

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra antropologie a genetiky člověka



**Studium jednonukleotidových polymorfizmů  
v kandidátních genech pro Crohnovu chorobu**

Petra Dušátková

Praha 2008

Vedoucím diplomové práce byl MUDr. Ondřej Cinek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury a pod vedením svého školitele.

V Praze dne 28.4.2008

Petra Dušátková

### Poděkování

Především bych ráda poděkovala MUDr. Ondřeji Cinkovi, Ph.D. za skvělé vedení mé práce, neformální přístup, trpělivost a ochotu kdykoli pomoci.

Dále děkuji MUDr. Ondřeji Hradskému za uvedení do studované problematiky a přátelskou atmosféru během naší práce.

Dík patří i celému kolektivu Laboratoře molekulární genetiky za podporu a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Rodině a Ondrovi Lipenskému děkuji za podporu během celého mého studia.

Diplomová práce vznikala v rámci grantů Ministerstva zdravotnictví České republiky (MZ00064203), interního grantu Fakultní nemocnice Motol, Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze (GA UK 7660/2007) a Ministerstva školství České republiky(č.2B06155).

## Abstrakt

Crohnova choroba (CD) patří mezi zánětlivá střevní onemocnění. Její etiologie dosud není zcela objasněna, ale předpokládá se, že na vznik onemocnění mají vliv genetické predispozice. Tato diplomová práce je součástí projektu zabývajícího se studiem kauzality jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) v kandidátních genech pro CD v české populaci. U 333 pacientů s CD a 499 zdravých jedinců jsme testovali polymorfizmy: c.3020insC, p.Gly908Arg, p.Arg702Trp v genu *CARD15*, g.-308G>A v genu *TNFA*, p.Arg381Gln v genu *IL23R* a p.Ala197Thr v genu *ATG16L1*. Určení jednotlivých genotypů jsme prováděli metodou alelické diskriminace ve formátu TaqMan sond (Applied Biosystems, USA). Varianty c.3020insC, p.908Arg v genu *CARD15* byly signifikantně asociovány s CD (OR = 4,4; 95%CI 3,0 – 6,4, respektive OR = 2,7; 95%CI 1,4 – 5,0). SNP p.702Trp byl asociován s CD až po adjustaci na zbylé dva polymorfizmy v genu *CARD15* (OR = 1,7; 95%CI 1,0 – 2,7). Nalezli jsme ochranný efekt p.381Gln v genu *IL23R* (OR = 0,6; 95%CI 0,3 – 1,0). Varianta p.197Ala v genu *ATG16L1* zvyšuje v české populaci riziko CD (OR = 1,3; 95%CI 1,0 – 1,9). Asociaci g.-308A v genu *TNFA* s CD jsme nedetekovali. Genotypo-fenotypovou analýzou prováděnou pouze na pacientech s CD jsme zjistili asociaci c.3020insC s časnější dobou diagnózy ( $p = 0,001$ ), s postižením ilea ( $p < 0,001$ ) a její protektivní vliv na postižení tlustého střeva ( $p < 0,001$ ). Varianta p.381Gln má ochranný vliv na postižení horní části gastrointestinálního traktu ( $p = 0,032$ ). Tato práce přispěla ke znalosti genetického pozadí CD u českých pacientů.



## Abstract

Crohn's disease (CD) is ranked among inflammatory bowel diseases. The etiology of the disease is not completely understood yet. However, it is assumed that genetic predispositions may play important role in the etiology of CD. This work is a part of a project studying causality of single nucleotide polymorphisms within candidate genes for CD in the Czech population. We tested in total 333 patients with CD and 499 healthy subjects for SNPs: c.3020insC, p.Gly908Arg, p.Arg702Trp within the gene *CARD15*, g.-308G>A within the gene *TNFA*, p.Arg381Gln within the gene *IL23R* a p.Ala197Thr within the gene *ATG16L1*. For determination of the genotypes we used allelic discrimination in TaqMan sonds format. Variants c.3020insC, p.908Arg within the gene *CARD15* were significantly associated with CD (OR = 4,4; 95%CI 3,0 – 6,4, OR = 2,7; 95%CI 1,4 – 5,0, respectively). SNP p.702Trp was associated with CD after adjustment for other two polymorphisms within the gene *CARD15* (OR = 1,7; 95%CI 1,0 – 2,7). We found the protective effect of the p.381Gln in the gene *IL23R* (OR = 0,6; 95%CI 0,3 – 1,0). Variant p.197Ala within the gene *ATG16L1* increased the risk of CD (OR = 1,3; 95%CI 1,0 – 1,9). We did not detect association between g.-308A in *TNFA* gene and CD. The genotype-phenotype analysis carried only on the patients detected association of c.3020insC with early onset disease ( $p = 0,001$ ), with ileal involvement ( $p < 0,001$ ) and its protective effect on the colon involvement ( $p < 0,001$ ). Variant p.381Gln has protective effect on the upper gastrointestinal involvement ( $p = 0,032$ ). This work contributed to the knowledge of the genetic background of CD among Czech patients.

# Obsah

<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>10</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
1.1 Cíle diplomové práce.....	12
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Crohnova choroba</b> .....	<b>13</b>
2.1.1 Historie.....	15
2.1.2 Incidence, prevalence.....	15
2.1.3 Příznaky, průběh.....	16
2.1.4 Klasifikace.....	17
2.1.5 Etiopatogeneze.....	18
2.1.5.1 Imunitní odpověď.....	19
2.1.5.2 Mikrobiální flóra.....	20
2.1.5.3 Faktory prostředí.....	21
2.1.5.4 Genetická predispozice.....	22
2.1.5.5 Jiné hypotézy.....	22
2.1.6 Léčba.....	22
<b>2.2 Genetické aspekty v etiologii Crohnovy choroby</b> .....	<b>23</b>
2.2.1 Metody studia genetické predispozice a kandidátních genů.....	23
2.2.1.1 Epidemiologické studie.....	23
2.2.1.2 Rodinné studie.....	24
2.2.1.3 Studie vazby.....	24
2.2.1.4 Studie asociace.....	25
2.2.2 NOD2/CARD15.....	26
2.2.2.1 Charakteristika.....	26
2.2.2.2 Funkce proteinu.....	27
2.2.2.3 Genotypo-fenotypové analýzy.....	28
2.2.3 HLA geny – <i>TNFA</i> .....	29
2.2.3.1 HLA oblast.....	29
2.2.3.2 Charakteristika <i>TNFA</i> .....	30
2.2.3.3 Funkce proteinu.....	30
2.2.3.4 Genotypo-fenotypové analýzy.....	30
2.2.4 <i>IL23R</i> .....	31
2.2.4.1 Charakteristika.....	31
2.2.4.2 Funkce proteinu.....	31

2.2.4.3 Genotipo-fenotypové analýzy .....	32
2.2.5 <i>ATG16L1</i> .....	33
2.2.5.1 Charakteristika .....	33
2.2.5.2 Funkce proteinu.....	34
2.2.5.3 Genotipo-fenotypové analýzy .....	34
2.2.7 Ostatní kandidátní geny .....	35
2.2.7.1 <i>SLC22A4</i> , <i>SLC22A5</i> .....	35
2.2.7.2 <i>DLG5</i> .....	36
2.2.7.3 <i>NOD1/CARD4</i> .....	36
2.2.7.4 <i>CTLA4</i> .....	37
2.2.7.5 <i>PTPN22</i> .....	38
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Charakteristika pacientů a kontrolního souboru .....</b>	<b>39</b>
3.1.1 Pacienti .....	39
3.1.2 Kontrolní soubor .....	39
<b>3.2 Laboratorní materiál.....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Laboratorní přístroje a pomůcky.....	41
3.2.2 Spotřební materiál .....	41
<b>3.3 Izolace DNA .....</b>	<b>41</b>
3.3.1 Izolace DNA z krve vysolováním.....	41
3.3.1.1 Materiál a chemikálie .....	42
3.3.1.2 Postup.....	42
3.3.2 Izolace DNA ze slin.....	43
3.3.2.1 Materiál a chemikálie .....	43
3.3.1.2 Postup.....	43
<b>3.4 Alelická diskriminace .....</b>	<b>44</b>
3.4.1 Real-time PCR .....	44
3.4.2 Princip alelické diskriminace .....	45
3.4.3 Primery a próby .....	45
3.4.4 Reakční směs .....	46
3.4.5 Postup a hodnocení .....	47
<b>3.5 Statistická analýza .....</b>	<b>50</b>
3.5.1 Hardy-Weinbergova rovnováha .....	50
3.5.2 Kontingenční tabulky.....	51
3.5.3 Kvantifikace rizika – odds ratio .....	51
3.5.4 Intervaly spolehlivosti.....	52

3.5.5	Chí kvadrát test .....	53
3.5.6	Fisherův exaktní test .....	54
3.5.7	Logistická regrese .....	54
3.5.8	Mann-Whitneyův test .....	54
3.5.9	Mantel-Haenszelův a Breslow-Dayův test homogenity .....	55
3.5.10	STATA .....	56
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Genotypové, alelické a fenotypické frekvence .....</b>	<b>57</b>
4.1.1	<i>CARD15</i> .....	57
4.1.2	<i>TNFA</i> .....	58
4.1.3	<i>IL23R</i> .....	58
4.1.4	<i>ATG16L1</i> .....	58
<b>4.2</b>	<b>Interakce s <i>CARD15</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>4.3</b>	<b>Genotipo-fenotypová analýza .....</b>	<b>62</b>
4.3.1	Věk v době diagnózy .....	62
4.3.2	Ostatní klinické charakteristiky .....	63
4.3.2.1	<i>CARD15</i> .....	63
4.3.2.2	<i>TNFA</i> .....	64
4.3.2.3	<i>IL23R</i> .....	64
4.3.2.4	<i>ATG16L1</i> .....	64
<b>5.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1</b>	<b>Genotypové, alelické a fenotypické frekvence .....</b>	<b>68</b>
5.1.1	Riziko variant v genu <i>CARD15</i> .....	68
5.1.1.1	Porovnání alelických frekvencí variant v genu <i>CARD15</i> v Evropě .....	68
5.1.2	Nenalezená asociace g.-308G>A v genu <i>TNFA</i> .....	72
5.1.3	Protektivní efekt p.381Gln v genu <i>IL23R</i> .....	73
5.1.4	Slabá asociace p.197Ala v genu <i>ATG16L1</i> .....	74
<b>5.2</b>	<b>Interakce s <i>CARD15</i> .....</b>	<b>74</b>
<b>5.3</b>	<b>Genotipo-fenotypová analýza .....</b>	<b>75</b>
5.3.1	Vliv c.3020insC na věk v době diagnózy .....	75
5.3.2	Vliv ostatních variant na věk v době diagnózy .....	76
5.3.3	Asociace SNP s místem postižení .....	76
5.3.3.1	Vliv SNP v genu <i>CARD15</i> .....	76
5.3.3.2	Vliv p.381Gln <i>IL23R</i> .....	77
5.3.4	Vliv SNP na další klinické charakteristiky .....	78

<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>79</b>
<b>7. PŘÍLOHY .....</b>	<b>81</b>
7.1 Původní článek 1 .....	81
7.2 Původní článek 2 .....	81
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>82</b>

## Seznam zkratek

<b>5-ASA</b>	kyselina 5-aminosalicylová
<b>ATG16L1</b>	autophagy-related 16-like 1 gene: gen související s autofágií
<b>c.</b>	coding: kódující
<b>CARD15</b>	caspase-activating recruitment domain 15: doména 15 aktivující kaspázu
<b>CD</b>	Crohn's disease: Crohnova choroba
<b>CD28</b>	molekula poskytující ko-stimulační signál nutný pro stimulaci T lymfocytů
<b>CI</b>	confidence interval: interval spolehlivosti
<b>Csk</b>	COOH-terminal Src kinase: negativní regulátor buněčného dělení a imunitní odpovědi
<b>CTLA4</b>	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4: antigen cytotoxických T lymfocytů 4
<b>DC</b>	dendritic cell: dendritická buňka
<b>DLG5</b>	discs, large homolog 5 ( <i>Drosophila</i> ): lidský diskovitý protein homologní diskovitému proteinu <i>Drosophily</i>
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid: deoxyribonukleová kyselina
<b>g.</b>	genomický
<b>GIT</b>	gastrointestinální trakt
<b>GWAs</b>	genome-wide association studies: celogenomové asociační studie
<b>HLA</b>	human leukocyte antigens: lidské leukocytární antigeny
<b>HWE</b>	Hardy-Weinberg equilibrium: Hardy-Weinbergova rovnováha
<b>IBD</b>	inflammatory bowel disease: zánětlivé střevní onemocnění
<b>IC</b>	indeterminate colitis: neurčená kolitida
<b>IDO</b>	indoleamin 2,3 dioxygenáza
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$
<b>IL</b>	interleukin
<b>IL23R</b>	receptor pro interleukin 23
<b>Lyp</b>	lymphoid-specific phosphatase: lymfaticky-specifická fosfatáza
<b>LRR</b>	leucine rich repeat: opakování bohaté na leucin
<b>M</b>	macrophage: makrofág
<b>MDP</b>	muramyl dipeptid

<b>MHC</b>	major histocompatibility complex: hlavní histokompatibilní komplex
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	nuclear factor $\kappa$ B: jaderný faktor $\kappa$ B
<b>NK</b>	natural killer: přirozený zabíječ
<b>NOD</b>	nucleotide-binding oligomerization domain: oligomerizační doména vázající nukleotid
<b>OCTN</b>	organic cation transporter: transportér organických kationtů
<b>OR</b>	odds ratio: poměr šancí
<b>p.</b>	proteinový
<b>PGN</b>	peptidoglykan
<b>PTPN22</b>	protein tyrosine phosphatase non-receptor 22: nereceptorová tyrozinová fosfatáza 22
<b>SE</b>	standard error: směrodatná chyba
<b>SH3</b>	Src homology 3 domain: konzervovaná doména kináz, která váže některé buněčné proteiny
<b>SLC22A4/5</b>	solute carrier family, member 4/5: rodina přenašečů látek rozpuštěných v roztoku, členové 4 a 5
<b>SNP</b>	single nucleotide polymorphism: jednonukleotidový polymorfismus
<b>TGF<math>\beta</math></b>	transforming growth factor $\beta$ : transformující růstový faktor $\beta$
<b>Th1</b>	T-helper cell 1: pomocný T lymfocyt 1
<b>TLR2</b>	toll like receptor: receptor skupiny Toll 2 rozeznávající specifické struktury patogenů
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor $\alpha$ : faktor nekrotizující nádory $\alpha$
<b>Treg</b>	T-regulatory cell: regulační T lymfocyt
<b>UC</b>	ulcerative colitis: ulcerózní kolitida

# 1. Úvod

Crohnova choroba je závažné, dosud nevléčitelné onemocnění, které se nejčastěji vyskytuje ve vyspělých zemích. Současná nevléčitelnost Crohnovy choroby je dána především tím, že nejsou do detailů známy příčiny jejího vzniku. Je zřejmé, že Crohnova choroba patří mezi multifaktoriální onemocnění a že jedním z důležitých faktorů podílejících se na její etiologii je genetika.

Rychlý rozvoj molekulárně-genetických technik v posledních desetiletích umožnil zjištění nových skutečností na poli genetických predispozic ke vzniku Crohnovy choroby. A právě studium genetického podkladu Crohnovy choroby může přinést nové poznatky o její etiologii, čímž také může nastínit možný další vývoj léčebných postupů a přispět tak ke zlepšení prognózy pacientů s tímto onemocněním.

Tato diplomová práce je součástí projektu, zabývajícího se genetikou Crohnovy choroby v České republice. Znalost kauzálních genetických variant, které jsou asociovány s Crohnovou chorobou v jiných evropských i zámořských populacích, dosud v České republice chybí.

## 1.1 Cíle diplomové práce

Cíle diplomové práce byly:

- Detekovat a kvantifikovat potencionální asociaci studovaných polymorfizmů v kandidátních genech (tj. v genech *CARD15*, *TNFA*, *IL23R*, *ATG16L1*) s Crohnovou chorobou u skupiny českých pacientů s diagnózou Crohnovy choroby a zdravých kontrolních subjektů.
- Zjistit možnou přítomnost interakcí mezi studovanými polymorfizmy v genech *TNFA*, *IL23R* a *ATG16L1* a genetickými variantami v genu *CARD15*.
- Provést genotypo-fenotypovou analýzu u českých pacientů s Crohnovou chorobou a zkoumat tak možnou souvislost studovaných genetických variant s věkem v době diagnózy, místem postižení a dalšími klinickými charakteristikami.



## 2. Literární přehled

### 2.1 Crohnova choroba

Crohnova choroba (CD, Crohn's disease) patří spolu s ulcerózní kolitidou (UC, ulcerative colitis) mezi chronická zánětlivá střevní onemocnění (IBD, inflammatory bowel diseases). Pro tato onemocnění je charakteristické, že se u osob s genetickou predispozicí v trávicím traktu detekuje nepřiměřená imunitní reakce na běžnou luminální flóru. Přesné příčiny vzniku IBD však zůstávají neznámé.

Hlavní rozdíly mezi CD a UC shrnuje tabulka 1. Hlubší charakteristiku Crohnovy choroby obsahují kapitoly 2.1. až 2.1.6.

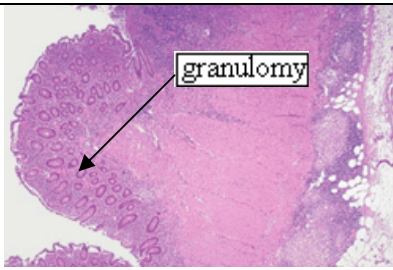
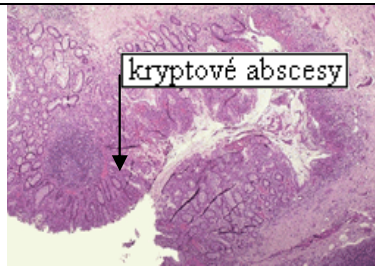
Pro Crohnovu chorobu je typické, že se zánět může vyskytovat v kterémkoli úseku trávicí trubice. Nejčastěji je zánět lokalizován v oblasti terminálního ilea, dále v oblasti tlustého střeva (Hendrickson *et al*, 2002). Pro CD je také typické perianální postižení. Patologické změny lze v některých případech nalézt v oblasti dvanáctníku, žaludku i ústech. Při CD se zánět může často rozšířit do všech vrstev trávicí trubice (slizniční, podslizniční, svalové a pojivové). Postižené úseky trávicího traktu mohou být prokládány zcela zdravými oblastmi.

Naproti tomu ulcerózní kolitidu lze definovat jako zánět sliznice tlustého střeva. Ve většině případů je primárně postižen konečník, může však být postiženo celé tlusté střevo.

Někdy není možné obě jednotky rozlišit, proto byl v anglické literatuře zaveden pojem neurčená kolitida (IC, indetermined colitis).

Chronická zánětlivá střevní onemocnění v současnosti patří mezi léčitelná, avšak nevléčitelná onemocnění.

**Tabulka 1. Základní charakteristiky CD a UC.** (Stejskal *et al*, 2001, Jirásek *et al*, 2002, Bouma a Strober, 2003)

	<b>Crohnova choroba</b>	<b>Ulcerózní kolitida</b>
<b>Klinické projevy</b>		
Průměrný věk v době diagnózy	15 - 25	20 - 40
Hlavní příznaky	průjem	krvavý průjem
Průběh	chronický	chronický
Extraintestinální manifestace	ano	ano
<b>Endoskopie</b>		
Lokalizace	celá trávicí trubice (hlavně tenké a tlusté střevo)	tlusté střevo
Šíření	diskontinuální	kontinuální
<b>Patologická anatomie*</b>		
Hloubka postižení	transmurálně	sliznice
Ztlustění stěny, zúžení průsvitu	ano	ne
Zánětlivá infiltrace	ano	ano
Hyperémie (překrvení)	ano	ano
Edém	ano	ano
Fisury	ano	zřídka
Kryptové abscesy	zřídka	ano
Granulomy	ano	ne
<b>Patologická histologie<sup>#</sup></b>		
		

\* Odlišení obou nemocí v bioptických vzorcích obtížné až nemožné (Stejskal *et al*, 2001).

<sup>#</sup> Upraveno dle Bouma a Strober, 2003.

### 2.1.1 Historie

Roku 1932 připravila skupina lékařů z newyorské nemocnice Mount Sinai publikaci do prestižního časopisu *Journal of the American Medical Association* popisující 14 pacientů se zánětem terminálního ilea. Podle tehdejších zvyklostí byli autoři pod článkem podepsáni v pořadí podle abecedy – B. B. Crohn, L. Ginzburg a G. D. Oppenheimer. Chirurg Berg, který všechny pacienty operoval, odmítl být pod článkem podepsán, protože se nepodílel na jeho sepsání. Od té doby je střevní zánětlivé onemocnění (dnes už nejen konečné části tenkého střeva) spojeno se jménem Burill Bernard Crohn (1884-1983) (shrnutí v Lukáš, 1998).

**Obrázek 1. B.B. Crohn** (Janowitz, 2000)



### 2.1.2 Incidence, prevalence

CD se může projevit v jakémkoli věku. Nejčastěji bývají první příznaky zaznamenány mezi 15. a 24. rokem života (Shivananda *et al*, 1996), výjimkou však není ani věk vyšší než 65 let. Dosud nebyl dokumentován rozdíl ve výskytu CD v závislosti na pohlaví (Lukáš, 1998).

Celosvětově je nejvyšší incidence CD (počet nových případů na velikost populace a čas) a prevalence CD (počet případů na velikost populace) zaznamenávána v severní Americe a severní a západní Evropě: Cardiff (Velká Británie): incidence 4,8/100 000/rok, prevalence 56/100 000; Malmö (Švédsko): 6,0 a 75,2; Minnesota (USA): 6,6 a 106 (shrnutí v Mayberry a Rhodes, 1984). Incidence prudce vzrostla v 60. a 70. letech minulého století. Roli sehrálo všeobecné přijetí poznatku, že se CD může vyskytovat v jakékoli části trávicí trubice a rovněž zlepšení endoskopických technik umožňujících přesnější diagnostiku. Ale počet pacientů diagnostikovaných peroperativně a mortalita na CD rostoucí incidenci v tomto období přesto potvrzují (Mayberry a Rhodes, 1984). Epidemiologické studie prováděné v 90. letech pak deklarují, že tento trend nárůstu incidence přetrvává i nadále, a to i u nás (Hildebrand *et al*, 2003; Pozler *et al*, 2006). Celková incidence CD získaná během dvouletého sledování nových pacientů ve 20 evropských medicínských centrech byla 5,6/100 000/rok. Tato studie rovněž prokázala severojižní gradient výskytu CD, kdy incidence v severních zemích byla o 80% vyšší než v jižních státech (Shivananda *et al*, 1996).

V České republice je průměrně diagnostikováno 1,6 až 2,0 nových pacientů na 100 000 obyvatel za rok (Dítě, 2001). Prevalence se u nás pohybuje mezi 40 – 45 případy na 100 000 obyvatel (Lukáš, 1998). Incidence CD zúžená na pacienty diagnostikované do 15ti let se zvýšila od roku 1991 do roku 2001 pětikrát – z 0,25 na 1,26/100 000/rok (Pozler *et al*, 2006). Pro srovnání, studie s podobným designem (sledování pacientů nově diagnostikovaných do 15. roku věku během let 1990 – 2001) provedená ve Švédsku v okrese severního Stockholmu prokázala rovněž pětinasobný nárůst počtu nových pacientů a celkovou incidenci 4,9/100 000/rok (Hildebrand *et al*, 2003).

O důvodech rostoucí incidence lze jen spekulovat, vliv mají zřejmě dietní návyky obyvatel, které se v průběhu posledních desetiletí změnily. Rovněž zpracování, příprava a skladování potravin doznaly změn. Vliv má zřejmě i stále častější sedavý způsob života a vyšší stres (viz také 2.1.5.3).

Mortalita je u pacientů s CD o 50% vyšší než v běžné populaci (Canavan *et al*, 2007). Prokázala to metaanalýza, která studovala 13 prací publikovaných v rozmezí let 1970 až 2007 zabývajících se tímto tématem.

### **2.1.3 Příznaky, průběh**

Stejně jako je rozmanité místo a závažnost postižení, jsou rozmanité i příznaky signalizující CD. Pacienti s postižením žaludku a dvanáctníku trpí nauzeou, zvracením, bolestí žaludku a poruchou polykání. Postižení tenkého střeva se projevuje bolestí břicha, průjmem a/nebo snížením hmotnosti, která může vyústit až v malabsorpční syndrom (těžkou podvýživu). Postižení tlustého střeva, které může být zaměňováno s UC, je charakterizováno průjmem s příměsí krve a hlenu a bolestí břicha. Perianální CD je spojena s výskytem análních fisur (trhlin) a fistul neboli píštělí (spojek mezi střevními kličkami navzájem nebo mezi střevními kličkami a jinými orgány). U pacientů s CD je zaznamenáván sklon k tvorbě abscesů (dutin vyplněných hnisem). U některých pacientů se vyskytují i extraintestinální komplikace ovlivňující klouby (artritida, ankylózuující spondylitida), kůži (erythema nodosum, pyoderma gangrenosum), oči (suché oči, uveitida) nebo játra (sklerózuující cholangitida) (Stejskal *et al*, 2001; Jirásek *et al*, 2002).

CD probíhá ve stádiích uklidnění a nových vzplanutí. Zhoršení stavu pacienta signalizující aktivitu zánětu se označuje jako relaps, naopak remise znamená klidové

stádium nemoci. Pokud se zánět objeví na dosud nepostížené části trávicí trubice, jedná se o recidivu (rekurenci).

#### 2.1.4 Klasifikace

Snaha o celosvětově sjednocenou charakteristiku CD usnadňující klasifikaci a umožňující relevantní statistické hodnocení fenotypu vedla mezinárodní skupinu gastroenterologů k sepsání tzv. Vídeňské klasifikace schválené roku 1998 na kongresu ve Vídni (Gasche *et al*, 2000).

Využívání Vídeňské klasifikace v praxi ukázalo několik jejích nedostatků. I proto byla při celosvětovém kongresu gastroenterologie v kanadském Montrealu roku 2005 přijata inovovaná tzv. Montrealská klasifikace IBD (Silverberg *et al*, 2005), která je využívána v klinické praxi i ve výzkumu dodnes (shrnutí v tabulce 2).

**Tabulka 2. Montrealská klasifikace.** (Silverberg *et al*, 2005)

<b>A Věk v době diagnózy</b>		
A1	≤ 16 let	
A2	17 – 40 let	
A3	> 40 let	
<hr/>		
<b>L Místo postižení</b>	<b>Modifikátor: postižení horní č. GIT (L4)</b>	
L1	terminální ileum	L1 + L4
L2	kolon	L2 + L4
L3	ileokolon	L3 + L4
<hr/>		
<b>B Chování CD</b>	<b>Modifikátor: perianální postižení (B4)</b>	
B1	nestrikurující / nepenetrující	B1 + B4
B2	strikurující	B2 + B4
B3	penetrující	B3 + B4

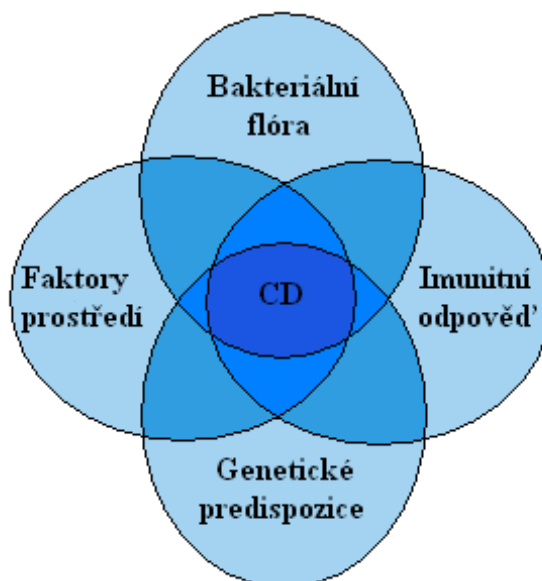
Montrealská klasifikace CD se zabývá třemi aspekty: věkem v době diagnózy (A, age at diagnosis), místem postižení CD (L, location) a hodnocením chování CD (B, behaviour). Vzhledem k tomu, že manifestace CD v mladším věku může být spojena s jiným místem postižení než manifestace v pozdějším věku a že některé geny mohou predikovat časnější nástup onemocnění (de Ridder *et al*, 2007), rozdělili autoři kategorii

A do tří podskupin: A1  $\leq$  16 let; A2 17 - 40 let; A3  $>$  40 let. Fenotyp CD je rozdělen dle místa postižení na terminálním ileum (L1), tlusté střevo (L2) nebo na postižení v obou střevech současně (ileokolon) (L3). Může se ovšem vyskytovat i ve vyšších částech gastrointestinálního traktu (GIT) (L4), a to většinou současně s lokací v oblasti střev. Proto Montrealský dokument povoluje společnou klasifikaci L4 a L1 – L3 (např. L2 + L4). Chování CD je rozděleno do tří podskupin. B1 je charakterizována jako nestrikturní (nedochází k zúžení střeva), nepenetrující CD, B2 se vyznačuje strikturní formou CD a B3 penetrující formou. Ve Vídeňské klasifikaci zahrnovala skupina B3 i pacienty s perianálními fistulami. Následné studie prokázaly, že tyto dva jevy nelze slučovat (Smith *et al*, 2004). Proto je přítomnost perianální nemoci (B4) modifikujícím faktorem chování CD (označováno např. B3 + B4) (Silverberg *et al*, 2005).

