Zakład Badawczo-Leczniczy Endokrynologii
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk

lek. Alina Kuryłowicz

ZWIĄZEK POLIMORFIZMÓW GENÓW UKŁADU WITAMINY D Z PODATNOŚCIĄ NA ROZWÓJ CHOROBY GRAVESA-BASEDOWA.

Instytut Centrum Medycyny Dośw. i Klin. PAN BIBLIOTEKA
ZS 261
H 3955

Praca doktorska

Promotor: dr hab. med. Tomasz Bednarczuk
Zakład Badawczo-Leczniczy Endokrynologii
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Warszawa, 2006

http://rcin.org.pl

Składam serdeczne podziękowania:

Promotorowi, ***Panu dr hab. med. Tomaszowi Bednarczukowi,*** *za ukierunkowanie mojego rozwoju naukowego, umożliwienie prowadzenia badań oraz nieocenioną pomoc w trakcie realizacji niniejszej pracy.*

Panu prof. dr hab. med. Januszowi Naumanowi, *za Jego życzliwość, wszechstronną pomoc i wyrozumiałość.*

Panu prof. dr med. Klausowi Badenhoop, *za umożliwienie mi wykonania części doświadczeń w jego laboratorium, cenne uwagi praktyczne i za stworzenie wspaniałej, przyjaznej atmosfery.*

Pani prof. dr hab. n. przyr. Barbarze Łukomskiej *z Zakładu Neurobiologii Naprawczej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, za cenne uwagi merytoryczne.*

Kolegom z Zakładu Badawczo-Leczniczego Endokrynologii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, za pomoc i cenne dyskusje.

http://rcin.org.pl

Wyniki prezentowane w niniejszej pracy zostały częściowo zawarte w następujących publikacjach:

- Ramos-Lopez E., Kurylowicz A., Bednarczuk T., Paunkovic J., Seidl C., Badenhoop K. *Vitamin D receptor polymorphisms are associated with Graves' disease in German and Polish but not in Serbian patients.* Thyroid 2005; 15:1125-30.
- Kurylowicz A., Badenhoop K. *CYP27B1 gene polymorphism is associated with Graves' disease in a Polish population study.* Thyroid 2005; 15:1107-8.
- Kurylowicz A., Ramos-Lopez E., Bednarczuk T., Badenhoop K. *Vitamin D-binding protein (DBP) gene polymorphism is associated with Graves' disease and the vitamin D status in a Polish population study.* Exp Clin Endocrinol Diabetes *In press.*
- Ramos-Lopez E., Kurylowicz A., Kahles H., Bednarczuk T., Seissler J., Badenhoop K. *CYP24 (24-hydroxylase) polymorphisms in autoimmune endocrine diseases.* Praca wysłana do Eur J Endocrinol.

http://rcin.org.pl

SPIS TREŚCI

SPIS TABEL 7

SPIS RYCIN 8

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW 9

STRESZCZENIE 11

I. WSTĘP 16

I. 1. Układ witaminy D 16

I. 1. 1. Hydroksylazy witaminy D 16

I. 1. 2. Białko wiążące witaminę D 18

1. 1. 3. Receptor witaminy D 18

I. 2. Wpływ witaminy D na układ immunologiczny 19

I. 2. 1. Badania nad wpływem $1,25(OH)_2D_3$ na komórki prezentujące antygen 19

I. 2. 2. Badania nad wpływem $1,25(OH)_2D_3$ na limfocyty T 21

I. 2. 3. Witamina D a rozwój chorób autoimmunologicznych 21

I. 3. Wpływ czynników genetycznych na rozwój choroby Gravesa-Basedowa 24

I. 3. 1. Badania analizy sprzężeń 24

I. 3. 2. Badania analizy asocjacji 25

I. 3. 3. Czynniki genetyczne predysponujące do rozwoju choroby Gravesa-Basedowa w populacjach rasy kaukaskiej 26

a. Główny układ zgodności tkankowej 26

b. Antygen 4 związany z cytotoksycznym limfocytem T 26

c. Fosfataza tyrozynowa limfocytów T 27

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY 28

III. MATERIAŁY I METODY 31

III. 1. Charakterystyka grup badanych 31

III. 2. Analiza genetyczna 32

III. 2. 1. Wykaz stosowanych odczynników 32

III. 2. 2. Bufory i roztwory 33

III. 2. 3. Izolacja genomowego DNA z krwi pełnej 33

III. 2. 4. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) 34

III. 2. 5. Reakcja trawienia enzymami restrykcyjnymi i elektroforeza w żelu agarozowym 36

III. 2. 6. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym 39

III. 2. 7. Sekwencjonowanie produktów PCR 41

III. 3. Analiza bioinformatyczna 42

III. 3. 1. Bazy danych sekwencji 42

III. 3. 2. Projektowanie starterów 42

III. 3. 3. Dobór enzymów restrykcyjnych 42

III. 3. 4. Analiza niezrównoważenia sprzężeń pomiędzy allelami badanych *loci* 42

III. 3. 4. Analiza haplotypów 43

http://rcin.org.pl

III. 4. Analiza statystyczna wyników 43
IV. WYNIKI 44
IV.1. Związek wybranych polimorfizmów genów układu witaminy D z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej 44
IV.1.1. Polimorfizmy genu receptora jądrowego witaminy D (*VDR*) 44
a. Polimorfimy zamiany pojedynczych nukleotydów w genie VDR 44
b. Metaanaliza badań nad związkiem polimorfizmów genu VDR z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w różnych populacjach 47
IV.1.2. Polimorfizmy genu białka wiążącego witaminę D (*DBP*) 48
a. Polimorfizmy zamiany pojedynczych nukleotydów w eksonie 11 genu DBP 48
b. Polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ *w intonie 8 genu DBP* 50
IV.1.3. Polimorfizm genu 1α-hydroksylazy witaminy D (*CYP27B1*) 51
IV.1.4. Polimorfizm genu 24-hydroksylazy witaminy D (*CYP24*) 51
IV.1. Analiza interakcji gen-gen między wybranymi polimorfizmami genów układu witaminy D 52
IV.1. Związek wybranych polimorfizmów genów układu witaminy D z fenotypem choroby Gravesa-Basedowa 53
V. DYSKUSJA 55
V.1. Związek wybranych polimorfizmów genów układu witaminy D z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej 55
V.1.1. Polimorfizmy genu receptora jądrowego witaminy D (*VDR*) 55
a. Polimorfimy zamiany pojedynczych nukleotydów w genie VDR 56
b. Metaanaliza badań nad związkiem polimorfizmów genu VDR z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w różnych populacjach 58
V.I.2. Polimorfizmy genu białka wiążącego witaminę D (*DBP*) 61
a. Polimorfizmy zamiany pojedynczych nukleotydów w eksonie 11 genu DBP 61
b. Polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ *w intonie 8 genu DBP* 62
V.1.3. Polimorfizm genu 1α-hydroksylazy witaminy D (*CYP27B1*) 63
V.I.4. Polimorfizm genu 24-hydroksylazy witaminy D (*CYP24*) 65
V.1. Analiza interakcji gen-gen między wybranymi polimorfizmami genów układu witaminy D 66
V.1. Związek wybranych polimorfizmów genów układu witaminy D z fenotypem choroby Gravesa-Basedowa 67
VI. WNIOSKI I PODSUMOWANIE PRACY 68
VII. PIŚMIENNICTWO 69

http://rcin.org.pl

SPIS TABEL

Tabela I. Badane polimorfizmy w genach układu witaminy D 30

Tabela II. Charakterystyka kliniczna chorych z chorobą Gravesa-Basedowa 31

Tabela III. Warunki stosowane podczas amplifikacji fragmentów badanych genów metodą PCR 34

Tabela IV. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w PCR 36

Tabela V. Enzymy stosowane do analizy restrykcyjnej produktów PCR 37

Tabela VI. Skład mieszaniny stosowanej w reakcji sekwenacyjnej 41

Tabela VII. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów genu *VDR* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa i u zdrowych ochotników 45

Tabela VIII. Analiza sprzężeń pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *VDR* 46

Tabela IX. Częstość występowania haplotypów genu *VDR* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa i u zdrowych ochotników 46

Tabela X. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów w eksonie 11 genu *DBP* u chorych z chorobą Gravesa -Basedowa i u zdrowych ochotników 48

Tabela XI. Częstość występowania haplotypów eksonu 11 genu *DBP* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa i u zdrowych ochotników 49

Tabela XII. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ w intronie 8 genu *DBP* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa i u zdrowych ochotników 50

Tabela XIII. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu promotora genu *CYP27B1* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa i u zdrowych ochotników 51

Tabela XIV. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu w regionie regulatorowym 5' genu *CYP24* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa i u zdrowych ochotników 52

Tabela XV. Analiza interakcji gen-gen między wybranymi genotypami genów układu witaminy D 53

Tabela XVI. Częstość występowania genotypów polimorfizmów: *Bsm*I w intronie 8 genu *VDR*, *Sty*I w eksonie 11 genu *DBP* oraz *Tfi*I w promotorze genu *CYP27B1* w grupach chorych z chorobą Gravesa-Basedowa, podzielonych według parametrów klinicznych 54

Tabela XVII. Związek polimorfizmu *Bsm*I w genie *VDR* z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w różnych populacjach 60

Tabela XVIII. Związek polimorfizmu promotora genu *CYP27B1* z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w różnych populacjach 64

http://rcin.org.pl

SPIS RYCIN

Rycina 1.

Uproszczony schemat przemian witaminy D..... 17

Rycina 2.

Schemat aktywacji transkrypcji genu docelowego przez receptor witaminy D (VDR)..... 19

Rycina 3.

Dobór warunków PCR dla starterów służących do amplifikacji fragmentu eksonu 2 genu *VDR*..... 35

Rycina 4.

Przykładowa analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) dla polimorfizmu w eksonie 2 (C/T) genu *VDR* wykrywanego enzymem *Fok*I..... 38

Rycina 5A.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym zamplifikowanych fragmentów intronu 8 genu *DBP* zawierającego polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$..... 39

Rycina 5B.

Chromatogramy przedstawiające sekwencje wybranych genotypów fragmentów intronu 8 genu *DBP* zawierającego polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$..... 40

Rycina 6.

Schemat organizacji genu receptora witaminy D 55

http://rcin.org.pl

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AITD – autoimmunologiczne choroby tarczycy, ang. *autoimmune thyroid diseases*

CD – cząsteczka powierzchniowa, ang. *cluster of differentiation*

CI – przedział ufności, ang. *confidence interval*

CIA – zapalenie stawów indukowane kolagenem, ang. *collagen induced arthritis*

CTLA-4 – antygen-4 związany z cytotoksycznym limfocytem T, ang. *cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*. Ludzki gen kodujący cząsteczkę CTLA-4 oznaczono dużymi literami i kursywą (*CTLA-4*).

CYP – białko cytochromowe, ang. *cytochrome protein*

CYP24 – 24-hydroksylaza witaminy D. Ludzki gen kodujący CYP24 oznaczono dużymi literami i kursywą (*CYP24*).

CYP27B1 – 1α-hydroksylaza witaminy D. Ludzki gen kodujący CYP27B1 oznaczono dużymi literami i kursywą (*CYP27B1*), gen zwierzęcy – małymi literami i kursywą (*cyp27b1*)

DBP – białko wiążące witaminę D, ang. *vitamin D-binding protein*. Ludzki gen kodujący DBP oznaczono dużymi literami i kursywą (*DBP*).

EAE – doświadczalne alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia, ang. *experimental allergic encephalomyelitis*

*HLA-DRB1*03* – grupa alleli kodujących cząsteczkę HLA-DR3

GD – choroba Gravesa-Basedowa, ang. *Graves' disease*

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów/makrofagów, ang. *granulocyte-macrophages colony stimulating factor*

HLA – antygen układu zgodności tkankowej, ang. *human leukocyte antigen*

HT – choroba Hashimoto, ang. *Hashimoto's thyroditis*

HWE – równowaga Hardy-Weinberga, ang. *Hardy-Weinberg equilibrium*

ICAM-1 – cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1, ang. *intercellular adhesion molecule-1*

http://rcin.org.pl

IFN – interferon

IL – interleukina

LD – niezrównoważenie sprzężeń, ang. *linkage disequilibrium*

LYP – fosfataza tyrozynowa limfocytów T, ang. *lymphoid-specific tyrosine phosphatase*. Ludzki gen kodujący LYP oznaczono dużymi literami i kursywą (*LYP*).

mRNA – informacyjny kwas rybonukleinowy, ang. *messenger RNA*

NF – czynnik jądrowy, ang. *nuclear factor*

NS – nieznamienny (statystycznie), ang. *not significant*

OR – iloraz szans, ang. *odds ratio*

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy, ang. *polymerase chain reaction*

RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, ang. *restriction fragment length polymorphism*

RR – ryzyko względne, ang. relative risk

RXR – receptor retinoidu X, ang. *retinoid X receptor*

SNP – polimorfizm pojedynczych nukleotydów, ang. *single nucleotide polymorphism*

TFIIB – czynnik transkrypcyjny IIB, ang. *transcription factor II B*

T_m – temperatura przyłączania (topnienia) starterów, ang. *melting temperature*

TNFα – czynnik martwicy nowotworów alfa, ang. *tumour necrosis factor* - α

TSH-R – receptor hormonu stymulującego tarczycę, receptor tyreotropiny, ang. *thyroid stimulating hormone receptor*

UTR – region nie podlegający translacji, ang. *untranslated region*

VDDR-I – krzywica zależna od witaminy D typu 1, ang. *vitamin D dependent rickets type I*

VDR – receptor witaminy D, ang. *vitamin D receptor*. Ludzki gen kodujący VDR oznaczono dużymi literami i kursywą (*VDR*).

VDRE – sekwencja DNA rozpoznawana przez VDR, ang. *vitamin D responsive element*

http://rcin.org.pl

STRESZCZENIE

Aktywny metabolit witaminy D – 1,25-dihydroksycholekalcyferol ($1,25(OH)_2D_3$) wpływa nie tylko na gospodarkę wapniową, ale ma również właściwości immunomodulujące. W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że $1,25(OH)_2D_3$ może regulować funkcję limfocytów T i komórek prezentujących antygen, natomiast w badaniach *in vivo* stwierdzono, że podawanie witaminy D zapobiega rozwojowi chorób autoimmunologicznych u zwierząt. Wyniki badań epidemiologicznych sugerują, że niedobór witaminy D wiąże się również z częstszym występowaniem chorób autoimmunologicznych u ludzi.

Działanie witaminy D zależy od prawidłowej funkcji wielu białek, które nazwano układem witaminy D (ang. *vitamin D system*). Kluczowym enzymem warunkującym syntezę aktywnego metabolitu jest 1α-hydroksylaza (CYP27B1), natomiast za degradację pochodnych witaminy D odpowiada 24-hydroksylaza (CYP24). Powstałe w wyniku hydroksylacji pochodne witaminy D wiązane są przez nośnik globulinowy – białko wiążące witaminę D (ang. *vitamin D-binding protein* – DBP), co zapewnia ich stabilność w krwiobiegu, oraz dostępność komórkową. Efekt biologiczny wywierany przez $1,25(OH)_2D_3$ zależy głównie od wiązania z receptorem jądrowym (ang. *vitamin D receptor* – VDR), który działa jako zależny od liganda czynnik transkrypcyjny i w ten sposób reguluje ekspresję genów w komórkach docelowych. Zaburzenie funkcji białek układu witaminy D może upośledzać działanie $1,25(OH)_2D_3$ i wpłynąć na kontrolę procesów immunologicznych. Dlatego geny tych białek są dobrymi „kandydatami" w badaniach nad podatnością genetyczną do rozwoju chorób autoimmunologicznych.

Choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' disease* – GD) jest autoimmunologiczną chorobą tarczycy o bardzo złożonej patogenezie. Rozwój GD uwarunkowany jest wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, które nie są jeszcze w pełni poznane. Heterogenność genetyczna sprawia, że o wystąpieniu GD mogą decydować różne czynniki w różnych populacjach. Celem niniejszej pracy było zbadanie związku polimorfizmów wybranych genów układu witaminy D z podatnością na rozwój oraz fenotypem choroby Gravesa-Basedowa.

Badanie miało charakter analizy asocjacji przypadek-kontrola (ang. *case-control association study*) i objęto nim 338 niespokrewnionych chorych z GD oraz 185 zdrowych ochotników. U osób tych analizowano następujące polimorfizmy:

http://rcin.org.pl

• w genie *VDR*, kodującym receptor witaminy D – polimorfizmy zamiany pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism* – SNP) w eksonie 2 (zamiana C na T – C/T, wykrywana enzymem restrykcyjnym *Fok*I), intronie 8 (G/A wykrywany enzymem *Bsm*I oraz T/G wykrywany enzymem *Apa*I) i eksonie 9 (T/C wykrywany enzymem *Taq*I);

• w genie *DBP*, kodującym białko wiążące witaminę D – dwa polimorfizmy zlokalizowane w eksonie 11 (C/A wykrywany enzymem *Sty*I i G/T wykrywany enzymem *Hae*III), oraz polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń (ang. *tandem repeat polymorphism*) – $(TAAA)_N$ w intronie 8

• w genie *CYP27B1*, kodującym 1α-hydroksylazę – SNP w pozycji -1260 promotora (C/A, wykrywany enzymem *Tfi*I)

• w genie *CYP24*, kodującym 24-hydroksylazę – SNP w regionie regulatorowym 5' (G/C, wykrywany enzymem *Bst*UI).

We wcześniejszych pracach analizowano związek wyżej wymienionych polimorfizmów z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa i innych chorób autoimmunologicznych w różnych populacjach, jednak wyniki tych badań były niejednoznaczne.

W tej pracy stwierdzono, że w genie *VDR* częstość występowania genotypu GG polimorfizmu wykrywanego enzymem *Bsm*I (25,5% *vs.* 33,9%; P = 0,02; iloraz szans - ang. *odds ratio* – OR = 1,62) była znamiennie większa w grupie chorych w porównaniu z grupą zdrowych ochotników, co przemawia za jego związkiem z rozwojem z choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej.

Na podstawie obserwowanych częstości genotypów obliczono, że allele polimorfizmów *Bsm*I, *Apa*I, *Taq*I genu *VDR* są ze sobą sprzężone, co oznacza, że dziedziczą się jako haplotypy. Rozkład badanych haplotypów genu *VDR* różnił się znamiennie pomiędzy chorymi z GD i zdrowymi ochotnikami (P = 0,0003), przy czym haplotyp zawierający allel G polimorfizmu *Bsm*I (G•G•T) występował częściej wśród chorych z GD (OR = 1,76). Badania funkcjonalne sugerują, że haplotyp ten związany jest z niższą aktywnością receptora.

Wyniki dotychczasowych badań nad związkiem polimorfizmów *VDR* z rozwojem GD w różnych populacjach były niejednoznaczne, co mogło wynikać zarówno z heterogenności genetycznej, jak i ze zbyt małej mocy przeprowadzonych badań. W celu potwierdzenia wyników uzyskanych w tej pracy przeprowadzono metaanalizę opublikowanych dotychczas badań, która wykazała, że genotyp GG polimorfizmu *Bsm*I

http://rcin.org.pl

jest związany z rozwojem choroby GD w populacjach rasy kaukaskiej (OR = 1,28). Ponieważ polimorfizm *Bsm*I jest zlokalizowany w intronie, należy przypuszczać, że jest on markerem sprzężonym z innym funkcjonalnym polimorfizmem. Dlatego konieczna jest dalsza, systematyczna analiza *locus VDR* w poszukiwaniu nowych mutacji, których znaczenie potwierdzone zostałoby badaniami funkcjonalnymi.

W genie *DBP* stwierdzono, że dla polimorfizmu wykrywanego enzymem *Sty*I (C/A) w eksonie 11, częstość genotypów AA i CA była wyższa w grupie chorych w porównaniu z grupą zdrowych ochotników (59,0% *vs.* 45,4%; P = 0,003; OR = 1,73), co wskazuje na związek tych genotypów z rozwojem GD. Polimorfizm *Sty*I był sprzężony z drugim badanym polimorfizmem eksonu 11, wykrywanym enzymem *Hae*III, co umożliwiło przeprowadzenie analizy haplotypów. Rozkład haplotypów eksonu 11 różnił się znamiennie pomiędzy chorymi z GD i zdrowymi ochotnikami (P = 0,01), a haplotyp zawierający allel A polimorfizmu *Sty*I (A•T) występował częściej wśród chorych z GD (OR = 1,50). W badaniach funkcjonalnych stwierdzono, że u osób posiadających haplotyp A•T występuje izoforma DBP o mniejszym powinowactwie względem metabolitów witaminy D. Jak dotąd nie opublikowano badań asocjacyjnych typu przypadek-kontrola dotyczących związku polimorfizmów eksonu 11 genu *DBP* z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa, co uniemożliwia przeprowadzenie metaanalizy. Dlatego, w celu zdefiniowania znaczenia tych polimorfizmów w rozwoju GD, konieczne jest przeprowadzenie badań replikacyjnych w innych populacjach.

W genie 1α-hydroksylazy witaminy D (*CYP27B1*) badano polimorfizm promotora (C-1260A) wykrywany enzymem restrykcyjnym *Tfi*I, który powoduje zmianę miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych. Stwierdzono, że u chorych z GD genotyp CC występuje znamiennie częściej w porównaniu z grupą kontrolną (47,0% *vs.* 33,8%; P = 0,006; OR = 1,74). Związek tego polimorfizmu z rozwojem GD był badany w innych populacjach, jednak brak homogenności pomiędzy wynikami opublikowanych badań uniemożliwił przeprowadzenie metaanalizy i wyjaśnienie, czy genotyp CC jest markerem choroby Gravesa-Basedowa wspólnym dla populacji rasy kaukaskiej.

Częstość genotypów pozostałych badanych polimorfizmów nie różniła się znamiennie pomiędzy grupą chorych z GD, a zdrowymi ochotnikami. Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy genotypami badanych polimorfizmów genów układu witaminy D a fenotypem klinicznym choroby Gravesa-Basedowa: płcią, stopniem nasilenia zmian ocznych, wiekiem, w którym wystąpiły pierwsze objawy choroby, a także rodzinnym występowaniem autoimmunologicznych chorób tarczycy.

http://rcin.org.pl

W tej pracy badano również, czy pomiędzy polimorfizmami genów układu witaminy D zachodzą interakcje gen-gen. Do analizy interakcji wybrano te spośród badanych czynników, dla których stwierdzony został związek z rozwojem GD: genotyp GG polimorfizmu *Bsm*I genu *VDR*, genotypy AA i AC polimorfizmu *Sty*I genu *DBP*, oraz genotyp CC polimorfizmu promotora genu *CYP27B1*. Przeprowadzona analiza wykazała, że pomiędzy badanymi czynnikami zachodzą prawdopodobnie interakcje, ponieważ iloraz szans (OR) związany z występowaniem dwóch z tych czynników był 1,5-krotnie wyższy, a dla występowania trzech czynników – około 2-krotnie wyższy niż w przypadku każdego z nich badanego osobno. Można więc założyć, że jeżeli jednocześnie u danej osoby występuje mutacja w genie hydroksylazy, która może ograniczać wydajność syntezy $1,25(OH)_2D_3$, mutacja genu białka wiążącego, zmniejszająca powinowactwo DBP względem aktywnego metabolitu, a wreszcie mutacja genu *VDR* upośledzająca funkcję receptora, to może dojść do zaburzenia procesów immunologicznych kontrolowanych przez witaminę D i rozwoju chorób autoimmunologicznych. Osoba z taką predyspozycją genetyczną będzie również wrażliwsza na niedobory witaminy D.

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy sugerują, że:

1. Polimorfizm *Bsm*I (G/A) genu *VDR*, polimorfizm *Sty*I (C/A) genu *DBP* oraz polimorfizm (C/A) w promotorze genu *CYP27B1* są związane z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej. Udział wymienionych polimorfizmów w kształtowaniu predyspozycji do rozwoju choroby Gravesa-Basedowa może mieć charakter addytywny (zachodzą między nimi interakcje gen-gen).
2. Polimorfizm *Bsm*I (G/A) genu *VDR* może być traktowany jako marker podatności do rozwoju choroby Gravesa-Basedowa w populacjach rasy kaukaskiej.
3. Polimorfizmy: *Fok*I (C/T), *Apa*I (T/G) i *Taq*I (T/C) genu *VDR*; *Hae*III (G/T) i polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ genu *DBP* oraz polimorfizm (G/C) w regionie regulatorowym 5' genu *CYP24* nie są związane z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej.
4. Badane polimorfizmy genów układu witaminy D (*VDR*, *DBP*, *CYP27B1*, *CYP24*) wydają się nie mieć związku z fenotypem choroby Gravesa-Basedowa.

http://rcin.org.pl

Powyższe wyniki potwierdzają znaczenie polimorfizmów genów białek tworzących układ witaminy D w kształtowaniu predyspozycji do rozwoju chorób autoimmunologicznych. Ponieważ funkcja niektórych z tych polimorfizmów pozostaje nieznana, możliwe jest, że są one markerami sprzężonymi z innymi funkcjonalnymi polimorfizmami w obrębie badanych *loci*. Dlatego potrzebne są dalsze, systematyczne badania genetyczne i funkcjonalne, których wyniki pozwolą ocenić wpływ poszczególnych genów układu witaminy D na rozwój chorób autoimmunologicznych, a także mogą stanowić podstawę dla zastosowania pochodnych witaminy D w terapii chorych.

http://rcin.org.pl

I. WSTĘP

Witamina D_3 (czyli cholekalcyferol, nazywana w skrócie witaminą D) postrzegana jest przede wszystkim jako czynnik regulujący gospodarkę wapniowo-fosforanową i metabolizm tkanki kostnej. Jednak badania ostatnich lat sprawiły, że zmienia się pogląd na rolę pochodnych witaminy D w utrzymywaniu homeostazy wielu tkanek. Obecnie wiadomo, że aktywny metabolit witaminy D – 1,25-dihydroksycholekalcyferol [Ryc. 1] ma wpływ, m.in. na procesy wzrostu i różnicowania komórek, sekrecję niektórych hormonów, a także na regulację funkcji reprodukcyjnych. Odkrycie jądrowego receptora witaminy D (ang. *vitamin D receptor* – VDR) i stwierdzenie jego obecności w komórkach immunokompetentnych dało początek badaniom nad wpływem pochodnych witaminy D na regulację procesów odpornościowych, a także nad rolą tych związków w rozwoju i przebiegu chorób autoimmunologicznych [162].

