takovéto molekuly se pak nazývají PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) a jedná se o nejrůznější komponenty typické pro patogenního vetřelce v organismu (lipopolysacharidy, jednořetězcová DNA nebo také virová RNA). Dále pak receptory mohou rozpoznávat i molekuly pocházející z poničených a umírajících buněk, tzv. DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) (Roach et al., 2005). K nim patří mimo jiné HSP60, HSP70 nebo α -B-crystallin. Aktivace těchto receptorů spouští celou řadu signálních kaskád uvnitř buňky, přičemž nejdůležitější z nich vede k aktivaci nukleárního transkripčního faktoru NF- κ B (nukleární faktor κ B), čímž dochází ke spuštění transkripce genů právě pro zánětlivé cytokiny, které slouží jako zesilovače a efekторы celé zánětlivé reakce. Může se jednat například o tumor nekrotizující faktor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) nebo interleukin 6 (IL-6).

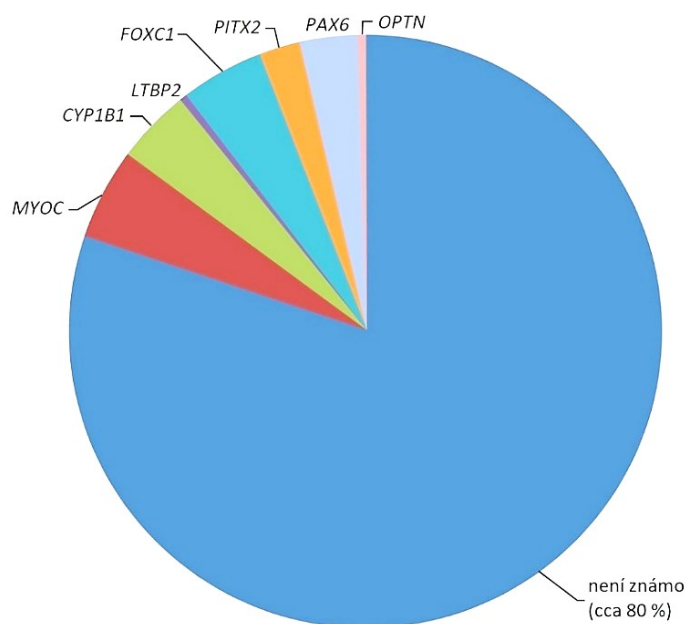
Ví se, že i krátkodobý vzestup IOP může způsobit prozánětlivé reakce v buňkách sítnice a optického nervu a morfologické změny imunitních buněk (Johnson, Deppmeier, Wentzien, Hsu, & Morrison, 2000). Předpokládá se, že iniciaci této reakce mají za následek právě nejrůznější DAMPs (mezi nimi především Heat Shock proteiny) produkované buňkami sítnice v případě zvýšeného nitroočního tlaku. V takových podmínkách zároveň dochází k nárůstu oxidativního stresu axonálních buněk a buněk sítnice. Nejrůznější studie prokázaly zvýšení hladin rozličných prozánětlivých markerů, mezi nimi jsou členové MAP kinázové kaskády vedoucí až k aktivaci NF- κ B (konkrétně adaptorový protein MyD88), komplementové kaskády imunitního systému (například komponenta C1QA), ale i výše zmiňované prozánětlivé cytokiny TNF- α a interleukiny z rodiny IL-1 (Howell et al., 2011; Luo et al., 2010; Yuan & Neufeld, 2000). Pochopení všech těchto mechanismů otevírá brány novému přístupu k diagnostice a léčbě glaukomu. Již bylo vyzkoušeno na experimentálních modelech, že například inhibice aktivity TNF- α blokuje aktivaci mikroglie a tím destrukci synapsí a axonů v oblasti optického nervu a gangliových buněk sítnice (Roh et al., 2012).

1.1.4 Genetika glaukomu

Jak již bylo zmíněno, genetické faktory jsou u glaukomu zásadní – a to jak pro vznik a následný průběh onemocnění, tak i pro vhodnou volbu léčby a její úspěšnost. Díky mnoha provedeným celogenomovým studiím se podařilo identifikovat několik kandidátních genů a jejich konkrétních variant rizikových pro vznik glaukomu.

Časně formy glaukomu vykazují typicky autozomálně dominantní nebo autozomálně recesivní mendelistickou dědičnost, naproti tomu u pozdějších forem se jedná o komplexní typ dědičnosti, kde při vzniku a manifestaci choroby hraje důležitou úlohu mnoho faktorů, včetně těch negenetických (Wang & Wiggs, 2014).

Pro POAG byla provedena řada studií napříč různými etniky i národnostmi a bylo nalezeno několik lokusů asociovaných s glaukomem. Celkový počet těchto lokusů je zatím 16, nicméně předpokládá se, že s dalšími výzkumy se toto číslo ještě dále navýší. A to zejména proto, že zcela chybí data pro africké populace (Wiggs & Pasquale, 2017). Funkce produktů kandidátních genů je velmi různorodá, od metabolismu lipidů, fruktózy, manózy, přes signální dráhy pomocí tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- α) až samotnému ovlivnění vývoje oka (Wiggs, 2015). Schéma přibližného zastoupení dosud známých mutací pro glaukom je znázorněno na obrázku číslo 3.



Obrázek 3 - Zastoupení známých mutací typických pro glaukom, upraveno podle Allen, Gaier, & Wiggs, 2015

1.1.4.1 MYOC

Mutace v genu pro myocilin (*MYOC*) jsou spojované především s POAG a také s juvenilními formami glaukomu. Jedná se dokonce o první gen, který byl s POAG asociován (Fingert, 2011). Gen *MYOC* se nachází na krátkém raménku chromozómu 1 (1q23-1q24, lokus GLC1A), jeho kódující část obsahuje 3 exony a kóduje kyselý glykoprotein zvaný myocilin sestávající z 504 aminokyselin (Kubota et al., 1998). Jedná se o cytoskeletální protein a je produkován světločivnými buňkami sítnice především částí poblíž napojení řasnatého tělíska, samotným řasnatým tělískem a duhovkou. Jeho exprese byla nicméně detekována i u jiných tělesných struktur než je oko, například u buněk kosterní svaloviny, srdce nebo v řasinkách čichového a sluchového epitelu. Nachází se především poblíž bazálního tělíska buněčného cytoskeletu těchto buněk a vykazuje jistou podobnost s myosinem (Kubota et al., 1997).

Studie zahrnující 1703 glaukomatických pacientů napříč několika populacemi (Japonsko, Austrálie, USA, Kanada) ukázala, že u přibližně 2–4 % všech pacientů s glaukomem se vyskytuje některá z mutací v genu pro myocilin a z nich v zhruba 8–36 % případů se jedná o juvenilní formu glaukomu (Fingert, 2011; Fingert et al., 1999).

Celkem je známo více než 70 mutací v tomto genu. V roce 1997 se podařilo výzkumníkům Stone a spol. identifikovat 3 konkrétní mutace asociované s časnou formou primárního otevřeného glaukomu (Stone et al., 1997). Následně bylo identifikováno mnoho dalších, především jednonukleotidových záměn (SNP), asociovaných s JOAG a to zejména v rámci exonu 3, mezi nimi například Tyr437His a Pro370Leu (Liu & Vollrath, 2004). Nejčastěji nacházená mutace u glaukomatických pacientů je nicméně záměna aminokyseliny glutaminu na pozici 368 za STOP kodon (Gln368X), čímž dochází k chybnému zastavení translace a vzniku defektního produktu genu (Allingham et al., 1998). Porušený protein se pak hromadí v oblasti trámčiny, kde působí na okolní buňky toxicky a způsobuje jejich dysfunkci. Následkem toho pak nemůže docházet k odtoku nitrooční tekutiny (Konz, Flugel-Koch, Ohlmann, & Tamm, 2009).

1.1.4.2 *OPTN*

První případ korelace mezi genetickými variantami situovanými v lokusu, ve kterém se nachází gen *OPTN* (optineurin), byl sledován u 46 členů jedné rodiny. Výzkum provedl tým Sarfarazi a spol. v roce 1998 a jednalo se tedy o rodinnou studii, přičemž 12 z 15 jejích sledovaných členů trpících glaukomem nikdy nemělo nitrooční tlak přesahující 22 mm Hg. Pro všechny probandy platilo, že jejich IOP se většinou pohyboval v rozmezí hodnot 15 až 25 mm Hg, věk stanovení diagnózy 23 až 65 let. Jednalo se tedy o případ glaukomu s normálním nitroočním tlakem, tedy normotenzní glaukom (Sarfarazi et al., 1998). Nicméně některé konkrétní varianty tohoto genu jsou asociovány i s adultní formou glaukomu s otevřeným úhlem.

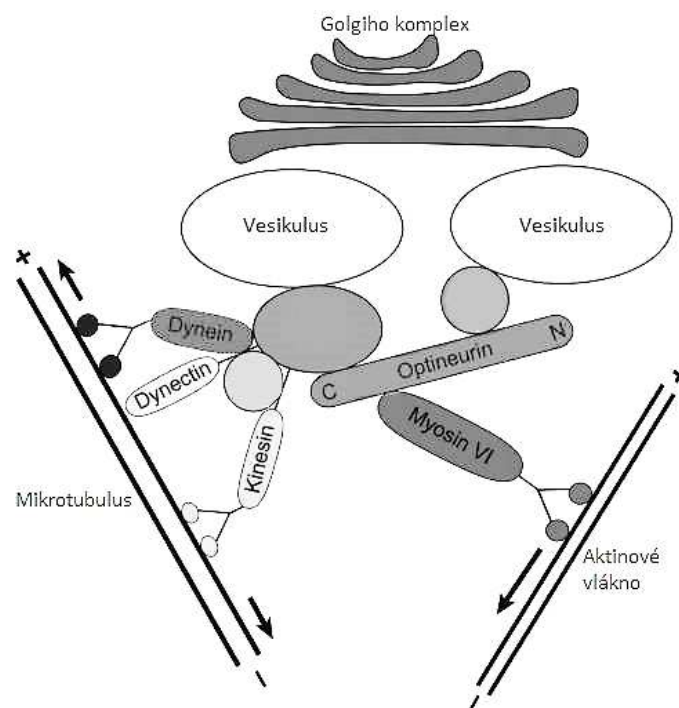
Gen *OPTN*, kódující 577 aminokyselin dlouhý protein optineurin, je lokalizován na krátkém raménku desátého chromozómu – konkrétně se jedná o oblast 10p14-10p15 (lokus *GLC1E*) (Sarfarazi et al., 1998). *OPTN* obsahuje 13 exonů, 3 nekódující oblasti a v samotném proteinovém produktu lze nalézt četné oblasti leucinových zipů. Jeho exprese byla zjištěna v řadě tkání lidského těla – játra, ledviny, srdce, mozek, placenta. Jsou mezi nimi ale i trámčina, sítnice a nepigmentovaná část řasnatého tělíska. Zvláště zajímavý je fakt, že tento protein zasahuje do TNF- α signalizační dráhy vedoucí k apoptóze a blokuje jednu z jejích komponent. Proto je nasnadě úvaha, že funkční protein hraje neuroprotektivní roli, je-li však v genu mutace způsobující jeho nesprávnou funkci, může to vést právě ke spuštění TNF- α indukované apoptózy skrze aktivaci nukleárního faktoru kapa B (NF- κ B) v oblasti zrakového nervu a tím vést k jeho poškození (Li, Kang, & Horwitz, 1998; Rezaie et al., 2002). Optineurin v buňkách interaguje s celou řadou dalších molekul – například s GTPázou Rab8, huntingtinem nebo myosinem VI, tedy s proteiny, které jsou mimo jiné zapojené do dráhy intracelulárního vesikulárního transportu směrem od Golgiho aparátu na plazmatickou membránu nebo do lysozómu (Hattula & Peranen, 2000). Tyto interakce jsou vykresleny na obrázku číslo 4 (Ying & Yue, 2012).

Nejčetnějšími mutacemi v tomto genu u glaukomatických jedinců z různých populací v rámci celého světa, které byly popsány v literatuře, jsou mutace vedoucí k aminokyselinovým záměnám, a to Glu50Lys (exon 4), Met98Lys (exon 5), Arg545Lys (exon 16) (Rezaie et al., 2002). Dalšími testovanými mutacemi, jejichž výskyt byl zaznamenán častěji u glaukomatických pacientů než kontrolních jedinců, pak byly například synonymní změny (tedy změny

v kodonech, které nevedou k výměně aminokyseliny ve výsledném proteinovém produktu) Thr34Thr a Leu61Leu. Byly ovšem nalezeny i takové genetické varianty, které se vyskytovaly častěji u kontrolních jedinců a nikoli mezi pacienty sledovanými pro glaukom, a to například aminokyselinová záměna na pozici 210 (Ala210Thr) (Alward et al., 2003).

Mutace v genu pro optineurin však nejsou asociovány pouze s glaukomem; některé varianty byly sledovány také v souvislosti s dalšími nemocemi, hlavně s amyotrofickou laterální sklerózou (Maruyama et al., 2002), či dalšími neurodegenerativními nemocemi – Alzheimerovou chorobou, Parkinsonovou chorobou, Creutzfeldt-Jakobovou chorobou, Pickovou chorobou (Osawa et al., 2011).

Experimenty prováděné na transgenních myších modelech, které měly výše zmiňovanou mutaci Glu50Lys, prokázaly, že přítomnost této mutace neguje neuroprotektivní účinek optineurinu a vede ke smrti gangliových buněk sítnice. Po 16 měsících vykazovaly transgenní myši úbytek gangliových buněk a přilehlých nervových synapsí a až o 28 % ztenčenou sítnici (Chi et al., 2010).



Obrázek 4 - Schéma interakce optineurinu s dalšími proteiny účastnícími se vesikulárního transportu, upraveno podle Ying & Yue, 2012

1.1.4.3 *PAX6*

Gen *PAX6* neboli Pair-box 6 je znám především jako velmi důležitý hráč v embryonálním vývoji. Hraje úlohu během morfogeneze orgánových soustav, a to i oka. Tato úloha je tedy krucální i v souvislosti se vznikem nejrůznějších dysgenezí těchto orgánů, jejichž vývoj je ovlivněn právě působením genu *PAX6*. Je lokalizován na krátkém raménku chromozómu 11 (konkrétně region 11p13) a obsahuje více jak 10 exonů. Kóduje protein o velikosti 422 aminokyselin tvořících 3 domény a jedná se o důležitý transkripční faktor, který je schopen vázat se na jiná místa v genomu a regulovat tak jejich transkripční aktivitu. Exprimován je v předním mozku, ventrální části míchy, endokrinní části pankreatu a v časných vývojových strukturách oka (Ton et al., 1991; Walther & Gruss, 1991; Wawrocka, Sikora, Kuszel, & Krawczynski, 2013).

Mutace v tomto genu jsou spojované především s aniridií, vrozeným očním onemocněním, přičemž postiženy jsou většinou obě oči zároveň (bilaterální). Mezi typické příznaky patří zhoršené vidění, nystagmus nebo chybění duhovky (Jordan et al., 1992). Často bývá v koincidenci s jinými očními poruchami – např. katarakta (šedý zákal), Petersonova anomálie rohovky nebo právě glaukom (anatomické změny v úhlu komory), ale mohou mezi ně patřit i nejrůznější nádorová onemocnění. Celosvětově se prevalence pohybuje od 1:64 000 do 1:100 000 (Neuhaus, Betz, Bergmann, & Bolz, 2014), přičemž až 80 % všech pacientů trpících aniridií má mutaci právě v tomto genu (Gronskov et al., 2001). Zajímavá je studie výzkumného týmu Gramer a spol., ve které byla vyhodnocena relativní frekvence chorob přidružených k aniridii. Z jejich vzorků aniridických pacientů 76,7 % trpělo kataraktou už od narození a dokonce až 66,7 % těchto pacientů mělo glaukom (z nich v 90 % případů se jednalo o glaukom bilaterální). Dále více jak polovina pacientů měla diagnostikovaný nystagmus a zhruba čtvrtina trpěla zakalením rohovky. Věk stanovení diagnózy glaukomu byl u většiny pacientů až po 40. roce jejich života (Gramer, Reiter, & Gramer, 2012). Podobných čísel se dopracoval již Grant v roce 1974, kdy zhruba polovina sledovaných pacientů s vrozenou aniridií trpěla zároveň i glaukomem. Pacienti byli sledováni již od dětství a byl pozorován vliv narušené tkáně duhovky na vývoj komorového úhlu, zároveň s věkem pacientů vzrůstal i naměřený IOP (Grant & Walton, 1974). Defekty *PAX6* asociované s aniridií jsou různorodé – může se jednat o mutace způsobující posun čtecího rámce (inzerce, delece), ale i o aminokyselinové záměny, známy jsou jak tzv. missence mutace, jež způsobují záměnu

aminokyseliny za jinou a s jinou funkcí, tak i ty, které způsobují záměny synonymní (Tzoulaki, White, & Hanson, 2005). Genetické změny *PAX6* související s glaukomem jsou především v rámci aminokyselinových záměn, mezi nimi například tzv. nonsense (vedou ke vzniku STOP kodonu a předčasnému ukončení translace) – tedy Cys40X, Trp156X, Arg203X nebo Arg317X (Chao, Huff, Strong, & Saunders, 2000; Dharmaraj et al., 2003; Vincent, Pujo, Olivier, & Calvas, 2003) (URL1).

1.1.4.4 Další kandidátní geny

Mezi dalšími kandidátními geny pro glaukom bych zde ráda zmínila především 3 – gen pro toll-like receptor 4 (TLR4), *WDR36* (protein 36 obsahující WD repetice) a gen *CYP1B1* (Cytochrome P450 1B1).

Polymorfismy genu pro TLR4 jsou asociovány především s POAG, nicméně některé jednonukleotidové polymorfismy byly nalezeny i u glaukomatických pacientů s nitroočním tlakem zcela v normě. TLR4 byl první objevený ze skupiny TLRs. Je schopen vázat lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, lipoproteiny RNA virů a některé heat shock proteiny (Chaiwiang & Poyomtip, 2019). Během patogeneze glaukomu vede aktivace imunitního systému skrze TLR4 k fibróze trabekulární sítě a tím dochází ke zvýšení nitroočního tlaku (Hernandez, Medina-Ortiz, Luan, Clark, & McDowell, 2017). Dalším prokázaným patologickým mechanismem je stimulace TLR4 tenascinem. Jedná je o tzv. DAMP molekulu a u glaukomatických pacientů je její exprese značně upregulována. Aktivuje kaskádu vedoucí přes TLR4, a to především v astrocytech hlav zrakového nervu u glaukomatiků (Pena, Varela, Ricard, & Hernandez, 1999).

Polymorfismů v tomto genu, jež vykazují souvislost s glaukomem, je známo hned několik, nicméně pro potřeby této diplomové práce je nejstěžejnější především SNP rs4986790, kdy dochází k záměně nukleotidu adeninu za guanin, v proteinovém produktu se to pak projeví jako aminokyselinová změna na pozici 299, konkrétně během translace dojde k přiřazení aminokyseliny glycinu místo aspartátu (Navarro-Partida et al., 2017). Kromě TLR4 byly ještě zkoumány varianty genu pro toll-like receptor 2 (TLR2), nicméně pro tento gen nebyla zaznamenána žádná asociace mezi konkrétním polymorfismem a glaukomem (Nakamura et al., 2009).

Protein 36 obsahující časté WD repetice je kódovaný genem *WDR36*. Ten je lokalizován na dlouhém raménku chromozómu 5 (region 5q22.1, lokus GLC1G) a obsahuje 23 exonů. Gen *WDR36* kóduje protein dlouhý 951 aminokyselin a jeho produkt hraje úlohu v aktivaci T-lymfocytů. Předpokládá se, že jejich nadměrná aktivita by mohla hrát úlohu v patogenezi glaukomu, konkrétně během procesu narušení optického nervu (M. Mao et al., 2004; Monemi et al., 2005). Jako první našel spojitost mezi určitými variantami tohoto genu a glaukodem Monemi et al. v roce 2005. Mutace v tomto genu bývají spojovány jak s POAG, tak i s normotenzním glaukodem. Další studie hledající nesynonymní varianty v tomto genu u glaukomatických pacientů zjistila přítomnost těchto záměn u 17 % pacientů s POAG, nicméně také u téměř 5 % zdravých kontrol. Je však patrné, že u glaukomatických pacientů jsou mutace v tomto genu daleko častější, než u zdravé populace (Hauser et al., 2006). Nejlépe prostudovaný je však jednonukleotidový polymorfismus v exonu 17 vedoucí k aminokyselinové záměně na pozici 658. Konkrétně jde o nahrazení kyselého aspartátu za neutrálně nabitou aminokyselinu glycin.

Mutace v genu *CYP1B1* bývají velmi často asociované s časnými formami glaukomu, a to především tím kongenitálním. Jsou ale známé i mutace asociované s JOAG (manifestace v druhé dekádě života pacienta). Jedná se o vůbec první lokus, jehož varianty byly asociovány se zvýšeným rizikem výskytu glaukomu (Sarfarazi et al., 1995). Gen leží na krátkém raménku chromozómu 2 (region 2p21, lokus GLC3A) a kóduje enzymy z rodiny cytochromu P450 mající monooxygenázovou funkci a využívající řadu substrátů (Gonzalez, 1988). Produkt genu se účastní velkého množství syntetických drah jiných molekul – například cholesterolu, steroidů, metabolismu xenobiotik a některých dalších lipidů (Choudhary, Jansson, Stoilov, Sarfarazi, & Schenkman, 2004). Exprese cytochromu P450 1B1 byla doposud zaznamenána zhruba v 15 tělních tkáních, mimo jiné i v řasnatém tělísku oka (Sutter et al., 1994). Bylo prokázáno, že nejrůznější bodové mutace genu *CYP1B1* souvisí s nenormálním fenotypem a vývojem očních partií například dysgenezí či úplnou agenezí Schlemmova kanálu a řasnatého tělíska a tím i chybným vývojem úhlu přední komory oční (Hollander et al., 2006).

1.2 Celiakie a další autoimunitní onemocnění

Celiakie, též označovaná jako orální intolerance lepku, je multifaktoriální autoimunitní tkáňově specifické onemocnění. Na jeho rozvoji mají vliv jak faktory genetické, tak i environmentální. Nemoc se může projevit v různém věku, ale je známo, že u žen je tato nemoc častější než u mužů, a to až trojnásobně (Green et al., 2001). Pacienti s touto poruchou jsou nuceni po zbytek života dodržovat přísnou bezlepkovou dietu. Jedině tak je možné zmírnit příznaky onemocnění a zlepšit kvalitu života nemocných celiakií. Prevalence tohoto onemocnění se uvádí pro většinu populací mírně nad 1 % (Cook et al., 2000; Lohi et al., 2007).

1.2.1 Patofyziologie a negenetické rizikové faktory celiakie

Autoimunitní reakce u pacientů trpících celiakií je vyvolána peptidy lepku neboli glutenu, přičemž jako autoantigen slouží tkáňová transglutamináza 2 a v séru pacientů lze detekovat protilátky proti ní. Reakce na tento antigen vyvolá kaskádu imunologických odpovědí vedoucích přes aktivaci buněk jak vrozené, tak i adaptivní imunity. Nejprve je však nutné, aby peptidy lepku (konkrétně protein gliadin) prostoupily bariéru v podobě střevní sliznice až k *lamina propria*, kde dochází k jejich navázání na tkáňovou transglutaminázu účastníci se deaminace glutaminu v peptidech lepku. Jako první byl její vztah k celiakii popsán skupinou Dieterich a spol. v roce 1997 (Dieterich et al., 1997). Gliadin je pak v místě *lamina propria* vystavován pomocí antigen prezentujících buněk imunitnímu systému a tím může docházet ke spuštění imunitní reakce.

Jedná se však o multifaktoriální onemocnění a podíl na vzniku tak mají jak faktory environmentální, tak i imunologické a neméně důležité jsou i ty genetické. Důležitá je vzájemná provázanost těchto vlivů. Mezi sourozenci a dizygotními dvojčaty se konkordance pohybuje mezi 10–11 % a u monozygotních dvojčat je dokonce až 75 % (Greco et al., 1998). Do environmentálních faktorů pak spadají virové infekce nebo například doba, po kterou je dítě výlučně krmeno mateřským mlékem (Ivarsson, Hernell, Stenlund, & Persson, 2002; Kagnoff et al., 1987).

