Raznovrsnost alela lokusa STR_MICA među bolesnicima sa šećernom bolesti tipa 1 i autoimunom bolesti štitnjače

Bošnjak, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:420966

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Marina Bošnjak

Raznovrsnost alela lokusa STR_MICA među bolesnicima sa šećernom bolesti tipa 1 i autoimunom bolesti štitnjače

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad, izrađen na Odjelu za tipizaciju tkiva Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod vodstvom prof. dr. sc. Zorane Grubić, dipl. ing. biol., predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

Zahvale

Veliku zahvalnost dugujem mentorici prof. dr. sc. Zorani Grubić, znanstvenoj suradnici, na njezinom vodstvu, korisnim savjetima i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Nadalje, želim se zahvaliti doc. dr. sc. Ani Galov na njezinoj susretljivosti, što je pristala biti su-voditeljica ovog rada.

Veliko hvala i Mariji Maskalan, mag. biol. mol., koja me je vodila tijekom eksperimentalnog dijela diplomskog rada te mi pomogla u analizi rezultata na svoj pomoći, strpljenju i korisnim savjetima.

Željela bih se zahvaliti i svojim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene te su svojim prisustvom razdoblje studiranja učinili zabavnim i nezaboravnim.

Na kraju, najveću zahvalnost za svoja postignuća pripisujem svojoj majci i djedu na njihovoj bezuvjetnoj podršci, strpljenju, razumijevanju i ljubavi.

Veliko Hvala svima!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Raznovrsnost alela lokusa STR_MICA među bolesnicima sa šećernom bolesti tipa 1 i autoimunom bolesti štitnjače

Marina Bošnjak

Roseveltov trg 6,10 000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog rada bio je istražiti raspodjelu alela STR_MICA među bolesnicima sa šećernom bolesti tipa 1 (DMT1), autoimunim poliglandularnim sindromom tipa 3(APS3v) i autoimunom bolesti štitnjače (AITD) te utvrditi je li učestalost pojedinih alela STR_MICA ovisna o genima HLA-DRB1 ili je rezultat neravnoteže udruživanja između alela STR_MICA i gena HLA. U istraživanje je bilo uključeno 290 nesrodnih bolesnika (DMT1-86, APS3v-63 i AITD-141) koji su uspoređeni s kontrolnim ispitanicima (N=86) odgovarajućeg spola i dobi. Svim ispitanicima uzeto je 5 ml periferne krvi s EDTA iz koje je izolirana DNA. Uzorci su testirani za alele STR_MICA lančanom reakcijom polimeraze (PCR-STR) i potom analizirani elektroforezom na 6% poliakrilamidnom gelu u aparatu za automatsko određivanje dužine fragmenta DNA. Svim ispitanicama prethodno su određeni geni lokusa HLA-DRB1 metodm PCR-SSO (Sequence Specific Oligos). Najčešće zastupljeni aleli STR_MICA među istraživanim skupinama bolesnika bili su: DMT1-STR_MICA-A6 (33,7%), APS3v-STR_MICA-A5.1 (31,8%) i AITD-STR_MICA-A5.1 i STR_MICA-A6 (26,2%). Značajnu razliku u učestalosti alela STR_MICA između bolesnika i kontrole pokazao je samo alel STR_MICA-A5 među AITD bolesnicima (12,0 vs. 6,4%; p=0,05). Geni HLA-DRB1*04 i HLA-DRB1*03 su statistički značajno češće zastupljeni među bolesnicima s DMT1 i APS3V-om, a samo gen HLA-DRB1*04 među bolesnicima AITD-om. Raspodjela alela STR_MICA u istraživanim bolestima ovisna je o genima HLA-DRB1.

(60 stranica, 19 slika, 10 tablica, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: autoimune bolesti, DMT1, APS3v, AITD, HLA-DRB1, STR_MICA

Voditelj: dr. sc. Zorana Grubić, izv. prof., Odjel za tipizaciju tkiva, Klinički bolnički centar Zagreb

Suvoditelj: dr. sc. Ana Galov, izv. prof., Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Ocjenitelji: dr. sc. Ana Galov, izv. prof.

dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof.

dr. sc. Zlatko Liber, prof.