I. 1. Układ witaminy D

Działanie witaminy D zależy od prawidłowej funkcji szeregu białek, które nazwano układem witaminy D (ang. *vitamin D system*).

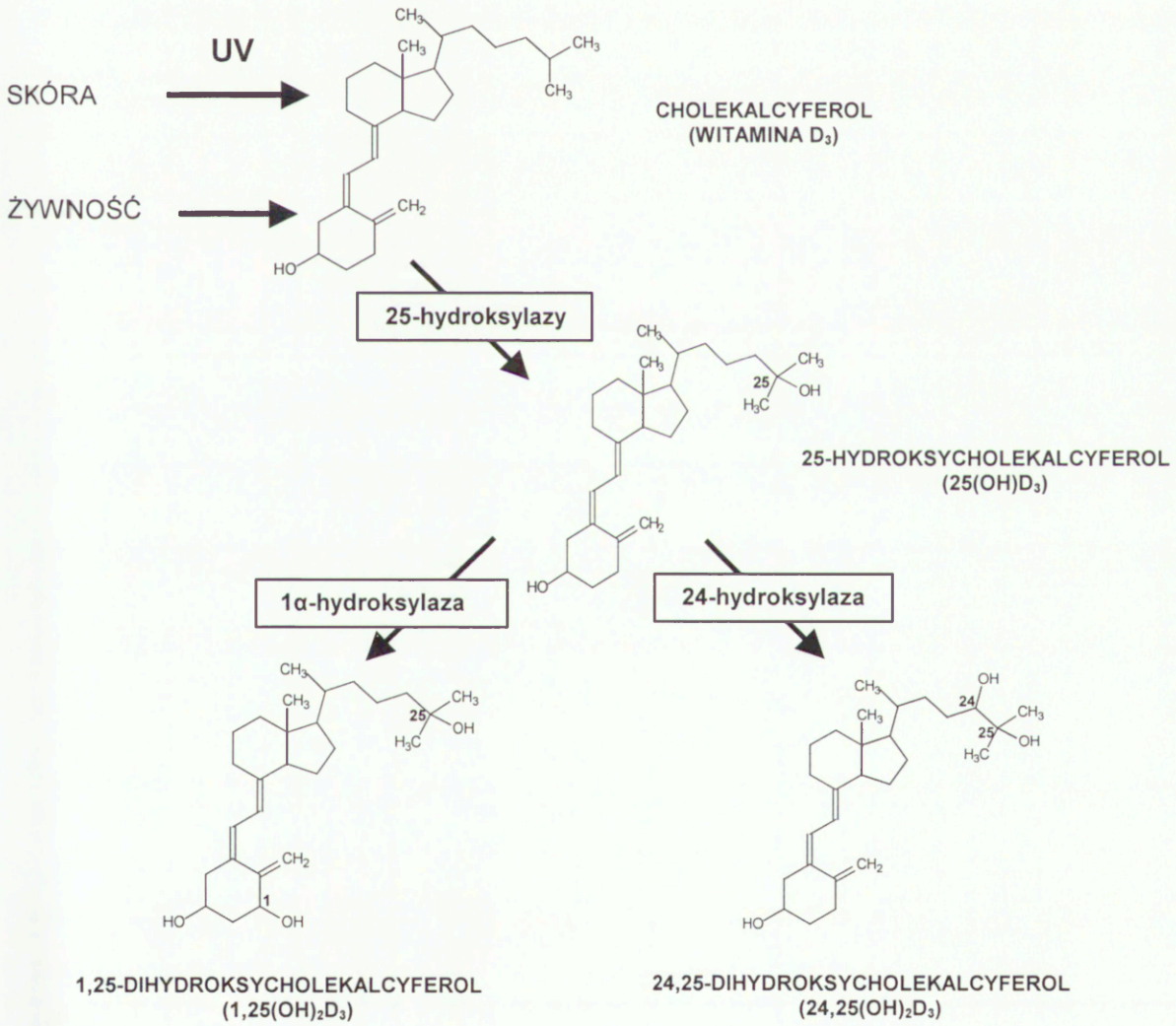
I. 1.1. Hydroksylazy witaminy D

Cholekalcyferol to związek z grupy sekosteroli, który do organizmu człowieka jest dostarczany wraz z dietą lub powstaje wskutek bioaktywacji pochodnej cholesterolu (7-dehydrocholekalcyferolu) w skórze, pod wpływem promieniowania słonecznego. Następnie witamina D podlega kolejnym reakcjom hydroksylacji, z których pierwsza, w pozycji 25, ma miejsce w wątrobie. Reakcję tę katalizuje prawdopodobnie nie jeden enzym, a zespół 25-hydroksylaz witaminy D, który tworzą białka cytochromowe (ang. *cytochrome protein* – CYP): CYP27A1, CYP3A4 oraz CYP2R1 [125]. W wyniku wątrobowej hydroksylacji powstaje 25-hydroksycholekalcyferol ($25(OH)D_3$) – główny krążący w organizmie człowieka metabolit witaminy D.

Kolejne hydroksylacje mają miejsce w pozycjach 1 i/lub 24 w wyniku czego powstają odpowiednio 1,25-dihydroksycholekalcyferol i 24,25-dihydroksycholekalcyferol [Ryc. 1]. 1α-hydroksylaza (CYP27B1) jest kluczowym enzymem dla syntezy 1,25-dihydroksycholekalcyferolu ($1,25(OH)_2D_3$) – aktywnej biologicznie formy witaminy D. Podstawowym miejscem ekspresji CYP27B1 są komórki kanalika proksymalnego nerki, ale jej obecność stwierdza się również m.in.: w tkance kostnej, płucach, wątrobie, łożysku, skórze oraz w makrofagach. Drugim produktem przemian $25(OH)D_3$ jest 24,25-dihydroksycholekalcyferol, którego syntezę katalizuje 24-hydroksylaza witaminy D

http://rcin.org.pl

(CYP24) obecna praktycznie we wszystkich komórkach, na które działa witamina D. Funkcja 24,25(OH)$_2$D$_3$ nie jest w pełni poznana, ale badania ostatnich lat pozwoliły stwierdzić, że bierze on udział m.in. w regulacji wzrostu chrząstki i przebudowy tkanki kostnej [140]. Substratem dla CYP24 jest również 1,25(OH)$_2$D$_3$, a hydroksylacja w pozycji 24 stanowi pierwszy etap degradacji pochodnych cholekalcyferolu. Regulatorem działania obu hydroksylaz (CYP27B1 i CYP24) jest, na zasadzie sprzężenia zwrotnego, sam 1,25(OH)$_2$D$_3$ (hamowanie aktywności CYP27B1, aktywacja CYP24). W procesie tym pośredniczą także jony wapniowe, fosforanowe, parathormon, kalcytonina i inne hormony (w tym glukokortykosteroidy, prolaktyna, somatotropina, tyroksyna). Skoordynowane działanie CYP27B1 i CYP24 odpowiada za prawidłowe stężenie metabolitów witaminy D [98].



Rycina 1. Uproszczony schemat przemian witaminy D.
Cholekalcyferol (powstały pod wpływem promieni UV w skórze lub dostarczony z dietą) podlega hydroksylacji, w pozycji 25 w wątrobie, a następnie w reakcji katalizowanej przez 1α-hydroksylazę (CYP27B1), powstaje aktywny metabolit – 1,25-dihydroksycholekalcyferol. Alternatywna droga przemian 25-hydroksycholekalcyferolu prowadzi przez hydroksylację w pozycji 24 (reakcję katalizuje 24-hydroksylaza witaminy D – CYP24).

http://rcin.org.pl

I. 1.2. Białko wiążące witaminę D

Zaledwie 0,04% $25(OH)D_3$ i 0,4% $1,25(OH)D_3$ krążących we krwi jest w stanie „wolnym" (niezwiązanym z białkami transportującymi). Około 15% związane jest niespecyficznie przez albuminy, natomiast większość – około 85% – przez specyficzny nośnik globulinowy – białko wiążące witaminę D (ang. *vitamin D-binding protein* – DBP). DBP syntetyzowane jest głównie w wątrobie, jako polipeptyd o masie cząsteczkowej około 58 kDa, złożony z trzech domen, z których pierwsza zawiera region wiążący pochodne witaminy D. Stężenie DBP we krwi wynosi 4-8 μM i zwiększa się min. pod wpływem estrogenów, somatotropiny, interleukiny 6 (IL-6), a maleje np.: pod wpływem transformującego czynnika wzrostu beta. Zwraca uwagę fakt, że tylko około 5% miejsc wiązania DBP jest wysyconych metabolitami cholekalcyferolu, co sugeruje, że zakres funkcji DBP wykracza poza transport pochodnych witaminy D. Rzeczywiście, badania ostatnich lat wykazały, że DBP odgrywa ważną rolę m.in. w zależnej od składowej C5a dopełniacza chemotaksji leukocytów, aktywacji makrofagów, a także usuwaniu zewnątrzkomórkowej aktyny (powstałej w wyniku rozpadu komórek i uszkadzającej naczynia mikrokrążenia). Podstawową funkcją DBP pozostaje jednak transport metabolitów witaminy D, co zapewnia ich stabilność i dostępność komórkową [164].

I. 1.3. Receptor witaminy D

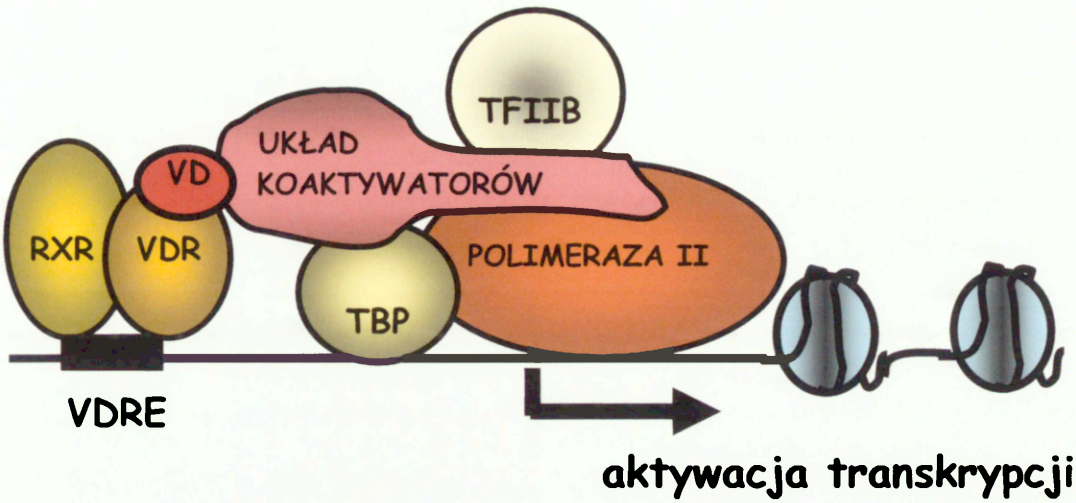
Działanie $1,25(OH)_2D_3$ na komórki docelowe odbywa się zarówno w mechanizmie pozagenomowym, jak i poprzez działanie na genom. Pozagenomowe działanie witaminy D związane jest z aktywacją kinaz tyrozynowych z rodziny Src (których geny wykazują homologię do genu *v-src* wirusa mięsaka Rous – ang. *Rous sarcoma virus*), a następnie uruchomieniem kaskady kinazy białkowej C lub kinazy MAP (ang. *mitogen activated protein kinase*). Mechanizmy aktywacji kinazy Src przez witaminę D nie są w pełni poznane i są obecnie przedmiotem badań [52].

Oddziaływanie genomowe odbywa za pośrednictwem wspomnianego już wcześniej receptora jądrowego witaminy D – VDR (ang. *vitamin D receptor*) i w ten sposób pochodne cholekalcyferolu wpływają zarówno na homeostazę wapniową, jak i na ogólnoustrojowe procesy wzrostu, dojrzewania i różnicowania komórek.

VDR, podobnie jak receptor dla trijodotyroniny, czy receptor kwasu retinowego, należy do II klasy receptorów jądrowych. Działa jako zależny od liganda czynnik transkrypcyjny, który po związaniu odpowiednich sekwencji (ang. *vitamin D responsive elements* – VDRE) w promotorach genów docelowych, reguluje ich ekspresję.

http://rcin.org.pl

Po połączeniu receptora z pochodnymi cholekalcyferolu [Ryc.2], dochodzi, do heterodimeryzacji z receptorem dla retnoidu X (ang. *retinoid X receptor* – RXR), związania z VDRE, przyłączenia innych białek koaktywujących i korepresorowych, a wreszcie utworzenia preinicjacyjnego kompleksu transkrypcyjnego [126].



Rycina 2. Schemat aktywacji transkrypcji genu docelowego przez receptor witaminy D. Receptor witaminy D (ang. *vitamin D receptor* – VDR), związany z witaminą D (ang. *vitamin D* – VD) przyłącza się w postaci heterodimera z receptorem dla retnoidu X (ang. *retinoid X receptor* – RXR) do odpowiednich sekwencji w promotorze genu docelowego (ang. *vitamin D responsive elements* – VDRE). Za pośrednictwem białka wiążącego sekwencję TATA (ang. *TATA binding protein* – TBP) i czynnika transkrypcyjnego IIB (ang. *transcription factor II B* – TFIIB), VDR kontaktuje się z kompleksem preinicjacyjnym, w skład którego wchodzi polimeraza II RNA i pozostałe podstawowe czynniki transkrypcyjne (dla uproszczenia nie przedstawione na tym schemacie). Poziom transkrypcji regulowany jest przez kompleks koaktywatorowy, który przyłącza się do VDR.

Stwierdzenie obecności VDR w limfocytach oraz komórkach prezentujących antygen sugeruje, że ich funkcja podlega regulacji przez witaminę D i dało podstawy badaniom nad wpływem pochodnych cholekalcyferolu na układ immunologiczny [42].

I. 2. Wpływ witaminy D na układ immunologiczny

Badania nad wpływem 1,25-dihydroksycholekalcyferolu na układ immunologiczny dotyczą głównie komórek prezentujących antygen oraz limfocytów T.

I.2.1. Badania nad wpływem 1,25$(OH)_2D_3$ na komórki prezentujące antygen

W badaniach dotyczących działania pochodnych witaminy D na komórki prezentujące antygen oceniano wpływ 1,25$(OH)_2D_3$ na różnicowanie, dojrzewanie i funkcję komórek dendrytycznych.

http://rcin.org.pl

W warunkach *in vitro* ludzkie monocyty krwi obwodowej różnicują się do niedojrzałych komórek dendrytycznych pod wpływem interleukiny 4 (IL-4) oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte-macrophages colony stimulating factor* – GM-CSF) [133]. Podczas różnicowania monocytów do komórek dendrytycznych obserwuje się na ich powierzchni wzrost ekspresji cząsteczki kostymulującej CD1a (ang. *cluster of differentiation*). Badając metodą cytometrii przepływowej hodowle monocytów poddane działaniu $1,25(OH)_2D_3$, nie obserwowano wzrostu ekspresji CD1a pod wpływem IL-4 i GM-CSF [23,121].

Podczas dojrzewania komórek dendrytycznych, obserwuje się na ich powierzchni zmniejszenie ekspresji cząsteczki CD1a, a wzrost ekspresji innych cząsteczek kostymulujących, m.in. CD40, CD83, CD86. W warunkach doświadczalnych podobne zmiany stwierdza się poddając niedojrzałe komórki dendrytyczne np.: działaniu liposacharydu (LPS) [30]. W hodowli niedojrzałych komórek dendrytycznych z LPS, po dodaniu $1,25(OH)_2D_3$, obserwowano zmniejszenie ekspresji cząsteczek CD40, CD83, CD86 o około 50% w porównaniu z komórkami kontrolnymi [23,121].

W badaniach przeprowadzonych na hodowlach dojrzałych komórek dendrytycznych aktywowanych ligandem CD40 stwierdzono wzrost stężenia cytokin, w tym IL-10 oraz IL-12 [29]. Z kolei po dodaniu do hodowli $1,25(OH)_2D_3$ zaobserwowano obniżenie stężenia IL-12 (cytokiny stymulującej m.in. powstawanie limfocytów T pomocniczych 1 – ang. *T helper 1* – Th_1) oraz 7-krotny wzrost syntezy IL-10 (która m.in. bierze udział w hamowaniu wytwarzania cytokin prozapalnych, w tym interferonu γ – IFN-γ oraz IL-2) [121].

Niedawno poznano niektóre z molekularnych mechanizmów w jakich witamina D może wpływać na działanie komórek prezentujących antygen. W badaniach nad regulacją promotora genu *GM-CSF*, na podstawie testów opóźnienia migracji w żelu, stwierdzono że sekwencja wiążąca VDR nakłada się częściowo na sekwencję wiążącą czynnik jądrowy AT (ang. *nuclear factor* AT – NF-AT). W testach koimmunoprecypitacji DNA zaobserwowano, że w obecności $1,25(OH)_2D_3$ monomer VDR może blokować miejsce wiązania NF-AT [155]. Natomiast w badaniach nad regulacją promotora genu *IL-12* stwierdzono, że w obecności $1,25(OH)_2D_3$ heterodimer VDR/RXR może blokować miejsce wiązania czynnika jądrowego κB (NF-κB) [39].

W badaniach *in vivo* zaobserwowano, że po podaniu $1,25(OH)_2D_3$ u 50% badanych myszy wydłuża się czas utrzymania przeszczepów wysp trzustkowych. Na powierzchni komórek dendrytycznych pochodzących od zwierząt po przeszczepie poddanych działaniu $1,25(OH)_2D_3$ stwierdzono niski poziom ekspresji cząsteczek kostymulujących (CD40, CD80, CD86), w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi [59].

http://rcin.org.pl

I. 2.2. Badania nad wpływem $1,25(OH)_2D_3$ na limfocyty T

W testach proliferacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej stwierdzono, że pod wpływem $1,25(OH)_2D_3$ dochodzi do hamowania indukowanej antygenem (KLH – *ang. keyhole limpet hemocyanin*) proliferacji limfocytów T, czego nie obserwowano w hodowlach limfocytów stymulowanych mitogenami (konkawaliną A i fitohemaglutyniną) [19].

Badając ekspresję genów cytokin w hodowlach limfocytów T krwi obwodowej stymulowanych fitohemaglutyniną, a następnie poddanych działaniu $1,25(OH)_2D_3$, zaobserwowano, zarówno na poziomie mRNA jak i białka, zmniejszenie ekspresji genów *IL-2* i *IFN-γ* [129,130]. Natomiast wyniki badań oceniających wpływ $1,25(OH)_2D_3$ na syntezę IL-4 (cytokiny wydzielanej głównie przez limfocyty Th_2) są niejednoznaczne. W badaniu przeprowadzonym na hodowlach limfocytów T $CD4^+$ stymulowanych syntetycznym peptydem OVA (fragmentem owalbuminy) i poddanych działaniu $1,25(OH)_2D_3$ odnotowywano wzrost stężenia IL-4 [20]. Natomiast w badaniu oceniającym profil cytokin wydzielanych przez hodowlę limfocytów T $CD4^+$ poddanych stymulacji za pomocą przeciwciał anty-CD3 i anty CD28, po dodaniu $1,25(OH)_2D_3$ obserwowano obniżenie stężenia IL-4 [139]. Z kolei w hodowli limfocytów T krwi obwodowej stymulowanych fitohemaglutyniną, a następnie IL-2 (pobudzającą różnicowanie limfocytów T w kierunku limfocytów cytotoksycznych), po dodaniu $1,25(OH)_2D_3$ nie stwierdzono wzrostu syntezy IL-4, w porównaniu z hodowlą kontrolną, stymulowaną samym mitogenem [165].

Częściowo poznany został molekularny mechanizm w jakim $1,25(OH)_2D_3$ może regulować ekspresję genów cytokin wydzielanych przez limfocyty T. W badaniach nad regulacją promotora genu *IL-2*, w testach koimmunoprecypitacji DNA zaobserwowano, że w obecności $1,25(OH)_2D_3$ heterodimer VDR/RXR może blokować miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego NF-AT, a także czynnika AP-1 (ang. *activating protein*) [2,146]. Natomiast w promotorze genu *IFN-γ* stwierdzono obecność negatywnego VDRE (nVDRE), który po związaniu kompleksu $1,25(OH)_2D_3$-VDR/RXR hamuje transkrypcję genu [33].

I. 2.3. Witamina D a rozwój chorób autoimmunologicznych

Pod wpływem różnorodnych czynników środowiskowych, u osób z odpowiednią predyspozycją genetyczną może dojść do przełamania tolerancji względem własnych

http://rcin.org.pl

antygenów i rozwoju procesów autoimmunologicznych [40]. Niedobór witaminy D, poprzez zachwianie równowagi immunologicznej, może stanowić czynnik środowiskowy sprzyjający rozwojowi zjawisk autoimmunologicznych. Potwierdzają to badania przeprowadzone na zwierzęcych modelach chorób autoimmunologicznych, np.: zaobserwowano, że niedobór cholekalcyferolu w diecie przyspiesza u myszy zimmunizowanych antygenami mieliny (np.: MOG35-55) wystąpienie objawów doświadczalnego alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia (ang. *experimental allergic encephalomyelitis* – EAE), które stanowi model stwardnienia rozsianego [25].

Zaobserwowano również, że podawanie $1,25(OH)_2D_3$ (i jego analogów) może wpływać na przebieg chorób autoimmunologicznych, a nawet zapobiegać ich wystąpieniu. Podanie $1,25(OH)_2D_3$ myszom wciągu 14 dni od immunizacji kolagenem typu II, całkowicie zapobiega rozwojowi zapalenia stawów (ang. *collagen induced arthritis* – CIA – model reumatoidalnego zapalenia stawów) [24]. Natomiast suplementacja $1,25(OH)_2D_3$ w diecie u myszy z CIA zapobiega rozwojowi ciężkich objawów zapalenia. Podobnie u myszy NOD (skrót z ang. *nonobese diabetic* – myszy u których, wskutek autoimmunologicznego zapalenia wysp trzustkowych, dochodzi do rozwoju cukrzycy insulinozależnej) zaobserwowano, że podanie $1,25(OH)_2D_3$ przed ukończeniem 3-go tygodnia życia zapobiega wystąpieniu choroby [94]. Natomiast w badaniu immunohistochemicznym wysp trzustkowych pochodzących od dorosłych zwierząt z cukrzycą, które otrzymywały analog $1,25(OH)_2D_3$ (Ro 26-2198) opisywano ograniczenie (o około 50%) nacieku zapalnego w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi otrzymującymi placebo [60]. Z kolei w badaniu histologicznym wycinków rdzenia kręgowego zwierząt z EAE, którym podawano analog witaminy D (Ro 63-2023), obserwowano ograniczenie nacieku limfocytarnego i zmniejszenie liczby ognisk demielinizacji [95].

Wyniki badań epidemiologicznych sugerują, że niedobór cholekalcyferolu w diecie wiąże się z częstszym występowaniem chorób autoimmunologicznych u ludzi, a właściwa suplementacja preparatami witaminy D może stanowić czynnik ochronny [26,27]. Zaobserwowano, że w populacjach rasy kaukaskiej zachorowalność na stwardnienie rozsiane jest wyższa w rejonach o mniejszym nasłonecznieniu, a przebieg choroby odpowiada sezonowym zmianom w stężeniach $25(OH)D_3$ (zaostrzenia w sezonie wiosennym, kiedy stwierdza się najniższe poziomu $25(OH)D_3$ w surowicy) [6,8,55,167]. Obserwacje te potwierdzono w badaniu prospektywnym, w którym wykazano, że dzienne spożycie witaminy D w dawce większej niż 400 IU/dobę zmniejsza ryzyko zachorowania na stwardnienie rozsiane (ryzyko względne ang. *relative risk* – RR = 0,59) [105]. Podobne wyniki uzyskano badając związek pomiędzy zawartością witaminy D w diecie, a

http://rcin.org.pl

częstością występowania reumatoidalnego zapalenia stawów (RR = 0,67) [96]. Wykazano również, że niedobór witaminy D w ciągu pierwszych 12 miesięcy życia stanowi czynnik ryzyka zachorowania na cukrzycę typu 1 (RR = 3,0) [69].