1.2.1.1 Příznaky

Příznaky onemocnění mohou být značně variabilní – záleží na povaze příčiny choroby i tělesném a imunitním nastavení jedince. Nejčastějšími projevy neléčené formy celiakie jsou bolesti břicha, u dětí celkové neprospívání a opožděná puberta, chronický průjem, anémie. Se střevní malabsorpcí pak může souviset i případný váhový úbytek a celotělová slabost, anémie, osteoporóza a v krajních případech až infertilita. Častá je také koincidence s dalšími nemocemi, mezi nimi například autoimunitní forma diabetu (T1D), periferní neuropatie, poruchy štítné žlázy, epilepsie, migrény, Addisonova choroba nebo jaterní dysfunkce (Briani, Samaroo, & Alaedini, 2008). Celiaci mají také zvýšené riziko vzniku nádorů nejrůznějších typů – non-Hodkinovské lymfomy, adenokarcinomy tenkého střeva, melanomy nebo nádory jícnu (Green et al., 2003). Mezi kožní projevy nemoci patří dermatitis herpetiformis (Reunala, 1998).

1.2.1.2 Diagnostika a léčba celiakie

Jak již bylo zmíněno, v současnosti je jedinou možnou léčbou dodržování bezlepkové diety. Díky ní dochází ke stabilizaci sliznice tenkého střeva a potlačení klinických projevů.

Ke stanovení diagnózy se využívá řada sérologických testů založených na určování hladin IgA anti-transglutamidázy 2 a anti-endomyziálních protilátek. Pokud jsou tyto protilátky zvýšené, přistupuje se k biopsii tenkého střeva. Jedná se o invazivní vyšetření a v současné době je to bohužel jediná možná spolehlivá metoda diagnostiky celiakie. Pokud je nález z biopsie pozitivní (tedy přítomnost abnormalit na stěnách tenkého střeva – atrofie mikrokloků), je pacientům naordinovaná přísná bezlepková dieta spočívající ve vyřazení všech potravin obsahujících lepek. Pakliže má pacient pozitivní odezvu na úpravu jídelníčku, je definitivně potvrzena diagnóza celiakie a pacient je pak na tuto dietu odkázán celoživotně. Díky ní dochází ke zklidnění střevní sliznice a obnově struktury mikrokloků (Briani et al., 2008).

Jako pomocný diagnostický marker pak může sloužit genetický test na přítomnost známých rizikových genetických variant pro celiakii, kterým se budu podrobněji věnovat níže. Tento test nicméně není využíván ke stanovení diagnózy jako takové samostatně, ale může posloužit například v případech, kdy není možné z nejrůznějších důvodů provést biopsii tenkého střeva.

Na jeho základě ale nelze určit přesnou diagnózu, ale pouze genetickou predispozici k ní a slouží jako negativní diagnostický faktor pro vyloučení celiakie.

1.2.2 Genetika celiakie

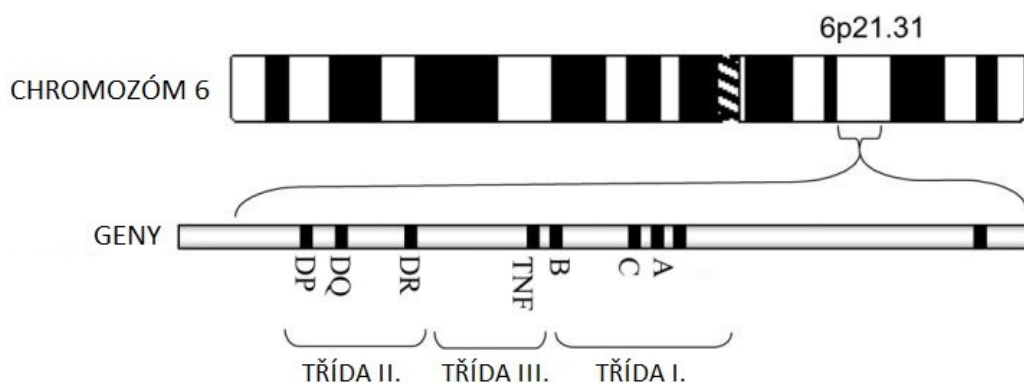
Již bylo zmíněno, že riziko propuknutí celiakie je do značné míry dáno právě genetickým pozadím jedince. Jedná se o polygenní onemocnění, což znamená, že vliv na projev a manifestaci choroby má celá řada genů. Nejlépe zmapovanou oblastí lidského genomu v souvislosti přímo s celiakií je oblast kódující geny pro komplex HLA molekuly II. třídy (z anglického Human Leukocyte Antigen). Nejsilnější asociace byla prokázána pro molekuly HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Přestože lze nalézt u většiny pacientů s celiakií, na její celkové dědičnosti se podílejí zhruba z jedné třetiny (Petronzelli et al., 1997).

Mezi další genetické markery celiakie se pak řadí některé varianty genů kódujících nejrůznější komponenty buněk imunitního systému – například geny kódující membránové receptory TLR2 a TLR4 na povrchu mononukleárních buněk, které jsou složkou přirozené imunity. Exprese těchto molekul je u celiaků značně zvýšená a může proto vést k nadměrné stimulaci imunitního systému (Szebeni et al., 2007). Pro složky adaptivní imunity to jsou varianty genů *CTLA-4* (antigen 4 cytotoxických T-lymfocytů), *CD28* (diferenciační kluster 28 – kostimulační molekula na povrchu T-lymfocytů) nebo *ICOS* (indukovatelný kostimulátor T-buněk), které všechny leží na dlouhém raménku chromozómu 2 a jejich produkty se podílí na regulaci T-buněk imunitního systému (Brophy et al., 2006). Gen *CTLA-4* je mimo jiné známý také jako kandidátní gen pro autoimunitní formu diabetu a zde lze nalézt propojení právě mezi těmito dvěma autoimunitními chorobami. Zajímavý je i gen *MYO9B* (gen pro myosin IXb). Produktem toho genu je protein podílející se na propustnosti buněčných membrán, mohl by tak ovlivňovat přechod peptidů lepku přes epitel střevní sliznice. Jeho role v genetice celiakie je však sporná (Hunt et al., 2006). Nakonec bych ráda zmínila i souvislost se 2 geny (*MMP-1* a *MMP-3*) pro alkalické metaloproteinázy (Daum et al., 1999).

1.2.2.1 HLA antigeny asociované s celiakií

HLA molekuly neboli molekuly hlavního histokompatibilního komplexu lze rozčlenit do dvou skupin. HLA I. třídy se nalézají na všech jaderných buňkách v těle a skládají se

z lehkého α řetězce a těžkého řetězce β 2-mikroglobulinu. Tyto řetězce mezi sebou utváří vazebné místo pro molekuly nacházející se v dané buňce. To slouží k rozpoznání stavu, ve kterém se buňka nachází. Je-li například infikovaná nějakým patogenem či v ní proběhla indukce k apoptóze, mohou se fragmenty patogenní částice prezentovat pomocí HLA buňkám imunitního systému a tím spustit imunitní reakci. K tomu napomáhají i HLA molekuly II. třídy, které naproti tomu nalezneme pouze na antigen prezentujících buňkách (monocyty, makrofágy, dendritické buňky, T- a B-lymfocyty), které tím prezentují fagocytované molekuly ze svého okolí pomocným $CD4^+$ T-lymfocytům. Skládají se z těžkého α a lehkého β řetězce a společně tvoří heterodimer (Salamon et al., 1999). Geny pro HLA molekuly se nachází na krátkém raménku chromozómu 6, region 6p21.31. Mezi oblastmi, které kódují geny pro HLA I a HLA II, se nachází ještě oblast pro tzv. HLA III (non-HLA oblast). Produkty těchto genů také souvisejí s imunitním systémem. Oblast kódující geny pro HLA je nejpolymorfnější oblastí lidského genomu a je často asociována s nejrůznějšími chorobami (především autoimunitními), ale také s inkompatibilitou při orgánových transplantacích. Nejzásadnější pro predispozici autoimunitních chorob jsou v tomto ohledu především oblasti DR, DQ a DP spadající pod HLA II. třídu (Stewart et al., 2004). Umístění těchto oblastí znázorňuje následující obrázek.



Obrázek 5 – Schéma umístění genů pro HLA molekuly na chromozómu 6, upraveno podle Louka & Sollid, 2003

Nejčastěji citovanými jsou v souvislosti s celiakií geny pro molekuly DQ2 a DQ8, konkrétně haplotypové varianty pro heterodimery $DQA1^*05-DQB1^*02$ a $DQA1^*03-DQB1^*0302$ (Louka & Sollid, 2003). Gen *DQA1* kóduje protein pro α řetězec heterodimeru receptoru, gen *DQB1*

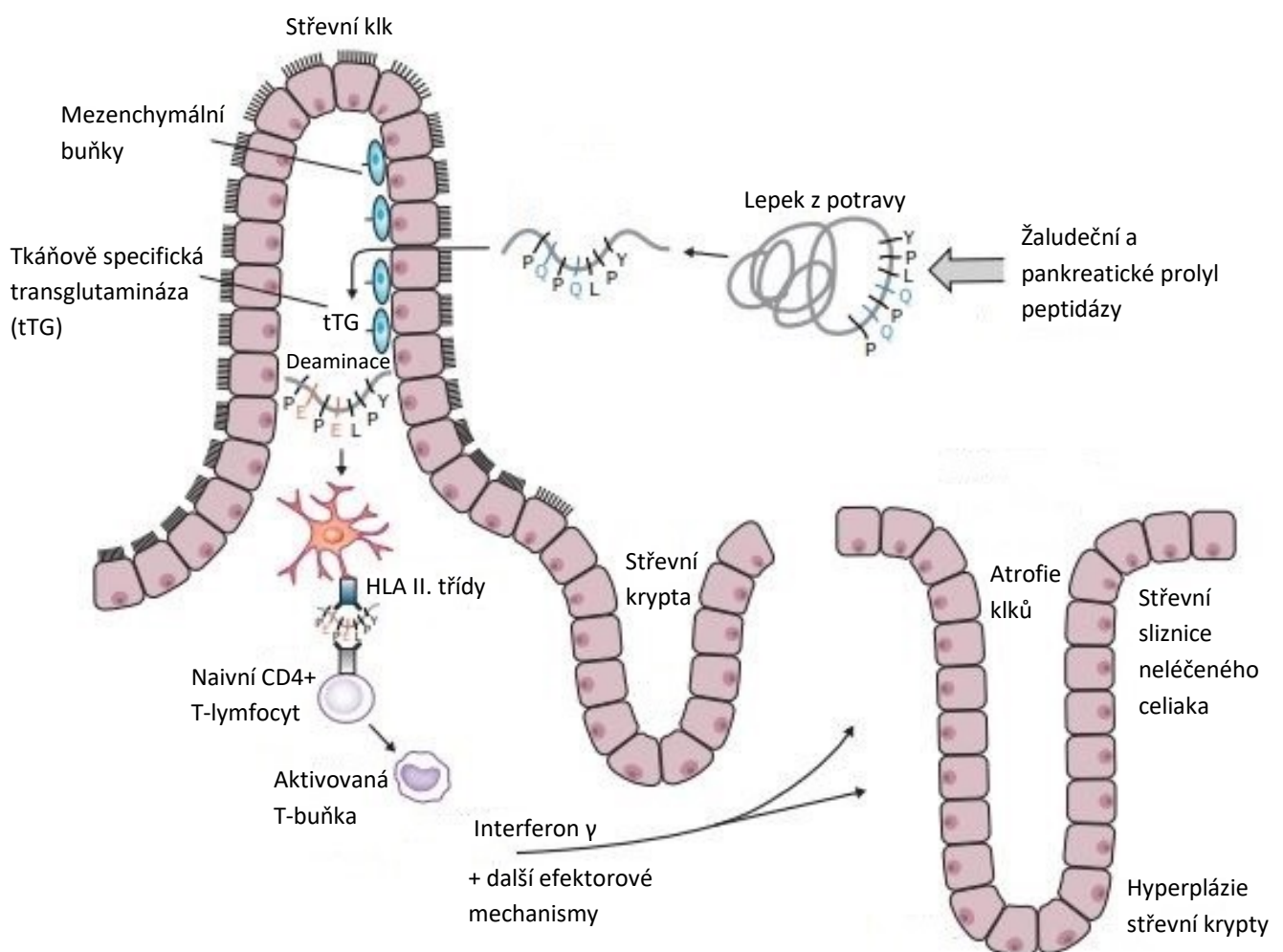
pak pro β řetězec. Pouze 1 % pacientů s celiakií nenesou žádnou z těchto rizikových variant. Většina celiaků pak má antigen DQ2, ten však můžeme nalézt i u jedné třetiny zdravé populace (Sollid et al., 1989). Důležitý je také efekt dávky jednotlivých alel – jedinec nesoucí 2 kopie alely DQB1*02, tedy na obou chromozómech (homozygot pro danou alelu), má daleko vyšší riziko celiakie a to i v přítomnosti pouze jedné kopie alely DQA1*05 (Ploski, Ek, Thorsby, & Sollid, 1993). Je tedy zřejmé, že důležitý je také efekt dávky jednotlivých genů. Nejvyšší riziko pro vznik celiakie mají nositelé homozygotní sestavy alel DQA1*0501-DQB1*0201, případně heterozygotní kombinace DQA1*0501-DQB1*0201/DQA1*0201- DQB1*0202. Samotná přítomnost haplotypu DQA1*0201-DQB1*0202 je bez rizika, ovšem v heterozygotní formě s DQA1*0505-DQB1*0301 se riziko zvyšuje. Heterozygot pro DQA1*0501-DQB1*0201 má pak riziko manifestace celiakie střední stejně jako heterozygot DQA1*0301-DQB1*0302 (antigen DQ8) (van Heel, Hunt, Greco, & Wijmenga, 2005). Samotná separátní přítomnost rizikových alel pro α nebo β řetězec asociovaných s celiakií (například by to byl případ jedince s DQA1*0501 alelou bez přítomnosti DQB1*0201 nebo nositel DQB1*0201 bez DQA1*0501) však nebyla shledána jako riziková pro manifestaci celiakie u jedinců nesoucích takovouto genetickou variantu HLA molekul II. třídy (Vader et al., 2003). Ke stejnému závěru došli i Donat et al. v roce 2009, kteří po provedení testu nezávislosti pro jednotlivé alely zjistili, že nelze s přesností určit, která alela (zda pro α nebo β řetězec) má zásadní vliv na vznik nemoci a stěžejní je tedy nosičství celého rizikového haplotypu (Donat et al., 2009).

1.2.3 Úloha vrozené a adaptivní imunity v patogenezi celiakie

Vzhledem k autoimunitní povaze celiakie hraje důležitou roli při jejím vzniku imunitní systém. Jeho profesionální antigen prezentující buňky, které jsou součástí vrozené, tedy neadaptivní složky imunitního systému, mohou na svém povrchovém receptoru vázat peptidy lepku a tím aktivovat CD4+ T-lymfocyty a započít tak kaskádu imunologické odpovědi. Důkazem pro to je přítomnost právě těchto gliadin specifických CD4+ T-lymfocytů produkujících celou řadu cytokinů ve střevní mukóze u pacientů s nekompenzovanou celiakií, jejich aktivitu však nelze detekovat u zdravých kontrol a pacientů na bezlepkové dietě (Nilsen et al., 1995). Afinita vazby peptidů lepku na HLA molekuly II. třídy antigen prezentujících buněk je dána přítomností jejich konkrétních genetických variant DQ2, respektive DQ8, a zároveň je zvýšená po deaminaci glutaminových zbytků peptidů lepku tkáňovou transglutaminázou (Louka

& Sollid, 2003). Aktivace T-lymfocytů pak vede k produkci celé řady prozánětlivých cytokinů, především interferonu gama (IFN γ) a také k aktivaci B-buněk adaptivní buněčné složky imunitního systému, což v konečném důsledku vyústí v produkci protilátek proti tkáňové transglutamináze, jak již bylo zmíněno výše (Nilsen et al., 1998; Sollid, Molberg, McAdam, & Lundin, 1997). Přítomnost autoprotilátek proti transglutamináze je možné pozorovat i u jedinců, u nichž byl normální nález střevní biopsie. Lze to považovat za takzvaný preceliakální stav a u těchto jedinců můžeme s největší pravděpodobností předpokládat propuknutí choroby.

Výše popsané patofyziologické procesy ve střevě pak způsobují poškození buněk střevní sliznice – enterocytů, atrofii střevních klků či hyperplázii střevních krypt a vyvolávají tak příznaky typické pro celiakii. Schéma patofyziologie celiakie je znázorněno na obrázku číslo 6 (Mowat, 2003).



Obrázek 6 - Průběh patologické imunitní reakce ve střevě neléčeného celiaka, upraveno podle Mowat, 2003

1.2.4 Asociace celiakie s dalšími autoimunitními nemocemi

Asociace celiakie s některými jinými autoimunitními chorobami je již poměrně dlouho známá a byla prokázána mnoha studiemi. Například studie Viljamaa et al. potvrdila signifikantní korelaci mezi výskytem inzulin dependentního typu diabetu a celiakie, podobně je tomu tak například i u Sjörgenova syndromu. Nicméně zvýšená incidence u celiaků byla nalezena i pro psoriázu, revmatoidní artritidu, autoimunitní poruchy štítné žlázy (hypothyroidismus a hyperthyroidismus), IgA glomerulonefritidu nebo systémový lupus erythematosus (Viljamaa et al., 2005). Konkrétně prevalence celiakie je například u dospívajících pacientů s diabetem prvního typu až 10 %, nicméně důležitou roli hraje také čas uplynulý od diagnostikování diabetu a věk jedince v době stanovení diagnózy (DeVitis, Ghirlanda, & Gasbarrini, 1996). Dalším zajímavým faktem je i protektivní efekt bezlepkové diety na vznik autoimunitních onemocnění přidružených k celiakii. Incidence autoimunitních chorob u celiaků dodržujících bezlepkovou dietu se ve studii Cosnes et al. pohybovala okolo 5 %, kdežto u pacientů s nekompenzovanou celiakií byla tato incidence více jak 11 % (Cosnes et al., 2008).

1.2.4.1 Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu je autoimunitní onemocnění způsobené selektivní destrukcí inzulin produkujících beta buněk pankreatu autoreaktivními T-lymfocyty. Jedná se tedy o orgánově specifické onemocnění. Lze také o něm hovořit jako o multifaktoriálním – vliv na jeho vznik a manifestaci mají jak genetické, tak i environmentální faktory.

1.2.4.1.1 Genetika diabetu a další rizikové faktory

Mezi genetické faktory se řadí hlavně polymorfismus genů pro HLA II. třídy, stejně tak, jak tomu bylo i u celiakie. U diabetu mají vliv především alely genu *DRB1*, ale neméně důležitá je i častá přítomnost heterozygotní varianty HLA molekul DQ2/DQ8, konkrétně se tedy jedná o haplotyp DQA1*0501-DQB1*0201/DQA1*0301-DQB1*0302 (Decochez et al., 2005). Haplotypy však nemusí být pouze rizikové, ví se o několika, které mají protektivní povahu, a to konkrétně DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303 a DRB1*1401-DQA1*0101-DQB1*0503 (Erlich et al., 2008). Významnou protektivní roli v souvislosti s diabetem pak hraje také alela DQB1*0602 (Pugliese et al., 1995).

Rizikové pro vznik diabetu jsou ale i varianty některých non-HLA genů, konkrétně gen pro alfa řetězec interleukinu 2 (*IL-2R α*), který hraje důležitou roli během vývoje raných T-lymfocytů v brzlíku (Willerford et al., 1995). Obdobnou roli během negativní selekce lymfocytů má i produkt genu *CTLA-4*, jehož polymorfismus je též spojovaný se vznikem autoimunitního typu diabetu (Momin et al., 2009) a neméně důležité je také zmínit gen pro inzulin (*INS*), u něhož je zásadní délka jeho VNTR (variabilní počet tandemových repetic) v promotorové oblasti. Zde platí, že čím je počet repetic menší, tím větší riziko propuknutí nemoci má daný jedinec (Pugliese et al., 1997). Jedná se však o populačně specifickou asociaci platící pro evropské populace. Celkový počet genů, které jsou s tímto onemocněním spojovány, je ale daleko větší, v současné době je jich známo téměř na 500 (Jin et al., 2014).

U faktorů vnějšího prostředí může být někdy těžké prokázat souvislosti s nemocí, nicméně s ohledem na diabetes mellitus 1. typu je nejčastěji zmiňováno prodělání některých virových infekcí v dětství (například zarděnek či mononukleózy, která je způsobená virem Epstein-Barrové) (Chikazawa et al., 1985; Forrest, Menser, & Burgess, 1971).

Genetickou souvislost mezi celiakií a autoimunitním diabetem můžeme tedy nalézt nejenom pro HLA molekuly II. třídy, ale i mezi non-HLA geny (například u genu *CTLA-4*, jak již bylo probíráno výše). Studie Elias et al. potvrdila zvýšenou míru rizika propuknutí celiakie u dětských pacientů s diabetem, přičemž všem diabetikům z této studie byla stanovena diagnóza celiakie do 5 let od propuknutí prvních příznaků diabetu. Všichni jedinci mající obě tyto choroby byli nositeli alely DQ2 pro molekuly HLA II. třídy, a to buď ve formě homozygotní, nebo heterozygotní, případně to ještě byli složení heterozygoti DQ2/DQ8 (tuto genetickou variantu mělo celkem 57 % dětí) (Elias, Hoorweg-Nijman, & Balemans, 2015).

1.2.4.2 Psoriáza

Psoriáza neboli lupénka je dalším autoimunitním onemocněním, které bývá asociováno s celiakií (Birkenfeld, Dreiherr, Weitzman, & Cohen, 2009). Jedná se o chronické zánětlivé kožní onemocnění projevující se především nadměrným odlupováním pokožky nejčastěji v oblasti velkých kloubů (loket, koleno) nebo na hlavě. Rizikové faktory jsou kouření, některé léky nebo infekce a neméně důležitou roli hraje i genetika. Existuje řada lokusů, které jsou s psoriázou asociovány. Příkladem je oblast, kde leží gen *PSORS1* (z anglického psoriasis susceptibility 1).

Nachází se na 6. chromozómu v oblasti kódující HLA I. třídy, konkrétně v telomerickém regionu, který obsahuje geny pro HLA-C. Gen *PSORS1* je až z 50 % zodpovědný za vznik psoriázy (Nestle, Kaplan, & Barker, 2009). Dalším rizikovým faktorem pro vznik psoriázy je také varianta genu pro interleukin 12 β (IL12 β). S psoriázou je asociovaný především jeden rizikový SNP rs3212227. Tato asociace byla nejprve nalezená u japonské populace (Tsunemi et al., 2002), nicméně později se jí podařilo prokázat i u populací neasijských (Cargill et al., 2007). U severoamerické populace byla frekvence této mutace mezi pacienty trpícími psoriázou dokonce vyšší než u předchozí studie zkoumající zmiňovanou japonskou populaci (Cargill et al., 2007) (Tsunemi et al., 2002). Mezi kandidátními geny bych také ráda zmínila varianty HLA molekul II. třídy, konkrétně haplotypovou variantu DQB1*0601. Ve studii prováděné na japonské populaci vykazovali jedinci s psoriázou zvýšený výskyt této varianty oproti zdravým kontrolám (Saeki et al., 1998). Stejně tak tomu bylo i u alel DRB1*0701/2, DQA1*0201 a DQB1*0303 (Schmittegenolf, Boehncke, Stander, Eiermann, & Sterry, 1993). Rizikový haplotyp obsahující alelu DQA1*0201, konkrétně HLA-Cw*0602-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201, byl později identifikován jako rizikový také u evropské populace (Kastelan, Gruber, Cecuk-Jelicic, Grubic, & Kastelan, 2003).

U pacientů s psoriázou byla prokázána přítomnost specifických protilátek účastnících se patogeneze celiakie, tedy autoprotilátky proti transglutamináze a gliadinu (Michaelsson et al., 2000; Woo et al., 2004). Mimo to se týmu Michaelsson et al. také podařilo potvrdit, že pokud pacienti s celiakií, kteří trpí zároveň psoriázou, dlouhodobě dodržují bezlepkovou dietu, mohou velmi zmírnit kožní projevy.