### 2.1.5 Etiopatogeneze

CD patří mezi multifaktoriální onemocnění, přesná etiologie není dosud objasněná. Mnoho experimentů na zvířecích modelech a studium pacientů s CD však přinesly několik možných scénářů vzniku CD. Nejrozšířenější hypotéza tvrdí, že se u geneticky predisponovaných jedinců vyvine příliš silná imunitní reakce (především T lymfocytů) na běžné komenzální bakterie zažívacího traktu a projev nemoci je spouštěn či urychlen faktory zevního prostředí (Sartor, 2006). Hlavní 4 komponenty vzniku CD jsou shrnuty na obrázku 2.

**Obrázek 2. Hlavní složky podílející se na etiologii CD. (Upraveno dle Sartor, 2006)**

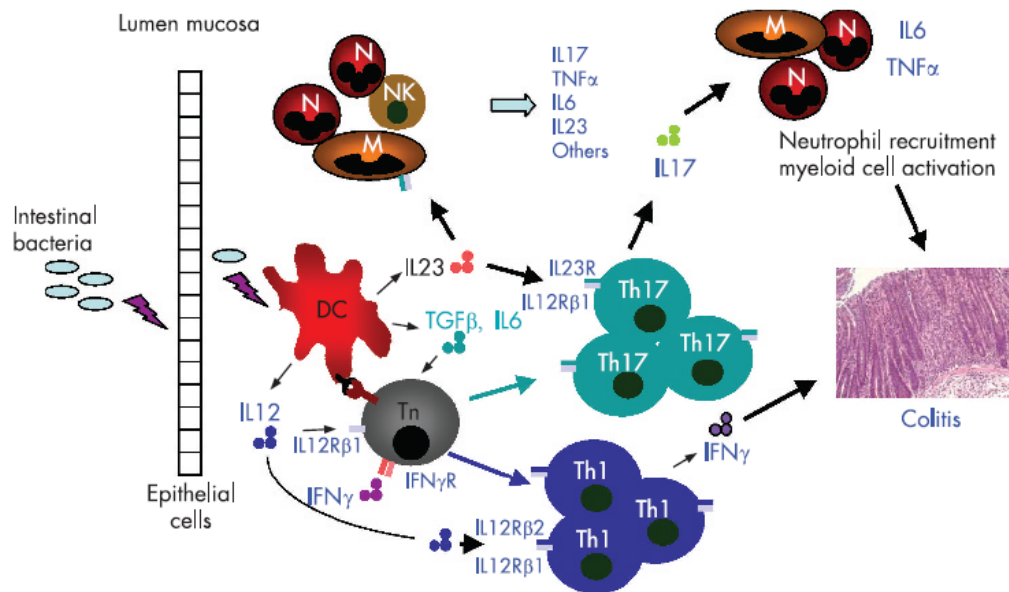


### 2.1.5.1 Imunitní odpověď

V místě postižení jsou u pacientů s CD aktivovány složky vrozené i získané imunity. Na patogenezi CD má především vliv imunitní odpověď zprostředkovaná Th1 lymfocyty (Bouma a Strober, 2003). Prozánětlivé interleukiny 12 a 18 (IL-12, IL-18) stimulují diferenciaci Th1 buněk. Th1 následně produkují jiné prozánětlivé cytokiny: interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) a faktor nekrotizující nádory (TNF, tumor necrosis factor).

Role protizánětlivého interleukinu 12 se zdála být velmi důležitou v patogenezi CD. Dokázala to například studie, která detekovala IL-12 ve střevní tkáni pacientů s CD ve vyšší míře než u zdravých jedinců (Parronchi *et al*, 1997). Podání anti-IL-12 protilátek myším s vyvinutou kolitidou vyústilo ve znatelné zlepšení nemoci a navrácení jejich původní tělesné váhy (Neurath *et al*, 1995). Ovšem náhled na roli IL-12 v zánětlivé reakci u CD byl modifikován objevem jiného prozánětlivého cytokinu produkovaného dendritickými buňkami: IL-23 (Oppmann *et al*, 2000). IL-12 a IL-23 jsou tvořeny dvěma podjednotkami, z nichž podjednotka p40 je u obou identická. A právě zablokování podjednotky p40 v předešlých studiích na myších modelech mělo sice za následek ztrátu funkce IL-12 ale současně také, tehdy ještě neznámého, IL-23. Interleukin 23 stimuluje CD4<sup>+</sup> T buňky nazývané Th17, které následně produkují prozánětlivé cytokiny IL-17 a IL-22 (Aggarwal *et al*, 2003; Liang *et al*, 2006). IL-17 zprostředkovává přes makrofágy produkci dalších prozánětlivých cytokinů a vyvolává zvýšenou kumulaci neutrofilů (Kolls a Linden, 2004), což indukuje vznik zánětu. Bylo nalezeno i zvýšené množství IL-17 a IL-22 ve střevech pacientů s CD (Fujino *et al*, 2003; Schmechel *et al*, 2008). Kaskády reakcí zahrnující Th1 a Th17 znázorňuje obrázek 3.

**Obrázek 3. Kaskády reakcí, které vyústí ve střevní zánět.** (McGovern a Powrie, 2007) Bakterie stimulují epitelální buňky, dendritické buňky (DC, dendritic cells) a makrofágy (M, macrophages) k produkci cytokinů. IL-12 a  $\text{IFN}\gamma$  stimulují prekurzor Th buněk (Tn) k diferenciaci Th1. Th1 lymfocyty produkují prozánětlivý  $\text{IFN}\gamma$  (modrá). Transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF  $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ) a IL-6 indukují v buňkách Th17 produkci IL-17 a expresi receptoru pro IL-23 (IL23R) (zelená). IL-23 produkovaný dendritickými buňkami pak podporuje sekreci IL-17 a zároveň stimuluje makrofágy, neutrofilů a natural killers (NK) k produkci prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-17, IL-23,  $\text{TNF}\alpha$ ), které způsobí střevní zánět.



### 2.1.5.2 Mikrobiální flóra

Experimenty prováděné na zvířecích modelech dokázaly, že bez přítomnosti mikroorganismů se střevní zánět nevyvine (Rath *et al*, 2001).

Za fyziologických podmínek představuje sliznice střeva (její epitelová vrstva) bariéru mezi imunitním systémem a intraluminálním prostředím střeva (Lukáš, 1998). Pacienti s CD mohou mít pozměněnou epitelovou vrstvu střeva, což může způsobit bližší kontakt bakterií se sliznicí, který vyústí v iniciaci dějů vedoucích k zánětu (Hendrickson *et al*, 2002). Bylo zjištěno, že u pacientů s IBD je mnohem vyšší koncentrace bakterií vytvářejících biofilm na střevním epitelu než u zdravých jedinců. Navíc byla detekována přímá souvislost mezi zvýšeným množstvím bakterií a závažností onemocnění (Lakatos *et al*, 2006).

Roli běžné střevní bakteriální flóry v patogenezi CD potvrdil nález asociace CD s proteinem NOD2 (podrobněji viz kapitola 2.2.2.2).



Předpokládá se také, že i interakce mezi intestinální flórou a slizničními obrannými mechanismy významně zasahuje do iniciace a následného rozvoje CD. Buňky epitelu produkují rozličné typy obranných molekul limitujících bakteriální růst (Eckmann, 2004). Mezi tyto molekuly patří defenziny, jejichž sníženou produkci lze u pacientů s CD pozorovat (Kocsis *et al*, 2007).

### 2.1.5.3 Faktory prostředí

Mezi environmentální faktory, o kterých se uvažuje v souvislosti s CD, patří nejčastěji kouření, dieta, stres a socioekonomický status.

Aktivní kuřáctví zvyšuje pravděpodobnost manifestace CD a je asociováno se závažnějšími projevy nemoci (Birrenbach a Bocker, 2004). Přesné mechanismy patogeneze kouření jsou nejasné, ovšem předpokládá se, že kouření modifikuje buněčné a humorální imunitní reakce, snižuje efekt fagocytózy, ovlivňuje hladiny cytokinů, modifikuje střevní propustnost a pohyblivost, apod. (shrnutí v Birrenbach a Bocker, 2004). U kuřáků je riziko CD dvakrát vyšší než u těch, co nekouří (Lewis *et al*, 2007).

Vliv potravy na vznik CD se předpokládá, protože přichází do nejtěsnějšího kontaktu se zažívacím ústrojím. Během druhé poloviny 20. století, kdy došlo k výraznému nárůstu výskytu CD, se měnily i stravovací návyky obyvatelstva. Mechanismus vlivu diety přesto zůstává neznámý (Sartor, 2006).

Podobně role stresu není objasněná. Emoční vlivy mají pravděpodobně dopad na aktivitu imunitního systému a mohou u predisponovaných jedinců spouštět onemocnění nebo způsobit relaps (Lukáš, 1998).

CD se častěji objevuje u osob s vyšším vzděláním, se sedavým a stresujícím zaměstnáním (Sonnenberg, 1990). Podle tzv. „Hygienické teorie“ je vyšší socioekonomický status asociován s nízkou frekvencí výskytu helmintů. Ti jsou naopak často přítomní v oblastech s horší lékařskou péčí, s nečistými potravinami a celkově horšími životními podmínkami. Infekce helminty chrání před IBD tím, že reguluje imunitní odpověď – stimuluje produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 a TGF- $\beta$ , který inhibuje proliferaci buněk nutných k zánětlivému procesu (shrnutí v (Kucharzik *et al*, 2006)). Studie u pacientů s CD následně pozitivní vliv helminta *Trichuris suis* potvrdila (Summers *et al*, 2005).

#### 2.1.5.4 Genetická predispozice

Čtvrtou komponentou patogeneze CD podle hlavního modelu je genetická predispozice jedinců. Této části je vyhrazen větší prostor níže, v kapitole 2.2.

#### 2.1.5.5 Jiné hypotézy

Další publikovaná hypotéza patogeneze CD je tzv. „Mykobakteriální teorie“. Podle ní je *Mycobacterium avium*, poddruh *M. paratuberculosis*, hlavním etiologickým (ovšem ne jediným) agens CD. Předpokládá se, že toto agens, podobně jako *M. tuberculosis* či *M. leprae*, dokáže přežít v hostiteli tím, že dysreguluje imunitní signalizace (Chamberlin a Naser, 2006). Kmen *Mycobacterium avium*, poddruh *M. paratuberculosis* byl detekován u 40% granulomů u pacientů s CD podstoupivších chirurgický zákrok (Ryan *et al*, 2002). Přesto je ale jeho asociace s CD zatím nejistá (Lakatos *et al*, 2006).

Uvažuje se i o dalších patogenech účastnících se vzniku CD: *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, nebo viru spalniček. Výsledky dosavadních studií jsou však sporné (Kucharzik *et al*, 2006; Lakatos *et al*, 2006).

#### 2.1.6 Léčba

Jelikož dosud není možné CD plně a nevratně vyléčit, je hlavním cílem léčby zkrácení relapsu, navození remise a především její udržení. K dosažení a udržení remise se využívají preparáty obsahující kyselinu 5-aminosalicylovou (5-ASA), imunosupresiva a popřípadě infliximab.

Kyselina 5-aminosalicylová blokuje produkci prostaglandinů a leukotrienů, inhibuje chemotaxi neutrofilů aktivovaných bakteriálními peptidy, odstraňuje reaktivní kyslíkové metabolity a zřejmě zabraňuje aktivaci jaderného transkripčního faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B, nuclear factor -  $\kappa$ B) (Podolsky, 2002).

Imunosupresiva azathioprin a merkaptopurin se nejčastěji předepisují pacientům, u nichž nelze vysadit podávání kortikoidů. Narušují dělení specifických a dlouhožijících skupin T buněk, což může vysvětlovat dlouhý čas potřebný k dosažení terapeutického cíle (Podolsky, 2002). Maximálního efektu těchto medikamentů je dosaženo až za 12 – 16 týdnů po začátku léčby (Beattie *et al*, 2006).

TNF- $\alpha$  je jedním z prozánětlivých cytokinů sekretovaných ve zvýšené míře u pacientů s CD (Komatsu *et al*, 2001). Monoklonální protilátka proti TNF- $\alpha$ , infliximab, se ukázala být účinným lékem navozujícím a udržujícím remisi. Infliximab se skládá

z komplement fixujícího „lidského“ imunoglobulinu IgG<sub>1</sub> a z antigen vázajícího regionu odvozeného z myši, který váže rozpustný TNF- $\alpha$  (Podolsky, 2002). Kromě inhibice TNF- $\alpha$  infliximab nejspíš i spouští apoptózu T buněk (Targan *et al*, 1997).

Aktivní CD je léčena kortikosteroidy, látkami s imunosupresivním účinkem. Kortikosteroidy působí rychle a indukují remisi u zhruba 70% pacientů (Buning a Lochs, 2006). Vždy by se měly užívat jen po nezbytně nutnou dobu, protože nebyl prokázán jejich vliv na udržení stádia remise a mají velké množství vedlejších účinků.

Antibiotika jsou užitečná při léčbě náhlého vzplanutí CD a při infekčních komplikacích.

Jedním z možných projevů CD je snížení hmotnosti, což může vyústit až v malnutriční syndrom. V tomto případě je nezbytná umělá výživa. Kompletní enterální výživa se někdy také užívá k dosažení remise. Dobrý nutriční stav pacienta už sám o sobě vede ke zlepšené reakci na léčbu.

Indikací k chirurgickému zákroku u pacientů s CD jsou rezistence ke konzervativní léčbě, neprůchodnost střeva, perforace, abscesy, atd. U pacientů diagnostikovaných v dětském věku s nedostatečným růstem vyvolala resekce (odstranění) postižené oblasti střeva opětovný růst (Hendrickson *et al*, 2002; Beattie *et al*, 2006). Operace ale bohužel nemusí být konečným vyřešením problému pacientů s CD. Až u 50% případů je do 10 let nutný další chirurgický zákrok (Rampton, 1999).

## **2.2 Genetické aspekty v etiologii Crohnovy choroby**

Vliv genetiky na etiologii a patogenezi CD je potvrzen rozličnými důkazy, které přinesly epidemiologické výzkumy a rodinné studie. Oblasti lidského genomu, respektive kandidátní geny spojené s náchylností k CD pak identifikovaly vazbové a asociační studie, včetně recentních celogenomových.

### **2.2.1 Metody studia genetické predispozice a kandidátních genů**

#### **2.2.1.1 Epidemiologické studie**

Epidemiologické studie prokázaly, že se CD častěji objevuje u určitých etnických a rasových skupin - u Židů spíše než u nežidovské populace, u europoidní (kavkazské) rasy spíše než u mongoloidní nebo ekvatoriální (negroidní a australoidní) (Ruthruff, 2007), což dokládá genetickou heterogenitu napříč populacemi.

### 2.2.1.2 Rodinné studie

Zvýšená prevalence IBD mezi příbuznými pacientů s CD nebo UC je jasným důkazem podílu genetických faktorů na vzniku IBD, respektive CD. Nejvíce jsou ohroženi příbuzní prvního stupně, zejména pak sourozenci (Satsangi *et al*, 1994). Riziko výskytu nemoci je desetkrát zvýšeno oproti nepříbuzným jedincům (Duerr, 1996). V rodinách s výskytem CD se může objevit i pacient s UC, což potvrzuje genetickou příbuznost těchto onemocnění.

Silným nástrojem pro zkoumání vlivu genetických predispozic jsou studie na dvojčatech. Ve švédském registru dvojčat čítajícího okolo 25 000 párů bylo nalezeno 46 dvojčat s CD (Tysk *et al*, 1988). Osm párů z 18 monozygotních dvojčat bylo konkordantních pro CD (tzn. oba byli shodní ve zkoumané charakteristice) na rozdíl od pouze jednoho páru z 26 dizygotních dvojčat. Konkordance CD (tzn. pravděpodobnost že oba jedinci budou mít stejnou charakteristiku) byla u jednovaječných dvojčat 58,3%, u dvojvaječných 3,9% (Tysk *et al*, 1988) a je tak silným důkazem vlivu genetických faktorů na etiologii CD.

### 2.2.1.3 Studie vazby

K identifikaci genu skutečně spojeného s náchylností k CD je nutné dokázat, že daný gen je ve vazbě se studovanou nemocí, tzn. že je přenesen spolu s nemocí z generace na generaci. Studie vazby jsou na rozdíl od populačních asociačních studií díky aplikaci na rodinné příslušníky oproštěny od potenciálního populačního zkreslení. Na druhou stranu hrozí nepřesné výsledky kvůli malé velikosti souboru (málo rodin s nemocnými členy) (Yang *et al*, 1999) nebo nejasnému modelu dědičnosti CD (Satsangi *et al*, 1994; Duerr, 1996). U CD nebyl prokázán klasický mendelovský model dědičnosti, tj. autozomálně dominantní nebo recesivní (Satsangi *et al*, 1994), na vzniku nemoci se podílí několik genů současně. Proto jsou ke statistickému zhodnocení nutné neparametrické metody, které nevyžadují specifikovaný model dědičnosti onemocnění ani odhady genové frekvence a stupně penetrance genů (Yang *et al*, 1999). Neparametrické testy vazby porovnávají, zda je konkordance genetického markeru u nemocných párů vyšší než konkordance, která by se dala očekávat díky náhodě (Duerr, 1996).

Původně byly za markery zvoleny mikrosatelity (tandemově se opakující repetice po 2 - 6 nukleotidech). Později, na začátku 21. století, je nahradily jednonukleotidové polymorfizmy (SNP, single nucleotide polymorphisms), a to z několika důvodů.

Narozdíl od mikrosatelitů jsou dostatečně početné (Allen-Brady *et al*, 2003) a rovněž prochází mutacemi méně často. Pokud totiž platí předpoklad, že náchylnost k onemocnění je hlavně určena běžnými, letitými DNA variantami, pak je nutné užít k identifikaci ancestrálních haplotypů markery, které jsou stabilní během dlouhé doby. Navíc jednotlivé SNP mohou samy o sobě představovat kauzální variantu pro onemocnění, zatímco mikrosatelitní makery jen označí oblast s kauzální variantou.

Celogenomové studie vazby jsou založeny na typizaci genetických markerů v celém lidském genomu, u nichž se předpokládá, že jsou sdíleny mezi postiženými členy rodin statisticky významně častěji, než by to odpovídalo náhodě (Hendrickson *et al*, 2002). Celogenomové studie vazby s mikrosatelitními markery tímto způsobem naznačily několik regionů na chromozómech 1, 3, 5, 6, 10, 12, 16, 19, na nichž se pravděpodobně nachází geny s vlivem na etiologii CD (Hugot *et al*, 1996; Satsangi *et al*, 1996; Hampe *et al*, 1999a; Rioux *et al*, 2000). Regiony identifikované pomocí vazbových studií byly následně podrobeny analýzám kandidátních genů – populačním asociačním studiím testujícím 5 až 50 SNP uvnitř genu (Van Limbergen *et al*, 2007b).

#### **2.2.1.4 Studie asociace**

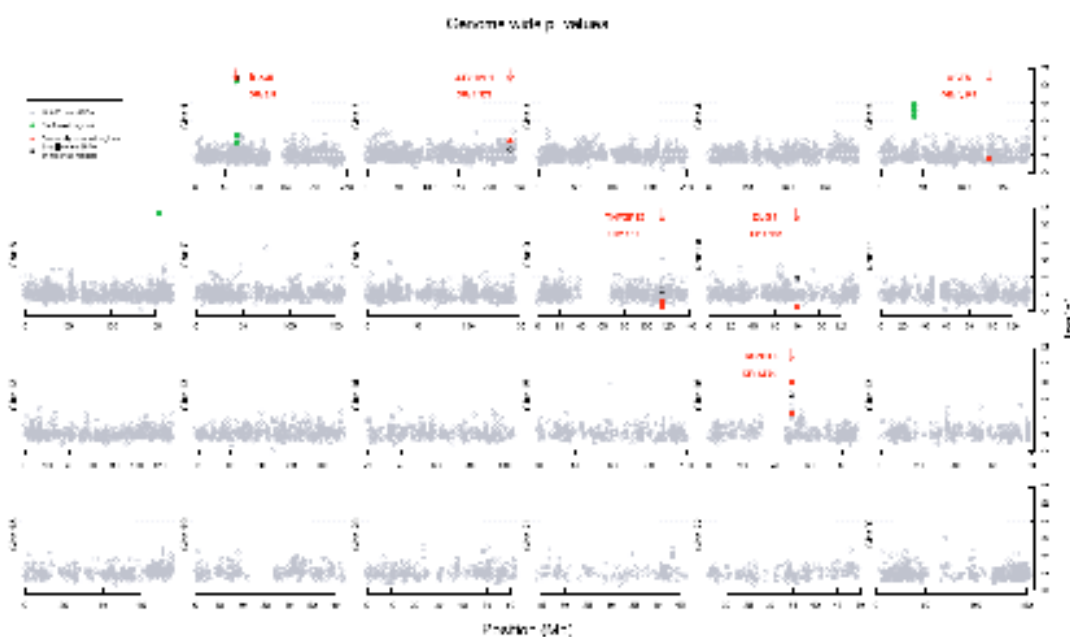
Genetické studie asociace hodnotí korelace mezi genetickými variantami a onemocněním na populační úrovni. Studie s populačními kontrolami užívají jako kontroly nepříbuzné jedince. Studie asociace tak představují širší pole působnosti, ale také v sobě skrývají několik úskalí. Již jsem zmínila možný falešný nálezn asociace kvůli populačnímu rozvrstvení (stratifikaci), kdy v případě, že se populace skládá z několika geneticky vzdálených subpopulací, může být studovaná varianta asociovaná s nemocí jen v jedné ze subpopulací. Hrozí rovněž riziko mnohonásobného testování, kdy při testování velkého počtu markerů na 5% hladině významnosti ( $p \leq 0,05$ ) bude 5% výsledků statisticky významných i bez jakéhokoli skutečného efektu. Proto p hodnota potřebuje korekci v závislosti na počtu zkoumaných otázek. Nejznámější metodou řešící korekci na mnohonásobné testování je Bonferroniho metoda. Cílem metody je udržet hladinu pravděpodobnosti chyby 1. druhu (většinou 5%) a v podstatě ji rozdělit na všechna porovnání (Zvárová, 1998).

Asociační studie s adekvátním designem jsou pak účinným nástrojem k mapování oblastí genomu asociovaných s CD: např. v polymorfní oblasti HLA genů (Danze *et al*, 1996) nebo k potvrzení, popř. vyvrácení kauzality variant detekovaných vazbovými studiemi u různých populací: např. nepotvrzení kauzality variant v genu CARD15 u

japonské populace (Inoue *et al*, 2002). Jsou také nejspolehlivější metodou, kterou lze detekovat asociaci subtypu či fenotypu onemocnění s určitou variantou ve studovaném genu: např. lokus IBD5 ovlivňuje nutnost operace u pacientů s CD (Noble *et al*, 2005).

Celogenomové asociční studie (GWAs, genome-wide association studies) využívající nyní dostupnou čipovou genotypizační technologii jsou schopné otestovat až 1 milion markerů v celém lidském genomu najednou (Van Limbergen, 2007b). Tato velmi nová metoda přinesla nejen potvrzení již dříve objevených variant v genech asociovaných s CD, ale také umožnila detekci dosud neznámých kauzálních SNP (Duerr *et al*, 2006; WTCCC 2007; Hampe *et al*, 2007; Libioulle *et al*, 2007; Raelson *et al*, 2007) a umožnila tak významný pokrok ve znalosti etiopatogeneze CD a v možnostech budoucí terapie.

**Obrázek 4. Celogenomový scan u pacientů s CD.** Osa x znázorňuje pozice (Mb) jednotlivých chromozómů, osa y záporný logaritmus zjištěných p hodnot pro 10 000 SNP (z 302 451 SNP). (Libioulle *et al*, 2007).



## 2.2.2 NOD2/CARD15

### 2.2.2.1 Charakteristika

Dvě výzkumné skupiny současně identifikovaly v roce 2001 jako první kandidátní gen pro CD *CARD15* kódující protein NOD2 (Hugot *et al*, 2001; Ogura *et al*, 2001). Gen *CARD15* (caspase-activating recruitment domain 15) se nachází na chromozomu 16q12. V tomto genu byly objeveny tři varianty, jejichž přítomnost zvyšuje riziko

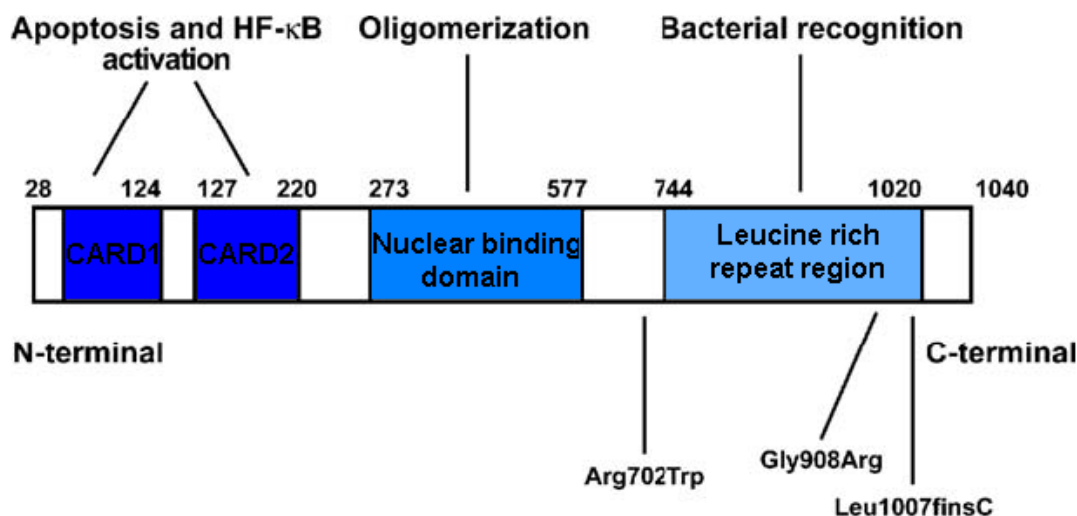
vzniku CD. Jedná se o inzerci cytozinu (C) v jedenáctém exonu genu v pozici 3020 na kódujícím řetězci (c.3020insC, rs5743293), která způsobí posun čtecího rámce. Místo leucinu je syntetizován prolin (p.Leu1007Pro), a za ním následuje stop-kodón předčasně ukončující syntézu proteinu NOD2, který tak obsahuje 1007 aminokyselin místo běžných 1040 (Ogura *et al*, 2001). Dalšími dvěma variantami jsou substituce cytozinu za guanin (G) v osmém exonu v pozici 2722, která vyvolá záměnu aminokyselin argininu za glycin (p.Gly908Arg, rs2066845), respektive substituce thyminu (T) za cytozin ve čtvrtém exonu v pozici 2104 způsobující výměnu tryptofanu za arginin (p.Arg702Trp, rs2066844) (Ogura *et al*, 2001; Sun *et al*, 2003).

Asociaci polymorfizmů c.3020insC, p.Gly908Arg a p.Arg702Trp v genu *CARD15* s CD testovalo velké množství následujících studií prováděných na různých populacích. Většina z nich kauzalitu těchto SNP potvrdila (shrnutí ve van der Linde *et al*, 2007). Výjimku představují asijské kohorty, u nichž nebyl vliv variant v *CARD15* na CD prokázán (shrnutí ve Economou *et al*, 2004). Heterozygoté pro jednu z minoritních alel čelí 2krát až 4krát většímu riziku vzniku CD, pro homozygoty či vícenásobné heterozygoty je riziko 15krát až 40krát vyšší než pro ty, kteří žádný minoritní SNP nenesou (Economou *et al*, 2004). Je nutné rovněž zdůraznit, že zde popisované polymorfizmy nejsou přítomny u všech pacientů s diagnózou CD a zároveň se vyskytují u malého množství zdravých jedinců: např. alelická frekvence minoritní alely c.3020insC byla v německé studii u pacientů s CD 12,2% a u kontrol 2,1% (Buning *et al*, 2004).

### 2.2.2.2 Funkce proteinu

NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2), produkt genu *CARD15*, je cytoplazmatický protein, který se podílí na regulaci imunitní odpovědi a buněčné smrti u rostlin a živočichů (Inohara a Nunez, 2003). Je exprimován antigen prezentujícími buňkami (makrofágy, dendritickými buňkami nebo neutrofily), ale také epitelovými buňkami, např. Panetovými buňkami v tenkém střevě (Ogura *et al*, 2003). Protein NOD2 je tvořen dvěma CARD doménami na N-konci, jednou nukleotid-vázající a oligomerizační doménou (NOD) umístěnou uprostřed proteinu a deseti opakováními bohatými na leucin blízko C-konce (LRR, leucin rich repeats) (Ogura *et al*, 2003). Tři popsané SNP se nachází uvnitř nebo v blízkosti LRR domény, jak ukazuje obrázek 5.