Obecnie, pochodne witaminy D znajdują zastosowanie w leczeniu łuszczycy, przewlekłej zapalnej choroby skóry prawdopodobnie o podłożu autoimmunologicznym [53]. Pierwsze doniesienie na ten temat dotyczy chorego, u którego po doustnym podaniu 1α-hydroksycholekalcyferolu ($1\alpha(OH)D_3$) w celu leczenia osteoporozy, stwierdzono remisję zmian łuszczycowych [100]. W następnych badaniach klinicznych zaobserwowano, że stosowanie pochodnych witaminy D zarówno zewnętrznie ($1,25(OH)_2D_3$, $1,24(OH)_2D_3$, kalcipotriol) jak i systemowo ($1\alpha(OH)D_3$, $1,25(OH)_2D_3$) po kilku tygodniach terapii powoduje poprawę kliniczną leczonych zmian u około 70-80% chorych (ocena według skal *Total Severity Score* – TSS, *Psoriasis Area Severity Index* – PASI) [4,93,108]. W badaniach eksperymentalnych na hodowlach keratynocytów zaobserwowano m.in., że w komórkach poddanych działaniu $1,25(OH)_2D_3$ dochodzi do ograniczenia inkorporacji znakowanych prekursorów syntezy DNA – 3H-tymidyny i 5-bromo-2deoksyurydyny – co świadczy o ograniczeniu proliferacji. Po dodaniu $1,25(OH)_2D_3$ do hodowli keratynocytów obserwowano również wzrost tworzenia tzw. zrogowaciałych kopert (ang. *cornified envelopes*), których obecność jest jednym ze wskaźników zróżnicowania [145]. Ponadto opisywano wpływ pochodnych witaminy D na profil wydzielanych w zmianach łuszczycowych cytokin: w biopsjach pobranych ze zmian łuszczycowych od chorych leczonych analogiem witaminy D (kalcipotrien) zaobserwowano wzrost stężenia IL-10 (o 57%), a zmniejszenie stężenia IL-8 (o 70%), w porównaniu z grupą chorych, którym podawano placebo [73]

Istnieją także doniesienia wskazujące na potencjalny związek witaminy D z rozwojem autoimmunologicznych chorób tarczycy. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na hodowli szczurzych tyreocytów (ang. *Fisher rat thyroid line* – FRTL-5) po dodaniu $1,25(OH)_2D_3$ obserwowano hamowanie indukowanej przez IFN-γ ekspresji antygenów klasy II głównego układu zgodności tkankowej [150]. Natomiast u myszy zimmunizowanych tyreoglobuliną (model autoimmunologicznego zapalenia tarczycy), poddanych łączonej terapii cyklosporyną A i $1,25(OH)_2D_3$, w badaniu histologicznym tarczyc obserwowano ograniczenie nacieków zapalnych w porównaniu do zwierząt kontrolnych otrzymujących samą cyklosporynę A [49].

http://rcin.org.pl

I. 3. Wpływ czynników genetycznych na rozwój choroby Gravesa-Basedowa

Autoimmunologiczne choroby tarczycy (ang. *autoimmune thyroid diseases* – AITD), do których zalicza się chorobę Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' disease* – GD) oraz chorobę Hashimoto (ang. *Hashimoto's thyroditis* – HT), należą do jednych z najczęstszych chorób autoimmunologicznych u człowieka. Charakterystycznym objawem GD jest nadczynność tarczycy spowodowana przeciwciałami wiążącymi i stymulującymi receptor dla tyreotropiny (ang. *thyroid stimulating hormone receptor* – TSH-R), w wyniku czego dochodzi do nadmiernej biosyntezy tyroksyny i trijodotyroniny. Obraz kliniczny GD jest niejednorodny, objawom ze strony tarczycy mogą towarzyszyć różnie nasilone zmiany w obrębie tkanek oczodołu (oftalmopatia), skóry przedgoleni (dermopatia) oraz dystalnych paliczków rąk i stóp (akropatia). Chorzy różnią się również wiekiem wystąpienia choroby oraz długoterminową odpowiedzią na leczenie tyreostatykami [106].

Etiopatogeneza GD ma bardzo złożony charakter. Rozwój choroby uwarunkowany jest wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, które nie zostały dotychczas w pełni poznane [109,163].

Istotny wpływ czynników genetycznych na rozwój GD potwierdzają badania bliźniąt, w których stwierdzono, że zapadalność na GD jest wyższa wśród bliźniąt monozygotycznych niż wśród bliźniąt dwuzygotycznych [22,131]. Na podstawie badań bliźniąt oceniono również, że udział czynników genetycznych w patogenezie GD wynosi około 80%.

W ostatnich latach dokonał się wielki postęp w zrozumieniu podłoża genetycznego GD. Obecnie wiadomo, że rozwój tej choroby nie zależy od zmian w jednym genie, a uwarunkowany jest interakcją wielu genów o zmiennej penetracji, które wpływają na predyspozycję do GD. W celu poszukiwania genów związanych z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa wykorzystywano dwie strategie badawcze: analizę sprzężeń (ang. *linkage analysis*) oraz analizę asocjacji (ang. *association analysis*).

I. 3.1. Badania analizy sprzężeń

Celem analizy sprzężeń jest znalezienie regionu chromosomu (*locus*), w którym występuje gen związany z chorobą. Zaletą tej metody jest możliwość wykrycia genu o dużym efekcie działania, oraz możliwość przeszukania całego genomu (ang. *whole genom scan*) w poszukiwaniu *loci* warunkujących daną chorobę. W tym celu analizuje się „sprzężenie" choroby ze wcześniej zmapowanymi markerami DNA na wszystkich chromosomach u członków rodzin dotkniętych daną chorobą [58].

http://rcin.org.pl

Badania analizy sprzężeń prowadzone przez różne światowe ośrodki wykazały, że istnieje szereg *loci* na różnych chromosomach związanych z chorobą Gravesa-Basedowa [12,148,152,159,161]. Jednak replikacja badań analizy sprzężeń w różnych grupach etnicznych jest niewielka, co wskazuje na heterogenność genetyczną GD. Co więcej, żadnemu z wymienianych dotychczas *loci*, nie przypisano głównego znaczenia w patogenezie choroby [148.]. Sugeruje to, że na podatność do rozwoju GD wpływa szereg genów zlokalizowanych na różnych chromosomach.

Co ciekawe, niektóre *loci* podatności do GD są wspólne z innymi chorobami immunologicznymi np.: cukrzycą typu I i stwardnieniem rozsianym, co może tłumaczyć częste współwystępowanie chorób autoimmunologicznych [148]. Należy również podkreślić, że poznane dotychczas *loci* wymagają dokładnego scharakteryzowania, ponieważ możliwa jest sytuacja, że badane są jedynie „nieszkodliwe" markery, a za rozwój choroby w rzeczywistości są odpowiedzialne inne, sprzężone z nimi geny.

I. 3.2. Badania analizy asocjacji

Analiza asocjacji jest drugą, obok analizy sprzężeń, metodą badawczą stosowaną w poszukiwaniu genów związanych z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa. W badaniach asocjacyjnych porównuje się częstość występowania określonych alleli w grupie osób chorych i zdrowych. Zakłada się, że allel określonego genu jest związany z rozwojem choroby, jeśli występuje ze znamiennie większą częstością wśród osób chorych niż w grupie kontrolnej. Analiza asocjacji jest bardzo czułą metodą, dzięki której można wykryć geny o małym efekcie działania (mniejszym niż 5%). W badaniach asocjacyjnych stosuje się często strategie genów „kandydujących", polegającą na wybraniu *a priori* genu, który teoretycznie mógłby mieć związek z daną chorobą, w oparciu o założenie, że zaburzona ekspresja, budowa lub funkcja białka kodowanego przez dany gen jest bezpośrednim powodem rozwoju choroby.

Podczas poszukiwania genów odpowiedzialnych za występowanie choroby Gravesa-Basedowa założono zmiany w antygenach tarczycowych i zaburzenia regulacji układu immunologicznego. Wśród antygenów tarczycowych, których geny badano pod kątem związku z rozwojem GD należy wymienić receptor dla hormonu tyreotropowego (TSH-R) [36], peroksydazę tarczycową [123] oraz tyreoglobulinę [154]. Analizowano również szereg genów kodujących białka uczestniczące w odpowiedzi immunologicznej, w tym:

– łańcuchy immunoglobulin np.: łańcuch ciężki immunoglobuliny G [107]

– receptory limfocytów T [41]

– cząsteczki kostymylujące limfocyty T np.: CD40 [75,81,153].

– cząsteczki adhezyjne np.: cząsteczkę adhezji międzykomórkowej-1 (ang. *intercellular*

http://rcin.org.pl

adhesion molecule-1 – ICAM-1) [78]

- cytokiny np.: interleukinę 6 (IL-6), interleukinę 13 (IL-13), czynnik martwicy nowotworów α (ang. *tumour necrosis factor α* – TNFα) [16,17,18,67].

Jednak wyniki wielu badań asocjacyjnych są niejednoznaczne i wymagają dalszej replikacji.

I. 3.3. Czynniki genetyczne predysponujące do rozwoju choroby Gravesa-Basedowa w populacjach rasy kaukaskiej

Do najlepiej scharakteryzowanych czynników genetycznych predysponujących do rozwoju choroby Gravesa-Basedowa (GD) w populacjach rasy białej należą geny głównego układu zgodności tkankowej (ang. *human leukocyte antigen* – HLA), gen kodujący antygen 4 związany z cytotoksycznym limfocytem T (ang. *cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4* – CTLA-4) oraz gen kodujący fosfatazę tyrozynową limfocytów T (ang. *lymphoid-specific tyrosine phosphatase* – LYP) [68,134,135,157].

a. Główny układ zgodności tkankowej

Główny układ zgodności tkankowej (HLA, chromosom 6) składa się z ponad 100 genów i należy do najbardziej polimorficznych regionów ludzkiego genomu [124]. Obecność pewnych cząsteczek kodowanych przez geny układu HLA wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia niektórych chorób, zwłaszcza o podłożu autoimmunologicznym [74]. Szereg badań potwierdziło znaczącą rolę genów HLA w rozwoju choroby Gravesa-Basedowa, a w populacjach rasy białej najlepiej udowodniony jest związek GD z allelami *HLA-DRB1*03* kodującymi cząsteczkę HLA-DR3. Względne ryzyko zachorowania na GD dla osób posiadających cząsteczkę HLA-DR3 wynosi w różnych populacjach od 2.0 do 7.6 [7,37,68,91].

b. Antygen 4 związany z cytotoksycznym limfocytem T

Spośród genów nienależących do kompleksu HLA, najsilniejszy związek z rozwojem GD stwierdzono dla genu kodującego cząsteczkę CTLA-4 (chromosom 2). Cząsteczka CTLA-4 jest obecna na powierzchni limfocytów T, a jej związanie z cząsteczką B7 na powierzchni komórek prezentujących antygen prowadzi do zahamowania aktywacji limfocytów T i apoptozy. Zaburzenie funkcji CTLA-4 może prowadzić do nadmiernej odpowiedzi immunologicznej i zjawiska autoagresji. W eksonie 1 genu *CTLA-4* występuje polimorfizm (czyli mutacja występująca w populacji z częstością większą niż 1%) zamiany pojedynczych nukleotydów A na G w pozycji 49 – A49G (ang. *single nucleotide*

http://rcin.org.pl

polymorphism – SNP), który ma wpływ na funkcję CTLA-4 i może zaburzać apoptozę aktywowanych limfocytów T [77]. Niezależne badania przeprowadzone w różnych ośrodkach wykazały związek allelu 49G z rozwojem chorób autoimmunologicznych, w tym choroby Gravesa-Basedowa [45,63,77,157,169].

c. Fosfataza tyrozynowa limfocytów T.

Nowym, niedawno odkrytym czynnikiem, który związany jest z predyspozycją genetyczną do rozwoju GD, jest gen kodujący fosfatazę tyrozynową limfocytów T (*LYP*, chromosom 1). LYP, pośrednicząc w transdukcji sygnałów komórkowych działa jako negatywny regulator aktywacji limfocytów T [64]. W genie *LYP* zidentyfikowano polimorfizm zamiany pojedynczych nukleotydów C1858T, który wpływa na powinowactwo LYP do kinazy regulatorowej Csk (ang. *c-src tyrosine kinase*) [21]. Stwierdzono, że allel 1858T, który jest związany ze zmniejszonym powinowactwem LYP względem Csk, a przez to z nadmierną odpowiedzią immunologiczną ze strony limfocytów T, wpływa na podatność do rozwoju chorób autoimmunologicznych w populacjach rasy białej, w tym do rozwoju GD [138,160].

Z uwagi na heterogenność genetyczną choroby Gravesa-Basedowa, wyniki badań asocjacyjnych wymagają replikacji w różnych populacjach. W badaniach przeprowadzonych w populacji polskiej potwierdzony został związek alleli głównego układu zgodności tkankowej HLA (allele *DRB1*03*), polimorfizmu genu *CTLA-4* (allel 49G) oraz polimorfizmu genu *LYP* (allel 1858T) z rozwojem GD [15,16,79,80,136].

Konieczne jest również poszukiwanie nowych czynników genetycznych predysponujących do rozwoju autoimmunologicznych chorób tarczycy oraz analiza zachodzących między nimi interakcji [10]. Poznanie tych czynników może nie tylko przybliżyć patogenezę choroby, ale również dostarczyć markerów genetycznych pomocnych w ocenie wczesnego ryzyka wystąpienia GD, prognozowaniu przebiegu nadczynności tarczycy i rozwoju związanej z GD oftalmopatii.

http://rcin.org.pl

ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Aktywny metabolit witaminy D – $1,25(OH)_2D_3$ – wpływając na funkcję limfocytów T i prezentację antygenów, działa jako czynnik immunomodulujący. Zaobserwowano również, że podawanie $1,25(OH)_2D_3$ zapobiega rozwojowi chorób autoimmunologicznych u zwierząt, a niedobór witaminy D wiąże się z częstszym występowaniem chorób autoimmunologicznych u ludzi (np.: cukrzycy typu 1, stwardnienia rozsianego czy reumatoidalnego zapalenia stawów).

Działanie witaminy D zależy od prawidłowej funkcji wielu białek, które nazwano układem witaminy D (ang. *vitamin D system*). Zaburzenie funkcji białek układu witaminy D, np.: 1α-hydroksylazy (CYP27B1) i 24-hydroksylazy (CYP24), od których zależy stężenie aktywnego metabolitu, białka transportującego (DBP), czy receptora (VDR), przez który witamina D reguluje transkrypcję genów, może upośledzać działanie $1,25(OH)_2D_3$ i wpłynąć na kontrolę procesów immunologicznych. Dlatego geny tych białek są dobrymi „kandydatami" w badaniach nad podatnością genetyczną do rozwoju chorób autoimmunologicznych.

Choroba Gravesa-Basedowa (GD) jest autoimmunologiczną chorobą tarczycy o bardzo złożonej patogenezie. Rozwój GD uwarunkowany jest wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, które nie są jeszcze w pełni poznane a heterogenność genetyczna sprawia, że o wystąpieniu GD mogą decydować różne czynniki w różnych populacjach.

Celem niniejszej pracy było:

1. Zbadanie związku wybranych polimorfizmów genów układu witaminy D (*VDR, DBP, CYP27B1* oraz *CYP24*) z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa.

Związek wybranych polimorfizmów genów układu witaminy D z rozwojem GD badano za pomocą analizy asocjacji przypadek-kontrola (ang. *case-control association study*), porównując częstość alleli, genotypów i haplotypów w grupie chorych z GD i u zdrowych ochotników.

W pierwszym etapie pracy analizowano związek polimorfizmów poszczególnych genów układu witaminy D z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej. Następnie zbadano, czy między wybranymi polimorfizmami zachodzą interakcje gen-gen. Wyniki tej pracy porównano z dotychczas opublikowanymi badaniami nad związkiem polimorfizmów genów układu witaminy D z rozwojem GD w różnych populacjach i tam, gdzie było to możliwe, przeprowadzono metaanalizę.

2. Zbadanie związku wybranych polimorfizmów genów układu witaminy D z fenotypem choroby Gravesa-Basedowa.

Korelację genotyp-fenotyp badano za pomocą analizy asocjacji porównując częstość

http://rcin.org.pl

występowania poszczególnych genotypów u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa po podziale na grupy w zależności od płci, stopnia nasilenia zmian ocznych, dodatniego wywiadu rodzinnego dotyczącego autoimmunologicznych chorób tarczycy, a także wieku, w którym rozpoznano GD.

W Tabeli I przedstawiono polimorfizmy genów *VDR, DBP, CYP27B1* oraz *CYP24* badane w tej pracy[1]. Analizie poddano polimorfizmy, dla których został wykazany związek z rozwojem chorób autoimmunologicznych w innych populacjach. Są to polimorfizmy o potencjalnym znaczeniu funkcjonalnym lub takie, które mogą stanowić marker genetyczny sprzężony z innym funkcjonalnym polimorfizmem. **Należy podkreślić, że wpływ tych polimorfizmów na rozwój i przebieg chorób autoimmunologicznych nie był dotychczas badany w populacji polskiej.**

[1] Nazewnictwo polimorfizmów genów układu witaminy D nie jest ujednolicone. W literaturze spotyka się zarówno nazwy systematyczne, jak i nazwy pochodzące od:

- enzymów restrykcyjnych służących do wykrywania danego polimorfizmu
- powodowanej przez polimorfizm substytucji aminokwasów
- lokalizacji polimorfizmu względem miejsca startu transkrypcji.

W tej pracy w odniesieniu do polimorfizmów analizowanych za pomocą enzymów restrykcyjnych stosowano nazwy pochodzące od odpowiednich enzymów (np. polimorfizm G/A w intronie 8 genu *VDR* wykrywany enzymem *Bsm*I – polimorfizm *Bsm*I).

http://rcin.org.pl

Tabela I. Badane polimorfizmy w genach układu witaminy D

Gen	Lokalizacja	Polimorfizm	Nazwa systematyczna	Enzym restrykcyjny[1]	Proponowane znaczenie funkcjonalne	Opisywany związek z chorobami autoimmunologicznymi
VDR	ekson 2	C/T*	rs10735810	*Fok*I	zmiana miejsca startu translacji	MS, T1D, AD
	intron 8	G/A*	rs1544410	*Bsm*I	markery genetyczne sprzężone z innym funkcjonalnym polimorfizmem	MS, T1D, AD
	intron 8	T/G*	rs7975232	*Apa*I		MS, T1D
	ekson 9	T/C*	rs731236	*Taq*I		MS, T1D, AD, RA
DBP	ekson 11	C/A*	rs4588	*Sty*I[2]	zamiana aminokwasów T/K	MS, T1D, RA
	ekson 11	G/T*	rs7041	*Hae*III[3]	zamiana aminokwasów D/E	MS, T1D, RA
	intron 8	$(TAAA)_N$**	rs10693211		wpływ na stabilność mRNA	GD
CYP27B1	promotor	C/A*	rs10877012	*Tfi*I[4]	zmiana miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych	T1D, AD,GD, HT
CYP24	region regulatorowy 5'	G/C*	rs2585436	*Bst*UI		AD

T – treonina; K – lizyna; D – kwas asparaginowy; E – kwas glutaminowy; MS – stwardnienie rozsiane (ang. *multiple sclerosis*); *T1D – cukrzyca typu 1* (ang. *type 1 diabetes*); *AD – choroba Addisona* (ang. *Addison's disease*); *RA – reumatoidalne zapalenie stawów* (ang. *rheumatoid arthritis*); *GD – choroba Gravesa-Basedowa* (ang. *Graves' disease*); *HT – choroba Hashimoto* (ang. *Hashimoto's thyroditis*).

* *polimorfizm zamiany pojedynczych nukleotydów* (ang. *single nucleotide polymorphism – SNP*) ** *polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń* (ang. *tandem repeat polymorphism*)

[1] *W tej pracy, w odniesieniu do polimorfizmów analizowanych za pomocą enzymów restrykcyjnych stosowane są nazwy enzymów służących do ich wykrywania (np. polimorfizm G/A w intronie 8 genu VDR – polimorfizm Bsm*I) [2] *Inna nazwa spotykana w literaturze to T420K* [3] *Inna nazwa spotykana w literaturze to D416E*

[4] *Inna nazwa spotykana w literaturze to polimorfizm C-1260A*

http://rcin.org.pl

III. MATERIAŁY I METODY

III. 1. Charakterystyka grup badanych

Polimorfizm genów układu witaminy D badano u 338 niespokrewnionych chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) będących pod opieką Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Akademii Medycznej Warszawie, których charakterystykę zawarto w Tabeli II. Rozpoznanie GD oparto na podstawie klinicznych objawów nadczynności tarczycy potwierdzonych wynikami badań hormonalnych (hormon tyreotropowy, wolna trijodotyronina, wolna tyroksyna), dodatnim mianem przeciwciał przeciwko receptorowi dla tyreotropiny (TRAK Lumitest, B.R.A.H.M.S Diagnostica, Germany), obecnością typowego wola miąższowego i/lub zwiększonym wychwytem radiojodu w badaniu scyntygraficznym. Objawy oczne u chorych z GD oceniano według klasyfikacji Amerykańskiego Towarzystwa Endokrynologicznego (skala NOSPECS). Do grupy z klinicznie jawną oftalmopatią (N=125) zakwalifikowano chorych z wytrzeszczem, zaburzeniami funkcji mięśni okoruchowych, z zajęciem rogówki i neuropatią nerwu wzrokowego.

Grupę kontrolną stanowiło 185 zdrowych ochotników (119 kobiet i 66 mężczyzn) bez chorób tarczycy i innych chorób autoimmunologicznych oraz z negatywnym wywiadem rodzinnym w tym kierunku.

Protokół badania został zaaprobowany przez Komisję Nadzoru nad Dokonywaniem Badań na Ludziach i Zwierzętach IMDiK PAN. Uczestnicy zostali poinformowani o charakterze badań i wyrazili pisemną zgodę na badania genetyczne. W przypadku osób niepełnoletnich, zgodę tę uzyskano również od opiekunów prawnych.

Tabela II. Charakterystyka kliniczna chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD)

	N	
Mężczyźni	338	20,1%
Wiek rozpoznania GD (lata)*	332	38,3 ± 14,6
Czas trwania choroby (lata)*	332	4,0 ± 6,0
Oftalmopatia	338	37,0%
Wywiad rodzinny w kierunku AITD	302	34,8%
Sposób leczenia nadczynności tarczycy:	337	
tyreostatyki		41,5%
radiojod		41,2%
leczenie chirurgiczne		16,3%

N – liczba pacjentów, o których uzyskano informację, GD – choroba Gravesa-Basedowa.

AITD – autoimmunologiczne choroby tarczycy (ang. *autoimmune thyroid diseases*).

* *Wiek rozpoznania i czas trwania choroby przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe.*

http://rcin.org.pl

III. 2. Analiza genetyczna

Izolację genomowego DNA z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej przeprowadzono metodą wysalania [97]. Do namnożenia fragmentów DNA zawierających badane polimorfizmy stosowano reakcję łańcuchową polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR). Polimorfizmy zamiany pojedynczych nukleotydów w genie *VDR*, eksonie 11 genu *DBP*, oraz w genach hydroksylaz *CYP27B1* i *CYP24* badano za pomocą analizy długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism* – RFLP). Analizę polimorfizmu zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ w intronie 8 genu *DBP* przeprowadzano rozdzielając produkty PCR w 10% żelu poliakrylamidowym. Poprawność interpretacji wyników weryfikowano za pomocą sekwencjonowania wybranych losowo próbek.

III. 2. 1. Wykaz stosowanych odczynników

Nazwa odczynnika:

- agaroza
- akrylamid/bisakrylamid 29:1
- alkohol etylowy
- alkohol metylowy
- albumina surowicy bydlęcej
- azotan srebra ($AgNO_3$)
- błekit bromofenylowy
- bromek etydyny
- chlorek magnezu ($MgCl_2$)
- chlorek potasu (KCl)
- chlorek sodu (NaCl)
- formaldehyd
- formamid
- glicerol
- kwas azotowy (V) (HNO_3)
- kwas borowy (H_3BO_3)
- kwas octowy
- kwas siarkowy (VI) (H_2SO_4)
- kwas solny (HCl)
- kwas trichlorooctowy
- peroksodisiarczan (VI) amonu (APS)
- proteinaza K
- sacharoza
- siarczan dodecylu sodu (SDS)
- siarczan (IV) sodu (Na_2SO_3)
- sól sodowa kwasu etylenodiaminooctowego (EDTA)
- węglan sodu (Na_2CO_3)
- tetrametyloetylenodiamina (TEMED)
- tris(hydroksymetylo)-aminometan (TRIS)
- monoeter 4-(1,1,3,3-tetrametylobutylo)fenylowy poliglikolu (10) etylenowego (Triton X-100)

Wymienione odczynniki laboratoryjne o wysokiej czystości chemicznej (ang. *molecular biology grade*) pochodziły z firm: Bio-Rad, MERC, Roche, Sigma.

http://rcin.org.pl

III. 2. 2. Bufory i roztwory

Izolacja DNA z krwi pełnej

Roztwór A	320 mM sacharozy
	10 mM TRIS pH 7.5
	5 mM $MgCl_2$
	0,01% Triton X-100
Roztwór B	400 mM NaCl
	2 mM EDTA pH 8
	10 mM TRIS
Bufor TE	1 M TRIS HCl pH 8
	0,25 mM EDTA pH 8

Elektroforeza w żelu agarozowym i poliakrylamidowym

Bufor TBE (5x)	450 mM TRIS
	450 mM H_3BO_3
	10 mM EDTA pH 8
Bufor TS	400 mM TRIS
	40 mM H_2SO_4

III. 2. 3. Izolacja genomowego DNA z krwi pełnej

W celu izolacji genomowego DNA z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, do 7 ml krwi żylnej dodawano 45 ml roztworu A (lizującego), schłodzonego do temperatury 4°C i całość dokładnie mieszano. Po 10 minutach inkubacji na lodzie, mieszaninę wirowano przez 10 min w 2500 x g (3500 rpm) w temperaturze 4°C. Po odrzuceniu nadsączu osad płukano roztworem A, a inkubację i wirowanie powtarzano jak poprzednio. Po ponownym usunięciu nadsączu osad zalewano 3 ml roztworu B z dodatkiem 10% SDS, a następnie dodawano 15 µl roztworu proteinazy K (Merck, 20 ng/ml). Całość inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C na wytrząsarce (200-220 rpm). Następnie, do każdej probówki dodawano 1 ml nasyconego roztworu chlorku sodu, całość dokładnie mieszano i wirowano przez 10 minut w temperaturze 18°C, 2500 x g. Po wirowaniu, pozbawiony białek nadsącz zbierano do nowej probówki i zalewano 2 objętościami 99,8% zmrożonego etanolu (-20°C) w celu precypitacji DNA. Sprecypitowane DNA dwukrotnie płukano w roztworze 70% etanolu i po odparowaniu alkoholu zalewano 200 µl buforu TE.