Rad prihvaćen: 16. 02. 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

The diversity of STR_MICA alleles among patients with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease

Marina Bošnjak

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

The aim of the present study was to investigate the polymorphism of STR_MICA alleles among patients with type 1 diabetes (DMT1), autoimmune polyglandular syndrome type 3 (APS3v) and autoimmune thyroid diseases (AITD), and to determine whether the association between STR_MICA alleles and these diseases is independent or result of linkage disequilibrium with HLA-DRB1 genes. Two hundred and ninety unrelated patients were included (DMT1-86, APS3v-63, and AITD-141). Eighty-six unrelated healthy matched individuals served as control. All samples were tested by polymerase chain reaction (PCR) and ran on 6% polyacrylamide gel in an automated machine for determination of length of alleles, while DRB1 genes were typed by PCR-SSO (Sequence Specific Oligos) method. The most frequent STR_MICA alleles were as follows: DMT1-STR_MICA-A6 (33.7%), APS3v-STR_MICA-A5.1 (31.8%), and AITD-STR_MICA-A5.1 and STR_MICA-A6 (26.2%, each). Only STR_MICA-A5 allele showed significant difference (p=0.05) between AITD patients and controls (12.0 vs. 6.4%). HLA-DRB1*04 and HLA-DRB1*03 genes were significantly more present among DMT1 patients and APS3V patients, while among AITD patients only HLA-DRB1*04 gene reached significant p value. The distribution of STR_MICA alleles in investigated diseases is result of linkage disequilibrium with HLA-DRB1 genes.

(60 pages, 19 pictures, 10 tables, 57 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: autoimmune disease, DMT1, APS3v, AITD, HLA-DRB1, STR_MICA

Supervisor: dr. sc. Zorana Grubić, Assoc. Prof., Tissue Typing Centre, University Hospital Centre Zagreb

Co-supervisor: dr. sc. Ana Galov, Assoc. Prof., Faculty of science, Zagreb

Reviewers: dr. sc. Ana Galov, Assoc. Prof.

dr. sc. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

dr. sc. Zlatko Liber, Prof.

Thesis accepted: 16 February 2017

SADRŽAJ

1. **UVOD** 1

1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE PODUDARNOSTI 2

1.1.1. Povijest i definicija sustava HLA 2

1.1.2. Važnost sustava HLA 3

1.1.3. Neravnoteža udruživanja (LD) 3

1.1.4. Geni i molekule HLA 4

1.1.4.1. Regija HLA razreda I 6

1.1.4.2. Regija HLA razreda II 7

1.1.5. Građa i funkcija molekula HLA razreda I 9

1.1.6. Građa i funkcija molekula HLA razreda II 9

1.1.7. Povezanost gena HLA i bolesti 10

1.2. GENI MIC 12

1.2.1. Građa, funkcija i polimorfizam gena MIC 12

1.2.2. Gen MICA 13

1.2.3. Povezanost gena MIC i bolesti 16

1.3. AUTOIMUNE BOLESTI 17

1.3.1. Autoimune bolesti štitnjače 17

1.3.2. Šećerna bolest tipa 1 18

1.3.3. Autoimuni poliglandularni sindrom 20

2. **CILJEVI ISTRAŽIVANJA** 21

3. **MATERIJAL I METODE** 23

3.1. MATERIJAL 24

3.2. METODE 25

3.2.1. Izolacija DNA 25

3.2.2. Umnažanje alela lokusa STR_MICA 26

3.2.3. Elektroforeza 27

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 29

4. **REZULTATI** 30

4.1. RASPODJELA ALELA STR_MICA MEĐU BOLESNICIMA S DMT1, APS3v, AITD I U KONTROLNOJ SKUPINI 31

4.2. RASPODJELA GENA HLA-DRB1 MEĐU BOLESNICIMA S DMT1, APS3v, AITD I U KONTROLNOJ SKUPINI 35

4.3. RASPODJELA ALELA STR_MICA MEĐU BOLESNICIMA S DMT1, APS3v, AITD S OBZIROM NA PRISUSTVO/ODSUSTVO GENA HLA-DRB1*03 I HLA-DRB1*04 40