Obrázek 5. Protein NOD2 (Quaglietta *et al*, 2007)



Existují tři hlavní teorie zabývající se rolí proteinu NOD2 ve vývoji zánětu v zažívacím traktu pacientů s CD. Za prvé, peptidoglykan (PGN) komenzálních bakterií ve střevě je rozeznán TLR2 (toll-like receptor 2), který kaskádou následných reakcí zprostředkovává sekreci prozánětlivého interleukinu 12. Současně je také bakteriální PGN metabolizován na muramyl-dipeptid (MDP), který je rozpoznán LRR oblastí proteinu NOD2, a který pak inaktivuje dráhu vedoucí k sekreci IL-12. Pokud je ovšem NOD2 defektní vlivem výše popsaných mutací v LRR oblasti, sekrece IL-12 není regulována a vede k zánětu (O'Neill, 2004). Druhá hypotéza předpokládá, že NOD2 přes svůj ligand MDP indukuje expresi beta- i alfa-defensinů (antimikrobiálních peptidů) zvyšujících tak obranu hostitele před patogeny. Naproti tomu protein NOD2 s c.3020insC variantou vyústí v zhoršenou indukci defensinů, a tím ke zvýšené bakteriální zátěži a následnému zánětu (Wehkamp *et al*, 2004; Voss *et al*, 2006). Podle třetí teorie, defektní protein NOD2 po rozeznání MDP spouští nadměrnou produkci prozánětlivého interleukinu 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Navíc NOD2 změněný přítomností variant asociovaných s CD efektivněji aktivuje transkripční faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), regulátora imunitní odpovědi na zánět (Maeda *et al*, 2005).

### 2.2.2.3 Genotipo-fenotypové analýzy

Předpokládá se, že u pacientů diagnostikovaných v dětském věku hraje genetická predispozice významnější roli než u pacientů diagnostikovaných v dospělosti. Na základě tohoto tvrzení se očekává, že frekvence kauzálních variant v genech spojených



s náchylností k CD, bude u pacientů diagnostikovaných v dětském věku s CD vyšší (de Ridder *et al*, 2007). Vliv genetických faktorů na věk manifestace či diagnózy byl a je proto zkoumán u většiny kandidátních genů pro CD. Německá práce prokázala vyšší podíl varianty c.3020insC u 55 pediatrických pacientů s CD v porovnání se souborem dospělých pacientů pocházejících z téměř celé západní Evropy (Sun *et al*, 2003). Ke stejným závěrům došla i nizozemská studie (de Ridder *et al*, 2007). Na druhé straně, izraelský výzkum statisticky významný rozdíl v přítomnosti studovaných SNP mezi pediatrickými a dospělými pacienty nepotvrdil (Leshinsky-Silver *et al*, 2005).

Větší shoda mezi publikovanými studiemi je patrná ve zkoumání vlivu kauzálních variant v genu *CARD15* na místo postižení a chování CD. Jak dokazuje metaanalýza z roku 2004, přítomnost c.3020insC, p.Gly908Arg nebo p.Arg702Trp zvyšuje pravděpodobnost postižení tenkého střeva. Naopak u pacientů s kolonickou formou CD je výskyt SNP v genu *CARD15* statisticky nižší (Economou *et al*, 2004). Některé studie dokázaly i souvislost mutací v *CARD15* s komplikovanější formou CD (strikturující, penetrující) (van der Linde *et al*, 2007) a s nutností operace (Russell *et al*, 2005).

### **2.2.3 HLA geny – *TNFA***

#### **2.2.3.1 HLA oblast**

Hlavní histokompatibilitní komplex (MHC, major histocompatibility complex; u lidí HLA, human leukocyte antigens) byl popsán jako soubor genů, jejichž produkty jsou klíčové pro histokompatibilitu, tedy schopnost transplantátu přilnout se v organismu jiného jedince. Později se termín rozšířil a nyní označuje celou genovou oblast, včetně genů s imunitou spjatými pouze vzdáleně nebo vůbec ne. Geny pro HLA se nachází na krátkém raménku šestého chromozómu (6p21). Tato vysoce polymorfní oblast obsahuje geny HLA I. a II. třídy, jejichž primární funkcí je prezentace antigenu. Jejich role v imunitních reakcích je proto zařazuje do skupiny kandidátních genů pro IBD. Celogenomové vazbové studie pak toto zařazení potvrzují (Hampe *et al*, 1999b; Yang *et al*, 1999).

V oblasti HLA genů II. třídy byla slabá asociace s CD nalezena u alel DR7, DRB3\*0301 a DQ4 (Stokkers *et al*, 1999). V současnosti je ovšem jedním z nejčastěji studovaných genů v rámci HLA regionu *TNFA*, součástí tzv. III. třídy HLA genů, která má sice imunologickou funkci ale nepodílí se na prezentaci antigenů.

### 2.2.3.2 Charakteristika *TNFA*

Gen *TNFA* kóduje prozánětlivý cytokin TNF $\alpha$ , který přenáší signály mezi imunitními a ostatními buňkami a je zapojen v procesech buněčné smrti, buněčného metabolismu nebo tvorby zánětu (Van Deventer, 1997). Bylo zjištěno, že TNF $\alpha$  je ve zvýšené míře sekretován při zánětlivé reakci u pacientů s CD (Komatsu *et al*, 2001). Dalším důvodem pro zkoumání genu *TNFA* byla úspěšná léčba některých pacientů s CD monoklonální protilátkou proti TNF- $\alpha$  (viz také kapitola 2.1.6).

Wilson *et al* doložili, že substituce adeninu (A) za guanin v promotorové oblasti v pozici -308 (rs1800629) zvyšuje transkripční aktivitu *TNFA* (Wilson *et al*, 1997). Následující práce zabývající se studiem asociace g.-308G>A s CD však nedocházely k stejným výsledkům (Ferreira *et al*, 2005; Fowler *et al*, 2005).

### 2.2.3.3 Funkce proteinu

Funkcí TNF $\alpha$  v souvislosti s IBD je dopravit cirkulující zánětlivé buňky do tkáňových oblastí zánětu, indukovat edémy, ale hlavně formovat granulomy (Van Deventer, 1997). Regulace exprese genu *TNFA* je buněčně specifická a *in vitro* zkoumání vlivu studovaných polymorfizmů má jen omezené možnosti zjistit, jak je *TNFA* regulován *in vivo* (Ahmad *et al*, 2006). Přesto ale bylo prokázáno, že transkripční faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) vázající se do promotorových oblastí a aktivující transkripci zánětlivých genů se ve zvýšené míře vyskytoval v tkáni tlustého střeva u pacientů s CD v porovnání se zdravými kontrolami (Schreiber *et al*, 1998). Vliv NF- $\kappa$ B potvrzuje i fakt, že aplikace kortikosteroidů potlačuje aktivaci NF- $\kappa$ B u pacientů s CD, a to tím že stabilizuje cytologický inhibitor NF- $\kappa$ B (Schreiber *et al*, 1998).

### 2.2.3.4 Genotypo-fenotypové analýzy

Dosud nebyla publikovaná žádná studie porovávající frekvence g.-308A mezi pacienty diagnostikovanými v dětském a dospělém věku s CD. Studium vlivu SNP g.-308G>A pouze u pacientů diagnostikovaných do 18ti let věku přineslo nesourodé výsledky jako u dospělých kohort (Levine *et al*, 2005; Sýkora *et al*, 2006).

Minoritní alela A byla detekována ve zvýšené míře u pacientů s postižením tlustého střeva (Louis *et al*, 1996) a u pacientů s komplikovanějšími formami CD (Sýkora *et al*, 2006).

## **2.2.4 IL23R**

### **2.2.4.1 Charakteristika**

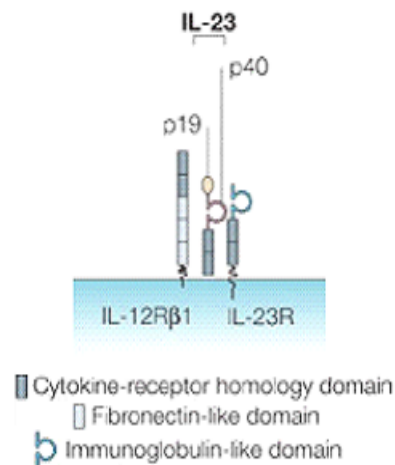
Mezi prvními kandidátními geny pro CD nalezenými pomocí celogenomových asociačních studií byl gen kódující podjednotku receptorového komplexu pro prozánětlivý interleukin 23 (*IL23R*) (Duerr *et al*, 2006). Gen *IL23R* leží na krátkém raménku prvního chromozómu (1p31). Duerr *et al* (2006) ve své analýze detekoval tranzici adeninu za guanin v pozici 1142, která způsobí substituci argininu za glutamin na pozici 381. aminokyseliny (p.Arg381Gln, rs11209026). Zároveň našel i devět dalších markerů v intronech genu *IL23R* a v jeho intergenovém regionu asociovaných nezávisle s CD. Glutaminová alela (p.381Gln) se ve zkoumaných populacích vyskytovala mnohem méně často než argininová alela, proto se předpokládá, že je variantou chránící její nositele před CD, a to jak v židovské tak v nežidovské kohortě (Duerr *et al*, 2006). I další celogenomové studie tento nález zopakovaly (WTCCC, 2007; Libioulle *et al*, 2007; Raelson *et al*, 2007; Rioux *et al*, 2007).

Následné replikační studie prováděné na různých evropských a zámořských populacích kauzalitu varianty p.Arg381Gln potvrdily (Buning *et al*, 2007; Glas *et al*, 2007; Baptista *et al*, 2008). Pouze japonská studie asociaci SNP s CD zamítla, což dokládá značnou genetickou odlišnost japonské, potažmo asijské populace (Yamazaki *et al*, 2007).

### **2.2.4.2 Funkce proteinu**

Extracelulární doména receptoru *IL23R* se skládá ze signální sekvence, N-terminální Ig podobné domény a dvou cytokin-receptorových domén. Na transmembránovou doménu navazuje cytoplazmatická doména s 252 aminokyselinami (Parham *et al*, 2002) Varianta p.Arg381Gln se nachází v cytoplazmatické doméně jako pátá nejbližší aminokyselina ke transmembránové doméně (obrázek 6). Je v rámci druhů vysoce konzervovaná (Duerr *et al*, 2006).

**Obrázek 6. Stavba IL-23, IL23R a IL12Rβ1. (Iwakura a Ishigame, 2006)**



Jak jsem již popsala výše v kapitole 2.1.5.1 o etiopatogenezi CD, prozánětlivý interleukin 23 (IL-23) je významným stimulatorem Th17 buněk, které jsou zapojeny v zánětlivém procesu u pacientů s CD (McGovern a Powrie, 2007). Receptorový komplex pro IL-23 se skládá ze dvou podjednotek: IL23R a IL12Rβ1 a je exprimován T buňkami a NK (natural killers) buňkami (Parham *et al*, 2002). Vazba cytokinu na receptorový komplex se projeví v intracelulární části receptoru a zahájí tak signální kaskádu, jejímž výsledkem je sekrece prozánětlivého cytokinu IL-17 a IL-22 (Liang, 2006). Nedávno publikovaná studie prezentovala potencionální roli polymorfizmu p.Arg381Gln v patogenezi CD (Schmechel *et al*, 2008). Pacienti s minoritní protektivní alelou měli signifikantně nižší hladinu IL-22 produkovaného Th17 buňkami než pacienti s majoritní alelou (Schmechel *et al*, 2008).

#### **2.2.4.3 Genotypo-fenotypové analýzy**

Protektivní efekt glutaminové alely v genu *IL23R* byl potvrzen i u pediatrické skupiny pacientů ze Skotska, Kalifornie a Pensylvánie (Baldassano *et al*, 2007b; Dubinsky *et al*, 2007; Van Limbergen *et al*, 2007a). Pouze jedna z dosud publikovaných prací porovnávala alelické frekvence polymorfizmu p.Arg381Gln mezi pacienty diagnostikovanými před dovršením 18 let a pacienty diagnostikovanými v dospělém věku, a to v izraelské židovské populaci (Leshinsky-Silver *et al*, 2007). Průměrný věk heterozygotů pro glutaminovou alelu byl v době diagnózy 17,8 let, u homozygotů pro majoritní alelu pak 21,3 let (homozygoté pro minoritní alelu se v souboru pacientů nevyskytovali). Rozdíl tak nedosáhl statistické významnosti ( $p = 0,08$ ) (Leshinsky-Silver *et al*, 2007).

Původní práce Duerra *et al* byla prováděna pouze na pacientech s postižením tenkého střeva (Duerr *et al*, 2006). Navazující studie s pacienty se všemi typy postižení trávicího traktu souvislost mezi p.Arg381Gln a některým subfenotypem nenalezly (např. Cummings *et al*, 2007a; Tremelling *et al*, 2007).

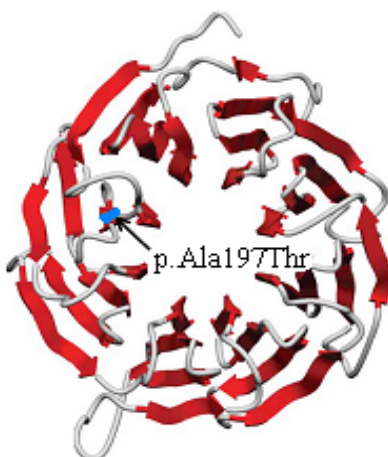
## 2.2.5 ATG16L1

### 2.2.5.1 Charakteristika

Dalším kandidátním genem pro CD nalezeným díky celogenomovým asociačním studiím je gen *ATG16L1* (autophagy-related 16-like 1) zapojený do buněčného procesu autofágie (Hampe *et al*, 2007). V rámci tohoto genu nacházejícího se na dlouhém raménku druhého chromozómu (2q37), Hampe *et al* detekovali jednonukleotidovou substituci adeninu za guanin v pozici 1338 v 9. exonu, která způsobí výměnu threoninu za alanin v místě 197. aminokyseliny (p.Ala197Thr, rs2241880). Varianta se nachází v evolučně konzervované části N-terminální domény s WD opakováním (W, tryptofan; D, kyselina asparagová) (Hampe *et al*, 2007).

### Obrázek 7. 3D strukturální model WD domény lidského proteinu ATG16L1.

(Upraveno dle Hampe *et al*, 2007)



Na rozdíl od např. genu *CARD15* se zatím zdá, že pouze tento jeden SNP nese riziko pro náchylnost k CD v oblasti genu *ATG16L1* (Hampe *et al*, 2007). Majoritní alela G kódující alanin je rizikovou alelou pro CD, když byla nalezena s vyšší frekvencí u pacientů s CD než u zdravé kontrolní skupiny (60% u pacientů s CD, 53% u kontrol – v panelu německých případů a kontrol) (Hampe *et al*, 2007).

Rovněž další celogenomové asociační studie kauzalitu varianty p.Ala197Thr potvrdily (např. WTCCC, 2007; Libiouille *et al*, 2007). Jako u jiných kandidátních genů

následovaly po první publikaci o asociaci *ATG16L1* s CD další práce zjišťující vztah genu a onemocnění v různých populacích. Replikační studie ve většině případů rizikovost alely p.197Ala pro CD detekovaly (např. Cummings *et al*, 2007b; Prescott *et al*, 2007; Roberts *et al*, 2007). Nulovou hypotézu říkající, že tento SNP nemá vliv na CD, však nezamítla japonská studie (Yamazaki *et al*, 2007), což vzhledem k populační heterogenitě a předchozím studiím nebylo překvapující, ovšem ani italská práce rozdíl ve frekvenci rizikové alely u pacientů s CD a kontrol nenalezla (Perricone *et al*, 2008). Tato asociační studie prováděná v Římě testovala 163 pacientů s CD a 160 zdravých kontrol. Mezi případy bylo 20,2% homozygotů pro rizikovou alelu p.197Ala a mezi kontrolami 18,8% (Perricone *et al*, 2008).

### 2.2.5.2 Funkce proteinu

Přesná funkce *ATG16L1* v patogenezi CD je zatím neznámá. Autofágie je jednou z hlavních drah degradace buněčných komponent. Mezi kroky v tomto procesu patří indukce autofágie, formování autofagozómu, zacílení autofagozómu a fúze s lysozómem, a rozpad autofagozómu (Klionsky a Emr, 2000). *Apg16* (kvasinkový homolog *ATG16L1*) a *Apg16L* (myší homolog *ATG16L1*) jsou geny nezbytné pro sestavení autofagozómu (Mizushima *et al*, 1999). Intracelulární patogeny objevily mechanismy, jak opustit fagozóm před fúzí s lysozómem (Schmid *et al*, 2006). Ovšem následně jsou patogeny pohlceny mechanismy autofágie (Shintani a Klionsky, 2004), která je tak důležitou součástí vrozené imunity. Pokud je kaskáda autofágických reakcí přerušena, patogeny jako *Mycobacterium tuberculosis* (Gutierrez *et al*, 2004), *Streptococcus pyogenes* (Nakagawa *et al*, 2004), *Shigella* (Ogawa *et al*, 2005) nebo virus Epstein-Barrové (Paludan *et al*, 2005) jsou schopné v těle hostitele přežít. Pokud by se prokázal jejich vliv na indukci zánětu u pacientů s CD, potvrdila by se tak teorie, že v patogenezi CD hrají roli i patogeny (viz kapitola 2.1.5.5).

### 2.2.5.3 Genotypo-fenotypové analýzy

Studie prováděná na pacientech s CD diagnostikovaných do 17ti let prokázala asociaci p.Ala197Thr s náchylností k CD (Baldassano *et al*, 2007a). Na druhou stranu, skotská práce kauzalitu této varianty u své pediatrické kohorty (269 pacientů) neprokázala, u pacientů diagnostikovaných v dospělosti (360) však ano (Van Limbergen *et al*, 2008). Van Limbergen *et al* tuto diskrepanci vysvětlovali fenotypovou charakteristikou pediatrických pacientů, u nichž se vyskytovalo v malé míře izolované

postižení ilea (L1 ± L4) a ve zvýšené míře kolonické postižení (L2 ± L4). U pediatrických i dospělých pacientů bylo izolované postižení tlustého střeva spojeno s nejnižší frekvencí rizikové alely v genu *ATG16L1*, zatímco samostatné postižení tenkého střeva bylo asociováno se zvýšenou frekvencí p.197Ala (Van Limbergen *et al*, 2008). Zcela opačné výsledky publikovala práce Prescott *et al*, která detekovala rizikovou variantu v nejvyšší míře u pacientů diagnostikovaných v 16ti letech nebo dříve a naopak nejnižší u pacientů diagnostikovaných po 40. roce věku (Prescott *et al*, 2007). Ovšem na tom, že p.197Ala je signifikantněji asociována s postižením tenkého střeva než s kolonickou formou CD, se tyto dvě práce shodly.

Jiné studie interakce mezi genotypem p.Ala197Thr a fenotypem nepotvrdily (Cummings *et al*, 2007b; Roberts *et al*, 2007).

## 2.2.7 Ostatní kandidátní geny

### 2.2.7.1 *SLC22A4*, *SLC22A5*

Celogenomová vazbová studie kanadských rodin s příslušníky postiženými CD identifikovala 250 kb dlouhý region na 5. chromozomu (5q31-33), uvnitř kterého se nachází několik kandidátních genů pro CD (Rioux *et al*, 2000). Peltekova *et al* následně sekvenováním genů v této oblasti našli dva asociované SNP s CD v genech *SLC22A4* a *SLC22A5* (solute carrier family, member 4/5) kódujících transportéry organických kationtů (OCTN, organic cation transporter) (Peltekova *et al*, 2004). Záměna tyminu za cytozin, respektive fenylalaninu za leucin (p.Leu503Phe, rs1050152) v devátém exonu genu *SLC22A4* a transverze cytozinu za guanin v promotoru genu *SLC22A5* (rs2631367) společně vytváří tzv. TC haplotyp, jehož nositelé mají vyšší pravděpodobnost vývoje CD (Peltekova *et al*, 2004). Kauzalitu TC haplotypu potvrdily následující asociační studie prováděné na různých populacích (Cucchiara *et al*, 2007; Gazouli *et al*, 2005). Slabá asociace byla rovněž detekována u pediatrické kohorty (Babusukumar *et al*, 2006). Na druhé straně, některé studie vliv variant v genech *SLC22A4* a *SLC22A5* nepotvrdily (Ferraris *et al*, 2006), což dokládá, že u některých populací může hrát v rámci regionu v etiologii CD roli jiný haplotyp (Silverberg, 2006).

Substituce fenylalaninu za leucin v genu *SLC22A4* zvyšuje aktivitu transportéru organických kationtů a zároveň snižuje afinitu ke karnitinu (Peltekova *et al*, 2004). Karnitin je mediátorem oxidace mastných kyselin a inhibice oxidace mastných kyselin může vyvolat klinické příznaky kolitidy (Roediger a Nance, 1986). Varianta g.-207C

v promotoru genu *SLC22A5* narušuje transkripční faktor heat shock proteinu, což může negativně ovlivnit imunitní odpověď např. na stres (Peltekova *et al*, 2004).

### 2.2.7.2 *DLG5*

Stoll *et al.* jako první detekovali polymorfismus uvnitř genu *DLG5* (discs, large homolog 5 (*Drosophila*)) asociovaný s CD (Stoll *et al*, 2004). Gen *DLG5* nacházející se na chromozomu 10q23 kóduje protein podílející se na udržení epiteliální integrity (Nakamura *et al*, 1998). Záměna adeninu za guanin v pozici 113 na kódujícím řetězci se projeví substitucí aminokyselin glutaminu za arginin (p.Arg30Gln, rs1248696). Přítomnost glutaminové alely pak pravděpodobně zabrání sestavení proteinu *DLG5* (Stoll *et al*, 2004). Asociace s CD však následně nebyla potvrzena většinou asociačních studií (Ferraris *et al*, 2006; Cucchiara *et al*, 2007b). Spekulovalo se i o protektivním efektu minoritní alely u žen (Biank *et al*, 2007). Ovšem metaanalýza publikována roku 2007 pohlavně-specifickou asociací s CD nepotvrdila (Browning *et al*, 2008). Role *DLG5* v etiologii CD tak zůstává nejasná.

### 2.2.7.3 *NOD1/CARD4*

Protein *NOD1*, produkt genu *CARD4* lokalizovaného na chromozómu 7p14, patří do stejné rodiny jako výše popisovaný *NOD2* (kapitola 2.2.2). Proto i on byl zavzat do skupiny kandidátních genů pro CD. Navíc celogenomové výzkumy definovaly vazbu regionu 7p14 s IBD (Satsangi *et al*, 1996). Zouali *et al* našli v exonech genu *CARD4* sedm SNP. Pět z nich způsobovalo záměnu aminokyseliny a pouze jeden z nich byl přítomen u více než jednoho pacienta s CD (Zouali *et al*, 2003). Na tuto variantu způsobující výměnu adeninu za guanin v pozici 796 na kódujícím řetězci DNA, respektive lyzinu za kyselinu glutamovou v pozici 266. aminokyseliny (rs2075820), se pak dále zaměřil. Nedetekoval však její asociaci s CD (Zouali *et al*, 2003). McGovern *et al* se v následující studii zaměřili na SNP v intronech genu *CARD4*, když předpokládali, že se mohou podílet na alternativním sestřihu proteinu (McGovern *et al*, 2005). Nalezli souvislost mezi CD a deletující alelou v komplexu inzerčně-delečního (tzv. in-del) polymorfismu nazývaného ND1 + 32656\*1 (rs6958571). Varianta ND1 + 32656\*1 byla asociována s ranným věkem pacientů v době diagnózy (<25 let) a extraintestinálními komplikacemi (McGovern *et al*, 2005). Ovšem další práce prováděná na velkém souboru pacientů (645 pacientů s CD vs. 358 pacientů s CD v původní studii) tuto asociaci nepotvrdila (Tremelling *et al*, 2006). Španělský výzkum, který byl prováděn na



malém souboru pacientů (97) a publikován ke konci roku 2007, označil rizikovost alely ND1 + 32656\*1 pro CD za velmi vysokou (OR = 5,1) (Canto *et al*, 2007).

Jediným rozdílem ve stavbě proteinu NOD1 oproti NOD2 je, že na tomto místě popisovaný protein obsahuje pouze jednu CARD doménu. Oba proteiny jsou zapojeny v dráze aktivující NFκB (podrobněji viz kapitola 2.2.2.2). NOD1 je na rozdíl od NOD2 exprimován ve větší míře v epiteliálních buňkách (Hisamatsu *et al*, 2003). Nepřesvědčivá asociace genu *CARD4* s CD by tak mohla signalizovat, že zásadnější roli ve vývoji nemoci hraje dráha zahrnující antigen prezentující buňky (monocyty, makrofágy, neutrofile, atd.) (Zouali *et al*, 2003).

#### 2.2.7. 4 *CTLA4*

Molekula CD28 podporuje aktivitu T lymfocytů. Jejím antagonistou je cytotoxický antigen T lymfocytů 4 (CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) inhibující T-buňky (Gough *et al*, 2005). Jako negativní regulátor imunitních reakcí je gen pro *CTLA4* kandidátním genem pro CD. Gen *CTLA4* se nachází na dlouhém raménku druhého chromozomu (2q33) (Dariavach *et al*, 1988). Obsahuje 4 exony, přičemž v prvním a za posledním byly detekovány SNP asociované s některými autoimunitními chorobami – s diabetem 1. typu nebo Gravesovou chorobou (Einarsdottir *et al*, 2003). Asociace studovaných SNP (např. +49A>G, rs231775 nebo CT60A>G, rs3087243) s CD u evropských populací nebyla prokázána (Rueda *et al*, 2005; Magyarai *et al*, 2007). Nelze ovšem vyloučit vliv jiného, dosud nestudovaného polymorfizmu v genu *CTLA4* na vznik CD nebo roli určitého haplotypu v rámci genu.

Funkce CTLA4 není zatím zcela zřejmá. Uvažuje se o pěti hypotézách shrnutých v práci Gougha *et al* (Gough *et al*, 2005). První model předpokládá soupeření CTLA4 a CD28 o ligandy, přičemž CTLA4 má pro ně vyšší afinitu. Podle druhé teorie CTLA4 generuje inhibiční molekuly, které vedou ke snížení signálu receptoru CD28. Za třetí, CTLA4 možná není konečným mediátorem suprese, nýbrž aktivuje T-regulační buňky (Treg), které tuto funkci plní. Čtvrtá hypotéza navrhuje, že CTLA4 stimuluje indoleamin 2,3dioxygenázovou (IDO) dráhu, která umožní dendritickým buňkám odbourat tryptofan, který se zdá být nezbytným pro proliferaci T lymfocytů. A konečně pátá teorie přikládá CTLA4 roli relokátora signálních komponent receptoru T lymfocytů (Gough *et al*, 2005).

### 2.2.7.5 *PTPN22*

Gen *PTPN22* (protein tyrosine phosphatase non-recetor 22) nacházející se na chromozómu 1p13 kóduje lymfoid-specifickou fosfatázu (Lyp, lymphoid-specific phosphatase). Lyp, intracelulární protein tyrozin fosfatázy, je připojen přes motiv bohatý na prolin (P1) k SH3 doméně kinázy Csk (Cloutier a Veillette, 1996). Tato vazba je nezbytná k signalizaci receptoru T-buněk (Cloutier a Veillette, 1999). Substituce tyminu za cytozin v pozici 1858 v genu *PTPN22* způsobí záměnu aminokyselin tryptofanu za arginin (p.Arg620Trp, rs2476601). Tato varianta nacházející se v oblasti P1 zabraňuje spojení Lyp a Csk, a tím neumožňuje potlačení aktivace T buněk (Bottini *et al*, 2004). SNP p.Arg620Trp je asociován s několika autoimunitními onemocněními, např. s diabetem 1. typu (Bottini *et al*, 2004) nebo s revmatoidní artritidou (van Oene *et al*, 2005). Podobně jako u *CTLA4* však nebyla prokázána souvislost mezi variantou v genu *PTPN22* a CD (Martin *et al*, 2005; Prescott *et al*, 2005).

## **3. Materiál a metody**

### **3.1 Charakteristika pacientů a kontrolního souboru**

V této studii případů a kontrol jsme testovali 333 pacientů s diagnózou Crohnovy choroby a 499 zdravých jedinců. Všichni se narodili v České republice.

Studie byla schválena etickou komisí. Písemný informovaný souhlas se zařazením do studie byl získán od všech účastníků výzkumu, popř. jejich zákonných zástupců.

#### **3.1.1 Pacienti**

Pacienti s CD, kteří byli zařazeni do studie, jsou léčeni v následujících zdravotních institucích: pacienti diagnostikovaní do 18. roku věku pochází z pražské fakultní nemocnice Motol z oddělení gastroenterologie, hepatologie a výživy Pediatrické kliniky, 15 pacientů z dětského střediska Karviná, 4 z fakultní nemocnice Brno a 3 z nemocnice České Budějovice. Diagnóza u nich byla stanovena na základě tzv. Porto kritérií (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, 2005). Pacienti diagnostikovaní v 19 letech a později patří pod IV. interní kliniku Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Pacienti byli diagnostikováni na základě klinických, radiologických, endoskopických a histologických vyšetření (Lennard-Jones, 1989).

