

Univerzita Karlova v Praze
Prírodovedecká fakulta
Katedra antropologie a genetiky človeka



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Úloha toll-like receptorů a stresového hormonu
prolaktin v poruchách imunitního systému**

Role of toll-like receptors and stress hormone prolactin in defects of
immune system

Veronika Sluková

Praha 2011

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D., Katedra antropologie a genetiky
člověka, Přírodovědecká fakulta UK

Práca bola vypracovaná v laboratóriách Ústavu obecné biologie a genetiky, 3. lékařské
fakulty UK, v rokoch 2008-2011 v rámci projektu “Úloha prolaktinu při bakteriální infekci“
financovaného grantom IGA NS 9970.

Spolupráca: II. interní klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

Transfúzní oddělení Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

Prehlásenie

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala len na základe citovanej literatúry a konzultáciou so svojou školiteľkou RNDr. Pavlínou Čejkovou, Ph.D.

V Prahe, 26.8.2011

.....
Veronika Sluková

Pod'akovanie

Ďakujem svojej školiteľke RNDr. Pavlíne Čejkovej, Ph.D. za čas, ktorý mi venovala počas vypracovávania tejto diplomovej práce a získanie praktických skúseností v laboratóriu. Ďalej by som rada poďakovala všetkým pracovníkom Ústavu obecné bilogie a genetiky 3. lékarské fakulty Univerzity Karlovy za pomoc poskytnutú pri práci v laboratóriu. Tiež ďakujem mojej rodine, ktoré ma počas celého štúdia vždy podporovala.

Abstrakt

Úvod: Diabetes mellitus je polygénne ochorenie, na ktorého vývin majú vplyv taktiež enviromentálne faktory. My sme skúmali spojitosť prolaktínu (PRL) a toll-like receptorov (TLR) 2 a 4 s autoimunitným typom diabetu. PRL je produkovaný najmä hypofýzou, ale v malých koncentráciách aj na periférii, kde sa podieľa aj na imunitných reakciách. Skúmali sme preto vplyv hladín mRNA monocytárneho PRL na vývin diabetu, a tiež vplyv G alely polymorfizmu -1149 G/T v mimohypofýzovom promotore, ktorá už bola asociovaná s inými autoimunitnými ochoreniami. TLRs sú receptory imunitných buniek rozoznávajúce patogény vstupujúce do tela a zastávajú dôležitú úlohu v iniciácii imunitnej odpovede. Detekciou hladín ich mRNA a proteínov na bunčnom povrchu monocytov sme sa snažili zistiť ich úlohu v patogenézii autoimunitného typu diabetu.

Materiál a metódy: Do štúdie bolo zahrnutých celkom 30 T1D a 21 LADA pacientov. Tri kontrolné skupiny tvorilo 23 T2D pacientov, 23 pacientov s nediabetickým ochorením (neDM) a 60 zdravých darcov krvi (TO). Jedincom boli odobraté krvné vzorky, z ktorých sme následne izolovali DNA na genotypizáciu SNP -1149 G/T pomocou RFLP, mRNA z monocytov na analýzu hladín expresie PRL, TLR2 a TLR4 pomocou real-time PCR, a mononukleárne bunky, z ktorých sme vďaka značeniu protilátkami proti TLR2, TLR4 a CD14 mohli na prietokovom cytometri identifikovať monocyty s nízkou a vysokou hladinou expresie týchto receptorov.

Výsledky: SNP -1149 G/T nevykazoval žiadne štatisticky významné rozdiely medzi porovnávanými skupinami. Medzi hladinami mRNA sme zistili signifikantné rozdiely v expresii PRL a TLR2 medzi skupinami AD a neDM, a expresii TLR2 a TLR4 medzi skupinami AD a TO. V počtoch monocytov exprimujúcich TLRs sme odhalili zvýšené hladiny u neDM a TO pri porovnaní s AD skupinou. Koreláciou hladín mRNA a proteínov TLRs všetkých jedincov sme zistili slabú, ale štatisticky významnú negatívnu koreláciu u monocytov s nízkou hladinou expresie CD14 a TLRs.

Záver: SNP -1149 G/T zrejme nemá vplyv na fyziologické hladiny expresie periférneho PRL v monocytoch AD. Pacienti s autoimunitným typom diabetu majú výrazne vyššie hladiny mRNA TLR2 a TLR4 oproti zdravým kontrolám, avšak nižšie počty monocytov exprimujúcich tieto receptory na svojom povrchu. Hladina mRNA PRL u AD bola porovnateľná s hladinami mRNA u zdravých kontrol, takže prolaktín pravdepodobne nemá vplyv na etiopatogenéziu diabetu.

Kľúčové slová: Diabetes mellitus, prolaktín, toll-like receptory, -1149 G/T SNP

Abstract

Introduction: Diabetes mellitus is a polygene disease and on its manifestation have influence also enviromental factors. We have studied the role of extrapituitary prolactin (PRL) and toll-like receptors (TLR) 2 and 4 in the etiopathogenesis of autoimmune diabetes. PRL is mainly produced by hypophysis, but in small concentrations also in the periphery, where it participates in the immune reactions. Therefore, we investigated the influence of the levels of monocytic PRL mRNA on the development of diabetes, and also the influence of G allele of the -1149 G/T polymorphism in the extrapituitary promotor, which has already been associated with other autoimmune diseases. TLRs are receptors of the immune cells that recognize patogenes entering into the body. They play an important role in the inication of the immune response. We aimed to find out their function in the pathogenesis of the autoimmune diabetes by the detection of their mRNA levels and protein levels expressed on the cell surface of the monocytes.

Material and methods: In this study we included 30 T1D and 21 LADA patients. Three control groups consisted of 23 T2D patients, 23 patients with a nondiabetic disease (neDM) and 60 healthy blood donors (TO). Blood samples have been taken from the individuals. From these blood samples we isolated DNA for genotyping the *PRL* -1149 G/T SNP via RFLP and from monocytes we extracted mRNA for the analysis of the levels of *PRL*, *TLR2* and *TLR4* gene expression via real-time PCR. Further, we separated mononuclear cells that were labelled with antibodies against CD14, TLR2 and TLR4, so that we could detect TLR2 and TLR4 expression on monocytes by using a flow cytometry.

Results: The genotype frequencies of the *PRL* -1149 G/T SNP did not significantly differ between compared groups. Contrary to this, we found statistically significant differences in the levels of PRL and TLR2 mRNA expression between the groups AD and neDM, and in the expression of TLR2 and TLR4 mRNA between AD and TO groups. In the number of monocytes expriming TLRs, we observed higher levels in neDM and TO groups compared to AD. Correlation of the levels of mRNA and proteins in all the individuals demonstrates weak, but statistically significant negative correlation in the monocytes with low expression of CD14 and TLRs.

Conclusion: The *PRL* -1149 G/T SNP does not seem to have any effect on the expresion of the peripheral PRL in monocytes of AD. Patients with autoimmune diabetes have significantly higher levels of TLR2 and TLR4 mRNA compared to healthy controls, but lower numbers of monocytes expriming these receptors on their cell surface. PRL mRNA levels in AD patients were comparable with those in TO group and we conclude that prolactin probably has no influence on the manifestation of autoimmune diabetes.

Key words: Diabetes mellitus, prolactin, toll-like receptors, -1149 G/T SNP

Obsah

Zoznam skratiek	9
1. Teoretický úvod	11
1.1 Diabetes mellitus	11
1.1.1 LADA vs. T2D	11
1.1.2 LADA vs. T1D	12
1.1.3 Ďalšie rizikové faktory vzniku diabetu	14
1.2 Prolaktín	14
1.2.1 Funkcie a výskyt PRL v organizme	14
1.2.2 Štruktúra génu a izoformy PRL	17
1.2.3 Úloha PRL v imunite	18
1.2.4 PRL a autoimunitné ochorenia	19
1.3 Toll-like receptory (TLRs); TLR2 a TLR4	20
1.3.1 Štruktúra a výskyt TLRs	20
1.3.2 Signálne dráhy TLRs	21
1.3.3 Úloha TLR2 a TLR4 v imunitnej odpovedi	22
2. Hypotézy a ciele diplomovej práce	24
3. Materiál a metódy	25
3.1 Materiál a pacienti	25
3.1.1 Pacienti.....	25
3.1.2 Kontroly.....	25
3.1.3 Použité prístroje.....	26
3.1.4 Použité počítačové programy.....	27
3.1.5 Všeobecne použité chemikálie.....	27
3.2 Určenie SNP -1149G/T v promotore génu PRL	27
3.2.1 Izolácia DNA	28
3.2.2 Polymerázová reťazová reakcia	29
3.2.3 Polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov	30
3.2.4 Elektroforetická separácia	31
3.3 Štúdium génovej expzie PRL, TLR2 a TLR4 na úrovni mRNA	33
3.3.1 Magnetická separácia monocytov	33
3.3.2 Izolácia RNA.....	34
3.3.3 Reverzne transkriptázová polymerázová reťazová reakcia	35

3.3.4 Polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase	37
3.3.4.1 Úprava získaných údajov z qPCR na ďalšie štatistické spracovanie	38
3.4 FACS analýza	39
3.4.1 Izolácia mononukleárných buniek pomocou Ficoll gradientu	39
3.4.2 Značenie buniek protilátkami a analýza na prietokovom cytometri	40
4. Výsledky	42
4.1 Polymorfizmus -1149 G/T v mimohypofyzárnom promotore génu <i>PRL</i>	42
4.1.1 Vplyv polymorfizmu -1149 G/T na vývin autoimunitného diabetu	42
4.1.2 Vplyv polymorfizmu -1149 G/T na expresiu <i>PRL</i> na úrovni mRNA	43
4.2 Real-time PCR	44
4.2.1 Relatívne hladiny expresie génu <i>PRL</i> na úrovni mRNA	44
4.2.2 Relatívne hladiny expresie génov <i>TLR2</i> a <i>TLR4</i> na úrovni mRNA	45
4.3 FACS analýza	47
4.3.1 Porovnanie expresie <i>TLR2</i> a <i>TLR4</i> receptorov na povrchu monocytov..	48
4.3.2 Porovnanie expresie <i>TLR2</i> a <i>TLR4</i> receptorov na základe klinických znakov	52
4.3.3 Korelácie hladín mRNA <i>TLR2</i> a <i>TLR4</i> a proteínov u jednotlivých sledovaných skupín	54
5. Diskusia	55
6. Záver	58
7. Zoznam použitej literatúry	59

Zoznam skratiek

AD – autoimunitný diabetes
BMI – body mass index
CP – C-peptid
DCs – dendritické bunky
DKA – ketoacidózný diabetes
DM – diabetes mellitus
EGF – epidermálny rastový hormón
GAD – dekarboxyláza kyseliny glutamovej
GADA – protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamovej
GPI – glykofosfoinozitol
HLA – human leukocyte antigen
IA-2 – insulinoma-associated antigen-2
IAA – inzulínová autoprotiľátka
ICAs – protilátky proti pankreatickým ostrovným bunkám
IC-PRL – PRL uvoľnený z imunitných buniek
IFN – interferon
IL – interleukín
INS – proinzulínový gén
IRF-1 – interferon regulatory factor 1
LADA – latentný autoimunitný diabetes u dospelých
LBP – LPS-viazajúci proteín
LPS – lipopolysacharid
LRR – opakovania bohaté na leucín
MD-2 – myeloid differentiation protein 2
MHC – major histocompatibility complex
neDM – pacienti nediabetickým ochorením
NF κ B – nuclear factor κ B
PRL – prolaktín
RA – reumatoidná artritída
SLE – systémový lupus erythematosus
SNP – jednonukleotidový polymorfizmus

T1D – diabetes mellitus typu I
T2D – diabetes mellitus typu II
TCR – T-buněčný antigénový receptor
TGF- β – transforming growth factor- β
Th – pomocné T-bunky
TIR – Toll/interleukín-1 receptor
TLR – toll-like receptor
TNF- α – tumor necrosis factor- α
TO – skupina zdravých darcov krvi
TPOAb – protilátky proti tyroid peroxidáze
TSH – tyroid stimulující hormon

1. Teoretický úvod

1.1 Diabetes mellitus

Etológia diabetu mellitus je veľmi komplexná, pretože toto ochorenie má polygenetické aj epigenetické faktory, ktoré sa podieľajú na jeho vývine. Príspevok každého z niekoľkých génov k tomuto komplexnému ochoreniu je pravdepodobne malý; len kombinovaný efekt niekoľkých náchylných génov, často v súčinnosti s predisponujúcimi enviromentálnymi faktormi, vedú k fenotypu choroby (Cejkova et al., 2008). Diabetes mellitus dosiahol epidemické rozmery a postihuje viac ako 150 miliónov jedincov na celom svete, takže pátranie po kandidátnych génoch je otázkou rastúcej dôležitosti (Wild et al., 2004).

Diabetes mellitus je reprezentovaný dvomi hlavnými typmi: autoimunitný a metabolický. Autoimunitný diabetes je charakterizovaný inzulínovou nedostatočnosťou spojenou s autoimunitnou deštrukciou pankreatických β -buniek (T1D). (Atkinson & McLaren, 94). Metabolický diabetes, charakteristický inzulínovou rezistenciou, je tiež známy ako diabetes mellitus typu II (T2D) (Porte & Kahn, 2001; Kahn, 2003). Ďalším typom diabetu, s ktorým sme sa v tejto práci stretli bol latentný autoimunitný diabetes u dospelých (LADA) .

1.1.1 LADA vs. T2D

Latentný autoimunitný diabetes u dospelých je forma diabetu s nástupom u dospelých, charakterizovaná prítomnosťou cirkulujúcich autoprotílátok proti ostrovčekom v pacientoch, ktorí nevyžadujú liečbu inzulínom najmenej 6 mesiacov od diagnózy (Zimmet et al., 1994) a reprezentujú prostrednú skupinu diabetických pacientov s charakteristikami diabetu typu I a II (Douroudis et al., 2009). LADA zo začiatku preukazuje vlastnosti typické pre T2D, najmä nástup po 35 rokoch života a prvotnú absenciu inzulínovej závislosti (klinicky sa manifestuje ako absencia ketoacidózy alebo strata na váhe) (Harvey et al., 2007). Rizikové faktory pre T2D, ako vek, obezita, nedostatok fyzickej aktivity, sú asociované aj s rozvojom LADA (Carlsson et al., 2007).

LADA fenotyp je odlišný od toho u pacientov s T2D, ktorí sú negatívny na GAD (dekarboxyláza kyseliny glutamovej) protílátky (Niskanen et al., 1995; Tuomi et al., 1999; Turner et al., 1997), s niektorými znakmi (mladší vek, relatívna štíhlosť a vyššia glykémia),

ktoré by mohli ovplyvniť vývin komplikácií (Niskanen et al., 1995; Tuomi et al., 1999; Turner et al., 1997; Davis et al., 2000; Romkens et al., 2006). V porovnaní s pacientmi s pravým T2D, GADA-pozitívny pacienti sú mladší, majú nižšie BMI, akútne symptómy, nižšiu hladinu glukózy v krvi v čase diagnózy, ďalšie autoprotiľátky a je viac pravdepodobné, že majú ďalšie autoimunitné poruchy, takže prezentujú odlišný klinický obraz (Davies et al., 2008). Súčasné zistenia naznačujú, že výskyt protiľatok proti tyroid peroxidáze (TPOAb) môže mať spojitosť s akceleráciou autoimunitných procesov v pankreatických beta bunkách u LADA pacientov, vyúsťujúc v zničenie funkcie beta buniek (Murao et al., 2008).

Neskorší vek nástupu a relatívne menej akútny klinický nástup LADA môže vyústiť do klinickej diagnózy diabetu typu II (Tuomi et al., 1993). V rámci prvých 5 rokov po diagnóze diabetu sa však vyvinie potreba inzulínovej liečby u mnoho LADA pacientov. Toto oddeľuje pacientov s LADA od tých s neautoimunitným T2D, kde sa potreba inzulínovej liečby vyvinie neskôr ako u tých s LADA (Turner et al., 1997). Prospektívne štúdie funkcie β -buniek ukazujú, že u LADA pacientov s viacerými ostrovnými protiľátkami sa vyvinie zlyhanie β -buniek do 5 rokov, zatiaľčo u tých s len GADAs alebo len ICAs (protiľátky proti bunkám pankreatických ostrovčekov) sa zlyhanie β -buniek väčšinou vyvinie až po 5 rokoch (Stenström et al., 2005). Mezi jedincami s LADA je autoimunitný systémový útok proti pankreatickým beta bunkám oveľa pomalší a selektívnejší ako u klasického T1D, čo dovoľuje prežívanie beta buniek produkujúcich inzulín dlhší časový úsek, zvyčajne niekoľko rokov. Inzulín je obyčajne vyžadovaný polovicou pacientov s LADA do 4 rokov od diagnózy, v porovnaní s viac ako 10 rokmi u pacientov s T2D (Grasso et al., 2001).

1.1.2 LADA vs. T1D

T1D má znaky charakteristické pre väčšinu autoimunitných chorôb: (1) Je asociovaný so špecifickými haplotypmi HLA (human leukocyte antigen) II triedy. (2) V tele sú prítomné autoprotiľátky proti autoantigénom β -buniek (GAD65, IA-2 (insulinoma-associated antigen-2), ICA, IAA (inzulínová autoprotiľátka)) (Cerna et al., 2007). Anti-inzulín autoprotiľátky sú bežnejšie medzi pacientmi s klasickým T1D ako u pacientov s LADA (Furlanos et al., 2006).

Existujú údaje, že poškodzovanie β -buniek môže byť indukované v ktoromkoľvek veku a že načasovanie klinickej prezentácie je vysoko variabilné, s najmladšími pacientmi diagnostikovanými v detstve a najstaršími v pokročilom veku (Sabbah et al., 2000). Navyše

môžeme hypotetizovať, že T1D u detí a dospelých môže mať rozdielne predispozičné gény ako tie u LADA. V porovnaní s rýchlo progredujúcim T1D s nástupom v dospelosti, pomaly progredujúci T1D s nástupom v dospelosti (LADA) môže obsahovať ochranné gény vedúce k pomalej, postupujúcej deštrukcii β -buniek a inzulínovej nedostatočnosti. Rozdielny mechanizmus sa odráža aj v rôznej asociácii s HLA u týchto ochorení. Polymorfizmus alel systému HLA je spojovaný s autoimunitným diabetom v oboch kategóriách, ale pre každú skupinu pacientov boli opísané špecifické asociácie. Najviac významná asociácia je u T1D s alelami DQB1, ale u LADA s alelami DRB1 (Cerna et al., 2007). Lokus HLA na krátkom ramienku 6. chromozómu, ktorý udeľuje väčšinu genetickej náchylnosti k T1D (Kantarova & Buc, 2007), ukázal podobnú asociáciu u LADA (Desai et al., 2007; Horton et al., 1999), ale aj jasné rozdiely, napr. DQB1 *0201/*0302 je viac bežný genotyp u T1D ako u LADA, zatiaľčo protektívne genotypy *0602/X a 0603/X sú bežnejšie u LADA (Tuomi et al., 1999).

V tabulke č. 1 sú stručne zhrnuté charakteristiky jednotlivých typov diabetu.

Tab.1 Porovnanie charakteristík T1D, T2D a LADA (Appel et al., 2009)

<i>Charakteristika</i>	<i>T1D</i>	<i>T2D</i>	<i>LADA</i>
Typický vek nástupu	<35	>35	>35
Rýchlosť nástupu	Rýchla	pomalá	Pomalá
Odpoveď na zmeny životného štýlu alebo orálne prostriedky	Slabá	dobrá	na začiatku akceptovateľná, ale časom zhoršenia
Frekvencia DKA	Vysoká	nízka	Nízka
Rodinná história DM	nie bežná	bežná	nie bežná
Osobná alebo rodinná história iných autoimunitných ochorení	Bežná	nie bežná	Bežná
Vzhľad postavy	Chudý	nadváha k obezite	normálny až nadváha
Metabolický syndróm	nie	áno	Nie
Hladina C-peptidu	nedetekovateľná/ nízka	normálna/ vysoká	nízka/ normálna
Anti-GAD/ Anti-ICA/ Anti-IA2	Pozitívne	negatívne	Pozitívne

DKA – ketoacidózný diabetes

Jedným zo spôsobov, ako zlepšiť klasifikáciu diabetu, je snažiť sa identifikovať čo najviac genetických rizikových faktorov. HLA- kódujúca náchylnosť k T1D môže vysvetliť menej ako 50% dedičného rizika ochorenia, preto tu existuje podstatná úloha non-HLA

kódovanej náchylnosti (Černá, 2008). Súčasné štúdiá ukazujú, že LADA zdieľa genetické znaky s oboma, T1D (HLA-DQB1, INS VNTR, PTPN22) a T2D (TCF7L2), naznačujúc, že reprezentuje mix dvoch hlavných typov diabetu (Cervin et al., 2008).