5. **RASPRAVA** 44

6. **ZAKLJUČCI** 48

7. **LITERATURA** 50

8. **ŽIVOTOPIS** 57

POPIS KRATICA

AITD	engl. *Autoimmune Thyroid Disease*
APS3v	engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3*
DMT1	engl. *Diabetes Melitus Type 1*
GB	Gravesova bolest
HLA	engl. *Human Leukocyte Antigen*
LD	engl. *Linkage Disequilibrium*
MIC	engl. *MHC class I chain-related genes*
MHC	engl. *Major Histocompatibility Complex*
MS	engl. *Multiple Sclerosis*
PCR	engl. *Polymerase Chain Reaction*

1. UVOD

1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE PODUDARNOSTI

1.1.1. Povijest i definicija sustava HLA

Temeljna uloga imunosnog sustava je očuvanje biološke cjelovitosti jedinke osiguravanjem visokospecifičnog odgovora na strane antigene. Za kontrolu i regulaciju ovako složenog zadatka odgovoran je visokospecijaliziran genski sustav koji osigurava gensku raznolikost svih organa i tkiva svake pojedine jedinke, kako bi se ona mogla učinkovito obraniti od prodora stranih antigena u organizam. Sustav je otkriven u svih viših organizama (ribe, gmazovi, ptice, sisavci) i naziva se glavnim sustavom tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex,* MHC) (Žunec i sur., 2011).

Pedesetih godina prošlog stoljeća francuski imunolog i nobelovac, Jean Dausset, otkrio je prvi humani leukocitni antigen (engl. *Human Leucocyte Antigen,* HLA) te ga je nazvao MAC (kasnije poznat kao HLA-A2). Stoga je kod ljudi sustav MHC nazvan sustav HLA. Godine 1980. znanstvenici J. Dausset, G. D. Sneel i B. Benacerrafu dobili su Nobelovu nagradu za svoja otkrića (Thorsby, 2009). Van Rood 1963. godine otkrio je dvije skupine antigena, međusobno isključivih, za koje je tvrdio da pripadaju istom genskom sustavu, a kasnije je taj sustav nazvao „Sustav 4“ (engl. *Sustav four*). Sljedeće godine, Payne i suradnici otkrili su sličan sustav leukocitnih antigena (engl. *Leucocyte antigens,* LA). Daljnja istraživanja pokazala su da se radi o dva različita, usko povezana lokusa, koji pripadaju istom genskom sustavu HL-A, koji je kasnije nazvan sustav HLA. Dva prvootkrivena lokusa dobila su novo nazivlje: lokus HLA-A i HLA-B, a novootkriveni antigeni pojedinog lokusa označavani su brojevima (npr. HLA-A1, -A2 ili HLA-B5, -B7) (Thorsby, 2009).

Sustav HLA najintenzivnije je istraživani genski sustav u čovjeka tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, a u projektu mapiranja ljudskoga genoma, upravo je ova kromosomska regija bila prva u potpunosti sekvencirana (Žunec i sur., 2011).

1.1.2. Važnost sustava HLA

Istraživanja sustava HLA pokazala su dvije vrlo važne značajke. Prvo, geni HLA izrazito su polimorfni i njihovi genski produkti dolaze u velikom broju različitih oblika. Drugo, funkcija molekula HLA je predočavanje tuđih antigena T-limfocitima, odnosno imunoregulacija.

Geni HLA imaju praktičnu važnost u presađivanju tkiva i organa, povezanosti s nastankom određenih bolesti, antropološkim istraživanjima, kod identifikacije osoba, ali i kod isključivanja očinstva.

Uspjeh presađivanja tkiva i organa u kliničkoj praksi najčešće odgovara stupnju podudarnosti HLA primatelja i davatelja presatka te je određivanje njihovih tkivnih antigena (antigena HLA) preduvjet uspješnoj transplantaciji (Andreis i sur., 2010).