Stężenie DNA określano spektrofotmoetrycznie, mierząc absorbancję prób przy długości fali λ = 260nm. Następnie obliczano wskaźnik czystości DNA (absorbancja λ = 260nm/ absorbancja λ = 280nm). Wartości wskaźnika pomiędzy 1,6 a 1,8 wskazują na wysoką

http://rcin.org.pl

czystość wyizolowanego DNA, natomiast wartości poniżej 1,6 świadczą o tym, że preparat jest zanieczyszczony białkami. Po oznaczeniu stężenia, do wyizolowanego DNA dodawano bufor TE do uzyskania stężenia końcowego 500 ng/µl. Próbki przechowywano w temperaturze -75°C. Dla potrzeb dalszych doświadczeń przygotowywano rozcieńczenia 50 ng/µl w wodzie, które przechowywano w temperaturze 4°C

III. 2. 4. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Przy projektowaniu starterów do PCR posłużono się sekwencjami genów dostępnymi w bazie GenBank; numery dostepu: *VDR* – 133554, *DBP* – L10641, *CYP27B1* – AF072470, *CYP24* – AL138805. Syntezę starterów zamawiano w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy DNA IBB PAN „Oligo"(http://www.oligo.pl).

Dla każdej pary starterów dobierano indywidualnie warunki reakcji: stężenie magnezu, temperatury przyłączania, oraz ilość cykli PCR. Temperatury przyłączania (topnienia – ang. *melting temperature* – T_m) ustalono na podstawie PCR przeprowadzonej w termocyklerze z termogradientowym blokiem grzewczym (MJ Research, PTC-200 Engine Gradient, MJ Research USA) – Tabela III, Ryc.3.

Tabela III. Warunki stosowane podczas amplifikacji fragmentów badanych genów metodą PCR

Gen	Polimorfizm		Sekwencja startera	T_m	$MgCl_2$	Produkt
VDR	*Bsm*I	for	5' GGC AAC CTG AAG GGA GAC GTA 3'	60	1,5 mM	511pz
		rev	5' CTC TTT GGA CCT CAT CAC CGA C 3'			
	*Fok*I	for	5' AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT 3'	61	1,5 mM	267pz
		rev	5' ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC 3'			
	*Apa*I/ *Taq*I	for	5' AGT AAG AGT CTG GCA AAG ATA GC 3'	58	2 mM	610pz
		rev	5' AAA CAC TTC GAG CAC AAG G 3'			
DBP	$(TAAA)_N$	for	5' CAG GAG GCA GAG GTT ACA GC 3'	61	1,5 mM	150-162pz
		rev	5' GCA TGA GGG AGA AAA GGA G 3'			
	*Sty*I/ *Hae*III	for	5' GAT CTC GAA GAG GCA TGT TTC 3'	60	2 mM	597pz
		rev	5' GTT GCC TGT GTT CAC AGA CTC 3'			
CYP27B1	*Tfi*I	for	5' CTC TCC TTT TTC ACA TTG ACC 3'	60	2 mM	404pz
		rev	5' GCA GCT CAT GAC TGT AAT CC 3'			
CYP24	*Bst*UI	for	5' TTA TTT CCT CTT CTC CTT GTG C 3'	60	2 mM	505pz
		rev	5' GTT TTA TGT GCT GAC GGT GG 3'			

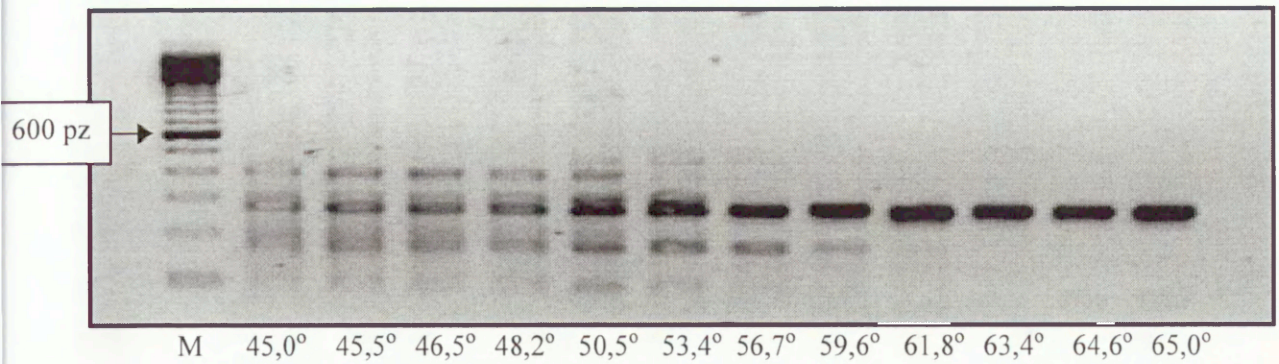
T_m – temperatura przyłączania starterów [°C] (ang. *melting temperature*).

for – starter dla nici 5'-3'DNA (ang. *forward*); *rev – starter dla nici 3'-5' DNA* (ang. *reverse*).

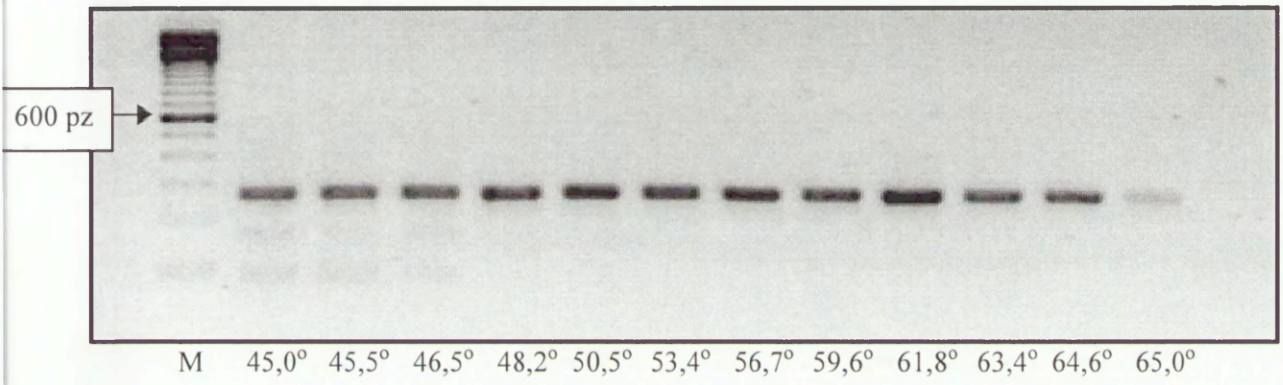
pz – liczba par zasad.

http://rcin.org.pl

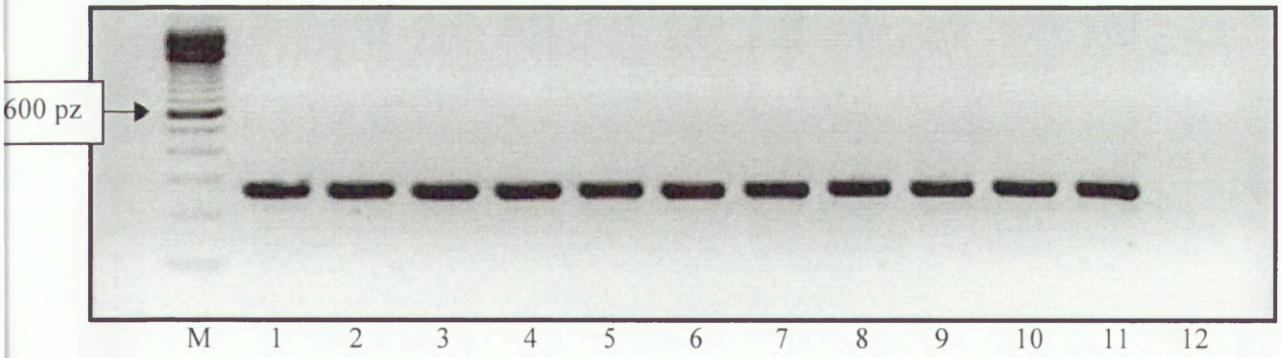
A.



B.



C.



Rycina 3. Dobór warunków PCR dla starterów służących do amplifikacji fragmentu eksonu 2 genu *VDR*. M – standard (marker) wielkości fragmentów DNA po 100 par zasad (pz).

A. Gradient PCR ze stężeniem $MgCl_2$ 2 mM.

B. Gradient PCR ze stężeniem $MgCl_2$ 1,5 mM.

Dla tej reakcji dobrano stężenie $MgCl_2$ 1,5 mM i temperaturę przyłączania starterów 61°C.

C. Ocena produktów amplifikacji na żelu agarozowym przed dalszą analizą, linia 12 zawiera mieszaninę reakcyjną bez genomowego DNA (kontrola negatywna).

http://rcin.org.pl

Skład mieszaniny dla pojedynczej reakcji przedstawiono w Tabeli IV. Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze MJ Research, PTC-200, według następującego schematu: wstępna denaturacja: 94°C – 4 minuty; właściwa amplifikacja – 35 do 40 cykli złożonych z 3 etapów: denaturacja 94°C – 0,5 minuty, przyłączanie starterów 56-61°C – 0,5 minuty, synteza DNA 72°C – 0,5 minuty; końcowa synteza – 72°C – 5 minut. W celu oceny poprawności wykonania doświadczenia (uniknięcia kontaminacji mieszaniny reakcyjnej) do każdej amplifikacji dołączano kontrolę negatywną, zawierającą mieszaninę reakcyjną bez genomowego DNA. Produkty PCR przed dalszą analizą oceniano na podstawie rozdziału elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym. Dokumentację żeli przeprowadzano za pomocą systemu Gel Doc (BioRad, Niemcy) [Ryc. 3].

Tabela IV. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w PCR

Objętość (µl)	Odczynnik
3,0	genomowe DNA (50 ng/µl)
2,5	bufor PCR 10x (Promega Corporation, USA)
2,0	dNTP 10 mM (Roche, Szwajcaria)
0,75 – 1	$MgCl_2$ 50 mM (Promega Corporation, USA)
0,5	starter "for" (10 pmol/µl)
0,5	starter "rev" (10 pmol/µl)
0,0625	polimeraza Taq 5U/µl (Promega Corporation, USA)
do 25	woda

dNTP – mieszanina fosforanów dezoksyrybonukleotydów;
for – starter dla nici 5'-3'DNA (ang. *forward*);
rev – starter dla nici 3'-5' DNA (ang. *reverse*).

III. 2. 5. Reakcja trawienia enzymami restrykcyjnymi i elektroforeza w żelu agarozowym

Zamplifikowane fragmenty DNA poddawano trawieniu endonukleazami restykcyjnymi rozpoznającymi specyficzne sekwencje zawierające polimorficzny nukleotyd. Wszystkie stosowane enzymy restrykcyjne, bufory oraz albuminę surowicy bydlęcej uzyskano z firmy New England Biolabs (USA). Skład pojedynczej mieszaniny reakcyjnej stanowiło 5 µl produktu reakcji PCR, 2 µl odpowiedniego buforu, 0,5 Ul enzymu oraz (w zależności od enzymu) 0,2 µl albuminy surowicy bydlęcej. Całość uzupełniano wodą destylowaną do objętości 20 µl i inkubowano przez 3 godziny w odpowiedniej temperaturze, zgodnie z instrukcją producenta. W Tabeli V zawarto zestawienie stosowanych enzymów restrykcyjnych.

http://rcin.org.pl

Tabela V. Enzymy stosowane do analizy restrykcyjnej produktów PCR

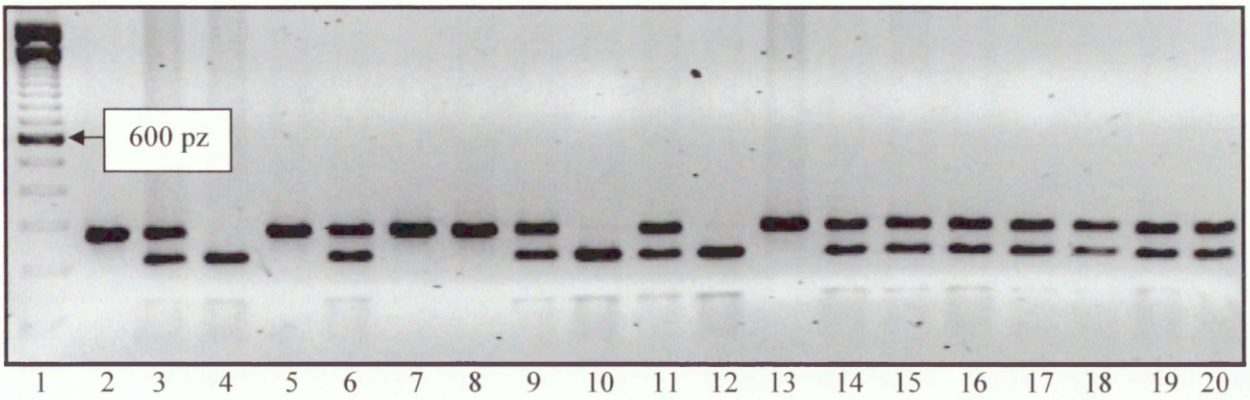
polimorfizm	*enzym*	*rozpoznawana sekwencja*	T_i	*allel dziki**	*allel polimorficzny*
VDR intron 8, G/A	*Bsm*I	5'...G A A T G C N*...3' 3'...C T T A C *G N...5'	65	253, 258 pz	511 pz
VDR ekson 2, C/T	*Fok*I	5'...G G A T G $(N)_9$*...3' 3'...C C T A C $(N)_{13}$*...5'	37	267 pz	207, 60 pz
VDR intron 8, T/G	*Apa*I	5'...G G G C C*C...3' 3'...C*C C G G G...5'	25	610 pz	324, 286pz
VDR ekson 9, T/C	*Taq*I	5'...T*C G A...3' 3'...A G C*T...5'	65	610 pz	400, 210 pz
DBP ekson 11, C/A	*Sty*I	5'...C*C W W G G...3' 3'...G G W W C*C...5'	37	597 pz	240, 357 pz
DBP ekson 11, T/G	*Hae*III	5'...G G*C C...3' 3'...C C*G G...5'	37	597 pz	233, 364 pz
CYP27B1 promotor C/A	*Tfi*I	5'...G*A W T C...3' 3'...C T W A*G...5'	65	404 pz	121, 283 pz
CYP24 region regulatorowy 5'G/C	*Bst*UI	5'...C G * C G...3' 3'...G C * G C ...5'	60	505 pz	277, 228 pz

T_i – temperatura inkubacji [°C]; *N – dowolny nukleotyd (A,C,G,T); W – A lub T; pz – pary zasad;*
**allel dziki* (ang. *wild type*) *– niezmieniony przez polimorfizm, allel występujący w populacjach naturalnych, zwykle z częstością przeważającą nad allelami polimorficznymi.*

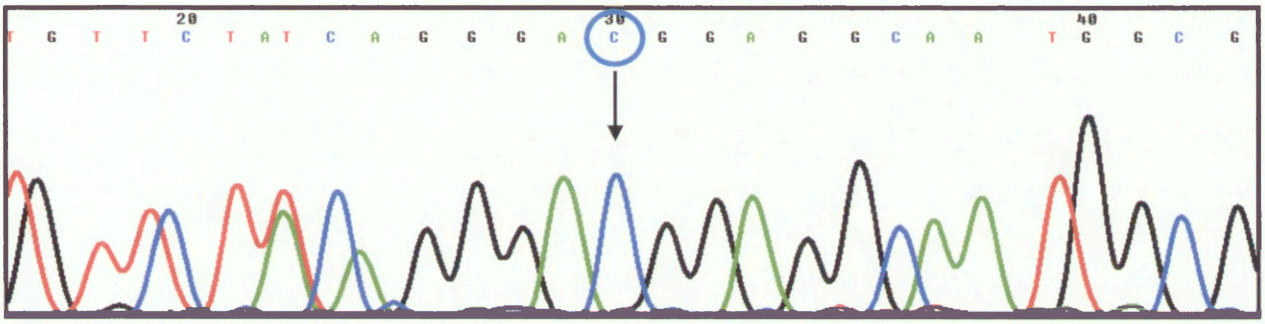
Inkubację przerywano umieszczając próbki na 10 minut w lodzie i następnie dodawano 4 µl buforu obciążającego (Sigma, USA). Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji trawienia przeprowadzano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (Sigma, USA). Elektroforezę przeprowadzano w buforze TBE (1x), przy napięciu 120V, przez 1 godzinę, w aparacie do elektroforezy Sub-Cell Model 96 cell (BioRad, Niemcy) w temperaturze pokojowej. Dokumentację żeli przeprowadzano za pomocą systemu Gel Doc (BioRad, Niemcy). Interpretacji wyników dokonywano poprzez porównanie długości otrzymanych fragmentów restrykcyjnych z markerem molekularnym DNA (100 par zasad, Invitrogen, USA) oraz z trzema próbkami kontrolnymi, których genotyp sprawdzono poprzez ich bezpośrednie sekwencjonowanie (homozygotą alleli dzikich, homozygotą alleli polimorficznych oraz heterozygotą posiadająca allel dziki i allel polimorficzny). [Ryc. 4].

http://rcin.org.pl

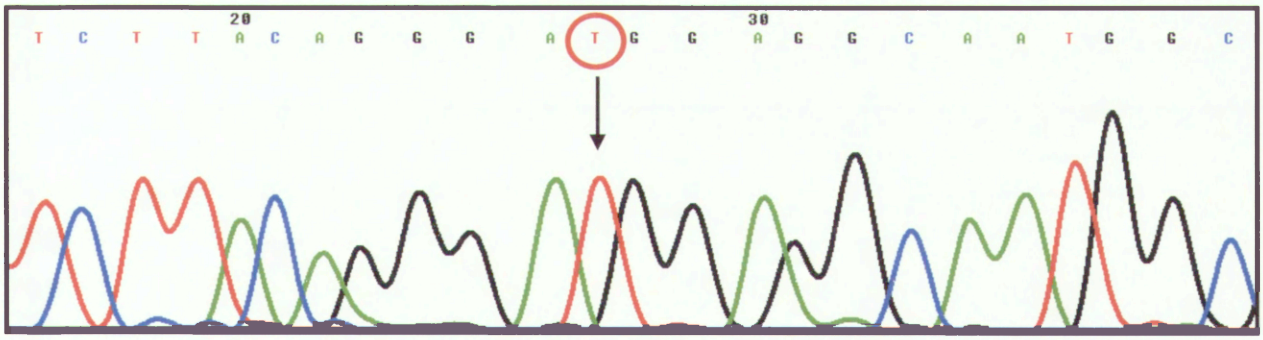
A.



B.



C.



Rycina 4. Przykładowa analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) dla polimorfizmu w eksonie 2 (C/T) genu *VDR* wykrywanego enzymem *Fok*I.

A. Rozdział na żelu agarozowym produktów reakcji trawienia enzymem restrykcyjnym: linia 1 – standard (marker) wielkości fragmentów DNA 100 par zasad, linia 2 – homozygota CC posiadająca dwa allele, których nie tnie enzym *Fok*I, linia 3 – heterozygota TC posiadająca dwa różne allele genu, linia 4 – homozygota TT posiadająca 2 allele cięte przez enzym *Fok*I, linie od 5 do 20 – badane próbki.

B. Chromatogram przedstawiający fragment genu *VDR* zawierający sekwencję CC

C. Chromatogram przedstawiający fragment genu *VDR* zawierający sekwencję TT

http://rcin.org.pl

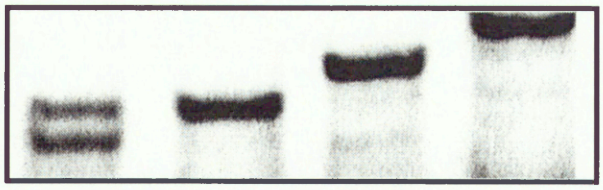
III. 2. 6. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

Analizę polimorfizmu zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ w intronie 8 genu *DBP* przeprowadzano rozdzielając różniące się wielkością produkty PCR (od 150 do 162 par zasad) w 10% żelu poliakrylamidowym. W celu przygotowania 30 ml żelu do 14 ml wody dodawano 10 ml 30% akrylamid:bis-akrylamidu w proporcji objętościowej 29:1, 6 ml buforu TS, a na koniec 210 µl 10% peroksodisiarczanu (VI) amonu (APS) i 12µl tetrametyloetylenodiaminy (TEMED). Na żel nakładano 10 µl produktu PCR oraz 2,5 µl buforu obciążającego (Sigma, USA) i 1,5 µl glicerolu (całkowita objętość próbki nakładanej do dołka wynosiła 14 µl). Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej, w buforze 1xTBE, przy użyciu aparatu Minipol (Kucharczyk T.E, Polska), przy napięciu 200 V przez 1 godzinę, a następnie przy napięciu 100 V przez 20 godzin.

Po zakończeniu elektroforezy, żel utrwalano przez 5 minut w 20% roztworze kwasu trichlorooctowego i dwukrotnie płukano w wodzie destylowanej. Następnie żel zanurzano w reduktorze tła (50 µl 10% siarczanu (IV) sodu w 100 ml wody), płukano wodą i wybarwiano przez 10 minut w 0,4% roztworze azotanu srebra. Żel wywoływano poprzez płukanie w 2,5% roztworze węglanu sodu z dodatkiem 1,5 µl 10% siarczanu (IV) sodu i 35 µl formaldehydu. Reakcję przerywano przez ponowne zanurzenie żelu na 1 minutę w reduktorze tła. Następnie żel utrwalano przez 2 minuty w 10% roztworze glicerolu, odwadniano przez 30 minut w 70% alkoholu metylowym i suszono w folii Dryout (Kucharczyk T.E., Polska).

Poszczególne allele określano na podstawie ilości powtórzeń (TAAA) jako 7 (150 pz), 8 (154 pz), 9 (158 pz), 10 (162 pz), porównując ze standardem wielkości DNA (DNA Molecular Weight Marker VIII, 19 – 1114 pz, Roche, Szwajcaria). Poprawność interpretacji wyników weryfikowano za pomocą sekwencjonowania wybranych losowo próbek [Ryc. 5].

A.



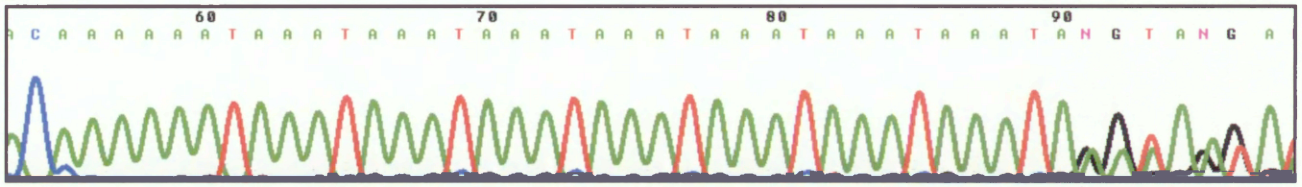
1 2 3 4

Rycina 5 A. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym zamplifikowanych fragmentów intronu 8 genu *DBP* zawierającego polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$: lina 1 – heterozygota 8/7, homozygota 8/8, linia 2 – homozygota 8/8, linia 3 – homozygota 9/9, linia 4 – homozygota 10/10.

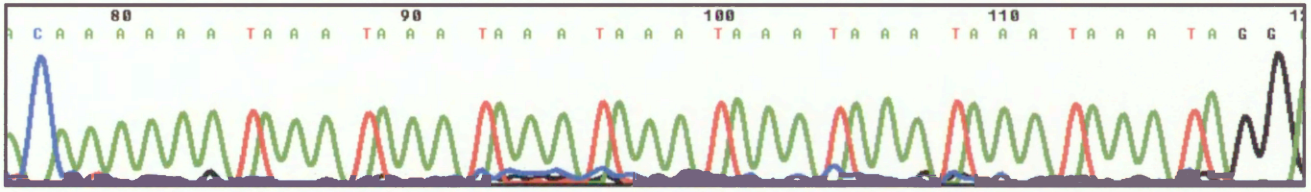
http://rcin.org.pl

B.