1.1.3 Ďalšie rizikové faktory vzniku diabetu

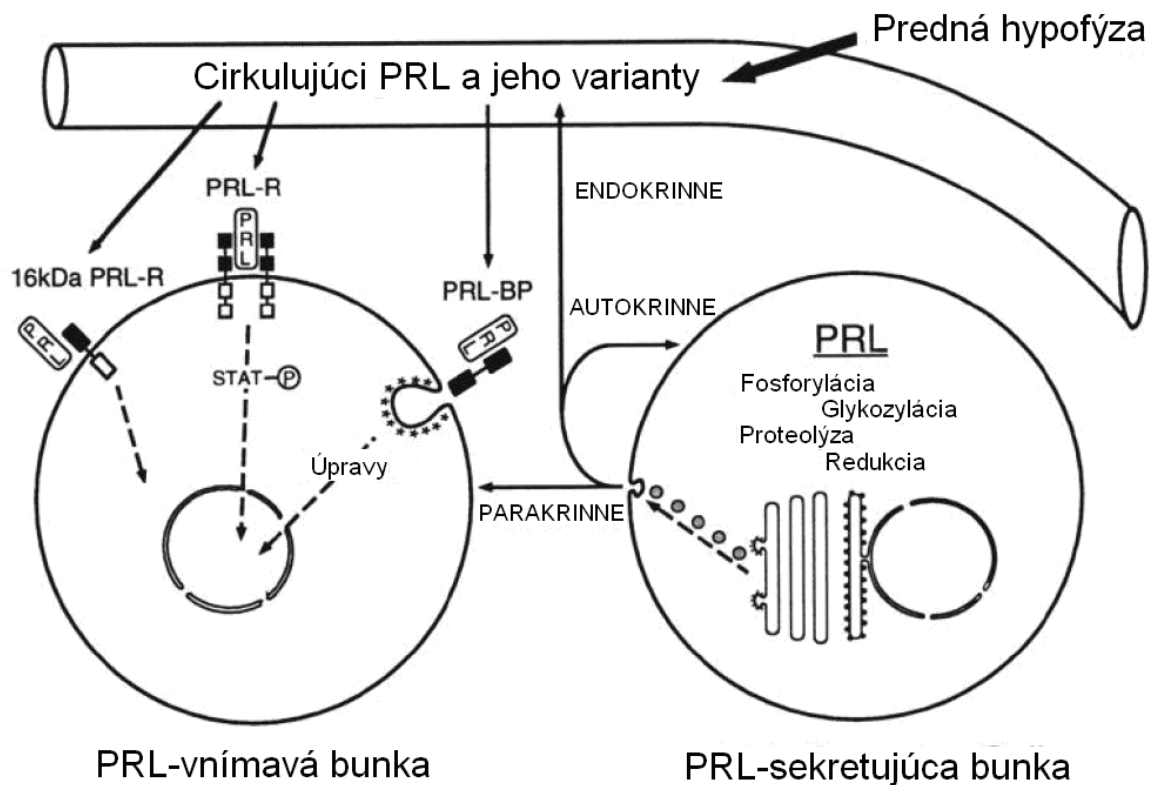
Regulačné T-bunky s autoimunitnou špecifitou môžu byť bežným znakom jedincov náchylných k autoimunitným ochoreniam, ktorí nepreukázali autoimunitné ochorenia. Imunitná odpoveď je regulovaná rovnováhou medzi cytokínmi buniek Th1 a Th2. Th1 bunky primárne sekretujú interferon (IFN)- γ a interleukín (IL)-2 a podporujú bunecnú imunitu, kým Th2 bunky produkujú IL-4, IL-10 a down-regulujú aktivitu Th1 buniek, a sú prevažne spojované s humorálnou imunitou. Publikované údaje o Th1 a Th2 naznačujú, že Th1 bunky podporujú vývin diabetu, kým Th2 by mohli byť protektívne (Katz et al., 1995).

Je známe, že riziko T1D a T2D rastie s rastúcim počtom postihnutých príbuzných (Grill et al., 1999; Meigs et al., 2000; Bonifacio et al., 2004). Tiež bolo ukázané, že riziko sa mení v závislosti na tom, ktorí príbuzní majú diabetes. Pre T1D niekoľko štúdií ukázalo, že mať otca s diabetom je asociované s vyšším rizikom ako mať matku s diabetom (Gale & Gillespie, 2001). Pre T2D, naopak, niektoré štúdie naznačili preferenčný maternálny efekt (Meigs et al., 2000; Kim et al., 2004). Jedinci s mužskými príbuznými s diabetom boli 2x náchylnejší mať LADA ako tí s ženskými príbuznými s diabetom. Tieto pozorovania korešponujú s predchádzajúcimi zisteniami u T1D (Gale & Gillespie, 2001).

1.2 Prolaktín

1.2.1 Funkcie a výskyt PRL v organizme

Prolaktín (PRL) postihuje viac fyziologických procesov ako všetky ostatné hormóny hypofýzy dokopy. Sú medzi nimi regulácia vývinu prsnej žľazy, iniciácia a udržiavanie laktácie, modulácia imunity, osmoregulácia a modifikácie správania. Rôznorodosť akcií prolaktínu je spôsobená tromi komponentami: štruktúrnym polymorfizmom, lokálnou produkciou a úpravami, a divergentnými intracelulárnymi signálnymi dráhami a cieľovými génmi. Celková predstava o PRL ako endokrinnom/parakrinnom/autokrinnom faktore je prezentovaná na obr. 1 (Ben-Jonathan et al., 1996).

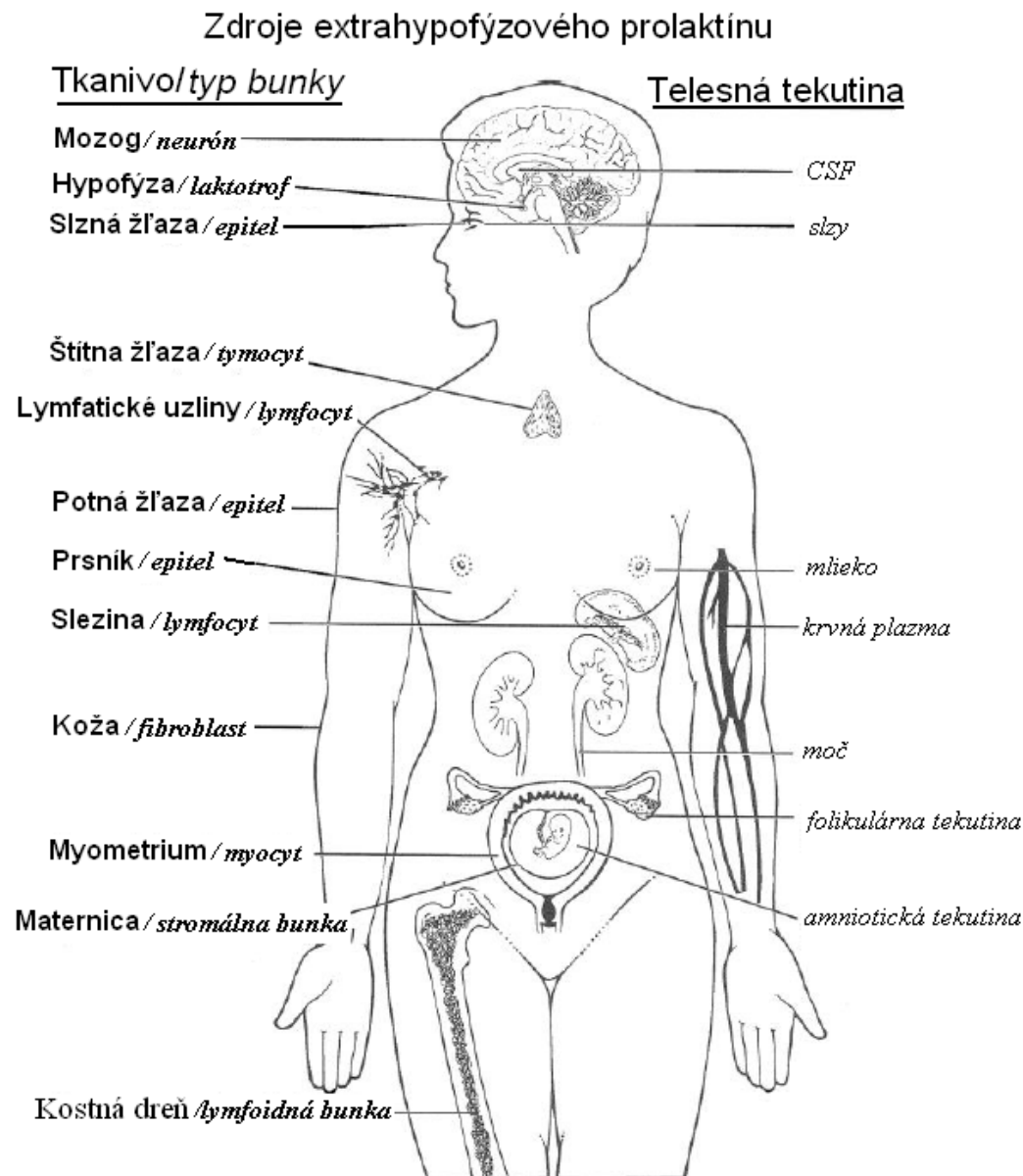


Obr. 1: Schéma demonštruje pleiotropný efekt PRL. Cirkulujúci PRL a jeho varianty sú primárne získané z prednej hypofýzy s menším prídavkom z extrahypofýzových PRL-sekretujúcich buniek (endokrinne). Lokálne produkovaný PRL môže ovplyvňovať susedné bunky (parakrinne) alebo vlastné PRL-sekretujúce bunky (autokrinne). PRL-vnímové bunky majú jeden alebo viac receptorových/väzbových proteínov. Klasický membránový receptor (PRL-R) dimerizuje po naviazaní PRL a aktivuje JAK/STAT signálnu dráhu. Po fosforylácii, STAT proteíny vstupujú do jadra. Receptor, ktorý viaže 16-kDa PRL (16-kDa PRL-R) sa líši od klasického receptoru. PRL-väzbový proteín (PRL-BP) je menší ako klasický receptor. Môže byť spojený s ukladaním PRL vo vnímavých bunkách a s transcelulárnym transportom PRL (Ben-Jonathan et al., 1996).

Malé množstvá PRL uvoľneného z imunitných buniek (immune cell-derived, IC-PRL) môžu dosiahnuť vysoké koncentrácie v priľahlom mikroprostredí. Počas fyzických interakcií medzi antigén-prezentujúcimi bunkami a T-lymfocytmi sa stimulačné a odpovedajúce membránové receptory redistribuuju tak, že sa koncentrujú v mieste kontaktu bunka-bunka, imunologickej synapsie (Delon & Germain, 2000). Cytokínové signály sú namierené k správnej bunke v správnom čase bez zbytočných neúčelných efektov na okolité bunky. Doklady, že signálny cross-talk nastáva medzi T-bunečnými antigénovými receptormi (TCR) a PRL receptormi (Montgomery et al., 1998; Krumenacker et al., 1998), naznačujú, že PRL

receptor sa môže nachádzať v blízkosti TCR a môže byť tiež súčasťou imunologickej synapsie (Montgomery, 2001). PRL-Rs sú exprimované na monocytoch, makrofágoch, T a prevažne B lymfocytoch, NK bunkách, granulocytoch a epiteliálnych bunkách štítnej žľazy (Peeva & Zouali, 2005).

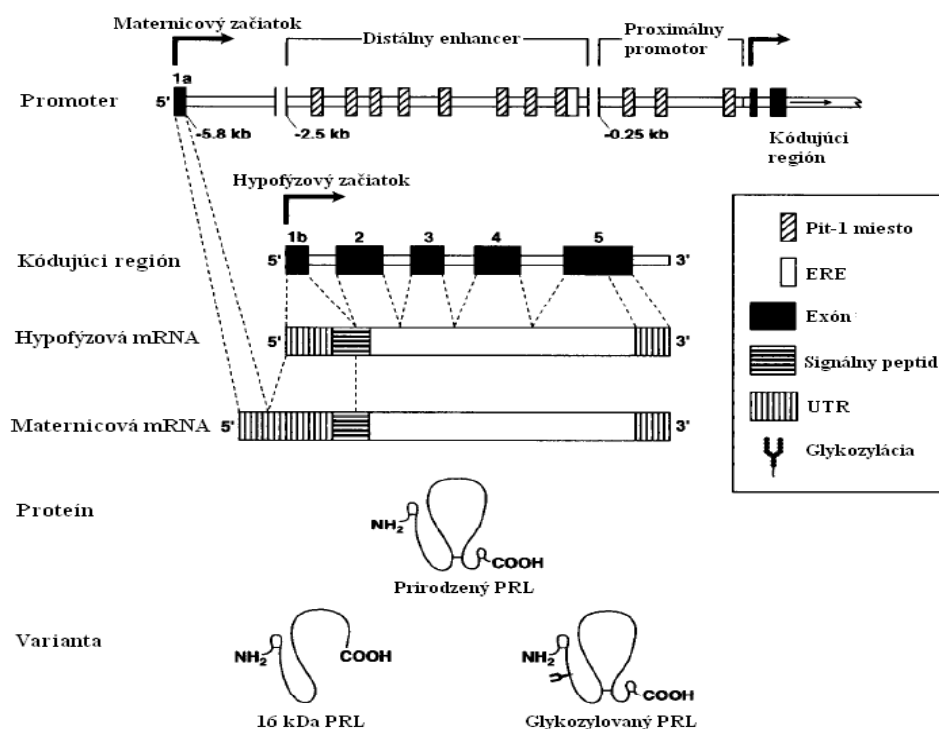
Široká distribúcia tkanív schopných PRL syntézy je ilustrovaná na obr. 2. Najdôležitejšie extrahypofýzové oblasti sú maternica, imunitný systém, mozog a myometrium, s ďalšími dokladmi PRL syntézy v koži a exokrinných žľazách, zahrňujúce prsné, potné a slzné (Ben.Jonathan et al., 1996).



Obr. 2: Distribúcia extrahypofýzového PRL v celom ľudskom tele. Štruktúry vymenované vľavo ukazujú tkanivá a bunky, ktoré produkujú PRL. Tie napravo znázorňujú tekutiny obsahujúce PRL (Ben-Jonathan et al., 1996).

1.2.2 Štruktúra génu a izoformy PRL

Gén *PRL* je prítomný ako jediná kópia na chromozóme 6. Zdieľa 40% homológiu s rastovým hormónom (GH) a placentálnym laktogénom, a tieto tri hormóny boli oddelené génovou duplikáciou zo spoločného génového predka zhruba pred 400 miliónmi rokmi (Miller & Eberhardt, 1983). Ľudský gén sa skladá skôr zo 6, ako z 5, exónov a je dlhý viac ako 15kb (Truong et al., 1984). Extra nekódujúci exón, exón 1a, má transkripčný začiatok 5,8kb upstream od hypofýzového začiatku (Berwaer et al., 1994) a je aktívny v mimohypofýzárnych tkanivách ako maternica, myometrium a lymfoidné bunky. Exón 1a je tu zostrihnutý k prvému hypofýzovému exónu 1b, čo generuje RNA transkript približne o 150 bp dlhší ako hypofýzový (Gellersen et al., 1989), líšiaci sa len v 5'-neprekladanej oblasti (Obr. 3) (Ben-Jonathan et al., 1996). Využitie alternatívneho promotora pri transkripcii v maternici a ďalších mimohypofýzárnych tkanivách poukazuje na tkanivovo-špecifický mechanizmus kontroly expície génu *PRL*. Napr., lymfocytická expícia *PRL* je nezávislá na Pit-1 transkripčnom faktore, ktorý je hlavným regulátorom transkripcie *PRL* v hypofýze (Gellersen et al., 1994; Berwaer et al., 1994).



Obr. 3: Diagram ľudského *PRL* génu, mRNA, proteínu a vybraných variant PRL. Znázornené sú dve varianty PRL, vytvorené posttranslačnými modifikáciami: 16-kDa PRL vytvorený štiepením a redukciou, a glykozylovaný PRL s jednou N-glykozyláciou na pozícii 31 (Ben-Jonathan, 1996).

PRL existuje v niekoľkých izoformách, podľa variácií v posttranslačných modifikáciách. Tieto varianty sa viažu na rozličné receptory a majú inú bioaktivitu (Chikanza, 1999; Peeva & Zouali, 2005). Napr. 16-kDa PRL je zaujímavý pre svoju antiangiogenickú aktivitu. Bol detekovaný v hypotalame (Torner et al., 1995), hypofýze, a séru (Sinha et al., 1985), zahŕňajúc asi 1% z celkovej sekrécie PRL. 16-kDa PRL inhibuje bazálny a FGF-stimulovaný rast kapilárnych endoteliálnych buniek (Clapp et al., 1993). Tvorba 22-kDa formy je zas závislá na pohlaví a je stimulovaná estrogénom a utlmovaná dopamínom (Anthony et al., 1993). Paradoxne, veľmi nízke hladiny dopamínu sa zdajú mať stimulačný účinok na uvoľňovanie PRL (Burriss et al., 1992).

1.2.3 Úloha PRL v imunite

Rozpoznanie PRL ako imunitného cytokínu sa vyvíjalo pomaly, lebo jeho syntéza imunitnými bunkami je veľmi slabá, tieto bunky sú vysoko heterogénne a klidové bunky normálne vyžadujú aktiváciu k expresii PRL (Ben-Jonathan, 1996). Spomedzi rastových faktorov, insulin (Stanley, 1988) a EGF (epidermálny rastový hormón) (Murdoch et al., 1982) stimulujú, zatiaľ čo TGF- β (transforming growth factor- β) utlmuje (Delidow et al., 1991) gén *PRL* (Ben-Jonathan, 1996).

PRL je mitogenný pre lymfocyty. PRL môže tiež poskytovať ochranu proti letálnym efektom salmonely zvýšením fagocytickej kapacity peritoneálnych makrofágov (Di Carlo et al., 1993). V natural killer bunkách, ktoré chránia proti infekci a nádorovému rastu, PRL zvyšuje expresiu IL-2 receptorov, zosilňuje bunečnú odpoveď na IL-2 a stimuluje tvorbu kolónií a cytotoxicitu (Matera et al., 1991). Ako väčšina cytokínov, PRL nepôsobí sám, ale vyžaduje kostimulátory (Ben-Jonathan, 1996).

PRL má antiapoptotický efekt sprostredkovaný CD40 na B bunkách a CD40L na T bunkách s následným zvýšením expresie antiapoptotickej molekuly Bcl-2. Tento efekt chráni autoreaktívne B bunky pred negatívnou selekciou a znižuje autotoleranciu (Orbach & Shoenfeld, 2007).

Bolo zistené, že malé hladiny cirkulujúceho PRL sú nevyhnutné na udržiavanie normálnej imunokompetencie (Nagy et al., 1983; Berczi et al., 1983). Avšak výsledky štúdie Brand et al. (2004) zdôrazňujú, že vysoké hladiny PRL môžu zvýšiť zápalové imunitné odpovede, naznačujúc účasť v poruchách imunity u ľudí. Zvýšené koncentrácie sérového PRL často korelujú s abnormalitami v imunitnej odpovedi. Brand et al. (2004) demonštrovali, že

PRL, sám alebo v kombinácii s LPS (lipopolysacharid), spôsobuje zvýšenie väzbovej aktivity transkripčných faktorov NFκB (nuclear factor κB) a IRF-1 (interferon regulatory factor 1), ktoré sú známe podporovaním sekrécie TNF-α (tumor necrosis factor-α) a IL-12. Tieto údaje naznačujú, že PRL podporuje pro-zápalové imunitné odpovede prostredníctvom NFκB a IRF-1, čo môže postihovať patofyziologické procesy vo fyziologických hyperprolaktémických štádiách (Bramd et al., 2004).

1.2.4 PRL a autoimunitné ochorenia

Hyperprolaktinémia bola detekovaná v orgánovo-špecifických ochoreniach, ako diabetes mellitus typu 1, Gravesova choroba, Hashimotova tyroidída, Addisonova choroba, lymfocytická hypofysitída, celiakia a skleróza multiplex (zhrnuté v Orbach & Shoenfeld, 2007), tak ako aj v rôznych systémových autoimunitných poruchách (systémový lupus erythematosus (SLE), reumatoidná artritída (RA)) (Jara et al., 2008). Fakt, že PRL-antagonizujúce lieky sú schopné zlepšiť klinický stav, len podporuje hypotézu o účasti PRL v procesoch vedúcich k autoimunitným fenotypom (McMurray, 2001a).