U nekim bolestima može se povezati postojanje određenog alela HLA s pojavom određene bolesti te je moguće izračunati koliki je relativni rizik (RR) da nositelj određenog alela HLA, u usporedbi s osobom koja taj alel HLA nema, razvije bolest o kojoj je riječ. Upravo ta spoznaja ima veliku dijagnostičku i prognostičku važnost za veliki broj bolesti autoimune prirode (Farid, 2000).

1.1.3. Neravnoteža udruživanja (LD)

Učestalost alela pojedinih gena HLA u različitim populacijama širom svijeta pokazala je razlike tako da se neki aleli HLA mogu smatrati karakterističnim za određenu populaciju ili etničku skupinu, dok su u drugoj prisutni s vrlo malom učestalošću ili ih uopće nema. S druge strane, brojni aleli HLA prisutni su u velikom broju populacija.

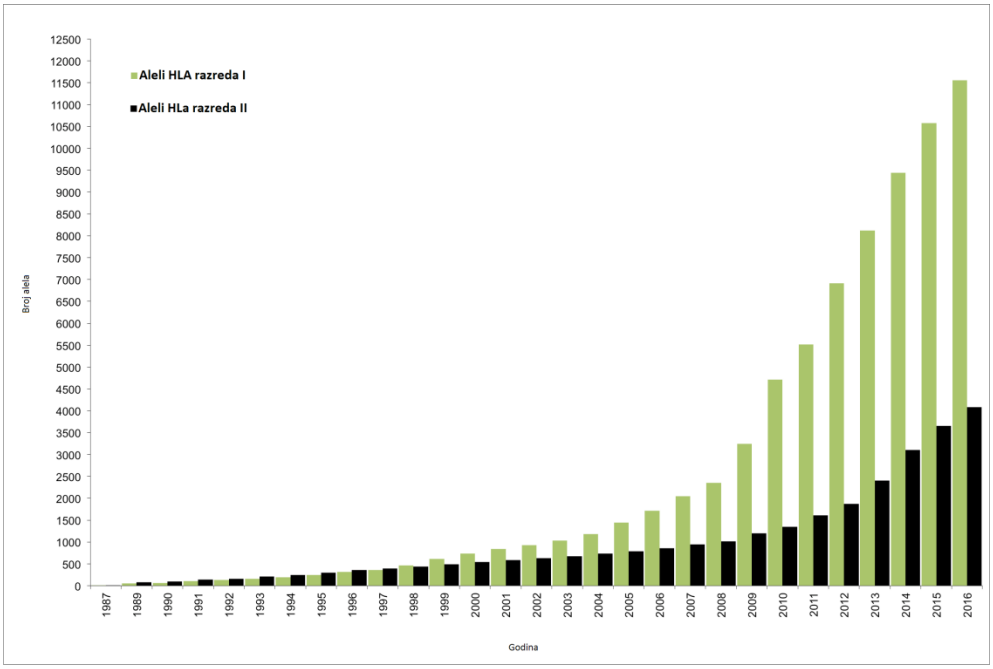
Usprkos velikom broju mogućih kombinacija poznato je da se pojedini aleli HLA u zajedničkom haplotipu HLA javljaju češće nego što je za očekivati na osnovi njihovih pojedinačnih učestalosti. Ta se pojava naziva neravnotežom udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*, LD). Neravnoteža udruživanja rezultat je niske učestalosti rekombinacija između određenih lokusa HLA, a koji su smješteni vrlo blizu na kromosomu 6. Tako je npr. vrlo jak LD između alela HLA-DRB1 i HLA-DQB1, HLA-DQA1 i HLA-DQB1. Unutar

određenih populacija povezanost određenih alela može biti gotovo potpuna što znači da gotovo uvijek dolaze u zajedničkom haplotipu (Thorsby, 2009).