2 Předpoklady a cíle diplomové práce

S ohledem na současné poznatky o genetice, patogenezí autoimunitních onemocnění a glaukomu, a zároveň na základě faktu, že některá autoimunitní onemocnění se vyskytují daleko častěji společně, jsme stanovili následující pracovní hypotézy:

- Genotyp zkoumaného jedince bude korelovat s jeho fenotypem.
- Přítomnost genetických rizikových markerů pro vybraná autoimunitní onemocnění ovlivní fenotyp glaukomu.

Pro lepší pochopení provázanosti koincidence autoimunitních chorob a glaukomu a prozkoumání dědičnosti daných onemocnění jsme pak stanovili cíle této diplomové práce:

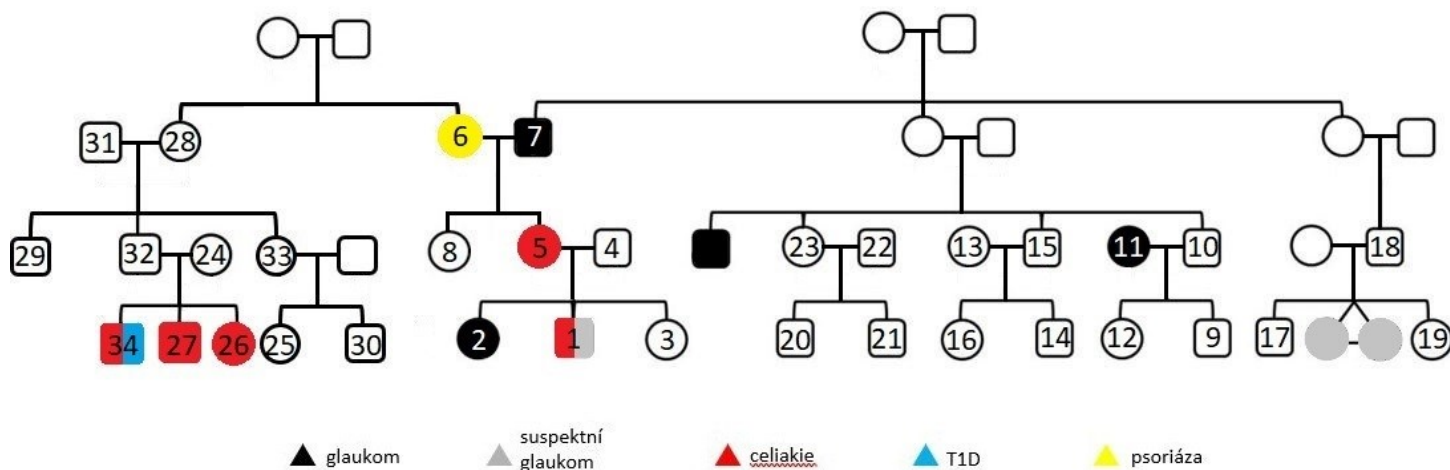
- Na základě dostupných publikací vybrat a zmapovat přítomnost rizikových genetických markerů v rodině s potvrzeným i suspektním glaukomem a autoimunitními chorobami (celiakie, T1D, psoriáza).
 - Dílčí cíl: Navrhnout primery pro dané rizikové genetické varianty a optimalizovat podmínky PCR reakcí.
- Na modelu třígenerační rodiny s mnohonásobným výskytem autoimunitních onemocnění a glaukomu ověřit, zda daný genotyp koreluje s fenotypem jedinců a prozkoumat tento vztah (genotyp-fenotyp).

3 Materiál a metody

Výchozím materiálem této studie byly vzorky slin od celkem 34 probandů, kteří pocházejí z jedné rodiny. Vzorky byly získány celkem ze tří generací této rodiny a po celou dobu studie byly zpracovávány pod číselnými kódy GG001–GG034 (znázorňuje obrázek číslo 7). Všichni jedinci podepsali informovaný souhlas (v případě nezletilých jejich zákonní zástupci) se zpracováním a nakládáním s jejich DNA materiálem. Jednotlivé procesy zpracování vzorků slin zahrnují izolaci samotné DNA a následně různé genotypizační techniky vycházející z metody PCR (polymerázová řetězová reakce), polymorfismus délky restričních fragmentů, sekvenování, vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) a genotypizace alel HLA metodou SSP-PCR (PCR se sekvenčně specifickými primery) Olerup.

3.1 Probandi

Za probandy bylo vybráno 34 členů jedné celkově třígenerační rodiny, ve které se vyskytují různé typy glaukomu a zároveň se v jejich rodinné anamnéze nachází též autoimunitní choroby – diabetes mellitus 1. typu, celiakie a psoriáza.



Obrázek 7 - Rodokmen studované rodiny s vyznačeným výskytem onemocnění. Studie se zúčastnili číselně označení probandi, čísla znázorňují kódy jednotlivých probandů (GG001–GG034 ~ 1–34).

Tab. 1 – Výskyt konkrétních onemocnění u sledovaných jedinců

Kód jedince	Adultní glaukom (POAG)	Juvenilní glaukom (JOAG)	Suspektní glaukom	Celiakie	T1D	Psoriáza
GG001			x	x		
GG002		x				
GG003						
GG004						
GG005				x		
GG006						x
GG007	x					
GG008						
GG009						
GG010						
GG011	x					
GG012						
GG013						
GG014						
GG015						
GG016						
GG017						
GG018						
GG019						
GG020						
GG021						
GG022						
GG023						
GG024						
GG025						
GG026				x		
GG027				x		
GG028						
GG029						
GG030						
GG031						
GG032						
GG033						
GG034				x	x	

Za adultní formu glaukomu považujeme takovou, která byla danému jedinci diagnostikována po 40. roce jeho života, opakem je pak juvenilní glaukom. Mezi jedinci se suspektním glaukodem jsou ti, kterým glaukom nebyl doposud diagnostikován, jsou však sledováni pro zvýšený nitrooční tlak.

3.2 Sběr materiálu

Ke genetické analýze členů rodiny jsme zvolili metodu izolace DNA ze vzorků slin. Vzorky jsme sbírali do sběrných zkumavek obsahujících stabilizační roztok (GeneFiX™ Saliva collectors – Isohelix), proto než jsme přistoupili k samotné izolaci DNA, mohly být tyto vzorky skladovány při pokojové teplotě. Před odběrem bylo nutné dodržet, aby probandi 30 minut nic nepili, nejedli, nekouřili a nečistili si zuby.

3.3 Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí GeneFiX™ Saliva Mini izolačního kitu (Isohelix). Princip spočívá v zachycení DNA na silikátové membráně, která se nachází v kolonce, a následném uvolnění a získu purifikované DNA. Vzorky slin pro izolaci byly umístěny v 10ml sběrných zkumavkách, které již obsahovaly 1 ml stabilizačního roztoku, tak, aby výsledný objem sběrných zkumavek před izolací činil 2 ml (1 ml slin + 1 ml stabilizačního roztoku). Pokud byl objem ve sběrných zkumavkách větší než 2 ml, bylo potřeba přebytečnou tekutinu odebrat.

Protokol:

Použité chemikálie

Součástí kitu Isohelix GeneFiX™ Saliva DNA Mini Kit pro vzorek slin o objemu 0.5–1 ml:

- Proteináza K
- Promývací pufr (WB)
- Eluční pufr (EB)

Dále:

- EtOH (96%) (P-LAB a.s., Praha)
- dH₂O ze systému MILLIPORE Gradient, Milli-Q

Postup

1. 10ml zkumavku se stabilizačním roztokem a se vzorkem slin jsme důkladně zvortexovali.
2. Následně jsme odebrali tolik tekutiny, aby ve zkumavce zbyly přesně 2 ml.
3. K těmto 2 ml jsme připipetovali 20 µl roztoku Proteinázy K, zamíchali pomocí vortexu a dali inkubovat při 60 °C na 1 hodinu.

4. Mezitím jsme si do 1,5ml mikrozkušavky napipetovali potřebné množství elučního pufru (100 μ l/vzorek) a umístili na 70 °C do suchého bloku.
5. Po hodině inkubace jsme vyndali vzorky z inkubátoru a přidali k nim po 2 ml ethanolu ke každému vzorku. Zvortexovali jsme.
6. Kolonku s membránou jsme umístili do sběrné zkumavky a na kolonku napipetovali 700–750 μ l vzorku. Sběrné zkumavky s kolonkou jsme umístili do centrifugy a stočili při 13400 rmp po dobu jedné minuty. Filtrát jsme vylili.
7. Tento krok jsme opakovali, dokud jsme do kolonky nenapipetovali celý objem našeho vzorku.
8. Kolonku jsme propláchli pomocí 750 μ l promývacího WB pufru, stočili při 13400 rmp na centrifuze 1 minutu a obsah sběrné zkumavky následně vylili.
9. Tento krok jsme ještě jednou zopakovali.
10. Kolonku jsme pak umístili na čistou sběrnou zkumavku a centrifugovali jsme 3 minuty při 13400 rmp, abychom se zbavili všech zbytků ethanolu.
11. Kolonku jsme přendali do čisté 1,5ml mikrozkušavky a napipetovali 100 μ l na 70 °C přehřátého EB pufru ke každému vzorku.
12. Vzorky jsme takto inkubovali 3 minuty při pokojové teplotě a následně stočili na centrifuze 1 minutu při 13400 rmp, čímž se uvolnila DNA ze silikátové membrány v kolonce do mikrozkušavky.
13. Po provedení izolace DNA bylo nutné změřit koncentraci a čistotu DNA na spektrofotometru Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific). Výsledné koncentrace pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulce číslo 2.
14. Vzorky jsme následně skladovali při -20 °C v mrazáku.

3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR slouží k amplifikaci produktů konkrétní délky, které jsou ohraničeny sekvencemi specifických primerů a dané produkty taktéž obsahují studovaná variabilní místa (SNP). Bylo tedy třeba pro všechny konkrétní genetické varianty navrhnout primery pro PCR reakce.

3.4.1 Návrh primerů a optimalizace PCR

Primery byly navrhovány podle sekvencí dostupných z internetových databází (Ensembl, National Center for Biotechnology Information (NCBI) (URL2 a URL3)) tak, aby pokud možno nenasedaly na jiný úsek lidské genomové DNA. Pro tuto analýzu byla využita internetová platforma BLAST na stránkách NCBI („Nucleotide – Primer BLAST“) (URL4). U vhodných primerů, vázajících se pouze na úsek DNA v oblasti obsahující sledované jednonukleotidové polymorfismy, byla dále ověřována hodnota volné energie, se kterou jsou primery ochotny tvořit sekundární struktury – dimery, self-dimery nebo vlásenky. K tomu posloužil algoritmus na stránkách Integrated DNA technologies (IDT) (URL5), kde byla po zadání sekvence obou primerů vypočítána hodnota volné energie, a nakonec vybrány nejvhodnější páry primerů.

Poté bylo nutné ověřit vhodné podmínky daných párů primerů pro PCR reakci – tedy různé koncentrace reagensů a teploty nasedání primerů. Výsledky optimalizačních reakcí byly poté vyhodnoceny na základě provedené elektroforetické separace, jejíž metodologie je popsána níže.

Protokol:

Použité chemikálie

- 5U/μl Taq DNA polymeráza (Life Technologies, USA)
- 25mM MgCl₂ (Fermentas-Thermofisher Scientific, Litva)
- 10× Taq pufr s (NH₄)₂SO₂ (Life Technologies, USA)
- dNTPs (každý 10mM, zásobní roztok 100mM) (Life Technologies, USA)
- primery (přímý/zpětný) 50 μM (Integrated DNA Technologies, Belgie)
- dH₂O ze systému MILLIPORE Gradient, Milli-Q

Postup

1. Všechny reagenty nutné k přípravě mastermixu v laminárním boxu (kromě Taq DNA polymerázy) jsme nejprve vyndali z mrazáku a rozmrazili za pokojové teploty.
2. Následně jsme připravili mastermix – a to dle protokolů získaných po optimalizačních reakcích (viz následující kapitola).
3. Mastermix bez polymerázy jsme pak zvortexovali.
4. Přidali jsme polymerázu. Po přidání polymerázy bylo nutné pracovat na ledu, aby nezačala pracovat nespecificky.
5. Poté jsme mastermix rozpipetovali do mikrokumavek, vždy 20 μ l mastermixu na jednu reakci (vzorek).
6. Následná práce s DNA probíhala již mimo laminární box. Do jednotlivých mikrokumavek jsme připipetovali 0,5 μ l DNA, jejíž koncentrace byla minimálně 30 ng/ μ l, do negativní kontroly stejné množství vody.
7. Na termocykleru C1000TM Thermal cycler (Biorad; Professional Thermocycler spol. Biometra, An Analytic Jena Company), ve kterém probíhala samotná PCR reakce, jsme nastavili vhodné podmínky a spustili program (viz následující kapitola), po nahřátí víka na 96 °C jsme vložili vzorky a víko zavřeli.
8. Úspěšnost PCR reakcí jsme ověřovali pomocí elektroforetické separace.
9. Vzorky jsme pak uchovávali v mrazáku při -20 °C, krátkodobé skladování (v řádu dnů) bylo v lednici při 4 °C.

3.4.2 PCR pro jednotlivé SNP

1. gen *OPTN*

- **rs28939688** (amplikon 290 bp)

- Přímý primer 5' – TGC AAT GTC CCA TCA ACC TCT – 3'
- Zpětný primer 5' – CAC CAG CTA CCA CCT ATG GAA – 3'
- Reakční podmínky:
 - Úvodní denaturace: 96 °C (3 minuty)
 - Denaturace: 96 °C (25 sekund)
 - Hybridizace: 56 °C (25 sekund)
 - Extenze: 72 °C (25 sekund) } 30x
- Konečná extenze: 72 °C (2 minuty)
- Konec: 4 °C (nekonečno)
- Složení reakční směsi pro 1 vzorek (celkem 20 µl):
 - dH₂O: 15,16 µl
 - 10x pufr: 2 µl
 - 10mM dNTPs: 0,4 µl
 - 2mM MgCl₂: 1,6 µl
 - 800nM přímý primer: 0,32 µl
 - 800nM zpětný primer: 0,32 µl
 - Taq polymeráza (5U/µl): 0,2 µl

- **rs75654767** (amplikon 138 bp)

- Přímý primer 5' – TCG CCA TCT GTT CTT CAA GTG – 3'
- Zpětný primer 5' – ACT TGG GGC AGG AAT GAA TCG – 3'

- Reakční podmínky:
 - Úvodní denaturace: 96 °C (3 minuty)
 - Denaturace: 96 °C (25 sekund)
 - Hybridizace: 57 °C (25 sekund)
 - Extenze: 72 °C (25 sekund)
 - Konečná extenze: 72 °C (2 minuty)
 - Konec: 4 °C (nekonečno)

- Složení reakční směsi pro 1 vzorek (celkem 20 µl):
 - dH₂O: 15,16 µl
 - 10x pufr: 2 µl
 - 10mM dNTPs: 0,4 µl
 - 2mM MgCl₂: 1,6 µl
 - 800nM přímý primer: 0,32 µl
 - 800nM zpětný primer: 0,32 µl
 - Taq polymeráza (5U/µl): 0,2 µl

- **rs11258194** (amplikon 306 bp)
 - Přímý primer 5' – AGA AAC AGA AGG AAG AAC GCC A – 3'
 - Zpětný primer 5' – GGG CAA CCA ATC TTT TCA GCA – 3'
 - Reakční podmínky:
 - Úvodní denaturace: 96 °C (3 minuty)
 - Denaturace: 96 °C (25 sekund)
 - Hybridizace: 56 °C (25 sekund)
 - Extenze: 72 °C (25 sekund)
 - Konečná extenze: 72 °C (2 minuty)
 - Konec: 4 °C (nekonečno)

- Složení reakční směsi pro 1 vzorek (celkem 20 µl):
 - dH₂O: 15,16 µl
 - 10x pufr: 2 µl
 - 10mM dNTPs: 0,4 µl

- 2mM MgCl₂: 1,6 μl
- 800nM přímý primer: 0,32 μl
- 800nM zpětný primer: 0,32 μl
- Taq polymeráza (5U/μl): 0,2 μl

2. gen *PAX6*

- **rs1057517785** (amplikon 244 bp)
 - Přímý primer 5' – CAG TTT CCT CCT TCA CAT CTG GCT – 3'
 - Zpětný primer 5' – AGC CAA TCA CTG TAG TGC GA – 3'
 - Reakční podmínky:
 - Úvodní denaturace: 96 °C (3 minuty)
 - Denaturace: 96 °C (25 sekund)
 - Hybridizace: 56 °C (25 sekund)
 - Extenze: 72 °C (25 sekund)
 - Konečná extenze: 72 °C (2 minuty)
 - Konec: 4 °C (nekonečno)
- Složení reakční směsi pro 1 vzorek (celkem 20 μl):
 - dH₂O: 15,16 μl
 - 10x pufr: 2 μl
 - 10mM dNTPs: 0,4 μl
 - 2mM MgCl₂: 1,6 μl
 - 800nM přímý primer: 0,32 μl
 - 800nM zpětný primer: 0,32 μl
 - Taq polymeráza (5U/μl): 0,2 μl

3. gen *MYOC*

- **rs74315329, rs74315330** (amplikon 177 bp)
 - Přímý primer 5' – GCC TCA TCG GTG CTG TAA AT – 3'
 - Zpětný primer 5' – CGC TGA GTC CAG AAC TGT CAT A – 3'

- Reakční podmínky:
 - Úvodní denaturace: 94 °C (5 minut)
 - Denaturace: 94 °C (21 sekund)
 - Hybridizace: 56 °C (21 sekund)
 - Extenze: 72 °C (21 sekund)
 - Konečná extenze: 72 °C (2 minuty)
 - Konec: 4 °C (nekonečno)

- Složení reakční směsi pro 1 vzorek (celkem 20 µl):
 - dH₂O: 15,6 µl
 - 10x pufr: 2 µl
 - 10mM dNTPs: 0,4 µl
 - 1,5mM MgCl₂: 1,2 µl
 - 800nM přímý primer: 0,3 µl
 - 800nM zpětný primer: 0,3 µl
 - Taq polymeráza (5U/µl): 0,2 µl

4. gen *WDR36*

- **rs34595252** (amplikon 192 bp)
 - Přímý primer 5' – AAA ACA TTT TCT GCA TCT CTT ATC C – 3'
 - Zpětný primer 5' – TGG GAA GTT GCC AGA AAG TCT – 3'
 - Reakční podmínky:
 - Úvodní denaturace: 96 °C (3 minuty)
 - Denaturace: 96 °C (20 sekund)
 - Hybridizace: 53 °C (20 sekund)
 - Extenze: 72 °C (20 sekund)
 - Konečná extenze: 72 °C (2 minuty)
 - Konec: 4 °C (nekonečno)

- Složení reakční směsi pro 1 vzorek (celkem 20 μ l):
 - dH₂O: 15,16 μ l
 - 10x pufr: 2 μ l
 - 10mM dNTPs: 0,4 μ l
 - 2mM MgCl₂: 1,6 μ l
 - 800nM přímý primer: 0,32 μ l
 - 800nM zpětný primer: 0,32 μ l
 - Taq polymeráza (5U/ μ l): 0,2 μ l

5. gen *TLR4*

- **rs4986790** (amplikon 188 bp)
 - Přímý primer 5' – AGC ATA CTT AGA CTA CTA CCT CCA TG – 3'
 - Zpětný primer 5' – GAG AGA TTT GAG TTT CAA TGT GGG – 3'
 - Reakční podmínky:
 - Úvodní denaturace: 95 °C (10 minut)
 - Denaturace: 95 °C (90 sekund) } 35x
 - Hybridizace: 55 °C (1 minuta) }
 - Extenze: 72 °C (30 sekund) }
 - Konečná extenze: 72 °C (10 sekund)
 - Konec: 4 °C (nekonečno)
 - Složení reakční směsi pro 1 vzorek (celkem 20 μ l):
 - dH₂O: 14,76 μ l
 - 10x pufr: 2 μ l
 - 1000 nM dNTPs: 0,4 μ l
 - 2 mM MgCl₂: 2 μ l
 - 800 nM přímý primer: 0,32 μ l
 - 800 nM zpětný primer: 0,32 μ l
 - Taq polymeráza (5U/ μ l): 0,2 μ l

3.5 Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)

Po úspěšném proběhnutí PCR reakcí pro jednotlivé vybrané polymorfismy bylo nutné provést analýzu jejich přítomnosti. Jednou z metod bylo využití analýzy pomocí RFLP.

Nejprve tedy bylo nutné ověřit, zda pro daný polymorfismus existuje nějaký restriční enzym, který štěpí pouze v přítomnosti (či nepřítomnosti) mutantní alely. K tomu jsme využívali webovou platformu RestrictionMapper a Genscript (URL6 a URL7). Takto jsme našli enzymy pro celkem 6 z námi studovaných polymorfismů. Reakční podmínky pro jednotlivé SNP včetně jejich výčtu jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 2 – Tabulka s vybranými restričními enzymy pro dané SNP

SNP	Restriční enzym
rs75654767 rs34595252	TseI
rs11258194	StuI
rs4986790	NcoI
rs74315329	AlwI
rs74315330	TaaI

Protokol:

Použité chemikálie

- Fastdigest TseI 5 U/μl (New England BioLabs, Velká Británie)
- Fastdigest StuI 10 U/μl (New England BioLabs, Velká Británie)
- Fastdigest NcoI 10 U/μl (New England BioLabs, Velká Británie)
- Fastdigest AlwI 10 U/μl (New England BioLabs, Velká Británie)
- TaaI 10 U/μl (Fermentas-Thermo Fisher Scientific, USA)
- 10× Buffer (New England BioLabs, Velká Británie)
- 25mM MgCl₂ (Fermentas-Thermo Fisher Scientific, USA)
- dH₂O ze systému MILLIPORE Gradient, Milli-Q

Postup

1. Všechny reagenty nutné k přípravě reakční směsi v laminárním boxu (kromě restričních enzymů, s nimi jsme dále pracovali na ledu) jsme nejprve vyndali z mrazáku a rozmrazili za pokojové teploty.
2. Následně jsme si připravili reakční směs podle podmínek pro jednotlivé enzymy (viz níže).
3. Reakční směs jsme zvortexovali a rozpipetovali po 5 μ l do mikrozkušavek.
4. Následně jsme do každé mikrozkušavky přidali 5 μ l PCR produktu určeného ke štěpení.
5. Na termocykleru C1000TM Thermal cycler (Biorad; Professional Thermocycler spol. Biometra, An Analytic Jena Company) jsme nastavili vhodné podmínky a spustili program (pro konkrétní enzymy odlišný, viz níže).
6. Vyhodnocovali jsme pomocí elektroforetické separace.