Vzťah medzi PRL a imunitnými ochoreniami môže byť vysvetlený aj tým, že ľudský PRL gén je lokalizovaný na krátkom ramienku 6. chromozómu blízko HLA regiónu (Vera-Lastra et al., 2002). Je dobre známe, že niektoré antigény HLA komplexu sú spojované s vyššou frekvenciou viacerých autoimunitných chorôb. Súčasné štúdie našli väzbovú nerovnováhu medzi génom *PRL* a génmi pre MHC proteíny (major histocompatibility complex), o ktorých je známe, že sú asociované s reumatoidnou artritídou a systémovým lupusom erythematosus (Brennan et al., 1997).

Stevens et al. demonštrovali funkčne signifikantný polymorfizmus -1149G/T SNP lokalizovaný v GATA mieste väzby transkripčného faktoru, ktoré mení aktivitu PRL promotora a hladiny mRNA v lymfocytoch u SLE pacientov (Stevens et al., 2001). Frekvencia G alely tohoto polymorfizmus v lymfocyt-špecifickom promotore pre PRL je pomerne zvýšená u pacientov s lupusom, naznačujúc jej asociáciu s ochorením. Podobné pozorovania boli v súčasnosti publikované aj v pacientoch so sklerózou multiplex (Baranzini et al., 2000).

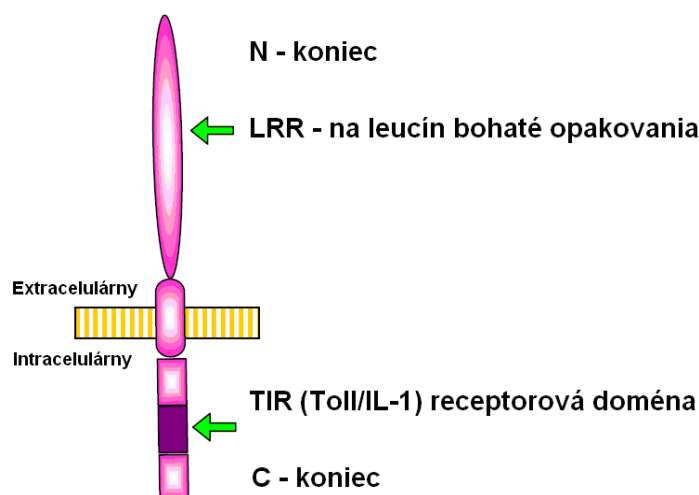
Vyššia incidencia autoimunitných chorôb medzi ženami naznačuje, že pohlavie môže byť rizikový faktor vo vývoji autoimunitných ochorení. Sexuálne hormóny, hlavne estrogén a prolaktín, sú zahrnuté v modulácii imunitnej odpovede (McMurray, 2001b). V mnohých

autoimunitných ochoreniach je hladina kortizolu subnormálna. Zvýšené hladiny PRL môžu urýchliť imunitnú odpoveď v pacientoch s nízkymi hladinami kortizolu. Kortikosteroidy antagonizujú stimulačný efekt PRL (Chikanza, 1999).

1.3 Toll-like receptory (TLRs); TLR2 a TLR4

1.3.1 Štruktúra a výskyt TLRs

TLRs tvoria rodinu transmembránových receptorov typu I, ktoré sú charakterizované extracelulárnou doménou bohatou na opakovania leucínu (LRR – leucine-rich repeat) a intracelulárnou Toll/interleukín (IL)-1 receptorovou (TIR) doménou (Obr. 4) (Medzhitov et al., 1997). U cicavcov je najmenej 11 TLRs, a každý sa zdá mať rôznu funkciu v rozpoznávaní patogénov (Akashi-Takamura & Miyake, 2006). TLRs sú exprimované v rôznych imunitných bunkách ako sú B bunky, dendritické bunky, makrofágy a špecifické typy T-buniek, a sú evolučne konzervované medzi hmyzom a stavovcami (Rock et al., 1998). Okrem buniek imunitného systému sú prítomné v epiteliálnych bunkách kože, dýchacom, intestinálnom a močopohlavnom systéme, čím formujú prvú ochrannú bariéru proti vnikajúcim patogénom. Polarizovaná regulácia expsie TLR v epiteliálnych bunkách vysvetľuje, prečo zápalové odpovede zistia patogénnu ale nie symbiotickú baktériu (Sandor & Buc, 2005b).



Obr. 4: Štruktúra ľudského TLR. Ľudské TLRs sú transmembránové proteíny typu I s extracelulárnou LRR doménou a cytoplazmatickou TIR doménou, ktorá je homologická k doméne IL-1 receptoru (Sandor & Buc, 2005a).

1.3.2 Signálne dráhy TLRs

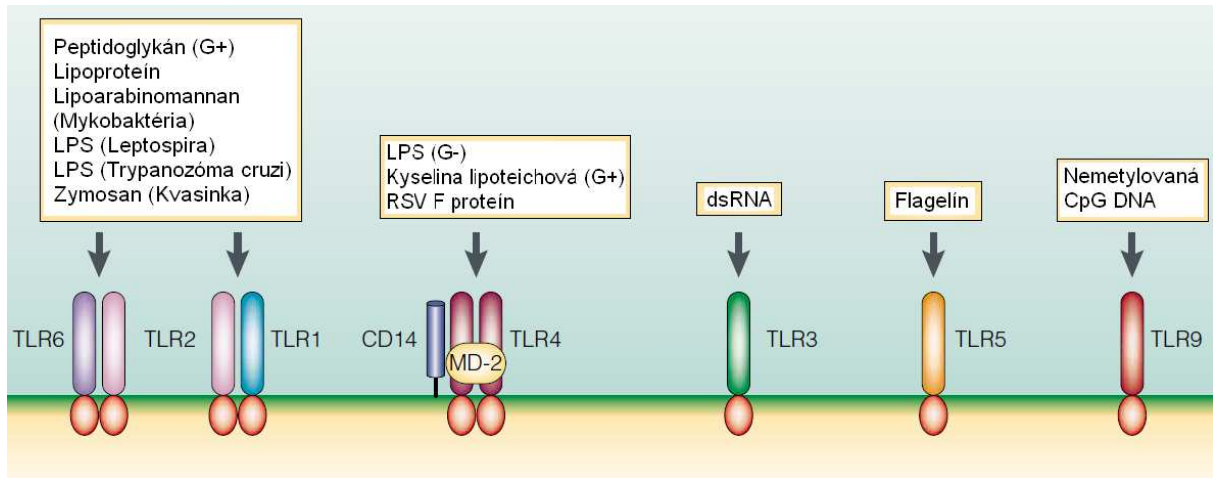
Aktivácia Toll-like receptorov rôznymi ligandmi spúšťa signálnu kaskádu vedúcu k produkcii cytokínov a iniciácii adaptívnej imunitnej odpovede (Takeda & Akira, 2001). Aktivácia signál-prenosovej dráhy TLRs vedie k indukcii viacerých génov, ktoré fungujú v obrane organizmu, zahŕňajúc zápalové cytokíny, chemokíny, hlavný histokompatibilný komplex (MHC) a kostimulačné molekuly. Cicavčie TLRs tiež indukujú viaceré efektorové molekuly ako syntázu oxidu dusičného a antimikrobiálne peptidy, ktoré môžu priamo ničiť mikrobiálne patogény (Thoma-Uszynski et al., 2001).

TLR signálna dráha je vyžadovaná pre ochranu proti infekčným ochoreniam, ale prehnaná signalizácia môže viesť k alergiám, autoimunitným ochoreniam, alebo ateroskleróze. Bolo publikovaných niekoľko deficiencií signálnych molekúl dráhy TLRs a polymorfizmov TLRs ovplyvňujúcich rozpoznávanie alebo signalizáciu, ktoré u ľudí spôsobujú imunodeficiencie. Niekoľko štúdií opísalo, že genetické variácie v TLRs menia citlivosť k infekciám, založenú na špecifických patogénoch rozpoznávaných TLRs (Akashi-Takamura & Miyake, 2006).

Väčšina ligandov TLRs sú mikrobiálne produkty, ktoré sú konzervované medzi druhmi patogénov. Štruktúry založené na lipidoch sú rozpoznávané TLR2 (ktorý je kombinovaný s TLR1 alebo TLR6 ako heterodimér) a TLR4 (ako homodimér). U TLR2 bolo ukázané, že je spojený s rozpoznávaním veľkého okruhu mikrobiálnych produktov, zahŕňajúc: peptidoglykan gram-pozitívnych baktérií (Takeuchi et al., 1999a; Schwandner et al., 1999), bakteriálne lipoproteíny (Takeuchi et al., 2000; Aliprantis et al., 1999; Brightbill et al., 1999), lipoarabinomannan bunečnej steny mykobaktérií (Means et al., 1999; Underhill et al., 1999a), GPI (glykofosfoinozitol) lipid trypanozómy *Cruzi* (Hajjar et al., 2001) a bunečných stien kvasiniek (Underhill et al., 1999b) (Obr. 5). Toto neobvykle široké množstvo ligandov rozpoznávaných TLR2 je zčasti vysvetlené kooperáciou medzi TLR2 a najmenej dvoma ďalšími TLR: TLR1 a TLR6 (Ozinsky et al., 2000; Takeuchi et al., 2001). TLR4 viaže endotoxín lipopolysacharid z vonkajšej membrány gram-negatívnych baktérií. TLR2 je mapované na 4q32, TLR4 sa nachádza na 9q33-35 (Rock et al., 1998; Takeuchi et al., 1999b).

Ľudský TLR4 bol prvý charakterizovaný Toll-like receptor u cicavcov (Medzhitov et al., 1997). Rozpoznanie LPS receptorom TLR4 je komplexné a vyžaduje niekoľko prídavných molekúl. LPS je najprv naviazané na sérový proteín, LBP (LPS-viazajúci proteín), ktorého funkciou je prenášať LPS monoméry k CD14 (Wright et al., 1989). CD14 je vysoko-afinitný

LPS receptor, ktorý môže byť buď sekretovaný do séra, alebo exprimovaný ako GPI-viazaný proteín na povrchu makrofágov (Wright et al., 1990).



Obr. 5: Špecifické ligandy TLRs. TLRs rozoznávajú rozličné molekulárne vzory asociované s patogénmi. Rozpoznaniu LPS pomocou TLR4 je napomáhané dvoma prídavnými proteínmi: CD14 a MD-2 (myeloid differentiation protein 2). TLR2 rozoznáva široký okruh štruktúrne nepríbuzných ligandov a funguje v kombinácii s niekoľkými (ale nie všetkými) ďalšími TLRs, zahŕňajúc TLR1 a TLR6. TLR3 je spojovaný s rozoznaním dvojreťazcovej RNA. TLR5 je špecifický pre bakteriálny flagelín, zatiaľčo TLR9 je receptor pre nemetylované CpG motívy, ktoré sú hojné v bakteriálnej DNA. G+, Gram-pozitívne; G-, Gram-negatívne; GPI, glykofosfoinozitol; RSV, respiračný syncytiálny vírus (Medzhitov, 2001).

1.3.3 Úloha TLR2 a TLR4 v imunitnej odpovedi

Nezrelé dendritické bunky (DCs) spočívajúce na periférii sú neschopné aktivovať T-bunky. Keď nastane infekcia, mikrobiálna prítomnosť je detekovaná pomocou TLRs exprimovaných na DCs a ďalších bunkách, ako napr. na monocytoch. Na základe rozpoznania svojich ligandov, TLRs iniciujú signálne procesy, ktoré vedú k dozrievaniu DCs, zapríčiňujú up-reguláciu MHC molekúl naložených peptidmi získanými z patogénov, a povrchovú expresiu CD80 a CD86 (Banchereau & Steinman, 1998). Kontrola kostimulačných molekúl expresie na DC sprostredkovaná TLRs hrá kľúčovú úlohu v aktivácii T buniek (Chandrashekar & Medzhitov, 2004).

Monocyty a makrofágy sú hlavnými producentmi prezápalových cytokínov (Woollard a Geissmann, 2009; Tabas, 2010) a exprimujú CD14 a TLRs receptory na svojom povrchu

(Uematsu a Akira, 2006). Tieto receptory sú schopné aktivovať viaceré gény, ktoré kódujú prezápalové cytokíny (napr. IL-1 β a IL-6), adhezívne a kostimulačné molekuly ako odpoveď na patogény alebo molekulárne vzory asociované s patogénmi (Takeda a Akira, 2005).

CD14 sa považuje za prvý rozpoznávajúci receptor vyžadovaný na rozpoznanie väčšiny bakteriálnych molekúl (Dziarsky et al, 2000; Pugin et al., 1994) a umožňuje expresiu zápalových molekúl prostredníctvom aktivácie TLRs (Segura et al., 2002). Regulácia TLRs zahŕňa niekoľko mechanizmov, napr. produkciu protizápalových cytokínov (hlavne IL-10), alebo TLRs homológov, ktoré priamo interagujú s TLR signálnym komplexom, čo vyúsťuje v negatívnu reguláciu TLRs. Produkcia týchto negatívnych regulátorov zabezpečuje správnu reguláciu pre- a proti-zápalovej rovnováhy (Liew, 2005). Dasu a Jialal (2011) ukázali, že vysoké hladiny glukózy indukujú TLRs expresiu, aktivitu a zápal prostredníctvom NF- κ B a uvoľňovaním cytokínov (Dasu a Jialal, 2011).

V štúdií Devaraj et al. (2007) je detekovaná expresia a signalizácia TLR2 a TLR4 zvýšená v pacientoch s T1D a prispieva k predzápalovému štádiu. V ďalšej štúdií Du et al. (2009) odhalili vyššiu expresiu TLR4 na monocytoch LADA a T2D, naznačujúc že LADA a T2D majú zvýšenú citlivosť na LPS. CD14, kľúčový koreceptor vyžadovaný na TLR4 transdukcii (Obr. 5), bol tiež viac exprimovaný na cirkulujúcich monocytoch u diabetických pacientov (Du et al., 2009).

2. Hypotézy a ciele diplomovej práce

Naším cieľom bolo rozšíriť vedomosti o aktivácii expresie TLR2, TLR4 a periférneho prolaktínu a ich úlohe v autoimunitných reakciách pomocou nasledujúcich cieľov:

1) Alela G -1149 G/T polymorfizmu v mimohypofyzárnom promotore *PRL* génu bola v niekoľkých predchádzajúcich štúdiách asociovaná s niektorými autoimunitnými ochoreniami (SLE, RA). Predpokladali sme vyšší výskyt G alely v skupine pacientov s autoimunitným diabetom.

Ciel: Detekcia funkčného SNP -1149 G/T:

- i) Porovnať zastúpenie SNP -1149 G/T v sledovanej skupine diabetických pacientov a kontrolných skupín
- ii) Zistiť, či *PRL* -1149 G/T polymorfizmus má vplyv na mieru expresie *PRL* mRNA v monocytoch jednotlivých študovaných skupín

2) Prolaktín je známy svojimi imunoregulačnými a hlavne imunostimulačnými účinkami. Môžeme teda predpokladať jeho účasť v autoimunitných procesoch, čo bolo potvrdené už u orgánovo-špecifických ochorení ako systémový lupus (SLE) a revmatoidná artritída (RA), hoci sa jednalo o prolaktín sérový.

Ciel: Porovnanie množstva exprimovanej mRNA *PRL*, TLR2 a TLR4 pomocou real-time PCR:

- i) U pacientov s autoimunitným typom diabetu bola očakávaná vyššia expresia mRNA *PRL*, TLR2 a TLR4 ako u zdravých kontrol a pacientov s neautoimunitným postihnutím

3) Toll-like receptory rozoznávajú patogény vstupujúce do organizmu a spúšťajú adaptívnu imunitnú odpoveď. Ich zvýšená expresia poukazuje na aktiváciu monocytov v dôsledku zvýšenej produkcie zápalových cytokínov, chemokínov a hlavného histokompatibilného komplexu (MHC). Očakávali sme preto, že TLR2 a TLR4 budú exprimované vo vyššej miere u pacientov s autoimunitným typom diabetu v porovnaní s kontrolnými súbormi

Ciel: FACS analýza expresie TLR2 a TLR4 na membráne CD14+ monocytov:

- i) Porovnať aktivitu prirodzeného imunitného systému medzi jednotlivými študovanými skupinami stanovením percenta monocytov exprimujúcich TLR2 a TLR4 membránové receptory
- ii) Porovnať aktivitu monocytov medzi jednotlivými študovanými skupinami stanovením percenta TLR2^{high} (TLR4^{high}) vs. TLR2^{low} (TLR4^{low}) expresie

3. Materiál a metódy

3.1 Materiál a pacienti

3.1.1 Pacienti

V rozmedzí rokov 2008-2010 bol vytvorený súbor pacientov s autoimunitným diabetom z Fakultnej nemocnice Kráľovské Vinohrady (FNKV) v Prahe. Pacienti podstúpili odbery krvi, z ktorých potom boli uskutočnené laboratórne testy a mi. analyzované hladiny C-peptidu a autoprotílátok GADA a IA-2. Podľa hodnôt C-peptidu a veku nástupu diabetu sme potom rozdelili pacientov na T1D a LADA. Počty zastúpené v jednotlivých skupinách sú zobrazené v tabulke 2. Celkom sme analyzovali 30 T1D, z toho 18 mužov a 12 žien v celkovom vekovom rozmedzí 19 – 85 rokov, a 21 LADA pacientov, 10 mužov a 11 žien v celkovom vekovom rozpätí 46 – 83 rokov.

Tab. 2 Sledovaný súbor pacientov

PACIENTI	muži	ženy	celkom
počet T1D	18	12	30
priemerný vek (rozptyl)	44,44 (19 – 85)	54,25 (23 – 81)	48,37 (19 – 85)
počet LADA	10	11	21
priemerný vek (rozptyl)	60,9 (46 – 83)	70,2 (58 – 82)	65,55 (46 – 83)

3.1.2 Kontroly

Použili sme dva kontrolné súbory: prvý, tvorený staršími pacientmi trpiacim inými komplikáciami ako autoimunitné ochorenie, a druhý, tvorený zdravou populáciou darcov krvi, ktorý majú odlišný vekový priemer od nami študovaného súboru. V rokoch 2006-2010 bol vytvorený kontrolný súbor pozostávajúci z pacientov hospitalizovaných na FNKV z iných dôvodov ako autoimunitné ochorenie. Súbor tvorí 22 mužov vo veku 40 – 87 rokov a 24 žien vo veku 51 – 92 rokov. Túto skupinu sme v štatistickom spracovaní rozdelili na dve: pacienti s T2D a pacienti s nediabetickým ochorením (neDM) (Tab. 3).

Tab. 3 Kontrolný súbor neautoimunitných pacientov

KONTROLY I		muži	ženy	celkom
T2D	počet	13	10	23
	priemerný vek (rozptyl)	60,77 (40 – 87)	70,4 (51 – 84)	64,96 (40 – 87)
neDM	počet	9	14	23
	priemerný vek (rozptyl)	67,56 (54 – 80)	77,5 (60 – 92)	73,61 (54 – 92)

V roku 2010 bol spracovaný kontrolný súbor zdravých darcov krvi. Boli využité vzorky krvi (buffy coat) darcov z transfúzneho oddelenia Fakultnej nemocnice Kráľovské Vinohrady v Prahe. Súbor obsahuje 60 jedincov, z čoho je 40 mužov vo veku 19 – 59 rokov a 20 žien vo veku 21 – 56 rokov. Údaje sú zhrnuté v tabuľke 4.

Tab. 4 Kontrolný súbor zdravej populácie

KONTROLY II	muži	ženy	celkom
počet	40	20	60
priemerný vek (rozptyl)	40,6 (19 – 59)	33,65 (21 – 56)	38,28 (19 – 59)

3.1.3 Použité prístroje

Automatická pipeta jednokanálová Biopette A (1000-5000 µl); Labnet, Poľsko

Automatické pipety jednokanálové Discovery⁺ (0,1-2; 0,5-10; 2-20; 20-200; 100-1000ul);

HTL Lab Solutions, Poľsko

Elektroforetické vane; Sigma Aldrich, Nemecko

Chladená centrifúga Z 300 K; Hermle, Nemecko

Kombinovaná chladnička; Whirlpool, USA

Laminárny box Aura Mini; BioAir, Taliansko

Minicentrifúga Z 100 M; Hermle, Nemecko

Mraziaci box Premium U410; New Brunswick Scientific, Veľká Británia

Nanofotometer; Implen, Nemecko

Systém pre elektroforézu; Sigma Aldrich, Nemecko

Termostat BT 120 M; Laboratorní Prístroje Praha, Česko

ThermoCycler C 1000; Bio-Rad, USA

Rúra mikrovlnná; Zanussi, Taliansko

UV Kamera; Syngene, Veľká Británie
UV Transluminátor; Claremont, USA
Váhy digitálne; KERN, Nemecko
Vortex – Genie 2; Scientific Industries, USA
Zdroj napätia pre elektroforézu PowerPac; Bio-Rad, USA
7000 SDS ABI Prism; Applied Biosystems, USA
Prietokový cytometer FACSCalibur; Becton-Dickinson

3.1.4 Použité počítačové programy

Excel; Microsoft Corporation, USA
GeneSnap; SynGene, Veľká Británie
GraphPad Prism 5; GraphPad Software Inc., USA
NanoPhotometer™ PVC Software 5.2.2.2; Implen, Nemecko
7000 Sequence Detection Software 1.2.3, RQ Study Application; Applied Biosystems, USA
CellQuestPro, Becton Dickinson, USA
WinMDI ver 2.9, Joseph Trotter, <http://facs.scripps.edu/software.html>

3.1.5 Všeobecne použité chemikálie

Etanol 96%; lekárne FNKV, Česko
Etanol 70%; nariadený 96% etanol
Voda – PCR ultra H₂O; Top Bio, Česko
Voda (Water - DNase, RNase - None detect); Sigma Aldrich, Nemecko

3.2 Určenie SNP -1149G/T v promotore génu *PRL*

Detekciu tohoto polymorfizmu sme robili pomocou restriktívnej endonukleázy XapI, ktorá štiepi DNA v prítomnosti alely G. Pred samotnou restrikciou sme najprv museli vyizolovať DNA a amplifikovať ju. Informáciu o prítomnosti konkrétnej alely sme potom získali prostredníctvom rozdelenia fragmentov DNA v geli pri elektroforéze.