Se sběrem DNA od pacientů s CD jsme začali v říjnu 2005 a ukončili jsme jej v únoru 2008. Ve studovaném souboru je 137 pacientů diagnostikovaných do 18 let a 196 pacientů diagnostikovaných v dospělosti. Jejich demografické a klinické charakteristiky podle Montrealské klasifikace (Silverberg *et al*, 2005) jsou shrnuty v tabulce 3.

#### **3.1.2 Kontrolní soubor**

DNA kontrolního souboru jsme získali ze dvou zdravotních zařízení. Z dětské chirurgické kliniky fakultní nemocnice Motol v Praze bylo vybráno 295 dětí (208 chlapců a 87 dívek), které podstoupily malý chirurgický zákrok. Medián věku v době nabrání jejich DNA byl 8 let, interkvartilové rozpětí 6 až 11 let. Z všeobecné fakultní nemocnice v Praze byla poskytnuta DNA od 204 zdravých dobrovolníků (114 mužů a 90 žen). Medián věku v době sběru DNA byl 38 let, interkvartilové rozpětí 31 až 46 let. Osoby užívající dlouhodobě léky, s abnormálními výsledky biochemického vyšetření, se zvýšenou sedimentací erytrocytů nebo s abnormálním EKG jsme ze studie vyloučili.

**Tabulka 3. Fenotypová charakteristika pacientů s CD podle Montrealské klasifikace. (Silverberg *et al*, 2005)**

<b>Fenotyp</b>	<b>Celkem (n=333)</b>	<b>Pacienti diagnostikovaní do 18 let včetně (n=137)</b>	<b>Pacienti diagnostikovaní v dospělosti (n=196)</b>
<b>Pohlaví, M / Ž</b>	148 / 185	71 / 66	77 / 119
<b>Medián věku v době diagnózy (interkvartilové rozpětí)</b>	21 (14-30)	14 (12-16)	28(23-35)
A1 (< 17 let)	111 (33,3%)	111 (81,0%)	0 (0%)
A2 (17 - 40 let)	190 (57,1%)	26 (19,0%)	164 (83,7%)
A3 (> 40 let)	32 (9,6%)	0 (0%)	32 (16,3%)
<b>Místo postižení</b>			
L1 (terminální ileum)	71 (21,3%)	23 (16,8%)	48 (24,5%)
L2 (kolon)	50 (15,0%)	13 (9,5%)	37 (18,9%)
L3 (ileokolon)	208 (62,5%)	101 (73,7%)	107 (54,6%)
L1-3 nedostupné	1 (0,3%)	0 (0%)	1 (0,5%)
L4 (postižení horního GIT)	56 (16,8%)	20 (14,6%)	36 (18,4%)
<b>Chování</b>			
B1 (nestrikurující / nepenetrující)	138 (41,5%)	79 (57,7%)	59 (30,1%)
B2 (strikturující)	129 (38,7%)	34 (24,8%)	95 (48,5%)
B3 (penetrující)	62 (18,6%)	21 (15,3%)	41 (20,9%)
B1-3 nedostupné	4 (1,2%)	3 (2,2%)	1 (0,5%)
B4 (perianální postižení)	109 (%)	32 (23%)	77 (39%)
<b>Extraintestinální manifestace (EIM)</b>	53 (15,9%)	21 (15,3%)	32 (16,3%)
nedostupné	6 (1,8%)	0 (0%)	6 (3,1%)
<b>Nutnost operace</b>	173 (52,0%)	41 (30,0%)	132 (67,3%)
nedostupné	2 (0,6%)	1 (0,7%)	1 (0,5%)

## **3.2 Laboratorní materiál**

### **3.2.1 Laboratorní přístroje a pomůcky**

- Pipety Eppendorf; Německo  
Finnpipette; Finsko  
Matrix; USA
- Vortex ZX3 P-Lab; Česká republika
- Centrifuga Mini spin plus Eppendorf; Německo
- Centrifuga B4i Jouan; Francie
- Termostat Memmert; Německo
- Real-time termocycler 7300 ABI Applied Biosystems, USA

### **3.2.2 Spotřební materiál**

- Pipetovací špičky s filtrem Sarstedt; Německo  
Matrix, USA
- Mikrozkušavky Eppendorf; Německo
- Zkušavky 1,5 ml, 10 ml, 50 ml Sarstedt; Německo
- Real-time PCR desky Applied Biosystems, USA
- Real-time PCR stripy Applied Biosystems, USA
- Real-time PCR krycí folie Applied Biosystems, USA
- PCR desky Eppendorf; Německo
- Laboratorní rukavice Promedica, Česká republika

## **3.3 Izolace DNA**

### **3.3.1 Izolace DNA z krve vysolováním**

Vysolování je tradiční metodou izolace DNA z periferní krve. Je založena na skutečnosti, že interakce mezi vodou a bílkovinou je slabší než mezi vodou a ionty. Přidání solí (chloridu sodného) vede ke snížení počtu molekul vody schopných interagovat s částmi bílkovin, a tím k vysrážení bílkovin, které jsou v komplexu s nukleovými kyselinami. Přidáním etanolu je poté DNA precipitována. Metodou vysolování jsme DNA izolovali u 94,6% vzorků.

### 3.3.1.1 Materiál a chemikálie

- RCLB (red cell lysis buffer - lyzační pufr červených krvinek) (1x)
- Destilovaná voda
- Pufr pro proteinázu K (5x)
- Proteináza K (20 mg/ml)
- SDS (sodium dodecyl sulfát) (20%)
- NaCl (6M)
- Etanol (100%, 70%)
- Skleněné Pasteurovy pipety s háčkem na konci
- TE pufr (Tris-HCl, EDTA) (1x)

### 3.3.1.2 Postup

Tři až deset ml nesrážlivé krve (v EDTě) jsme přenesli do 50 ml zkumavky s 20 ml RCLB. Po promíchání jsme vzorek stočili po dobu 10 minut při 1 600 g při 4 – 8 °C. Následně jsme supernatant slili a k peletě jsme přidali 15 ml RCLB. Promícháním na vortexu jsme způsobili znovurozpuštění pelety. Vzorek jsme centrifugovali po dobu 5 až 10 minut při 1 600 g při 4 – 8 °C. Pokud nebyla peleta bílá či růžová, opět jsme supernatant slili, přidali 15 ml RCLB a vše jsme promíchali. V okamžiku kdy byla peleta již bílá či růžová, jsme přidali 560 µl destilované vody, 160 µl pufru pro proteinázu K, 30 µl proteinázy K a 40 µl SDS. Směs jsme zvortexovali a poté inkubovali při 50 – 55 °C 2 až 4 hodiny, popř. při 37 – 50 °C přes noc. Po vychladnutí zkumavky, krátkém zvortexování a stočení v centrifuze jsme obsah 50 ml zkumavky přenesli do 1,5 ml zkumavky předplněné 500 µl NaCl. Zkumavku jsme na vortexu dostatečně promíchali (alespoň 15 – 30 s) a pak jsme ji centrifugovali při relativní centrifugační síle 11 300 g. Supernatant jsme přenesli do nové 1,5 ml zkumavky a opět stočili v centrifuze při maximálních otáčkách. Následně jsme supernatant přemístili do 10 ml zkumavky s 1 ml 100% etanolu. Pomalým převrácením zkumavky jsme vzorek promíchali. Vysráženou DNA jsme zachytili skleněnou Pasteurovou pipetou s háčkem a krátce jsme ji ponořili do 70% etanolu. Zhruba 1 minutu jsme DNA ponechali na kličce, aby oschla a poté jsme ji přenesli do 750 µl TE pufru. Nakonec jsme DNA pečlivě promíchali na vortexu.

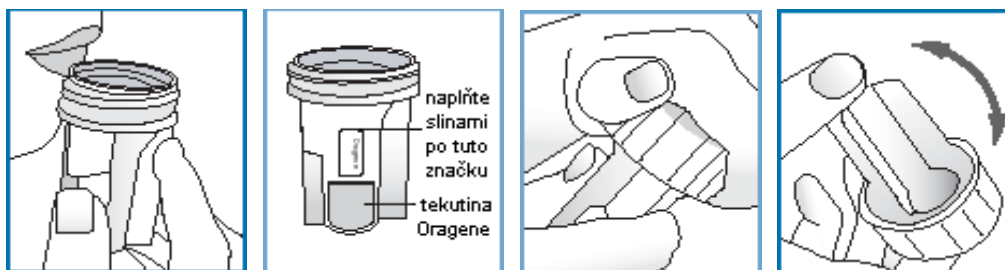
### 3.3.2 Izolace DNA ze slin

U menší části pacientů (5,4%) jsme DNA izolovali ze slin. Účastníkům studie jsme domů zaslali „Oragene DNA self-collection kit“ (DNA Genotek Inc., Ottawa, Ontario, Kanada) (obrázek 8), do kterého dle návodu (obrázek 9) předali svůj vzorek slin.

**Obrázek 8. Nádobka pro sběr vzorku slin.** (DNA Genotek, Kanada)



**Obrázek 9. Návod na náběr vzorku slin.** (Upraveno dle DNA Genotek, Kanada)



#### 3.3.2.1 Materiál a chemikálie

- Oragene Purifier
- Etanol (100%)
- TE pufr
- Led

#### 3.3.1.2 Postup

DNA jsme izolovali dle protokolu výrobce. Poté co pacienti zaslali zpět do laboratoře kit se svým vzorkem slin, jsme jej inkubovali při 50 °C 1 hodinu. Oragene Purifier jsme předpipetovali v objemu 20 µl do 1,5 ml zkumavky, pak jsme přidali 500 µl vzorku (zbytek vzorku jsme skladovali při pokojové teplotě a byl tak k dispozici k dalšímu použití). Po jemném promíchání obracením zkumavky jsme vzorek nechali 10 minut inkubovat na ledu. Po uplynutí této doby jsme vzorek stočili při 14 100 g při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Do sterilních mikrozkušavek jsme předpipetovali 500 µl 100% etanolu a poté jsme přidali čistý supernatant bez pelety ze stočeného vzorku. Po jemném promíchání jsme vzorek inkubovali 15 minut při pokojové teplotě,

aby DNA precipitovala. Následně jsme vzorek stočili po 1 minutu při 14 100 g a odstranili supernatant bez porušení pelety. Na závěr jsme peletu DNA rozpustili ve 400  $\mu$ l TE pufru a dostatečně jsme vzorek zvortexovali a stočili. Vzorek jsme po izolaci inkubovali ještě 1 hodinu nebo lépe přes noc při pokojové teplotě.

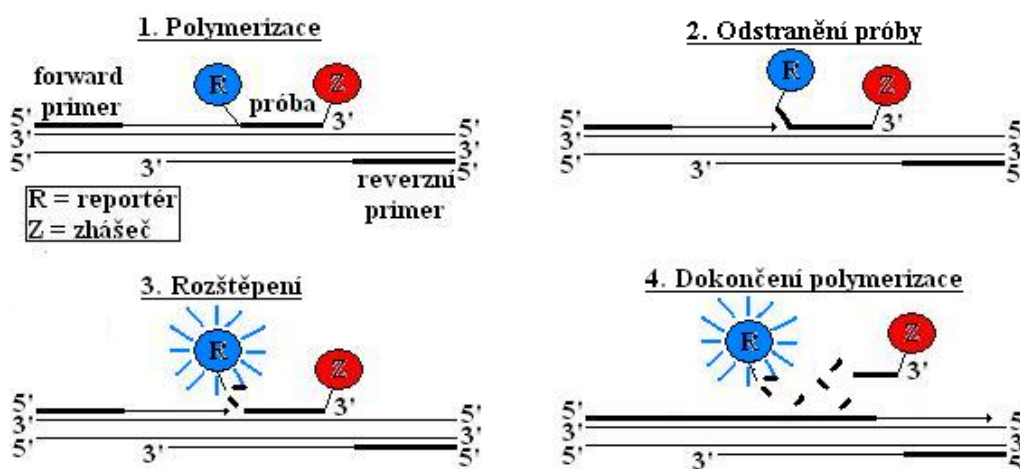
Úspěšnost následné genotypizace byla shodná pro oba způsoby izolace DNA a pohybovala se okolo 97%.

### 3.4 Alelická diskriminace

#### 3.4.1 Real-time PCR

Real-time PCR (polymerase chain reaction), umožňuje sledovat tvorbu PCR produktu přímo během jednotlivých amplifikačních cyklů. Metoda TaqMan firmy Applied Biosystems (Foster City, Kalifornie, USA) využívá sondy (próby), které mají na svém 5' konci reportérovou fluorescenční barvu (reporter) a na 3' konci fluorescenční barvu nazývanou zhášec (quencher). V intaktním stavu je fluorescenční záření reportérové barvičky potlačeno přítomností zhášeče. Po navázání sondy do kompatibilního úseku jednořetězcové DNA je vazba mezi reportérem a zhášečem rozrušena 5' exonukleázovou aktivitou Taq DNA polymerázy, což vyvolá zvýšení signálu reportérové barvy (obrázek 10), který je následně detekován SDS (sequence detection system) kamerou a zobrazen softwarem na připojeném počítači.

**Obrázek 10. Princip metody real-time PCR ve formátu TaqMan sond.** (Upraveno dle Applied Biosystems, USA)





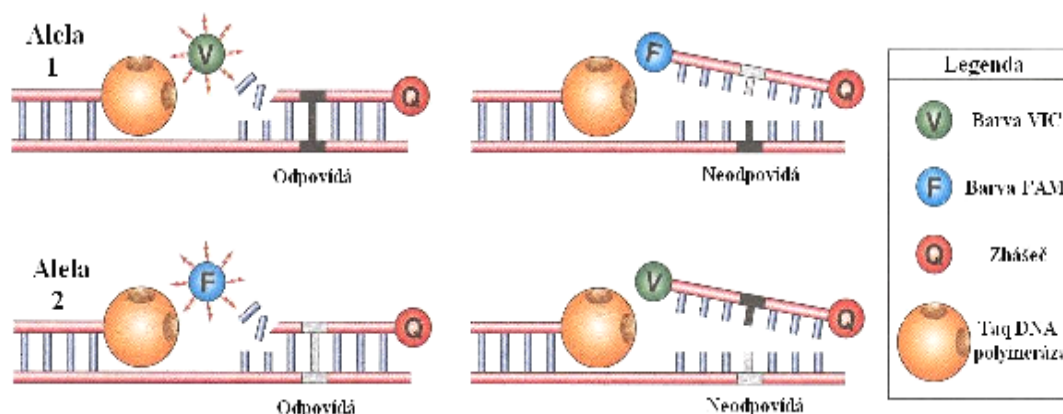
### 3.4.2 Princip alelické diskriminace

Jednou z nových aplikací, kterou umožňuje real-time PCR, je tzv. genotypizace - alelická diskriminace. Alelická diskriminace je metoda zjišťující dvě varianty sekvence jedné nukleové kyseliny ve studovaném vzorku. Často se tato metoda využívá pro detekci SNP.

Reakční PCR směs obsahuje dva primery a dvě próby s odlišnými fluorescenčními barvami (VIC a FAM), z nichž jedna je komplementární k majoritní alele a druhá k minoritní alele. Pokud próba svým nukleotidovým složením odpovídá templátu DNA, specificky se naváže na dané místo. Následně je polymerázou přerušena vazba mezi reportérem a zhášečem, což vyvolá emisi fluorescenčního záření. V případě, že sekvence próby nesedí k templátu DNA, nedojde k oddělení reportéru od zhášeče a není tudíž vydán fluorescenční signál (obrázek 11).

Pokud je detekována zvýšená fluorescence např. pouze barvy FAM, znamená to, že je jedinec homozygotní pro alelu, ke které byla komplementární próba s fluorescenční barvou FAM. Je-li zachycen signál obou fluorescenčních barev, jedná se o heterozygota pro studovaný SNP.

**Obrázek 11. Metoda alelické diskriminace ve formátu TaqMan sond.** (Upraveno dle Applied Biosystems, USA)



### 3.4.3 Primery a próby

Pro *CARD15* p.Gly908Arg, *CARD15* p.Arg702Trp, *TNFA* g.-308G>A, *IL23R* p.Arg381Gln a *ATG16L1* p.Ala197Thr nabízí firma Applied Biosystems již předpřipravené směsi primerů a prób (TaqMan genotyping assays), u nichž nezveřejňuje jejich sekvence. Pro typizaci *CARD15* c.3020insC jsme použili námi navržené primery a próby, které jsou spolu s označením zbylých SNP rs číslem sepsány v tabulce 4.

**Tabulka 4. Primery a próby.**

<b>SNP</b>	<b>rs číslo</b>	<b>assay ID</b>
<i>CARD15</i> p.Gly908Arg	rs2066845	C_11717466_20
<i>CARD15</i> p.Arg702Trp	rs2066844	C_11717468_20
<i>TNFA</i> g.-308G>A	rs1800629	C_7514879_10
<i>IL23R</i> p.Arg381Gln	rs11209026	C_1272298_10
<i>ATG16L1</i> p.Ala197Thr	rs2241880	C_9095577_20
<i>CARD15</i> c.3020insC	rs5743293 (rs2066847)	<b>forward primer:</b> ccttaccagacttccaggatggt  <b>reverse primer:</b> tgtccaataactgcatcacctacct  <b>próba VIC pro alelu bez insC:</b> VIC-ctttcaagggcctgc-MGB  <b>próba FAM pro alelu s insC:</b> FAM-cctttcaagggcct-MGB

### 3.4.4 Reakční směs

Genotypy jedinců pro jednotlivé SNP byly určeny použitím TaqMan genotyping assays. Celkový objem PCR směsi byl 10 µl a obsahoval: 3,75 µl PCR vody, 0,25 µl primerů a prób (koncentrace 0,5x), 5 µl TaqMan universal (popř. genotyping) PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornie, USA) a 1 µl DNA. Pro některé polymorfizmy (c.3020insC, p.Gly908Arg, p.Arg702Trp) jsme komerční master mix nahradili reagenциemi shrnutými v tabulce 5.

**Tabulka 5. Komponenty reakční PCR směsi.**

<b>Složky reakční směsi</b>	<b>μl na vzorek</b>	<b>Finální koncentrace</b>
PCR voda	5,36	
pufř 10x + MgCl <sub>2</sub> (15 mM)	1,00	1x (1,5 mM)
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,00	2,5 mM
glycerol 50%	1,00	5%
dNTP 4 x 5 mM	0,30	4 x 0,15 mM
ROX-6 barvička (100 mM)	0,10	1 μM
primery - próby 20x	0,20	0,5x
DNA polymeráza (HotStar Qiagen) 5 U / ul	0,04	0,2 U / 10 ul reakce
DNA	1,00	
<b>Objem celkem</b>	<b>10,00</b>	

### 3.4.5 Postup a hodnocení

PCR reakce jsme prováděli na přístroji 7300 ABI (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornie, USA).

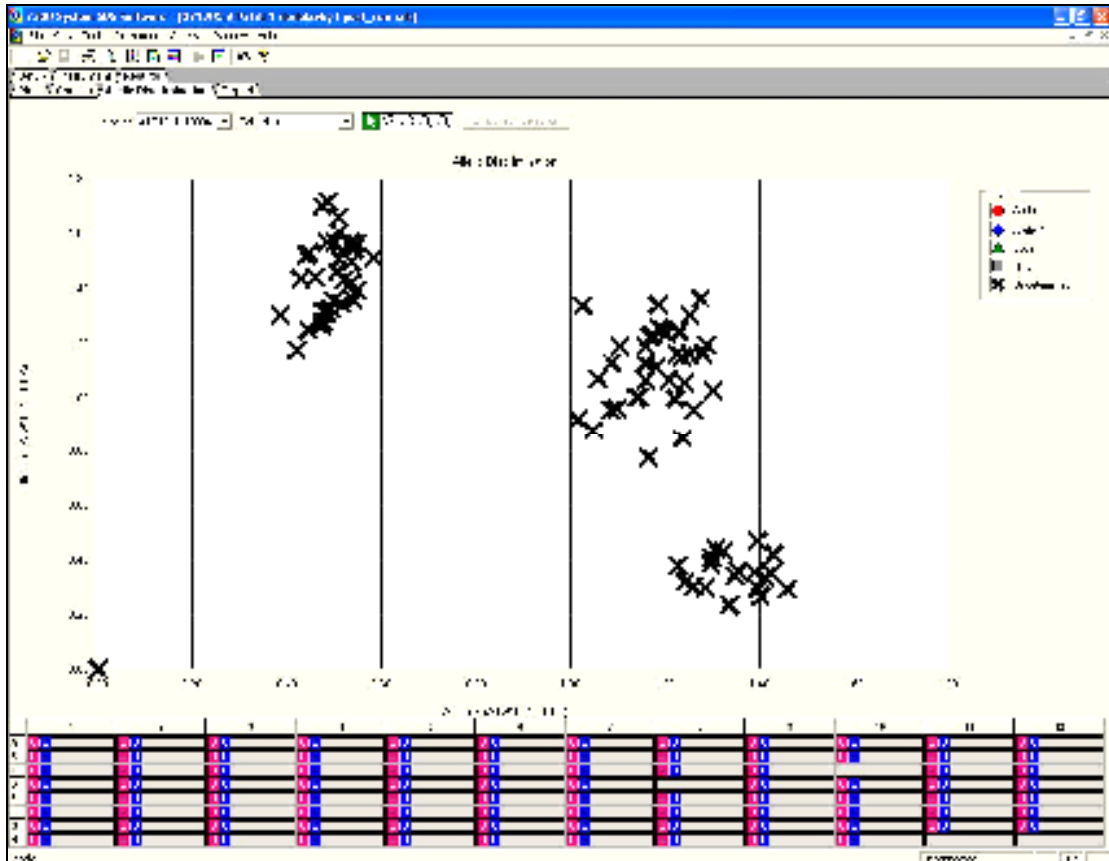
V prvním kroku typizace jsme zaznamenali pozadí fluorescence každé jamky - tzv. „pre\_run“. Následovalo spuštění amplifikační reakce (tzv. „run“), ve které iniciální denaturace probíhala 15 minut při 95 °C. V každém ze 45 amplifikačních cyklů pak denaturace trvala 15 vteřin při 92 °C a nasednutí primerů a prób spolu s elongací řetězců DNA 1 minutu při 60 °C. Po skončení reakce jsme opět zaznamenali fluorescenční pozadí každé jamky („post\_run“). Během tohoto děje byla odečtena hodnota „pre\_run“ fluorescence od „post\_run“ fluorescence, aby byly zajištěny přesné výsledky fluorescence během amplifikace.

Kvůli zajištění konzistence mezi experimenty jsme v každé analýze měli zastoupeny vzorky o známém genotypu a rovněž PCR vodu jako negativní kontrolu (NTC, no template control).

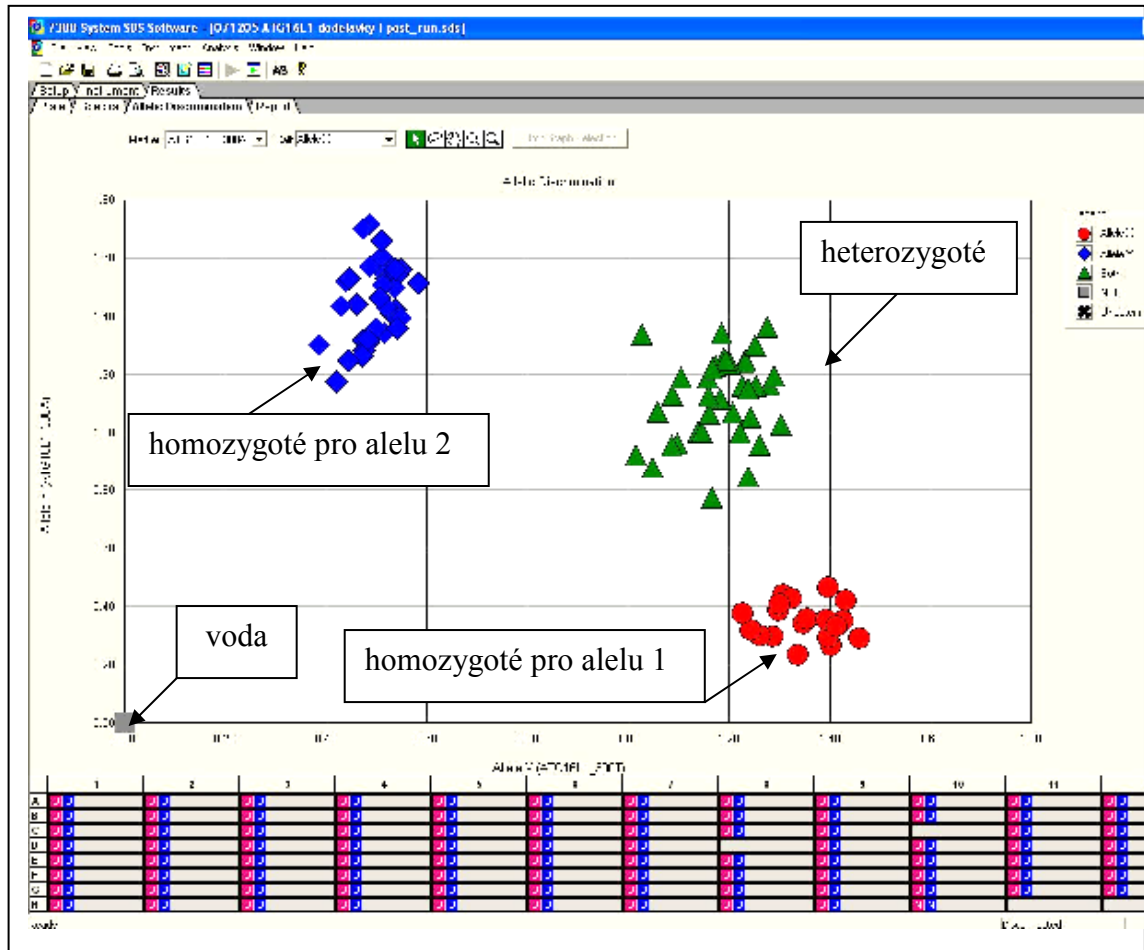
Výsledky detekce fluorescenčního signálu program zobrazoval po skončení amplifikace v grafu, kde na osách x a y zobrazoval hodnoty naměřené fluorescence (obrázek 12). Tento graf jsme mohli následně graficky upravit (obrázek 13), aby byly jasně zřetelné 4 skupiny vzorků reprezentující homozygoty pro alelu 1 a 2, heterozygoty a negativní kontroly. Při sporném rozložení vzorku v grafu jsme ještě inspekcí jeho amplifikační křivky zaznamenávající detekovanou fluorescenci v čase mohli rozhodnout

o jeho genotypu (obrázek 14). Pokud ani tento graf nebyl jasně průkazný, tak jsme analýzu vzorku opakovali.

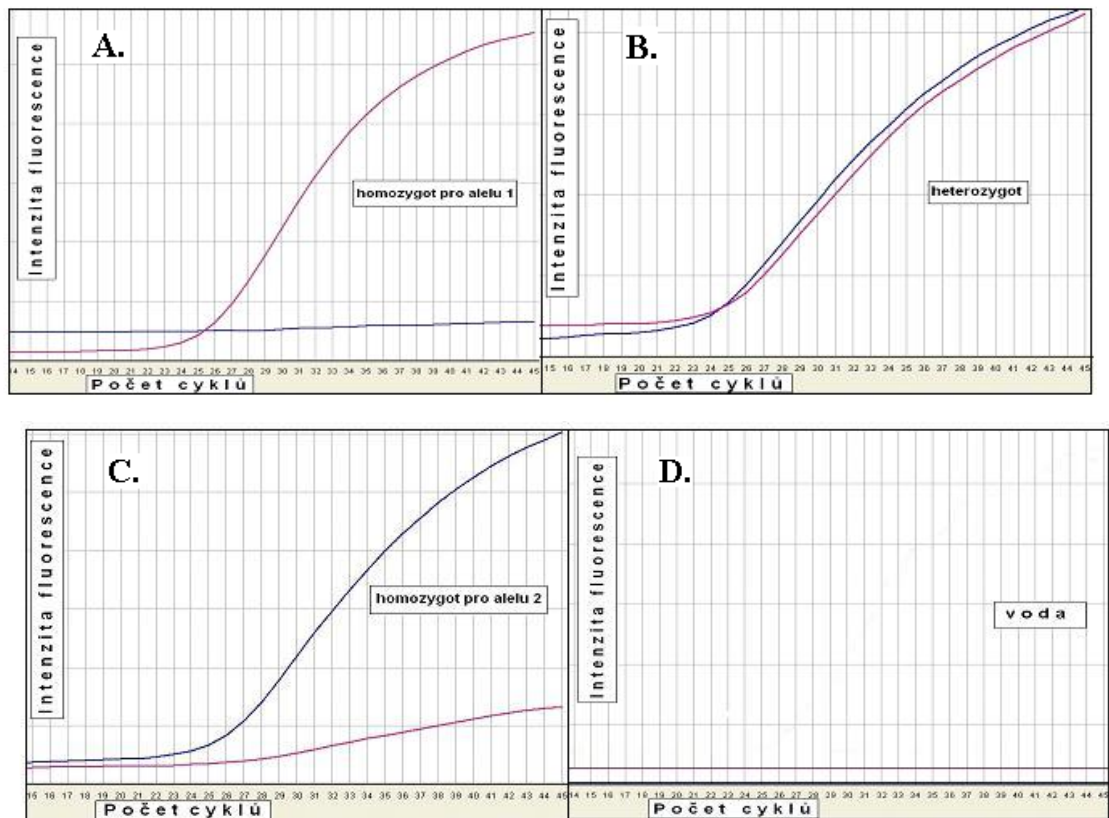
**Obrázek 12.** Výsledek alelické diskriminace po ukončení amplifikace. Typizace vzorků pro polymorfismus p.Ala197Thr genu *ATG16L1*.