1.1.4. Geni i molekule HLA

Sustav HLA mapiran je na p21.3 kraćem kraku kromosoma 6 (6p21.3) gdje zauzima područje od 4 milijuna parova baza što čini približno 1% humanoga genoma (Žunec i sur., 2011). Unutar regije HLA nalazi se otprilike 225 gena. Od tog broja 57%, odnosno 128 gena ima ekspresiju, a 40% tih gena ima imunoregulatornu ulogu (Lahita i sur., 2011). Kromosom 6 je multicentrični kromosom koji čini 6% ljudskog genoma. Većina onoga što se danas zna o genetičkim varijacijama i organizaciji haplotipova otkriveno je upravo proučavanjem regije HLA (Mungall i sur., 2003).

Do danas je otkriveno preko 15 000 alela HLA (elektronski izvor br. 2) (Slika 1), pri čemu približno ¾ otpada na alele HLA razreda I (Tablica 1). Jedno od objašnjenja za ovaj veliki polimorfizam može biti da se sustav HLA razvijao brže od ostalih genskih sustava ili je pak posljedica prirodne selekcije temeljene na stvaranju alela HLA koji stvaraju preduvjet za otpornost na različite uzročnike bolesti. Posljedica velikog polimorfizma je sposobnost prepoznavanja bilo kojeg antigena koji se može pojaviti u organizmu. Nastajanje novih alela HLA može biti posljedica konverzije gena (zamjena alela različitih, ali homolognih lokusa), točkastih mutacija (zamjena jednog nukleotida unutar pojedinog alela) i rekombinacije između alela (Thorsby, 2009).



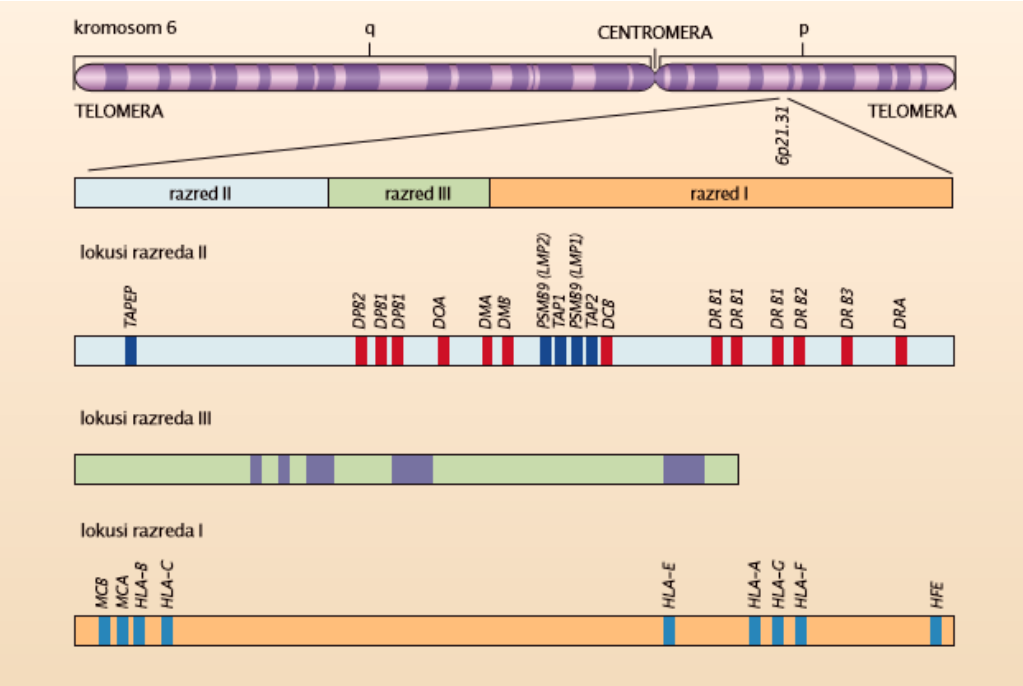
Slika 1. Broj novootkrivenih alela HLA razreda I i II od 1987. do kraja rujna 2016. godine (http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html).

Tablica 1. Broj poznatih alela na lokusima HLA (2017) (http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html).