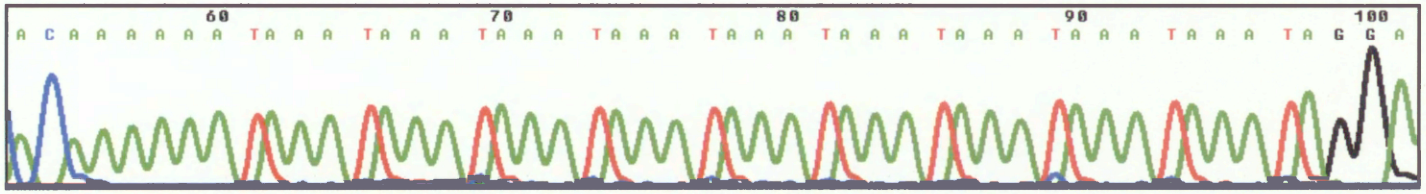
8/7



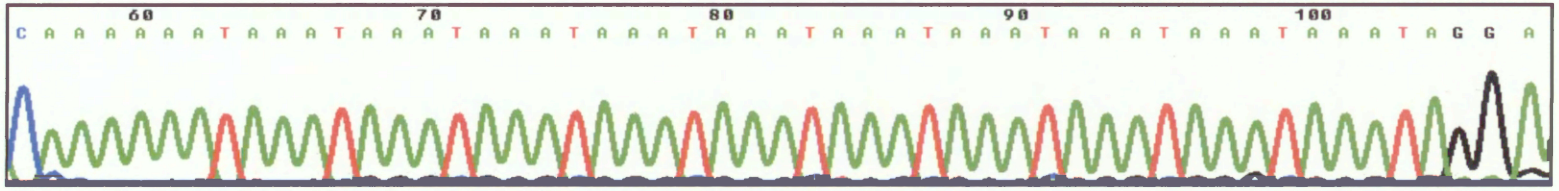
8/8



9/9



10/10



Rycina 5B. Chromatogramy przedstawiające sekwencje wybranych genotypów fragmentów intronu 8 genu *DBP* zawierającego polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$

http://rcin.org.pl

III.2. 7. Sekwencjonowanie produktów PCR

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzono z zastosowaniem nukleotydów terminatorowych barwionych fluorescencyjnie (metoda dideoxy Sangera).

Produkty PCR oczyszczano za pomocą filtrów z błony celulozowej (o nominalnym limicie masy cząsteczkowej 30 kilodaltonów – Millipore, USA). Oczyszczanie miało na celu eliminację z mieszaniny post-PCR niezwiązanych nukleotydów, starterów oraz jonów i białek, aby związki te nie zaburzały reakcji sekwencjonowania. Stężenie oczyszczonego produktu określano spektrofotmoetrycznie, w dwóch niezależnych pomiarach, przy długości fali 260 nm, a wynik uśredniano.

Skład mieszaniny dla pojedynczej reakcji sekwencyjnej przedstawiono w Tabeli VI. Reakcję sekwencyjną przeprowadzano w termocyklerze MJ Research, PTC-200 wg. nastepującego schematu: denaturacja 94°C – 10 sekund, przyłączanie starterów 56-61°C – 3 minuty (35 cykli).

Tabela VI. Skład mieszaniny stosowanej w reakcji sekwenacyjnej

Objętość (µl)	Odczynnik
1,0	oczyszczony produkt PCR (20 ng/µl)
1,0	bufor sekwenacyjny 10x (Applied BioSystems, USA)
2,0	BigDyeMix* (Applied BioSystems, USA)
0,2	starter (10 pmol/µl)
do 10	woda

**BigDyeMix – mieszanina zawierająca bufor, dezoksynukleotydy i nukleotydy terminatorowe znakowane fluorescencyjnie, oraz polimerazę Taq – FS*

Produkty reakcji sekwencyjnej oczyszczano na kolumnach z podłożem Sephadex (CENTRI-SEP Princeton Separations, USA) w celu usunięcia niezwiązanych nukleotydów oraz jonów, liofilizowano, zawieszano w 19 µl odczynnika TSR (ang. *template suppression reagent*, Applied BioSystems, USA), a następnie denaturowano przez 2 minuty w 95°C i szybko schładzano. Rozdziału produktów reakcji sekwencjonowania dokonywano za pomocą elektroforezy kapilarowej w żelu denaturującym, przy użyciu automatycznego analizatora genetycznego ABIPRISM 310 (Applied BioSystems, USA) w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy DNA IBB PAN „Oligo". Uzyskane wyniki przekształcono na chromatogramy za pomocą programu Sequencing Analysis 3.0 (Applied BioSystems, USA).

http://rcin.org.pl

III. 3. Analiza bioinformatyczna

Do analizy bioinformatycznej wykorzystano ogólnie dostępne oprogramowanie i bazy danych.

III. 3. 1. Bazy danych sekwencji

Przy projektowaniu starterów do PCR posłużono się sekwencjami genów dostępnymi w bazie:

- National Center for Bioinformatics (NCBI): http://ncbi.nlm.nih.gov/

W celu porównania fragmentów sekwencji genów korzystano również z oprogramowania:

- Blast: http://www. ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

III. 3. 2. Projektowanie starterów

Do projektowania starterów użyto programu:

- Primer3: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi/

III. 3. 3. Dobór enzymów restrykcyjnych

Przy dobieraniu enzymów i kontroli długości fragmentów restrykcyjnych korzystano z programów:

- NEBcutter 2.0: http://tools.neb.com/NEBcutter2/
- Restriction Enzyme Site Mapper: http://www.restrictionmapper.org/

III. 3. 4. Analiza niezrównoważenia sprzężeń pomiędzy allelami badanych *loci*

Kombinacje różnych alleli w obrębie jednego *locus* mogą nie być przypadkowe, ponieważ niektóre allele mogą być ze sobą sprzężone (występuje między nimi niezrównoważenie sprzężeń – ang. *linkage disequilibrium* – LD). Do analizy niezrównoważenia sprzężeń pomiędzy badanymi polimorfizmami wykorzystano program:

- Haploview 3.2: http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/

Miarą niezrównoważenia sprzężeń pomiędzy allelami badanych *loci* jest zaproponowany przez Lewontina parametr D' [84]. Wartość parametru D' równa 0 wskazuje na całkowity brak sprzężenia między dwoma allelami (markerami); wartość 1,0 – na całkowite, a wartości 0,7-1,0 – na silne niezrównoważenie sprzężeń. Wykazanie, że markery w obrębie jednego *locus* są sprzężone pozwala przypuszczać, że nie są one dziedziczone w sposób niezależny, ale w postaci haplotypów.

http://rcin.org.pl

III. 3. 5. Analiza haplotypów

Bezpośrednie oszacowanie haplotypów (grup alleli w danym *locus* o ścisłym sprzężeniu) jest możliwe tylko poprzez analizę genetyczną rodzin, natomiast dla osób niespokrewnionych poprzez pracochłonną i kosztowną analizę opartą na technikach molekularnych, która nie jest wykorzystywana do badaniach epidemiologicznych [142]. Pośrednio, u osób niespokrewnionych, haplotypy można odtworzyć na podstawie wyników genotypowania poszczególnych polimorfizmów, za pomocą programów komputerowych. W tej pracy do analizy haplotypów wykorzystano program Haplowiev 3.2 [13]. Program ten umożliwia również porównanie częstości haplotypów pomiędzy grupami za pomocą testu nieparametrycznego (ang. *case-control permutation test*).

III. 4. Analiza statystyczna wyników

Częstość występowania alleli i genotypów wśród pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa i u zdrowych ochotników porównano za pomocą testu chi-kwadrat (χ^2) używając odpowiednio tablic 2x2, 3x2, 4x2, 8x2. Wartości prawdopodobieństwa (P) mniejsze niż 0,05 uznawano za znamienne statystycznie. Obliczając prawdopodobieństwo (P), nie stosowano konserwatywnej poprawki Bonferoniego [122].

W celu oceny potencjalnego związku przyczynowo – skutkowego pomiędzy posiadaniem badanych alleli, genotypów i haplotypów, a wystąpieniem choroby obliczano iloraz szans (ang. *odds ratio* – OR). Wartość OR > 1 sugeruje, że dany allel/genotyp/haplotyp zwiększa ryzyko wystąpienia choroby, podczas gdy OR < 1 sugeruje jego wpływ ochronny. Do obliczania OR zastosowano metodę Woolf'a [166].

Zbadano również, czy zaobserwowane rozkłady genotypów pozostają w zgodności z prawem równowagi Hardy-Weinberga (ang. *Hardy-Weinberg equilibrium* – HWE). Zaburzenia w równowadze Hardy-Weinberga mogą wskazywać na nieprawidłową selekcję grup badanych albo błąd w analizie polimorfizmu [65]. W tej pracy rozkład genotypów badanych polimorfizmów w genach *VDR, DBP, CYP27B1* oraz *CYP24* pozostawał w zgodzie z równowagą Hardy-Weinberga, zarówno w grupie chorych z GD jak i w grupie zdrowych ochotników (P > 0,05).

Przeprowadzając metaanalizę wyników badań dotyczących związku polimorfizmów genu *VDR* z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w różnych populacjach zastosowano test Mantel-Haenszel [89]. Homogenność populacji badano za pomocą testu heterogenności Q Cochrana.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL) oraz Statistica (Statsoft, Inc., Tulsa, OK).

http://rcin.org.pl

IV. WYNIKI

IV. 1. Związek wybranych polimorfizmów genów układu witaminy D z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa (GD) w populacji polskiej

IV. 1. 1. Polimorfizmy genu receptora jądrowego witaminy D (*VDR*)

a. Polimorfimy zamiany pojedynczych nukleotydów w genie VDR

Częstość genotypów i alleli badanych polimorfizmów genu *VDR* przedstawiono w Tabeli VII. Dla polimorfizmu w intronie 8 wykrywanego enzymem restrykcyjnym *Bsm*I (G/A) stwierdzono, że częstość występowania allelu G była znamiennie większa w grupie chorych z GD w porównaniu z grupą osób zdrowych (66,9% *vs.* 57,3%; P = 0,003). Iloraz szans (ang. *odds ratio* – OR) obliczony dla allelu G wynosił 1,51; 95% przedział ufności (ang. *confidence interval* – CI) 1,14-1,99. Zaobserwowano również znamienną statystycznie różnicę w rozkładzie genotypów (P = 0,02), przy czym jedynie genotyp GG występował częściej u chorych z GD (45,5% *vs.* 33,9%; P = 0,02 w teście χ^2 z użyciem tablic 2x2; OR = 1,62; 95%CI: 1,09-2,41), co może sugerować recesywny model dziedziczenia.

Dla pozostałych badanych polimorfizmów genu *VDR* (wykrywanych enzymami restrykcyjnymi *Fok*I, *Apa*I i *Taq*I) nie stwierdzono znamiennych różnic (P > 0,05) w częstości występowania genotypów i alleli, pomiędzy badanymi grupami.

Kombinacje różnych alleli tego samego genu mogą nie być przypadkowe, ponieważ niektóre allele mogą być ze sobą sprzężone (występuje między nimi niezrównoważenie sprzężeń – ang. *linkage disequilibrium* – LD). Sprzężenie pojedynczych polimorfizmów może mieć znaczenie funkcjonalne i wówczas wskazane jest wykonanie analizy haplotypów.

Przeprowadzona analiza wykazała, że polimorfizmy zlokalizowane przy końcu 3' genu *VDR*: *Bsm*I, *Apa*I (w intronie 8) i *Taq*I (w eksonie 9) występują w niezrównoważeniu sprzężeń [Tabela VIII]. Nie stwierdzono natomiast sprzężenia pomiędzy polimorfizmem *Fok*I (w eksonie 2), a żadnym z pozostałych polimorfizmów genu *VDR*, co jest zgodne z danymi literaturowymi [110]. Stwierdzenie niezrównoważenia sprzężeń pomiędzy polimorfizmami genu *VDR* pozwoliło na przeprowadzenie analizy haplotypów [Tabela IX].

http://rcin.org.pl

Tabela VII. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów genu *VDR* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) i u zdrowych ochotników

Polimorfizm		Chorzy z GD		Zdrowi ochotnicy		*P*
*Bsm*I	Genotypy	*N* = 299		*N* = 165		
(G/A)	AA	35	(11,7%)	32	(19,4%)	0,02
	AG	128	(42,8%)	77	(46,7%)	
	GG	136	(45,5%)	56	(33,9%)	
	Allele	*N* = 598		*N* = 330		
	A	198	(33,1%)	141	(42,7%)	0,003
	G	400	(66,9%)	189	(57,3%)	
*Fok*I	Genotypy	*N* = 299		*N* = 165		
(C/T)	TT	60	(20,1%)	36	(21,8%)	0,12
	TC	149	(49,8%)	94	(57,0%)	
	CC	90	(30,1%)	35	(21,2%)	
	Allele	*N* = 598		*N* = 330		
	T	329	(55,0%)	164	(49,7%)	0,12
	C	269	(45,0%)	166	(50,3%)	
*Apa*I	Genotypy	*N* = 299		*N* = 165		
(T/G)	GG	88	(29,4%)	40	(24,3%)	0,17
	GT	135	(45,2%)	70	(42,4%)	
	TT	76	(25,4%)	55	(33,3%)	
	Allele	*N* = 598		*N* = 330		
	G	311	(52,0%)	150	(45,5%)	0,06
	T	287	(48,0%)	180	(54,5%)	
*Taq*I	Genotypy	*N* = 299		*N* = 165		
(T/C)	CC	30	(10,0%)	26	(15,8%)	0,17
	TC	136	(45,5%)	74	(44,8%)	
	TT	133	(44,5%)	65	(39,4%)	
	Allele	*N* = 598		*N* = 330		
	C	196	(32,8%)	126	(38,2%)	0,10
	T	402	(67,2%)	204	(61,8%)	

N – liczba osób lub alleli; GD – choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' disease*).

Porównując rozkład genotypów w grupie chorych z GD i w grupie zdrowych ochotników, wartości P obliczano za pomocą testu χ^2 używając tablic 3x2, a porównując częstość alleli – tablic 2x2.

http://rcin.org.pl

Tabela VIII. Analiza sprzężeń pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *VDR*

Polimorfizm 1	Polimorfizm 2	D'
*Taq*I	*Apa*I	0,81
*Taq*I	*Bsm*I	0,89
*Apa*I	*Bsm*I	0,79
*Taq*I	*Fok*I	0,08
*Apa*I	*Fok*I	0,03
*Bsm*I	*Fok*I	0,03

Do analizy niezrównoważenia sprzężeń pomiędzy badanymi polimorfizmami wykorzystano program Haploview 3.2. Miarą niezrównoważenia sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium – LD*) *pomiędzy allelami badanych loci jest opisany przez Lewontina parametr D'. Wartość parametru D' równa 0 wskazuje na całkowity brak sprzężenia między dwoma allelami* (*markerami*)*; wartości 0,7-1,0 – na silne niezrównoważenie sprzężeń; a wartość 1,0 – że dwa allele zawsze są dziedziczone wspólnie.*

Tabela IX. Częstość występowania haplotypów genu *VDR* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) i u zdrowych ochotników

Haplotypy VDR ***Bsm*I • *Apa*I • *Taq*I**	Chorzy z GD	Zdrowi ochotnicy	OR
G•G•T	49,1%	35,0%	1,76
A•T•C	30,8%	29,5%	1,06
G•T•T	15,7%	17,1%	0,91
A•T•T	1,1%	7,5%	0,12
A•G•T	1,1%	4,3%	0,22
G•G•C	0,6%	4,2%	0,15
A•G•C	1,1%	1,6%	0,81

GD – choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' disease*); *OR – iloraz szans* (ang. *odds ratio*).

Na podstawie wyników genotypowania poszczególnych polimorfizmów obliczono prawdopodobieństwo wystąpienia określonego haplotypu (*korzystając z programu Haplowiew 3.2*)*. Przedstawiono haplotypy, które przynajmniej w jednej grupie występowały częstością >1%. Wartość OR > 1 sugeruje, że dany haplotyp zwiększa ryzyko wystąpienia choroby, podczas gdy OR < 1 sugeruje jego wpływ ochronny. Porównując rozkład haplotypów w obu grupach posłużono się testem nieparametrycznym* (ang. *case-control permutation test*) *– P = 0,0003.*

http://rcin.org.pl

Na podstawie wyników genotypowania poszczególnych markerów genetycznych (polimorfizmów) odtworzone zostały prawdopodobne haplotypy końca 3'genu *VDR*. Rozkład haplotypów różnił się znamiennie u chorych z GD w porównaniu z grupą zdrowych ochotników (wynik testu nieparametrycznego ang. *case-control permutation test* P = 0,0003). Allel *Bsm*I G występował głównie w dwóch haplotypach: G•G•T oraz G•T•T. Jednak tylko haplotyp G•G•T występował częściej w grupie chorych z GD (49,1% *vs.* 35,0%; OR = 1,76; 95%CI: 1,19-2,63). Natomiast haplotyp A•G•T występował częściej u osób zdrowych (7,5% *vs.* 1,1%; OR = 0,12; 95%CI: 0,04-0,43), co może sugerować jego wpływ ochronny.

b. Metaanaliza badań nad związkiem polimorfizmów genu VDR z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w różnych populacjach

Dotychczas zostało opublikowanych pięć badań asocjacyjnych dotyczących związku polimorfizmów genu *VDR* z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w różnych populacjach: w populacji niemieckiej, angielskiej i serbskiej (gdzie badano polimorfizmy *Fok*I, *Bsm*I, *Apa*I i *Taq*I), populacji chorwackiej (*Bsm*I, *Apa*I i *Taq*I) oraz japońskiej (*Fok*I, *Bsm*I, *Taq*I) [9,11,34,127,141]. Wyniki tych badań były niejednoznaczne, co można tłumaczyć zarówno heterogennością genetyczną GD, jak i niewystarczającą mocą niektórych badań (co powoduje, że uzyskane wyniki mogły być zarówno fałszywie negatywne jak i fałszywie pozytywne) [38]. W takiej sytuacji, jednym z proponowanych rozwiązań, jest przeprowadzenie metaanalizy łączącej w sobie wyniki kilku badań i na tej podstawie wnioskowanie o roli badanego czynnika w kształtowaniu predyspozycji genetycznej do rozwoju choroby [85].

Przeprowadzając metaanalizę, dla każdego z badanych polimorfizmów genu *VDR* i dla wszystkich populacji, przeprowadzono test heterogenności Q Cochrana. W przypadku polimorfizmu *Bsm*I zdecydowano o wyłączeniu z metaanalizy populacji japońskiej, ponieważ nie spełniała kryterium homogenności (P < 0,05 w teście Q Cochrana) i dalszą analizę prowadzono wyłącznie w odniesieniu do populacji rasy kaukaskiej [Tabela XVII w rozdziale Dyskusja]. Na podstawie metaanalizy stwierdzono, że szacunkowy iloraz szans (OR) dla genotypu *Bsm*I GG wynosi 1,28 (95%CI: 1,09-1,51; P = 0,003 w teście Mantel-Haenszel), co wskazuje na jego potencjalny związek z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w populacjach rasy kaukaskiej. W przypadku pozostałych badanych polimorfizmów (*Fok*I, *Apa*I i *Taq*I) przeprowadzone metaanalizy nie wykazały związku z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa (P > 0,05 w teście Mantel-Haenszel).

http://rcin.org.pl

IV. 1. 2. Polimorfizmy genu białka wiążącego witaminę D (*DBP*)

a. Polimorfizmy zamiany pojedynczych nukleotydów w eksonie 11 genu DBP

Rozkład genotypów i alleli badanych polimorfizmów w eksonie 11 genu *DBP* przedstawiono w Tabeli X. Spośród dwóch badanych wariantów, dla polimorfizmu wykrywanego enzymem restrykcyjnym *Sty*I (C/A) stwierdzono, że allel A występował znamiennie częściej wśród chorych z GD (34,2% *vs.* 25,7%; P = 0,005; OR = 1,45; 95%CI: 1,13-1,99). Zaobserwowano również znamienną statystycznie różnicę w częstości genotypów (P = 0,01), przy czym genotypy AA i CA stwierdzano częściej w grupie chorych (59,0% *vs.* 45,4%; P = 0,003 w teście χ^2 z użyciem tablic 2x2; OR = 1,73; 95%CI: 1,21-2,49), co może sugerować dominujący charakter dziedziczenia.

W przypadku polimorfizmu wykrywanego enzymem restrykcyjnym *Hae*III (G/T), nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genotypów oraz alleli pomiędzy badanymi grupami (P > 0,05).

Tabela X. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów w eksonie 11 genu *DBP* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) i u zdrowych ochotników

Polimorfizm		Chorzy z GD		Zdrowi ochotnicy		*P*
***Sty*I**	**Genotypy**	*N* = 332		*N* = 185		
(C/A)	AA	31	(9,3%)	11	(5,9%)	0,01
	CA	165	(49,7%)	73	(39,5%)	
	CC	136	(41,0%)	101	(54,6%)	
	Allele	*N* = 664		*N* = 370		
	A	227	(34,2%)	95	(25,7%)	0,005
	C	437	(65,8%)	275	(74,3%)	
***Hae*III**	**Genotypy**	*N* = 332		*N* = 185		
(G/T)	TT	69	(20,8%)	37	(20,0%)	0,81
	TG	168	(50,6%)	90	(48,6%)	
	GG	95	(28,6%)	58	(31,4%)	
	Allele	*N* = 664		*N* = 370		
	T	306	(46,1%)	164	(44,3%)	0,59
	G	358	(53,9%)	206	(55,7%)	

N – liczba osób lub alleli; GD – choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' disease*).
Porównując rozkład genotypów w grupie chorych z GD i w grupie zdrowych ochotników, wartości P obliczano za pomocą testu χ^2 używając tablic 3x2, a porównując częstość alleli – tablic 2x2.

http://rcin.org.pl

Polimorfizmy eksonu 11 genu *DBP* pozostawały względem siebie w niezrównoważeniu sprzężeń (D' = 0,94), co pozwoliło na przeprowadzenie analizy haplotypów [Tabela XI].

Tabela XI. Częstość występowania haplotypów eksonu 11 genu *DBP* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) i u zdrowych ochotników

Haplotypy *Sty*I • *Hae*III	Chorzy z GD	Zdrowi ochotnicy	OR
C•G	52,5%	54,7%	0,92
A•T	32,9%	24,7%	1,50
C•T	13,2%	19,6%	0,63
A•G	1,4%	1,0%	1,18

GD – choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' disease*); *OR – iloraz szans* (ang. *odds ratio*).
Na podstawie wyników genotypowania poszczególnych polimorfizmów obliczono prawdopodobieństwo wystąpienia określonego haplotypu (korzystając z programu Haplowiew 3.2). Wartość OR > 1 sugeruje, że dany haplotyp zwiększa ryzyko wystąpienia choroby, podczas gdy OR < 1 sugeruje jego wpływ ochronny. Porównując rozkład haplotypów w obu grupach posłużono się testem nieparametrycznym (ang. *case-control permutation test*) *– P = 0.01.*

Rozkład haplotypów różnił się znamiennie w obu badanych grupach (wynik testu nieparametrycznego ang. *case-control permutation test* P = 0.01). Allel *Sty*I A występował głównie w haplotypie A•T, a haplotyp ten stwierdzano częściej u chorych z GD, niż u zdrowych ochotników (32,9% *vs.* 24,7%; OR = 1,50; 95%CI: 1,00-2,24). Istnieją doniesienia, że haplotyp A•T może mieć związek ze zmniejszonym powinowactwem białka wiążącego względem pochodnych witaminy D [3].

http://rcin.org.pl

b. Polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ w intonie 8 genu DBP

Wśród 496 badanych osób (332 chorych z GD i 164 osób z grupy kontrolnej) stwierdzono 4 warianty, różniące się liczbą powtórzeń tandemowych $(TAAA)_N$ w intronie 8: allel 7 (150 par zasad – pz), 8 (154 pz), 9 (158 pz) i 10 (162 pz). Kombinacje tych alleli tworzyły 3 genotypy homozygotyczne (8/8, 9/9, 10/10) oraz 5 genotypów heterozygotycznych (10/9, 10/8, 9/8, 9/7 i 8/7) [Tabela XII]. Genotypów 7/7 i 10/7 w badanej grupie nie stwierdzono. Częstość występowania obserwowanych genotypów i alleli nie różniła się znamiennie między chorymi z GD a zdrowymi ochotnikami (P > 0,05).

Tabela XII. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ w intronie 8 genu *DBP* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) i u zdrowych ochotników

	Chorzy z GD		Zdrowi ochotnicy		P
Allele	*N* = 664		*N* = 328		
8	480	(72,3)	248	(75,6%)	0,62
9	104	(15,7%)	44	(13,4%)	
10	67	(10,0%)	32	(9,8%)	
7	13	(2,0%)	4	(1,2%)	
Genotypy	*N* = 332		*N* = 164		
8/8	171	(51,5%)	94	(57,3%)	0,91
9/8	77	(23,2%)	32	(19,5%)	
10/8	50	(15,1%)	24	(14,6%)	
8/7	11	(3,3%)	4	(2,4%)	
10/9	9	(2,7%)	4	(2,4%)	
9/9	8	(2,4%)	4	(2,4%)	
10/10	4	(1,2%)	2	(1,2%)	
9/7	2	(1,0%)	0	0	

N – liczba osób lub allel; GD – choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' disease*).

Porównując rozkład genotypów w grupie chorych z GD i w grupie zdrowych ochotników, wartości P obliczano za pomocą testu χ^2 używając tablic używając tablic 8x2, a porównując częstość alleli – tablic 4x2.

http://rcin.org.pl

1. 3. Polimorfizm genu 1α-hydroksylazy witaminy D *(CYP27B1)*

Rozkład genotypów i alleli polimorfizmu C/A promotora genu 1α-hydroksylazy witaminy D wykrywanego enzymem *Tfi*I, przedstawiono w Tabeli XIII. Stwierdzono, że wśród chorych z GD allel C występuje znamiennie częściej w porównaniu z grupą osób zdrowych (67,4% *vs.* 60,1%; P = 0,02; OR = 1,37; 95%CI: 1,04-1,87). Zaobserwowano również znamienną statystycznie różnicę w częstości genotypów (P = 0,01), przy czym jedynie genotyp CC występował częściej u chorych z GD (47,0% *vs.* 33,8%; P = 0,006 w teście χ^2 z użyciem tablic 2x2; OR = 1,74; 95%CI: 1,17-2,59).