**Obrázek 13. Graficky upravený výsledek alelické diskriminace po ukončení amplifikace.** Grafické rozlišení jednotlivých genotypů pro polymorfismus p.Ala197Thr genu *ATG16L1*. Alela 1 reprezentuje alelu p.197Thr, alela 2 reprezentuje alelu p.197Ala.



**Obrázek 14. Amplifikační křivky pro SNP p.Ala197Thr.** A. Homozygot pro alelu 1 = genotyp Thr / Thr. B. Heterozygot = genotyp Ala / Thr. C. Homozygot pro alelu 2 = genotyp Ala / Ala. D. Negativní kontrola (voda): nedošlo k amplifikaci.



### 3.5 Statistická analýza

#### 3.5.1 Hardy-Weinbergova rovnováha

Nezbytnou součástí statistické analýzy studie případů a kontrol je testování kontrolního souboru na Hardy-Weinbergovu rovnováhu (HWE, Hardy-Weinberg equilibrium). Hardy-Weinbergova rovnováha popisuje populaci v rovnováze, tzn. že splňuje určité podmínky jako náhodné párování, velká populace, nepřítomnost migrace, selekce, atd. Za splnění těchto podmínek pak platí:  $p + q = 1$ , kde  $p, q$  jsou frekvence alel v dialelickém lokusu.

Hardy-Weinbergova rovnováha je testována pomocí chí kvadrát testu (viz 3.5.5) nebo Fisherova exaktního testu (viz 3.5.6). Odchyly v HWE mohou být způsobeny selekcí, populační stratifikací, migrací, atd.

### 3.5.2 Kontingenční tabulky

Ve studiích případů a kontrol jsou porovnávány dvě skupiny. Jejich data jsou obvykle prezentována ve formě kontingenční tabulky (contingency table). Tato tabulka je vyžadována pro testování statistické významnosti, odhady rizik (poměr šancí - viz 3.5.3) a pro výpočet intervalu spolehlivosti (viz 3.5.4). V genetické epidemiologii řádky (resp. sloupce) popisují stav jedinců (případy nebo kontroly) a sloupce (popř. řádky), referují o specifických alelách, genotypch nebo haplotypech.

### 3.5.3 Kvantifikace rizika – odds ratio

Poměr šancí (OR, odds ratio) je jednou ze statistik hodnotících nebezpečí výskytu určité nemoci, pokud je přítomný daný faktor či expozice. Odds ratio je poměr pravděpodobnosti, že se daná událost stane a pravděpodobnosti, že se nestane. To je obvykle testováno jako poměr počtu případů, kdy se událost stala a počtu případů, kdy tomu bylo naopak. Odds ratio je nejpoužívanější statistickou metodou odhadující míru rizika ve studiích případů a kontrol. Data, která jsou použita pro kalkulaci OR, mohou být shrnuta do 2x2 tabulky.

**Tabulka 6. 2x2 tabulka pro výpočet OR.**

(upraveno dle Knapp, 1992)

N+ = nemocný; N- = zdravý; E+ = exponovaný určitému faktoru; E- = neexponovaný určit. faktoru

	<b>N+ (případy)</b>	<b>N- (kontroly)</b>	<b>Součet</b>
<b>E+</b>	a	b	a + b
<b>E-</b>	c	d	c + d
<b>Součet</b>	a + c	b + d	a + b + c + d

Pro studii případů a kontrol vypadá výpočet OR takto (upraveno dle Knapp, 1992):

$$OR = \frac{\text{šance, že nemocný byl vystaven určitému faktoru}}{\text{šance, že zdravý byl vystaven určitému faktoru}}$$

$$OR = \frac{O_{E+|N+}}{O_{E+|N-}}$$

$$OR = \frac{P(E+ | N+) / P(E- | N+)}{P(E+ | N-) / P(E- | N-)}$$

$$OR = \frac{a/c}{b/d}$$

$$OR = ad / bc$$

Hodnoty OR nemůžou nabývat záporných hodnot, nejsou ohraničeny shora. Čím vyšší je hodnota OR, tím silnější je asociace mezi onemocněním a zkoumaným faktorem. Pokud je OR okolo 1, pak spolu nemoc a zkoumaný faktor nesouvisí, tzn. že šance, že jedinec vystavený určitému faktoru onemocní, je stejná, jako u jedince, který stejnému faktoru vystaven nebyl. Hodnoty OR menší než 1 ukazují negativní asociaci, tzn. že sledovaný faktor má protektivní efekt (Knapp, 1992). Zlogaritmováním hodnoty OR je možné vypočítat směrodatnou chybu (SE) pro log OR a dále i intervaly spolehlivosti okolo odhadů rizika (viz 3.5.4).

$$SE(\log(or)) = \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}$$

OR je velmi užívané v lékařských výzkumech. Důvodem je, že poskytuje odhad (s intervaly spolehlivosti) vztahu mezi dvěma binárními (ano – ne) veličinami, dále umožní zkoušet efekty dalších proměnných na tento vztah užitím logistické regrese (viz 3.5.7). Poskytuje rovněž vyhovující interpretaci ve studiích případů a kontrol (Bland a Altman, 2000). OR je navíc běžnou cestou prezentování výsledků metaanalýzy (Crichton, 2001).

### 3.5.4 Intervaly spolehlivosti

Interval spolehlivosti (CI, confidence interval) ohraničuje rozpětí, do něhož s určitou pravděpodobností (obvykle 95%) spadá výsledek testované hypotézy nebo odhad poměru šancí. Jinak řečeno, pokud je konfidenční interval spočítán na 95% hladině, znamená to, že 95% pokusů (opakovaných stále dokola) bude zahrnovat skutečnou populační hodnotu.



Obecný vzorec pro výpočet intervalu spolehlivosti na 95% hladině je: statistika  $\pm 1,96$  SE, kde SE vyjadřuje standardní odchylku statistiky a 1,96 je kritická hodnota ( $Z_C$ ) pro  $p = 0,05$  (pro  $p = 0,01$  platí  $Z_C = 2,58$ ). Kritická hodnota nezávisí na velikosti zkoumaného vzorku. Výpočet intervalu spolehlivosti pro OR vyžaduje jejich přirozené zlogaritmování, protože bez toho nemají normální rozdělení. Výpočet CI se provádí Woolfovou metodou (Woolf, 1955 in Knapp, 1992):

$$95\% \text{ interval spolehlivosti pro } \ln \text{ OR} = \ln \text{ OR} \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}$$

Horní (UL, upper limit) a dolní (LL, lower limit) limit tohoto CI je následně spočítán jako antilogaritmus horního a dolního limitu pro  $\ln \text{ OR}$ :  $UL_{\text{OR}} = e^{UL_{\ln \text{OR}}}$ ;  $LL_{\text{OR}} = e^{LL_{\ln \text{OR}}}$ .

### 3.5.5 Chí kvadrát test

Statistická významnost asociačních testů je často hodnocena chí kvadrát testem ( $\chi^2$ ). Stejně je tomu i v této práci. Chí kvadrát test funguje na následujícím principu. Pro každou buňku v kontingenční tabulce (viz kapitola 3.5.2) najdeme frekvenci, kterou bychom očekávali v případě platnosti nulové hypotézy (tzn. žádný vztah mezi proměnnými). Očekávanou (E, expected) frekvencí je míněna průměrná frekvence, kterou bychom získali při dlouho opakovaném měření. Obecně lze výpočet očekávaných frekvencí (E) definovat vzorcem:

$$E = \frac{\text{součet řádků} \times \text{součet sloupců}}{\text{celkový součet}}$$

Následně porovnáme očekávané a skutečně získané (O, observed) frekvence. Pokud nejsou námi zkoumané veličiny ve vzájemném vztahu, oba druhy frekvencí by měly mít podobné hodnoty. Statistikou, jak porovnat očekávané a získané frekvence je

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Velikost výsledného rozdílu ale závisí i na počtu pacientů.  $\chi^2$  test je spolehlivý pro velké výběry. Čím menší budou očekávané frekvence, tím pochybnější bude výsledek testu. Statistik W. G. Cochran zavedl pravidlo, že  $\chi^2$  test je platný, pokud je nejméně

80% očekávaných frekvencí větších než 5 a všechny překračují hodnotu 1 (Bland, 1995). U malých výběrů je výhodnější použít místo  $\chi^2$  testu Fisherův exaktní test.

### 3.5.6 Fisherův exaktní test

Fisherův exaktní test přímo počítá pravděpodobnost výskytu všech možných obměn četností v kontingenční tabulce, které dávají stejné marginální četnosti jako tabulka zjištěných hodnot:

$$p = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!a!b!c!d!}$$

Výhodou exaktních testů je to, že berou v úvahu všechny možné alternativy a výsledek bez počítačového programu lze těžko spočítat.

Fisherův exaktní test jsme v této práci použili k testování asociace jednotlivých SNP s Crohnovou chorobou a při genotypo-fenotypové analýze.

### 3.5.7 Logistická regrese

Aplikace logistické regrese je užívána v případě testování binárních veličin, jak je tomu u analýzy vlivu určitého polymorfizmu na vznik onemocnění. Logistická regrese predikuje pravděpodobnost události, která se stala ( $\pi$ ) nebo nestala ( $1-\pi$ ). Pravděpodobnost  $p(x)$  značí přítomnost události ( $\pi$ ) a zároveň studované nezávislé veličiny  $x$ . Při logistické regresi se odhadují regresní koeficienty  $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_n$  pomocí logitové transformace:  $\text{logit}(p(x)) = \ln [p(x) / 1-p(x)]$ . Jednoduchá logistická regrese s jedinou vysvětlující proměnou  $x$  má tvar:  $\text{logit}(p(x)) = b_0 + bx$ , kde  $b_n$  jsou odhady regresních koeficientů. Nulová pak zní, že jsou regresní koeficienty  $\beta$  stejné:  $\beta_0 = \beta_1 = \dots = \beta_n$  (Balding, 2006). Mnohonásobná logistická regrese vypadá následovně:  $\text{logit}(p(x_1 \dots x_i)) = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_ix_i$ . Výhodou logitové transformace je i to, že rozšiřuje obor hodnot funkce  $\pi$  s intervalem  $[0,1]$  na celou reálnou osu (Bencko, 2003).

Metodu jednoduché logistické regrese jsme využili pro vyjádření OR a CI pro studované varianty, a to i u dat stratifikovaných v závislosti na věku pacientů v době diagnózy. Pro zkoumání vlivu jednotlivých SNP v genu *CARD15* jsme použili i metodu mnohonásobné logistické regrese.

### 3.5.8 Mann-Whitneyův test

Neparametrický Mann-Whitneyův test zkoumá rozdíl mezi dvěma skupinami. Kombinuje oba výběry, řadí pozorování od nízkých hodnot k vysokým a následně

stanoví pořadí pro každé pozorování. Po sečtení pořadí pro obě porovnávané skupiny spočítá testovou statistiku podle vzorce:  $U_1 = S_1 - [n_1(n_1 + 1)]/2$ , kde  $S_1$  vyjadřuje součet pořadí v první skupině a  $n_1$  rozsah výběru první skupiny. Obdobně je zjištěna i statistika  $U_2$  pro druhou skupinu. Nulová hypotéza, tj. není rozdíl mezi skupinami, je zamítnuta pokud je menší z hodnot  $U_1$  nebo  $U_2$  menší než kritická hodnota, kterou lze zjistit z tabulek či aproximací (Zvárová, 1998):

$$Z = \frac{U_1 - \frac{1}{2}n_1n_2}{\sqrt{\frac{1}{12}n_1n_2(n_1 + n_2 + 1)}}$$

Mann-Whitneyův test založený na pořadí jsme v této práci vybrali k zjištění vlivu testovaných polymorfizmů na věk v době diagnózy.

### 3.5.9 Mantel-Haenszelův a Breslow-Dayův test homogenity

Soubor dat může být rozdělen (stratifikován) podle proměnných, které by mohly potencionálně být zavádějícími faktory. Tento postup ozřejmí, jak se rozložení četností studovaných faktorů v jednotlivých skupinách (stratech) mění v závislosti na potencionálním zaváděcím faktoru. Pro každou skupinu lze získat specifický ukazatel (např. OR s CI). Ovšem cílem analýzy je získat sumárního ukazatele, který už bere v úvahu efekt stratifikované proměnné. Jedná se tedy o adjustovaný ukazatel. Mantel-Haenszelův postup výpočtu adjustovaného OR je následující (Bencko, 2003):

$$\bar{OR}_{MH} = \frac{\sum_{i=1}^k a_i d_i / n_i}{\sum_{i=1}^k b_i c_i / n_i}$$

$k$  = počet strat;  $i$  = strata;  $a_i$  = pacienti s alespoň jednou minoritní variantou v *CARD15*;  $b_i$  = kontroly s alespoň jednou minoritní variantou v *CARD15*;  $c_i$  = pacienti bez minoritních alel v *CARD15*;  $d_i$  = kontroly bez minoritních alel v *CARD15*;  $n_i$  = součet pacientů a kontrol

K zjištění zda lze považovat strata za homogenní, se využívají Mantel-Haenszelovy a Breslow-Dayovy testy homogenity, které mají podobu váženého součtu čtverců odchylek logaritmů dílčích OR od jejich váženého průměru (Bencko, 2003).

Stratifikace testovaného souboru jsme provedli na základě přítomnosti či nepřítomnosti aspoň jedné minoritní alely ve studovaných SNP genu *CARD15*. Získaná



## 4. Výsledky

### 4.1 Genotypové, alelické a fenotypické frekvence

Všechny z testovaných polymorfizmů byly v kontrolním souboru v Hardy-Weinbergově rovnováze ( $p \geq 0,64$ ).

#### 4.1.1 *CARD15*

Frekvence studovaných variant v genu *CARD15* shrnuje tabulka 7. Alela s inzercí cytozinu (c.3020insC) a minoritní alela v SNP p.Gly908Arg byly signifikantně asociovány s CD.

Nejsilnější asociaci jsme našli mezi minoritní alelou v polymorfizmu c.3020insC, kterou neslo 32,4% pacientů s CD a pouze 9,4% zdravých jedinců (OR = 4,4; 95%CI 3,0 – 6,4). V našem souboru pacientů jsme detekovali 29 pacientů (8,7%) homozygotních pro variantu c.3020insC, zatímco žádný kontrolní subjekt nebyl homozygotní pro tuto variantu. Rovněž nositelé minoritní alely p.908Arg mají vyšší náchylnost k CD (OR = 2,7; 95%CI 1,4 – 5,0), ačkoli není tak vysoká jako v případě c.3020insC. V testovaném souboru se vyskytovali tři homozygoté (0,9%) pro minoritní argininovou alelu ve skupině případů a jeden homozygot (0,2%) v kontrolní skupině. Na druhou stranu, rozdíl mezi případy a kontrolami ve variantě p.Arg702Trp nedosáhl statistické významnosti, když alelu kódující tryptofan mělo 6% pacientů s CD a 4,1% kontrol (OR = 1,5; 95%CI 0,9 – 2,4).

Přítomnost studovaných minoritních alel v genu *CARD15* znamená pro jejich nositele významné riziko pro vznik CD. Alespoň jednu minoritní alelu mělo 46,2% pacientů a pouze 20,2% zdravých jedinců (OR = 3,39; 95%CI 2,47 – 4,66). Riziko, které představují tyto tři studované rizikové varianty je výrazně závislé na dávce (počtu rizikových alel v genomu): pro nositele jedné rizikové alely se odds ratio rovná 2,43 (95%CI 1,75 – 3,38), pro nositele dvou a více rizikových alel se OR zvyšuje na 18,53 (95%CI 7,80 – 44,01).

Při použití mnohonásobné regresní analýzy, kde byly rizikové varianty v genu *CARD15* brány jako prediktory a CD jako výstup, jsme opět našli největší rizikovost pro alelu c.3020insC (OR = 4,48; 95%CI 3,08 – 6,53). Následovala varianta p.908Arg (OR = 2,77; 95%CI 1,43 – 5,34). V tomto modelu byla rovněž asociována s CD minoritní alela p.702Trp (OR = 1,65; 95%CI 1,02 – 2,67).

### **4.1.2 TNFA**

Genotypové, alelické a fenotypické frekvence variant v genech *TNFA*, *IL23R* a *ATG16L1* jsou zobrazeny v tabulce 8. Asociaci mezi minoritní alelou v polymorfizmu g.-308G>A v genu *TNFA* a CD jsme v souboru případů a kontrol nenalezli. Alelu A neslo 23,7% pacientů a 24% zdravých jedinců (OR = 0,98; 95%CI 0,71 – 0,36).

### **4.1.3 IL23R**

Minoritní alela p.381Gln v genu *IL23R* byla negativně asociována s CD, protože její alelická frekvence dosáhla u případů 3,2% a u kontrol 5,5% (OR = 0,56; 95%CI 0,32 – 0,95). Stejně tak nositelů glutaminové alely u případů bylo statisticky významně méně než nositelů glutaminové alely u kontrol (OR = 0,57; 95%CI 0,33 – 0,96).

### **4.1.4 ATG16L1**

Rizikovou alelu p.197Ala v genu *ATG16L1* jsme ve větší míře našli u případů než u kontrol (alelická frekvence u pacientů 55,6%, u zdravých jedinců 50,4%; OR = 1,23; 95%CI 1,01 – 1,50). Ovšem porovnání nositelů rizikové alely mezi případy a kontrolami nebylo signifikantně rozdílné (OR = 1,34; 95%CI 0,96 – 1,88).

## **4.2 Interakce s CARD15**

Soubor případů a kontrol jsme stratifikovali podle přítomnosti či nepřítomnosti aspoň jedné z variant v genu *CARD15* (*CARD15+* či *CARD15-*). Tabulka 9 dokazuje, že se fenotypické frekvence rizikových alel g.-308A v genu *TNF $\alpha$* , p.381Gln v genu *IL23R* ani p.197Ala v genu *ATG16L1* signifikantně neodlišovaly v těchto dvou stratech. Jakv případě Mantel-Haenszelova, tak Breslow-Dayova testu homogenity byla p hodnota shodná (p = 0,36 pro g.-308A, p = 0,81 pro p.381Gln, p = 0,41 pro p.197Ala).

**Tabulka 7. Genotypové, alelické a fenotypické frekvence pro c.3020insC, p.Gly908Arg, p.Arg702Trp.**

	Genotypové frekvence $n_{\text{případy}}=333, n_{\text{kontroly}}=499$			Alelické frekvence $2n_{\text{případy}}=666, 2n_{\text{kontroly}}=998$		Fenotypické frekvence $n_{\text{případy}}=333, n_{\text{kontroly}}=499$	
	-/-	-/C	C/C	-	C	- +	C+
<b>CARD15 c.3020insC</b>							
Případy	225 (67,6%)	79 (23,7%)	29 (8,7%)	529 (79,4%)	137 (20,6%)	304 (91,3%)	108 (32,4%)
Kontroly	450 (90,2%)	49 (9,8%)	0 (0%)	949 (95,1%)	49 (4,9%)	497 (99,6%)	49 (9,8%)
OR (95%CI)					<b>5,02 (3,52-7,22)</b>		<b>4,41 (3,03-6,40)</b>
<b>CARD15 p.Gly908Arg</b>	Gly/Gly	Gly/Arg	Arg/Arg	Gly	Arg	Gly+	Arg+
Případy	306 (91,9%)	24 (7,2%)	3 (0,9%)	636 (95,5%)	30 (4,5%)	330 (99,1%)	27 (8,1%)
Kontroly	483 (96,8%)	15 (3,0%)	1 (0,2%)	981 (98,3%)	17 (1,7%)	498 (99,8%)	16 (3,2%)
OR (95%CI)					<b>2,72 (1,44-5,30)</b>		<b>2,66 (1,41-5,02)</b>
<b>CARD15 p.Arg702Trp</b>	Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp	Arg	Trp	Arg+	Trp+
Případy	294 (88,3%)	38 (11,4%)	1 (0,3%)	626 (94,0%)	40 (6,0%)	332 (99,7%)	39 (11,7%)
Kontroly	458 (91,8%)	41 (8,2%)	0 (0%)	957 (95,9%)	41 (4,1%)	499 (100%)	41 (8,2%)
OR (95%CI)					<b>1,49 (0,93-2,39)</b>		<b>1,48 (0,93-2,35)</b>

**Tabulka 8. Genotypové, alelické a fenotypické frekvence pro g.-308G>A, p.Arg381Gln, p.Ala197Thr.**

<i>TNF<math>\alpha</math></i> g.-308G>A	Genotypové frekvence $n_{\text{případy}}=333, n_{\text{kontroly}}=499$			Alelické frekvence $2n_{\text{případy}}=666, 2n_{\text{kontroly}}=998$		Fenotypické frekvence $n_{\text{případy}}=333, n_{\text{kontroly}}=499$	
	G/G	G/A	A/A	G	A	G+	A+
Případy	254 (76,3%)	72 (21,6%)	7 (2,1%)	580 (87,1%)	86 (12,9%)	326 (97,9%)	79 (23,7%)
Kontroly	379 (76,0%)	110 (22,0%)	10 (2,0%)	868 (87,0%)	130 (13,0%)	489 (98,0%)	120 (24,0%)
OR (95%CI)					0,99 (0.73-1,34)		0,98 (0.71-1,36)
<i>IL23R</i> p.Arg381Gln	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Arg	Gln	Arg+	Gln+
Případy	312 (93,7%)	21 (6,3%)	0 (0%)	645 (96,8%)	21 (3,2%)	333 (100%)	21 (6,3%)
Kontroly	446 (89,4%)	51 (10,2%)	2 (0,4%)	943 (94,5%)	55 (5,5%)	497 (99,6%)	53 (10,6%)
OR (95%CI)					0,56 (0.32-0,95)		0,57 (0.33-0,96)
<i>ATG16L1</i> p.Ala197Thr	Thr/Thr	Thr/Ala	Ala/Ala	Thr	Ala	Thr+	Ala+
Případy	68 (20,4%)	160 (48,1%)	105 (31,5%)	296 (44,4%)	370 (55,6%)	226 (68%)	265 (79,6%)
Kontroly	128 (25,7%)	239 (47,9%)	132 (26,5%)	495 (59,6%)	503 (50,4%)	367 (74%)	371 (74,4%)
OR (95%CI)					1,23 (1.01-1,51)		1,34 (0,96-1,88)



**Tabulka 9. Porovnání frekvencí g.-308A, p.381Gln a p.197Ala dle stratifikace na přítomnost či nepřítomnost alespoň jedné rizikové alely v genu *CARD15*.**

<i>CARD15</i> status	Fenotypické frekvence <i>TNF<math>\alpha</math></i> -308G>A		Fenotypické frekvence <i>IL23R</i> p.Arg381Gln		Fenotypické frekvence <i>ATG16L1</i> p-Ala197Thr	
	G+	A+	Arg+	Gln+	Thr+	Ala+
<b>Případy</b> (n=154)	150 (97,4%)	47 (30,5%)	154 (100%)	13 (8,4%)	107 (69,5%)	121 (78,6%)
<b>Kontroly</b> (n=101)	96 (95,0%)	30 (29,7%)	101 (100%)	18 (17,8%)	70 (69,3%)	78 (77,2%)
<b>OR (95%CI)</b>	1,04 (0,58-1,87)			<b>0,43</b> <b>(0,18-0,97)</b>		1,08 (0,56-2,06)
<b>Případy</b> (n=179)	176 (98,3%)	32 (17,9%)	179 (100%)	8 (4,5%)	121 (67,6%)	144 (80,5%)
<b>Kontroly</b> (n=398)	393 (98,7%)	90 (22,6%)	396 (99,5%)	35 (8,8%)	297 (74,6%)	293 (73,6%)
<b>OR (95%CI)</b>	0,74 (0,46-1,19)			0,49 (0,19-1,10)		1,47 (0,94-2,34)
<b>Adjustované OR</b>	0,85 (0,60-1,20)			<b>0,46</b> <b>(0,26-0,79)</b>		1,33 (0,94-1,89)
<b>p hodnota testu homogeneity</b>	0,36			0,81		0,41

### 4.3 Genotypo-fenotypová analýza

Využitím modelu „case-only“ jsme testovali závislost fenotypových charakteristik pacientů s CD na přítomnosti rizikových alel studovaných kandidátních genů.

#### 4.3.1 Věk v době diagnózy

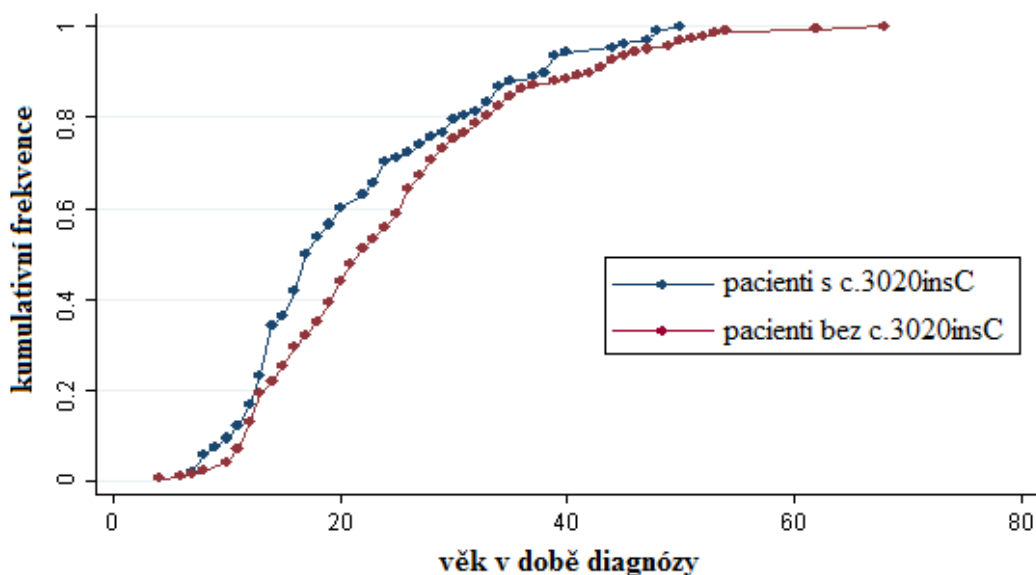
Nejprve jsme porovnali frekvence rizikových alel mezi skupinou pacientů diagnostikovaných do 18. roku věku včetně a skupinou pacientů diagnostikovaných v dospělosti. Jak ukazuje tabulka 10, pouze u varianty c.3020insC v genu *CARD15* jsme detekovali statisticky významný rozdíl mezi těmito dvěma skupinami pacientů ( $p = 0,001$ ).

Tabulka 10. Porovnání frekvencí rizikových alel mezi 2 skupinami pacientů.

Polymorfismus	Pacienti diagnostikovaní v pediatrickém věku	Pacienti diagnostikovaní v dospělosti	p hodnota
	Frekvence rizikové alely		
<b><i>CARD15</i></b>			
c.3020insC	42,3%	25,5%	<b>0.001</b>
p.908Arg	10,2%	6,6%	0.24
p.702Trp	11,7%	11,7%	0.99
<b><i>TNFA</i></b>			
g.-308A	27,0%	21,4%	0.24
<b><i>IL23R</i></b>			
p. 381Gln	5,1%	7,1%	0,46
<b><i>ATG16L1</i></b>			
p.179Ala	78,8%	80,1%	0,78

Také graf 1 dokazuje, že pacienti, kteří ve svém genomu nesou inzerci cytozinu v pozici 3020 v genu *CARD15* jsou diagnostikováni dříve než pacienti bez této varianty. Asociaci c.3020insC s věkem v době diagnózy potvrdil i Mann-Whitneyův test založený na pořadí ( $p = 0,01$ ).

**Graf 1. Porovnání pacientů s c.3020insC a bez ní v závislosti na věku v době diagnózy.**



#### 4.3.2 Ostatní klinické charakteristiky

Následně jsme testovali další fenotypové charakteristiky pacientů s CD podle Montrealské klasifikace (Silverberg *et al*, 2005) v závislosti na přítomnosti rizikových alel. Výsledky získané Fisherovým exaktním testem jsou shrnuty v tabulkách 11, 12 a 13.