HLA RAZRED I		**HLA RAZRED II**			
Lokus	**Broj alela**	**Lokus**	**Broj alela**	**Lokus**	**Broj alela**
A	3657	**DRA**	7	**DQA1**	76
B	4459	**DRB1**	1977	**DQB1**	978
C	3290	**DRB2**	1	**DPA1**	44
E	23	**DRB3**	127	**DPB1**	716
F	22	**DRB4**	53	**DMA**	7
G	53	**DRB5**	43	**DMB**	13
		DRB6	3	**DOA**	12
		DRB7	2	**DOB**	13
		DRB8	1		
		DRB9	1		
Ukupno: 11504		**Ukupno: 4074**			
Sveukupno alela HLA (razred I + razred II): 15578					

Kombinacija alelnih oblika gena HLA na jednome kromosomu zove se haplotip HLA. Po jedan haplotip HLA nasljeđuje se od svakog roditelja i izražava se kodominantno na staničnoj membrani (Andreis i sur., 2010). Sa stajališta imunosne reakcije najvažniji produkti glavnoga sustava tkivne podudarnosti su antigeni (molekule) HLA razreda I (HLA-A, HLA-B i HLA-C) te antigeni HLA razreda II (HLA-DR, HLA-DP i HLA-DQ). I jedni i drugi sudjeluju u predočivanju antigena T-staničnim receptorima, ali s temeljnom razlikom u načinu njihova djelovanja (Žunec i sur., 2011).

Sustav HLA organiziran je u tri osnovne genske regije (Slika 2) (Klein i Sato, 2000).

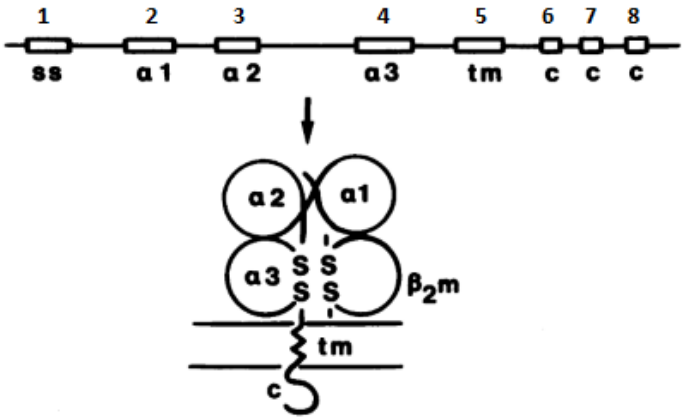


Slika 2. Genska karta sustava HLA (Klein i Sato, 2000).

1.1.4.1. Regija HLA razreda I

Regija gena razreda I, smještena na telomeričnom kraju, sadržava klasične gene HLA-A, HLA-B i HLA-C koji kodiraju molekule HLA-A, HLA-B i HLA-C (Žunec i sur., 2011). Osim njih u ovom području nalaze se i neklasični geni HLA razreda I (HLA-E, HLA-F i HLA-G) koji imaju manji stupanj raznolikosti te pseudogeni (HLA-H, HLA-J, HLA-K i HLA-L) čiji proteinski produkti ili nisu poznati ili nisu do kraja razjašnjeni (Mehra, 2010).

Geni HLA razreda I sastoje se od 8 egzona koji kodiraju teški lanac molekula HLA razreda I (Slika 3). Egzon 1 kodira vodeći peptid, egzon 2 kodira domenu α1, egzon 3 kodira domenu α2, a egzon 4 kodira domenu α3 koja se nalazi u izvanstaničnom prostoru. Egzon 5 kodira transmembransku regiju, a egzoni 6 i 7 kodiraju citoplazmatsku regiju. Završni dio molekule, netranslatirajući 3' kraj kodira egzon 8. Najpolimorfniji dio molekule HLA razreda I kodiraju egzoni 2 i 3. Egzoni gena HLA razreda I sastoje se od 1089-1101 nukleotida, a teški lanci sastavljeni su od 362-366 aminokiselina. U regiji HLA razreda I nalazi se i porodica gena MIC (engl. *MHC class I-related chain*).



Slika 3. Organizacija gena i građa molekule HLA razreda I (Bodmer, 1987).