A. gen *OPTN*

- **rs75654767** (amplikon 138 bp)
 - Enzym TseI rozděluje amplikon na fragmenty o délce 98 a 40 bp v přítomnosti mutantní alely A (záměna G>A)
 - Reakční podmínky:
 - Restrikce při 65 °C celkem 30 minut
 - Složení reakční směsi pro 1 vzorek:
 - dH₂O: 2,5 μ l
 - 10x pufr: 0,5 μ l
 - Restriční enzym: 0,5 μ l
 - 25 mM MgCl₂: 1,5 μ l
- **rs11258194** (amplikon 306 bp)
 - Enzym StuI rozděluje amplikon na fragmenty o délce 66 a 240 bp v přítomnosti mutantní alely A (záměna T>A)
 - Reakční podmínky:
 - Restrikce při 37 °C celkem 30 minut

- Složení reakční směsi pro 1 vzorek:
 - dH₂O: 2,5 µl
 - 10x pufr: 0,5 µl
 - Restrikční enzym: 0,5 µl
 - 25 mM MgCl₂: 1,5 µl

B. gen *MYOC*

- **rs74315329** (amplikon 177 bp)

- Enzym AlwI štěpí v přítomnosti mutantní alely A (tranzice G>A) a zároveň také v přítomnosti wild type alely G u druhého vybraného SNP rs74315330 (nutná podmínka pro štěpení tímto enzymem). Mohou tedy nastat následující varianty:
 - V případě přítomnosti wild type alely G u obou SNP enzym neštěpí a přítomný bude pouze fragment o délce 177 bp
 - Je-li přítomná mutace (alela A) u rs74315329 a wild type alela G u rs74315330, enzym štěpí a fragmenty budou dlouhé 91 a 86 bp
 - V přítomnosti wild type alely G u rs74315329 a mutantní alely A u rs74315330 nebude enzym štěpit a bude přítomný pouze fragment o délce 177 bp
- Reakční podmínky:
 - Restrikce při 37 °C celkem 30 minut
 - Inaktivace enzymu při 80 °C celkem 20 minut
- Složení reakční směsi pro 1 vzorek:
 - dH₂O: 2,5 µl
 - 10x pufr: 0,5 µl
 - Restrikční enzym: 0,5 µl
 - 25 mM MgCl₂: 1,5 µl

- **rs74315330** (amplikon 177 bp)

- Enzym Taal štěpí v přítomnosti wild type alely G (tranzice G>A) a zároveň se v sekvenci amplikonu vyskytuje ještě další dvě štěpná místa pro tento enzym. Tento fakt lze využít jako kontrolu správnosti štěpení enzymu. Mohou nastat následující varianty:

- V případě přítomnosti wild type alely G rozdělí enzym amplikon na fragmenty o délkách: 88 bp, 44 bp, 30 bp, 15 bp
- Je-li přítomná mutace (alela A), budou fragmenty dlouhé: 133 bp, 30 bp, 15 bp
- Neštěpí-li enzym správně, bude přítomný 1 fragment o délce 177 bp
- Reakční podmínky:
 - Restrikce při 65 °C celkem 120 minut
- Složení reakční směsi pro 1 vzorek:
 - dH₂O: 2,5 µl
 - 10x pufr: 0,5 µl
 - Restrikční enzym: 0,5 µl
 - 25 mM MgCl₂: 1,5 µl

C. Gen *WDR36*

- **rs34595252** (amplikon 192 bp)
 - Enzym TseI rozděljuje amplikon na fragmenty o délce 69 a 123 bp v přítomnosti mutantní alely C (tranzice T>C)
 - Reakční podmínky:
 - Restrikce při 65 °C celkem 30 minut
 - Složení reakční směsi pro 1 vzorek:
 - dH₂O: 2,5 µl
 - 10x pufr: 0,5 µl
 - Restrikční enzym: 0,5 µl
 - 25 mM MgCl₂: 1,5 µl

D. gen pro TLR4

- **rs4986790** (amplikon 188 bp)
 - Enzym NcoI rozděljuje amplikon na fragmenty o délce 168 a 20 bp v přítomnosti mutantní alely G (tranzice A>G)
 - Reakční podmínky:
 - Restrikce při 37 °C celkem 15 minut
 - Denaturace enzymu při 80 °C celkem 20 minut

- Složení reakční směsi pro 1 vzorek:
 - dH₂O: 2,5 µl
 - 10x pufr: 0,5 µl
 - Restrikční enzym: 0,5 µl
 - 25 mM MgCl₂: 1,5 µl

3.6 HLA genotypizace

HLA genotypizaci jsme prováděli pomocí kitu Olerup SSP DQA1*02, 05; DQB1*02,03:02 3G5 od firmy CareDx (Německo).

Testovali jsme i použití kitu Histotype Celiac Disease (Bag Health Care, Německo), nicméně se nepodařilo optimalizovat reakční podmínky. Důvodem mohl být nevhodně zvolený postup při izolaci DNA či nedostatečná robustnost daného kitu.

Protokol:

Použité chemikálie

- Mastermix s polymerázou (součást kitu)
- DNA o ideální koncentraci 30 ng/µl a čistotě A260/A280 = 1,6–2,0
- dH₂O ze systému MILLIPORE Gradient, Milli-Q

Postup

1. Nejprve jsme nechali rozmraznout mastermix při pokojové teplotě.
2. Poté jsme připravili reakční směs dle následujících údajů (pro 1 vzorek DNA):
 - 69 µl Master mix
 - 46 µl DNA
 - 115 µl dH₂O
3. Reakční směs jsme krátce zvortexovali a stočili na mikrocentrifuze.
4. Připravili jsme si stripy, které jsou součástí kitu, s 24 jamkami. Každá jamka již obsahovala příslušné páry primerů pro každou reakci.
5. Následně jsme pipetovali 10 µl reakční směsi do prvních 23 jamek stripu, do poslední 24. jamky jsme pipetovali 8 µl Master mixu a 2 µl vody. Poslední jamka tedy sloužila jako negativní kontrola.

6. Strip s napipetovanou reakční směsí jsme stočili v centrifuze vychlazené na 4 °C po dobu jedné minuty při 12000 rpm.
7. Na termocykleru jsme nastavili následující program a po nahřátí víka na 96 °C i bloku vložili strip se vzorky.
 - 1 cyklus: 94 °C (2 minuty)
 - 10 cyklů: 94 °C (10 sekund)
65 °C (1 minuta)
 - 20 cyklů: 94 °C (10 sekund)
65 °C (50 sekund)
72 °C (30 sekund)
 - Konec: 4 °C (nekonečno)
8. Produkty jednotlivých reakcí jsme vizualizovali pomocí elektroforetické separace.
9. Následné vyhodnocení a stanovení finálního genotypu jsme prováděli pomocí interpretační tabulky, jež byla součástí kitu.

3.7 Elektroforetická separace

Metodu elektroforetické separace jsme využívali k ověřování úspěšnosti proběhlých PCR reakcí (včetně optimalizačních), vyhodnocování reakcí využívajících restričních enzymů a také k vyhodnocování výsledků genotypizace HLA alel.

Protokol:

Použité chemikálie

- Agaróza (Sigma Aldrich, Česká republika)
- 10× TBE pufr – 500 ml H₂O, 180 g Tris, 55 g kyseliny borité, 40 ml EDTA doplněné do 1 000 ml vodou
 - 890mM Tris base (Amresco, USA)
 - 890mM kyselina boritá (Serva Electrophoresis GmbH, Německo)
 - 25mM EDTA (ph 8) (Roth, Německo)
- GelRed, 10 000x koncentrovaný ve vodě (C-Consulting, Slovensko)
- 6× Loading Dye Solution (Life Technologies, USA)
- DNA marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermofisher Scientific, USA)

- dH₂O ze systému MILLIPORE Gradient, Milli-Q

Postup

1. Pro přípravu 2% agarózového gelu (ověření produktů PCR, HLA genotypizace, výsledky reakcí s restrikčními enzymy) jsme rozpustili 2 g agarózy ve 100 ml 0,5× TBE pufru. Pro přípravu 2,5% agarózového gelu (ověření produktů štěpení enzymem NcoI) jsme rozpustili 2,5 g agarózy ve 100 ml TBE pufru.
2. Tento roztok jsme následně vařili v mikrovlnné troubě.
3. Po jeho zchladnutí na cca 60 °C jsme přidali 2,5 µl interkalačního činidla GelRed a směs dobře promíchali.
4. Zchladlý gel s interkalačním barvivem jsme nalili do elektroforetické vany a přidali hřebeny pro vytvoření jamek na vzorky a nechali jsme dobře zatuhnout (cca 30 minut).
5. Po zatuhnutí jsme vyndali hřebeny a vanu naplnili 0,5× TBE až byl gel úplně ponořený.
6. Poté jsme pipetovali vzorky do jednotlivých jamek – po 5 µl vzorku smíchaného s 2 µl nanášecí barvy (u HLA typizace pouze 10 µl produktu). Do první jamky pak vždy přišlo 0,8 µl DNA markeru opět smíchaného s 2 µl nanášecí barvy.
7. Vanu jsme přiklopili víkem a nechali probíhat elektroforézu 20–45 minut při stejnosměrném napětí 95–140 V (zdroj PowerPac Basis Power Supply, Biorad) v závislosti na velikosti elektroforetické vany.
8. Výsledky jsme vizualizovali pomocí UV transluminátoru Gel-Doc XR (Biorad).

3.8 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

Pro analýzu genotypů SNP rs28939688 a rs1057517785 jsme použili metodu HRM. Ta je založená na odlišné schopnosti denaturace dvouřetězcového vlákna DNA v závislosti na konkrétní sekvenci. Postupnou denaturací dvojlákna se uvolňuje fluorescenční barvivo a tento fluorescenční signál je snímán pomocí speciálního přístroje. Následuje analýza křivek tání znázorňující závislost intenzity zachycené fluorescence na příslušné teplotě, při níž došlo k disociaci molekuly.

Nejprve však bylo nutné vzorky pro tuto analýzu připravit. K již hotovému PCR produktu jsme přidali fluorescenční barvičku LC Green Plus dle následujícího protokolu.

Protokol:

Použité chemikálie, reagentie a přístroje

LC Green Plus (BioFire Diagnostics, USA)

dH₂O ze systému MILLIPORE Gradient, Milli-Q

PCR produkty k daným SNP

Lightcycler 480 RealTime PCR 384-well (LifeSciences, Roche)

Postup

1. Nejprve jsme si připravili v laminárním boxu LC Green Mastermix. Pro jeden vzorek byl objem takového mastermixu 5 μ l, přičemž obsahoval:
 - 0,5 μ l LC Green Plus
 - 4,5 μ l dH₂O
2. LC Green Mastermix jsme následně jemně promíchali pomocí pipety a napipetovali do 384 jamkové destičky a přidali do každé jamky 5 μ l PCR produktu.
3. Výsledný objem směsi pro HRM analýzu v každé jamce tedy činil 10 μ l.
4. Destičku s napipetovanými vzorky jsme stočili v centrifuze (Eppendorf 5804 R) po dobu 1 minuty při 800 rmp.
5. Následně jsme destičku vložili do přístroje LC 480 a spustili následující program:
 - 95 °C (1 minuta)
 - 40 °C (1 minuta)
 - 60 °C (1 sekunda)
 - 95 °C (1 sekunda) – pokračování
 - o Ramp hodnota 0,02 °C/s
 - o Akvizice 25/°C
6. Z křivek prvního kola HRM analýzy jsme stanovili hlavní teplotní pík pro rs28939688 88,5°C a pro rs1057517785 88 °C a následně spustili druhé kolo dle následujících podmínek:
 - 95 °C (1 minuta)
 - 40 °C (1 minuta)
 - 65 °C (1 sekunda)

- 95 °C (1 sekunda) – pokračování
 - o Ramp hodnota 0,02 °C/s
 - o Akvizice 25/°C
- 7. Následně jsme pomocí programu LC480 Software v1.5.1 provedli analýzu křivek tání.
- 8. Pro ověření výsledků jsme vybrali pro každý SNP 4 vzorky, které byly připraveny dle protokolu pro sekvenační analýzu a následně odeslány na sekvenaci.

3.9 Sekvenování

Za pomoci sekvenačních reakcí jsme ověřovali funkčnost restričních enzymů a přítomnost konkrétních genotypů – tedy zda je daný proband homozygot pro majoritní alelu, homozygot pro minoritní alelu či heterozygot.

K přípravě vzorků na sekvenaci jsme využívali produktů PCR reakcí pro jednotlivé SNP, protokoly viz výše.

Protokol:

Použité chemikálie

- 5× sekvenační pufr (Applied Biosystems, USA)
- 800nM přímé a zpětné primery (navržené již pro předchozí PCR reakce)
- Sekvenační kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA)
- dH₂O ze systému MILLIPORE Gradient, Milli-Q
- 96% EtOH (P-LAB, a.s., Praha)
- 70% EtOH připravený naředěním 96% EtOH (P-LAB, a.s., Praha)

Postup

1. Reakční směs jsme připravili dle následujícího schématu:

- Sekvenační pufr (5×): 2 µl
- Přímý nebo zpětný primer (800nM): 1 µl
- Amplikon (z předchozích PCR reakcí): 2,5 µl
- Sekvenační kit: 1 µl
- dH₂O: 3,5 µl

2. Na termocykleru jsme nastavili následující reakční podmínky a po nahřátí víka na 96 °C spustili reakci.
 - 96 °C (3 minuty)
 - 96 °C (10 sekund)
 - 50 °C (5 sekund)
 - 60 °C (3 minuty)

} 35x
3. Poté jsme prováděli přečistění vzorků. Nejprve jsme přidali 28 μ l 96% EtOH k 10 μ l sekvenační směsi a inkubovali 15 minut při pokojové teplotě.
4. Stočili jsme na centrifuze 20 minut při 12000 rpm. Supernatant jsme odstříkli.
5. Následně jsme přidali 50 μ l 70% EtOH k peletě a centrifugovali 10 minut (12000 rpm). Opět jsme provedli odstříknutí supernatantu.
6. Nakonec jsme vzorky inkubovali až do úplného vysušení.

Samotná sekvenační analýza pak byla provedena v laboratoři sekvenace DNA v Biotechnologickém a biomedicínském centru Akademie věd České republiky a Univerzity Karlovy ve Vestci (BIOCEV) na přístroji Genetic Analyzer 3500 (dvacetičtyřkapilární) od firmy Applied Biosystems.

3.10 Statistické zpracování

Pro statistickou analýzu výsledků jsme používali program GraphPad Prism 6. K porovnávání různých skupin jedinců mezi sebou jsme využívali Fisherův exaktní test s použitím kontingenčních tabulek (2 \times 2) a s provedením Yatesovy korekce v případě četností < 5. Hladina významnosti byla 0,05, konfidenční interval 95 %. Následně jsme ještě prováděli Bonferroniho korekci na mnohačetná pozorování, získali jsme tak korigovanou P hodnotu (P_k).

4 Výsledky

4.1 Návrhy primerů a optimalizace PCR reakcí

Jak již bylo zmíněno výše, pro každý z vybraných SNP asociovaných s glaukomem jsme navrhovali originální pár primerů pro dosažení co nejspecifičtějšího nasednutí pouze na jedno konkrétní místo v lidském genomu. Tato skutečnost byla ověřována pomocí algoritmu Primer BLAST na webových stránkách National Center for Biotechnology Information (NCBI) (URL4). Dále jsme ještě prověřovali hodnotu jejich volných energií, se kterou by byly ochotny tvořit heterodimery, self-dimery nebo vlásenky. Sekvence jednotlivých párů primerů, které jsme takto navrhli, jsou uvedeny v následující tabulce. Pro rs4986790 jsme použili již ověřené primery, reakční podmínky a složení reakční směsi dle již zavedeného protokolu Laboratoře molekulární antropologie.

Tab. 3 - Sekvence primerů pro dané SNP

SNP	Přímý primer	Zpětný primer
rs28939688	5' – TGC AAT GTC CCA TCA ACC TCT – 3'	5' – CAC CAG CTA CCA CCT ATG GAA – 3'
rs75654767	5' – TCG CCA TCT GTT CTT CAA GTG – 3'	5' – ACT TGG GGC AGG AAT GAA TCG – 3'
rs11258194	5' – AGA AAC AGA AGG AAG AAC GCC A – 3'	5' – GGG CAA CCA ATC TTT TCA GCA – 3'
rs74315329	5' – GCC TCA TCG GTG CTG TAA AT – 3'	5' – CGC TGA GTC CAG AAC TGT CAT A – 3'
rs74315330	5' – GCC TCA TCG GTG CTG TAA AT – 3'	5' – CGC TGA GTC CAG AAC TGT CAT A – 3'
rs1057517785	5' – CAG TTT CCT CCT TCA CAT CTG GCT – 3'	5' – AGC CAA TCA CTG TAG TGC GA – 3'
rs34595252	5' – AAA ACA TTT TCT GCA TCT CTT ATC C – 3'	5' – TGG GAA GTT GCC AGA AAG TCT – 3'

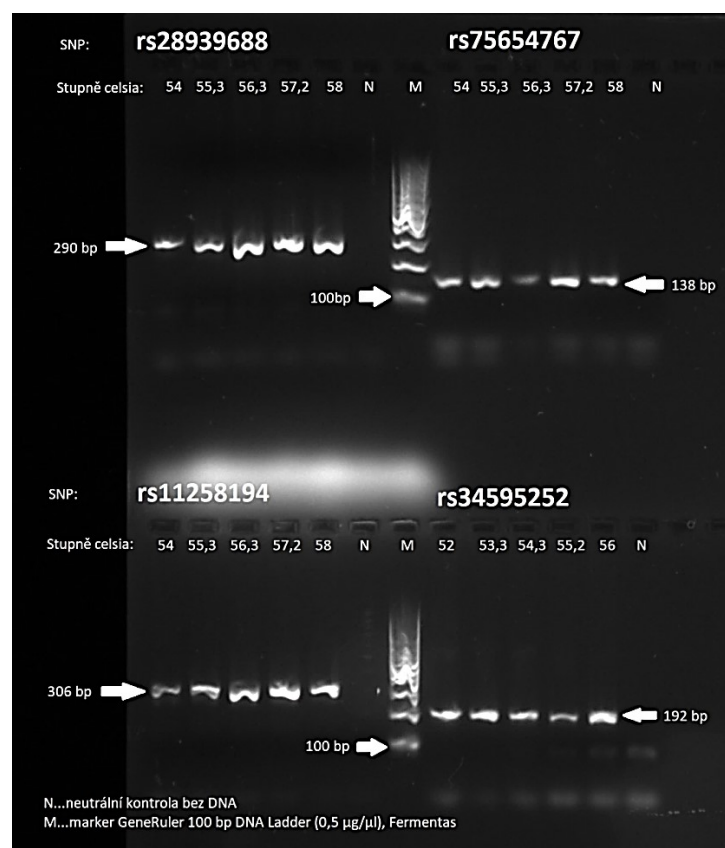
Následně jsme použili gradientovou PCR za účelem stanovení optimální teploty nasedání každého páru primerů na templátovou DNA, aby bylo dosaženo co nejvyšší efektivity pozdějších PCR reakcí. Pro každý SNP bylo vybráno 5 teplot, které jsme testovali pomocí gradientové PCR a následně vyhodnotili pomocí elektroforetické separace.

S ohledem na délku amplikonů, které pomocí navržených primerů vzniknou, a T_m PCR produktu, jsme stanovili teplotní a časové podmínky PCR a objemy jednotlivých komponent mastermixu.

Vybrané testované teploty gradientových PCR reakcí pro dané SNP lze vidět v následující tabulce.

Tab. 4 - Testované teploty při gradientové PCR pro námi vybrané SNP

SNP	Testované teploty (stupně celsia)
rs28939688 rs75654767 rs11258194	54; 55; 56; 57; 58
rs34595252	52; 53; 54; 55; 56
rs74315329 rs74315330	54; 55; 56; 57; 58
rs1057517785	55; 56; 57; 58; 59



Obrázek 8 - Snímek gradientové PCR z optimalizačních reakcí pro některé SNP

Výsledky optimalizace vybraných reakcí (gradientové PCR) jsou znázorněny na obrázku 8 z elektroforetické separace. Následující tabulka pak poskytuje informace o finálně vybraných hodnotách optimální anelační teploty pro jednotlivé páry primerů.

Tab. 5 - Vybrané finální teploty pro nasedání primerů u jednotlivých SNP

SNP	Vybraná teplota (stupně celsia)
rs28939688	56
rs75654767	57
rs11258194	56
rs34595252	53
rs74315329	56
rs74315330	56
rs1057517785	58

Dále jsme testovali různá složení reakční směsi (mastermixu), výsledné vybrané objemy jednotlivých složek jsou uvedeny v tabulkách níže. Celkový objem mastermixu na jednu reakci činil 20 μ l.

Tab 6. - Složení mastermixu pro rs28939688, rs75654767 a rs11258194, rs34595252, rs1057517785

dH₂O	15,16 μ l
2mM MgCl₂ (25 mM)	1,6 μ l
1000nM dNTPs	0,4 μ l
800nM přímý primer	0,32 μ l
800nM zpětný primer	0,32 μ l
10x pufr	2 μ l
Taq polymeráza (5 U/μl)	0,2 μ l

Tab 7 - Složení mastermixu pro rs74315329 a rs74315330

dH₂O	15,6 µl
1,5mM MgCl₂ (25 mM)	1,2 µl
1000nM dNTPs	0,4 µl
800nM přímý primer	0,3 µl
800nM zpětný primer	0,3 µl
10x pufr	2 µl
Taq polymeráza (5 U/µl)	0,2 µl

Nakonec bylo nutné stanovit vhodné reakční podmínky pro jednotlivé PCR reakce. Ty jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tab. 8 - Reakční podmínky pro rs28939688 a rs11258194

Teplota (stupně celsia)	Čas	
96	3'	
96	25''	} 30x
56	25''	
72	25''	
72	2'	

Tab. 9 - Reakční podmínky pro rs75654767

Teplota (stupně celsia)	Čas	
96	3'	
96	25''	} 30x
57	25''	
72	25''	
72	2'	

Tab. 10 - Reakční podmínky pro rs34595252

Teplota (stupně celsia)	Čas
96	3'
96	20''
53	20''
72	20''
72	2'

} 30x

Tab. 11 - Reakční podmínky pro rs1057517785

Teplota (stupně celsia)	Čas
96	3'
96	20''
58	20''
72	20''
72	2'

} 30x

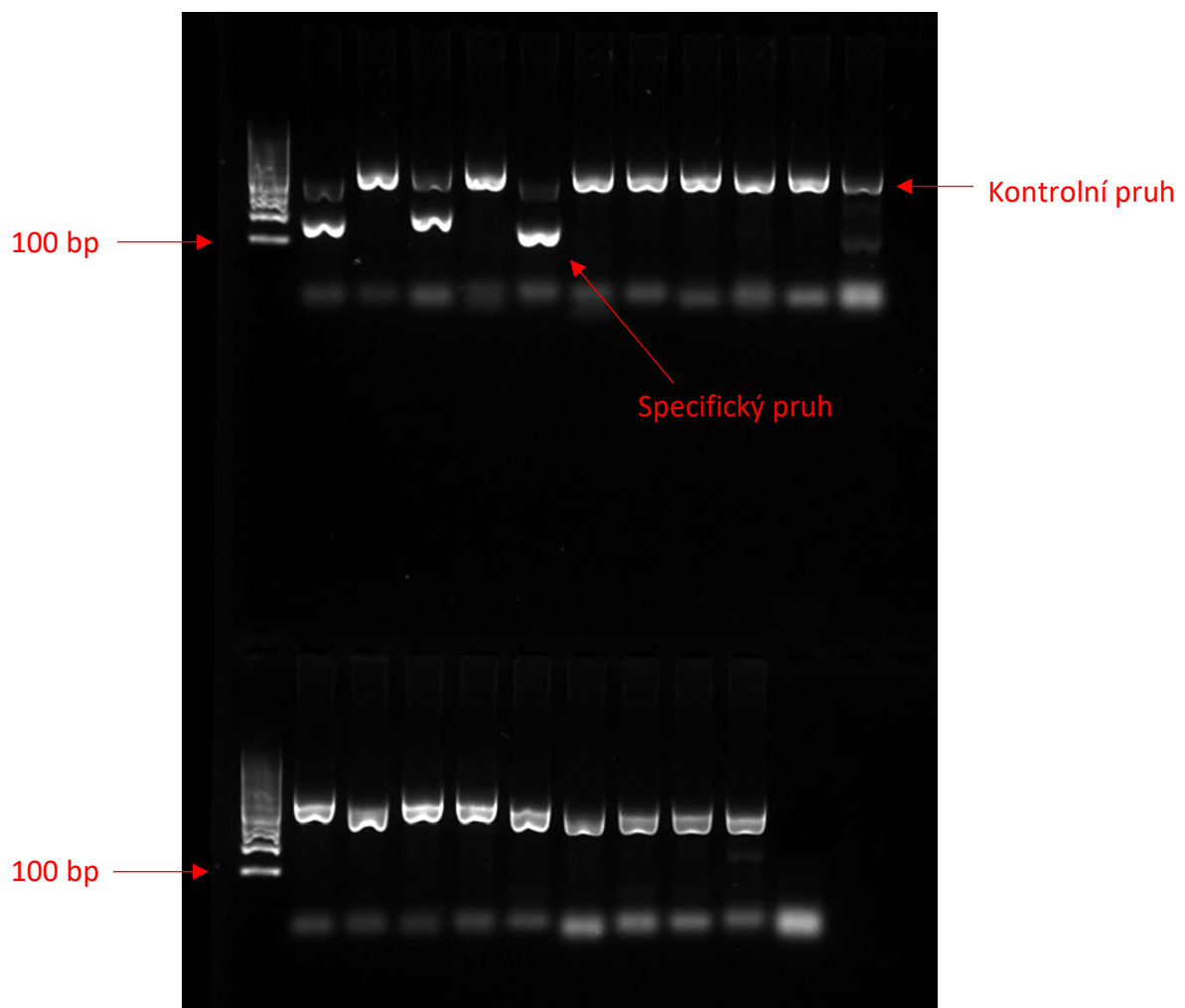
Tab. 12 - Reakční podmínky pro rs74315329 a rs74315330