##### 4.3.2.1 CARD15

Postižení tenkého střeva (L1 + L3) bylo asociováno s nosičstvím varianty c.3020insC ( $p < 0,001$ ; OR = 5,53; 95%CI 2,11 – 18,31). Stejně tak riziko postižení ileokolonu (L3) je zvýšené přítomností c.3020insC ( $p = 0,04$ ; OR = 1,73; 95%CI = 1,03 – 2,94). Ovšem samostatné postižení terminálního ilea (L1) statistické významnosti pro tuto variantu nedosáhlo ( $p = 0,39$ ). Statistická analýza dále ukázala, že přítomnost c.3020insC má ochranný vliv proti postižení tlustého střeva ( $p < 0,001$ ; OR = 0,20; 95%CI 0,06 – 0,52). Přítomnost perianálního postižení u pacientů s CD bylo na hranici statistické významnosti ( $p = 0,05$ ). Polymorfismus c.3020insC nebyl signifikantně asociován s žádným dalším testovaným subfenotypem CD jako je postižení horní části gastrointestinálního traktu, strikturující nebo penetrující forma CD, extraintestinální manifestace nebo nutnost chirurgického zákroku.

U zbývajících studovaných SNP v genu *CARD15*: p.Gly908Arg (tabulka 11) a p.Arg702Trp (tabulka 12) jsme neprokázali asociaci s testovanými klinickými charakteristikami na 5% hladině významnosti.

#### **4.3.2.2 *TNFA***

Porovnáním přítomnosti minoritní alely A (g.-308A) v genu *TNFA* u pacientů s CD se studovanými fenotypy jsme nedokázali jejich vzájemný kauzální vztah (tabulka 12).

#### **4.3.2.3 *IL23R***

Genotypo-fenotypová analýza varianty p.381Gln (tabulka 13) detekovala její protektivní efekt na postižení horního gastrointestinálního traktu ( $p = 0,03$ ; pravý okraj 95%CI 0,84). Hodnotu OR a levý okraj 95%CI nelze vyčíslit kvůli přítomnosti nulové hodnoty v kontingenční tabulce. Další statisticky významnou asociaci této varianty s fenotypem CD jsme nedetekovali.

#### **4.3.2.4 *ATG16L1***

Ve studovaném souboru pacientů s CD se rovněž neobjevila asociace rizikové alely p.197Ala v genu *ATG16L1* s některým z testovaných klinických charakteristik (tabulka 13).



**Tabulka 12. Genotypo-fenotypová analýza pro p.Arg702Trp v genu *CARD15* a g.-308G>A v genu *TNFA*.**

	Rozložení genotypů <i>CARD15</i> p.Arg702Trp			Fenotypické frekvence		p hodnota	Rozložení genotypů <i>TNFA</i> g.-308G>A			Fenotypické frekvence		p hodnota
	Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp	Trp+	Trp-		G/G	G/A	A/A	A+	A-	
<b>Místo postižení</b>												
L1	59	12	0	12 (16,9%)		0,15	55	13	3	16 (22,5%)		0,88
L2	47	3	0	3 (6,0%)		0,23	36	13	1	14 (28,0%)		0,47
L3	184	23	1	24 (11,5%)		0,86	161	44	3	47 (22,6%)		0,51
L1 + L3	243	35	1	36 (12,9%)		0,17	216	57	6	63 (22,6%)		0,29
L4	52	4	0	4 (7,1%)		0,36	45	47	0	11 (19,6%)		0,49
- ano	241	34	1	35 (12,7%)			208	61	7	68 (24,6%)		
- ne												
<b>Chování</b>												
B1	122	15	1	16 (11,6%)		1,00	104	32	2	34 (24,6%)		0,60
B2	112	17	0	17 (13,2%)		0,60	102	24	3	27 (20,9%)		0,50
B3	56	6	0	6 (9,7%)		0,67	47	13	2	15 (24,2%)		0,87
B4	100	9	0	9 (8,3%)		0,20	84	31	0	25 (22,9%)		1,00
- ano	190	29	1	30 (13,6%)			169	44	7	51 (23,2%)		
- ne												
<b>EIM</b>												
- ano	51	2	0	2 (3,8%)		0,06	43	10	0	10 (18,9%)		0,39
- ne	237	36	1	37 (13,5%)			206	61	7	68 (24,8%)		
<b>Operace</b>												
- ano	154	19	0	19 (11,0%)		0,73	132	37	4	41 (23,7%)		0,90
- ne	138	19	1	20 (12,7%)			122	33	3	36 (22,8%)		

**Tabulka 13. Genotypo-fenotypová analýza pro p-Arg381Gln v genu *IL23R* a p-Ala197Thr v genu *ATG16L1*.**

Místo postižení	Rozložení genotypů <i>IL23R</i> p-Arg381Gln			Fenotypické frekvence		p hodnota	Rozložení genotypů <i>ATG16L1</i> p-Ala197Thr			Fenotypické frekvence		p hodnota
	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Gln+	Thr/Thr		Thr/Ala	Ala/Ala	Ala+			
<b>Místo postižení</b>												
L1	68	3	0	3 (4,2%)	0,58	17	36	18	54 (76,1%)	0,41		
L2	44	6	0	6 (12,0%)	0,11	7	24	19	43 (86,0%)	0,26		
L3	196	12	0	12 (5,8%)	0,64	44	97	67	164 (78,9%)	0,78		
L1 + L3	264	15	0	15 (5,4%)	0,12	61	133	85	218 (78,1%)	0,19		
L4 - ano	56	0	0	0 (0%)	<b>0,03</b>	12	27	17	44 (78,6%)	0,86		
- ne	255	21	0	21 (7,6%)		56	133	87	220 (79,7%)			
<b>Chování</b>												
B1	130	8	0	8 (5,8%)	1,00	31	62	45	107 (77,5%)	0,49		
B2	119	10	0	10 (7,8%)	0,35	23	63	43	106 (82,2%)	0,33		
B3	60	2	0	2 (3,2%)	0,39	14	32	16	48 (77,4%)	0,73		
B4 - ano	105	4	0	4 (30,7%)	0,23	19	54	36	90 (82,6%)	0,39		
- ne	204	16	0	16 (7,3%)		49	103	68	171 (77,7%)			
<b>EIM</b>												
- ano	48	5	0	5 (9,4%)	0,36	13	24	16	40 (75,5%)	0,46		
- ne	258	16	0	16 (5,8%)		54	131	89	220 (80,3%)			
<b>Operace</b> - ano	165	8	0	8 (4,6%)	0,26	31	86	56	142 (82,1%)	0,28		
- ne	145	13	0	13 (8,2%)		36	73	49	122 (77,2%)			

## 5. Diskuze

Během posledních více než deseti let bylo po celém světě publikováno mnoho studií případů a kontrol zabývajících se studiem kandidátních genů pro Crohnovu chorobu. Ovšem poznatky o genetickém pozadí u pacientů s diagnózou CD narozených v České republice nebyly velké. Pouze Sýkora *et al* studovali vliv polymorfizmu g.-308G>A v genu *TNFA* u českých pacientů s IBD diagnostikovaných mezi 8 a 18 lety (Sýkora *et al*, 2006).

Naše práce se věnovala studiu potenciálně kauzálních variant v kandidátních genech pro CD u velké skupiny pacientů diagnostikovaných do 18 let věku i v dospělosti.

### 5.1 Genotypové, alelické a fenotypické frekvence

#### 5.1.1 Riziko variant v genu *CARD15*

Ve shodě s evropskými a zámořskými studii jsme potvrdili kauzalitu variant c.3020insC, p.Gly908Arg a p.Arg702Trp v genu *CARD15* u českých pacientů s CD (Hradský *et al*, 2008). Nejvyšší riziko vzniku CD s sebou nese přítomnost první jmenované varianty. Signifikantní nezávislou asociaci minoritní alely p.702Trp s CD jsme detekovali až po adjustaci na zbylé dva testované polymorfizmy v genu *CARD15* v analýze mnohonásobnou regresí ( $p = 0,041$ ).

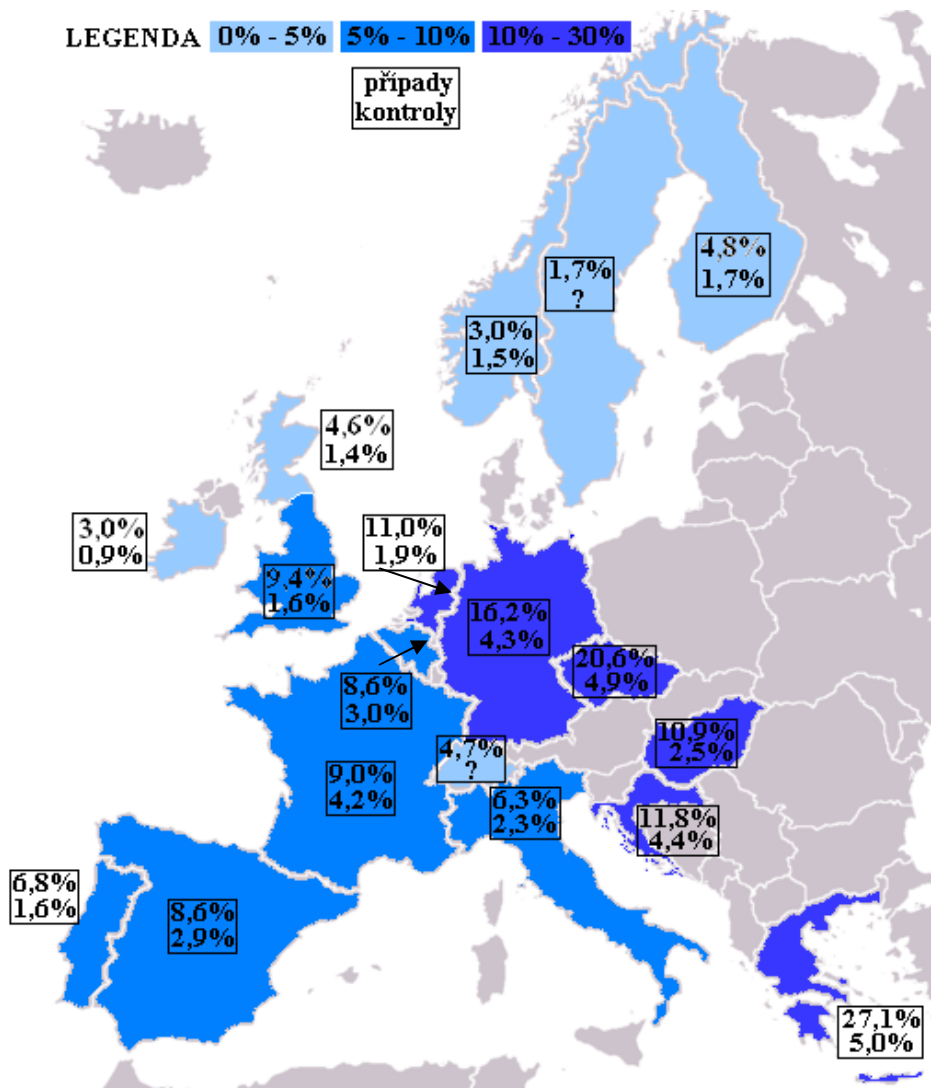
##### 5.1.1.1 Porovnání alelických frekvencí variant v genu *CARD15* v Evropě

Alelická frekvence varianty c.3020insC je u českých pacientů s CD jednou z nejvyšších: dosahuje 20,6%. Při porovnávání publikovaných frekvencí v rámci Evropy je patrná značná heterogenita (obrázek 16). Alelická frekvence c.3020insC u pacientů s CD se zdá být v severní Evropě nižší (Norsko: 3,0% (Medici *et al*, 2006); Švédsko: 1,7% (Idestrom *et al*, 2005); Finsko: 4,8% (Helio *et al*, 2003), Irsko: 3,0% (Arnott *et al*, 2004); Skotsko: 4,6% (Arnott *et al*, 2004)) a to i u kontrolních souborů než u jihoevropských zemí (Řecko: 27,1% (Economou *et al*, 2007); Chorvatsko: 11,8% (Cukovic-Cavka *et al*, 2006); Itálie: 6,3%, (Giachino *et al*, 2004); Španělsko: 8,6% (Mendoza *et al*, 2003); Portugalsko: 6,8% (Ferreira *et al*, 2005)). Nejedná se ovšem o evropský stoupající severo-jihní gradient výskytu c.3020insC u pacientů s CD, protože vysoké frekvence byly detekovány ve střední Evropě: Česká republika: 20,6% (Hradský



*et al*, 2008); Maďarsko: 10,9% (Lakatos *et al*, 2005) a v západní Evropě: Německo: 16,2% (Medici *et al*, 2006), Nizozemí: 11,0% (van der Linde *et al*, 2007); Belgie: 8,6% (Esters *et al*, 2004); Francie: 9,0% (Heresbach *et al*, 2004); Anglie: 9,4% (Ahmad *et al*, 2002). Výjimku představuje alelická frekvence zjištěná ve Švýcarsku: 4,7% (Ruegg *et al*, 2004). Rovněž porovnání míry rizika, kterou představuje studovaná varianta v různých zemích Evropy nepřineslo jasně definovatelný trend. I přesto, že je alelická frekvence c.3020insC u českých pacientů vysoká, poměr šancí pro tuto variantu (OR = 5,0; 95%CI 3,5-7,2) se výrazně neodlišuje od rizika zjištěného metaanalýzou Economou *et al* (OR = 4,1; 95%CI 3,2 – 5,2) (Economou *et al*, 2004).

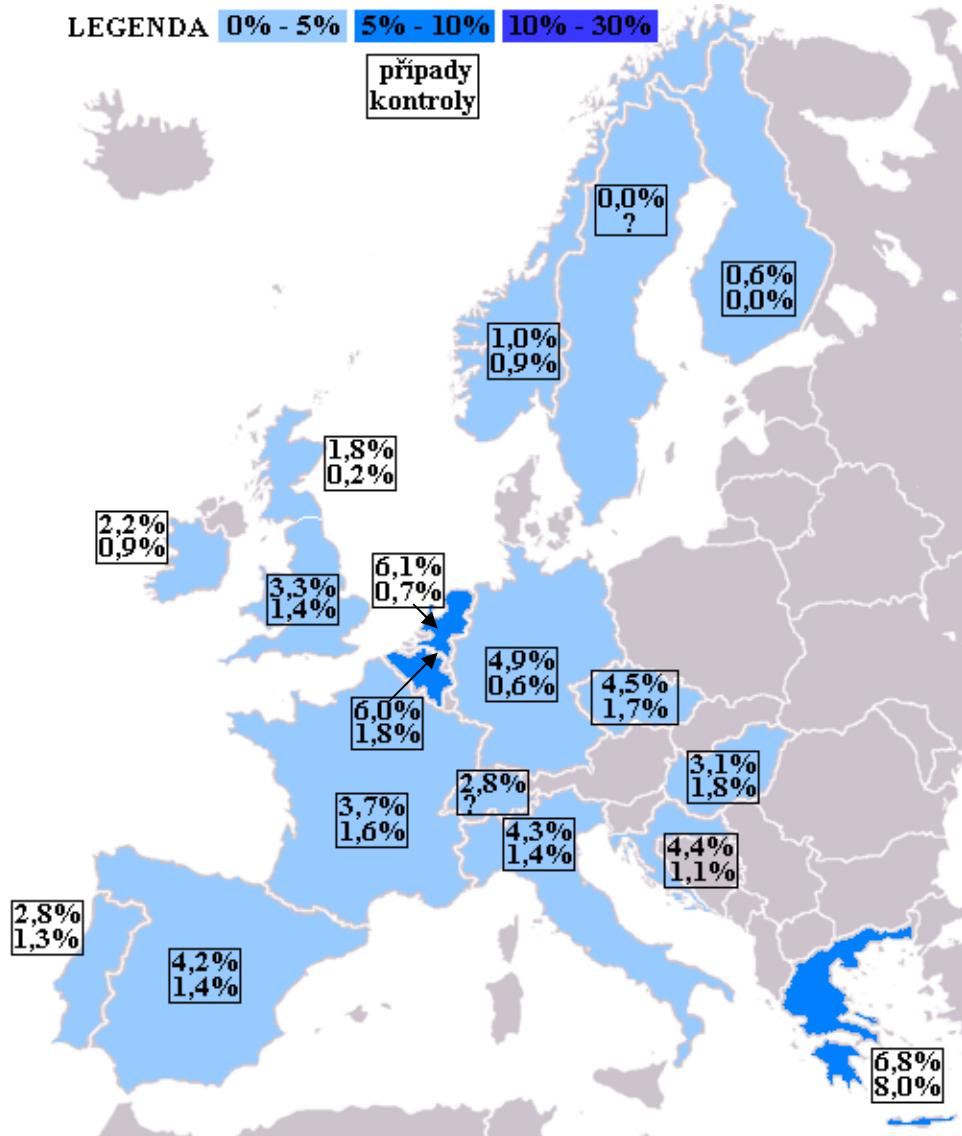
**Obrázek 16. Alelické frekvence c.3020insC v genu *CARD15* u pacientů s CD a kontrol.** Ze zemí, ve kterých bylo provedeno více studií, je znázorněna frekvence ze studie s nejvyšším počtem probandů. U některých studií nebyla dostupná hodnota pro kontroly (?).



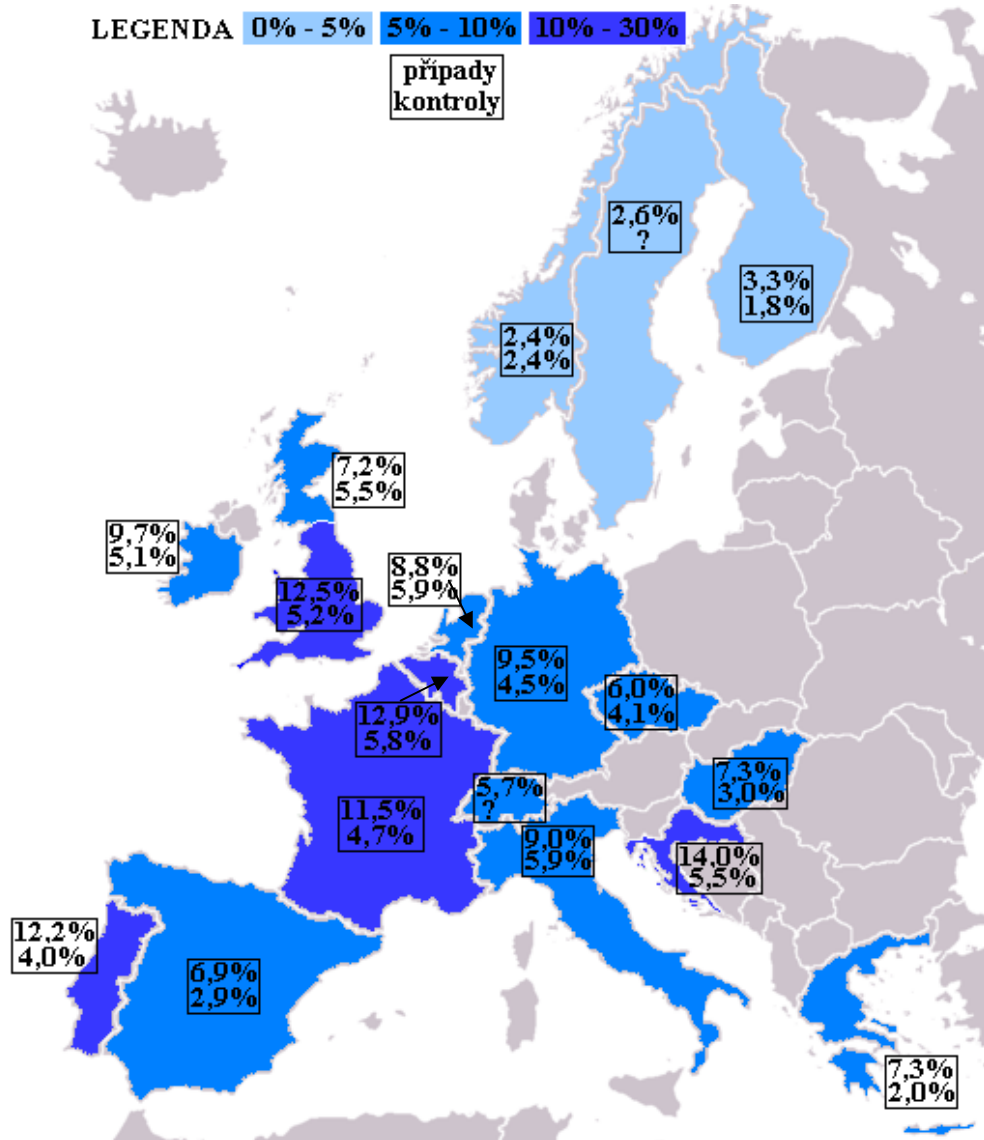
Minoritní argininová alela p.908Arg v genu *CARD15* se v evropských zemích u pacientů s CD vyskytuje méně než c.3020insC (obrázek 17). I u tohoto polymorfizmu byly nejnižší frekvence u pacientů s CD detekovány v severských státech: Norsko: 1,0% (Medici *et al*, 2006); Švédsko: 0,0% (Idestrom *et al*, 2005); Finsko: 0,6% (Helio *et al*, 2003), i když odlišnosti od ostatních evropských zemí nejsou markantní: Anglie: 3,3% (Ahmad *et al*, 2002); Francie: 3,7% (Heresbach *et al*, 2004); Itálie: 4,3% (Giachino *et al*, 2004). Alelická frekvence p.908Arg u českých pacientů dosáhla 4,5% (Hradský *et al*, 2008), což je podobné výsledku zjištěnému v nejbližším Německu (4,5%) (Medici *et al*, 2006). Data z ostatních našich sousedních zemí nejsou k dispozici. Nejvyšší alelické frekvence p.908Arg byly zjištěny v Belgii (6,0%) (Esters *et al*, 2004), Nizozemí (6,1%) (van der Linde *et al*, 2007) a Řecku (6,8%) (Economou *et al*, 2007). I v případě této varianty tak nelze pozorovat jasný trend související s polohou jednotlivých států. Metaanalýza do té doby celosvětově publikovaných dat o variantách v genu *CARD15* zhodnotila riziko SNP p.908Arg na OR = 2,2 (95%CI 1,8 – 2,6) (Economou *et al*, 2004). Ani tato hodnota se významně neodlišuje od rizika zjištěného u českých pacientů s CD a zdravých kontrol: OR = 2,7 (95%CI 1,4 – 5,3).

Pravděpodobně největší nesoulad v rámci geografického rozložení je patrný u třetí studované varianty v genu *CARD15* – p.702Trp (obrázek 18). Nejnižší detekované alelické frekvence u pacientů jsou opět na severu Evropy (Norsko: 2,4% (Medici *et al*, 2006); Švédsko: 2,6% (Idestrom *et al*, 2005), Finsko: 3,3% (Helio *et al*, 2003)). Nesourodé výsledky se vyskytují u některých sousedících zemí. Např. u Belgie (12,9%) (Esters *et al*, 2004) a Nizozemí (8,8%) (van der Linde *et al*, 2007), Španělska (6,9%) (Mendoza *et al*, 2003) a Portugalska (12,2%) (Ferreira *et al*, 2005) nebo Maďarska (7,3%) (Lakatos *et al*, 2005) a Chorvatska (14,0%) (Cukovic-Cavka *et al*, 2006). U českých pacientů s CD jsme našli 6% alelickou frekvenci p.702Trp (Hradský *et al*, 2008). Je to o 3,5% méně než v sousedním Německu (Medici *et al*, 2006) a o 1,3% méně než v nedalekém Maďarsku (Lakatos *et al*, 2005). Bohužel můžeme pouze spekulovat, zda by frekvence z Polska či Slovenska byly podobné našim. Srovnání s metaanalýzou Economou *et al* pak dokládá, že varianta p.702Trp není v české populaci tak riziková než jak je tomu jinde ve světě. Poměr šancí pro rizikovou alelu byl v naší populaci zjištěn zhruba o polovinu menší (OR = 1,5; 95%CI 0,9 – 2,4) než u metaanalýzy ze 29 studií na kavkazských nežidovských populacích (OR = 3,0; 95%CI 2,4 – 3,7) (Economou *et al*, 2004).

**Obrázek 17. Alelické frekvence p.908Arg v genu *CARD15* u pacientů s CD a kontrol.** Ze zemí, ve kterých bylo provedeno více studií, je znázorněna frekvence ze studie s nejvyšším počtem probandů. U některých studií nebyla dostupná hodnota pro kontroly (?).



**Obrázek 18. Alelické frekvence p.702Trp v genu *CARD15* u pacientů s CD a kontrol.** Ze zemí, ve kterých bylo provedeno více studií, je znázorněna frekvence ze studie s nejvyšším počtem probandů. U některých studií nebyla dostupná hodnota pro kontroly (?).



### 5.1.2 Nenalezená asociace g.-308G>A v genu *TNFA*

Jak jsem již výše zmínila, kauzalitu varianty g.-308A již v české populaci studovali Sýkora *at al* (2006). Studii ale prováděli na menším souboru případů a kontrol (46 pacientů s diagnózou CD vs. 82 zdravých kontrolních subjektů). Riziková adeninová alela v genu *TNFA* se nevyskytovala v kohortě pacientů signifikantně častěji než v kontrolní skupině (Sýkora *et al*, 2006). Ani naše studie rizikovost alely g.-308A nepotvrdila a dá se tedy předpokládat, že tato varianta nebude hrát významnou roli

v etiologii CD v české populaci. Kauzálním polymorfizmem u českých pacientů s CD může být jiná námi nezkoumaná varianta v genu *TNFA*.

Publikované zahraniční práce však takto konzistentní nejsou. Studie Fowlera *et al* (2005) prováděná na australské skupině 304 pacientů s CD a 217 kontrol asociaci této varianty nepotvrdila ( $p = 0,72$ ). Naopak portugalská studie (235 pacientů s CD vs. 929 zdravých kontrol) kauzalitu g.-308A v genu *TNFA* detekovala (OR = 3,00) (Ferreira *et al*, 2005). Italská práce studující vliv varianty u pacientů diagnostikovaných do 18 let, našla g.-308A statisticky významně častěji u pacientů s CD než u kontrol (OR = 2,79) (Cucchiara *et al*, 2007a). Naopak v izraelském souboru pacientů diagnostikovaných do 18 let asociace studovaného polymorfizmu prokázána nebyla (Levine *et al*, 2005).

Nesourodost výše zmíněných zjištění je o to zajímavější, vezmeme-li v úvahu účinnou léčbu pacientů monoklonální protilátkou proti TNF $\alpha$ , infliximabem. Jak jsem již zmínila v kapitole 2.1.6, mechanismus působení infliximabu je dvojitý: inhibice TNF $\alpha$  a indukce apoptózy T buněk. Infliximab spouští cytolýzu T lymfocytů pouze v místě aktivního zánětu a ne u cirkulujících imunokompetentních buněk (Špičák *et al*, 2008), což je tedy pravděpodobně jeho hlavním účinkem a přínosem léčby.

### 5.1.3 Protektivní efekt p.381Gln v genu *IL23R*

V případě polymorfizmu p.Arg381Gln v genu *IL23R* dosud nebyla publikována evropská či americká studie, která by nepotvrzovala ochranný vliv p.381Gln na CD. Dokazuje to tedy velký přínos celogenomových asociačních studií pro studium genetického podkladu CD, protože SNP p.Arg381Gln byl jako jeden z prvních polymorfizmů detekovaný touto recentní metodou (Duerr *et al*, 2006).

I v této studii se glutaminová alela vyskytovala signifikantně častěji u kontrolního souboru než u pacientů s CD. Nejpodobnější alelické frekvence minoritní alely jsme našli mezi naší a skotskou studií s 239 pacienty diagnostikovanými do 17 let věku (Česká republika: 3,2% u případů vs. 5,5% u kontrol; Skotsko: 3,0% vs. 5,5%) (Van Limbergen *et al*, 2007a). Z našich okolních států byl vliv p.381Gln testován pouze v sousedním Německu (stejně jako u ostatních studovaných SNP v této práci). Ve skupině pacientů s CD (304) z berlínského centra Charité byla alelická frekvence glutaminové alely 4,4%, u kontrol (384) pak 6,0% (Buning *et al*, 2007). Druhá německá studie čítající 833 pacientů s CD zjistila alelickou frekvenci pro p.381Gln 3,0% u případů a 6,8% u kontrol (Glas *et al*, 2007).

Námi zjištěný ochranný vliv glutaminové alely vyjádřený poměrem šancí je v porovnání s dosud publikovanými pracemi nejnižší (OR = 0,56 vs. např. OR = 0,43 v německé studii (Glas *et al*, 2007)). Rozdíly jsou ale minimální.

#### **5.1.4 Slabá asociace p.197Ala v genu *ATG16L1***

U rizikové majoritní varianty p.197Ala rovněž objevené díky celogenomovému screeningu (Hampe *et al*, 2007) již byla publikována italská a brazilská studie zaměřující její asociaci v těchto populacích s CD (Baptista *et al*, 2008; Perricone *et al*, 2008). I když v našem souboru byla alaninová alela více zastoupena u pacientů než u zdravých jedinců, fenotypická frekvence statisticky významného rozdílu nedosáhla ( $p = 0,095$ ). Jelikož velikost našeho souboru není menší než v jiných studiích potvrzující kauzalitu p.197Ala a jelikož vliv této varianty není modifikován polymorfizmy v genu *CARD15*, předpokládáme, že p.197Ala nemá na rozvoj CD v české populaci velký vliv.