3.2.1 Izolácia DNA

Na izoláciu DNA sme použili periférnu krv odobranú pacientom a dodanú v skúmavke s antikoagulačnou úpravou (EDTA), prípadne buffy coaty od zdravých darcov.

Použité chemikálie:

QIAamp DNA Blood Mini Kit; Qiagen, Nemecko

- Buffer AL
- Buffer AW1 (koncentrát, ktorý sme nariadil etanolom podľa inštrukcií výrobcu)
- Buffer AW2 (koncentrát, ktorý sme nariadil etanolom podľa inštrukcií výrobcu)
- Buffer AE
- QIAGEN Protease (smícháme s Protease Solvent)
- Protease Solvent

Postup:

1. Na dno mikrocentrifúgačnej skúmavky sme napipetovali 20 μ l QIAGEN Protease.
2. Pridali sme 200 μ l plnej krvi (alebo buffy coatu).
3. Potom sme pridali 200 μ l Buffer AL a 15 sekúnd vortexovali.
4. Následne sme skúmavku inkubovali 10 minút pri 56°C.
5. Krátko sme ju zcentrifúgovali, aby sme odstránili kvapky z viečka.
6. Pridali sme 200 μ l 96% etanolu a vortexovali 15 sekúnd. Potom znovu krátko zcentrifúgovali.
7. Zmes sme opatrne preniesli na kolónku, tak aby sme nezašpinili okraje skúmavky.
8. Centrifúgovali sme 1 minútu pri 6000g. Filtrát sme vyhodili a kolónku umiestnili do čistej zbernej skúmavky.
9. Kolónku sme opatrne otvorili a pridali 500 μ l Buffer AW1. Potom zavreli a 1 minútu centrifúgovali pri 6000g. Opäť sme vyhodili filtrát a kolónku premiestnili do novej zbernej skúmavky.
10. Kolónku sme znovu otvorili, pridali 500 μ l Buffer AW2, zavreli a centrifúgovali 3 minúty pri 18000g.
11. Filtrát sme vyhodili a kolónku premiestnili do novej zbernej skúmavky. Opatrne sme pridali 200 μ l vody (PCR ultra H₂O).
12. Inkubovali sme 1 minútu pri izbovej teplote a potom centrifúgovali 1 minútu pri 6000g.

13. Filtrát (získanú DNA) sme prepipetovali do kryoskúmavky a uchovávali pri 4°C.

3.2.2 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

PCR sme použili na amplifikáciu 137bp dlhého úseku promotorovej oblasti obsahujúceho detekovaný polymorfizmus.

Použité chemikálie:

PCR reakčný kit; Fermentas, Kanada

- Taq DNA Polymerase (rekombinantná) 500u, 5u/ul
- 10x Taq Buffer s (NH₄)₂SO₄
- 25 mM MgCl₂

Primery; East Port Praha, Česko

- Primer R 5´ - CAT CTC AGA GTT GAA TTT ATT TCC TT -3´
- Primer F 5´ - GCA GGT CAA GAT AAC CTG GA -3´
- Pôvodnú koncentráciu 100 µM sme nariedili 2x.

- V jednom z primerov sa nachádza artificieľne štiepne miesto pre XapI, vďaka čomu dôjde pri optimálne fungujúcej reakcii k odštiepeniu 17bp dlhému fragmentu bez ohľadu na genotyp.
dNTP; Fermentas, Kanada

- Pôvodná koncentrácia 100 mM bola nariedená na koncentráciu 10mM.

Postup:

1. Všetky reagenty okrem Taq polymerázy sme nechali rozmraziť na ľade a prípravu reakčnej zmesi vykonávali v laminárnom boxe.
2. Reakčnú zmes sme pripravili podľa tabuľky (Tab. 5). Zmes sme urobili tiež pre jednu negatívnu a jednu pozitívnu kontrolu.
3. Zmes sme zvortexovali a pripravili si skúmavky pre vzorky.
4. Do každej skúmavky sme dali 20µl reakčnej zmesi.
5. Mimo laminárny box sme pridali 0,5µl DNA, do negatívnej kontroly vodu a premiešali pipetou.

Tab. 5 Zloženie reakčnej zmesi pre PCR pre jednu reakciu.

Komponenty	Objem (μ l)
Voda (PCR ultra H ₂ O)	14,76
25mM MgCl ₂	2
dNTPs Mixture (10mM každý dNTP)	0,4
Forward Primer (50 μ M)	0,32
Reverse Primer (50 μ M)	0,32
10x PCR Buffer s (NH ₄) ₂ SO ₄	2
Taq DNA Polymerase (5U/ μ l)	0,2
Celkom	20

6. V termocykléri sme nastavili podmienky reakcie:

1. krok (počiatočná denaturácia): 2 minúty pri 94°C
 2. krok (denaturácia): 17 sekúnd pri 94°C
 3. krok (hybridizácia): 17 sekúnd pri 55°C
 4. krok (extenzia): 17 sekúnd pri 72°C
- (Kroky 2, 3 a 4 sa opakovali 35x)
5. krok (konečná extenzia): 1 minúta pri 72°C

7. Akonáhle sa veko nahrialo, vložili sme dnu vzorky a nechali proces bežať. PCR produkty sme uchovávali pri 4°C, pre dlhodobjšie uskladnenie sme zvolili -20°C. Prítomnosť amplifikátu žiadaného úseku DNA sme potvrdili elektroforeticky – vid' kapitola 3.2.4.

3.2.3 Polymorfizmus dĺžky restriktčných fragmentov (RFLP)

Po overení kvality produktov PCR sme vyhovujúce vzorky použili na restriktčné štiepenie enzýmom XapI, ktorý štiepi DNA v prítomnosti alely G a odštiepuje zo 137kb dlhého PCR produktu kontrolný 17kb fragment.

Použité chemikálie:

XapI (ApoI) Kit; Fermentas, Kanada

- XapI (ApoI) 500u, 10u/ μ l

- 10x Buffer Tango

25mM MgCl₂; Fermentas, Kanada

Postup:

1. Reagencie (okrem enzýmu, ktorý sme vybrali z mrazničky až bezprostredne pred použitím) sme nechali rozmraziť na ľade.
2. Reakčnú zmes sme pripravili podľa tabuľky (Tab. 6).

Tab. 6 Zloženie reakčnej zmesi pre jednu RFLP reakci.

Komponenty	Objem (µl)
Voda (PCR ultra H ₂ O)	2,5
25mM MgCl ₂	1,5
10x Buffer Tango	0,5
XapI restriction endonuclease	0,5
Celkom	5,0

3. Zmes sme zvortexovali a pripravili si skúmavky pre vzorky.
4. Do každej skúmavky sme napipetovali 5µl zmesi.
5. Potom sme pridali 5µl PCR produktu a premiešali pipetou.
6. V termocykléri sme nastavili nasledovné podmienky reakcie:
 1. krok (restrikcia): 120 minút pri 37°C
 2. krok (denaturácia enzýmu): 25 minút pri 80°C
7. Naštiepenú DNA sme uchovávali pri 4°C, dlhodobejšie pri -20°C. Genotyp jednotlivých vzoriek sme zistili pomocou elektroforézy (viď kapitola 3.2.4.).

3.2.4 Elektroforetická separácia

Pomocou elektroforézy sme hodnotili kvalitu PCR produktov a zisťovali prítomnosť konkrétnej alely. V prípade alely T vznikli 2 fragmenty dlhé 17bp a 120bp. U alely G vznikli 3 fragmenty – 17bp, 35bp a 85bp. Na géli sme potom videli u homozygota TT výrazný 120bp fragment, u homozygota GG fragment dlhý 85bp a u heterozygota GT sme pozorovali 2 fragmenty - 120bp a 85bp, pričom 120bp fragment bol výraznejší. Na PCR produkty sme používali 2% agarózový gél a na produkty z RFLP potom 3% agarózový gél.

Použité chemikálie:

Agaróza (NuSieve 3:1 Agarose); Lonza, USA

10 x TBE pufr (Tris-borátový pufr) – pripravený zmiešaním 500ml destilovanej vody, 108g Tris, 55g kyseliny boritej a 40 ml EDTA a doplnením vodou na 1000ml.

- 890 mM Tris base; Roth, Nemecko

- 890 mM kyselina boritá; Amresco, USA

- 20 mM EDTA pH=8; Lekárň FNKV, Česko

Destilovaná voda; Ardeapharma, Česko

PCR Ehtidium bromidTB; Top-Bio, Česko

6X Loading Dye Solution; Fermentas, Kanada

Marker pUC19 DNA/MspI; Fermentas, Kanada

Postup:

1. Navážili sme 2g agarózy (resp. 3g) a rozpustili ju v 100ml TBE pufru.

2. Potom sme roztok prevarili v mikrovlnnej rúre a následne pridali 4 μ l ethidium bromidu. Premiešali, naliali do vaničky a vložili hrebene pre vytvorenie požadovanej veľkosti a počtu jamiek. Gél sme následne nechali stuhnúť.

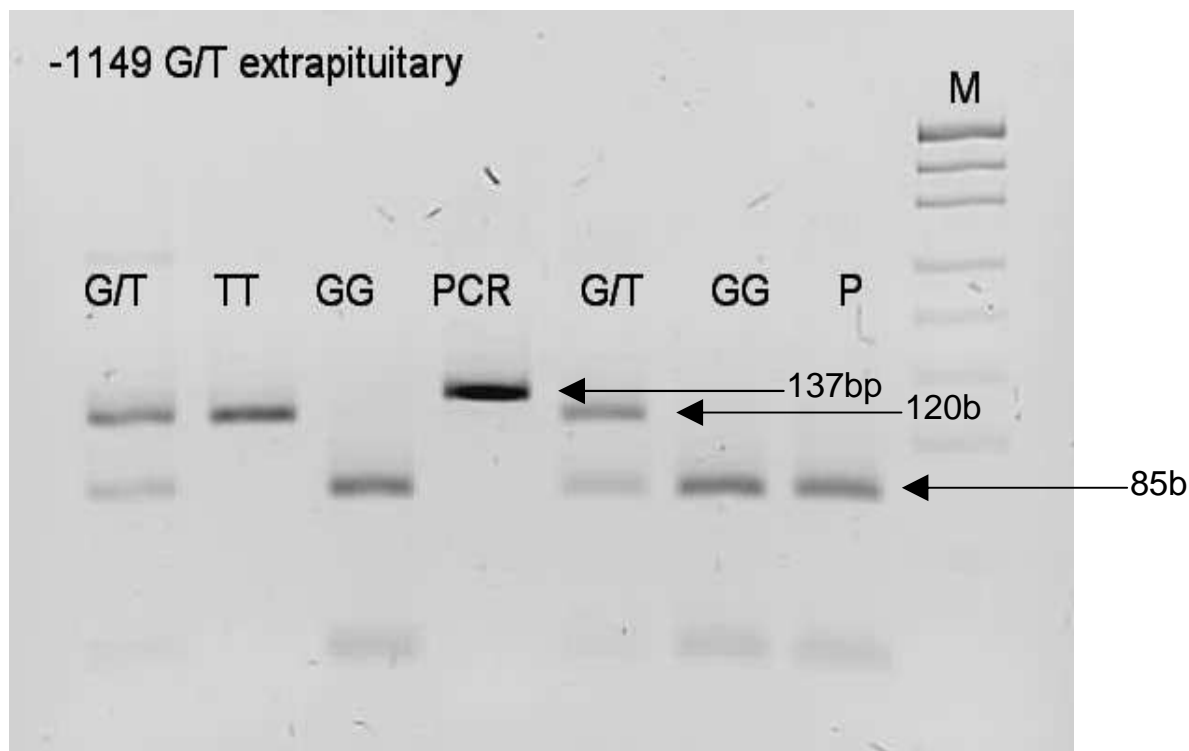
3. Elektroforetickú vaňu sme naplnili TBE pufrom.

4. Stuhnutý gél sme vložili do vane a dbali na to, aby bol celý ponorený v TBE pufri.

5. Do jamiek sme naniesli 5 μ l PCR produktu (resp. 10 μ l produktu restričného štiepenia) spolu s 2 μ l nanášacieho farbiva. Do prvej jamky sme naniesli negatívnu kontrolu a do poslednej sme napipetovali 1,2 μ l markru. Medzi produkty restričného štiepenia sme dali PCR produkt (pre kontrolu štiepenia) a tiež pozitívnu kontrolu s už určeným genotypom.

6. Elektroforéza prebiehala 30 minút pri stejnosmernom napätí o veľkosti 5 V/cm.

7. Po skončení sme gél skúmali pod UV kamerou, ktorá nám umožnila výsledok elektroforézy zviditeľniť, vyfotiť a ďalej spracovať. Snímok sme spracovávali v programe GeneSnap. Príklad výstupu z RFLP je na obrázku (Obr. 6).



Obr. 6: Príklad výsledkov genotypizácie polymorfizmu -1149 G/T. M – marker, P – pozitívna kontrola, PCR – produkt PCR, T – alela T, G – alela G.

3.3 Štúdium expresie PRL, TLR2 a TLR4 na úrovni mRNA

Z periférnej krvi pacientov alebo buffy coatu darcov krvi sme vyizolovali monocyty pomocou magnetických guľičiek. Nasledovala izolácia RNA a jej prepis do cDNA. Táto potom bola použitá pre real-time PCR. Sledovali sme relatívnu expresiu mRNA génov pre PRL, TLR2 a TLR4. Ako endogennú kontrolu sme použili PGK1 (fosfoglycerát kináza 1). Získané údaje boli následne štatisticky vyhodnotené.

3.3.1 Magnetická separácia monocytov

Monocyty z periférnej krvi (dodaná v skúmavke s antikoagulačnou úpravou, tzn. kyselinou etyléndiaminotetraoctovou - EDTA) boli separované pomocou magnetických guľičiek Dynabeads s naviazanou protilátkou anti-CD14. Celá separácia prebiehala na ľade.

Použité chemikálie:

Dynabeads CD14; Invitrogen, USA

PBS pH=7,4 (Phosphate Buffered Saline); Invitrogen, USA

RNAlater Solution; Ambion, USA

Postup:

1. V 50ml skúmavke sme zmiešali 8ml krvi a 8ml PBS (4ml buffy coat a 8ml PBS).
2. Pridali sme 70 μ l guličiek Dynabeads.
3. Zavretú skúmavku sme nechali inkubovať na ľade 5 minút za občasného premiešavania.
4. Potom sme odšroubovali viečko a skúmavku ním len prikryli. Postavili sme ju na 3 minúty tesne vedľa magnetu, ktorý je tiež v nádobe s ľadom.
5. Skúmavku sme nechali v blízkosti magnetu a pipetou odsali zmes PBS a krvi. Na stene skúmavky zostali prichytené značené bunky.
6. Odoberali sme skúmavku, doplnili 15ml PBS a obsah premiešali.
7. Skúmavku sme znovu postavili na 3 minúty k magnetu.
8. Odsali sme všetku tekutinu.
9. Kroky 6, 7 a 8 sme zopakovali ešte raz.
10. K bunkám v skúmavke sme pridali 1ml RNAlateru a niekoľkokrát premiešali špičkou, aby sme zo steny skúmavky zmyli všetky bunky.
11. Suspenziu sme premiestnili do kryoskúmavky a uchovávali pri teplote -80°C.

3.3.2 Izolácia RNA

RNA bola izolovaná v laminárnom boxe z CD14+ buniek izolovaných z buffy coatu a uložených v RNAlateru, pri pacientoch z FNKV ihneď následne po izolácii CD14+ buniek z krvi. Izolácia prebiehala cez kolónky so silikagélou membránou dodávané v reakčnom kite na izoláciu RNA. RNA sa zachytí na membráne, kde je pomocou pufrov zbavená kontaminujúcich látok. Následne je pomocou vody uvoľnená z membrány do roztoku.

Použité chemikálie:

RNeasy Mini Kit; Qiagen, Nemecko

- Buffer RLT
- Buffer RW1
- Buffer RPE (koncentrát, ktorý sme nariadili etanolom)
- RNase-free water

Postup:

1. CD14+ bunky v RNAlateru sme nechali rozmraziť pri izbovej teplote.
2. Bunky sme zcentrifugovali pri 8250g 10 minút.
3. Supernatant sme odsali pipetou.
4. Pridali sme 600µl Buffer RLT a premiešali pipetou.
5. Bunky sme zhomogenizovali pomocou injekčnej ihly a striekačky – 10x nasat' a vypustiť späť. Potom sme zmes preniesli do ependorfky.
6. Pridali sme 600µl 70% etanolu a premiešali pipetou.
7. 700µl vzorku sme preniesli na kolónku (tá je vsadená v zbernej skúmavke), bez zašpinenia okrajov. Centrifúgovali sme 30 sekúnd pri 18000g. Filtrát sme vyliali, zbernú skúmavku osušili a použili ďalej.
8. Do kolónky sme pridali 700µl Buffer RW1 a centrifúgovali 30 sekúnd pri 18000g. Zbernú skúmavku s filtrátom sme vyhodili.
9. Kolónku sme umiestnili do novej zbernej skúmavky. Pridali sme 500µl Buffer RPE a opäť centrifúgovali 30 sekúnd pri 18000g. Filtrát sme vyliali a zbernú skúmavku použili znovu.
10. Pridali sme ďalších 500µl Buffer RPE a centrifugovali 2 minúty pri 18000g. Filtrát sme vyliali a zbernú skúmavku vrátili pod kolónku. Následne sme centrifúgovali 1 minútu, aby sme sa úplne zbavili Buffer RPE. Potom sme zbernú skúmavku vyhodili.
11. Kolónku sme umiestnili do novej čistej skúmavky. Pridali sme 100µl RNase-free water a inkubovali 2 minúty. Potom centrifúgovali 2 minúty pri 18000g a filtrát si ponechali. Kolónku sme vyhodili.
12. K filtrátu sme pridali 300µl Buffer RLT a 300µl 96% etanolu a premiešali pipetou.
13. Zmes sme preniesli na novú kolónku (700µl) a opakovali kroky 7-10.
14. Potom sme si vzali novú zbernú skúmavku a premiestnili do nej kolónku. Pridali sme 40µl RNase-free water a inkubovali 2 minúty. Následne sme centrifúgovali 2 minúty pri 18000g a filtrát (získanú RNA) prepipetovali do kryoskúmavky.
15. Na nanofotometri sme zmerali koncentráciu a čistotu. RNA a uchovávali pri -80°C.

3.3.3 Reverzne-transkriptázová polymerázová reťazová reakcia

Vďaka reverznej transkripcii sme získali cDNA, ktorú sme ďalej použili pri real-time PCR. Všetky komponenty sme pridávali do skúmavky v laminárnom boxe.

Použité chemikálie:

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems, USA

- 10x RT Buffer

- 25x dNTP Mix (100mM)

- 10x RT Random Primers

- MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/uL)

Postup:

1. Všetky komponenty kitu sme nechali roztopiť na ľade.
2. Podľa počtu reakcií sme pripravili základnú reakčnú zmes, v tabuľke (Tab. 7) je uvedené množstvo na jednu reakciu. Zmes pre každú vzorku sme pripravovali dvakrát, jednu bez reverznej transkriptázy. Táto reakcia slúžila ako negatívna kontrola.

Tab. 7 Zloženie reakčnej zmesi pre jednu reakciu RT-PCR.