Teplota (stupně celsia)	Čas
96	3'
96	20''
56	20''
72	20''
72	2'

} 30x

4.2 HLA genotypizace

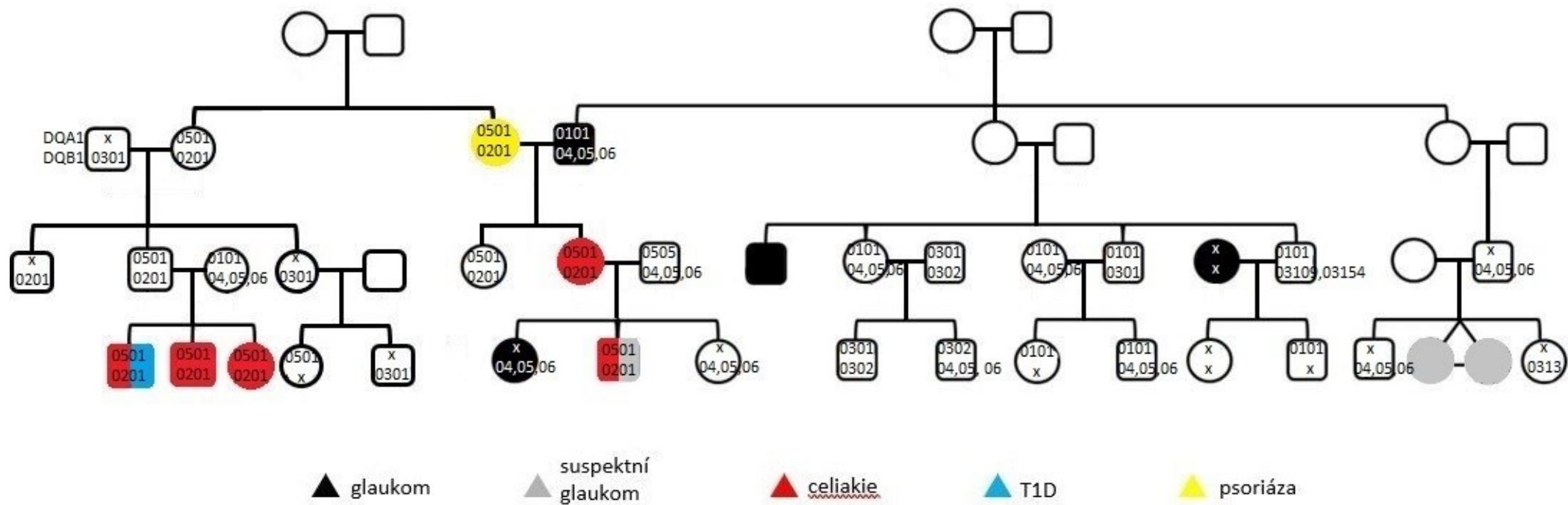
Vzorky od všech 34 probandů byly testovány pomocí kitu Olerup SSP DQA1*02, 05; DQB1*02, 0305 na přítomnost pro celiakii rizikových HLA antigenů. Tento systém je schopný rozlišit pouze některé alely HLA, nelze ho tedy využít k celkové genotypizaci molekul HLA a také pomocí něho v případě nálezu pouze jedné alely nelze rozlišit, zda je jedinec pro danou alelu homozygot či heterozygot. V tabulce číslo 13 jsou uvedeny alely u jednotlivých jedinců, které se podařilo pomocí tohoto kitu detekovat. U některých jedinců se nepodařilo zjistit přítomnost ani jedné z alel, kterou je tento kit schopen rozlišit, je u nich tedy křížek a můžeme usuzovat, že jedinec je tedy nositelem některé z alel, které nejsou s celiakií asociovány. V naší rodině jsme zjistili celkem 9 případů pro celiakii rizikového haplotypu DQA1*0501-DQB1*0201 (n=9), potvrdili jsme tedy u těchto jedinců přítomnost molekuly DQ2, dále jsme objevili 2 nositele DQ8 molekuly, haplotyp těchto jedinců je DQA1*0301-DQB1*0302 (n=2).



Obrázek 9 - Ilustrační obrázek z elektroforetické separace výsledků HLA genotypizace pro vzorek GG012

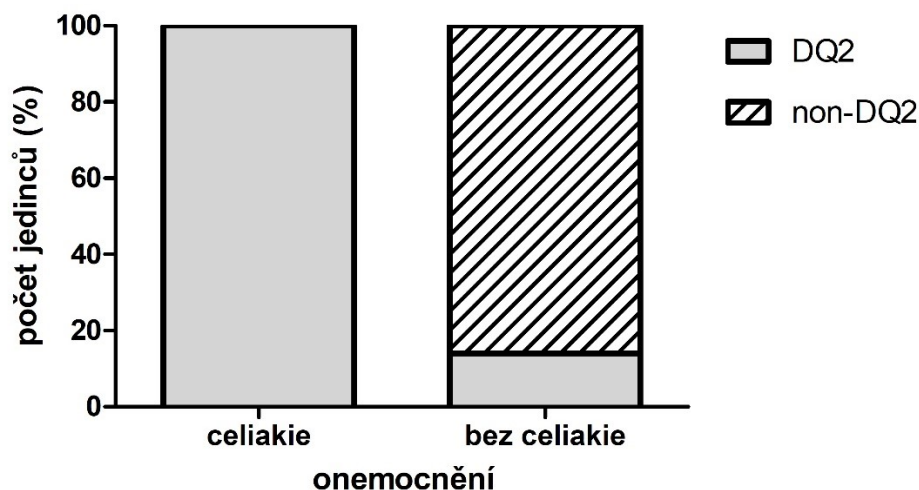
Tab. 13 - Výsledky HLA genotypizace na přítomnost rizikových alel pro celiakii

Kód jedince	HLA DQA1	HLA DQB1	DQ2/DQ8
GG001	0501	0201	DQ2
GG002	x	04...,05...,06...	
GG003	x	04...,05...,06...	
GG004	0505	04...,05...,06...	
GG005	0501	0201	DQ2
GG006	0501	0201	DQ2
GG007	0101	04...,05...,06...	
GG008	0501	0201	DQ2
GG009	0101	x	
GG010	0101	3109,03154	
GG011	x	x	
GG012	x	x	
GG013	0101	04...,05...,06...	
GG014	0101	04...,05...,06...	
GG015	0101	0301	
GG016	0101	x	
GG017	x	04...,05...,06...	
GG018	x	04...,05...,06...	
GG019	x	0313	
GG020	0301	0302	DQ8
GG021	0302	04...,05...,06...	
GG022	0301	0302	DQ8
GG023	0101	04...,05...,06...	
GG024	0101	04...,05...,06...	
GG025	0501	x	
GG026	0501	0201	DQ2
GG027	0501	0201	DQ2
GG028	0501	0201	DQ2
GG029	x	0201	
GG030	x	0301	
GG031	x	0301	
GG032	0501	0201	DQ2
GG033	x	0301	
GG034	0501	0201	DQ2



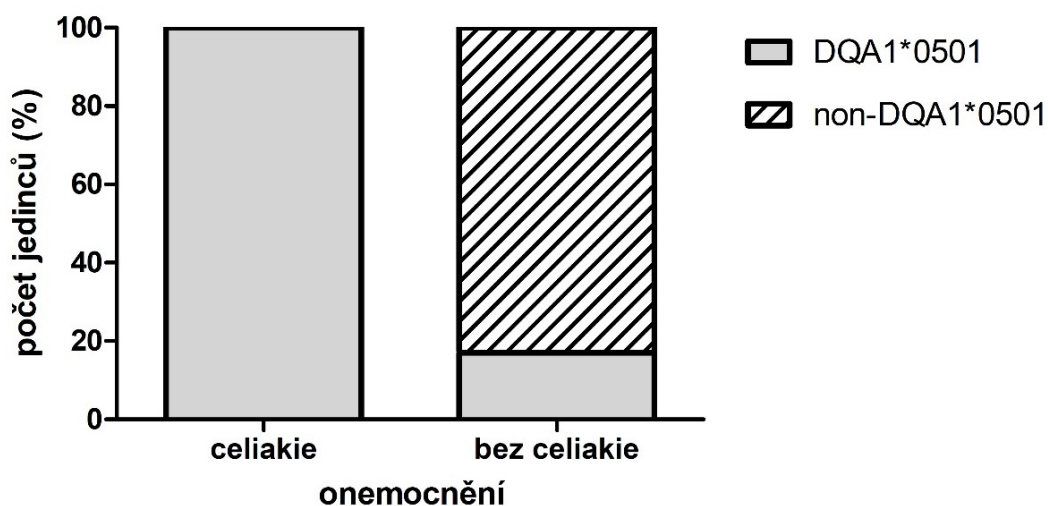
Obrázek 10 - Rodokmen znázorňující dědičnost zachycených HLA alel II. třídy pomocí kitu Olerup SSP, v prvním řádku alela DQA1, na dalším potom DQB1 (x značí alelu, kterou použitý kit nedokázal rozlišit)

V této rodině můžeme sledovat výskyt jednotlivých predispozičních haplotypů DQ2 a DQ8. Pro posouzení zastoupení alel těchto antigenů jsme probandy rozdělili do dvou skupin – s diagnostikovanou celiakií (n=5) a bez diagnostikované celiakie (n=29) a ty pak mezi sebou porovnávali. Výsledek jsme vyhodnotili za použití kontingenčních tabulek aplikací χ^2 testu s Yatesovou korekcí a následně jsme provedli ještě Bonferroniho korekci na mnohočetná pozorování, získali jsme tak korigovanou P hodnotu. Ve sledované rodině jsme zjistili silnou korelaci mezi výskytem celiakie a predispozičního haplotypu DQ2, a to s $P_k=0,001$, $OR=62,33$ a $CI=2,91-1335$ (graficky znázorněno na obrázku číslo 11). Rozdíl četnosti DQ8 antigenu mezi zdravými a nemocnými ve sledované rodině nebyl signifikantní ($P_k=NS$).

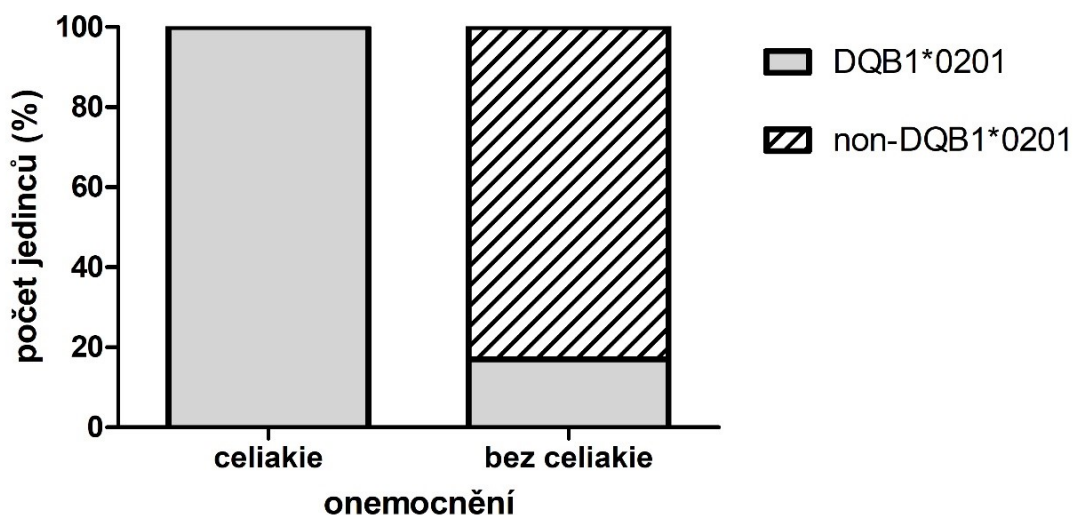


Obrázek 11 – Procentuální zastoupení DQ2 antigenu u skupin jedinců s celiakií (n=5) a bez celiakie (n=29), $P=0,001$

Signifikantní vztah jsme také našli pro jedince nesoucí predispoziční alelu DQA1*0501 a výskyt celiakie ($P_k=0,004$, $OR=49$, $CI=2,34-1024$). Opět jsme porovnávali mezi jedinci s diagnostikovanou celiakií (n=5) versus bez ní (n=29), stejný test byl pak proveden i pro alelu DQB1*0201 ($P_k=0,004$, $OR=49$, $CI=2,34-1024$). Grafický výstup těchto testů je na obrázcích číslo 12 a 13. Jako nesignifikantní pak vyšel vztah mezi danými skupinami jedinců a zastoupením samostatných alel DQA1*0301 ($P_k=2,015$) a DQB1*0302 ($P_k=2,015$). Můžeme tedy konstatovat, že ve sledované rodině je genetická predispozice pro celiakii silně vázaná na přítomnost DQ2 antigenu, tedy konkrétně na přítomnost haplotypu DQA1*0501-DQB1*0201, který byl již dříve označen jako silně rizikový pro manifestaci onemocnění. Bohužel námi použité metody neumožňují rozlišit, zda jsou jedinci nositeli homozygotní či heterozygotní formy tohoto haplotypu.



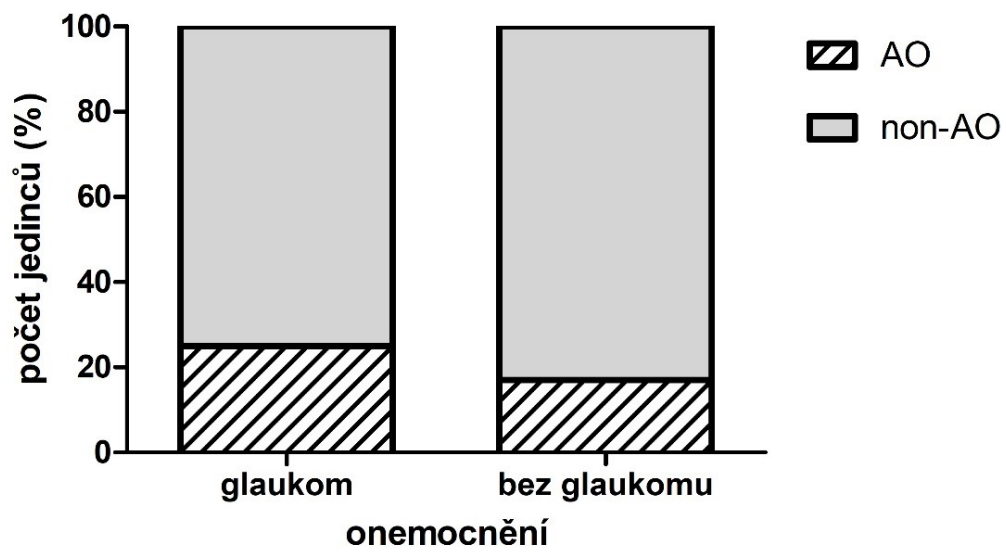
Obrázek 12 – Procentuální zastoupení DQA1*0501 alely u skupin jedinců s celiakií (n=5) a bez celiakie (n=5), $P < 0,05$



Obrázek 13 - Procentuální zastoupení alely DQB1*0201 u skupin jedinců s celiakií (n=5) a bez celiakie (n=5), $P < 0,05$

Dále nás zajímal vztah mezi výskytem rizikových alel DQ2 nebo DQ8 pro celiakii (a T1D) a výskytem glaukomu. Probandy jsme tedy rozdělili na dvě skupiny – s glaukomem (diagnostikovaný i suspektní) a bez glaukomu a sledovali jsme, zda je nějaký vztah mezi výskytem toho onemocnění a výše zmíněných alel. Výsledná P hodnota po korekci však ukazuje na nesignifikantní vztah ($P_k=1,630$). Ke stejnému závěru jsme došli také, pakliže jsme se zaměřili na souvislost mezi výskytem glaukomu a autoimunitních onemocnění, výsledný vztah opět nebyl statisticky významný ($P_k=1,548$, graficky znázorňuje obrázek číslo 14).

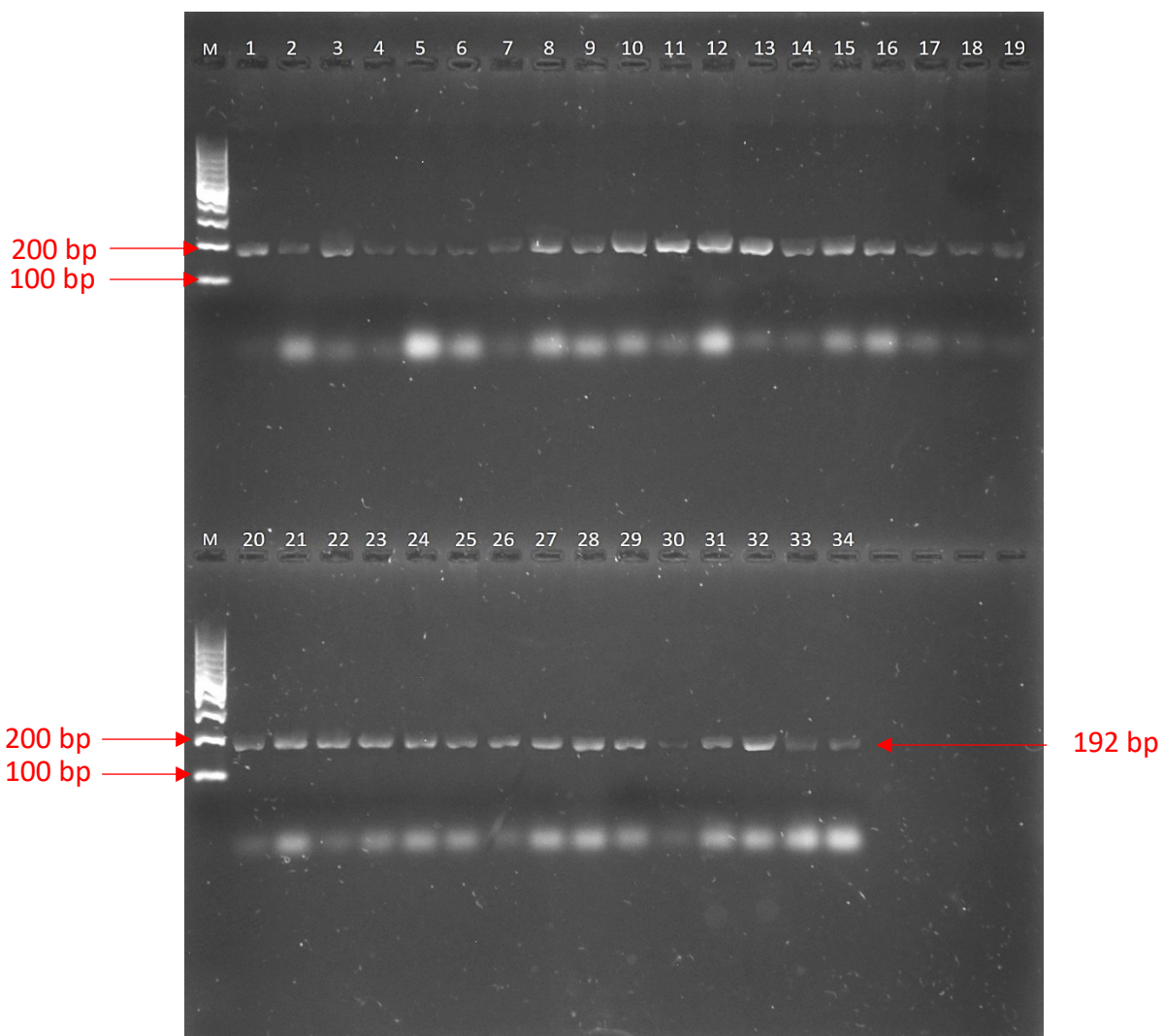
Neshledali jsme tedy žádnou korelaci mezi výskytem autoimunitních chorob (konkrétně se v námi pozorované rodině jednalo o celiakii, T1D a psoriázu) a glaukomem.



Obrázek 14 - Procentuální zastoupení autoimunitních onemocnění u skupin jedinců s glaukomem (n=1) a bez glaukomu (n=5), $P > 0,05$ ($P_k = 1,548$), AO...autoimunitní onemocnění, non-AO...bez autoimunitního onemocnění

4.3 Štěpení pomocí restrikčních endonukleáz

Pomocí metody RFLP jsme ověřovali přítomnost mutantních alel pro SNP rs75654767, rs34595252 (štěpeny enzymem TseI), rs11258194 (štěpen enzymem StuI), rs4986790 (štěpen enzymem NcoI) rs74315329 (štěpen enzymem AluI) a rs74315330 (štěpen enzymem TaalI). Pro všechny zmíněné SNP jsme shledali, že námi sledovaní probandi jsou homozygoti pro majoritní (tedy „wild type“) alelu, ani u jednoho SNP jsme neidentifikovali heterozygota či homozygota pro mutantní alelu. Výsledek štěpení enzymem TseI pro rs34595252 je vidět na následujícím obrázku.



Obrázek 15 - Výsledky štěpení našich vzorků enzymem TseI pro SNP rs34595252 (WDR36), všichni jedinci jsou nositeli „wild type“ alely v homozygotní formě (čísla znázorňují kódy jednotlivých probandů (GG001–GG034 ~ 1–34))

Genotypy všech jedinců pro výše zmíněné SNP zobrazuje následující tabulka.