#### **5.2 Interakce s *CARD15***

Zjišťovali jsme, zda studované varianty v genech *TNFA*, *IL23R* a *ATG16L1* určitým způsobem interagují s rizikovými alelami v genu *CARD15*. Zda například nepřítomnost c.3020insC, p.908Arg a p.702Trp zvyšuje pravděpodobnost výskytu g.-308A, p.381Gln nebo p.197Ala, nebo zda se naopak rizikové varianty vyskytují u pacientů s CD společně.

Po stratifikaci našeho souboru případů a kontrol na základě přítomnosti či nepřítomnosti alespoň jedné rizikové alely v genu *CARD15* jsme zjistili, že se jednotlivé varianty podílí na vzniku CD samostatně. Nezávislý efekt SNP v genech *CARD15* a *TNFA* potvrdily i jiné studie (Ferreira *et al*, 2005).

Podobně jako v naší skupině případů a kontrol nebyla většinou studií detekována interakce p.381Gln s variantami v genu *CARD15* (např. Borgiani *et al*, 2007; Tremelling *et al*, 2007). Studie Roberts *et al* detekovala asociaci mezi rizikovým genotypem Arg / Arg v genu *IL23R* a CD na podkladě nepřítomnosti žádné rizikové varianty v genu *CARD15* (Roberts *et al*, 2007). To by znamenalo, že p.381Arg je rizikovým faktorem pro vznik CD, pokud se v genomu jedince nevyskytuje žádná z variant c.3020insC, p.908Arg a p.702Trp.

I poslední studovaný polymorfismus p.197Ala v genu *ATG16L1* se u české kohorty na vzniku CD podílí samostatně. Nezávislost této varianty potvrdili ve svých pracích i např. Prescott *et al* (2007) a Cummings *et al* (2007b). Na druhé straně Van Limbergen

*et al* zjistili ve své skupině pacientů diagnostikovaných CD v dospělosti, že ti, kteří nenesou žádnou rizikovou variantu v genu *CARD15*, mají vyšší frekvenci výskytu rizikové alaninové alely v genu *ATG16L1* než nositelé alespoň jednoho asociovaného SNP v genu *CARD15* (Van Limbergen *et al*, 2008).

Neprokázání interakce většinou asociačních studií je důsledkem její nepřítomnosti nebo důsledkem velikosti souboru. Pro detekci statisticky významné interakce je nutný velký soubor případů a kontrol. V případě studia varianty p.381Gln v genu *IL23R* je rovněž problémem velmi nízká frekvence výskytu této varianty u případů i kontrolních subjektů (pohybuje okolo 6,8% ve zdravé populaci – dle vzorové kohorty reprezentující populaci v mezinárodním Hap-Map projektu: [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Studie tak nemají dostatečnou sílu možné epistáze nalézt (Van Limbergen *et al*, 2007a).

### **5.3 Genotypo-fenotypová analýza**

#### **5.3.1 Vliv c.3020insC na věk v době diagnózy**

Jak se již výše v kapitole 2.2.2.3 zmiňuji, u pacientů diagnostikovaných v ranném věku se předpokládá významnější vliv genetických faktorů než u pacientů diagnostikovaných v dospělosti.

V souboru českých pacientů s CD jsme našli statisticky významný vliv c.3020insC na věk v době diagnózy. Pacienti, kteří ve svém genomu nesli tuto variantu, byli diagnostikováni dříve než pacienti bez ní. Kohortu případů jsme rozdělili na pacienty diagnostikované do 18 let věku včetně a pacienty diagnostikované v 19 letech a později. Jistá nesourodost panuje v určení hranice mezi dvěma porovnávanými straty. Některé studie porovnávaly rizikovitost variant v genu *CARD15* s průměrným věkem v době diagnózy, což nemusí být vždy správný postup z důvodu distribuce věku v době diagnózy. Někteří autoři používali věkové rozhraní 40 let (podle tzv. Vídeňské klasifikace) (De Diego *et al*, 2006), 20 let (Cukovic-Cavka *et al*, 2006) nebo kvartily (Arnott *et al*, 2004). Přesto nebo právě proto ale prokázali kauzální vliv c.3020insC na věk v době diagnózy.

Naopak několik asociačních studií s dostatečnou silou detekovat asociaci polymorfizmu c.3020insC s věkem v době diagnózy tuto asociaci neidentifikovalo a to u pacientů diagnostikovaných do 18 let a později (Tomer *et al*, 2003; Leshinsky-Silver *et al*, 2005) respektive do 16 let a později (Weiss *et al*, 2004). Dokládá to, že efekt c.3020insC na věk v době diagnózy CD neplatí obecně.

Z obrázku 16 je patrné, že alelické frekvence inserce cytozinu v pozici 3020 kódujícího řetězce DNA se v rámci evropských populací významně odlišují. Tato variance může být ještě výraznější u pacientů s CD diagnostikovaných v dětském nebo pubertálním věku. A skutečně, v německé kohortě pacientů s CD diagnostikovaných do 18 let byla zjištěna alelická frekvence c.3020insC 26% (Sun *et al*, 2003), naproti tomu švédská práce detekovala alelickou frekvenci této varianty u pacientů diagnostikovaných do 18 let pouze 1,7% (Idestrom *et al*, 2005).

Zjištěná alelická frekvence c.3020insC v naší skupině pacientů diagnostikovaných do 18 let dosáhla vysoké hodnoty 42,3%. Bohužel porovnání s podobně stratifikovanými kohortami ze sousedních států není možné, protože kromě Německa tato data nejsou k dispozici.

### **5.3.2 Vliv ostatních variant na věk v době diagnózy**

U dalších testovaných variant v rámci této práce jsme jejich vliv na věk v době diagnózy neprokázali. Toto zjištění je ve shodě s většinou dosud publikovaných prací. V případě varianty p.381Gln v genu *IL23R* byl nalezen určitý trend pro časnější věk v době diagnózy (viz 2.2.4.3) (Leshinsky-Silver *et al*, 2007).

Z výsledků naší studie tedy vyplývá, že pouze c.3020insC v genu *CARD15* ovlivňuje věk v době diagnózy. Další polymorfizmy jsou na věku nezávislé.

### **5.3.3 Asociace SNP s místem postižení**

#### **5.3.3.1 Vliv SNP v genu *CARD15***

Ve shodě s většinou předchozích studií jsme i u českých pacientů s CD potvrdili asociaci c.3020insC v genu *CARD15* s postižením tenkého střeva (OR pro L1 + L3 = 5,53; 95%CI 2,11 – 18,31). Rovněž při porovnání pacientů s aspoň jednou rizikovou variantou v genu *CARD15* dosáhla asociace L1 + L3 statistické významnosti (OR = 3,1; 95%CI 1,59 – 6,05). Tento nálezn také vysvětluje trend, který je zřetelný u p.702Trp a postižení tenkého střeva (p = 0,17). Pro samostatné postižení terminálního ilea (L1) však asociace statistické významnosti nedosáhla (p = 0,39 pro c.3020insC). Předpokládáme, že důvodem může být menší počet pacientů s tímto typem postižení (21,3% pro L1 vs. 65,5% pro L3).

Spojenou nádobou se zde diskutovanou souvislostí variant v genu *CARD15* a zvýšeného rizika postižení tenkého střeva je nález ochranného vlivu c.3020insC (OR =



0,20; 95%CI 0,06 – 0,52) potažmo přítomnosti jakékoli rizikové varianty v genu *CARD15* (OR = 0,36; 95%CI 0,18 – 0,70) na postižení tlustého střeva (L2 ± L4).

### 5.3.3.2 Vliv p.381Gln *IL23R*

Zjistili jsme, že žádný z pacientů s postižením horního gastrointestinálního traktu zařazený do této studie nenesl ve svém genomu protektivní glutaminovou alelu v genu *IL23R*. Touto problematikou se dosud žádná práce podrobněji nezabývala. Ovšem ve dvou publikovaných studiích se také vyskytovali pacienti s postižením horní části trávicí trubice bez zmiňované alely (Glas *et al*, 2007; Leshinsky-Silver *et al*, 2007). Rozdíly mezi nositeli glutaminové alely a těmi kdo danou variantu nemají, byly minimální (0% vs. 2,8% u izraelské kohorty pacientů diagnostikovaných do 18 let; 0% vs. 0,7% v německé skupině) v porovnání s našimi zjištěnými frekvencemi u pacientů trpících postižením horního GIT: 0% vs. 16,8%. Při srovnání všech dostupných dat z publikovaných genotypo-fenotypových analýz je rozdíl přítomnosti a nepřítomnosti p.381Gln u pacientů s lokalizací postižení v horní části zažívacího traktu rovněž viditelný: 2 nositelé glutaminové alely z 37 vs. 35 z 37 bez ní (Borgiani *et al*, 2007; Glas *et al*, 2007; Leshinsky-Silver *et al*, 2007). Po přidání dat z naší studie se pak rozdíl ještě prohloubí: 2 z 93 s p.381Gln vs. 91 z 93 bez ní. Ovšem porovnání pacientů s postižením horní části trávicího traktu a bez něj na základě přítomnosti či nepřítomnosti protektivní alely p.381Gln v těchto studiích signifikantní rozdíl nepřineslo ( $p = 0,828$ ). Rovněž po zařazení našich dat do statistického výpočtu nebyla hladina významnosti překročena ( $p = 0,172$ ). Za zmínku stojí i to, že několik studií do své genotypo-fenotypové analýzy postižení horního gastrointestinálního traktu vůbec nezařadilo (Roberts *et al*, 2007; Tremelling *et al*, 2007), takže informace není kompletní.

Většina studií zabývajících se funkcí produktu genu *IL23R* v patogenezi CD se zaměřuje pouze na oblast střev, takže přesná funkce receptoru pro interleukin 23 v oblasti dvanáctníku, žaludku, jícnu nebo i dutiny ústní zůstává nejasná. Náš výsledek by indikoval, že v této oblasti trávicího traktu je role receptoru pro IL-23 poněkud odlišná. Je tedy nutný hlubší výzkum zaměřený na patogenezi horního gastrointestinálního traktu u pacientů s CD.

### 5.3.4 Vliv SNP na další klinické charakteristiky

Testování dalších fenotypových charakteristik, jako je chování CD, přítomnost extraintestinálních manifestací nebo nutnost operace, detekci signifikantní asociace nepřineslo. Hraniční p hodnotu jsme zjistili pro perianální postižení (B4) a přítomnost varianty c.3020insC. Tato varianta má ochranný efekt na perianální postižení, když 27 (8,1%) pacientů s touto diagnózou mělo ve svém genomu inzerci cytozinu v pozici 3020 a 82 (24,6%) nikoliv. Podobný trend zaznamenali ve své studii Ahmad *et al* (2002), i když ne tak výrazný.

I přesto, že česká studie Sýkory *et al* (2006) na pacientech CD diagnostikovaných do 18 let neprokázala stejně jako tato práce signifikantní asociaci g.-308A v genu *TNFA*, našla souvislost mezi touto variantou a závažnější formou nemoci (fistulující, tzn. penetrující formou:  $p < 0,001$ ). Toto zjištění jsme však nepotvrdili a to jak v celé kohortě případů (OR = 1,08; 95%CI 0,56 – 2,06) tak pouze ve skupině pacientů diagnostikovaných do 18 let (OR = 1,52; 95%CI 0,56 – 4,14). Vzhledem k velikosti našeho souboru v porovnání se skupinou testovanou Sýkorou *et al* je asociace rizikového polymorfizmu v promotorové oblasti genu *TNFA* s penetrující formou CD v české populaci sporná.

Ačkoli jsme detekovali slabou asociaci mezi CD v české populaci a p.197A1a, tato varianta neprokázala žádný signifikantní vztah s jakoukoliv klinickou charakteristikou. Předpokládáme tedy, že *ATG16L1* představuje v české populaci obecný rizikový faktor pro vznik CD bez spojitosti s fenotypovým projevem.

## 6. Závěr

Ve studii, která je podkladem této diplomové práce, jsme se zabývali studiem genetické asociace šesti jednonukleotidových polymorfizmů s Crohnovou chorobou. Kauzalitu variant c.3020insC, p.Gly908Arg, p.Arg702Trp v genu *CARD15*, g.-308G>A v genu *TNFA*, p.Arg381Gln v genu *IL23R* a p.Ala197Thr v genu *ATG16L1* jsme testovali na souboru čítajícím 333 pacientů s diagnózou Crohnovy choroby a 499 zdravých kontrolních jedinců. Tato studie přinesla první rozsáhlejší data týkající se genetického pozadí Crohnovy choroby v české populaci.

Zjistili jsme, že přítomnost inserce cytozinu v pozici 3020 na kódujícím řetězci DNA v genu *CARD15* a substituce argininu za glycin v pozici 908. aminokyseliny v produktu genu *CARD15* signifikntně zvyšuje riziko vzniku CD v české populaci. Statisticky významný efekt substituce tryptofanu za arginin v pozici 702. aminokyseliny v produktu genu *CARD15* je patrný pouze po adjustaci na zbylé dva polymorfizmy v rámci genu. Minoritní glutaminová alela p.381Gln v genu *IL23R* má ochranný vliv na vznik CD, když se v testovaném souboru vyskytovala častěji u zdravých osob než u pacientů s CD. V souboru českých případů a kontrol jsme rovněž prokázali vliv varianty p.197Ala na vznik CD.

Polymorfizmus c.3020insC v genu *CARD15* statisticky významně ovlivňuje u pacientů s CD jejich věk v době diagnózy. Ti, kteří ve svém genomu nesou tuto variantu, jsou diagnostikováni v časnějším věku než ti, kteří c.3020insC nemají. U jiných SNP jsme asociaci s věkem v době diagnózy v české kohortě pacientů s CD nedetekovali. Zvýšené riziko postižení tenkého střeva a naopak ochranný vliv na postižení tlustého střeva je dalším efektem c.3020insC.

Přítomnost glutaminové alely v genu *IL23R* má u českých pacientů s CD protektivní vliv na postižení horního gastrointestinálního traktu (tzn. postižení dvanáctníku, žaludku, jícnu nebo dutiny ústní), když žádný z pacientů s tímto typem postižení ve své genetické výbavě p.381Gln nenesl. Toto zjištění dosud nebylo v zahraniční literatuře popsáno. Je proto nutné jeho další zkoumání.

Znalost genetického pozadí multifaktoriálních onemocnění, mezi které patří Crohnova choroba, je důležité pro lepší porozumění její patogenezi a etiologii, což je možné dále využívat k efektivnější léčbě tohoto závažného onemocnění. Identifikace kauzálních variant rovněž umožní nalézt osoby s predispozicí ke Crohnově chorobě a bude tak možné studovat mechanismy patogeneze v ranném stádiu nemoci. Poznatky

z tohoto studia pak mohou být využity v nových léčebných postupech nebo dokonce v předcházení vzniku CD u jedinců s genetickou predispozicí (Duerr, 1996).

## **7. Přílohy**

### ***7.1 Původní článek 1***

### ***7.2 Původní článek 2***

## 8. Seznam použité literatury

- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J., Gurney, A. L. (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." *J Biol Chem* **278**(3): 1910-4.
- Ahmad, T., Armuzzi, A., Bunce, M., Mulcahy-Hawes, K., Marshall, S. E., Orchard, T. R., Crawshaw, J., Large, O., de Silva, A., Cook, J. T., Barnardo, M., Cullen, S., Welsh, K. I., Jewell, D. P. (2002). "The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease." *Gastroenterology* **122**(4): 854-66.
- Ahmad, T., Marshall, S. E., Jewell, D. (2006). "Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex." *World J Gastroenterol* **12**(23): 3628-35.
- Allen-Brady, K., Farnham, J. M., Weiler, J., Camp, N. J. (2003). "A cautionary note on the appropriateness of using a linkage resource for an association study." *BMC Genet* **4 Suppl 1**: S89.
- Arnott, I. D., Nimmo, E. R., Drummond, H. E., Fennell, J., Smith, B. R., MacKinlay, E., Morecroft, J., Anderson, N., Kelleher, D., O'Sullivan, M., McManus, R., Satsangi, J. (2004). "NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe?" *Genes Immun* **5**(5): 417-25.
- Babusukumar, U., Wang, T., McGuire, E., Broeckel, U., Kugathasan, S. (2006). "Contribution of OCTN variants within the IBD5 locus to pediatric onset Crohn's disease." *Am J Gastroenterol* **101**(6): 1354-61.
- Baldassano, R. N., Bradfield, J. P., Monos, D. S., Kim, C. E., Glessner, J. T., Casalunovo, T., Frackelton, E. C., Otieno, F. G., Kanterakis, S., Shaner, J. L., Smith, R. M., Eckert, A. W., Robinson, L. J., Onyiah, C. C., Abrams, D. J., Chiavacci, R. M., Skraban, R., Devoto, M., Grant, S. F., Hakonarson, H. (2007a). "Association of the T300A non-synonymous variant of the ATG16L1 gene with susceptibility to paediatric Crohn's disease." *Gut* **56**(8): 1171-3.
- Baldassano, R. N., Bradfield, J. P., Monos, D. S., Kim, C. E., Glessner, J. T., Casalunovo, T., Frackelton, E. C., Otieno, F. G., Kanterakis, S., Shaner, J. L., Smith, R. M., Eckert, A. W., Robinson, L. J., Onyiah, C. C., Abrams, D. J., Chiavacci, R. M., Skraban, R., Devoto, M., Grant, S. F., Hakonarson, H. (2007b). "Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with

- susceptibility to pediatric Crohn's disease." Clin Gastroenterol Hepatol **5**(8): 972-6.
- Balding, D. J. (2006). "A tutorial on statistical methods for population association studies." Nat Rev Genet **7**(10): 781-91.
- Baptista, M. L., Amarante, H., Picheth, G., Sdepanian, V. L., Peterson, N., Babasukumar, U., Lima, H. C., Kugathasan, S. (2008). "CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population." Inflamm Bowel Dis.
- Beattie, R. M., Croft, N. M., Fell, J. M., Afzal, N. A., Heuschkel, R. B. (2006). "Inflammatory bowel disease." Arch Dis Child **91**(5): 426-32.
- Bencko, V., K. Hrach, M. Malý, H. Pikhart, J. Reissigová, Š. Svačina, M. Tomečková, J. Zvárová (2003). Statistické metody v epidemiologii. Praha, Karolinum.
- Biank, V., Friedrichs, F., Babusukumar, U., Wang, T., Stoll, M., Broeckel, U., Kugathasan, S. (2007). "DLG5 R30Q variant is a female-specific protective factor in pediatric onset Crohn's disease." Am J Gastroenterol **102**(2): 391-8.
- Birrenbach, T., Bocker, U. (2004). "Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications." Inflamm Bowel Dis **10**(6): 848-59.
- Bland, J. M. (1995). An Introduction to Medical Statistics. New York, Oxford University Press Inc.
- Bland, J. M., Altman, D. G. (2000). "Statistics notes. The odds ratio." Bmj **320**(7247): 1468.
- Borgiani, P., Perricone, C., Ciccacci, C., Romano, S., Novelli, G., Biancone, L., Petruzzello, C., Pallone, F. (2007). "Interleukin-23R Arg381Gln is associated with susceptibility to Crohn's disease but not with phenotype in an Italian population." Gastroenterology **133**(3): 1049-51; author reply 1051-2.
- Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., Rahmouni, S., Nika, K., Rostamkhani, M., MacMurray, J., Meloni, G. F., Lucarelli, P., Pellecchia, M., Eisenbarth, G. S., Comings, D., Mustelin, T. (2004). "A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes." Nat Genet **36**(4): 337-8.
- Bouma, G., Strober, W. (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **3**(7): 521-33.
- Browning, B. L., Annese, V., Barclay, M. L., Bingham, S. A., Brand, S., Buning, C., Castro, M., Cucchiara, S., Dallapiccola, B., Drummond, H., Ferguson, L. R.,

- Ferraris, A., Fisher, S. A., Gearry, R. B., Glas, J., Henckaerts, L., Huebner, C., Knafelz, D., Lakatos, L., Lakatos, P. L., Latiano, A., Liu, X., Mathew, C., Muller-Myhsok, B., Newman, W. G., Nimmo, E. R., Noble, C. L., Palmieri, O., Parkes, M., Petermann, I., Rutgeerts, P., Satsangi, J., Shelling, A. N., Siminovitch, K. A., Torok, H. P., Tremelling, M., Vermeire, S., Valvano, M. R., Witt, H. (2008). "Gender-stratified analysis of DLG5 R30Q in 4707 patients with Crohn disease and 4973 controls from 12 Caucasian cohorts." J Med Genet **45**(1): 36-42.
- Buning, C., Genschel, J., Buhner, S., Kruger, S., Kling, K., Dignass, A., Baier, P., Bochow, B., Ockenga, J., Schmidt, H. H., Lochs, H. (2004). "Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation." Aliment Pharmacol Ther **19**(10): 1073-8.
- Buning, C., Lochs, H. (2006). "Conventional therapy for Crohn's disease." World J Gastroenterol **12**(30): 4794-806.
- Buning, C., Schmidt, H. H., Molnar, T., De Jong, D. J., Fiedler, T., Buhner, S., Sturm, A., Baumgart, D. C., Nagy, F., Lonovics, J., Drenth, J. P., Landt, O., Nickel, R., Buttner, J., Lochs, H., Witt, H. (2007). "Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers a protective effect not only against Crohn's disease but also ulcerative colitis." Aliment Pharmacol Ther **26**(7): 1025-33.
- Canavan, C., Abrams, K. R., Mayberry, J. F. (2007). "Meta-analysis: mortality in Crohn's disease." Aliment Pharmacol Ther **25**(8): 861-70.
- Canto, E., Ricart, E., Busquets, D., Monfort, D., Garcia-Planella, E., Gonzalez, D., Balanzo, J., Rodriguez-Sanchez, J. L., Vidal, S. (2007). "Influence of a nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) polymorphism and NOD2 mutant alleles on Crohn's disease phenotype." World J Gastroenterol **13**(41): 5446-53.
- Chamberlin, W. M., Naser, S. A. (2006). "Integrateing theories of the etiology of Crohn's disease. On the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses." Med Sci Monit **12**(2): RA27-33
- Cloutier, J. F., Veillette, A. (1996). "Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells." Embo J **15**(18): 4909-18.
- Cloutier, J. F. , Veillette, A. (1999). "Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase." J Exp Med **189**(1): 111-21.



- Crichton, N. (2001). "Information Point: Odds Ratio." J Clin Nurs **10**: 268-9.
- Cucchiara, S., Latiano, A., Palmieri, O., Canani, R. B., D'Inca, R., Guariso, G., Vieni, G., De Venuto, D., Riegler, G., De'Angelis, G. L., Guagnozzi, D., Bascietto, C., Miele, E., Valvano, M. R., Bossa, F., Annese, V. (2007a). "Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease." J Pediatr Gastroenterol Nutr **44**(2): 171-9.
- Cucchiara, S., Latiano, A., Palmieri, O., Staiano, A. M., D'Inca, R., Guariso, G., Vieni, G., Rutigliano, V., Borrelli, O., Valvano, M. R., Annese, V. (2007b). "Role of CARD15, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel diseases." World J Gastroenterol **13**(8): 1221-9.
- Cukovic-Cavka, S., Vermeire, S., Hrstic, I., Claessens, G., Kolacek, S., Jakic-Razumovic, J., Krznaric, Z., Grubelic, K., Radic, D., Misak, Z., Jadresin, O., Rutgeerts, P., Vucelic, B. (2006). "NOD2/CARD15 mutations in Croatian patients with Crohn's disease: prevalence and genotype-phenotype relationship." Eur J Gastroenterol Hepatol **18**(8): 895-9.
- Cummings, J. R., Ahmad, T., Geremia, A., Beckly, J., Cooney, R., Hancock, L., Pathan, S., Guo, C., Cardon, L. R., Jewell, D. P. (2007a). "Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype." Inflamm Bowel Dis **13**(9): 1063-8.
- Cummings, J. R., Cooney, R., Pathan, S., Anderson, C. A., Barrett, J. C., Beckly, J., Geremia, A., Hancock, L., Guo, C., Ahmad, T., Cardon, L. R., Jewell, D. P. (2007b). "Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene." Inflamm Bowel Dis **13**(8): 941-6.
- Danze, P. M., Colombel, J. F., Jacquot, S., Loste, M. N., Heresbach, D., Ategbo, S., Khamassi, S., Perichon, B., Semana, G., Charron, D., Cezard, J. P. (1996). "Association of HLA class II genes with susceptibility to Crohn's disease." Gut **39**(1): 69-72.
- Darriavach, P., Mattei, M. G., Golstein, P., Lefranc, M. P. (1988). "Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains." Eur J Immunol **18**(12): 1901-5.
- De Diego, C., Alcantara, M., Valle, J., Perez-Grueso, M. J., Munoz-Rosas, C., Carrobes, J. M., Martinez-Castro, P. (2006). "Frequency of CARD15

- polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: genotype-phenotype correlation." Genet Test **10**(3): 178-85.
- de Ridder, L., Weersma, R. K., Dijkstra, G., van der Steege, G., Benninga, M. A., Nolte, I. M., Taminiau, J. A., Hommes, D. W., Stokkers, P. C. (2007). "Genetic susceptibility has a more important role in pediatric-onset Crohn's disease than in adult-onset Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **13**(9): 1083-92.
- Dítě, P. (2001). "Nejčastější zánětlivá střevní onemocnění." Interní medicína pro praxi **10**: 451-454.
- Dubinsky, M. C., Wang, D., Picornell, Y., Wrobel, I., Katzir, L., Quiros, A., Dutridge, D., Wahbeh, G., Silber, G., Bahar, R., Mengesha, E., Targan, S. R., Taylor, K. D., Rotter, J. I. (2007). "IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **13**(5): 511-5.
- Duerr, R. H. (1996). "Genetics of Inflammatory Bowel Disease." Inflamm Bowel Dis **2**(1): 48-60.
- Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., Steinhardt, A. H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L. W., Kistner, E. O., Schumm, L. P., Lee, A. T., Gregersen, P. K., Barmada, M. M., Rotter, J. I., Nicolae, D. L., Cho, J. H. (2006). "A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene." Science **314**(5804): 1461-3.
- Eckmann, L. (2004). "Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine." Curr Opin Gastroenterol **20**(2): 82-8.
- Economou, M., Filis, G., Tsianou, Z., Alamanos, J., Kogevinas, A., Masalas, K., Petrou, A., Tsianos, E. V. (2007). "Crohn's disease incidence evolution in North-western Greece is not associated with alteration of NOD2/CARD15 variants." World J Gastroenterol **13**(38): 5116-20.
- Economou, M., Trikalinos, T. A., Loizou, K. T., Tsianos, E. V., Ioannidis, J. P. (2004). "Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis." Am J Gastroenterol **99**(12): 2393-404.
- Einarsdottir, E., Soderstrom, I., Lofgren-Burstrom, A., Haraldsson, S., Nilsson-Ardnor, S., Penha-Goncalves, C., Lind, L., Holmgren, G., Holmberg, M., Asplund, K., Holmberg, D. (2003). "The CTLA4 region as a general autoimmunity factor: an extended pedigree provides evidence for synergy with the HLA locus in the

- etiology of type 1 diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease." Eur J Hum Genet **11**(1): 81-4.
- Esters, N., Pierik, M., van Steen, K., Vermeire, S., Claessens, G., Joossens, S., Vlietinck, R., Rutgeerts, P. (2004). "Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease." Am J Gastroenterol **99**(2): 299-305.
- Ferraris, A., Torres, B., Knafelz, D., Barabino, A., Lionetti, P., de Angelis, G. L., Iacono, G., Papadatou, B., D'Amato, G., Di Ciommo, V., Dallapiccola, B., Castro, M. (2006). "Relationship between CARD15, SLC22A4/5, and DLG5 polymorphisms and early-onset inflammatory bowel diseases: an Italian multicentric study." Inflamm Bowel Dis **12**(5): 355-61.
- Ferreira, A. C., Almeida, S., Tavares, M., Canedo, P., Pereira, F., Regalo, G., Figueiredo, C., Trindade, E., Seruca, R., Carneiro, F., Amil, J., Machado, J. C., Tavarela-Veloso, F. (2005). "NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **11**(4): 331-9.
- Fowler, E. V., Eri, R., Hume, G., Johnstone, S., Pandeya, N., Lincoln, D., Templeton, D., Radford-Smith, G. L. (2005). "TNFalpha and IL10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease." J Med Genet **42**(6): 523-8.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., Fujiyama, Y. (2003). "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." Gut **52**(1): 65-70.
- Gasche, C., Scholmerich, J., Brynskov, J., D'Haens, G., Hanauer, S. B., Irvine, E. J., Jewell, D. P., Rachmilewitz, D., Sachar, D. B., Sandborn, W. J., Sutherland, L. R. (2000). "A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998." Inflamm Bowel Dis **6**(1): 8-15.
- Gazouli, M., Mantzaris, G., Archimandritis, A. J., Nasioulas, G., Anagnostou, N. P. (2005). "Single nucleotide polymorphisms of OCTN1, OCTN2, and DLG5 genes in Greek patients with Crohn's disease." World J Gastroenterol **11**(47): 7525-30
- Giachino, D., van Duist, M. M., Regazzoni, S., Gregori, D., Bardessono, M., Salacone, P., Scaglione, N., Sostegni, R., Sapone, N., Bresso, F., Sambataro, A., Gaia, E., Pera, A., Astegiano, M., De Marchi, M. (2004). "Analysis of the CARD15