Tabela XIII. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu promotora genu *CYP27B1* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) i u zdrowych ochotników

Polimorfizm		Chorzy z GD		Zdrowi ochotnicy		*P*
*Tfi*I	**Genotypy**	*N* = 336		*N* = 154		
(C/A)	AA	41	(12,2%)	21	(13,6%)	0,01
	CA	137	(40,8%)	81	(52,6%)	
	CC	158	(47,0%)	52	(33,8%)	
	Allele	*N* = 672		*N* = 308		
	A	32,6	(32,6%)	123	(39,9%)	0,02
	C	67,4	(67,4%)	185	(60,1%)	

N – liczba osób lub allel; GD – choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' disease*).
Porównując rozkład genotypów w grupie chorych z GD i w grupie zdrowych ochotników, wartości P obliczano za pomocą testu χ^2 używając tablic 3x2, a porównując częstość alleli – tablic 2x2.

IV. 1. 4. Polimorfizm genu 24-hydroksylazy witaminy D *(CYP24)*

W Tabeli XIV przedstawiono rozkład genotypów i alleli dla badanego polimorfizmu G/C w promotorze genu 24-hydroksylazy witaminy D. Stwierdzono, że częstość występowania allelu C jest wyższa wśród chorych z GD (26,1%), w porównaniu z grupą osób zdrowych (20,5%), natomiast różnica ta nie jest znamienna statystycznie (P = 0,05; OR = 1,37; 95%CI: 1,00-1,88). Nie zaobserwowano również znamiennych statystycznie różnic w częstości występowania genotypów (P > 0,05) w obu badanych grupach.

http://rcin.org.pl

Tabela XIV. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu w regionie 5' regulatorowym genu *CYP24* u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) i u zdrowych ochotników.

Polimorfizm		Chorzy z GD		Zdrowi ochotnicy		*P*
*Bsi*UI	**Genotypy**	*N* = 331		*N* = 168		
(G/C)	C/C	23	(6,9%)	7	7 (4,2%)	0,15
	G/C	127	(38,4%)	55	(32,7%)	
	G/G	181	(54,7%)	106	(63,1%)	
	Allele	*N* = 662		*N* = 336		
	C	173	(26,1%)	69	(20,5%)	0,05
	G	489	(73,9%)	267	(79,5%)	

N – liczba osób lub alleli; GD – choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' disease*).
Porównując rozkład genotypów w grupie chorych z GD i w grupie zdrowych ochotników, wartości P obliczano za pomocą testu χ^2 używając tablic 3x2, a porównując częstość alleli – tablic 2x2.

IV. 2. Analiza interakcji gen-gen między wybranymi polimorfizmami genów układu witaminy D

Do analizy interakcji gen-gen wybrano te, spośród badanych czynników, w przypadku których stwierdzono statystycznie znamienne asocjacje z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa, tzn. genotyp GG polimorfizmu *Bsm*I genu *VDR* (OR = 1,62), genotypy AA i AC polimorfizmu *Sty*I genu *DBP* (OR = 1,73), oraz genotyp CC polimorfizmu promotora genu *CYP27B1* (OR = 1,74). Analizę przeprowadzono porównując częstość jednoczesnego występowania wybranych genotypów w grupie chorych z GD z grupą zdrowych ochotników [Tabela XV] i na tej podstawie obliczając połączony iloraz szans (metodę tę stosowano uprzednio do analizy interakcji alleli HLA *DRB1*03* oraz *CTLA-4* 49G) [10].

Iloraz szans (OR) dla łącznego występowania 2 z badanych czynników wynosił od 2,42 do 2,59, zaś dla 3 badanych czynników wynosił 3,15 – co może sugerować ich częściowe działanie addytywne.

http://rcin.org.pl

Tabela XV. Analiza interakcji gen-gen między wybranymi genotypami genów układu witaminy D

Genotypy	Chorzy z GD *N* = 299	Zdrowi ochotnicy *N* = 154	OR
*VDR Bsm*I **GG** / *DBP Sty*I **AA+CA**	29,1%	13,4%	2,59
*VDR Bsm*I **GG** / *CYP27B1* **CC**	23,6%	10,8%	2,51
*DBP Sty*I **AA+CA** / *CYP27B1* **CC**	28,8%	14,5%	2,42
*VDR Bsm*I **GG** /*DBP Sty*I **AA+CA** / *CYP27B1* **CC**	14,8%	5,4%	3,15

N – liczba osób lub alleli; GD – choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' disease*); *OR – iloraz szans* (ang. *odds ratio*); *VDR Bsm*I *– polimorfizm G/A w intronie 8 genu VDR; DBP Sty*I *– polimorfizm C/A w eksonie 11 genu DBP; CYP27B1- polimorfizm C/A w promotorze genu CYP27B1*

IV. 3. Związek wybranych polimorfizmów genów układu witaminy D z fenotypem choroby Gravesa-Basedowa (GD)

Chorych z chorobą Gravesa-Basedowa podzielono na grupy w zależności od płci, stopnia nasilenia zmian ocznych, dodatniego wywiadu rodzinnego dotyczącego autoimmunologicznych chorób tarczycy, a także wieku, w którym rozpoznano GD. Następnie grupy te porównano pod częstości występowania genotypów badanych polimorfizmów genów *VDR*, *DBP*, *CYP27B1* i *CYP24*.

W Tabeli XVI przedstawiono wyniki przykładowej analizy trzech czynników, dla których stwierdzono najsilniejszy związek z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w badanej populacji (genotyp *Bsm*I GG genu *VDR*, genotypy *Sty*I AA i AC genu *DBP*, oraz genotyp CC promotora genu *CYP27B1*). W przypadku żadnego z badanych polimorfizmów genów układu witaminy D nie stwierdzono związku z fenotypem choroby Gravesa Basedowa ($P > 0,05$).

http://rcin.org.pl

Tabela XVI. Częstość występowania genotypów polimorfizmów: *Bsm*I w intronie 8 genu *VDR*, *Sty*I w eksonie 11 genu *DBP* oraz *Tfi*I w promotorze genu *CYP27B1* w grupach chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD), podzielonych według parametrów klinicznych

Parametr	Grupa badana	*N*	Genotypy *VDR BsmI*		*P*	Genotypy *DBP StyI*		*P*	Genotypy *CYP27B1 TfiI*		*P*
			GG	AA+AG		AA+CA	CC		CC	AA+CA	
Płeć	kobiety	236	45,3%	54,7%	0,92	61,9%	38,1%	0,11	50,0%	50,0%	0,43
	mężczyźni	63	46,0%	54,0%		50,8%	49,2%		44,1%	55,9%	
Oftalmopatia	obecna	106	46,2%	53,8%	0,85	54,7%	45,3%	0,21	47,2%	52,8%	0,80
	brak	193	45,1%	54,9%		62,2%	37,8%		49,5%	50,5%	
Wywiad rodzinny	pozytywny	91	42,9%	57,1%	0,96	65,9%	34,1%	0,12	50,5%	49,5%	0,43
	negatywny	176	43,2%	56,8%		55,7%	44,3%		45,6%	54,4%	
Wiek rozpoznania choroby	< 40 rż	138	44,9%	55,1%	0,83	60,2%	39,8%	0,82	44,9%	55,1%	0,38
	≥ 40 rż	158	46,2%	53,8%		58,8%	41,2%		50,0%	50,0%	

N – liczba osób lub alleli; GD – choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' disease*).

*VDR Bsm*I *– polimorfizm G/A w intronie 8 genu VDR; DBP Sty*I *– polimorfizm C/A w eksonie 11 genu DBP; CYP27B1- polimorfizm C/A w promotorze genu CYP27B1*

Porównując rozkład genotypów w poszczególnych grupach, wartości P obliczano za pomocą testu χ^2 *używając tablic 2x2.*

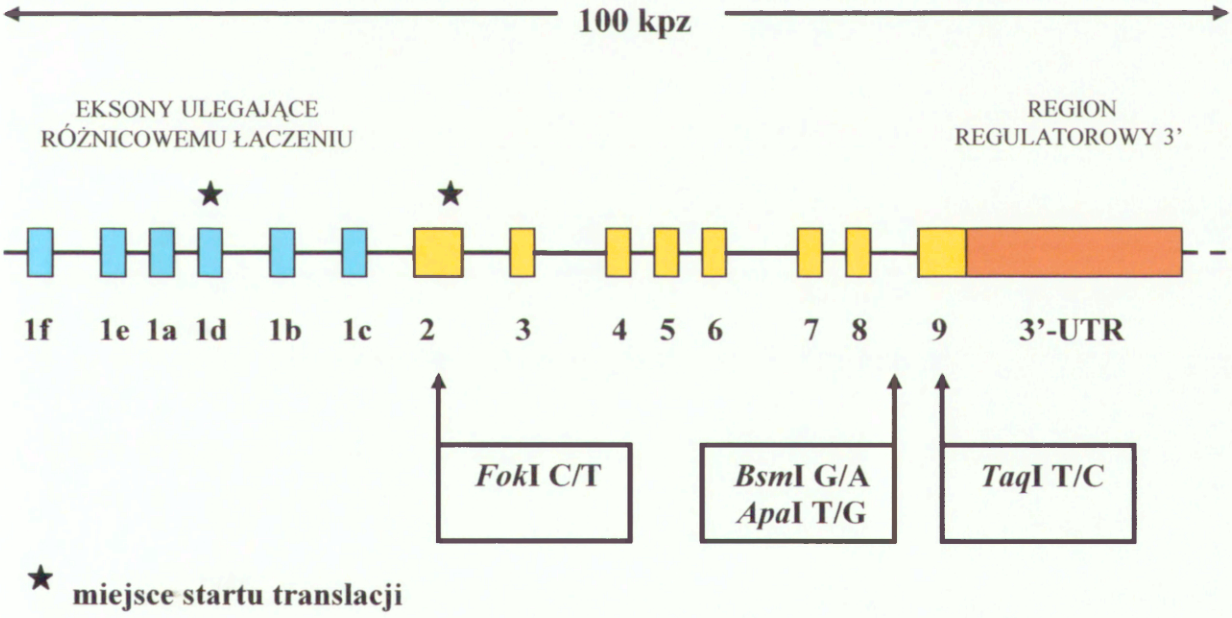
http://rcin.org.pl

V. DYSKUSJA

V. 1. Związek wybranych polimorfizmów genów układu witaminy D z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa (GD) w populacji polskiej

V. 1. 1. Polimorfizmy genu receptora jądrowego witaminy D (*VDR*)

Gen ludzkiego receptora witaminy D (*VDR*) położony jest w regionie 13 na długim ramieniu chromosomu 12 (12q13) i składa się z 14 eksonów [Ryc. 6]. Różnicowe łączenie eksonów 1f-1c na końcu 5' genu jest przyczyną powstawania transkryptów różnej długości, często swoistych dla danej tkanki. Do tej pory zidentyfikowano 14 transkryptów genu *VDR*: w pięciu przypadkach pierwszym eksonem transkryptu jest ekson 1a, w pięciu 1d, a w czterech 1f. Ekson 9 sąsiaduje bezpośrednio z niepodlegającym translacji regionem regulatorowym (ang. *untranslated region* – UTR) przy końcu 3' genu *VDR* [35].



Rycina 6. Schemat organizacji genu receptora witaminy D
Gen receptora witaminy D (ang. *vitamin D receptor* – VDR) liczy około 100 kilo par zasad (kpz) i złożony jest z 14 eksonów. Eksony od 1f do 1c (zaznaczone kolorem niebieskim) ulegają różnicowemu łączeniu, wskutek czego powstają transkrypty różnej długości. Na końcu 3' znajduje się region regulatorowy (ang. *untranslated region* – UTR – zaznaczony kolorem pomarańczowym). Strzałki umieszczone w dolnej części schematu wskazują lokalizację polimorfizmów badanych w tej pracy, których nazwy pochodzą od enzymów restrykcyjnych: *Fok*I – polimorfizm zamiany cytozyny na tyminę (C/T) w eksonie 2, *Bsm*I – polimorfizm zamiany guaniny na adeninę (G/A) w intronie 8, *Apa*I – polimorfizm zamiany tyminy na guaninę (T/G) w intronie 8, *Taq*I – polimorfizm zamiany tyminy na cytozynę (T/C) w eksonie 9.

http://rcin.org.pl

Do niedawna sądzono, że istnieje tylko jedna izoforma białka VDR, dla której miejsce startu translacji znajduje się w eksonie 2, a część strukturalna kodowana jest przez eksony 2-9. Niedawno odkryto, że w eksonie 1d znajduje się inne potencjalne miejsce startu translacji [Ryc.6] i potwierdzono istnienie kilku izoform VDR, które mogą odpowiadać za tkankowo-specyficzne działanie witaminy D [51].

a. Polimorfizmy zamiany pojedynczych nukleotydów w genie VDR

W *locus VDR* stwierdzono obecność ponad 200 polimorfizmów, co świadczy, że jest to gen „dynamiczny" i „młody" ewolucyjnie [110]. Ze względu na udział witaminy D w regulacji ogólnoustrojowych procesów wzrostu, dojrzewania i różnicowania komórek, gen *VDR* stał się „kandydatem" dla badań asocjacyjnych w genetyce chorób wieloczynnikowych. Stwierdzono, że polimorfizmy genu *VDR* mogą mieć wpływ m.in. na gęstość mineralną tkanki kostnej [43,54,82], występowanie nowotworów [32,72], a także na rozwój chorób autoimmunologicznych [50,56,61,115,118,144].

Co do jednego z polimorfizmów genu *VDR* wiadomo, że ma bezpośredni wpływ na strukturę białka (zamiana cytozyny na tyminę C/T, wykrywana enzymem *Fok*I), ponieważ powoduje przesunięcie o trzy aminokwasy miejsca startu translacji w eksonie 2 [99]. Interpretacja roli pozostałych polimorfizmów genu *VDR* jest utrudniona, ponieważ nie jest znana ich bezpośrednia funkcja biologiczna, a część z nich wykryto przypadkowo, podczas cięcia fragmentów genu losowo wybranymi enzymami restrykcyjnymi [158]. W ten sposób zidentyfikowane zostały też trzy polimorfizmy genu *VDR* badane w niniejszej, oraz we wcześniej wymienionych pracach:

– zlokalizowane w intronie 8 polimorfizmy zamiany guaniny na adeninę (G/A) i tyminy na guaninę (T/G) wykrywane odpowiednio za pomocą enzymów *Bsm*I i *Apa*I [48,102]

– zlokalizowany w eksonie 9 polimorfizm zamiany tyminy na cytozynę (C/T) wykrywany enzymem *Taq*I [101] [Ryc.6].

W tej pracy wykazano związek genotypu GG polimorfizmu genu *VDR* wykrywanego enzymem *Bsm*I z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej. Częstość genotypu *Bsm*I GG obserwowana u zdrowych ochotników rasy kaukaskiej różnych narodowości waha się od 18% (w populacji Anglii) [34] do 42% (w populacji Finlandii) [156] i różni się często nawet pomiędzy populacjami tej samej narodowości [5]. Ta sama obserwacja dotyczy częstości genotypów polimorfizmów *Fok*I, *Apa*I i *Taq*I, co tłumaczy się wysoką dynamiką genu *VDR* wywołaną

http://rcin.org.pl

prawdopodobnie wpływami środowiska [156]. Częstość genotypu GG u zdrowych ochotników populacji polskiej badanych w tej pracy (34%) była zbliżona do częstości obserwowanych w innych populacjach środkowoeuropejskich (30-33%) [62,137,141] i nie różniła się znamiennie od częstości opisywanej uprzednio w polskiej populacji z regionu Małopolski (38%) przez Małeckiego i wsp. [87]. Natomiast u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa genotyp GG występował znamiennie częściej (45,5%) i wiązał się z ilorazem szans (OR) 1,62.

W badanej populacji stwierdzono, że polimorfizmy *Bsm*I, *Apa*I i *Taq*I występują w niezrównoważeniu sprzężeń [Tabela VIII], co jest zgodne z danymi literaturowymi [110]. W przypadku wykazania sprzężenia pomiędzy polimorfizmami jest wskazane wykonanie analizy haplotypów, ponieważ wykazane sprzężenie może mieć znaczenie funkcjonalne. Analiza haplotypów znajduje coraz szersze zastosowanie w prognozowaniu ciężkości przebiegu chorób uwarunkowanych genetycznie (np. mukowiscydozy), a także w ocenie odpowiedzi na stosowane leczenie (np. nieswoistych chorób zapalnych jelit). Identyfikacja i zrozumienie znaczenia klinicznie istotnych haplotypów badanych genów może przyczynić się do postępu w diagnostyce i leczeniu chorób jedno- i wielogenowych [83].

Częstość haplotypów genu *VDR* u zdrowych ochotników w populacji polskiej [Tabela IX] była podobna do obserwowanych w innych populacjach europejskich [158], ale różniła się znamiennie w porównaniu z grupą chorych z GD. Allel G polimorfizmu *Bsm*I był obecny głównie w dwóch haplotypach (G•G•T oraz G•T•T), z których haplotyp G•G•T występował częściej u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (OR = 1,76).

W ciągu ostatnich lat opublikowano szereg badań asocjacyjnych, wskazujących na związek polimorfizmów i haplotypów genu *VDR* z rozwojem chorób wieloczynnikowych u człowieka, oraz badań funkcjonalnych mających na celu wyjaśnienie obserwowanych asocjacji. W badaniach funkcjonalnych posługiwano się różnorodnymi metodami: próbowano powiązać poszczególne polimorfizmy i haplotypy z aktywnością transkrypcyjną genu *VDR*, ze stabilnością transkryptu (mRNA), zdolnością wiązania ligandów przez receptor, a także odpowiedzią na leczenie pochodnymi cholekalcyferolu, preparatami wapnia i bifosfonianami. Wyniki niektórych z tych badań sugerują, że allel G polimorfizmu *Bsm*I oraz haplotyp G•G•T, mogą mieć m.in. związek z:

– niższym poziomem mRNA dla receptora witaminy D [28,101];

http://rcin.org.pl

– niższymi stężeniami osteokalcyny (białka, którego gen podlega regulacji przez VDR) [66,101,149];
– a także, ze słabszą odpowiedzią na leczenie pochodnymi cholekalcyferolu i bifosfonianami, mierzoną przyrostem gęstości mineralnej kości [57,90].

Należy jednak podkreślić, że różne metody i stosowane układy doświadczalne utrudniają jednoznaczną interpretację badań funkcjonalnych genu *VDR*. Nie jest również znany mechanizm biologiczny, który tłumaczyłby zaobserwowane różnice. Ponieważ polimorfizm *Bsm*I zlokalizowany jest w intronie, część autorów sugeruje, że jest on markerem sprzężonym z innym funkcjonalnym polimorfizmem w *locus VDR*. Taką rolę może pełnić zlokalizowany w niepodlegającym translacji regionie (UTR) przy końcu 3' genu *VDR* polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń reszt adeninowych (poly-A). Istnieją doniesienia, że allel G polimorfizmu *Bsm*I sprzężony jest z większą (n = 18-24) liczbą reszt adeninowych, niż allel A (n = 13-17), co może mieć wpływ na mniejszą stabilność transkryptu mRNA u osób posiadających genotyp GG a również haplotyp G•G•T [70].

b. Metaanaliza badań nad związkiem polimorfizmów genu VDR z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w różnych populacjach.

Dotychczas, związek polimorfizmów genu *VDR* z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa (GD) badany był w 5 populacjach rasy kaukaskiej oraz w populacji japońskiej [9,11,34,127,141]. Należy zaznaczyć, że częstości genotypów genu *VDR* obserwowane u Japończyków, odbiegały od częstości stwierdzanych w populacjach rasy kaukaskiej, co zaobserwowano również w przypadku innych chorób autoimmunologicznych. Może to świadczyć o różnicach w predyspozycji genetycznej do chorób autoimmunologicznych pomiędzy grupami etnicznymi [92].

Również wyniki prac przeprowadzonych w populacjach rasy kaukaskiej nie były jednoznaczne. Jest to obecnie problem coraz częściej spotykany w badaniach asocjacyjnych. Dlatego sugeruje się, że wykazanie rzeczywistego związku pomiędzy wybranym czynnikiem genetycznym a rozwojem choroby wymaga przeprowadzenia analizy obejmującej tysiące uczestników. Moc badań przeprowadzonych na mniejszych grupach może być niewystarczająca, a uzyskane wyniki zarówno fałszywie negatywne jak i fałszywie pozytywne [38]. W sytuacji, gdy nie jest możliwe zebranie w jednym

http://rcin.org.pl

ośrodku dostatecznie licznych grup badanych, jednym z proponowanych rozwiązań jest przeprowadzenie metaanalizy łączącej w sobie wyniki kilku mniejszych badań i na tej podstawie wnioskowanie o roli badanego czynnika w kształtowaniu predyspozycji genetycznej do rozwoju choroby. Na podstawie wyników metaanalizy jest możliwe wytyczenie dalszych kierunków badań w danej dziedzinie [85,104].

W celu potwierdzenia wyników niniejszej pracy zdecydowano się na przeprowadzenie metaanalizy dotychczas opublikowanych badań nad związkiem polimorfizmów genu *VDR* z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa (GD) w różnych populacjach. Wykonana metaanaliza sugeruje, że genotyp GG polimorfizmu *Bsm*I jest związany z rozwojem choroby GD w populacjach rasy kaukaskiej (P = 0,003; szacunkowy iloraz szans (OR) = 1,28). Z analizy wyłączona została, z powodu heterogenności, populacja japońska, gdzie obserwowane częstości genotypów znacznie odbiegały od wyników uzyskanych w populacjach rasy kaukaskiej [Tabela XVII].

We wcześniejszych badaniach asocjacyjnych wykazano związek genotypu *Bsm*I GG ze zwiększoną podatnością do rozwoju dwóch innych chorób autoimmunologicznych: stwardnienia rozsianego u Japończyków [50] oraz choroby Addisona w populacji niemieckiej [118]. Należy również zwrócić uwagę, że we wszystkich badanych dotychczas populacjach rasy kaukaskiej częstość genotypu GG była wyższa wśród chorych z chorobą Gravesa-Basedowa, w porównaniu z populacją osób zdrowych – Tabela XVII [34,127,141].

W przypadku pozostałych badanych polimorfizmów genu *VDR* (*Fok*I, *Apa*I i *Taq*I), przeprowadzone metaanalizy nie wykazały ich wpływu na rozwój GD w populacjach rasy kaukaskiej. Należy jednak pamiętać, że metaanaliza nie może w pełni zastąpić badania asocjacyjnego, przeprowadzonego na dobrze scharakteryzowanych i odpowiednio licznych grupach badanych.

Dla definitywnego określenia roli polimorfizmów genu *VDR* w rozwoju choroby Gravesa-Basedowa konieczna jest dalsza, systematyczna analiza *locus VDR*. Powinna zostać przeprowadzona analiza sprzężeń pomiędzy znanymi polimorfizmami zlokalizowanymi w genie *VDR*, a także w regionach okalających, która pozwoli na wyodrębnienie tzw. bloków (fragmentów genu o silnym niezrównoważeniu sprzężeń). Z bloków tych powinny zostać wyodrębnione charakterystyczne markery (allele lub haplotypy), których analiza wystarczyłaby (dzięki sprzężeniom) do określenia pozostałych polimorfizmów i których znaczenie potwierdzone zostałoby badaniami funkcjonalnymi[110,143].

http://rcin.org.pl

Tabela XVII. Związek polimorfizmu *Bsm*I w genie *VDR* z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa (GD) w różnych populacjach

Badana Populacja	Grupa	*N*	Genotypy *VDR BsmI*			*P*	OR	Piśmiennictwo
			GG	AG	AA			
Polska	GD	299	45,5%	42,8%	11,7%	0,003	1,62	
	zdrowi ochotnicy	165	33,9%	46,7%	19,4%			
Serbia	GD	211	27,0%	53,6%	19,4%	NS	1,12	Ramos Lopez E i wsp., 2005
	zdrowi ochotnicy	153	24,8%	55,6%	19,6%			
Anglia	GD	648	19,4%	49,4%	31,2%	NS	1,12	Collins JE i wsp., 2004
	zdrowi ochotnicy	847	17,7%	52,3%	30,0%			
Niemcy	GD	209	31,1%	48,8%	20,1%	NS	1,28	Ramos Lopez E i wsp., 2005
	zdrowi ochotnicy	476	26,1%	55,0%	18,9%			
Chorwacja	GD	110	43,6%	49,1%	7,3%	0,04	1,78	Stefanic M i wsp., 2005
	zdrowi ochotnicy	99	30,3%	46,5%	23,2%			
Japonia	GD	180	63,0%	34,0%	3,0%	0,008	0,54	Ban Y i wsp., 2000
	zdrowi ochotnicy	195	76,0%	23,0%	1,0%			

N – liczba osób; GD – choroba Gravesa- Basedowa (ang. *Graves' disease*); *OR – iloraz szans* (ang. *odds ratio*) *obliczony dla genotypu GG; NS – wynik nieznamienny statystycznie* (ang. *not significant*).