Tab. 14 - Výsledné četnosti jednotlivých genotypových variant u našeho souboru na základě použití metody RFLP

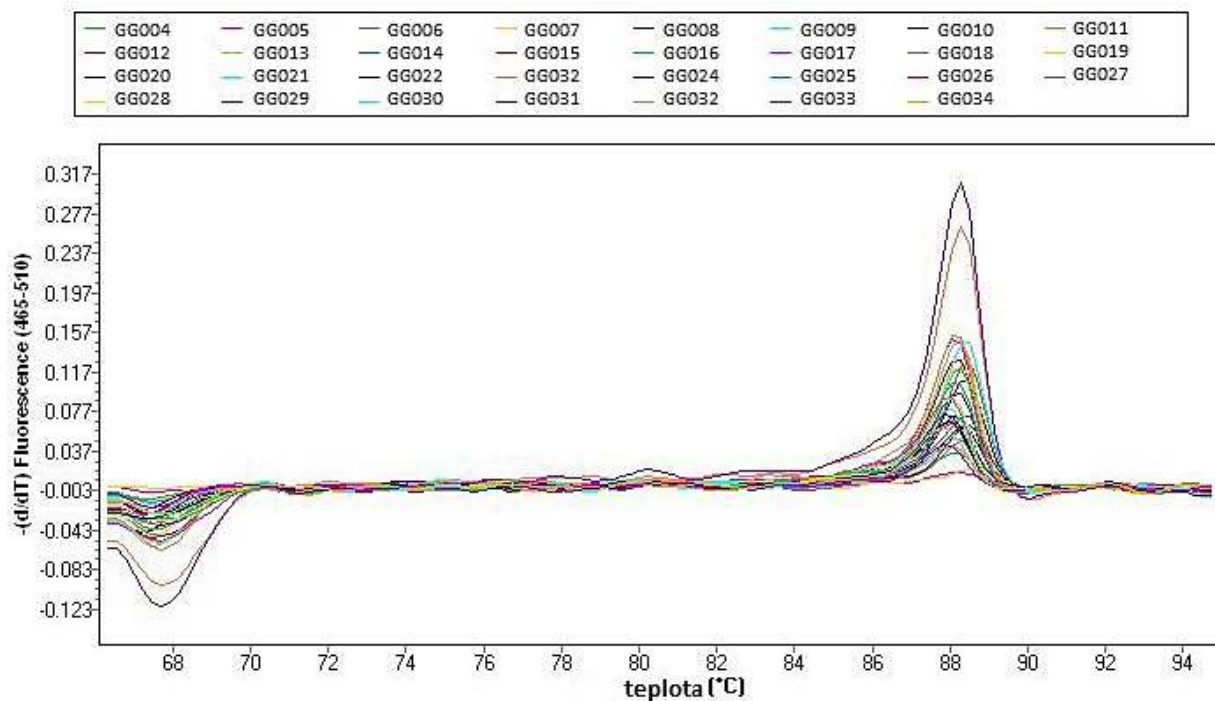
SNP	Restrikční enzym	Nukleotidová záměna	Wild type homozygot	Heterozygot	Homozygot pro mutantní alelu
rs75654767	Tsel	G>A	34	0	0
rs34595252	Tsel	T>C	34	0	0
rs11258194	StuI	T>A	34	0	0
rs4986790	NcoI	A>G	34	0	0
rs74315329	AlwI	G>A	34	0	0
rs74315330	TaaI	G>A	34	0	0

4.4 HRM analýza

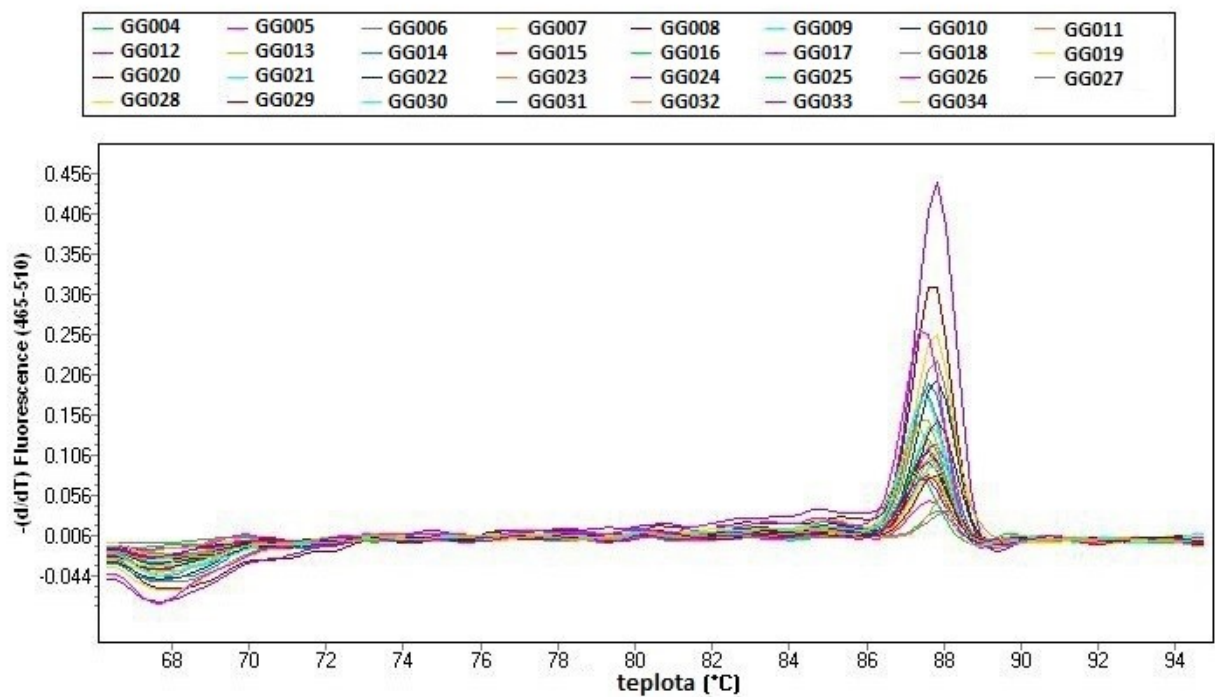
Dle provedené analýzy HRM jsme zjistili u všech vzorků přítomnost wild type genotypu pro rs28939688 a rs1057517785, tedy všichni jedinci jsou nositeli majoritní alely G v homozygotní formě. Pro ověření výsledků byly 4 vybrané vzorky od každého SNP osekvenovány, viz kapitola 4.5. Výsledné četnosti jednotlivých genotypů u sledovaných jedinců jsou uvedeny v tabulce číslo 15, grafický výstup HRM analýzy pak na obrázcích číslo 16 a 17.

Tab. 15 - Výsledné četnosti jednotlivých genotypových variant u našeho souboru na základě použití metody HRM

SNP	Nukleotidová záměna	Wild type homozygot G/G	Heterozygot G/A	Homozygot pro mutantní alelu A/A
rs28939688	G>A	34	0	0
rs1057517785	G>A	34	0	0



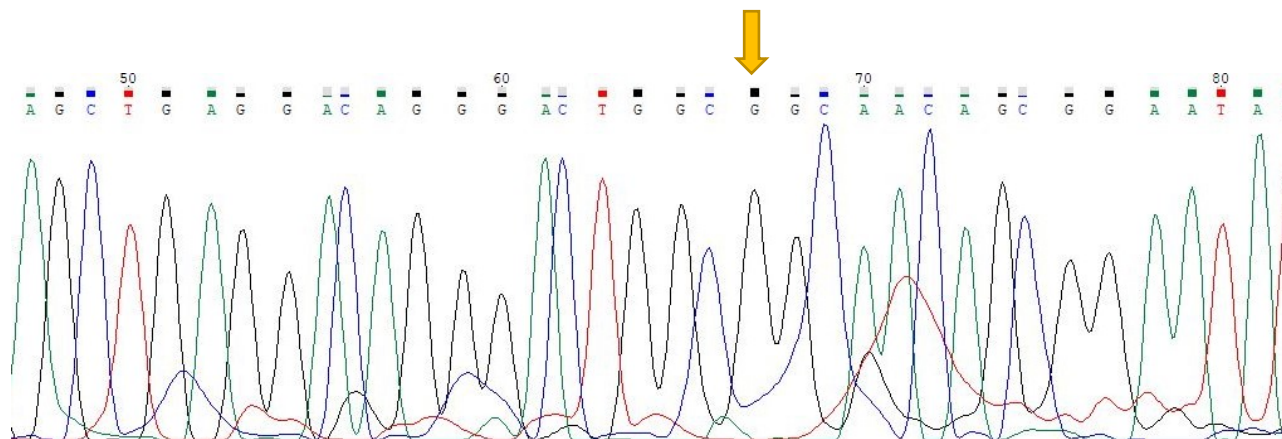
Obrázek 16 – Křivky tání, výstup z HRM analýzy pro SNP rs28939688 prováděný pro vzorky GG004–GG034, všichni jedinci jsou homozygoti pro majoritní alelu G



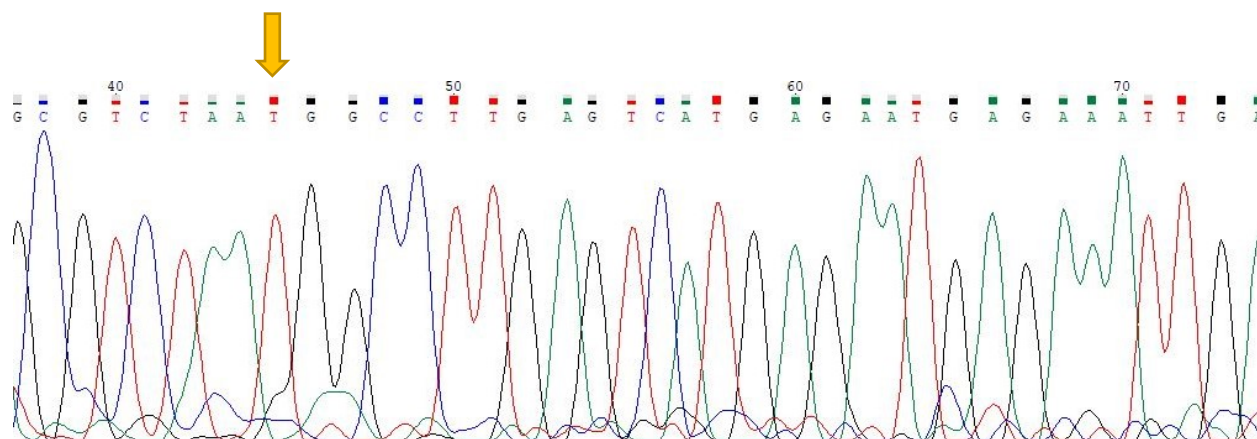
Obrázek 17 - Křivky tání, výstup z HRM analýzy pro SNP rs1057517785 prováděný pro vzorky GG004–GG034, všichni jedinci jsou homozygoti pro majoritní alelu G

4.5 Sekvenování

Vzhledem k tomu, že pro všechny SNP, pro které jsme používali restriční enzymy, se daní jedinci jeví jako homozygotní nositelé majoritní alely, a z důvodu absence vnitřního kontrolního mechanismu štěpení (výjimkou byla restriční endonukleáza Taal), jsme potřebovali ověřit, zda restriční štěpení proběhlo správně. Stejně tak jsme potřebovali ověřit přítomnost majoritní alely u SNP testovaných pomocí HRM analýzy. Proto jsme provedli sekvenační reakci a vzorky zaslali na analýzu do laboratoře sekvenace DNA. Sekvenační analýza potvrdila u všech vzorků homozygotní přítomnost majoritní alely.



Obrázek 18 - Výsledek sekvenování PCR amplikonu pro rs75654767 u vzorku GG021, majoritní alela označená šipkou, zpracováno v programu Chromas



Obrázek 19 - Výsledek sekvenování PCR amplikonu pro rs11258194 u vzorku GG012, majoritní alela označená šipkou, zpracováno v programu Chromas

5 Diskuze

Glaukom představuje skupinu oftalmologických neurodegenerativních onemocnění, pro něž je typické poškození zrakového nervu. Příčiny vzniku glaukomu se vyznačují svojí multifaktoriální povahou – tedy vliv má jak složka genetická, tak i ta negenetická. Tento charakter vykazuje i většina autoimunitních onemocnění, mezi nimi například celiakie, T1D, psoriáza nebo revmatoidní artritida. Genetické pozadí těchto onemocnění je již celkem dobře prozkoumáno. Pro celiakii je to zejména přítomnost specifických antigenů HLA-DQ2 a DQ8, ty jsou rizikové i pro T1D, pro glaukom to jsou některé mutace především v genech pro myocilin nebo optineurin. Poznatky několika posledních dekád přinesly již doklady o autoimunitní povaze glaukomu. Pokud budeme brát v potaz fakt, že některá autoimunitní onemocnění se vyskytují častěji společně, jak bylo prokázáno například pro celiakii a psoriázu nebo celiakii a T1D, můžeme si položit otázku, zda je tato koincidence zapříčiněná určitým konkrétním genetickým pozadím a zdali může mít právě taková genetická výbava vliv na fenotyp jiného onemocnění (například glaukomu) (Michaelsson et al., 2000).

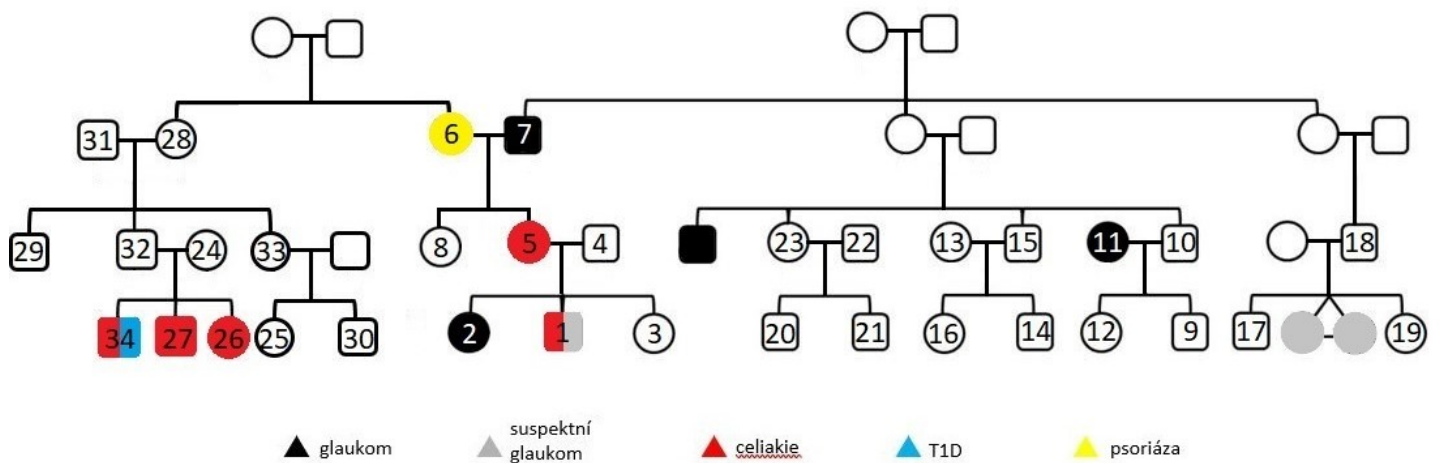
5.1 Dědičnost vybraných rizikových markerů pro glaukom

Vybrané rizikové jednonukleotidové polymorfismy, jež jsou asociované s glaukomem, byly zvoleny na základě dostupných publikací citovaných v úvodu této práce. Při výběru byl brán zřetel na geografickou příslušnost jedinců, u kterých byl daný polymorfismus nalezen a na četnost, s jakou se u glaukomatických jedinců vyskytuje. Gen *PAX6* byl navíc vybrán s ohledem na vliv jeho produktu během rané ontogeneze při vývoji jak oka, tak i pankreatu, takže by mutace v něm mohla hrát roli jak v patogenezi glaukomu, tak diabetu. Nicméně všichni sledovaní jedinci v dané rodině se ukázali být nositeli majoritních alel v homozygotní formě pro všechny vybrané polymorfismy (shrnutí polymorfismů k nahlédnutí v tabulce číslo 16). Vzhledem k tomu, že se jedná o rodinnou studii, není překvapivé, že probandi mají stejný genotyp a zároveň lze předpokládat, že se tyto polymorfismy budou do dalších generací předávat v homozygotní formě pro majoritní alely. Pokud by se však v následujících generacích vyskytnul nějaký jiný genotyp, muselo by buď dojít k vnesení jiných variant přivdáním či přiřazením jedince, který by byl jejich nositelem, nebo by muselo v tom konkrétním místě genomu dojít k *de novo* mutaci.

Tab. 16 - Výsledný přehled informací o vybraných SNP asociovaných s glaukomem včetně zjištěných genotypů jedinců

Číslo SNP	Aminokyselinová záměna	Nukleotidová záměna	Gen	Genotypy našeho souboru jedinců
rs28939688	Glu50Lys	G>A	<i>OPTN</i>	GG
rs11258194	Met98Lys	T>A	<i>OPTN</i>	TT
rs75654767	Arg545Lys	G>A	<i>OPTN</i>	GG
rs1057517785	Arg317Ter	G>A	<i>PAX6</i>	GG
rs4986790	Asp299Gly	A>G	<i>TLR4</i>	AA
rs74315329	Gln368X	G>A	<i>MYOC</i>	GG
rs74315330	Pro370Leu	G>A	<i>MYOC</i>	GG
rs34595252	Asp658Gly	T>C	<i>WDR36</i>	TT

Z rodokmene sledované rodiny je však patrné, že existuje určitá genetická predispozice pro glaukom, jedná se však pravděpodobně o mutaci v nějakém jiném genu, který nebyl zahrnut v rámci této diplomové práce, či o jiný typ mutace ve sledovaných genech (nebo obě varianty zároveň). Tato predispozice přichází nejspíše od jednoho z rodičů jedince GG007, protože glaukom se vyskytuje i v následujících generacích, konkrétně u vnoučat probanda GG007 a také u syna jeho sestry. Jejich genetický materiál jsme však neměli k dispozici a nebyl tedy testován na přítomnost predispozičních markerů. Další výskyt glaukomu, který je však prozatím pouze suspektní a daní jedinci jsou sledováni pro zvýšený nitrooční tlak, je u jednovaječných dvojčat, která jsou pravnoučaty sestry jedince GG007. Zajímavý je také fakt, že do rodiny se přivdala probandka GG011, která je léčená pro glaukom. Lze tedy usuzovat, že v této rodině se může vyskytovat více různých mutací způsobující fenotyp glaukomu. Naše analýza však ani jednu z nich nedokázala rozpoznat. Pro lepší orientaci je na obrázku 20 přiložen rodokmen znázorňující pacienty s glaukomem i jedince s glaukomem suspektním.



Obrázek 20 - Rodokmen znázorňující výskyt glaukomu a autoimunitních onemocnění u členů sledované rodiny. Čísla znázorňují kódy jednotlivých probandů (GG001–GG034 ~ 1–34).

Vzhledem k tomu, že v této rodině nebyla prokázána statisticky významná závislost mezi výskytem glaukomu a ostatních autoimunitních onemocnění, lze diskutovat o možných příčinách koincidence daných onemocnění mezi členy rodiny. Může se jednat o koincidence čistě náhodnou – tedy, že geny pro predispozici k celiakii (a dalším autoimunitám) a zároveň ty pro glaukom jsou děděny zcela separátně a vzájemně se nijak neovlivňují. Doposud neexistují žádné studie, které by se zabývaly konkrétním mechanismem, jak by mohlo docházet k tomu, že se v jedné rodině vyskytuje jak genetická predispozice k daným onemocněním, tak i ke glaukomu, jak je tomu právě u námi sledované rodiny. Je však také možné, že tento mechanismus vůbec neexistuje. Tomu by mohl nahrávat i fakt, že glaukom se ve studované rodině vykytuje pouze u potomků rodičů jedince GG007, naproti tomu genetická predispozice k celiakii (DQ2 antigen) přichází od manželky (GG006) tohoto jedince, respektive od některého z jejích rodičů. Je tedy pravděpodobné, že v této konkrétní rodině se geny způsobující predispozici k daným onemocněním (tedy rizikové antigeny pro celiakii a non-HLA varianty asociované s glaukodem) dědí separátně a zároveň nedochází k žádnému vlivu na fenotyp jiných chorob, než se kterými jsou vybrané markery primárně spojovány. Nicméně vztah k jiným autoimunitním onemocněním s ohledem na mechanismus jejich patogeneze byl již v některých studiích diskutován. Byl to konkrétně vztah autoimunitních mechanismů u glaukomu a revmatoidní artritidy, kdy u obou těchto onemocnění bylo u pacientů zaznamenáno zvýšení některých prozánětlivých cytokinů – konkrétně TNF- α (a

s tím související zvýšení hladin matrixových metaloproteináz (MMP)) či IL-6. Tento nárůst značí zvýšenou aktivitu makrofágů, kromě těch dochází ale u daných nemocí i k upregulaci aktivity T- a B-lymfocytů, a to například skrze zvýšení exprese solubilního receptoru interleukinu 2, adhezních molekul a HSP proteinů (Wax, 2011; Yang, Patil, Yu, Gordon, & Wax, 2001). Zajímavý je fakt, že mutace v genu pro α řetězec receptoru pro interleukin 2 je spojovaná s autoimunitním typem diabetu, stejně tak i zvýšená exprese adhezních molekul (Kado, Wakatsuki, Yamamoto, & Nagata, 2001; Willerford et al., 1995). I mezi těmito dvěma nemocemi je tedy jistá souvislost. Tu lze nalézt i pro dvojici onemocnění glaukom-celiakie, a to prostřednictvím genů pro MMP. Některé varianty *MMP-1* a *MMP-3*, jež jsou s celiakií asociovány, totiž vedou ke zvýšení exprese těchto genů u pacientů s celiakií (Daum et al., 1999). U glaukomatických pacientů je hladina produktů těchto genů také zvýšená, a to konkrétně v gangliových buňkách optického nervu, kde se předpokládá jejich role v aktivaci astrocytů skrze TNF- α dráhu vedoucí k degenerativním změnám na sítnici (Yan, Tezel, Wax, & Edward, 2000). Mechanismy patogeneze výše zmiňovaných a do této studie zahrnutých autoimunitních onemocnění a glaukomu vykazují evidentní podobnost, není proto náhodou, že jsme se rozhodli tuto skutečnost hlouběji prozkoumat. Vzali jsme v potaz především ty geny a jejich varianty, které jsou rizikové primárně pro jeden druh onemocnění (tedy rizikové markery separátně pro glaukom) a doposud nebyl zkoumán jejich vliv či souvislost s chorobami dalšími.

Je zde ještě mnoho prostoru, kudy by se mohly ubírat následné výzkumy členů této rodiny, ať už by šlo o navazující genetické analýzy či například stanovení vybraných autoprotilátek v séru daných probandů. V tomto ohledu nejlépe zmapované a popsané je zvýšení hladiny protilátek proti malým HSP proteinům u glaukomatických pacientů. Produkce HSP proteinů je u uvedených pacientů se zvýšeným nitroočním tlakem v buňkách retiny a v gangliových buňkách optického nervu upregulována, což je odpovědí na poškození těchto buněk (Tezel, Hernandez, & Wax, 2000). Nicméně u glaukomatických s NTG je typický i nárůst protilátek proti těmto stresovým proteinům, ty pak tedy nemohou správně plnit svou signální roli (Tezel et al., 1998). Dále by také mohla být stanovena exprese některých TLRs, a to především TLR4, jehož indukce je zapojena do průběhu vzniku patologických změn na sítnici u glaukomatických (Pena et al., 1999). Na myším modelu, který postrádal tento receptor, bylo prokázáno, že právě absence tohoto receptoru u takto speciálně geneticky modifikovaných myší způsobila

lepší přežívání gangliových buněk sítnice za podmínek zvýšeného nitroočního tlaku v důsledku snížení exprese genů kódujících prozánětlivé faktory (Dvorianchikova, Barakat, Hernandez, Shestopalov, & Ivanov, 2010). Také by bylo zapotřebí dostat se k dalšímu genetickému materiálu, například k DNA již zmiňovaných jednovaječných dvojčat se suspektním glaukomem pocházející právě z větve, kde je evidentní přítomnost genetické predispozice ke glaukomu.

S glaukomem jsou spojované také některé polymorfismy v oblasti kódující HLA molekuly. Tento fakt by tedy mohl být brán v potaz při výběru dalších možných studovaných genetických variant ve sledované rodině. Platí to zejména pro HLA molekuly II. třídy, konkrétně lokusy HLA-DR. Zvýšená exprese antigenu HLA-DR byla na T-lymfocytech glaukomatických pacientů prokázána a to v porovnání se zdravými kontrolami (Yang, Patil, et al., 2001). Již dříve byla zjištěna asociace mezi haplotypem DRB1*0407-DQB1*0302 a glaukomem, studie však byla prováděna na mexické populaci (Gil-Carrasco et al., 1999). O mapování haplotypů HLA-DRB1 a DQB1 se pokoušeli i Suzuki et al. v roce 2010. Ti vzali do svého výzkumu japonskou populaci a podle jejich závěrů nebyla nalezena žádná asociace mezi konkrétními HLA-DRB1 a DQB1 haplotypy a výskytem glaukomu (Suzuki et al., 2010). Nicméně podstatné je také zmínit, že první uváděná studie měla k dispozici pacienty s POAG, naproti tomu druhé studie se účastnili pacienti s NTG. Variantami genů HLA II. třídy u pacientů s POAG se pak v minulosti rovněž zabýval výzkumný tým Ferreri et al., pracující s pacienty pocházejícími z Itálie. Tento tým našel signifikantně zvýšenou incidenci antigenů DQ1 a DR11 u pacientů s POAG, přítomnost DR1 antigenu sice byla vyšší u pacientů než u kontrol, nicméně rozdíl nebyl statisticky signifikantní (Ferreri et al., 1998). Z toho lze tedy vyvodit, že genetické markery asociované s glaukomem mají silnou populační specifičnost. Tento fakt jsme brali v potaz při výběru námi studovaných genetických non-HLA variant a vždy jsme se snažili dohledávat jejich četnosti u více geograficky od sebe vzdálených populací.

V rámci dalších analýz sledované rodiny by bylo vhodné použít jiný biologický materiál pro izolaci DNA (například krev) či jinou metodu izolace nebo jiný izolační kit. V průběhu optimalizačních reakcí PCR se opakovaně vyskytovaly problémy s některými DNA vzorky, je tedy možné, že určité složky izolačního kitu způsobovaly inhibici některých PCR reakcí.