- variants R702W, G908R and L1007fs in Italian IBD patients." Eur J Hum Genet **12**(3): 206-12.
- Glas, J., Seiderer, J., Wetzke, M., Konrad, A., Torok, H. P., Schmechel, S., Tonenchi, L., Grassl, C., Dambacher, J., Pfennig, S., Maier, K., Griga, T., Klein, W., Epplen, J. T., Schiemann, U., Folwaczny, C., Lohse, P., Goke, B., Ochsenkuhn, T., Muller-Myhsok, B., Folwaczny, M., Mussack, T., Brand, S. (2007). "rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants." PLoS ONE **2**(9): e819.
- Gough, S. C., Walker, L. S., Sanson, D. M. (2005). "CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity." Immunol Rev **204**: 102-15.
- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., Deretic, V. (2004). "Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages." Cell **119**(6): 753-66.
- Hampe, J., Schreiber, S., Shaw, S. H., Lau, K. F., Bridger, S., Macpherson, A. J., Cardon, L. R., Sakul, H., Harris, T. J., Buckler, A., Hall, J., Stokkers, P., van Deventer, S. J., Nurnberg, P., Mirza, M. M., Lee, J. C., Lennard-Jones, J. E., Mathew, C. G., Curran, M. E. (1999a). "A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort." Am J Hum Genet **64**(3): 808-16.
- Hampe, J., Shaw, S. H., Saiz, R., Leysens, N., Lantermann, A., Mascheretti, S., Lynch, N. J., MacPherson, A. J., Bridger, S., van Deventer, S., Stokkers, P., Morin, P., Mirza, M. M., Forbes, A., Lennard-Jones, J. E., Mathew, C. G., Curran, M. E., Schreiber, S. (1999b). "Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p." Am J Hum Genet **65**(6): 1647-55.
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F. M., Briggs, J., Gunther, S., Prescott, N. J., Onnie, C. M., Hasler, R., Sipos, B., Folsch, U. R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C. G., Krawczak, M., Schreiber, S. (2007). "A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1." Nat Genet **39**(2): 207-11.
- Helio, T., Halme, L., Lappalainen, M., Fodstad, H., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Farkkila, M., Krusius, T., Kontula, K. (2003). "CARD15/NOD2 gene variants

- are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease." Gut **52**(4): 558-62.
- Hendrickson, B. A., Gokhale, R., Cho, J. H. (2002). "Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease." Clin Microbiol Rev **15**(1): 79-94.
- Heresbach, D., Gicquel-Douabin, V., Birebent, B., D'Halluin P, N., Heresbach-Le Berre, N., Dreano, S., Siproudhis, L., Dabadie, A., Gosselin, M., Mosser, J., Semana, G., Bretagne, J. F., Yaouanq, J. (2004). "NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype- phenotype analysis." Eur J Gastroenterol Hepatol **16**(1): 55-62.
- Hildebrand, H., Finkel, Y., Grahnquist, L., Lindholm, J., Ekblom, A., Askling, J. (2003). "Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001." Gut **52**(10): 1432-4.
- Hisamatsu, T., Suzuki, M., Podolsky, D. K. (2003). "Interferon-gamma augments CARD4/NOD1 gene and protein expression through interferon regulatory factor-1 in intestinal epithelial cells." J Biol Chem **278**(35): 32962-8.
- Hradsky, O., Lenicek, M., Dusatkova, P., Bronsky, J., Nevoral, J., Valtrova, V., Kotalova, R., Szitanyi, P., Petro, R., Starzykova, V., Bortlik, M., Vitek, L., Lukas, M., Cinek, O. (2008). "Variants of CARD15, TNFA and PTPN22 and susceptibility to Crohn's disease in the Czech population: high frequency of the CARD15 1007fs." Tissue Antigens in press.
- Hugot, J. P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J. M., Lee, J. C., Beaugerie, L., Naom, I., Dupas, J. L., Van Gossum, A., Orholm, M., Bonaiti-Pellie, C., Weissenbach, J., Mathew, C. G., Lennard-Jones, J. E., Cortot, A., Colombel, J. F., Thomas, G. (1996). "Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16." Nature **379**(6568): 821-3.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., Thomas, G. (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 599-603.
- IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. (2005). "Inflammatory bowel disease in children and

- adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria." J Pediatr Gastroenterol Nutr **41**(1): 1-7.
- Idestrom, M., Rubio, C., Granath, F., Finkel, Y., Hugot, J. P. (2005). "CARD15 mutations are rare in Swedish pediatric Crohn disease." J Pediatr Gastroenterol Nutr **40**(4): 456-60.
- Inohara, N., Nunez, G. (2003). "NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis." Nat Rev Immunol **3**(5): 371-82.
- Inoue, N., Tamura, K., Kinouchi, Y., Fukuda, Y., Takahashi, S., Ogura, Y., Inohara, N., Nunez, G., Kishi, Y., Koike, Y., Shimosegawa, T., Shimoyama, T., Hibi, T. (2002). "Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease." Gastroenterology **123**(1): 86-91.
- Iwakura, Y., Ishigame, H. (2006). "The IL-23/IL-17 axis in inflammation." J Clin Invest **116**(5): 1218-22.
- Janowitz, H. D. (2000). "Burill B. Crohn (1884-1983)." Mt Sinai J Med **67**(1): 12-13.
- Jirásek, V., M. Brodanová, Z. Mareček (2002). Gastroenterologie a hepatologie. Praha, Karolinum.
- Klionsky, D. J., Emr, S. D. (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." Science **290**(5497): 1717-21.
- Knapp, R. G., M.C. Miller (1992). Clinical Epidemiology and Biostatistics. Baltimore, Maryland, Williams & Wilkins.
- Kocsis, A. K., Lakatos, P. L., Somogyvari, F., Fuszek, P., Papp, J., Fischer, S., Szamosi, T., Lakatos, L., Kovacs, A., Hofner, P., Mandi, Y. (2007). "Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with Crohn's disease." Scand J Gastroenterol: 1-9.
- Kolls, J. K., Linden, A. (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." Immunity **21**(4): 467-76.
- Komatsu, M., Kobayashi, D., Saito, K., Furuya, D., Yagihashi, A., Araake, H., Tsuji, N., Sakamaki, S., Niitsu, Y., Watanabe, N. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR." Clin Chem **47**(7): 1297-301.
- Kucharzik, T., Maaser, C., Luger, A., Kagnoff, M., Mayer, L., Targan, S., Domschke, W. (2006). "Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies." Inflamm Bowel Dis **12**(11): 1068-83.

- Lakatos, P. L., Fischer, S., Lakatos, L., Gal, I., Papp, J. (2006). "Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ?" World J Gastroenterol **12**(12): 1829-41.
- Lakatos, P. L., Lakatos, L., Szalay, F., Willheim-Polli, C., Osterreicher, C., Tulassay, Z., Molnar, T., Reinisch, W., Papp, J., Mozsik, G., Ferenci, P. (2005). "Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations." World J Gastroenterol **11**(10): 1489-95.
- Lennard-Jones, J. E. (1989). "Classification of inflammatory bowel disease." Scand J Gastroenterol Suppl **170**: 2-6; discussion 16-9.
- Leshinsky-Silver, E., Karban, A., Buzhakor, E., Fridlander, M., Yakir, B., Eliakim, R., Reif, S., Shaul, R., Boaz, M., Lev, D., Levine, A. (2005). "Is age of onset of Crohn's disease governed by mutations in NOD2/caspase recruitment domains 15 and Toll-like receptor 4? Evaluation of a pediatric cohort." Pediatr Res **58**(3): 499-504.
- Leshinsky-Silver, E., Karban, A., Dalal, I., Eliakim, R., Shirin, H., Tzofi, T., Boaz, M., Levine, A. (2007). "Evaluation of the interleukin-23 receptor gene coding variant R381Q in pediatric and adult Crohn disease." J Pediatr Gastroenterol Nutr **45**(4): 405-8.
- Levine, A., Karban, A., Eliakim, R., Shaoul, R., Reif, S., Pacht, A., Wardi, J., Yakir, B., Silver, E. L. (2005). "A polymorphism in the TNF-alpha promoter gene is associated with pediatric onset and colonic location of Crohn's disease." Am J Gastroenterol **100**(2): 407-13.
- Lewis, C. M., Whitwell, S. C., Forbes, A., Sanderson, J., Mathew, C. G., Marteau, T. M. (2007). "Estimating risks of common complex diseases across genetic and environmental factors: the example of Crohn disease." J Med Genet **44**(11): 689-94.
- Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., Fouser, L. A. (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." J Exp Med **203**(10): 2271-9.
- Libioulle, C., Louis, E., Hansoul, S., Sandor, C., Farnir, F., Franchimont, D., Vermeire, S., Dewit, O., de Vos, M., Dixon, A., Demarche, B., Gut, I., Heath, S., Foglio,

- M., Liang, L., Laukens, D., Mni, M., Zelenika, D., Van Gossum, A., Rutgeerts, P., Belaiche, J., Lathrop, M., Georges, M. (2007). "Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4." PLoS Genet **3**(4): e58.
- Louis, E., Satsangi, J., Roussomoustakaki, M., Parkes, M., Fanning, G., Welsh, K., Jewell, D. (1996). "Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease." Gut **39**(5): 705-10.
- Lukáš, M. (1998). Idiopatické střevní záněty: nejistoty, současné znalosti a klinický přístup. Praha, Galén.
- Maeda, S., Hsu, L. C., Liu, H., Bankston, L. A., Iimura, M., Kagnoff, M. F., Eckmann, L., Karin, M. (2005). "Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing." Science **307**(5710): 734-8.
- Magyari, L., Farago, B., Bene, J., Horvatovich, K., Lakner, L., Varga, M., Figler, M., Gasztonyi, B., Mozsik, G., Melegh, B. (2007). "No association of the cytotoxic T-lymphocyte associated gene CTLA4 +49A/G polymorphisms with Crohn's disease and ulcerative colitis in Hungarian population samples." World J Gastroenterol **13**(15): 2205-8.
- Martin, M. C., Oliver, J., Urcelay, E., Orozco, G., Gomez-Garcia, M., Lopez-Nevot, M. A., Pinero, A., Brieva, J. A., de la Concha, E. G., Nieto, A., Martin, J. (2005). "The functional genetic variation in the PTPN22 gene has a negligible effect on the susceptibility to develop inflammatory bowel disease." Tissue Antigens **66**(4): 314-7.
- Mayberry, J. F., Rhodes, J. (1984). "Epidemiological aspects of Crohn's disease: a review of the literature." Gut **25**(8): 886-99.
- McGovern, D., Powrie, F. (2007). "The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD." Gut **56**(10): 1333-6.
- McGovern, D. P., Hysi, P., Ahmad, T., van Heel, D. A., Moffatt, M. F., Carey, A., Cookson, W. O., Jewell, D. P. (2005). "Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease." Hum Mol Genet **14**(10): 1245-50.
- Medici, V., Mascheretti, S., Croucher, P. J., Stoll, M., Hampe, J., Grebe, J., Sturniolo, G. C., Solberg, C., Jahnsen, J., Moum, B., Schreiber, S., Vatn, M. H. (2006). "Extreme heterogeneity in CARD15 and DLG5 Crohn disease-associated



- polymorphisms between German and Norwegian populations." Eur J Hum Genet **14**(4): 459-68.
- Mendoza, J. L., Murillo, L. S., Fernandez, L., Pena, A. S., Lana, R., Urcelay, E., Cruz-Santamaria, D. M., de la Concha, E. G., Diaz-Rubio, M., Garcia-Paredes, J. (2003). "Prevalence of mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn disease." Scand J Gastroenterol **38**(12): 1235-40.
- Mizushima, N., Noda, T., Ohsumi, Y. (1999). "Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway." Embo J **18**(14): 3888-96.
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., Yoshimori, T. (2004). "Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus." Science **306**(5698): 1037-40.
- Nakamura, H., Sudo, T., Tsuiki, H., Miyake, H., Morisaki, T., Sasaki, J., Masuko, N., Kochi, M., Ushio, Y., Saya, H. (1998). "Identification of a novel human homolog of the Drosophila dlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55." FEBS Lett **433**(1-2): 63-7.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stuber, E., Strober, W. (1995). "Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice." J Exp Med **182**(5): 1281-90.
- Noble, C. L., Nimmo, E. R., Drummond, H., Ho, G. T., Tenesa, A., Smith, L., Anderson, N., Arnott, I. D., Satsangi, J. "The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease." Gastroenterology **129**(6): 1854-64.
- O'Neill, L. A. (2004). "How NOD-ing off leads to Crohn disease." Nat Immunol **5**(8): 776-8.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., Sasakawa, C. (2005). "Escape of intracellular Shigella from autophagy." Science **307**(5710): 727-31.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G., Cho, J. H. (2001). "A

- frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 603-6.
- Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T. A., Chen, F. F., Zimmermann, E., Tretiakova, M., Cho, J. H., Hart, J., Greenson, J. K., Keshav, S., Nunez, G. (2003). "Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis." Gut **52**(11): 1591-7.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., Kastelein, R. A. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity **13**(5): 715-25.
- Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., Munz, C. (2005). "Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy." Science **307**(5709): 593-6.
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K. P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A. M., McClanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D. M., Kastelein, R. A., de Waal Malefyt, R., Moore, K. W. (2002). "A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R." J Immunol **168**(11): 5699-708.
- Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Beccchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., Romagnani, S. (1997). "Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease." Am J Pathol **150**(3): 823-32.
- Peltekova, V. D., Wintle, R. F., Rubin, L.A., Amos, C. I., Huang, Q., Gu, X., Newman, B., Van Oene, M., Cescon, D., Greenberg, G., Griffiths, A. M., St George-Hyslop, P. H., Siminovitch, K. A. (2004). "Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn's disease." Nat Genet **36**(5): 471-5.
- Perricone, C., Borgiani, P., Romano, S., Ciccacci, C., Fusco, G., Novelli, G., Biancone, L., Calabrese, E., Pallone, F. (2008). "ATG16L1 Ala197Thr is not associated with susceptibility to Crohn's disease or with phenotype in an Italian population." Gastroenterology **134**(1): 368-70.
- Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **347**(6): 417-29.

- Pozler, O., Malý, J., Bonová, O., Dědek, P., Fruhauf, P., Havlíčková, A., Janatová, T., Jimramovský, F., Klímová, L., Klusáček, D., Kocourková, D., Kolek, A., Kotalová, R., Marx, D., Nevoral, J., Petro, R., Petrů, O., Plašilová, I., Seidl, Z., Sekyrová, I., Semendřák, N., Schreierová, I., Staněk, J., Sýkora, J., Šuláková, A., Toukalková, L., Trávníčková, R., Volf, V., Zahradníček, L., Ženíšková, I. (2006). "Incidence of Crohn disease in the Czech Republic in the years 1990 to 2001 and assessment of pediatric population with inflammatory bowel disease." J Pediatr Gastroenterol Nutr **42**(2): 186-9.
- Prescott, N. J., Fisher, S. A., Onnie, C., Pattni, R., Steer, S., Sanderson, J., Forbes, A., Lewis, C. M., Mathew, C. G. (2005). "A general autoimmunity gene (PTPN22) is not associated with inflammatory bowel disease in a British population." Tissue Antigens **66**(4): 318-20.
- Prescott, N. J., Fisher, S. A., Franke, A., Hampe, J., Onnie, C. M., Soars, D., Bagnall, R., Mirza, M. M., Sanderson, J., Forbes, A., Mansfield, J. C., Lewis, C. M., Schreiber, S., Mathew, C. G. (2007). "A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5." Gastroenterology **132**(5): 1665-71.
- Quaglietta, L., te Velde, A., Staiano, A., Troncone, R., Hommes, D. W. (2007). "Functional consequences of NOD2/CARD15 mutations in Crohn disease." J Pediatr Gastroenterol Nutr **44**(5): 529-39.
- Raelson, J. V., Little, R. D., Ruether, A., Fournier, H., Paquin, B., Van Eerdewegh, P., Bradley, W. E., Croteau, P., Nguyen-Huu, Q., Segal, J., Debrus, S., Allard, R., Rosenstiel, P., Franke, A., Jacobs, G., Nikolaus, S., Vidal, J. M., Szego, P., Laplante, N., Clark, H. F., Paulussen, R. J., Hooper, J. W., Keith, T. P., Belouchi, A., Schreiber, S. (2007). "Genome-wide association study for Crohn's disease in the Quebec Founder Population identifies multiple validated disease loci." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14747-52.
- Rampton, D. S. (1999). "Management of Crohn's disease." Bmj **319**(7223): 1480-5.
- Rath, H. C., Schultz, M., Freitag, R., Dieleman, L. A., Li, F., Linde, H. J., Scholmerich, J., Sartor, R. B. (2001). "Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice." Infect Immun **69**(4): 2277-85.
- Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., Steinhart, A. H., McLeod, R. S., Griffiths, A. M., Green, T., Brettin, T. S., Stone, V., Bull, S. B., Bitton, A., Williams, C. N., Greenberg, G. R., Cohen, Z., Lander, E. S., Hudson, T. J., Siminovitch, K.

- A. (2000). "Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci." Am J Hum Genet **66**(6): 1863-70.
- Rioux, J. D., Xavier, R. J., Taylor, K. D., Silverberg, M. S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M. M., Datta, L. W., Shugart, Y. Y., Griffiths, A. M., Targan, S. R., Ippoliti, A. F., Bernard, E. J., Mei, L., Nicolae, D. L., Regueiro, M., Schumm, L. P., Steinhart, A. H., Rotter, J. I., Duerr, R. H., Cho, J. H., Daly, M. J., Brant, S. R. (2007). "Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis." Nat Genet **39**(5): 596-604.
- Roberts, R. L., Gearry, R. B., Hollis-Moffatt, J. E., Miller, A. L., Reid, J., Abkevich, V., Timms, K. M., Gutin, A., Lanchbury, J. S., Merriman, T. R., Barclay, M. L., Kennedy, M. A. (2007). "IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease." Am J Gastroenterol **102**(12): 2754-61.
- Roediger, W. E., Nance, S. (1986). "Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation." Br J Exp Pathol **67**(6): 773-82.
- Rueda, B., Zhernakova, A., Lopez-Nevot, M. A., Gomez-Garcia, M., Ortega, E., Pinero, A., Corroero, F., Brieva, J. A., Nieto, A., Koeleman, B. P., Martin, J. (2005). "CTLA4/CT60 polymorphism is not relevant in susceptibility to autoimmune inflammatory intestinal disorders." Hum Immunol **66**(3): 321-5.
- Ruegg, C., Hersberger, M., Wusk, B., Rentsch, K., Kullak-Ublick, G. A., von Eckardstein, A., Maly, F. E. (2004). "Detection of the Arg702Trp, Gly908Arg and Leu1007fsinsC polymorphisms of the NOD2/CARD15 gene by real-time PCR with melting curve analysis." Clin Chem Lab Med **42**(5): 494-8.
- Russell, R. K., Drummond, H. E., Nimmo, E. E., Anderson, N., Smith, L., Wilson, D. C., Gillett, P. M., McGrogan, P., Hassan, K., Weaver, L. T., Bisset, M., Mahdi, G., Satsangi, J. (2005). "Genotype-phenotype analysis in childhood-onset Crohn's disease: NOD2/CARD15 variants consistently predict phenotypic characteristics of severe disease." Inflamm Bowel Dis **11**(11): 955-64.
- Ruthruff, B. (2007). "Clinical review of Crohn's disease." J Am Acad Nurse Pract **19**(8): 392-7.
- Ryan, P., Bennett, M. W., Aarons, S., Lee, G., Collins, J. K., O'Sullivan, G. C., O'Connell, J., Shanahan, F. (2002). "PCR detection of Mycobacterium

- paratuberculosis in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection." Gut **51**(5): 665-70.
- Sartor, R. B. (2006). "Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis." Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol **3**(7): 390-407.
- Satsangi, J., Jewell, D. P., Rosenberg, W. M., Bell, J. I. (1994). "Genetics of inflammatory bowel disease." Gut **35**(5): 696-700.
- Satsangi, J., Parkes, M., Louis, E., Hashimoto, L., Kato, N., Welsh, K., Terwilliger, J. D., Lathrop, G. M., Bell, J. I., Jewell, D. P. (1996). "Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12." Nat Genet **14**(2): 199-202.
- Schmechel, S., Konrad, A., Diegelmann, J., Glas, J., Wetzke, M., Paschos, E., Lohse, P., Goke, B., Brand, S. (2008). "Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status." Inflamm Bowel Dis **14**(2): 204-12.
- Schmid, D., Dengjel, J., Schoor, O., Stevanovic, S., Munz, C. (2006). "Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens." J Mol Med **84**(3): 194-202.
- Schreiber, S., Nikolaus, S., Hampe, J. (1998). "Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease." Gut **42**(4): 477-84.
- Shintani, T., Klionsky, D. J. (2004). "Autophagy in health and disease: a double-edged sword." Science **306**(5698): 990-5.
- Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., van Blankenstein, M. (1996). "Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)." Gut **39**(5): 690-7.
- Silverberg, M. S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I. D., Bernstein, C. N., Brant, S. R., Caprilli, R., Colombel, J. F., Gasche, C., Geboes, K., Jewell, D. P., Karban, A., Loftus Jr, E. V., Pena, A. S., Riddell, R. H., Sachar, D. B., Schreiber, S., Steinhart, A. H., Targan, S. R., Vermeire, S., Warren, B. F. (2005). "Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology." Can J Gastroenterol **19 Suppl A**: 5-36.

- Silverberg, M. S. (2006). "OCTNs: will the real IBD5 gene please stand up?" World J Gastroenterol **12**(23): 3678-81.
- Smith, B. R., Arnott, I. D., Drummond, H. E., Nimmo, E. R., Satsangi, J. (2004). "Disease location, anti-Saccharomyces cerevisiae antibody, and NOD2/CARD15 genotype influence the progression of disease behavior in Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **10**(5): 521-8.
- Sonnenberg, A. (1990). "Occupational distribution of inflammatory bowel disease among German employees." Gut **31**(9): 1037-40.
- Stejskal, J., R. Kodet, V. Povýšilová, K. Motlík, A. Chlumská, A. Pastrňák, D. Dudochinová (2001). Speciální patologie, II. díl. Praha, Karolinum.
- Stokkers, P. C., Reitsma, P. H., Tytgat, G. N., van Deventer, S. J. (1999). "HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis." Gut **45**(3): 395-401.
- Stoll, M., Corneliussen, B., Costello, C. M., Waetzig, G. H., Mellgard, B., Koch, W. A., Rosenstiel, P., Albrecht, M., Croucher, P. J., Seegert, D., Nikolaus, S., Hampe, J., Lengauer, T., Pierrou, S., Foelsch, U. R., Mathew, C. G., Lagerstrom-Fermer, M., Schreiber, S. (2004). "Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease." Nat Genet **36**(5): 476-80.
- Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F., Jr., Thompson, R., Weinstock, J. V. (2005). "Trichuris suis therapy in Crohn's disease." Gut **54**(1): 87-90.
- Sun, L., Roesler, J., Rosen-Wolff, A., Winkler, U., Koch, R., Thurigen, A., Henker, J. (2003). "CARD15 genotype and phenotype analysis in 55 pediatric patients with Crohn disease from Saxony, Germany." J Pediatr Gastroenterol Nutr **37**(4): 492-7.
- Sýkora, J., Šubrt, I., Dídek, P., Siala, K., Schwarz, J., Machalová, V., Varvarovská, J., Pazdiora, P., Pozler, O., Stožický, F. (2006). "Cytokine Tumor Necrosis Factor-alpha A Promoter Gene Polymorphism at Position -308 G-->A and Pediatric Inflammatory Bowel Disease: Implications in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease." J Pediatr Gastroenterol Nutr **42**(5): 479-487.
- Špičák, J. (2008). "Novinky v gastroenterologii a hepatologii." Praha, Grada.
- Targan, S. R., Hanauer, S. B., van Deventer, S. J., Mayer, L., Present, D. H., Braakman, T., DeWoody, K. L., Schaible, T. F., Rutgeerts, P. J. (1997). "A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group." N Engl J Med **337**(15): 1029-35.

- Tomer, G., Ceballos, C., Concepcion, E., Benkov, K. J. (2003). "NOD2/CARD15 variants are associated with lower weight at diagnosis in children with Crohn's disease." Am J Gastroenterol **98**(11): 2479-84.
- Tremaine, W. J. (2003). "Gastroduodenal Crohn's disease: medical management." Inflamm Bowel Dis **9**(2): 127-8; discussion 131.
- Tremelling, M., Cummings, F., Fisher, S. A., Mansfield, J., Gwilliam, R., Keniry, A., Nimmo, E. R., Drummond, H., Onnie, C. M., Prescott, N. J., Sanderson, J., Bredin, F., Berzuini, C., Forbes, A., Lewis, C. M., Cardon, L., Deloukas, P., Jewell, D., Mathew, C. G., Parkes, M., Satsangi, J. (2007). "IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease." Gastroenterology **132**(5): 1657-64.
- Tremelling, M., Hancock, L., Bredin, F., Sharpstone, D., Bingham, S. A., Parkes, M. (2006). "Complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) is not associated with inflammatory bowel disease susceptibility in East Anglia panel." Inflamm Bowel Dis **12**(10): 967-71.
- Tysk, C., Lindberg, E., Järnerot, G., Floderus-Myrhed, B. (1988). "Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking." Gut **29**(7): 990-6.
- van der Linde, K., Boor, P. P., Houwing-Duistermaat, J. J., Crusius, B. J., Wilson, P. J., Kuipers, E. J., de Rooij, F. W. (2007). "CARD15 mutations in Dutch familial and sporadic inflammatory bowel disease and an overview of European studies." Eur J Gastroenterol Hepatol **19**(6): 449-59.
- Van Deventer, S. J. (1997). "Tumour necrosis factor and Crohn's disease." Gut **40**(4): 443-8.
- Van Limbergen, J., Russell, R. K., Nimmo, E. R., Drummond, H. E., Smith, L., Davies, G., Anderson, N. H., Gillett, P. M., McGrogan, P., Hassan, K., Weaver, L., Bisset, W. M., Mahdi, G., Wilson, D. C., Satsangi, J. (2007a). "IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland." Gut **56**(8): 1173-4.
- Van Limbergen, J., Russell, R. K., Nimmo, E. R., Satsangi, J. (2007b). "The genetics of inflammatory bowel disease." Am J Gastroenterol **102**(12): 2820-31.
- Van Limbergen, J., Russell, R. K., Nimmo, E. R., Drummond, H. E., Smith, L., Anderson, N. H., Davies, G., Gillett, P. M., McGrogan, P., Weaver, L. T., Bisset, W. M., Mahdi, G., Arnott, I. D., Wilson, D. C., Satsangi, J. (2008).

- "Autophagy gene ATG16L1 influences susceptibility and disease location but not childhood-onset in Crohn's disease in Northern Europe." Inflamm Bowel Dis **14**: 338-46.
- van Oene, M., Wintle, R. F., Liu, X., Yazdanpanah, M., Gu, X., Newman, B., Kwan, A., Johnson, B., Owen, J., Greer, W., Mosher, D., Maksymowych, W., Keystone, E., Rubin, L. A., Amos, C. I., Siminovitch, K. A. (2005). "Association of the lymphoid tyrosine phosphatase R620W variant with rheumatoid arthritis, but not Crohn's disease, in Canadian populations." Arthritis Rheum **52**(7): 1993-8.
- Voss, E., Wehkamp, J., Wehkamp, K., Stange, E. F., Schroder, J. M., Harder, J. (2006). "NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2." J Biol Chem **281**(4): 2005-11.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K. R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schroder, J. M., Bevins, C. L., Fellermann, K., Stange, E. F. (2004). "NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression." Gut **53**(11): 1658-64.
- Weiss, B., Shamir, R., Bujanover, Y., Waterman, M., Hartman, C., Fradkin, A., Berkowitz, D., Weintraub, I., Eliakim, R., Karban, A. (2004). "NOD2/CARD15 mutation analysis and genotype-phenotype correlation in Jewish pediatric patients compared with adults with Crohn's disease." J Pediatr **145**(2): 208-12.
- Welcome Trust Case Control Consortium. (2007). "Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls." Nature **447**(7145): 661-78
- Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O., Duff, G. W. (1997). "Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3195-9.
- Yamazaki, K., Onouchi, Y., Takazoe, M., Kubo, M., Nakamura, Y., Hata, A. (2007). "Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients." J Hum Genet **52**(7): 575-83.
- Yang, H., Plevy, S. E., Taylor, K., Tyan, D., Fischel-Ghodsian, N., McElree, C., Targan, S. R., Rotter, J. I. (1999). "Linkage of Crohn's disease to the major histocompatibility complex region is detected by multiple non-parametric analyses." Gut **44**(4): 519-26.



Zouali, H., Lesage, S., Merlin, F., Cezard, J. P., Colombel, J. F., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C., Gassull, M., Christensen, S., Finkel, Y., Modigliani, R., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Chamailard, M., Thomas, G., Hugot, J. P. (2003). "CARD4/NOD1 is not involved in inflammatory bowel disease." Gut **52**(1): 71-4.

Zvárová, J. (1998). Základy statistiky pro biomedicínské obory. Praha, Karolinum.