Komponenty	Objem (µl)	
	Zmes s reverznou transkriptázou	Zmes bez reverznej transkriptázy
10x RT Buffer	2,0	2,0
25x dNTP Mix (100mM)	0,8	0,8
10x RT Random Primers	2,0	2,0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0	-
Voda (Water - DNase, RNase - None detect)	4,2	5,2
Celkom	10	10

3. Reakčnú zmes sme zvortexovali a udržovali na ľade.
4. Do každej skúmavky sme dali 10µl reakčnej zmesi.
5. Pridali sme toľko RNA, aby jej množstvo v reakcii bolo 20ng. Celkový objem reakcie sme doplnili vodou (Water - DNase, RNase - None detect) na 20µl.
6. Skúmavky sme zatvorili a krátko zcentrifúgovali. Uchovávali sme ich na ľade, až kým sme ich nevložili do termocykléru.

7. Nastavili sme program v termocykléru:

1. krok (hybridizácia s primermi): 10 minút pri 25°C

2. krok (extenzia): 30 minút pri 48°C

3.krok (denaturácia enzýmu): 5 minút pri 95°C

8. Skúmavky sme vložili do prístroja a spustili proces. Po skončení reakcie sme vzorky uchovávali pri - 20°C.

3.3.4 Polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase

V real-time PCR je cDNA amplifikovaná a zároveň, vďaka fluorescenčným sondám pre jednotlivé gény, je detekované aj jej množstvo v jednotlivých cykloch reakcie. Ako endogennú kontrolu sme použili PGK1, ktorá by mala byť exprimovaná v rovnakej miere vo všetkých bunkách. Získané údaje sme potom štatisticky analyzovali.

Použité chemikálie:

TaqMan Gene Expression Master Mix; Applied Biosystems, USA

Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix; Applied Biosystems, USA

- PGK1: Hs99999906_m1

- PRL: Hs00168730_m1

- TLR2: Hs00152932_m1

- TLR4: Hs00152939_m1

Postup:

1. Assays-on-Demand pre všetky 4 gény a cDNA sme nechali rozmraziť pri izbovej teplote.
2. Pre každý gén sme namiešali reakčnú zmes podľa tabuľky 8.

Tab. 8 Zloženie reakčnej zmesi pre Real Time PCR pre jednu reakciu.

Komponenty	Objem (µl)
TaqMan Gene Expression Master Mix	12,5
20x Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix	1,25
Voda (Water - DNase, RNase - None detect)	1,25
Celkom	25

3. Do 96-jamkovej doštičky sme napipetovali po 15µl zmesi pre daný gén podľa tabuľky 9. Reakcia bola robená v tripletoch.

Tab. 9 Príklad rozmiestnenia reakčných zmesí pre jednotlivé gény a cDNA pre jednotlivé vzorky (N znamená negatívnu kontrolu z RT-PCR).

PGK1			PRL			TLR2			TLR4		
G10	G10	G10	G10	G10	G10	G10	G10	G10	G10	G10	G10
G10N	G10N	G10N	G10N	G10N	G10N	G10N	G10N	G10N	G10N	G10N	G10N
H1	H1	H1	H1	H1	H1	H1	H1	H1	H1	H1	H1
H1N	H1N	H1N	H1N	H1N	H1N	H1N	H1N	H1N	H1N	H1N	H1N
H2	H2	H2	H2	H2	H2	H2	H2	H2	H2	H2	H2
H2N	H2N	H2N	H2N	H2N	H2N	H2N	H2N	H2N	H2N	H2N	H2N
H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3
H3N	H3N	H3N	H3N	H3N	H3N	H3N	H3N	H3N	H3N	H3N	H3N

4. cDNA sme 10x nariedili vodou (Water - DNase, RNase - None detect).

5. Do príslušných jamiek sme napipetovali 10µl nariedenej cDNA podľa Tab. 9 tak, aby v jamkách nevznikali bubliny.

6. Doštičku sme prelepili foliou a 2 minúty centrifugovali pri 500g.

7. Potom sme doštičku vložili do 7000 SDS ABI Prism a merali pomocou absolútnej kvantifikácie. Podmienky reakcie boli nastavené takto:

1. krok (zničenie prípadnej RNA): 2 minúty pri 50°C

2. krok (hot start): 10 minút pri 95°C

3. krok (denaturácia): 15 sekúnd pri 95°C

4. krok (hybridizácia, extenzia): 1 minúta pri 60°C

(Kroky 3 a 4 sa opakujú 50x)

8. Po dokončení reakcie sme uložili získané údaje pre následnú štatistickú analýzu.

3.3.4.1 Úprava získaných údajov z qPCR na ďalšie štatistické spracovanie

1. Pomocou Real Time PCR sme pre každý gén (*PRL*, *TLR2*, *TLR4*, *PGK1*) a vzorku vytvorili 3 technické triplety a získali tak 3 hodnoty Ct (cyklus PCR, v ktorom prekročí fluorescencia amplifikovaného templátu prahovú fluorescenciu), ktoré sme následne spriemerovali.

2. Gén *PGKI* nám slúžil ako endogenná kontrola. Priemernú hodnotu jeho Ct sme potom odpočítali od hodnoty príslušného nami sledovaného génu a dostali hodnotu dCt. Týmto sme získali relatívny rozdiel v expresii pozorovaného génu a endogennej kontroly v rámci jedného vzorku.
3. Nasledoval výpočet hodnôt 2^{-dCt} , ktoré určujú množstvo templátu vo vzorke.
4. Tieto hodnoty sme potom zlogaritmovali pomocou prirodzeného logaritmu (ln), aby sme sa zbavili odľahlých hodnôt.
5. Takto upravené údaje sme potom použili v štatistickom hodnotení.

3.4 FACS analýza

Z periférnej krvi pacientov alebo buffy coatu darcov krvi sme vyzolovali mononukleárne bunky pomocou ficoll gradientovej centrifúgy. Následne sme ich označili protilátkami pre CD14, TLR2 a TLR4 receptory. Vďaka fluorescencii sme potom na prietokovom cytometri zistili počty buniek so zvýšenou expresiou týchto receptorov na membráne.

3.4.1 Izolácia mononukleárnych buniek pomocou Ficoll gradientu

Bunky sme izolovali prostredníctvom ficoll gradientovej centrifúgy. Mononukleárne bunky vytvorili prstenec uprostred skúmavky, ktorý sme potom odsali pipetou.

Použité chemikálie:

PBS pH=7,4 (Phosphate Buffered Saline); Invitrogen, USA

Histopaque-1077; Sigma-Aldrich, Nemecko

Postup:

1. Do jednej skúmavky sme napipetovali 15 ml ficollu, do druhej 12 ml PBS, v ktorom sme následne nariedili 8 ml krvi. Pri práci s buffy coatom boli pomery roztokov 18:15:10 ml, resp.
2. Potom sme opatrne po stene skúmavky napipetovali roztok krvi a PBS do skúmavky s ficollom tak, aby vznikla ostrá hranica medzi týmito dvomi fázami a nezmiešali sa.
3. Nasledovala centrifugácia na slow programe 35 minút pri 500 rcf a 4°C.

4. Vytvorený prstenec mononukleárných buniek sme odobrali pipetou do novej skúmavky, doplnili PBS na 25 – 30 ml a jemným preklápaním bunky premyli.
5. Centrifúgovali sme 10 minút pri 1500 rpm a izbovej teplote.
6. Supernatant sme odliali a bunky uchytené na dne skúmavky zvortexovali.
7. Znovu sme doplnili PBS na 25 – 30 ml pre druhé premytie a centrifúgovali 10 minút pri 1200 rpm a izbovej teplote.
8. Odliali sme supernatant a bunky zvortexovali. Doplnili sme PBS na objem 1ml a premiešali pipetou.
9. Následne sme bunky spočítali pomocou Bürkeho komôrky.

3.4.2 Značenie buniek protilátkami a analýza na prietokovom cytometri

Vyizolované mononukleárne bunky sme označili fluorescenčnými protilátkami, aby sme ich mohli detekovať pomocou prietokového cytometra. Pre každú vzorku sme pripravili 3 skúmavky – neznačené bunky, značené s CD14-FITC a TLR2-APC, značené s CD14-FITC a TLR4-APC.

Použité chemikálie:

PBS pH=7,4 (Phosphate Buffered Saline); Invitrogen, USA

PBS bol pre potreby prietokovej cytometrie upravený na výsledné 0,5% FBS a 2mM EDTA.

Protilátky proti CD14-FITC, Exbio, ČR

TLR2-APC, eBioscience, USA

TLR4-APC eBioscience, USA

Postup:

1. Do každej skúmavky sme dali 2×10^6 buniek a objem doplnili PBS na 500 μ l.
2. Skúmavky sme zvortexovali a centrifúgovali 2 minúty pri 1800 rpm pri izbovej teplote.
3. Zliali sme supernatant, bunky zvortexovali a pridali 500 μ l PBS.
4. Skúmavky sme znovu zcentrifúgovali 2 minúty pri 1800 rpm a izbovej teplote.
5. Následne sme zas odliali supernatant a bunky zvortexovali.
6. Do prvej skúmavky s neznačenými bunkami sme pridali 500 μ l PBS, resuspendovali a dali ju do chladničky. Do druhej sme pridali 7 μ l CD14-FITC protilátky, 7 μ l TLR2-APC

protilátky a 100 μ l PBS. Do tretej skúmavky 7 μ l CD14-FITC protilátky, 7 μ l TLR4-APC protilátky a 100 μ l PBS.

7. Bunky sme nechali inkubovať s protilátkami 30 minút pri 4°C.

8. Následne sme ich 3x premyli v 500 μ l PBS 2-minútovou centrifugáciou pri 1800 rpm pri izbovej teplote a resuspendovali v 500 μ l PBS.

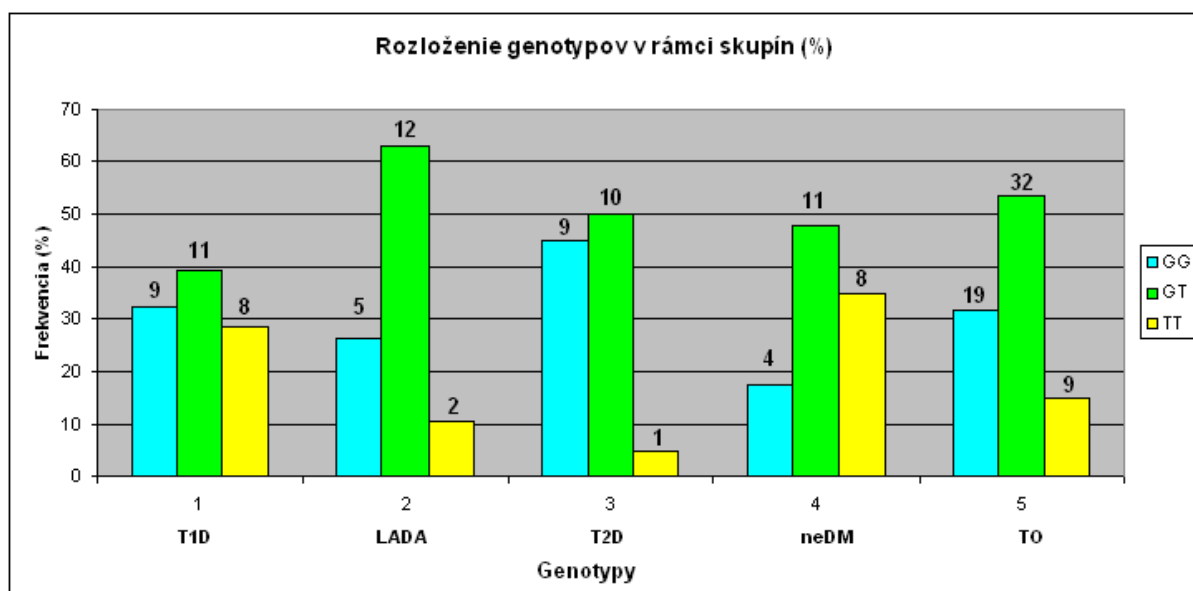
9. Cytometer sme nechali zdetekovať 30 000 buniek a údaje sme uložili pre ďalšie zpracovanie programom CellQuestPro.

4. Výsledky

4.1 Polymorfizmus -1149 G/T v mimohypofyzárnom promotore génu *PRL*

4.1.1 Vplyv polymorfizmu -1149 G/T na vývin autoimunitného diabetu

V grafe 1 je znázornené percentuálne zastúpenie jednotlivých genotypov, ktoré sme detekovali v extrahypofyzárnom promotore génu *PRL* u jednotlivých skupín pacientov a kontrol.



Graf 1: Percentuálne rozloženie genotypov v rámci skupín pacientov a kontrol. Nad jednotlivými stĺpcami sú číselne uvedené počty úspešne genotypizovaných jedincov v daných skupinách.

neDM – kontrolný súbor pacientov hospitalizovaných s iných dôvodov ako autoimunitné ochorenie

TO – kontrolný súbor zdravých darcov krvi

Pozorovali sme, či má G alela (genotypy GG a GT) vplyv na vývin autoimunitného diabetu (AD). Najprv sme porovnali T1D pacientov s LADA pacientami, ale nezistili sme

signifikantný rozdiel, preto sme tieto dve skupiny spojili do jednej – autoimunitný diabetes. Použili sme χ^2 - test na hladine významnosti 0,05. Porovnávali sme skupinu autoimunitného diabetu s ostatnými skupinami, ale signifikantný rozdiel sme nepreukázali ($p > 0,05$). Pomery šancí (OR) a intervaly spoľahlivosti (CI) sú uvedené v Tab. 10.

Tab. 10 Pomery šancí a intervaly spoľahlivosti u jednotlivých porovnávaní

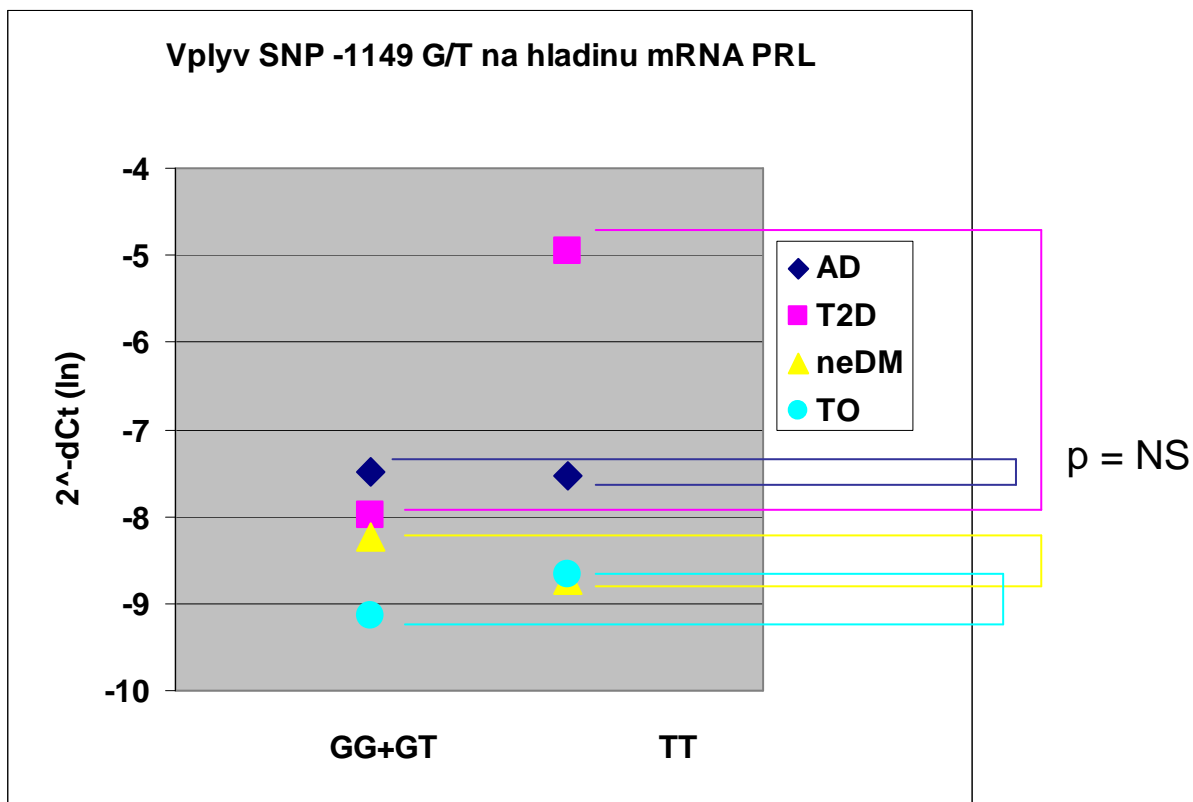
	Pomer šancí (OR)	Interval spoľahlivosti (CI)
AD vs. T2D	0,19	0,01-1,7
AD vs. neDM	1,97	0,57-6,86
AD vs. TO	0,65	0,22-1,96
AD vs. všetky kontroly	0,87	0,34-2,23

4.1.2 Vplyv polymorfizmu -1149 G/T na expresiu PRL na úrovni mRNA

Sledovali sme tiež vplyv SNP -1149 G/T na hladiny mRNA PRL u skupiny autoimunitného diabetu, T2D, skupiny pacientov s neautoimunitným ochorením (neDM) a u zdravých darcov krvi (TO) (Graf 2). Vzhľadom k veľkosti skupiny TT u T2D (N=1) nebolo možné štatisticky porovnať hladinu mRNA PRL expresie u T2D.

Na posúdenie rozdielov v expresii PRL medzi genotypmi GG a GT s genotypom TT u jednotlivých skupín pacientov a kontrol sme použili nepárový T-test s hladinou významnosti 0,05. Štatisticky významný rozdiel sme nepreukázali ani v jednom súbore, všetky p-hodnoty boli nesignifikantné. Signifikantný rozdiel sme nepreukázali ani pri porovnaní hladín mRNA PRL voči genotypom (GG+GT vs TT) v rámci všetkých sledovaných jedincov.

Skúmali sme aj vplyv tohto polymorfizmu na niektoré klinické znaky (hladina C-peptidu, TSH, trvanie a vek nástupu diabetu), ale nezistili sme žiadny signifikantný rozdiel. P-hodnoty, OR a CI sú uvedené v Tab. 11.



Graf 2: Vplyv polymorfizmu -1149 G/T na hladinu mRNA PRL.

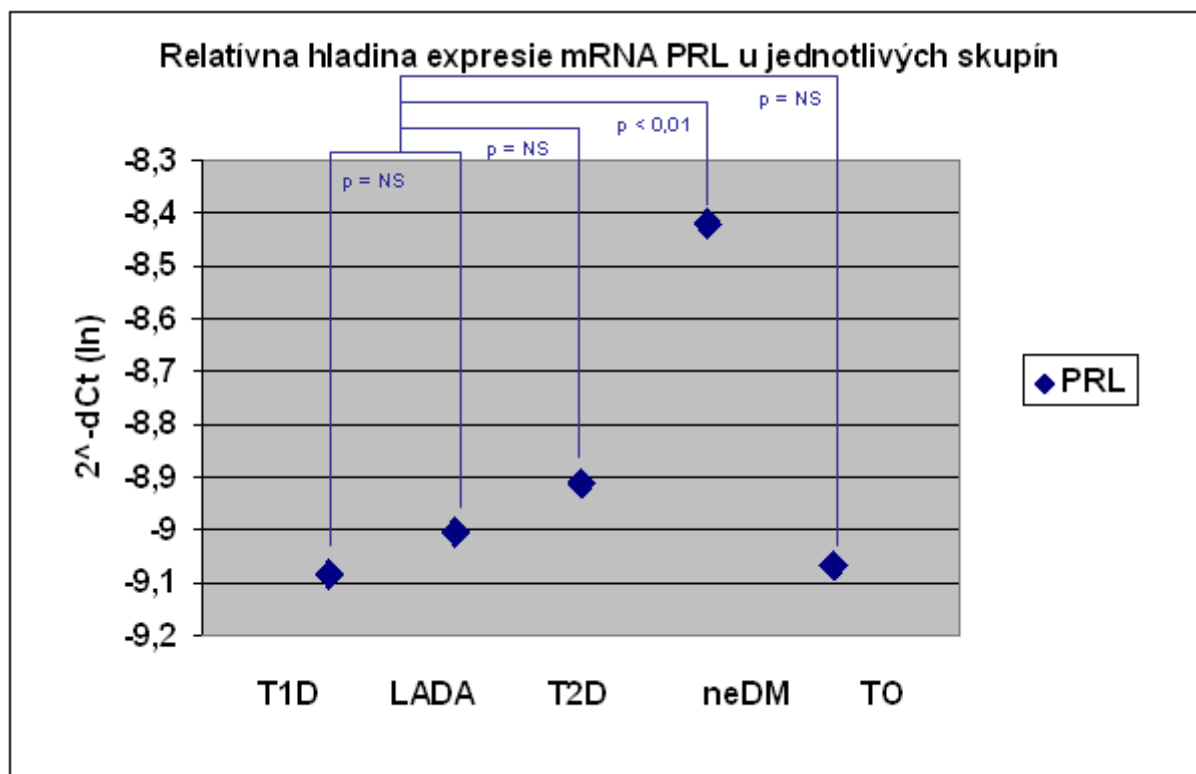
Tab. 11 P-hodnoty, pomery šancí (OR) a intervaly spoľahlivosti (CI).

	p-hodnota	OR	CI
CP	NS	0,26	0,01 – 2,65
TSH	NS	3	0,30 - 72
Trvanie diabetu (hranica 1 rok)	NS	1,96	0,18 – 49,66
Trvanie diabetu (hranica 5 rokov)	NS	0,76	0,12 – 5,06
Vek nástupu diabetu	NS	1,3	0,18 – 11,33

4.2 Real-time PCR

4.2.1 Relatívne hladiny expresie génu *PRL* na úrovni mRNA

Relatívne hladiny expresie mRNA *PRL* v CD14⁺ monocytoch sme porovnali medzi skupinou pacientov s autoimunitným diabetom a skupinami pacientov s T2D, pacientov s neautoimunitným ochorením a skupinou zdravých darcov krvi (Graf 3).