Porównując rozkład genotypów w grupie chorych z GD i w grupie zdrowych ochotników, wartości P obliczano za pomocą testu χ^2 *używając tablic 2x2* (*GG vs AG+AA*).

http://rcin.org.pl

V. 1. 2. Polimorfizmy genu białka wiążącego witaminę D (*DBP*)

a. Polimorfizmy zamiany pojedynczych nukleotydów w eksonie 11 genu DBP

Ludzki gen białka wiążącego witaminę D (*DBP*) zlokalizowany na chromosomie 4 (4q11-q13) i składa się z 11 eksonów. W niniejszej pracy badano dwa polimorfizmy zamiany pojedynczych nukleodydów (ang. *single nucleotide polymorphism* – SNP) zlokalizowane w eksonie 11 genu *DBP*: zamianę cytozyny na adeninę (C/A) wykrywaną enzymem *Sty*I oraz guaniny na tyminę (G/T) wykrywaną enzymem *Hae*III. Oba te polimorfizmy mogą mieć znaczenie funkcjonalne, ponieważ polimorfizm *Sty*I (C/A) powoduję zastąpienie treoniny w pozycji 420 łańcucha aminokwasowego przez lizynę (inna nazwa spotykana w literaturze to T420K), natomiast *Hae*III (G/T) – kwasu glutaminowego w pozycji 416 przez kwas asparaginowy (inna nazwa spotykana w literaturze to D416E).

W tej pracy stwierdzono związek allelu A polimorfizmu *Sty*I z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa (GD) w populacji polskiej. W opublikowanych dotychczas badaniach, częstość allelu A, obserwowana w różnych populacjach rasy kaukaskiej, wynosiła od 20% do 30% [76,111,170]. W niniejszej pracy częstość allelu A w grupie zdrowych ochotników wynosiła 26% i była zbliżona do częstości opisywanej w innej polskiej populacji (28%) [88]. Natomiast u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD), częstość allelu A była wyższa (34%) a związany z nim iloraz szans (OR) wynosił 1,45.

W badanej populacji polimorfizmy eksonu 11 genu *DBP* pozostawały silnym niezrównoważeniu sprzężeń, co jest zgodne z wynikami badań w innych populacjach [76,88]. Allel A polimorfizmu *Sty*I występował głównie w sprzężeniu z allelem T polimorfizmu *Hae*III i konsekwentnie, haplotyp A•T występował częściej u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa. W badaniach funkcjonalnych stwierdzono, że u osób posiadających haplotyp A•T występuje izoforma DBP o niższym powinowactwie względem metabolitów witaminy D [3]. We wcześniejszych badaniach asocjacyjnych, haplotyp A•T związany był również z podatnością do rozwoju innych chorób autoimmunologicznych w populacjach rasy kaukaskiej: reumatoidalnego zapalenia stawów [120] oraz stwardnienia rozsianego [44]. Natomiast badanie rodzin dotkniętych autoimmunologicznymi chorobami tarczycy nie wykazało związku haplotypów eksonu 11 genu *DBP* z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa (GD) i choroby Hashimoto w populacji niemieckiej [116]. Brak zgodności pomiędzy wynikami uzyskanymi w

http://rcin.org.pl

niniejszej pracy, a badaniem przeprowadzonym w populacji niemieckiej, może wynikać z różnicy czułości pomiędzy modelem badawczym typu przypadek-kontrola a badaniami rodzin [151].

W przypadku drugiego badanego SNP (G/T), wykrywanego enzymem *Hae*III, nie stwierdzono związku alleli i genotypów z rozwojem GD w badanej populacji.

Jak dotąd nie opublikowano badań asocjacyjnych typu przypadek-kontrola dotyczących związku polimorfizmów eksonu 11 genu *DBP* z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa, co uniemożliwia przeprowadzenie metaanalizy. Dlatego, w celu zdefiniowania znaczenia tych polimorfizmów w rozwoju GD, konieczne jest przeprowadzenie badań replikacyjnych w innych populacjach.

b. Polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ w intonie 8 genu DBP

Analiza polimorfizmu zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ genu *DBP* w populacji polskiej wykazała różnice w częstości poszczególnych alleli i genotypów w porównaniu z populacjami Europy Zachodniej. W badaniu przeprowadzonym we Wschodniej Anglii, opisano występowanie pięciu alleli określanych według liczby powtórzeń jako 6, 8, 9, 10 oraz 11 i stwierdzono związek genotypu 10/8 z obniżoną gęstością mineralną kości [119]. Natomiast w populacji niemieckiej stwierdzono występowanie zaledwie trzech alleli: 6, 8 i 10, przy czym w badaniach rodzin zaobserwowano, że allel 8 związany jest z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa [114,119]. Sugerowano również, że polimorfizm ten ma znaczenie funkcjonalne, ponieważ liczba powtórzeń (TAAA) może wpływać na stabilność mRNA i przez to na wydajność translacji [14].

Badając polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ w genu *DBP* w polskiej populacji, oprócz trzech znanych wariantów (8,9,10) stwierdzono występowanie nie opisywanego wcześniej w literaturze allelu, określonego na podstawie liczby powtórzeń (TAAA) jako 7. Obserwowany rozkład alleli i genotypów był zatem odmienny od obserwowanych w innych populacjach rasy kaukaskiej i nie stwierdzono związku tego polimorfizmu z GD. Wytłumaczeniem uzyskanych wyników może być fakt, że *locus DBP* jest bardzo polimorficzne, a jego poszczególne warianty mogą być swoiste dla danej populacji [164]. Dlatego dopiero dalsze badania regionu 4q11-q13 w, a także badania asocjacyjne przeprowadzone w różnych populacjach pozwolą na określenie roli polimorfizmów genu *DBP* w podatności do rozwoju choroby Gravesa-Basedowa.

http://rcin.org.pl

V. 1. 3. Polimorfizm genu 1α-hydroksylazy witaminy D (*CYP27B1*)

Ludzki gen 1α-hydroksylazy witaminy D – *CYP27B1* – jest zlokalizowany na chromosomie 12 (12q13.1-q13.3), w odległości 10 megapar zasad od genu *VDR*. Mutacje genu *CYP27B1* zaburzające funkcję enzymu są przyczyną rozwoju krzywicy zależnej od witaminy D typu 1 (ang. *vitamin D dependent rickets type I* – VDDR-I). W chorobie tej, dziedziczonej w sposób autosomalny recesywny, na skutek braku $1,25(OH)_2D_3$ dochodzi do rozwoju wtórnej nadczynności przytarczyc, hipokalcemii, hipofosfatemii oraz osteomalacji [98]. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach pozbawionych genu *cyp27b1*, oprócz zaburzeń gospodarki mineralnej i zniekształconej budowy kości, stwierdzono również nieprawidłowości w układzie immunologicznym: powiększenie okołotarczycowych węzłów chłonnych oraz zmniejszenie obwodowej puli limfocytów T pomocniczych i cytotoksycznych [113]. Dlatego gen *CYP27B1* jest interesującym kandydatem w badaniach nad patogenezą chorób autoimmunologicznych również u ludzi [117].

W tej pracy badano polimorfizm promotora genu *CYP27B1* (C-1260A) wykrywany enzymem restrykcyjnym *Tfi*I. Zmiany w sekwencji promotora mogą mieć wpływ na poziom ekspresji genu poprzez powstanie lub utratę miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych. Obecność allelu C w pozycji -1260 promotora genu *CYP27B1* powoduje zmianę w sekwencji rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny Cdx-2 (ang. *caudal type homeo box transcription factor 2*) z TATTT na TCTTT. Czynnik Cdx-2 odgrywa ważną rolę regulacji transkrypcji genu *VDR* w jelicie cienkim [168], a polimorfizmy zlokalizowane w sekwencji wiążącej Cdx-2 w promotorze genu *VDR* mają wpływ na gęstość mineralną tkanki kostnej [47]. W niniejszej pracy zaobserwowano, że genotyp -1260 CC występuje częściej u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa (GD), w porównaniu z grupą zdrowych ochotników, a więc może mieć związek z rozwojem GD w populacji polskiej. W populacji niemieckiej stwierdzono, że ten sam genotyp jest związany z cukrzycą typu 1, chorobą Addisona a także z GD i chorobą Hashimoto sugerując, że polimorfizm *CYP27B1* (C-1260A) może być nowym, wspólnym markerem chorób autoimmunologicznych [86]. Natomiast w niedawno przeprowadzonym badaniu w populacji angielskiej potwierdzono związek polimorfizmu C-1260A wyłącznie z chorobą Addisona, nie stwierdzając różnic w częstości występowania genotypu CC pomiędzy chorymi z GD, a grupą zdrowych ochotników [71]. Brak homogenności pomiędzy populacją polską, niemiecką i angielską [Tabela XVIII], uniemożliwia przeprowadzenie

http://rcin.org.pl

Tabela XVIII. Związek polimorfizmu promotora genu *CYP27B1* z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa (GD) w różnych populacjach

Badana Populacja	Grupa	*N*	Genotypy promotora genu *CYP27B1*			*P*	OR	Piśmiennictwo
			CC	CA	AA			
Polska	GD	336	47,0%	40,8%	12,2%	0,006	1,74	
	zdrowi ochotnicy	154	33,8%	42,6%	13,6%			
Niemcy	GD	334	50,6%	41,0%	8,4%	0,005	1,56	Lopez R E i wsp., 2004
	zdrowi ochotnicy	320	39,7%	52,8%	7,5%			
Anglia	GD	446	41,3%	44,4%	14,3%	NS	0,98	Jennings CE i wsp., 2005
	zdrowi ochotnicy	381	41,7%	46,5%	11,8%			

N – liczba osób; GD – choroba Gravesa- Basedowa (ang. *Graves' disease*); *OR – iloraz szans* (ang. *odds ratio*) *obliczony dla genotypu CC; NS – wynik nieznamienny statystycznie* (ang. *not significant*).

Porównując rozkład genotypów w grupie chorych z GD i w grupie zdrowych ochotników, wartości P obliczano za pomocą testu χ^2 używając tablic 2x2 (CC vs CA+AA).

http://rcin.org.pl

metaanalizy i wyjaśnienie, czy genotyp ten jest markerem choroby Gravesa-Basedowa wspólnym dla populacji rasy kaukaskiej. Jennings i współpracownicy w swojej pracy badali również dwa inne polimorfizmy promotora: T-1918C oraz G-1077C sugerując, że określenie roli genu *CYP27B1* w rozwoju chorób autoimmunologicznych wymaga analizy innych wariantów w obrębie jego *locus* i dalszych badań asocjacyjnych przeprowadzonych na dużych grupach badanych.

V. 1. 4. Polimorfizm genu 24-hydroksylazy witaminy D (*CYP24*)

Gen 24-hydroksylazy witaminy D – *CYP24* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 20 (20q13.2-q13.3). W promotorze genu *CYP24* znajdują się dwie sekwencje regulatorowe VDRE, przez które $1,25(OH)_2D_3$, w połączeniu z VDR może aktywować ekspresję enzymu, zapoczątkowując tym samym degradację metabolitów witaminy D [31]. W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że nadmierna ekspresja genu *CYP24* skutkuje wzmożonym katabolizmem aktywnego metabolitu – $1,25(OH)_2D_3$ [132]. Wywołany w ten sposób niedobór witaminy D może prowadzić do zburzenia kontroli procesów wzrostu i różnicowania komórek, co potwierdzono w badaniach nad patogenezą raka sutka [1]. Analogicznie, spowodowany nieprawidłową ekspresją genu *CYP24* niedobór $1,25(OH)_2D_3$ może zaburzać prawidłową funkcję limfocytów T i komórek prezentujących antygen, prowadząc do rozwoju zjawisk autoimmunologicznych.

W niniejszej pracy analizowano polimorfizm zamiany pojedynczych nukleotydów (G/C) zlokalizowany w regionie regulatorowym 5' genu *CYP24*. Analiza *in silico* wykazała, że obecność allelu C powoduje powstanie miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F, które są regulatorami postępu cyklu komórkowego i odgrywają ważną rolę w eliminacji autoreaktywnych limfocytów T [171]. Jak dotąd brak badań funkcjonalnych potwierdzających znaczenie tego polimorfizmu, natomiast w badaniu asocjacyjnym w populacji niemieckiej stwierdzono, że allel C może wiązać się z niższymi stężeniami $25(OH)D_3$ i predysponować do rozwoju choroby Addisona [Ramos-Loopez E i wsp., niepublikowane dane]. Częstość allelu C u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa w populacji polskiej była większa w porównaniu z grupą zdrowych ochotników, choć różnica ta nie była znamienna statystycznie. Wynik ten sugeruje, ze polimorfizm G/C w regionie 5' regulatorowym *CYP24* nie wpływa na rozwój choroby

http://rcin.org.pl

Gravesa-Basedowa w populacji polskiej, aczkolwiek sam gen pozostaje interesującym kandydatem dla dalszych badań asocjacyjnych.

V. 2. Analiza interakcji gen-gen między wybranymi polimorfizmami genów układu witaminy D

Za wystąpienie objawów chorób jednogenowych są odpowiedzialne mutacje pojedynczego genu powodujące utratę jego funkcji (np. mutacja w genie pendryny powodująca zespól Pendreda) albo jego nadmierną aktywację (np. mutacja w protoonkogenie *RET* kodującym receptor błonowy z grupy receptorowych kinaz tyrozynowych w zespole mnogiej gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej) [46,128].

W schorzeniach wieloczynnikowych, takich jak choroba Gravesa-Basedowa (GD), mutacje mogą mieć nieznaczny wpływ na funkcję poszczególnych genów, a dopiero ich kombinacje i wzajemne interakcje decydują o rozwoju choroby [151,152]. Nierozwiązany pozostaje również problem, w jakim stopniu czynniki środowiskowe mogą modulować interakcje genów i jaki ma to wpływ na rozwój i fenotyp choroby [152]. Badanie interakcji gen-gen oraz geny-czynniki środowiskowe jest bardzo trudne i obecnie nie ma jasnych wytycznych, co do prawidłowych metod badawczych.

W niniejszej pracy badano 9 polimorfizmów w czterech genach kodujących białka układu witaminy D [Tabela I]. Do analizy interakcji wybrano te spośród badanych czynników, dla których stwierdzony został związek z rozwojem GD: genotyp GG polimorfizmu *Bsm*I genu *VDR*, genotypy AA i AC polimorfizmu *Sty*I genu *DBP*, oraz genotyp CC polimorfizmu promotora genu *CYP27B1*. Przeprowadzona analiza wykazała, że pomiędzy badanymi czynnikami zachodzą prawdopodobnie interakcje, ponieważ iloraz szans (OR) związany z występowaniem dwóch z tych czynników był 1,5-krotnie wyższy, a dla występowania trzech czynników – około 2-krotnie wyższy niż w przypadku każdego z nich badanego osobno. Podobne addytywne działanie w kształtowaniu predyspozycji do rozwoju GD stwierdzono pomiędzy allelami HLA *DRB1*03* oraz *CTLA-4* 49G [10].

Nie są znane mechanizmy molekularne, w jakich dochodzi do interakcji gen-gen w chorobach wieloczynnikowych. Według jednej z hipotez, obserwowane interakcje są wyrazem skumulowanego działania kilku genów na różnych etapach patogenezy. W przypadku badanych genów układu witaminy D, można założyć, że jeżeli jednocześnie u danej osoby występuje mutacja w genie hydroksylazy, która może ograniczać

http://rcin.org.pl

wydajność syntezy $1,25(OH)_2D_3$, mutacja genu białka wiążącego zmniejszająca powinowactwo DBP względem aktywnego metabolitu, a wreszcie mutacja genu *VDR* upośledzająca funkcję receptora, to może dojść do zaburzenia procesów immunologicznych kontrolowanych przez witaminę D i rozwoju chorób autoimmunologicznych. Osoba z taką predyspozycją genetyczną będzie również wrażliwsza na niedobory witaminy D.

V. 3. Związek wybranych polimorfizmów genów układu witaminy D z fenotypem choroby Gravesa-Basedowa (GD)

Różnorodność objawów klinicznych choroby Gravesa-Basedowa, które lokalizują się w tarczycy, tkankach oczodołu, skórze przedgoleni oraz dystalnych paliczków rąk i stóp, sugeruje, że na przebieg choroby mogą mieć wpływ różne czynniki genetyczne i środowiskowe [109,163]. Choć podatność genetyczna do rozwoju GD jest dobrze udokumentowana na podstawie badań bliźniąt, to wpływ konkretnych czynników genetycznych na fenotyp choroby wciąż budzi kontrowersje [151,159].

Istnieją pojedyncze doniesienia, że badane w tej pracy polimorfizmy genów układu witaminy D, mogą mieć wpływ na przebieg chorób autoimmunologicznych w różnych populacjach. W odniesieniu do polimorfizmów genu *VDR* stwierdzono, że wpływają na szybszą progresję cukrzycy typu I (allel *Apa*I G i *Taq*I C), rozwój retinopatii cukrzycowej (genotypy *Fok*I TT i *Taq*I TC) czy osteoporozy związanej z GD (genotyp *Fok*I CC) [9,103,147]. Natomiast polimorfizm eksonu 11 genu *DBP* wykrywany enzymem *Hae*III (genotypy GG i TG) związany był z wyższym poziomem autoprzeciwciał przeciwko fosfatazie tyrozyny (IA-2) u pacjentów z cukrzycą typu I [112].

W tej pracy nie stwierdzono korelacji pomiędzy genotypami badanych polimorfizmów genów układu witaminy D a fenotypem klinicznym choroby Gravesa-Basedowa: płcią, stopniem nasilenia zmian ocznych, wiekiem, w którym wystąpiły pierwsze objawy choroby, a także rodzinnym występowaniem autoimmunologicznych chorób tarczycy. Powyższe wyniki sugerują, że badane polimorfizmy genów układu witaminy D nie mają wpływu na fenotyp GD, a ich analiza nie będzie przydatna w ocenie wczesnego ryzyka wystąpienia i prognozowania, co do ciężkości przebiegu choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej.

http://rcin.org.pl

WNIOSKI I PODSUMOWANIE PRACY

1. Polimorfizm *Bsm*I (G/A) genu *VDR*, polimorfizm *Sty*I (C/A) genu *DBP* oraz polimorfizm (C/A) w promotorze genu *CYP27B1* są związane z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej. Udział wymienionych polimorfizmów w kształtowaniu predyspozycji do rozwoju GD może mieć charakter addytywny (zachodzą między nimi interakcje gen-gen).

2. Polimorfizm *Bsm*I (G/A) genu *VDR* może być traktowany jako marker podatności do rozwoju choroby Gravesa-Basedowa w populacjach rasy kaukaskiej.

3. Polimorfizmy: *Fok*I (C/T), *Apa*I (T/G) i *Taq*I (T/C) genu *VDR*; *Hae*III (G/T) i polimorfizm zmiennej liczby powtórzeń $(TAAA)_N$ genu *DBP* oraz polimorfizm (G/C) w regionie regulatorowym 5' genu *CYP24* nie są związane z podatnością na rozwój choroby Gravesa-Basedowa w populacji polskiej.

4. Badane polimorfizmy genów układu witaminy D (*VDR*, *DBP*, *CYP27B1*, *CYP24*) wydają się nie mieć związku z fenotypem choroby Gravesa-Basedowa.

Powyższe wyniki potwierdzają znaczenie polimorfizmów genów białek tworzących układ witaminy D w kształtowaniu predyspozycji do rozwoju chorób autoimmunologicznych. Ponieważ funkcja niektórych z tych polimorfizmów pozostaje nieznana, możliwe jest, że są one markerami sprzężonymi z innymi funkcjonalnymi polimorfizmami w obrębie badanych *loci*. Dlatego potrzebne są dalsze systematyczne badania genetyczne i funkcjonalne, których wyniki pozwolą ocenić wpływ poszczególnych genów układu witaminy D na rozwój i fenotyp chorób autoimmunologicznych, a także mogą stanowić podstawę dla zastosowania pochodnych witaminy D w terapii chorych.

http://rcin.org.pl

PIŚMIENNICTWO

1. Albertson D.G., Ylstra B., Segraves R., Collins C., Dairkee S.H., Kowbel D., Kuo W.L., Gray J.W., Pinkel D. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. Nat Genet. 2000; 25:144-6.
2. Alroy I., Towers T.L., Freedman L.P. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. Mol Cell Biol. 1995; 15:5789-99.
3. Arnaud J., Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP).Hum Genet. 1993; 92:183-8.
4. Ashcroft D.M., Po A.L., Williams H.C., Griffiths C.E. Systematic review of comparative efficacy and tolerability of calcipotriol in treating chronic plaque psoriasis. BMJ. 2000; 320:963-7.
5. Audi L., Marti G., Esteban C., Oyarzabal M., Chueca M., Gussinye M., Yeste D., Fernandez-Cancio M., Andaluz P., Carrascosa A. VDR gene polymorphism at exon 2 start codon (FokI) may have influenced Type 1 diabetes mellitus susceptibility in two Spanish populations. Diabet Med. 2004; 21:393-4.
6. Auer D.P., Schumann E.M., Kumpfel T., Gossl C., Trenkwalder C. Seasonal fluctuations of gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. Ann Neurol. 2000; 47:276-7.
7. Badenhoop K., Schwarz G., Schleusener H., Weetman A.P., Recks S., Peters H., Bottazzo G.F., Usadel K.H. Tumor necrosis factor beta gene polymorphisms in Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab. 1992; 74:287-91.
8. Bamford C.R., Sibley W.A., Thies C. Seasonal variation of multiple sclerosis exacerbations in Arizona. Neurology. 1983; 33:697-701.
9. Ban Y., Ban Y., Taniyama M., Katagiri T. Vitamin D receptor initiation codon polymorphism in Japanese patients with Graves' disease. Thyroid. 2000; 10:375-80.
10. Ban Y., Concepcion E.S., Villanueva R., Greenberg D.A., Davies T.F., Tomer Y. Analysis of immune regulatory genes in familial and sporadic Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89:4562-8.
11. Ban Y., Taniyama M., Ban Y. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with Graves' disease in the Japanese population. J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85:4639-43.
12. Barbesino G., Tomer Y., Concepcion E., Davies T.F., Greenberg D.A. Linkage analysis of candidate genes in autoimmune thyroid disease: 1. Selected immunoregulatory genes. International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83:1580-4.
13. Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics. 2005; 21:263-5.
14. Batzer M.A., Deininger P.L. Alu repeats and human genomic diversity. Nat Rev Genet. 2002; 3:370-9.
15. Bednarczuk T., Hiromatsu Y., Fukutani T., Jazdzewski K., Miskiewicz P., Osikowska M., Nauman J. Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and non-genetic factors with Graves' ophthalmopathy in European and Japanese populations. Eur J Endocrinol. 2003; 148:13-8.
16. Bednarczuk T., Hiromatsu Y., Seki N., Ploski R., Fukutani T., Kurylowicz A., Jazdzewski K., Chojnowski K., Itoh K., Nauman J. Association of tumor necrosis factor and human leukocyte antigen DRB1 alleles with Graves' ophthalmopathy. Hum Immunol. 2004; 65:632-9.
17. Bednarczuk T., Kurylowicz A., Hiromatsu Y., Kiljanski J., Telichowska A., Nauman J. Association of G-174C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter with Graves'

http://rcin.org.pl

ophthalmopathy. Autoimmunity. 2004; 37:223-6.
18. Bednarczuk T., Placha G., Jazdzewski K., Kurylowicz A., Kloza M., Makowska U., Hiromatsu Y., Nauman J. 2003 Interleukin-13 gene polymorphisms in patients with Graves' disease. Clin Endocrinol (Oxf). 2003; 59:519-25.
19. Bhalla A.K., Amento E.P., Serog B., Glimcher L.H.1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. J Immunol. 1984; 133:1748-54.
20. Boonstra A., Barrat F.J., Crain C., Heath V.L., Savelkoul H.F., O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. J Immunol. 2001; 167:4974-80.
21. Bottini N., Musumeci L., Alonso A., Rahmouni S., Nika K., Rostamkhani M., MacMurray J., Meloni G.F., Lucarelli P., Pellecchia M., Eisenbarth G.S., Comings D., Mustelin T. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. Nat Genet. 2004; 36:337-8.
22. Brix T.H., Kyvik K.O., Christensen K., Hegedus L. Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86:930-4.
23. Canning M.O., Grotenhuis K., de Wit H., Ruwhof C., Drexhage H.A.1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. Eur J Endocrinol. 2001; 145:351-7.
24. Cantorna M.T., Hayes C.E., DeLuca H.F.1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. J Nutr. 1998; 128:68-72.
25. Cantorna M.T., Hayes C.E., DeLuca H.F.1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93:7861-4.
26. Cantorna M.T., Mahon B.D. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. Exp Biol Med (Maywood). 2004; 229:1136-42.
27. Cantorna M.T., Zhu Y., Froicu M., Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. Am J Clin Nutr. 2004; 80:1717S-20S.
28. Carling T., Rastad J., Akerstrom G., Westin G. Vitamin D receptor (VDR) and parathyroid hormone messenger ribonucleic acid levels correspond to polymorphic VDR alleles in human parathyroid tumors. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83:2255-9.
29. Caux C., Massacrier C., Vanbervliet B., Dubois B., Van Kooten C., Durand I., Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J Exp Med. 1994;180:1263-72.
30. Cella M., Engering A., Pinet V., Pieters J., Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. Nature. 1997; 388:782-7.
31. Chen K.S., DeLuca H.F. Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. Biochim Biophys Acta. 1995; 1263:1-9.
32. Chen W.Y., Bertone-Johnson E.R., Hunter D.J., Willett W.C., Hankinson S.E. Associations between polymorphisms in the vitamin D receptor and breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005; 14:2335-9.
33. Cippitelli M., Santoni A. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. Eur J Immunol. 1998; 28:3017-30.
34. Collins J.E., Heward J.M., Nithiyananthan R., Nejentsev S., Todd J.A., Franklyn J.A., Gough S.C. Lack of association of the vitamin D receptor gene with Graves' disease in UK Caucasians. Clin Endocrinol (Oxf). 2004; 60:618-24.
35. Crofts L.A., Hancock M.S., Morrison N.A., Eisman J.A. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95:10529-34.