5.2 Dědičnost a rizikovost HLA molekul II. třídy

Ve sledované rodině můžeme pozorovat silnou genetickou predispozici pro celiakii navázanou na přítomnost antigenu DQ2, který je s touto nemocí asociován. Vzhledem k tomu, že použitý kit na zjišťování přítomnosti rizikových alel pro celiakii nedokáže rozlišit, zda je daný jedinec pro konkrétní alelu homozygot či heterozygot, nelze stanovit přesný a kompletní genotyp HLA-DQA1 a DQB1. Můžeme si však povšimnout určitých trendů v přenosu rizikových haplotypů i jednotlivých alel. Je zcela evidentní, že oba jedinci GG006 a GG028 zdělili geny pro molekulu DQ2 od některého ze svých rodičů a dále je pak přenášeli mezi svoje potomky. Konkrétně probandka GG006, u které sice celiakie nebyla dosud diagnostikována, ale subjektivně popisuje časté střevní obtíže a je léčena pro jiné autoimunitní onemocnění (psoriázu), přenesla na obě své dcery GG008 a GG005 tento kritický haplotyp (je tedy pozitivní na přítomnost DQ2 antigenu). U dcery GG005 byla celiakie diagnostikována před 3 lety, u dcery GG008 doposud nenastaly žádné komplikace. Následně došlo ještě k přenosu haplotypu DQA1*0501-DQB1*0201 od GG005 do další generace, a to konkrétně na syna GG001, který je v současné době sledován pro podezření na glaukom. Další potomci GG005 tento rizikový haplotyp nezdělili. Její dcera GG002 však trpí juvenilní formou glaukomu, nicméně celiakie u ní diagnostikována nebyla a nenese ani rizikový haplotyp pro tuto nemoc, na rozdíl od svého bratra GG001, který popisuje častý střevní diskomfort a v současné době je indikován na diagnostické vyšetření k potvrzení či vyloučení celiakie.

Proband GG032 zdělil rizikový haplotyp DQA1*0501-DQB1*0201 od své matky GG028, ani jednomu z nich však dosud celiakie diagnostikována nebyla. Tento fakt ale není v rozporu s literaturou – až jedna třetina zdravé populace je nositelem DQ2 antigenu a navíc k manifestaci nemoci může docházet v různém věku života jedince (Sollid et al., 1989). Jeho bratr GG029 zdělil pouze jednu alelu DQB1*0201 a celiakie u něj také není manifestována. Rizikovost pro rozvoj celiakie této samotné alely bez přítomnosti alely DQA1*0501 již byla v minulosti zkoumána. Bylo zjištěno, že má-li jedinec pouze tuto alelu a to v homozygotní formě, může mít vliv na manifestaci celiakie, nicméně pro heterozygotní variantu tato asociace potvrzena nebyla (Megiorni & Pizzuti, 2012; Vader et al., 2003). Všichni potomci výše zmiňovaného probanda GG032 zdělili rizikový haplotyp DQA1*0501-DQB1*0201 a u všech je celiakie přítomná, syn GG034 je navíc léčen také s diabetem prvního typu. Alela DQA1*0501 byla detekována i u probandky GG025, která ji musela zdědit od svého

otce, nicméně jeho DNA jsme neměli k dispozici, abychom tento fakt ověřili genotypizací. Je však zřejmé, že tato probandka je stejně jako její otec heterozygotka pro danou alelu, protože její matka GG033 je DQA1*0501 negativní a současně její bratr GG030 tuto alelu pro α řetězec také nemá. Samotná přítomnost této alely bez druhé do páru navíc nevykazuje žádnou známku zvýšení míry rizika pro celiakii (Vader et al., 2003). A ani samotná diskutovaná probandka GG025, ani její otec celiakii netrpí.

Během vyhodnocování výsledků jsme ovšem zaznamenali v rodině i přítomnost DQ8 alely, konkrétně u 2 jedinců GG022 a jeho syna GG020. Oba jsou nicméně zdraví a celiakie u nich není diagnostikována. Lze tedy předpokládat, že tito jedinci jsou heterozygoti pro DQ8 variantu, u nich je totiž riziko manifestace celiakie oproti jedincům, kteří jsou nositeli homozygotní varianty DQ8/DQ8, sníženo (van Heel et al., 2005).

Studie z roku 2009 na španělské populaci prokázala dokonce zvýšenou distribuci antigenu DQ8 mezi zdravými kontrolními jedinci oproti těm s diagnostikovanou celiakii (Donat et al., 2009). Tento výzkumný tým se dále také zabýval vlivem jednotlivých alel genů pro α a β řetězce na možnost manifestace celiakie. Například pro alelu DQA1*0101 nebyla nalezena žádná signifikance ve vztahu k celiakii a s ohledem na to, že mezi námi genotypizovanými jedinci se jich nachází celkem 9, kteří jsou nositeli této alely, lze konstatovat, že je to v souladu s výsledky zmiňované studie.

U jedinců, kteří mají diagnostikovaný glaukom, jsme nenašli žádnou z rizikových alel pro celiakii. Pouze u jedince GG001, který je sledovaný pro vysoký nitrooční tlak, jsme zjistili přítomnost DQ2 antigenu. U tohoto jedince je zároveň manifestována celiakie. Jedinci GG002 a GG007, oba s diagnostikovaným glaukomem, jsou nositeli některé z alel DQB1*04,05,06, nicméně použitý kit neumožnil vyšší rozlišení. Zajímavá je ale přítomnost alely DQA1*0101 u glaukomatického pacienta GG007. Tuto alelu nesou i jeho synovci (GG010, GG015) a neteř (GG023). Jedinci GG010, GG015 a GG023 mají ještě sourozence, u něhož byl glaukom diagnostikován, ale jeho DNA jsme neměli k dispozici. Nicméně vzhledem k přítomnosti zmiňované alely DQA1*0101 u všech jeho sourozenců, a i u jeho strýce lze odhadnout, že by mohl být minimálně heterozygotem pro danou alelu. Můžeme předpokládat také pravděpodobnou přítomnost některé z alel DQB1*04,05,06, s ohledem na to, že jsme dané alely našli jak u jeho sestry (GG023), tak i strýce (GG007). Z výše zmíněných nálezů alel HLA molekul II. třídy však nelze vyvodit žádný důsledek přítomnosti jednotlivých testovaných

rizikových alel pro celiakii na fenotyp glaukomu. Takovouto souvislost jsme nenašli ani v materiálech, které se zabývají genetickým pozadím glaukomu a přítomností konkrétních HLA alel u glaukomatických pacientů.

Podařilo se tedy potvrdit závěry již dříve prováděných výzkumů ohledně rizikosti DQ2 antigenu pro celiakii, zároveň však ne všichni jedinci, u kterých jsme genotypizaci prováděli a byli na tuto molekulu pozitivní, manifestovali celiakii. Oba tyto závěry jsou v souladu s dostupnou literaturou (Sollid et al., 1989). S ohledem na fakt, že použitý kit na genotypizaci rizikových haplotypů pro toto onemocnění nedokáže rozlišit, zda je daný jedinec nositelem takového haplotypu v homozygotní nebo heterozygotní formě, nabízí se myšlenka následných analýz, které by mohly pomoci odhalit další skutečnosti ohledně genotypu HLA molekul II. třídy u námi sledovaných jedinců. Mohla by pak být lépe diskutována rizikovitost alel DQA1 a DQB1 samostatně, většina studií totiž bere v potaz celý konkrétní haplotyp pro DQ2 nebo DQ8, ale nikoli alely samotné.

6 Závěr

Studovaným objektem této diplomové práce byla unikátní třígenerační rodina s mnohonásobným výskytem autoimunitních onemocnění (celiakie, T1D, psoriáza) a zároveň také vícečetným výskytem glaukomu – a to jak POAG, tak i glaukomu juvenilního. Pomocí dostupné literatury byly vytipovány rizikové markery nejčastěji spojované s glaukomem. Konkrétně se jednalo o 8 jednonukleotidových polymorfismů, pro něž byl navržen systém specifických PCR primerů. Genotypizační analýzy v žádném z těchto polymorfních míst neprokázaly přítomnost s glaukomem asociované mutace, všichni sledovaní jedinci jsou homozygotní nositelé majoritní alely. Žádná z těchto variant tedy nemá u sledovaných probandů vliv na fenotyp glaukomu a ani jednoho ze studovaných autoimunitních onemocnění. Zároveň byly sledovány rizikové markery pro celiakii, antigeny DQ2 a DQ8 (alely DQA1*0501, DQA1*0301, DQB1*0302 a DQB1*0201), tyto antigeny jsou rizikové i pro T1D.

Podařilo se potvrdit vliv přítomnosti DQ2 molekuly na manifestaci celiakie ($P_k=0,001$, $OR=62,33$ a $CI=2,91-1335$), zároveň však i fakt, že samotná přítomnost této molekuly ještě neznamená, že daný jedinec bude touto chorobou trpět.

U členů studované rodiny nebyla prokázána korelace mezi výskytem glaukomu a dalších autoimunitních onemocnění a s ohledem na homozygotní povahu všech non-HLA mutací asociovaných s glaukomem u probandů nelze posuzovat vliv daného genotypu na fenotyp glaukomu či autoimunitní choroby.

Genetické pozadí zkoumaných onemocnění je však značně komplikované a vliv na projev těchto chorob má i prostředí, ve kterém daný jedinec žije. I z toho důvodu by bylo zajímavé provést rozšiřující genetické analýzy pro hlubší poznání vztahu genotypu a fenotypu v této rodině.

7 Seznam použitých zkratek

A	Adenin
AO	Autoimunné disease
APC	Antigen presenting cell
Bp	Base pair
C	Cytosin
CD28	Cluster of differentiation 28
CTLA-4	Cluster of differentiation 152
CYP1B1	Cytochrome P450 1B1
DAMP	Damage-associated molecular patterns
EB	Eluation buffer
G	Guanin
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HLA	Human leukocyte antigen
HRM	High resolution melting analysis
HSP	Heat shock protein
HSP27	Heat shock protein 27
HSP60	Heat shock protein 60
HSP70	Heat shock protein 70
ICOS	Inducible T cell costimulator
IDT	Integrated DNA technologies
IFN γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-2R α	Interleukin 2 receptor subunit α
IL-6	Interleukin 6
INS	Insulin
IOP	Intraocular pressure
JOAG	Juvenile open angle glaucoma

MMP	Matrix metalloproteinase
MMP-1	Matrix metalloproteinase 1
MMP-3	Matrix metalloproteinase 3
MYO9B	Myosin-IXb
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	The nuclear factor κ B
NLR	Nod-like receptor
Non-AO	Without autoimmune disease (non-autoimmune disease)
NTG	Normal tension glaucoma
PACG	Primary angle closure glaucoma
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PAX6	Pair box 6
PCR	Polymerase chain reaction
POAG	Primary open angle glaucoma
PRR	Pattern recognition receptor
PSORS1	Psoriasis susceptibility 1 locus
SSP-PCR	Single-specific-primer polymerase chain reaction
T	Thymin
T1D	Type I diabetes
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TLR	Toll-like receptor
SNP	Single nucleotide polymorphism
VNTR	Variable number tandem repeat
WB	Wash buffer
WDR36	WD (tryptophan-aspartic acid) repeat-containing protein

8 Seznam použité literatury

- Allen, K. F., Gaier, E. D., & Wiggs, J. L. (2015). Genetics of primary inherited disorders of the optic nerve: Clinical applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7), 10. doi:10.1101/cshperspect.a017277
- Allingham, R. R., Wiggs, J. L., De la Paz, M. A., Vollrath, D., Tallett, D. A., Broomer, B., Del Bono, E.A., Kern, J., Patterson, K., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A. (1998). Gln368STOP myocilin mutation in families with late-onset primary open-angle glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(12), 2288-2295.
- Alward, W. L. M., Kwon, Y. H., Kawase, K., Craig, J. E., Hayreh, S. S., Johnson, A. T., Khana, C. L., Yamamoto, T., Mackey, D. A., Roos, B. R., Affatigato, L. M., Sheffield, V. C., Stone, E. M. (2003). Evaluation of optineurin sequence variations in 1,048 patients with open-angle glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 136(5), 904-910. doi:10.1016/s0002-9394(03)00577-4
- Aponte, E. P., Diehl, N., & Mohny, B. G. (2010). Incidence and clinical characteristics of childhood glaucoma: A population-based study. *Archives of Ophthalmology*, 128(4), 478-482. doi:10.1001/archophthalmol.2010.41
- Birkenfeld, S., Dreier, J., Weitzman, D., & Cohen, A. D. (2009). Coeliac disease associated with psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 161(6), 1331-1334. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09398.x
- Briani, C., Samaroo, D., & Alaedini, A. (2008). Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 7(8), 644-650. doi:10.1016/j.autrev.2008.05.006
- Brophy, K., Ryan, A. W., Thornton, J. M., Abuzakouk, M., Fitzgerald, A. P., McLoughlin, R. M., O'Morain, C., Kennedy, M. P., Stevens, F. M., Feighery, C., Kelleher, D., McManus, R. (2006). Haplotypes in the CTLA4 region are associated with coeliac disease in the Irish population. *Genes and Immunity*, 7(1), 19-26. doi:10.1038/sj.gene.6364265
- Cargill, M., Schrodi, S. J., Chang, M., Garcia, V. E., Brandon, R., Callis, K. P., Matsunami, L., Ardlie, K. G., Civello, D., Catanese, J. J., Leong, D. U., Panko, J. M., McAllister, L. B., Hansen, C. B., Papenfuss, J., Prescott, S. M., White, T. J., Leppert, M. F., Krueger, G. G., Begovich, A. B. (2007). A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *American Journal of Human Genetics*, 80(2), 273-290. doi:10.1086/511051
- Cartwright, M. J., Grajewski, A. L., Friedberg, M. L., Anderson, D. R., & Richards, D. W. (1992). Immune-related disease and normal-tension glaucoma - A case-control study. *Archives of Ophthalmology*, 110(4), 500-502. doi:10.1001/archopht.1992.01080160078035
- Chaiwiang, N., & Poyomtip, T. (2019). The association of toll-like receptor 4 gene polymorphisms with primary open angle glaucoma susceptibility: a meta-analysis. *Bioscience Reports*, 39, 14. doi:10.1042/bsr20190029
- Chao, L. Y., Huff, V., Strong, L. C., & Saunders, G. F. (2000). Mutation in the PAX6 gene in twenty patients with aniridia. *Human Mutation*, 15(4), 332-339. doi:10.1002/(sici)1098-1004(200004)15:4<332::aid-humu5>3.0.co;2-1
- Chi, Z. L., Akahori, M., Obazawa, M., Minami, M., Noda, T., Nakaya, N., Tomarev, S., Kawase, K., Yamamoto, T., Noda, S., Sasaoka, M., Shimazaki, A., Takada, Y., Iwata, T. (2010). Overexpression of optineurin E50K disrupts Rab8 interaction and leads to a progressive

- retinal degeneration in mice. *Human Molecular Genetics*, 19(13), 2606-2615. doi:10.1093/hmg/ddq146
- Chikazawa, K., Okusa, H., Minakami, H., Kimura, K., Araki, S., & Tamada, T. (1985). Acute onset of insulin-dependent diabetes mellitus caused by Epstein-Barr virus infection. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 37(3), 453-456.
- Choudhary, D., Jansson, I., Stoilov, I., Sarfarazi, M., & Schenkman, J. B. (2004). Metabolism of retinoids and arachidonic acid by human and mouse cytochrome P4501B1. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(8), 840-847. doi:10.1124/dmd.32.8.840
- Cook, H. B., Burt, M. J., Collett, J. A., Whitehead, M. R., Frampton, C. M., & Chapman, B. A. (2000). Adult coeliac disease: Prevalence and clinical significance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(9), 1032-1036. doi:10.1046/j.1440-1746.2000.02290.x
- Cosnes, J., Cellier, C., Viola, S., Colombel, J. F., Michaud, L., Sarles, J., Hugot, G. P., Ginies, J. L., Dabadie, A., Mouterde, O., Allez, M., Nion-Larmurien, I., Grp D'Etude Rech Maladie, C. (2008). Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: Protective effect of the gluten-free diet. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 6(7), 753-758. doi:10.1016/j.cgh.2007.12.022
- Daum, S., Bauer, U., Foss, H. D., Schuppan, D., Stein, H., Riecken, E. O., & Ullrich, R. (1999). Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut*, 44(1), 17-25. doi:10.1136/gut.44.1.17
- Decochez, K., Truyen, I., Van der Auwera, B., Weets, I., Vandemeulebroucke, E., De Leeuw, I. H., Keymeulen, B., Mathieu, C., Rottiers, R., Pipeleers, D. G., Gorus, F. K., Belgian Diabet, R. (2005). Combined positivity for HLA DQ2/DQ8 and IA-2 antibodies defines population at high risk of developing type 1 diabetes. *Diabetologia*, 48(4), 687-694. doi:10.1007/s00125-005-1702-x
- DeVitis, I., Ghirlanda, G., & Gasbarrini, G. (1996). Prevalence of coeliac disease in type I diabetes. A multicentre study. *Acta Paediatrica*, 85, 56-57.
- Dharmaraj, N., Reddy, A., Kiran, V., Mandal, A., Panicker, S., & Chakrabarti, S. (2003). PAX6 gene mutations and genotype-phenotype correlations in sporadic cases of aniridia from India. *Ophthalmic Genet*, 24(3), 161-165.
- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O., & Schuppan, D. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*, 3(7), 797-801. doi:10.1038/nm0797-797
- Donat, E., Planelles, D., Capilla-Villanueva, A., Montoro, J. A., Palau, F., & Ribes-Koninckx, C. (2009). Allelic distribution and the effect of haplotype combination for HLA type II loci in the celiac disease population of the Valencian community (Spain). *Tissue Antigens*, 73(3), 255-261. doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01191.x
- Dvorianchikova, G., Barakat, D. J., Hernandez, E., Shestopalov, V. I., & Ivanov, D. (2010). Toll-like receptor 4 contributes to retinal ischemia/reperfusion injury. *Molecular Vision*, 16(206-07), 1907-1912.
- Elias, J., Hoorweg-Nijman, J. J. G., & Balemans, W. A. (2015). Clinical relevance and cost-effectiveness of HLA genotyping in children with Type 1 diabetes mellitus in screening for coeliac disease in the Netherlands. *Diabetic Medicine*, 32(6), 834-838. doi:10.1111/dme.12658
- Erlich, H., Valdes, A. M., Noble, J., Carlson, J. A., Varney, M., Concannon, P., Mychaleckyj, J. C., Todd, J. A., Bonella, P., Fear, A. L., Lavant, E., Louey, A., Moonsamy, P., Type 1 Diabet

- Genetics, C. (2008). HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: Analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*, 57(4), 1084-1092. doi:10.2337/db07-1331
- Ferreri, G., D'Andrea, A., Castagna, I., Rechichi, C., Pettinato, G., & D'Andrea, D. (1998). The role of class I and class II HLA antigens in primary open angle glaucoma (POAG). *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 76, 17-19.
- Fingert, J. H. (2011). Primary open-angle glaucoma genes. *Eye*, 25(5), 587-595. doi:10.1038/eye.2011.97
- Fingert, J. H., Heon, E., Liebmann, J. M., Yamamoto, T., Craig, J. E., Rait, J., Kawase, K., Hoh, S. T., Buys, Y. M., Dickinson, J., Hockey, R. R., Williams-Lyn, D., Trope, G., Kitazawa, Y., Ritch, R., Mackey, D. A., Alward, W. L. N., Sheffield, V. C., Stone, E. M. (1999). Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Human Molecular Genetics*, 8(5), 899-905. doi:10.1093/hmg/8.5.899
- Fisher, J., Levkovitch-Verbin, H., Schori, H., Yoles, E., Butovsky, O., Kaye, J. F., Ben-Nun, A., Schwartz, M. (2001). Vaccination for neuroprotection in the mouse optic nerve: Implications for optic neuropathies. *Journal of Neuroscience*, 21(1), 136-142. doi:10.1523/jneurosci.21-01-00136.2001
- Forrest, J. M., Menser, M. A., & Burgess, J. A. (1971). High frequency of diabetes mellitus in young adults with congenital rubella. *Lancet*, 2(7720), 332-&.
- Gil-Carrasco, F., Vargas-Alarcon, G., Zuniga, J., Tinajero-Castaneda, O., Hernandez-Martinez, B., Hernandez-Pacheco, G., Rodriguez-Reyna, T. S., Hesiquio, R., Gamboa, R., Granados, J. (1999). HLA-DRB and HLA-DQB loci in the genetic susceptibility to develop glaucoma in Mexicans. *American Journal of Ophthalmology*, 128(3), 297-300. doi:10.1016/s0002-9394(99)00180-4
- Gonzalez, F. J. (1988). The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacological Reviews*, 40(4), 243-288.
- Gramer, E., Reiter, C., & Gramer, G. (2012). Glaucoma and frequency of ocular and general diseases in 30 patients with aniridia: a clinical study. *European Journal of Ophthalmology*, 22(1), 104-110. doi:10.5301/ejo.2011.8318
- Grant, W. M., & Walton, D. S. (1974). Progressive changes in angle in congenital aniridia, with development of glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 78(5), 842-847. doi:10.1016/0002-9394(74)90308-0
- Greco, L., Corazza, G., Babron, M. C., Clot, F., Fulchignoni-Lataud, M. C., Percopo, S., Zavattari, P., Bouguerra, F., Dib, C., Tosi, R., Troncone, R., Ventura, A., Mantavoni, W., Magazzu, G., Gatti, R., Lazzari, R., Giunta, A., Perri, F., Iacono, G., Cardi, E., de Virgiliis, S., Cataldo, F., De Angelis, G., Musumeci, S., Ferrari, R., Balli, F., Bardella, M. T., Volta, U., Catassi, C., Torre, G., Eliaou, J. F., Serre, J. L., Clerget-Darpoux, F. (1998). Genome search in celiac disease. *American Journal of Human Genetics*, 62(3), 669-675. doi:10.1086/301754
- Green, P. H. R., Fleischauer, A. T., Bhagat, G., Goyal, R., Jabri, B., & Neugut, A. I. (2003). Risk of malignancy in patients with celiac disease. *American Journal of Medicine*, 115(3), 191-195. doi:10.1016/s0002-9343(03)00302-4
- 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. *American Journal of Gastroenterology*, 96(1), 126-131. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.03462.x
- Grode, L., Bech, B. H., Jensen, T. M., Humaidan, P., Agerholm, I. E., Plana-Ripoll, O., & Ramlau-Hansen, C. H. (2018). Prevalence, incidence, and autoimmune comorbidities of celiac

- disease: a nation-wide, population-based study in Denmark from 1977 to 2016. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 30(1), 83-91. doi:10.1097/meg.0000000000000992
- Gronskov, K., Olsen, J. H., Sand, A., Pedersen, W., Carlsen, N., Jylling, A. M. B., Lyngbye, T., Brondum-Nielsen, K., Rosenberg, T. (2001). Population-based risk estimates of Wilms tumor in sporadic aniridia - A comprehensive mutation screening procedure of PAX6 identifies 80% of mutations in aniridia. *Human Genetics*, 109(1), 11-18. doi:10.1007/s004390100529
- Grus, F. H., Joachim, S. C., Wuenschig, D., Rieck, J., & Pfeiffer, N. (2008). Autoimmunity and glaucoma. *Journal of Glaucoma*, 17(1), 79-84. doi:10.1097/IJG.0b013e318156a592
- Hattula, K., & Peranen, J. (2000). FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Current Biology*, 10(24), 1603-1606. doi:10.1016/s0960-9822(00)00864-2
- Hauser, M. A., Allingham, R. R., Linkroum, K., Wang, J., LaRocque-Abramson, K., Figueiredo, D., Santiago-Turla, C., del Bono, E. A., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Wiggs, J. L. (2006). Distribution of WDR36 DNA sequence variants in patients with primary open-angle glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(6), 2542-2546. doi:10.1167/iovs.05-1476
- Hernandez, H., Medina-Ortiz, W. E., Luan, T., Clark, A. F., & McDowell, C. M. (2017). Crosstalk between transforming growth factor beta-2 and toll-like receptor 4 in the trabecular meshwork. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(3), 1811-1823. doi:10.1167/iovs.16-21331
- Hollander, D. A., Sarfarazi, M., Stoilov, I., Wood, I. S., Fredrick, D. R., & Alvarado, J. A. (2006). Genotype and phenotype correlations in congenital glaucoma: CYP1B1 mutations, goniodysgenesis, and clinical characteristics. *American Journal of Ophthalmology*, 142(6), 993-1004. doi:10.1016/j.ajo.2006.07.054
- Howell, G. R., Macalinao, D. G., Sousa, G. L., Walden, M., Soto, I., Kneeland, S. C., Barbay, J. M., King, B. L., Marchant, J. K., Hibbs, M., Stevens, B., Barres, B. A., Clark, A. F., Libby, R. T., John, S. W. M. (2011). Molecular clustering identifies complement and endothelin induction as early events in a mouse model of glaucoma. *Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1429-1444. doi:10.1172/jci44646
- Hunt, K. A., Monsuur, A. J., McArdle, W., Kumar, P. J., Travis, S. P. L., Walters, J. R. F., Jewell, D. P., Strachan, D. P., Playford, R. J., Wijmenga, C., van Heel, D. A. (2006). Lack of association of MYO9B genetic variants with coeliac disease in a British cohort. *Gut*, 55(7), 969-972. doi:10.1136/gut.2005.086769
- Ivarsson, A., Hernell, O., Stenlund, H., & Persson, L. A. (2002). Breast-feeding protects against celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5), 914-921.
- Jin, Y. L., Sharma, A., Bai, S., Davis, C., Liu, H., Hopkins, D., Barriga, K., Rewers, M., She, J. X. (2014). Risk of type 1 diabetes progression in islet autoantibody-positive children can be further stratified using expression patterns of multiple genes implicated in peripheral blood lymphocyte activation and function. *Diabetes*, 63(7), 2506-2515. doi:10.2337/db13-1716
- Joachim, S. C., Bruns, K., Lackner, K. J., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2007). Antibodies to alpha B-crystallin, vimentin, and heat shock protein 70 in aqueous humor of patients with normal tension glaucoma and IgG antibody patterns against retinal antigen in aqueous humor. *Current Eye Research*, 32(6), 501-509. doi:10.1080/02713680701375183
- Joachim, S. C., Reichelt, J., Berneiser, S., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2008). Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody

- profiles against human optic nerve antigens. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 246(4), 573-580. doi:10.1007/s00417-007-0737-8
- Johnson, E. C., Deppmeier, L. M. H., Wentzien, S. K. F., Hsu, I., & Morrison, J. C. (2000). Chronology of optic nerve head and retinal responses to elevated intraocular pressure. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(2), 431-442.
- Jordan, T., Hanson, I., Zaletayev, D., Hodgson, S., Prosser, J., Seawright, A., Hastie, N., Vanheyningen, V. (1992). The human PAX6 gene is mutated in 2 patients with aniridia. *Nature Genetics*, 1(5), 328-332. doi:10.1038/ng0892-328
- Kado, S., Wakatsuki, T., Yamamoto, M., & Nagata, N. (2001). Expression of intercellular adhesion molecule-1 induced by high glucose concentrations in human aortic endothelial cells. *Life Sciences*, 68(7), 727-737. doi:10.1016/s0024-3205(00)00968-1
- Kagnoff, M. F., Paterson, Y. J., Kumar, P. J., Kasarda, D. D., Carbone, F. R., Unsworth, D. J., & Austin, R. K. (1987). Evidence for the role of a human intestinal adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *Gut*, 28(8), 995-1001. doi:10.1136/gut.28.8.995
- Kastelan, M., Gruber, F., Cecuk-Jelicic, E., Grubic, Z., & Kastelan, A. (2003). A new extended haplotype Cw*0602-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 associated with psoriasis in the Croatian population. *Clinical and Experimental Dermatology*, 28(2), 200-202. doi:10.1046/j.1365-2230.2003.01215.x
- Konz, D. D., Flugel-Koch, C., Ohlmann, A., & Tamm, E. R. (2009). Myocilin in the trabecular meshwork of eyes with primary open-angle glaucoma. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 247(12), 1643-1649. doi:10.1007/s00417-009-1152-0
- Kubota, R., Kudoh, J., Mashima, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Hejtmancik, J. F., Oguchi, Y., Shimizu, N. (1998). Genomic organization of the human myocilin gene (MYOC) responsible for primary open angle glaucoma (GLC1A). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242(2), 396-400. doi:10.1006/bbrc.1997.7972
- Kubota, R., Noda, S., Wang, Y. M., Minoshima, S., Asakawa, S., Kudoh, J., Mashima, Y., Oguchi, Y., Shimizu, N. (1997). A novel myosin-like protein (Myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: Molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics*, 41(3), 360-369. doi:10.1006/geno.1997.4682
- Leske, M. C., Heijl, A., Hussein, M., Bengtsson, B., Hyman, L., Komaroff, E., & Early Manifest Glaucoma Trial, G. (2003). Factors for glaucoma progression and the effect of treatment - The early manifest glaucoma trial. *Archives of Ophthalmology*, 121(1), 48-56.
- Li, Y. G., Kang, J., & Horwitz, M. S. (1998). Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains. *Molecular and Cellular Biology*, 18(3), 1601-1610. doi:10.1128/mcb.18.3.1601
- Liu, Y. H., & Vollrath, D. (2004). Reversal of mutant myocilin non-secretion and cell killing: implications for glaucoma. *Human Molecular Genetics*, 13(11), 1193-1204. doi:10.1093/hmg/ddh128
- Loftus, E. V., Silverstein, M. D., Sandborn, W. J., Tremaine, W. J., Harmsen, W. S., & Zinsmeister, A. R. (1998). Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: Incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology*, 114(6), 1161-1168. doi:10.1016/s0016-5085(98)70421-4
- Lohi, S., Mustalahti, K., Kaukinen, K., Laurila, K., Collin, P., Rissanen, H., Lohi, O., Bravi, E., Gasparin, M., Reunanen, A., Maki, M. (2007). Increasing prevalence of coeliac

- disease over time. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(9), 1217-1225. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03502.x
- 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. doi:10.1034/j.1399-0039.2003.00017.x
- Luo, C., Yang, X. J., Kain, A. D., Powell, D. W., Kuehn, M. H., & Tezel, G. (2010). Glaucomatous tissue stress and the regulation of immune response through glial toll-like receptor signaling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(11), 5697-5707. doi:10.1167/iovs.10-5407
- Mao, L. K., Stewart, W. C., & Shields, M. B. (1991). Correlation between intraocular-pressure control and progressive glaucomatous damage in primary open-angle glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 111(1), 51-55. doi:10.1016/s0002-9394(14)76896-5
- Mao, M., Biery, M. C., Kobayashi, S. V., Ward, T., Schimmack, G., Burchard, J., Schelter, J. M., Dai, H. Y., He, Y. D. D., Linsley, P. S. (2004). T lymphocyte activation gene identification by coregulated expression on DNA microarrays. *Genomics*, 83(6), 989-999. doi:10.1016/j.yengo.2003.12.019
- Maruyama, I., Ikeda, Y., Nakazawa, M., & Ohguro, H. (2002). Clinical roles of serum autoantibody against neuron-specific enolase in glaucoma patients. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 197(3), 125-132. doi:10.1620/tjem.197.125
- Marx-Gross, S., Laubert-Reh, D., Schneider, A., Hohn, R., Mirshahi, A., Munzel, T., Wild, P. S., Beutel, M. E., Blettner, M., Pfeiffer, N. (2017). The prevalence of glaucoma in young people. *Deutsches Arzteblatt International*, 114(12), 204-U217. doi:10.3238/arztebl.2017.0204
- Megiorni, F., & Pizzuti, A. (2012). HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of Biomedical Science*, 19, 5. doi:10.1186/1423-0127-19-88
- Michaelsson, G., Gerden, B., Hagforsen, E., Nilsson, B., Pihl-Lundin, I., Kraaz, W., Hjelmquist, G., Loof, L. (2000). Psoriasis patients with antibodies to gliadin can be improved by a gluten-free diet. *British Journal of Dermatology*, 142(1), 44-51. doi:10.1046/j.1365-2133.2000.03240.x
- Momin, S., Flores, S., Angel, B., Codner, E., Carrasco, E., & Petez-Bravo, F. (2009). Interactions between programmed death 1 (PD-1) and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) gene polymorphisms in type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 83(3), 289-294. doi:10.1016/j.diabres.2008.12.003
- Monemi, S., Spaeth, G., DaSilva, A., Popinchalk, S., Ilitchev, E., Liebmann, J., Ritch, R., Heon, E., Crick, R. P., Child, A., Sarfarazi, M. (2005). Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Human Molecular Genetics*, 14(6), 725-733. doi:10.1093/hmg/ddi068
- Mowat, A. M. (2003). Coeliac disease - a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *Lancet*, 361(9365), 1290-1292.
- Mukesh, B. N., McCarty, C. A., Rait, J. L., & Taylor, H. R. (2002). Five-year incidence of open-angle glaucoma - The visual impairment project. *Ophthalmology*, 109(6), 1047-1051. doi:10.1016/s0161-6420(02)01040-0
- Nakamura, J., Meguro, A., Ota, M., Nomura, E., Nishide, T., Kashiwagi, K., Mabuchi, F., Iijima, H., Kawase, K., Yamamoto, T., Nakamura, M., Negi, A., Sagara, T., Nishida, T., Inatani, M., Tanihara, H., Aihara, M., Araie, M., Fukuchi, T., Abe, H., Higashide, T., Sugiyama, K., Kanamoto, T., Kiuchi, Y., Iwase, A., Ohno, S., Inoko, H., Mizuki, N. (2009).

- Association of toll-like receptor 2 gene polymorphisms with normal tension glaucoma. *Molecular Vision*, 15(306-07), 2905-2910.
- Navarro-Partida, J., Martinez-Rizo, A. B., Ramirez-Barrera, P., Velazquez-Fernandez, J. B., Mondragon-Jaimes, V. A., Santos-Garcia, A., & Benites-Godinez, V. (2017). Association of Toll-like receptor 4 single-nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile with the risk of primary open angle glaucoma. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 255(5), 995-1001. doi:10.1007/s00417-017-3610-4
- Nestle, F. O., Kaplan, D. H., & Barker, J. (2009). Mechanisms of disease: Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 361(5), 496-509. doi:10.1056/NEJMra0804595
- Neuhaus, C., Betz, C., Bergmann, C., & Bolz, H. J. (2014). Genetics of congenital aniridia. *Ophthalmologie*, 111(12), 1157-1163. doi:10.1007/s00347-014-3059-3
- Nilsen, E. M., Jahnsen, F. L., Lundin, K. E. A., Johansen, F. E., 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. doi:10.1016/s0016-5085(98)70134-9
- Nilsen, E. M., Lundin, K. E. A., Krajci, P., Scott, H., Sollid, L. M., & Brandtzaeg, P. (1995). Gluten specific, HLA-DQ restricted T-cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon-gamma. *Gut*, 37(6), 766-776. doi:10.1136/gut.37.6.766
- Osawa, T., Mizuno, Y., Fujita, Y., Takatama, M., Nakazato, Y., & Okamoto, K. (2011). Optineurin in neurodegenerative diseases. *Neuropathology*, 31(6), 569-574. doi:10.1111/j.1440-1789.2011.01199.x
- Pena, J. D. O., Varela, H. J., Ricard, C. S., & Hernandez, M. R. (1999). Enhanced tenascin expression associated with reactive astrocytes in human optic nerve heads with primary open angle glaucoma. *Experimental Eye Research*, 68(1), 29-40. doi:10.1006/exer.1998.0577
- Petronzelli, F., Bonamico, M., Ferrante, P., Grillo, R., Mora, B., Mariani, P., Apollonio, I., Gemme, G., Mazzilli, M. C. (1997). Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Annals of Human Genetics*, 61, 307-317.
- Ploski, R., Ek, J., Thorsby, E., & Sollid, L. M. (1993). On the HLA-DQ(ALPHA-1*0501, BETA-1*0201)-associated susceptibility in celiac disease - A possible gene dosage effect of DQB1*0201. *Tissue Antigens*, 41(4), 173-177. doi:10.1111/j.1399-0039.1993.tb01998.x
- Pugliese, A., Gianani, R., Moromisato, R., Awdeh, Z. L., Alper, C. A., Erlich, H. A., Jackson, R. A., Eisenbarth, G. S. (1995). HLA-DQB1*0602 is associated with protection from diabetes even among islet-cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes*, 44(6), 608-613. doi:10.2337/diabetes.44.6.608
- Pugliese, A., Zeller, M., Fernandez, A., Zalcborg, L. J., Bartlett, R. J., Ricordi, C., Pietropaolo, M., Eisenbarth, G. S., Bennett, S. T., Patel, D. D. (1997). The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nature Genetics*, 15(3), 293-297. doi:10.1038/ng0397-293
- Quigley, H. A. (1996). Number of people with glaucoma worldwide. *British Journal of Ophthalmology*, 80(5), 389-393. doi:10.1136/bjo.80.5.389
- Quigley, H. A., & Broman, A. T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *British Journal of Ophthalmology*, 90(3), 262-267. doi:10.1136/bjo.2005.081224

- Quigley, H. A., Nickells, R. W., Kerrigan, L. A., Pease, M. E., Thibault, D. J., & Zack, D. J. (1995). Retinal ganglion-cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *36*(5), 774-786.
- Ransohoff, R. M., & Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, *12*(9), 623-635. doi:10.1038/nri3265
- Reunala, T. (1998). Dermatitis herpetiformis: coeliac disease of the skin. *Annals of Medicine*, *30*(5), 416-418. doi:10.3109/07853899809002482
- Rezaie, T., Child, A., Hitchings, R., Brice, G., Miller, L., Coca-Prados, M., Heon, E., Krupin, T., Ritch, R., Kreutzer, D., Crick, R. P., Sarfarazi, M. (2002). Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science*, *295*(5557), 1077-1079. doi:10.1126/science.1066901
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E., Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(27), 9577-9582. doi:10.1073/pnas.0502272102
- Roh, M., Zhang, Y., Murakami, Y., Thanos, A., Lee, S. C., Vavvas, D. G., Benowitz, L. I., Miller, J. W. (2012). Etanercept, a widely used inhibitor of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), prevents retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma. *Plos One*, *7*(7), 13. doi:10.1371/journal.pone.0040065
- Saeki, H., Kuwata, S., Nakagawa, H., Asahina, A., Tamaki, K., Shibata, Y., & Juji, T. (1998). Analysis of HLA class II and TAP alleles in Japanese patients with psoriasis vulgaris. *Human Immunology*, *59*(8), 503-511. doi:10.1016/s0198-8859(98)00046-9
- Salamon, H., Klitz, W., Easteal, S., Gao, X. J., Erlich, H. A., Fernandez-Vina, M., Trachtenberg, E. A., McWeeney, S. K., Nelson, M. P., Thomson, G. (1999). Evolution of HLA class II molecules: Allelic and amino acid site variability across populations. *Genetics*, *152*(1), 393-400.
- Sarfarazi, M., Akarsu, A. N., Hossain, A., Turacli, M. E., Aktan, S. G., Barsoumhomysy, M., Chevrette, L., Sayli, B. S. (1995). Assignment (GLC3A) for primary congenital glaucoma (buphthalmos) to 2p21 and evidence for genetic heterogeneity. *Genomics*, *30*(2), 171-177. doi:10.1006/geno.1995.9888
- Sarfarazi, M., Child, A., Stoilova, D., Brice, G., Desai, T., Trifan, O. C., Poinosawmy, D., Crick, R. P. (1998). Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region. *American Journal of Human Genetics*, *62*(3), 641-652. doi:10.1086/301767
- Schmittegenolf, M., Boehncke, W. H., Stander, M., Eiermann, T. H., & Sterry, W. (1993). Oligonucleotide typing reveals association of type 1 psoriasis with the HLA-DRB1*0701/2, HLA-DQA1*0201, HLA-DQB1*0303 extended haplotype. *Journal of Investigative Dermatology*, *100*(6), 749-752. doi:10.1111/1523-1747.ep12476080
- Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *87*(1), 4-14. doi:10.1016/j.diabres.2009.10.007
- 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), 345-350. doi:10.1084/jem.169.1.345

- Sollid, L. M., Molberg, O., McAdam, S., & Lundin, K. E. A. (1997). Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase - guilt by association? *Gut*, *41*(6), 851-852. doi:10.1136/gut.41.6.851
- Sommer, A., Tielsch, J. M., Katz, J., Quigley, H. A., Gottsch, J. D., Javitt, J., & Singh, K. (1991). Relationship between intraocular-pressure and primary open angle glaucoma among the white and black-americans - The Baltimore eye survey. *Archives of Ophthalmology*, *109*(8), 1090-1095. doi:10.1001/archopht.1991.01080080050026
- Stewart, C. A., Horton, R., Allcock, R. J. N., Ashurst, J. L., Atrazhev, A. M., Coggill, P., Dunham, I., Forbes, S., Halls, K., Howson, J. M. M., Humphray, S. J., Hunt, S., Mungall, A. J., Osoegawa, K., Palmer, S., Roberts, A. N., Rogers, J., Sims, S., Wang, Y., Wilming, L. G., Elliott, J. F., de Jong, P. J., Sawcer, S., Todd, J. A., Trowsdale, J., Beck, S. (2004). Complete MHC haplotype disease gene mapping. *Genome Research*, *14*(6), 1176-1187. doi:10.1101/gr.2188104
- Stone, E. M., Fingert, J. H., Alward, W. L. M., Nguyen, T. D., Polansky, J. R., Sunden, S. L. F., Nishimura, D., Clark, A. F., Nystuen, A., Nichols, B. E., Mackey, D. A., Ritch, R., Kalenak, J. W., Craven, E. R., Sheffield, V. C. (1997). Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science*, *275*(5300), 668-670. doi:10.1126/science.275.5300.668
- Sutter, T. R., Tang, Y. M., Hayes, C. L., Wo, Y. Y. P., Jabs, E. W., Li, X., Yin, H., Cody, C. W., Greenlee, W. F. (1994). Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome-P450 that maps to a chromosome 2. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(18), 13092-13099.
- Suzuki, M., Meguro, A., Ota, M., Nomura, E., Kato, T., Nomura, N., Kashiwagi, K., Mabuchi, F., Iijima, H., Kawase, K., Yamamoto, T., Nakamura, M., Negi, A., Sagara, T., Nishida, T., Inatani, M., Tanihara, H., Aihara, M., Araie, M., Fukuchi, T., Abe, H., Higashide, T., Sugiyama, K., Kanamoto, T., Kiuchi, Y., Iwase, A., Ohno, S., Inoko, H., Mizuki, N. (2010). Genotyping HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles in Japanese patients with normal tension glaucoma. *Molecular Vision*, *16*(203), 1874-1879.
- Szebeni, B., Veres, G., Dezsofi, A., Rusai, K., Vannay, A., Bokodi, G., Vasarhelyi, B., Korponay-Szabo, I. R., Tulassay, T. T., Arato, A. (2007). Increased mucosal expression of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *45*(2), 187-193. doi:10.1097/MPG.0b013e318064514a
- Tezel, G., Hernandez, M. R., & Wax, M. B. (2000). Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes. *Archives of Ophthalmology*, *118*(4), 511-518.
- Tezel, G., Seigel, G. M., & Wax, M. B. (1998). Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *39*(12), 2277-2287.
- Tielsch, J. M., Katz, J., Sommer, A., Quigley, H. A., & Javitt, J. C. (1994). Family history and risk of primary open-angle glaucoma - The Baltimore eye survey. *Archives of Ophthalmology*, *112*(1), 69-73. doi:10.1001/archopht.1994.01090130079022
- Ton, C. C. T., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M. M., Monaghan, P., Jordan, T., Vanheyningen, V., Hastie, N. D., Meijersheijboer, H., Drechsler, M., Royerpokora, B., Collins, F., Swaroop, A., Strong, L. C., Saunders, G. F. (1991). Positional cloning and characterization of a paired box-containing domain and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell*, *67*(6), 1059-1074. doi:10.1016/0092-8674(91)90284-6
- Tsunemi, Y., Saeki, H., Nakamura, K., Sekiya, T., Hirai, K., Fujita, H., Asano, N., Kishimoto, M., Tanida, Y., Kakinuma, T., Mitsui, H., Tada, Y., Wakugawa, M., Torii, H., Komine, M., Asahina, A., Tamaki, K. (2002). Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis

- vulgaris. *Journal of Dermatological Science*, 30(2), 161-166. doi:10.1016/s0923-1811(02)00072-5
- Tzoulaki, I., White, I. M. S., & Hanson, I. M. (2005). PAX6 mutations: genotype-phenotype correlations. *Bmc Genetics*, 6, 12. doi:10.1186/1471-2156-6-27
- Vader, W., Stepniak, D., Kooy, Y., Mearin, L., Thompson, A., van Rood, J. J., Spaenij, L., 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. doi:10.1073/pnas.2135229100
- van Heel, D. A., Hunt, K., Greco, L., & Wijmenga, C. (2005). Genetics in coeliac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19(3), 323-339. doi:10.1016/j.bpg.2005.01.001
- Viljamaa, M., Kaukinen, K., Huhtala, H., Kyronpalo, S., Rasmussen, M., & Collin, P. (2005). Coeliac disease, autoimmune diseases and gluten exposure. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 40(4), 437-443. doi:10.1080/00365520510012181
- Vincent, M. C., Pujo, A. L., Olivier, D., & Calvas, P. (2003). Screening for PAX6 gene mutations is consistent with haploinsufficiency as the main mechanism leading to various ocular defects. *European Journal of Human Genetics*, 11(2), 163-169. doi:10.1038/sj.ejhg.5200940
- Walther, C., & Gruss, P. (1991). PAX-6, a murine pair box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*, 113(4), 1435-1449.
- Wang, R., & Wiggs, J. L. (2014). Common and rare genetic risk factors for glaucoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(12), 13. doi:10.1101/cshperspect.a017244
- Wawrocka, A., Sikora, A., Kuszal, L., & Krawczynski, M. R. (2013). 11p13 deletions can be more frequent than the PAX6 gene point mutations in Polish patients with aniridia. *Journal of Applied Genetics*, 54(3), 345-351. doi:10.1007/s13353-013-0154-0
- Wax, M. B. (2011). The case for autoimmunity in glaucoma. *Experimental Eye Research*, 93(2), 187-190. doi:10.1016/j.exer.2010.08.016
- Wax, M. B., Barrett, D. A., & Pestronk, A. (1994). Increased incidence of paraproteinemia and autoantibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 117(5), 561-568. doi:10.1016/s0002-9394(14)70059-5
- Wax, M. B., Tezel, G., Saito, I., Gupta, R. S., Harley, J. B., Li, Z. Z., & Romano, C. (1998). Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 125(2), 145-157. doi:10.1016/s0002-9394(99)80084-1
- Wiggs, J. L. (2015). Glaucoma genes and mechanisms. In J. F. Hejtmancik & J. M. Nickerson (Eds.), *Molecular Biology of Eye Disease* (Vol. 134, pp. 315-342). San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Wiggs, J. L., & Pasquale, L. R. (2017). Genetics of glaucoma. *Human Molecular Genetics*, 26(R1), R21-R27. doi:10.1093/hmg/ddx184
- Willerford, D. M., Chen, J. Z., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., & Alt, F. W. (1995). Interleukin-2 receptor-alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*, 3(4), 521-530. doi:10.1016/1074-7613(95)90180-9
- Woo, W. K., McMillan, S. A., Watson, R. G. P., McCluggage, W. G., Sloan, J. M., & McMillan, J. C. (2004). Coeliac disease-associated antibodies correlate with psoriasis activity. *British Journal of Dermatology*, 151(4), 891-894. doi:10.1111/j.1365-2133.2004.06137.x

- Yan, X. M., Tezel, G., Wax, M. B., & Edward, D. P. (2000). Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha in glaucomatous optic nerve head. *Archives of Ophthalmology*, 118(5), 666-673.
- Yang, J. J., Patil, R. V., Yu, H., Gordon, M., & Wax, M. B. (2001). T cell subsets and sIL-2R/IL-2 levels in patients with glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 131(4), 421-426. doi:10.1016/s0002-9394(00)00862-x
- Yang, J. J., Tezel, G., Patil, R. V., Romano, C., & Wax, M. B. (2001). Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42(6), 1273-1276.
- Ying, H. Y., & Yue, B. (2012). Cellular and molecular biology of optineurin. In K. W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol 294 (Vol. 294, pp. 223-258). San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Yuan, L., & Neufeld, A. H. (2000). Tumor necrosis factor-alpha: A potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia*, 32(1), 42-50. doi:10.1002/1098-1136(200010)32:1<42::aid-glia40>3.0.co;2-3

URL1: http://lsdb.hgu.mrc.ac.uk/variants.php?action=search_unique&select_db=PAX6
(citováno dne 8.9.2018)

URL2: <https://www.ensembl.org/index.html> (citováno dne 10.9.2018)

URL3: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/> (citováno dne 10.9.2018)

URL4: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (citováno dne 10.9.2018)

URL5: <https://eu.idtdna.com/site/account/login?returnurl=%2Fcalc%2Falyzer>
(citováno dne 25.10.2018)

URL6: <http://restrictionmapper.org/> (citováno dne 25.10.2018)

URL7: <https://www.genscript.com/tools/restriction-enzyme-map-analysis>
(citováno dne 14.7.2019)