Graf 3: Relatívna hladina expresie mRNA PRL u jednotlivých sledovaných súborov.

Pre porovnanie jednotlivých skupín sme použili nepárový T-test, hladina významnosti 0,05. Najprv sme porovnali skupinu pacientov s T1D a skupinu pacientov s LADA. Nepreukázali sme žiadny signifikantný rozdiel medzi týmito súborami, preto sme ďalej pracovali so súborom AD vzniknutým zlúčením T1D a LADA súborov.

AD skupinu sme porovnali s kontrolnými súborami (T2D, neDM, TO). Signifikantný rozdiel sme zistili len pri porovnaní s neDM skupinou ($p < 0,01$), pričom u neDM bola expresia mRNA PRL zvýšená 1,076x oproti AD súboru. Jedinci v skupine neDM mali 1,077x (štatisticky nevýznamne) vyšší level expresie mRNA PRL ako sú fyziologické hodnoty namerané u darcov krvi. Pacienti s T1D vykazovali porovnateľnú expresiu mRNA PRL ako skupina TO. Spomedzi skupín diabetikov mali najvyššie hladiny mRNA PRL diabetici 2. typu (NS).

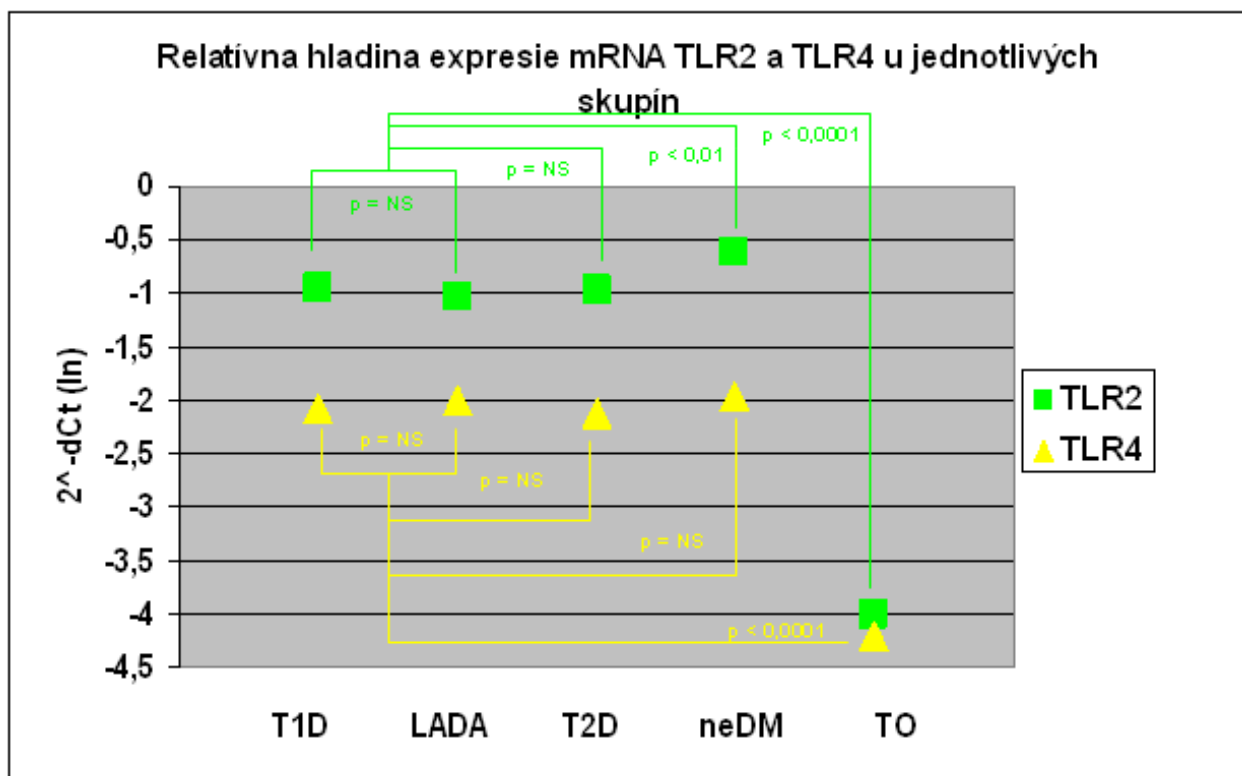
4.2.2 Relatívne hladiny expresie génov *TLR2* a *TLR4* na úrovni mRNA

Relatívne hladiny mRNA *TLR2* a *TLR4* v $CD14^+$ monocytoch sme opäť porovnali medzi súborami AD, T2D, neDM a TO pomocou nepárového T-testu.

Štatisticky významný rozdiel v expresii mRNA sme preukázali medzi AD a neDM súbormi u TLR2, pričom u neDM bola expresia zvýšená 1,58x. Ďalej sme zistili signifikantne zvýšené hladiny mRNA TLR2 a TLR4 u pacientov s autoimunitným diabetom v porovnaní so zdravými kontrolami (4,14x pre TLR2; 2,04x pre TLR4) a v porovnaní so všetkými kontrolnými súbormi dokopy (2,82x pre TLR2; 1,69x pre TLR4). Výsledné p-hodnoty sú zhrnuté v tabuľke č. 12 a grafické znázornenie hladín mRNA TLR2 a TLR4 jednotlivých skupín je vyznačené na grafe č. 4.

Tab. 12 P-hodnoty pre jednotlivé nepárové T-testy medzi rôznymi skupinami

	AD vs. T2D	AD vs. neDM	AD vs. TO	AD vs. T2D+neDM+TO
mRNA TLR2	NS	< 0,01	< 0,0001	< 0,0001
mRNA TLR4	NS	NS	< 0,0001	< 0,0001



Graf 4: Relatívna hladina expresie mRNA TLR2 a TLR4 u jednotlivých súborov.

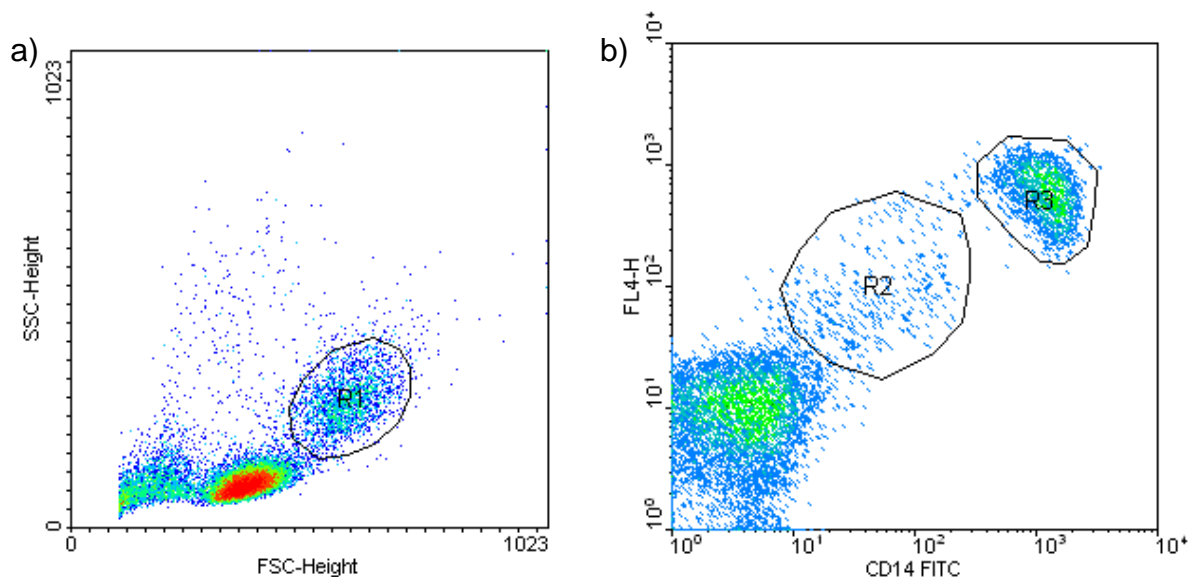
Skúmali sme aj rozdiely v expresii mRNA v súvislosti s klinickými údajmi, hladina CP (C-peptid) a TSH (tyroid stimulujúci hormón), trvanie a vek nástupu diabetu, ale žiadne štatisticky významné rozdiely sme nepreukázali.

Porovnali sme tiež skupinu zdravých darcov krvi s T2D a neDM skupinami. Signifikantné rozdiely sme zistili v expresii TLR2 aj TLR4 ($p < 0,0001$), pričom oproti T2D bola expresia TLRs u TO znížená 4,09x pre TLR2 a 1,98x pre TLR4 a oproti neDM 6,53x nižšia pre TLR2 a 2,15x pre TLR4 (Graf 4).

4.3 FACS analýza

Prietokovým cytometrom sme vždy nechali pretieť 30 000 buniek vyizolovaných pomocou ficol-gradientovej centrifugácie z periférnej krvi pacientov (alebo buffy coatu u TO). Na základe fyzických vlastností buniek (veľkosť vs. granularita) sme na grafe v CellQuestPro programe určili oblasť monocytov.

Meraním fluorescence značených primárnych protilátok sme získali údaje o počte buniek, ktoré exprimujú CD14, TLR2 a TLR4 receptory. Na grafe, ktorý znázorňoval závislosť fluorescence CD14-FITC protilátky a TLRs-APC protilátok (dvojité pozitívity), sme potom určili dve oblasti buniek: bunky s nízkou hladinou expície CD14 a TLRs receptorov ($CD14^{low}TLR^{low}$) a bunky s vysokou hladinou expície CD14 a TLRs receptorov ($CD14^{high}TLR^{high}$) (Obr. 7).



Obr. 7: a) Graf závislosti veľkosti a granularity. R1 oblasť ohraničuje monocyty. b) Graf dvojitej pozitivity CD14-FITC a TLRs-APC (osa y, FL4-H) protilátok. R2 je oblasť buniek s nízkou fluorescenciou protilátok, R3 s vysokou.

Údaje sme následne spracovali pomocou CellQuestPro programu, a ďalej potom štatisticky vyhodnotili jednotlivé skupiny pacientov a kontrol medzi sebou pomocou nepárového T-testu.

4.3.1 Porovnanie expresie TLR2 a TLR4 receptorov na povrchu monocytov

Expresiu TLR2 a TLR4 sme najprv porovnali medzi skupinami T1D a LADA, ale nezistili sme žiadny signifikantný rozdiel v expresii TLRs. Preto sme tieto dve skupiny spojili do jednej – autoimunitný diabetes (AD), a túto ďalej porovnávali so skupinami T2D, neDM a TO.

Medzi AD a T2D skupinami sme nezistili žiadny signifikantný rozdiel. Pri porovnaní s neDM skupinou sme zistili signifikantné rozdiely v počte monocytov, 2,46x viac u neDM, buniek s CD14^{high}TLR_{2;4}^{high} expresiou, 2,53x viac u neDM, a monocytoch CD14^{high}TLR_{2;4}^{high} expresiou, 3,35x viac u neDM. Zistené p-hodnoty a namerané počty buniek sú uvedené v tabuľke 13.

Tab. 13 Počty buniek a p-hodnoty jednotlivých typov buniek pri porovnaní skupiny autoimunitného diabetu a nediabetických pacientov

AD vs neDM		TLR2	TLR4
Monocyty	p	< 0,0001	< 0,0001
	b _{AD}	2191	2251
	b _{neDM}	5443	5482
Bunky s CD14 ^{high} TLR _{2;4} ^{high} expresiou	p	< 0,0001	< 0,0001
	b _{AD}	2292	2257
	b _{neDM}	5747	5772
Monocyty s CD14 ^{high} TLR _{2;4} ^{high} expresiou	p	< 0,0001	< 0,001
	b _{AD}	1367	1402
	b _{neDM}	4692	4620

p – p-hodnota, b – počet buniek

Porovnanie so skupinou zdravých kontrol odhalilo signifikantné rozdiely v počte monocytov, 2,1x viac u TO, buniek s CD14^{high}TLR_{2;4}^{high} expresiou, 1,82x viac u TO, monocytoch s CD14^{low}TLR_{2;4}^{low} expresiou, 1,07x viac u AD, a monocytoch s CD14^{high}TLR₂^{high} expresiou, 2,73x viac u TO a s CD14^{high}TLR₄^{high} expresiou 2,47x viac u TO. Zistené p-hodnoty a namerané počty buniek sú uvedené v tabuľke 14.

Tab. 14 Počty buniek a p-hodnoty jednotlivých typov buniek pri porovnaní skupiny autoimunitného diabetu a zdravých darcov krvi

AD vs TO		TLR2	TLR4
Monocyty	p	< 0,0001	< 0,0001
	b _{AD}	2191	2251
	b _{TO}	4728	4643
Bunky s CD14 ^{high} TLR _{2;4} ^{high} expresiou	p	< 0,0001	< 0,0001
	b _{AD}	2292	2257
	b _{TO}	4297	4007
Monocyty s CD14 ^{low} TLR _{2;4} ^{low} expresiou	p	< 0,001	< 0,01
	b _{AD}	398	438
	b _{TO}	386	393
Monocyty s CD14 ^{high} TLR _{2;4} ^{high} expresiou	p	< 0,0001	< 0,0001
	b _{AD}	1367	1402
	b _{TO}	3727	3475

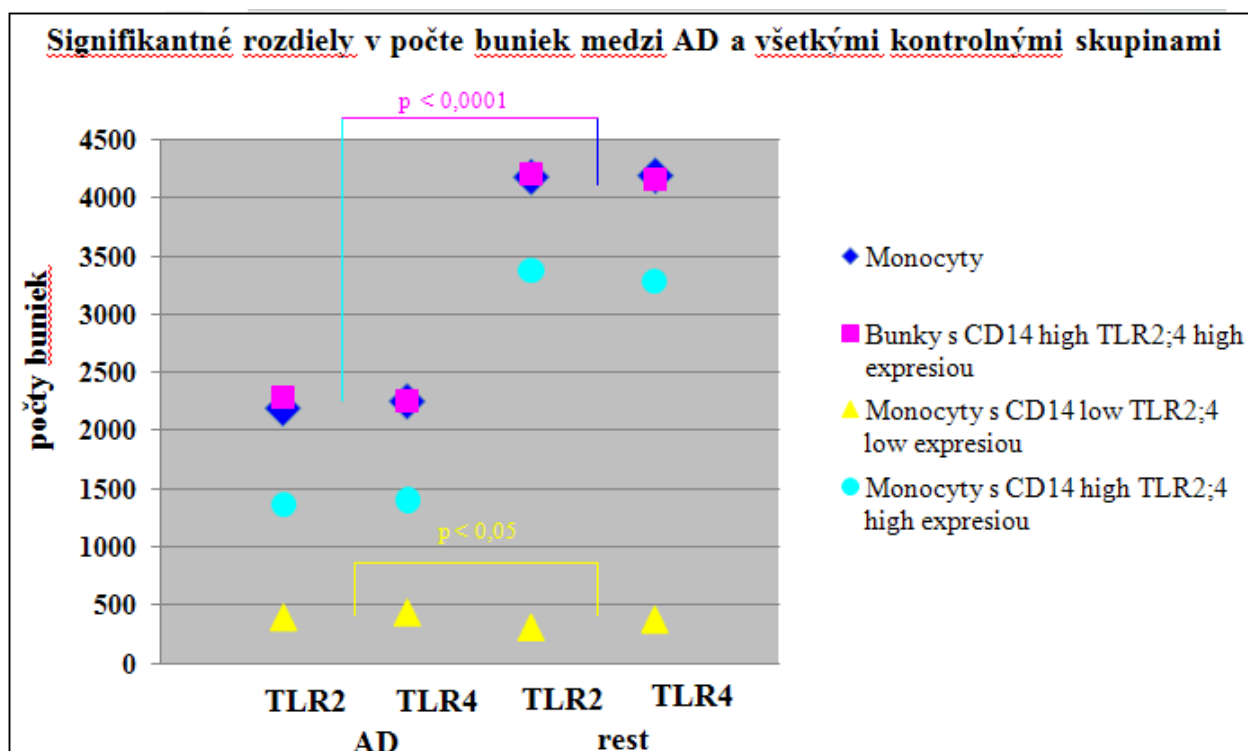
p – p-hodnota, b – počet buniek

Porovnaním AD so všetkými ostatnými skupinami dokopy (T2D, neDM, TO) sme zistili signifikantné rozdiely v počte monocytov, 2,06x viac u kontrol, buniek s CD14^{high}TLR_{2;4}^{high} expresiou, 1,87x viac u kontrol, monocytoch s CD14^{low}TLR_{2;4}^{low} expresiou, 1,12x viac u AD a monocytoch s CD14^{high}TLR_{2;4}^{high} expresiou, 2,6x viac u kontrol. Zistené p-hodnoty a namerané počty buniek sú uvedené v tabuľke 15 a znázornené v grafe 5.

Tab. 15 Počty buniek a p-hodnoty jednotlivých typov buniek pri porovnaní skupiny autoimunitného diabetu so všetkými kontrolnými súbormi dokopy

AD vs rest		TLR2	TLR4
Monocyty	p	< 0,0001	< 0,0001
	b _{AD}	2191	2251
	b _{rest}	4603	4547
Bunky s CD14 ^{high} TLR _{2;4} ^{high} expresiou	p	< 0,0001	< 0,0001
	b _{AD}	2292	2257
	b _{rest}	4370	4164
Monocyty s CD14 ^{low} TLR _{2;4} ^{low} expresiou	p	< 0,05	< 0,05
	b _{AD}	398	438
	b _{rest}	358	392
Monocyty s CD14 ^{high} TLR _{2;4} ^{high} expresiou	p	< 0,0001	< 0,0001
	b _{AD}	1367	1402
	b _{rest}	3683	3482

p – p-hodnota, b – počet buniek



Graf 5: Znázornenie signifikantných rozdielov počtu buniek pri porovnaní pacientov s autoimunitným diabetom so všetkými kontrolnými súbormi.

Porovnali sme tiež počet TLR2 a TLR4 exprimujúcich buniek medzi skupinov zdravých darcov krvi a T2D a neDM. Výsledky sú zhrnuté v tabuľkách č. 16, 17, 18. Pri porovnaní TO vs T2D nám vyšli signifikantne rozdielne takmer všetky typy buniek, okrem buniek s $CD14^{low}TLR_4^{low}$ expresiou. Monocyty boli 2x viac zastúpené u zdravých darcov krvi, bunky s $CD14^{low}TLR_2^{low}$ expresiou 1,5x viac, bunky s $CD14^{high}TLR_{2;4}^{high}$ expresiou 1,55x viac, monocyty s $CD14^{low}TLR_2^{low}$ expresiou 1,7x viac, zatiaľčo TLR_4^{low} expresiou 1,33x viac, a monocytov s $CD14^{high}TLR_{2;4}^{high}$ expresiou bolo u TO 2,1x viac ako u pacientov s diabetom typu 2 (Tab. 16).

Porovnanie zdravých kontrol s nediabetickými pacientami ukázalo, že neDM majú 1,36x viac buniek s $CD14^{low}TLR_4^{low}$ expresiou, 1,4x viac buniek s $CD14^{high}TLR_{2;4}^{high}$ expresiou a 1,3x viac monocytov s $CD14^{high}TLR_{2;4}^{high}$ expresiou, zatiaľčo v skupine TO sme namerali 1,2x viac monocytov s $CD14^{low}TLR_2^{low}$ expresiou oproti neDM skupine (Tab. 17).