http://rcin.org.pl

36. Cuddihy R.M., Dutton C.M., Bahn R.S. A polymorphism in the extracellular domain of the thyrotropin receptor is highly associated with autoimmune thyroid disease in females. Thyroid. 1995; 5:89-95.
37. Cuddihy R.M., Schaid D.S., Bahn R.S. Multivariate analysis of HLA loci in conjunction with a thyrotropin receptor codon 52 polymorphism in conferring risk of Graves' disease. Thyroid. 1996; 6:261-5.
38. Dahlman I., Eaves I.A., Kosoy R., Morrison V.A., Heward J., Gough S.C., Allahabadia A., Franklyn J.A., Tuomilehto J., Tuomilehto-Wolf E., Cucca F., Guja C., Ionescu-Tirgoviste C., Stevens H., Carr P., Nutland S., McKinney P., Shield J.P., Wang W., Cordell H.J., Walker N., Todd J.A., Concannon P. Parameters for reliable results in genetic association studies in common disease. Nat Genet. 2002; 30:149-50.
39. D'Ambrosio D., Cippitelli M., Cocciolo M.G., Mazzeo D., Di Lucia P., Lang R., Sinigaglia F., Panina-Bordignon P. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. J Clin Invest. 1998; 101:252-62.
40. Davidson A., Diamond B. Autoimmune diseases. N Engl J Med. 2001; 345:340-50.
41. Davies T.F., Martin A., Concepcion E.S., Graves P., Cohen L., Ben-Nun A. Evidence of limited variability of antigen receptors on intrathyroidal T cells in autoimmune thyroid disease. N Engl J Med. 1991; 325:238-44.
42. Deluca H.F., Cantorna M.T. Vitamin D: its role and uses in immunology. FASEB J. 2001; 15:2579-85.
43. Deng H.W., Li J., Li J.L., Johnson M., Gong G., Davis K.M., Recker R.R. Change of bone mass in postmenopausal Caucasian women with and without hormone replacement therapy is associated with vitamin D receptor and estrogen receptor genotypes. Hum Genet. 1998; 103:576-85.
44. Di Bacco M., Luiselli D., Manca M.L., Siciliano G. Bayesian approach to searching for susceptibility genes: Gc2 and EsD1 alleles and multiple sclerosis. Coll Antropol. 2002; 26:77-84.
45. Donner H., Rau H., Walfish P.G., Braun J., Siegmund T., Finke R., Herwig J., Usadel K.H., Badenhoop K. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82:143-6.
46. Falchetti A., Marini F., Tonelli F., Brandi M.L. Lessons from genes mutated in multiple endocrine neoplasia (MEN) syndromes. Ann Endocrinol (Paris). 2005; 66:195-205.
47. Fang Y., van Meurs J.B., Bergink A.P., Hofman A., van Duijn C.M., van Leeuwen J.P., Pols H.A., Uitterlinden A.G. Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. J Bone Miner Res. 2003; 18:1632-41.
48. Faraco J.H., Morrison N.A., Baker A., Shine J., Frossard P.M. Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. Nucleic Acids Res. 1989; 17:2150.
49. Fournier C., Gepner P., Sadouk M., Charreire J. In vivo beneficial effects of cyclosporin A and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. Clin Immunol Immunopathol. 1990; 54:53-63.
50. Fukazawa T., Yabe I., Kikuchi S., Sasaki H., Hamada T., Miyasaka K., Tashiro K. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese. J Neurol Sci. 1999; 166:47-52.
51. Gardiner E.M., Esteban L.M., Fong C., Allison S.J., Flanagan J.L., Kouzmenko A.P., Eisman J.A. Vitamin D receptor B1 and exon 1d: functional and evolutionary analysis. J Steroid Biochem Mol Biol. 2004; 89-90:233-8.
52. Gniadecki R. Nongenomic signaling by vitamin D: a new face of Src. Biochem Pharmacol. 1998; 56:1273-7.

http://rcin.org.pl

Biomarkers Prev. 1997; 6:93-8.
71. Jennings C.E., Owen C.J., Wilson V., Pearce S.H. A haplotype of the CYP27B1 promoter is associated with autoimmune Addison's disease but not with Graves' disease in a UK population. J Mol Endocrinol. 2005; 34:859-63.
72. John E.M., Schwartz G.G., Koo J., Van Den Berg D., Ingles S.A. Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of advanced prostate cancer. Cancer Res. 2005; 65:5470-9.
73. Kang S., Yi S., Griffiths C.E., Fancher L., Hamilton T.A., Choi J.H. Calcipotriene-induced improvement in psoriasis is associated with reduced interleukin-8 and increased interleukin-10 levels within lesions. Br J Dermatol. 1998; 138:77-83.
74. Kędzierska A., Turowski G. Układ zgodności tkankowej człowieka –HLA. Rozważania w świetle aktualnych poglądów. Współzależność między antygenami HLA a występowaniem określonych chorób. Przegl. Lek 2001; 58:7-8.
75. Kim T.Y., Park Y.J., Hwang J.K., Song J.Y., Park K.S., Cho B.Y., Park J. A C/T polymorphism in the 5'-untranslated region of the CD40 gene is associated with Graves' disease in Koreans.Thyroid. 2003; 13:919-25.
76. Klupa T., Małecki M., Hanna L., Sieradzka J., Frey J., Warram J.H., Sieradzki J., Krolewski A.S. Amino acid variants of the vitamin D-binding protein and risk of diabetes in white Americans of European origin. Eur J Endocrinol. 1999; 141:490-3.
77. Kouki T., Sawai Y., Gardine C.A., Fisfalen M.E., Alegre M.L., DeGroot L.J.CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. J Immunol. 2000; 165:6606-11.
78. Kretowski A., Wawrusiewicz N., Mironczuk K., Mysliwiec J., Kretowska M., Kinalska I. Intercellular adhesion molecule 1 gene polymorphisms in Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88:4945-9.
79. Kula D., Bednarczuk T., Jurecka-Lubieniecka B., Hasse-Lazar K., Krawczyk A., Szpak S., Stęchly T., Jarząb M., Steinhof-Radwańska K., Kowalska E., Pawlaczek A., Hajduk B., Gubała E., Żebracka J., Kuryłowicz A., Bar-Andziak E., Nauman J., Jarząb B. Predisposition to Graves' Disease – interaction of HLA II class DRB1*03 allele with CTLA-4 and TNF genes. Endokrynol. Pol. 2005; 433-4 [Streszczenie]
80. Kula D., Jurecka-Lubienecka B., Hasse-Lazar K., Krawczyk A., Szpak S., Stechly T., Jarzab B., Steinhof-Radwanska K., Kowalska M., Pawlaczek A. 2004 Interaction of CTLA-4 with DRB1*03 and TNF genes in predisposition to Graves' disease. 30th Annual Meeting of the European Thyroid Association 2004 Istanbul, Turkey. [Streszczenie nr. 40]
81. Kuryłowicz A., Kula D., Ploski R., Skorka A., Jurecka-Lubieniecka B., Zebracka J., Steinhof-Radwanska K., Hasse-Lazar K., Hiromatsu Y., Jarzab B., Bednarczuk T. Association of CD40 gene polymorphism (C-1T) with susceptibility and phenotype of Graves' disease. Thyroid. 2005; 15:1119-24.
82. Langdahl B.L., Gravholt C.H., Brixen K., Eriksen E.F. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. Eur J Clin Invest. 2000; 30:608-17.
83. Lee J.E., Choi J.H., Lee J.H., Lee M.G. Gene SNPs and mutations in clinical genetic testing: haplotype-based testing and analysis. Mutat Res. 2005; 573:195-204.
84. Lewontin R.C. The detection of linkage disequilibrium in molecular sequence data. Genetics. 1995; 140:377-88.
85. Lohmueller K.E., Pearce C.L., Pike M., Lander E.S., Hirschhorn J.N. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. Nat Genet. 2003; 33:177-82.
86. Lopez E.R., Zwermann O., Segni M., Meyer G., Reincke M., Seissler J., Herwig J., Usadel K.H., Badenhoop K. A promoter polymorphism of the CYP27B1 gene is associated with

http://rcin.org.pl

Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and type 1 diabetes mellitus in Germans. Eur J Endocrinol. 2004; 151:193-7.
87. Malecki M.T., Frey J., Moczulski D., Klupa T., Kozek E., Sieradzki J. Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2003; 111:505-9.
88. Malecki M.T., Klupa T., Wanic K., Cyganek K., Frey J., Sieradzki J. Vitamin D binding protein gene and genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. Diabetes Res Clin Pract. 2002; 57:99-104.
89. Mantel N., Haenszel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. J Natl Cancer Inst. 1959; 22:719-748.
90. Marc J., Prezelj J., Komel R., Kocijancic A. VDR genotype and response to etidronate therapy in late postmenopausal women. Osteoporos Int. 1999; 10:303-6.
91. Marga M., Denisova A., Sochnev A., Pirags V., Farid N.R. Two HLA DRB 1 alleles confer independent genetic susceptibility to Graves disease: relevance of cross-population studies. Am J Med Genet. 2001; 102:188-91.
92. Maruyama T., Shimada A., Kasuga A., Kasatani T., Ozawa Y., Ishii M., Takei I., Suzuki Y., Kobayashi A., Takeda S., Matsubara K., Saruta T. Analysis of MHC class II antigens in Japanese IDDM by a novel HLA-typing method, hybridization protection assay. Diabetes. Res Clin Pract. 1994; 23:77–84.
93. Mason J., Mason A.R., Cork M.J. Topical preparations for the treatment of psoriasis: a systematic review.Br J Dermatol. 2002; 146:351-64.
94. Mathieu C., Waer M., Laureys J., Rutgeerts O., Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. Diabetologia. 1994; 37:552-8.
95. Mattner F., Smiroldo S., Galbiati F., Muller M., Di Lucia P., Poliani P.L., Martino G., Panina-Bordignon P., Adorini L. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3).Eur J Immunol. 2000; 30:498-508.
96. Merlino L.A., Curtis J., Mikuls T.R., Cerhan J.R., Criswell L.A., Saag K.G. Iowa Women's Health Study. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. Arthritis Rheum. 2004; 50:72-7.
97. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988; 16:1215.
98. Miller W.L., Portale A.A. Vitamin D 1 alpha-hydroxylase. Trends Endocrinol Metab. 2000; 11:315-9.
99. Miyamoto K., Kesterson R.A., Yamamoto H., Taketani Y., Nishiwaki E., Tatsumi S., Inoue Y., Morita K., Takeda E., Pike J.W. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. Mol Endocrinol. 1997; 11:1165-79.
100. Morimoto S., Kumahara Y. A patient with psoriasis cured by 1 alpha-hydroxyvitamin D3. Med J Osaka Univ. 1985; 35:51-4.
101. Morrison N.A., Qi J.C., Tokita A., Kelly P.J., Crofts L., Nguyen T.V., Sambrook P.N., Eisman J.A. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. Nature. 1994; 367:284-7.
102. Morrison N.A., Yeoman R., Kelly P.J., Eisman J.A. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89:6665-9.
103. Motohashi Y., Yamada S., Yanagawa T., Maruyama T., Suzuki R., Niino M., Fukazawa T., Kasuga A., Hirose H., Matsubara K., Shimada A., Saruta T. Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88:3137-40.
104. Muffano M.R., Flint J. Meta-analysis of genetic association studies. Trends Genet. 2004;

http://rcin.org.pl

20:439-44.
105. Munger K.L., Zhang S.M., O'Reilly E., Hernan M.A., Olek M.J., Willett W.C., Ascherio A. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. Neurology. 2004; 62:60-5.
106. Mysliwiec J., Grygorczuk S., Kinalska I. Graves-Basedov's disease: effect of treatment methods for hyperthyroidism on the course of ophthalmopathy. Pol Arch Med Wewn. 2000; 104:413-8.
107. Nagataki S. The interaction of MHC and Gm in liability to autoimmune thyroid disease. Mol Biol Med. 1986; 3:73-84.
108. Nagpal S., Lu J., Boehm M.F. Vitamin D analogs: mechanism of action and therapeutic applications. Curr Med Chem. 2001; 8:1661-79.
109. Nauman J., Nauman A. Choroby tarczycy. In Choroby wewnętrzne (Wojtczak A, ed). PZWL 1995; tom III: 39-48.
110. Nejentsev S., Godfrey L., Snook H., Rance H., Nutland S., Walker N.M., Lam A.C., Guja C., Ionescu-Tirgoviste C., Undlien D.E., Ronningen K.S., Tuomilehto-Wolf E., Tuomilehto J., Newport M.J., Clayton D.G., Todd J.A. Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. Hum Mol Genet. 2004; 13:1633-9.
111. Ongagna J.C., Kaltenbacher M.C., Sapin R., Pinget M., Belcourt A. The HLA-DQB alleles and amino acid variants of the vitamin D-binding protein in diabetic patients in Alsace. Clin Biochem. 2001; 34:59-63.
112. Ongagna J.C., Pinget M., Belcourt A. Vitamin D-binding protein gene polymorphism association with IA-2 autoantibodies in type 1 diabetes. Clin Biochem. 2005; 38:415-9.
113. Panda D.K., Miao D., Tremblay M.L., Sirois J., Farookhi R., Hendy G.N., Goltzman D. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98:7498-503.
114. Pani M.A., Donner H., Herwig J., Usadel K.H., Badenhoop K. Vitamin D binding protein alleles and susceptibility for type 1 diabetes in Germans. Autoimmunity. 1999; 31:67-72.
115. Pani M.A., Knapp M., Donner H., Braun J., Baur M.P., Usadel K.H., Badenhoop K. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. Diabetes. 2000; 49:504-7.
116. Pani M.A., Regulla K., Segni M., Hofmann S., Hufner M., Pasquino A.M., Usadel K.H., Badenhoop K. A polymorphism within the vitamin D-binding protein gene is associated with Graves' disease but not with Hashimoto's thyroiditis. J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87:2564-7.
117. Pani M.A., Regulla K., Segni M., Krause M., Hofmann S., Hufner M., Herwig J., Pasquino A.M., Usadel K.H., Badenhoop K. Vitamin D 1alpha-hydroxylase (CYP1alpha) polymorphism in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and type 1 diabetes mellitus. Eur J Endocrinol. 2002; 146:777-81.
118. Pani M.A., Seissler J., Usadel K.H., Badenhoop K. Vitamin D receptor genotype is associated with Addison's disease. Eur J Endocrinol. 2002; 147:635-40.
119. Papiha S.S., Allcroft L.C., Kanan R.M., Francis R.M., Datta H.K. Vitamin D binding protein gene in male osteoporosis: association of plasma DBP and bone mineral density with (TAAA)(n)-Alu polymorphism in DBP. Calcif Tissue Int 1999; 65:262-6.
120. Papiha S.S., Pal B. Gc (vitamin D binding protein) subtypes in rheumatoid arthritis. Hum Genet. 1985; 70:278-80.
121. Penna G., Adorini L. 1 Alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. J Immunol. 2000; 164:2405-11.
122. Perneger T.V. What's wrong with Bonferroni adjustments. BMJ. 1998; 316:1236-8.

http://rcin.org.pl

123. Pirro M.T, De Filippis V., Di Cerbo A., Scillitani A., Liuzzi A., Tassi V. Thyroperoxidase microsatellite polymorphism in thyroid diseases. Thyroid. 1995; 5:461-4.
124. Ploski R., Forre O. Genetic markers analysis. In: Oxford Textbook of Rheumatology. Oxford University Press 1998; 669-701.
125. Prosser E., Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. Trends Biochem Sci. 2004; 29:664-73.
126. Rachez C., Freedman L.P. Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions. Gene. 2000; 246:9-21.
127. Ramos-Lopez E., Kurylowicz A., Bednarczuk T., Paunkovic J., Seidl C., Badenhoop K. Vitamin D Receptor Polymorphisms are Associated with Graves' Disease in German and Polish But not in Serbian Patients. Thyroid. 2005; 15:1125-30.
128. Reardon W., Trembath R.C. Pendred syndrome. J Med Genet. 1996; 33:1037-40.
129. Reichel H., Koeffler H.P., Tobler A., Norman A.W. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits gamma-interferon synthesis by normal human peripheral blood lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84:3385-9.
130. Rigby W.F., Denome S., Fanger M.W. Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Specific inhibition at the level of messenger RNA. J Clin Invest. 1987; 79:1659-64.
131. Ringold D.A., Nicoloff J.T., Kesler M., Davis H., Hamilton A., Mack T. Further evidence for a strong genetic influence on the development of autoimmune thyroid disease: the California twin study. Thyroid. 2002; 12:647-53.
132. Roy S., Martel J., Ma S., Tenenhouse H.S. Increased renal 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase messenger ribonucleic acid and immunoreactive protein in phosphate-deprived Hyp mice: a mechanism for accelerated 1,25-dihydroxyvitamin D3 catabolism in X-linked hypophosphatemic rickets. Endocrinology. 1994; 134:1761-7.
133. Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med. 1994; 179:1109-18.
134. Simmonds M.J, Gough S.C. Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond. Clin Exp Immunol. 2004; 136:1-10.
135. Simmonds M.J. i Gough S.C. Genetic insights into disease mechanisms of autoimmunity. Br Med Bull. 2005; 71:93-113.
136. Skorka A., Bednarczuk T., Bar-Andziak E., Nauman J., Ploski R. Lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22/LYP) variant and Graves' disease in a Polish population: association and gene dose-dependent correlation with age of onset. Clin Endocrinol (Oxf). 2005; 62:679-82.
137. Skrabic V., Zemunik T., Situm M., Terzic J. Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. Diabetes Res Clin Pract. 2003; 59:31-5.
138. Smyth D., Cooper J.D., Collins J.E., Heward J.M., Franklyn J.A., Howson J.M., Vella A., Nutland S., Rance H.E., Maier L., Barratt B.J., Guja C., Ionescu-Tirgoviste C., Savage D.A., Dunger D.B., Widmer B., Strachan D.P., Ring S.M., Walker N., Clayton D.G., Twells R.C., Gough S.C., Todd J.A. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. Diabetes. 2004; 53:3020-3
139. Staeva-Vieira T.P., Freedman L.P.1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4+ T cells. J Immunol. 2002; 168:1181-9.
140. St-Arnaud R., Glorieux F.H. 24,25-Dihydroxyvitamin D-active metabolite or inactive

http://rcin.org.pl

catabolite? Endocrinology. 1998; 139:3371-4.
141. Stefanic M., Karner I., Glavas-Obrovac L., Papic S., Vrdoljak D., Levak G., Krstonosic B. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with susceptibility to Graves' disease in Eastern Croatian population: case-control study. Croat Med J. 2005; 46:639-46.
142. Stephens M., Smith N.J., Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. Am J Hum Genet. 2001; 68:978-89.
143. Stram D.O. Tag SNP selection for association studies. Genet Epidemiol. 2004; 27:365-74.
144. Tajouri L., Ovcaric M., Curtain R., Johnson M.P., Griffiths L.R., Csurhes P., Pender M.P., Lea R.A. Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population. J Neurogenet. 2005; 19:25-38.
145. Takahashi H., Ibe M., Kinouchi M., Ishida-Yamamoto A., Hashimoto Y., Iizuka H. Similarly potent action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues, tacalcitol, calcipotriol, and maxacalcitol on normal human keratinocyte proliferation and differentiation. J Dermatol Sci. 2003; 31:21-8.
146. Takeuchi A., Reddy G.S., Kobayashi T., Okano T., Park J., Sharma S. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. J Immunol. 1998; 160:209-18.
147. Taverna M.J., Sola A., Guyot-Argenton C., Pacher N., Bruzzo F., Slama G., Reach G., Selam J.L. Taq I polymorphism of the vitamin D receptor and risk of severe diabetic retinopathy. Diabetologia. 2002; 45: 436-42.
148. Taylor J.C., Gough S.C., Hunt P.J., Brix T.H., Chatterjee K., Connell J.M., Franklyn J.A., Hegedus L., Robinson B.G., Wiersinga W.M., Wass J.A., Zabaneh D., Mackay I., Weetman A.P. A Genome-wide Screen in 1119 Relative Pairs with Autoimmune Thyroid Disease. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91: 646-53.
149. Tokita A., Matsumoto H., Morrison N.A., Tawa T., Miura Y., Fukamauchi K., Mitsuhashi N., Irimoto M., Yamamori S., Miura M., Watanabe T., Kuwabara Y., Yabuta K., Eisman J.A. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. J Bone Miner Res. 1996; 11:1003-9.
150. Tokuda N., Mano T., Levy R.B.1,25-Dihydroxyvitamin D3 antagonizes interferon-gamma-induced expression of class II major histocompatibility antigens on thyroid follicular and testicular Leydig cells. Endocrinology. 1990; 127:1419-27.
151. Tomer Y, Davies TF. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. Endocr Rev. 2003; 24:694-717.
152. Tomer Y., Barbesino G., Greenberg D.A., Concepcion E., Davies T.F. Mapping the major susceptibility loci for familial Graves' and Hashimoto's diseases: evidence for genetic heterogeneity and gene interactions. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84:4656-64.
153. Tomer Y., Concepcion E., Greenberg D.A. A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. Thyroid. 2002; 12:1129-35.
154. Tomer Y., Greenberg D.A., Concepcion E., Ban Y., Davies T.F. Thyroglobulin is a thyroid specific gene for the familial autoimmune thyroid diseases. J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87:404-7.
155. Towers T.L., Staeva T.P., Freedman L.P. A two-hit mechanism for vitamin D3-mediated transcriptional repression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene: vitamin D receptor competes for DNA binding with NFAT1 and stabilizes c-Jun. Mol Cell Biol. 1999;19:4191-9.
156. Turpeinen H., Hermann R., Vaara S., Laine A.P., Simell O., Knip M., Veijola R., Ilonen J. Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in the Finnish population. Eur J Endocrinol. 2003; 149:591-6.
157. Ueda H., Howson J.M., Esposito L., Heward J., Snook H., Chamberlain G., Rainbow D.B., Hunter K.M., Smith A.N., Di Genova G., Herr M.H., Dahlman I., Payne F., Smyth D., Lowe

http://rcin.org.pl

C., Twells R.C., Howlett S., Healy B., Nutland S., Rance H.E., Everett V., Smink L.J., Lam A.C., Cordell H.J., Walker N.M., Bordin C., Hulme J., Motzo C., Cucca F., Hess J.F., Metzker M.L., Rogers J., Gregory S., Allahabadia A., Nithiyananthan R., Tuomilehto-Wolf E., Tuomilehto J., Bingley P., Gillespie K.M., Undlien D.E., Ronningen K.S., Guja C., Ionescu-Tirgoviste C., Savage D.A., Maxwell A.P., Carson D.J., Patterson C.C., Franklyn J.A., Clayton D.G., Peterson L.B., Wicker L.S., Todd J.A., Gough S.C. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. Nature. 2003; 423:506-11.

158. Uitterlinden A.G., Fang Y., Van Meurs J.B., Pols H.A., Van Leeuwen J.P. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. Gene. 2004; 338:143-56.
159. Vaidya B., Kendall-Taylor P., Pearce S.H. The genetics of autoimmune thyroid disease. J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87:5385-97.
160. Velaga M.R., Wilson V., Jennings C.E., Owen C.J., Herington S., Donaldson P.T., Ball S.G., James R.A., Quinton R., Perros P., Pearce S.H. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89:5862-5.
161. Villanueva R., Tomer Y., Greenberg D.A., Mao C., Concepcion E.S., Tucci S., Estilo G., Davies T.F. Autoimmune thyroid disease susceptibility loci in a large Chinese family. Clin Endocrinol (Oxf). 2002; 56:45-51.
162. Walters M.R. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. Endocr Rev. 1992; 13:719-64.
163. Weetman A.P. Graves' disease. N Engl J Med. 2000; 343:1236-48.
164. White P., Cooke N. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. Trends Endocrinol Metab. 2000; 11:320-7.
165. Willheim M., Thien R., Schrattbauer K., Bajna E., Holub M., Gruber R., Baier K., Pietschmann P., Reinisch W., Scheiner O., Peterlik M. Regulatory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84:3739-44.
166. Woolf B. On estimating the relationship between blood group and disease. Ann Hum Genet. 1955; 19:251-253.
167. Wuthrich R., Rieder H.P. The seasonal incidence of multiple sclerosis in Switzerland. Eur Neurol. 1970; 3:257-64.
168. Yamamoto H., Miyamoto K., Li B., Taketani Y., Kitano M., Inoue Y., Morita K., Pike J.W., Takeda E. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. J Bone Miner Res. 1999; 14:240-7.
169. Yanagawa T., Taniyama M., Enomoto S., Gomi K., Maruyama H., Ban Y., Saruta T. CTLA4 gene polymorphism confers susceptibility to Graves' disease in Japanese. Thyroid. 1997; 7:843-6.
170. Ye W.Z., Dubois-Laforgue D., Bellanne-Chantelot C., Timsit J., Velho G. Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) and risk of type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. Metabolism. 2001; 50:366-9.
171. Zhu J.W., Field S.J., Gore L., Thompson M., Yang H., Fujiwara Y., Cardiff R.D., Greenberg M., Orkin S.H, DeGregori J. E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. Mol Cell Biol. 2001; 21:8547-64.

http://rcin.org.pl