Tab. 16 Počty buniek a p-hodnoty jednotlivých typov buniek pri porovnaní zdravých darcov krvi a T2D pacientov

TO vs T2D		TLR2	TLR4
Monocyty	p	< 0,0001	< 0,0001
	b _{TO}	4728	4643
	b _{T2D}	2371	2449
Bunky s CD14 ^{low} TLR _{2;4} ^{low} expresiou	p	< 0,05	NS
	b _{TO}	1534	
	b _{T2D}	1022	
Bunky s CD14 ^{high} TLR _{2;4} ^{high} expresiou	p	< 0,0001	< 0,01
	b _{TO}	4297	4007
	b _{T2D}	2562	2704
Monocyty s CD14 ^{low} TLR _{2;4} ^{low} expresiou	p	< 0,0001	< 0,0001
	b _{TO}	386	393
	b _{T2D}	225	294
Monocyty s CD14 ^{high} TLR _{2;4} ^{high} expresiou	p	< 0,0001	< 0,0001
	b _{TO}	3727	3475
	b _{T2D}	1705	1759

p – p-hodnota, b – počet buniek, NS – nesignifikantná p-hodnota

Tab. 17 Počty buniek a p-hodnoty jednotlivých typov buniek pri porovnaní zdravých darcov krvi a nediabetických pacientov

TO vs neDM		TLR2	TLR4
Bunky s CD14 ^{low} TLR _{2;4} ^{low} expresiou	p	NS	< 0,01
	b _{TO}		1437
	b _{neDM}		1952
Bunky s CD14 ^{high} TLR _{2;4} ^{high} expresiou	p	< 0,05	< 0,01
	b _{TO}	4297	4007
	b _{neDM}	5747	5772
Monocyty s CD14 ^{low} TLR _{2;4} ^{low} expresiou	p	< 0,01	NS
	b _{TO}	386	
	b _{neDM}	322	
Monocyty s CD14 ^{high} TLR _{2;4} ^{high} expresiou	p	< 0,05	< 0,05
	b _{TO}	3727	3475
	b _{neDM}	4692	4620

p – p-hodnota, b – počet buniek, NS – nesignifikantná p-hodnota

A nakoniec porovnanie TO skupiny so skupinami T2D a neDM dokopy nám prinieslo nasledujúce zistenia: buffy coaty jedincov zo skupiny zdravých darcov krvi obsahovali 1,1x viac monocytov, 1,35x viac monocytov s CD14^{low}TLR₂^{low} expresiou a 1,01x viac monocytov s CD14^{low}TLR₄^{low} expresiou (Tab 18).

Tab. 18 Počty buniek a p-hodnoty jednotlivých typov buniek pri porovnaní zdravých darcov krvi a skupiny T2D pacientov spojenej s nediabetickými pacientami

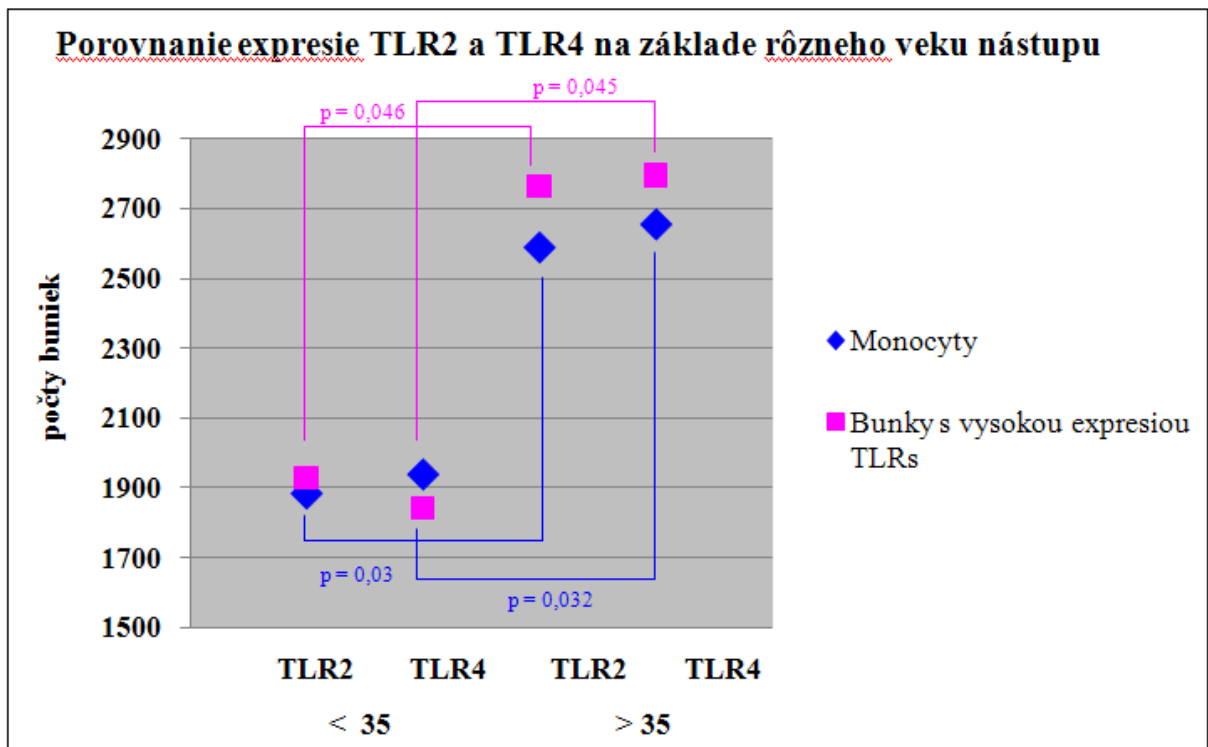
TO vs T2D+neDM		TLR2	TLR4
Monocyty	p	< 0,05	NS
	b _{TO}	4728	
	b _{T2D+neDM}	4291	
Monocyty s CD14 ^{low} TLR _{2;4} ^{low} expresiou	p	< 0,0001	< 0,05
	b _{TO}	386	393
	b _{T2D+neDM}	286	390

p – p-hodnota, b – počet buniek, NS – nesignifikantná p-hodnota

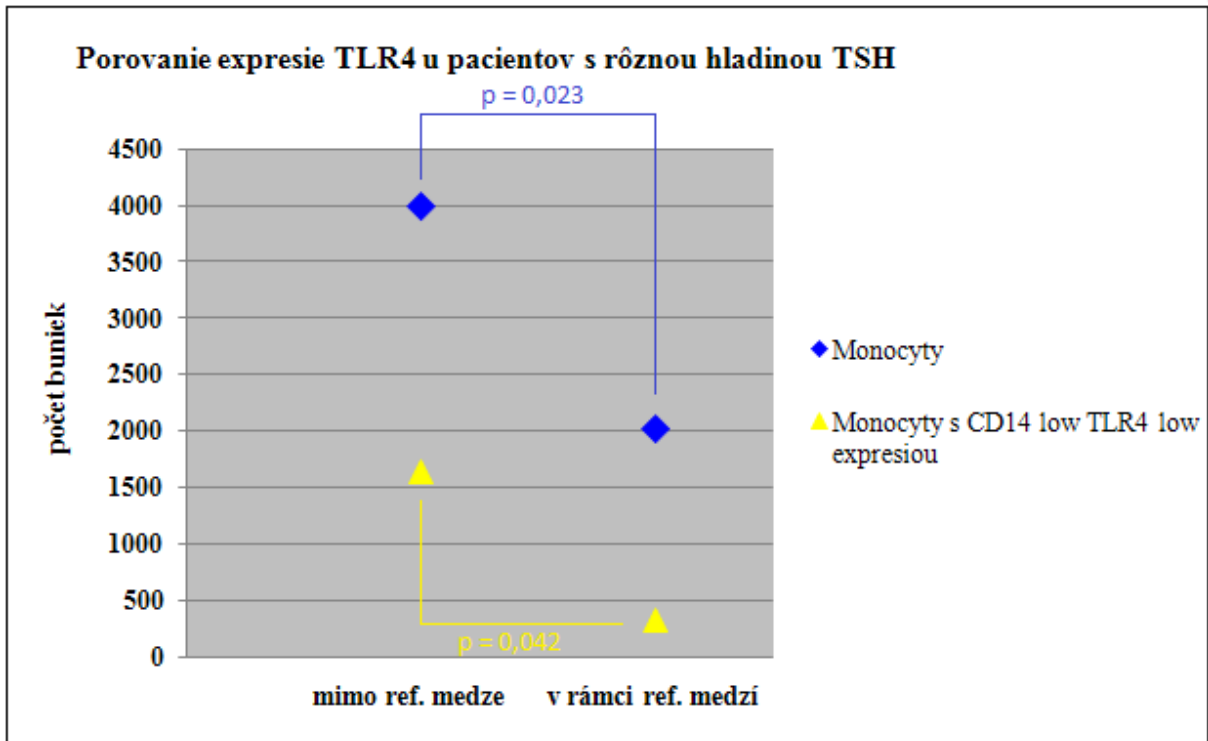
4.3.2 Porovnanie expresie TLR2 a TLR4 receptorov na základe klinických znakov

Expresiu TLR2 a TLR4 receptorov na monocytoch sme porovnávali u vybraných klinických znakov (hladina TSH a C-peptidu, vek nástupu a doba trvania diabetu) v skupine AD. Signifikantné rozdiely boli zistené u veku nástupu (hranica 35 rokov) a hladinách TSH (referenčné medze: 0,465 – 4,68). S ohľadom na vek nástupu boli detekované rozdiely v počte monocytov, 1,37x viac u pacientov s vekom nástupu nad 35 rokov ($p_{\text{TLR2}} = 0,03$; $p_{\text{TLR4}} = 0,032$) a v počte buniek s CD14^{high}TLR_{2;4}^{high} expresiou ($p_{\text{TLR2}} = 0,046$; $p_{\text{TLR4}} = 0,045$), pričom pacienti s vekom nástupu >35 rokov mali 1,47x vyšší počet buniek exprimujúcich receptory CD14 a TLR2, TLR4 (Graf 6).

V hladinách TSH sme zistili rozdiely len v expresii TLR4 receptorov, a to v počte monocytov, ktorých bolo 1,97x viac u pacientov s hladinami TSH v rámci referenčných medzí, ($p = 0,023$) a monocytov s CD14^{low}TLR₄^{low} expresiou, ktorých bolo 5x viac u pacientov s hladinami mimo referenčné medze TSH ($p = 0,042$). Výsledky sú zobrazené na grafe 7.



Graf 6: Porovnanie expresie TLR2 a TLR4 receptorov na povrchu mononukleárných buniek u pacientov s rôznym vekom nástupu diabetu.



Graf 7: Porovnanie expresie TLR4 na monocytoch medzi pacientmi s rôznymi hladinami TSH.

4.3.3 Korelácie hladín mRNA TLR2 a TLR4 a proteínov u jednotlivých sledovaných skupín

Hladinu mRNA a proteínov TLR2 a TLR4 exprimovaných v monocytoch s CD14^{low}TLR_{2;4}^{low} a CD14^{high}TLR_{2;4}^{high} expresiou sme porovnali pomocou korelácií. U jednotlivých skupín pacientov sme žiadnu signifikantnú koreláciu neodhalili. Slabú, ale štatisticky významnú pozitívnu koreláciu sme zistili v skupine TO u TLR2, p-hodnoty a Spearmanove koeficienty sú uvedené v tabuľke č. 19.

Tab. 19 P-hodnoty a Spearmanove koeficienty (r) pre TLR2 u TO skupiny

	p	r
mRNA TLR2 vs monocyty s CD14 ^{low} TLR _{2;4} ^{low} expresiou	0,0345	0,2735
mRNA TLR2 vs monocyty s CD14 ^{high} TLR _{2;4} ^{high} expresiou	0,0014	0,4023

Porovnaním hladín mRNA a proteínov TLR2 a TLR4 u všetkých pozorovaných skupín dokopy sme odhalili slabé, ale štatisticky významné negatívne korelácie u monocytov s CD14^{low}TLR_{2;4}^{low} expresiou u TLR2 aj TLR4. P-hodnoty a Spearmanove koeficienty sú uvedené v tabuľke č. 20.

Tab. 20 P-hodnoty a Spearmanove koeficienty (r) pre TLR2 a TLR4 u všetkých pozorovaných skupín jedincov

	p	r
mRNA TLR2 vs monocyty s CD14 ^{low} TLR _{2;4} ^{low} expresiou	0,0004	-0,3357
mRNA TLR4 vs monocyty s CD14 ^{low} TLR _{2;4} ^{low} expresiou	<0,0001	-0,3710

5. Diskusia

Porovnaním zastúpenia G alely polymorfizmu -1149 G/T mimohypofyzárneho promotora génu *PRL* sme sa pokúsili odhaliť spojitosť s vývinom autoimunitného diabetu, pretože tento SNP je asociovaný s niektorými ďalšími autoimunitnými ochoreniami ako SLE (Stevens et al., 2001; Fojtíková et al., 2010) a RA (Lee et al., 2009). Nepreukázali sme však žiadny signifikantný rozdiel medzi skupinou pacientov a kontrolnými súbormi. Toto naznačuje, že G alela tohto polymorfizmu zrejme nemá vplyv na vývin autoimunitného diabetu. Môže to byť spôsobené tým, že T1D je orgánovo špecifické ochorenie, zatiaľčo SLE a RA sú systémové. Autoimunitný proces sa u týchto ochorení teda objavuje častejšie, pričom u AD sa odohrá len na začiatku ochorenia. Po niekoľkých rokoch od nástupu diabetu už teda pankreas nemusí vykazovať žiadne príznaky zápalu a tiež hladiny autoprotilátok sú nízke. U SLE sa protilátky vracajú so stúpajúcou aktivitou ochorenia.

Ďalej sme zisťovali vplyv tohoto polymorfizmu na expresiu mRNA *PRL*. Tu sme taktiež nepreukázali štatisticky významný rozdiel v expresii medzi jednotlivými genotypmi. Z grafu 2 ale môžeme vidieť zvýšenie hladiny mRNA *PRL* u neDM. Toto sme žiaľ nemohli štatisticky potvrdiť, pretože v tejto skupine bol len jeden jedinec s TT genotypom, čo je nedostačujúce pre štatistickú výpoveď. Je patrné aj malé zvýšenie hladiny mRNA *PRL* pri GG a GT genotypoch u neDM skupiny. Títo pacienti netrpeli autoimunitnými poruchami, avšak u 4 (17%) bola prítomná hypotyreóza, ktorá sa zvykne zhoršovať stav pacientov s autoimunitnými chorobami. Väčšinou trpeli ICHS (ischemická choroba srdca) a chronickými pľúcnymi ochoreniami. V skupine autoimunitného diabetu nie je rozdiel patrný ani na grafe.

Na ďalšom grafe (Graf 3), ktorý porovnáva vplyv sledovaného SNP na expresiu mRNA u všetkých pozorovaných jedincov, zas vidíme veľmi nepatrné zvýšenie hladiny pri TT genotype. Ani toto však nie je štatisticky významné.

Skúmali sme tiež rozdiely v relatívnej hladine expresie *PRL*, TLR2 a TLR4 na úrovni mRNA. U prolaktínu sme zistili signifikantný rozdiel v expresii medzi skupinami AD a neDM, pričom pacienti s autoimunitným typom diabetu mali hladiny mRNA nižšie, čo sme neočakávali. Je otázne, čím to mohlo byť spôsobené, pretože pacienti v neDM skupine mali rozličné diagnózy, napr. chronické pľúcne ochorenia, hypotyreóza. Akbaş et al. (2010) zistili zvýšené hladiny *PRL* u pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc. Hekimsoy et al.

(2010) zase namerali zvýšené hladiny PRL u pacientov s hypotyreózou. Toto by mohlo vysvetľovať nami zistené zvýšené hladiny expresie PRL u neDM. Skupina zdravých darcov krvi mala hladiny mRNA PRL porovnateľné so skúmaným AD súborom.

Čo sa týka hladín expresie TLRs, potvrdili sme predchádzajúce zistenia publikácií Devaraj et al. (2007) a Du et al. (2009), kde odhalili zvýšenú expresiu TLR2 a 4 u T1D, a TLR4 u T2D a LADA, resp. Štatisticky významné rozdiely v expresii sme zistili medzi skupinami AD a neDM (len u TLR2), pričom vyššie hladiny sme detekovali u neDM pacientov. Signifikantné rozdiely sme odhalili tiež porovaním TO vs AD, TO vs T2D a TO vs neDM. Zdraví darcí krvi mali hladiny expresie TLR2 a TLR4 výrazne nižšie ako pacienti. Toto potvrdzuje náš predpoklad zvýšenej expresie toll-like receptorov u autoimunitného diabetu. Vysvetliť zvýšenie hladiny mRNA TLR2 u pacientov s neautoimunitným ochorením je problematické, pretože mali rôzne diagnózy. V štúdií Chávez-Sánchez et al. (2010) zistili, že CD14, TLR2 a TLR4 receptory sa podieľajú na imunitnej odpovedi proti mmLDL (minimally modified low-density lipoprotein) iniciáciou produkcie cytokínov v monocytoch a makrofágoch u pacientov s aterosklerózou. Jedným z hlavných ochorení v neDM skupine bolo ICHS, takže na zvýšení hladiny TLRs sa mohli podpísať podobné mechanizmy ako pri ateroskleróze. Je tiež možné, že pacienti v čase diagnózy prežívali nerozpoznanú infekciu Gram+ bakterií. Tie totiž poskytujú ligandy pre TLR2 receptory a zapríčiňujú ich zvýšenú expresiu.

Detekciou pomocou prietokového cytometra sme stanovili počty monocytov exprimujúcich TLR2 a TLR4 receptory na svojom povrchu. $CD14^{low}TLR_{2,4}^{low}$ expresia charakterizuje monocyty v neaktivovanom stave, zatiaľčo $CD14^{high}TLR_{2,4}^{high}$ expresia plne rozvinuté monocyty imunitnej odpovede. Signifikantné rozdiely sme zistili medzi skupinami AD a neDM, pričom neDM pacienti mali 2,46x viac monocytov celkovo a 3,35x viac monocytov s $CD14^{high}TLR_{2,4}^{high}$ expresiou. Toto odpovedá zisteniam z real-time PCR, kde sme detekovali zvýšenú hladinu TLR2 mRNA u neDM oproti AD skupine, avšak TLR4 expresia proteínu nesúhlasí s expresiou mRNA TLR4, ktorá nebola signifikantne rozdielna.

Porovnaním autoimunitných diabetikov so zdravými kontrolami sme odhalili, že AD pacienti majú 2,1x menej monocytov a 2,73x menej monocytov s $CD14^{high}TLR_2^{high}$ expresiou, 2,47x menej monocytov s $CD14^{high}TLR_4^{high}$ expresiou a 1,07x viac monocytov s $CD14^{low}TLR_{2,4}^{low}$ expresiou, čo síce vyšlo štatisticky významné, ale z biologického hľadiska sa nedá hovoriť o významnom rozdieli v expresii. Tieto údaje však nezodpovedajú údajom z real-time PCR, kde bola nameraná vyššia hladina mRNA u pacientov s autoimunitným

diabetom. Bolo by možné, že u monocytov s $CD14^{low}TLR_{2;4}^{low}$ expresiou je prítomná mRNA, ktorá ešte nie je translatovaná do proteínu, preto sme namerali nižšie hladiny proteínov na ich povrchu. Koreláciou hladín mRNA expresie a hladiny TLR2 a TLR4 exprimovaných na povrchu monocytov u všetkých jedincov dohromady sme tiež odhalili slabú štatisticky významnú negatívnu koreláciu. To by mohlo naznačovať, že u diabetikov by zrejme mohli byť TLR2 a TLR4 proteíny skladované v zásobných vezikulách a na povrch by sa uvoľnili až po určitom signále, čo by vysvetľovalo, prečo sme tieto molekuly nedetekovali prietokovým cytometrom. Tiež by bolo možné, že u AD je určitým spôsobom narušený mechanizmus transportu TLRs na povrchu bunky. Podobné výsledky prinieslo aj porovnanie AD skupiny so všetkými kontrolnými súbormi dokopy.

Porovnali sme tiež skupinu zdravých kontrol s ostatnými kontrolnými skupinami, T2D a neDM. TO súbor sa najviac líšil od T2D pacientov, štatisticky významný rozdiel bol detekovaný u všetkých typoch buniek okrem buniek s $CD14^{low}TLR_4^{low}$ expresiou. Viac monocytov aj buniek exprimujúcich TLRs bolo vždy v skupine zdravých darcov krvi (Tab. 16). Porovnaním s neDM súborom sme zistili štatisticky významné rozdiely, ktoré však nie sú veľmi biologicky významné, rozdiel v expresii bol približne 1,3x.

Pri rozdelení podľa vybraných klinických znakov sme štatisticky významné rozdiely preukázali u veku nástupu, pričom pacienti s vekom nástupu >35 rokov mali vyššie počty monocytov a buniek s $CD14^{high}TLR_{2;4}^{high}$ expresiou. TLRs expresia monocytmi však nebola signifikantne rozdielna, čo zodpovedá zisteniam z real-time PCR. Podľa hladín TSH sme zistili signifikantné rozdiely v počte monocytov, ktorých bolo 2x viac u pacientov s hladinami hormónu v rámci referenčných medzí a v počte monocytov s $CD14^{low}TLR_4^{low}$ expresiou. Týmto zisteniam však nemôžeme pripisovať vysokú výpovednú hodnotu, pretože v skupine pacientov s hladinami TSH mimo referenčné medze sme mali len 2 jedincov.

6. Záver

V rámci svojej diplomovej práce som detekovala SNP -1149 G/T, hladiny expresie mRNA PRL, TLR2 a TLR4 a počty monocytov exprimujúcich TLR2 a TLR4 receptory u skupín pacientov (T1D a LADA) a kontrolných súborov (T2D, neDM a TO) v počte jedincov 28, 19, 20, 23 a 60, resp. Výsledné hodnoty som porovnala medzi jednotlivými skupinami a dospela som k nasledujúcim zisteniam:

- Polymorfizmus -1149 G/T zrejme nemá vplyv na vývin autoimunitného typu diabetu, môže však ovplyňovať hladinu mRNA PRL v monocytoch.
- Pacienti s autoimunitným typom diabetu majú výrazne vyššie hladiny mRNA TLR2 a TLR4 oproti zdravým kontrolám, avšak nižšie počty monocytov exprimujúcich tieto receptory na svojom povrchu.
- Genotyp pacienta ani jeho hladiny mRNA PRL, TLR2 a TLR4 v monocytoch zrejme nemajú súvislosť so skúmanými klinickými znakmi (C-peptid, TSH, trvanie a vek nástupu diabetu).

Hypotézu o zvýšenej expresii prolaktínu a toll-like receptorov 2 a 4 u pacientov s autoimunitným diabetom sa nám podarilo preukázať len na úrovni mRNA u TLR2 a TLR4, na úrovni proteínov, bola expresia znížená. Tiež sme nepotvrdili hypotézu o asociácii G alely -1149 G/T polymorfizmu s vývinom autoimunitného diabetu.

7. Zoznam použitej literatúry

Akashi-Takamura, S. a Miyake, K. (2006), Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *J Infect Chemother*, 12: 233-240.

Akbaş, T., Karakurt, S., Unlügüzel, G., Celikel, T. a Akalin, S. (2010), The endocrinologic changes in critically ill chronic obstructive pulmonary disease patients. *COPD*, 7: 240-247.

Aliprantis, A. O., Yang, R.-B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P. a Zychlinsky, A. (1999), Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science*, 285: 736-739.

Anthony, P.K., Stoltz, R.A., Pucci, M.L. a Powers, C.A. (1993), The 22K variant of rat prolactin: evidence for identity to prolactin-(1-173), storage in secretory granules, and regulated release. *Endocrinology*, 132: 806-814.

Appel, S. J., Wadas, T. M., Rosenthal, R.S. a Ovalle, F. (2009), Latent autoimmune diabetes of adulthood (LADA): An often misdiagnosed type of diabetes mellitus. *J Am Acad Nurse Pract*, 21: 156-159.

Atkinson, M. A. a Maclaren, N. K. (1994), The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 331: 1428-1436.

Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998), Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245-52.

Baranzini, S. E., Elfstrom, C., Chang, S.-Y., Butunoi, C., Murray, R., Higuchi, R. a Oksenberg, J. R. (2000), Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *J Immunol*, 165: 6576-6582.

Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L. a Steinmetz, R. W. (1996), Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr rev*, 17: 639-669.

Berczi, I., Nagy, E., Asa, S.L. a Kovacs, K. (1983), Pituitary hormones and contact sensitivity in rats. *Allergy*, 38: 325-330.

Berwaer, M., Martial, J.A. a Davis, J.R.E. (1994), Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol Endocrinol*, 8: 635-642.

Bonifacio, E., Hummel, M., Walter, M., Schmid, S. a Ziegler, A.G. (2004), IDDM1 and multiple family history of type 1 diabetes combine to identify neonates at high risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 27: 2695-2700.

Brand, J.-M., Frohn, C., Cziupka, K., Brockmann, C., Kirchner, H. a Luhm, J. (2004), Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. *Eur Cytokine Netw*, 15: 99-104.

Brennan, P., Hajeer, A., Ong, K. R., Worthington, J., John, S., Thomson, W., Silman, A. a Ollier, B. (1997), Allelic markers close to prolactin are associated with HLA-DRB1

susceptibility alleles among women with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 40: 1383-1386.

Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R.-B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J. a Modlin, R. L. (1999), Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science*, 285: 732-736.

Burris, T. P., Nguyen, D. N., Smith, S. G. a Freeman, M. C. (1992), The stimulatory and inhibitory effects of dopamine on prolactin secretion involve different G-proteins. *Endocrinology*, 130: 926-932.

Carlsson, S., Midthjell, K., Tesfamarian, M. Y. a Grill, V. (2007), Age, overweight and physical inactivity increase the risk of latent autoimmune diabetes in adults: results from the Nord-Trøndelag Health Study. *Diabetologia*, 50: 55-58.

Cejkova, P., Novota, P., Cerna, M., Kolostova, K., Novakova, D., Kucera, P., Novak, J., Andel, M., Weber, P. a Zdarsky, E. (2008), HLA DRB1, DQB1 and insulin promoter VNTR polymorphisms: interactions and the association with adult-onset diabetes mellitus in Czech patients. *Int J Immunogenet*, 35: 133-140.

Cerná M. (2008), Genetics of autoimmune diabetes mellitus. *Wien Med Wochenschr*, 158: 2-12.

Cerna, M., Kolostova, K., Novoty, P., Romzova, M., Cejkova, P., Pinterova, D., Pruhova, S., Treslova, L. a Andel, M. (2007), Autoimmune diabetes mellitus with adult onset and type 1 diabetes mellitus in children have different genetic predispositions. *NY Acad Sci*, 1110: 140-150.

Cervin, C., Lyssenko, V., Bakhtadze, E., Lindholm, E., Nilsson, P., Tuomi, T., Cilio, C. M. a Groop, L. (2008), Genetic similarities between latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, and type 2 diabetes. *Diabetes*, 57: 1433-1437.

Chávez-Sánchez, L., Chávez-Rueda, K., Legorreta-Haquet, M. V., Zenteno, E., Ledesma-Soto, Y., Montoya-Díaz, E., Tesoro-Cruz, E., Madrid-Miller, A. a Blanco-Favela, F. (2010), The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. *Lipids Health Dis*, 9: 117.

Chikanza, I. C. (1999), Prolactin and neuroimmunomodulation: in vitro and in vivo observations. *Ann NY Acad Sci*, 876: 119-130.

Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delrue, F. a Weiner, R. I. (1993), The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*, 133: 1292-1299.

Dasu, M. R., Jialal, I. (2011), Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll-like receptors. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab*, 300: 145-154.

Davies, H., Brophy, S., Fielding, A., Bingley, P., Chandler, M., Hilldrup, I., Brooks, C. a Williams, R. (2008), Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) in South Wales: incidence and characterization. *Diabet Med*, 25: 1354-1357.

Davis, T. M., Zimmet, P., Davis, W. A., Bruce, D. G., Fida, S. a Mackay, I. R. (2000), Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in diabetic patients from a multi-ethnic Australian community: the Fremantle Diabetes Study. *Diabet Med*, 17: 667-674.

Delidow, B. C., Billis, W. M., Agarwal, P. a White, B.A. (1991), Inhibition of prolactin gene transcription by transforming growth factor-beta in GH3 cells. *Mol Endocrinol*, 5: 1716-1722.

Delon, J. a Germain, R. N. (2000), Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol*, 10: 923-933.

Desai, M., Zeggini, E., Horton, V. A., Owen, K. R., Hattersley, A. T., Levy, J. C., Walker, M., Gillespie, K. M., Bingley, P. J., Hitman, G. A., Holman, R. R., McCarthy, M. I. a Clark, A. (2007), An association analysis of the HLA gene region in latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetologia*, 50: 68-73.

Devaraj, S., Dasu, M. R., Rockwood, J., Winter, W., Griffen, S. C. a Jialal, I. (2007), Increased TLR2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a pro-inflammatory state. *J Clin Endocrin Metab*, 93: 578-583.

Di Carlo, R., Meli, R., Galdiero, M., Nuzzo, I., Bentivoglio, C., Carrateli, C. R. (1993), Prolactin protection against lethal effects of *Salmonella typhimurium*. *Life Sci*, 53: 981-989.

Douroudis, K., Prans, E. a Uiho, R. (2009), CTLA-4 promoter polymorphisms are associated with latent autoimmune diabetes in adults. *Hum Immunol*, 70: 921-924.

Du, T., Zhou, Z.-G., You, S., Huang, G., Lin, J., Yang, L., Li, X., Zhou, W.-D. a Chao, C. (2009), Modulation of monocyte hyperresponsiveness to TLR ligands by 1,25-dihydroxy-vitamin D3 from LADA and T2DM. *Diabetes Res Clin Pract*, 83: 208-214.

Dziarski, R., Ulmer, A. J. a Gupta, D. (2000), Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria. *Chem Immunol*, 74: 83-107.

Fojtíková, M., Novota, P., Cejková, P., Pešíčková, S., Tegzová, D. a Cerná, M. (2010), HLA class II, MICA and PRL gene polymorphisms: the common contribution to the systemic lupus erythematosus development in Czech population. *Rheumatol Int*, [Epub ahead of print].

Fourlanos, S., Perry, C., Stein, M. S., Stankovich, J., Harrison, L. C. a Colman, P. G. (2006), A clinical screening tool identifies autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Care*, 29: 970-975.

Gale, E. A. a Gillespie, K.M. (2001), Diabetes and gender. *Diabetologia*, 44: 3-15.

Gellersen, B., diMattia, G. E., Friesen, H. G. a Bohnet, H. G. (1989), Prolactin (PRL) mRNA from human decidua differs from pituitary PRL mRNA but resembles the IM-9-P3 lymphoblast PRL transcript. *Mol Cell Endocrinol*, 64: 127-130.

Gellersen, B., Kempf, R., Telgmann, R. a DiMattia, G. E. (1994), Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol*, 8: 356-373.

Grasso, Y. Z., Reddy, S. K., Rosenfeld, C. R., Hussein, W. I., Hoogwerf, B. J., Faiman, C., Gupta, M. K. (2001), Autoantibodies to IA-2 and GAD65 in patients with type 2 diabetes mellitus of varied duration: Prevalence and correlation with clinical features. *Endocr Pract*, 7: 339-345.

Grill, V., Persson, P.-G., Carlsson, S., Alvarsson, M., Norman, A., Svanström, L. a Efendic, S. (1999), The Stockholm Diabetes Prevention Program Group: Family history of diabetes in middle-age Swedish men is a gender unrelated factor which associates with insulinopenia in newly diagnosed diabetes subjects. *Diabetologia*, 42: 15-23.

Hajjar, A. M., O'Mahony, D. S., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Aderem, A., Klebanoff, S. J. a Wilson, C. B. (2001), Cutting edge: functional interactions between Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol*, 166: 15-19.

Hekimsoy, Z., Kafesçiler, S., Güçlü, F. a Ozmen, B. (2010), The prevalence of hyperprolactinaemia in overt and subclinical hypothyroidism. *Endocr J*, 57: 1011-1015.

Chiu, H. K., Tsai, E. C., Juneja, R., Stoeber, J., Brooks-Worrell, B., Goel, A. a Palmer, J. P. (2007), Equivalent insulin resistance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*, 77: 237-244.

Horton, V., Stratton, I., Bottazzo, G. F., Shattock, M., Mackay, I., Zimmet, P., Manley, S., Holman, R. a Turner, R. (1999), Genetic heterogeneity of autoimmune diabetes: age of presentation in adults is influenced by HLA DRB1 and DQB1 genotypes (UKPDS 43): UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Diabetologia*, 42: 608-616.

Jara, L. J., Benitez, G. a Medina, G. (2008), Prolactin, dendritic cells, and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*, 7: 251-255.

Kahn, S. E. (2003), The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 46: 3-19.

Kantarova, D. a Buc, M. (2007), Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. *Physiol Res*, 56: 255-266.

Katz, J. D., Benoist, C. a Mathis, D. (1995), T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science*, 268: 1185-1188.

Kim, D. J., Cho, N. H., Noh, J. H., Lee, M. S., Lee, M. K., Kim, K. W. (2004), Lack of excess maternal transmission of type 2 diabetes in a Korean population. *Diabetes Res Clin Pract*, 65: 117-124.

Krumenacker, J. S., Montgomery, D. W., Buckley, D. J., Gout, P. W. a Buckley, A. R. (1998), Prolactin receptor signaling. Shared components with the T-cell antigen receptor in Nb2 lymphoma cells. *Endocrine*, 9: 313-320.

- Lee, Y.C., Raychaudhuri, S., Cui, J., De Vivo, I., Ding, B., Alfredsson, L., Padyukov, L., Costenbader, K. H., Seielstad, M., Graham, R. R., Klareskog, L., Gregersen, P. K., Plenge, R. M. a Karlson, E. W. (2009), The PRL -1149 G/T polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum*, 60: 1250-1254.
- Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. a O'Neill, L.A. (2005), Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, 6: 446-458.
- Matera, L., Bellone, G. a Cesano, A. (1991), Prolactin and the neuroimmune network. *Adv Neuroimmunol*, 1: 158-172.
- McMurray, R. W. (2001a), Bromocriptine in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum*, 31: 21-32.
- McMurray, R. W. (2001b), Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. *Int Immunopharmacol*, 1: 995-1008.
- Means, T. K., Lien, E., Yoshimura, A., Wang, S., Golenbock, D. T. a Fenton, M. J. (1999), The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol*, 163: 6748-6755.
- Medzhitov, R. (2001), Toll-like receptors and innate immunity. *Immunology*, 1: 135-145.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. a Janeway, C. A., Jr. (1997), A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388: 394-397.
- Meigs, J. B., Cupples, L. A. a Wilson, P. W. (2000), Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes*, 49: 2201-2207.
- Miller, W. L. a Eberhardt, N. L. (1983), Structure and evolution of the growth hormone family. *Endocr Rev*, 4: 97-130.
- Montgomery, D. W. (2001), Prolactin production by immune cells. *Lupus*, 10: 665-675.
- Montgomery, D. W., Krumenacker, J. S. a Buckley, A. R. (1998), Prolactin stimulates phosphorylation of the human T-cell antigen receptor complex and ZAP-70 tyrosine kinase. A potential mechanism for its immunomodulation. *Endocrinology*, 139: 811-814.
- Murao, S., Kondo, S., Ohashi, J., Fujii, Y., Shimizu, I., Fujiyama, M., Ohno, K., Takada, Y., Nakai, K., Yamane, Y., Osawa, H. a Makino, H. (2008), Anti-thyroid peroxidase antibody, IA-2 antibody, and fasting C-peptide levels predict beta cell failure in patients with latent autoimmune diabetes in adults (LADA)—A 5-year follow-up of the Ehime study. *Diabetes Res Clin Pract*, 80: 114-121.
- Murdoch, G. H., Potter, E., Nicolaisen, A. K., Evans, R. M. a Rosenfeld, M. G. (1982), Epidermal growth factor rapidly stimulates prolactin gene transcription. *Nature*, 300: 192-194.
- Nagy, E., Berczi, I. a Friesen, H. G. (1983), Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol*, 102: 351-357.

- Niskanen, L. K., Tuomi, T., Karjalainen, J., Groop, L. C. a Uusitupa, M. I. (1995), GAD antibodies in NIDDM. Ten-year follow-up from the diagnosis. *Diabetes Care*, 18: 1557-1565.
- Orbach, H. a Shoenfeld, Y. (2007), Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 6: 537-542.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. a Aderem, A. (2000), The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci*, 97: 13766-13771.
- Pasare, C. a Medzhitov, R. (2004), Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol*, 16: 23-26.
- Peeva, E. a Zouali, M. (2005), Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett*, 101: 123-43.
- Porte, D., Jr a Kahn, S. E. (2001), Beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. *Diabetes*, 50: 160-163.
- Pugin, J., Heumann, I. D., Tomasz, A., Kravchenko, V. V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., Glaese, M. P., Tobias, P. S. a Ulevitch, R.J. (1994), CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*, 1: 509-516.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. a Bazan, J. F. (1998), A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci*, 95: 588-93.
- Romkens, T. E., Kusters, G. C., Netea, M. G. a Netten, P. M. (2006), Prevalence and clinical characteristics of insulin-treated, anti-GAD-positive, Type 2 diabetic subjects in an outpatient clinical department of a Dutch teaching hospital. *Neth J Med*, 64: 114-118.
- Sabbah, E., Savola, K. a Ebeling, T., Kulmala, P., Vähäsalo, P., Ilonen, J., Salmela, P. I. a Knip, M. (2000), Genetic, autoimmune, and clinical characteristics of childhood- and adult-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 23: 1326-1332.
- Sandor, F. a Buc, M. (2005a), Toll-like Receptors. I. Structure, Function and Their Ligands. *Folia Biol*, 51: 148-156.
- Sandor, F. a Buc, M. (2005b), Toll-like Receptors. II. Distribution and Pathways Involved in TLR Signalling. *Folia Biol*, 51: 188-197.
- Segura, M., Vadeboncoeur, N. a Gottschalk, M. (2002), CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin Exp Immunol*, 127: 243-254.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. a Kirschning, C. J. (1999), Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, 274: 17406-17409.

Sinha, Y. N., Gilligan, T. A., Lee, D. W., Hollingsworth, D. a Markoff, E. (1985), Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 60: 239-243.

Stanley, F. (1988), Stimulation of prolactin gene by insulin. *J Biol Chem*, 263: 13444-13448.

Stenström, G., Gottsäter, A., Bakhtadze, E., Berger, B. a Sundkvist, G. (2005), Latent autoimmune diabetes in adults definition, prevalence, β -Cell function, and treatment. *Diabetes*, 54: 68-72.

Stevens, A., Ray, D., Alansari, A., Hajeer, A., Thomson, W., Donn, R., Ollier, W. E. R., Worthington, J. a Davis, J. R. E. (2001), Characterization of a prolactin gene polymorphism and its associations with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 44: 2358-2366.

Tabas, I. (2010), Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*, 10: 36-46.

Takeda, K. a Akira, S. (2001), Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells*, 6: 733-742.

Takeda, K., a Akira, S. (2005), Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17: 1-14.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. a Akira, S. (1999a), Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11: 443-451.

Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Takeda, K., Akira, S. (1999b), TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene*, 231: 59-65.

Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Mühlradt, P. F. a Akira, S. (2000), Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol*, 164: 554-557.

Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K. a Akira, S. (2001), Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*, 13: 933-940.

Thoma-Uszynski, S., Stenger, S., Takeuchi, O., Ochoa, M. T., Engele, M., Sieling, P. A., Barnes, P. F., Rölinghoff, M., Bölskei, P. L., Wagner, M., Akira, S., Norgard, M. V., Belisle, J. T., Godowski, P. J., Bloom, B. R. a Modlin, R. L. (2001), Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptors. *Science*, 291: 1544-1547.

Torner, L., Mejia, S., Lopez-Gomez, F. J., Quintanar, A., Martinez de la Escalera G. a Clapp C. (1995), A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology*, 136: 5454-5460.

- Truong, A. T., Duez, C., Belayew, A., Pictet, R., Bell, G. I., Renard, A. a Martial, J. A. (1984), Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J*, 3: 429-437.
- Tuomi, T., Groop, L. C., Zimmet, P. Z., Rowley, M. J., Knowles, W. a Mackay, I. R. (1993), Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes*, 42: 359-362.
- Tuomi, T., Carlsson, A., Li, H., Isomaa, B., Miettinen, A., Nilsson, A., Nissen, M., Ehrnstrom, B. O., Forsen, B., Snickars, B., Lahti, K., Forsblom, C., Saloranta, C., Taskinen, M. R. a Groop, L. C. (1999), Clinical and genetic characteristics of type 2 diabetes with and without GAD antibodies. *Diabetes*, 48: 150-157.
- Turner, R., Stratton, I., Horton, V., Manley, S., Zimmet, P., Mackay, I. R., Shattock, M., Bottazzo, G. F. a Holman, R. (1997), UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes: UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet*, 350: 1288-1293.
- Uematsu, S. a Akira, S. (2006), Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med*, 9: 712-725.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D. & Aderem, A. (1999a), Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci*, 96: 14459-14463.
- Underhill, D., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M. a Aderem, A. (1999b), The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 401: 811-815.
- Vera-Lastra, O., Jara, L. J. a Espinoza, L. R. (2002), Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 1: 360-364.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. a King, H. (2004), Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27: 1047-1053.
- Woollard, K. J. a Geissmann, F. (2010), Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*, 7: 77-86.
- Wright, S. D., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. a Ramos, R. A. (1989), Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPSbearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med*, 170: 1231-1241.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. a Mathison, J. C. (1990), CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249: 1431-1433.
- Zimmet, P. Z., Tuomi, T., Mackay, I. R., Rowley, M. J., Knowles, W., Cohen, M., Lang, D. A. (1994), Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med*, 11: 299-303.