1.1.4.2. Regija HLA razreda II

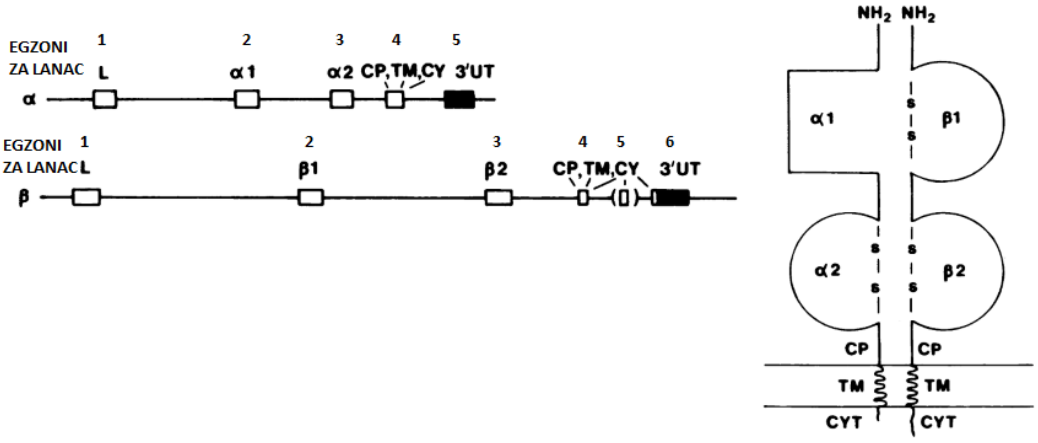
Unutar regije HLA razreda II nalazi se 6 podregija, klasične HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR te neklasične HLA-DM, HLA-DO i HLA-DN. Samo se produkti klasičnih gena HLA razreda II ispoljavaju na površini stanica.

Podpodručje gena HLA-DP sadrži po dva para gena A i B (DPA1-DPB1 i par DPA2-DPB2 te gen DPB3) od kojih su geni DPA1 i DPB1 funkcionalni, dok su ostali geni ovog podpodručja nefunkcionalni.

Podpodručje gena HLA-DQ sadrži funkcionalne gene DQA1 i DQB1 te pseudogene DQA2, DQB2 i DQB3. Jedna od glavnih značajki gena HLA-DQ je jaka neravnoteža udruživanja s genima HLA-DR (Thorsby, 2009).

Podpodručje gena HLA-DR složeno je zbog velikog broja usko vezanih gena koji čine stabilne haplotipske skupine. Svaka haplotipska skupina sadrži jedan aktivni par gena (HLA-DRA1 i HLA-DRB1), može biti prisutan još neki od aktivnih gena DRB (DRB3 ili DRB4 ili DRB5) kao i jedan ili više pseudogena (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8, DRB9). Gen HLA-DRB1 odlikuje se velikom raznolikošću, s više od 1000 različitih alela (http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html).

Geni HLA razreda II građeni su od 5 egzona za lanac α i 6 egzona za lanac β (Slika 4). U lancu α, egzon 1 kodira početnu sekvencu peptida, egzon 2 kodira domenu α1, egzon 3 domenu α2, egzon 4 transmembranski i citoplazmatski dio, a egzon 5 je odgovoran za kodiranje 3' netranslatirajuće regije lanca α. U lancu β, egzon 1 kodira početnu sekvencu peptida, egzon 2 kodira domenu β1, egzon 3 domenu β2, egzon 4 transmembranski dio, egzon 5 citoplazmatski dio, dok je egzon 6 odgovoran za kodiranje 3' netranslatirajuće regije lanca β (Thorsby, 2009).



Slika 4. Organizacija gena i građa molekule HLA razreda II (Bodmer, 1987)

1.1.5. Građa i funkcija molekula HLA razreda I

Molekule HLA razreda I heterodimerni su membranski glikoproteini građeni od teškog lanca α (~45kDa) koji je usidren u membranu stanice te od lakog lanca β2-mikroglobulina (12kDa) (Marsh i sur., 2000). Laki lanac nije kodiran genima HLA, nego genom na kromosomu 15 i ne prolazi kroz staničnu membranu. (Grgičević i sur., 2006).

Molekule HLA razreda I predočuju unutarstanične antigene (npr. tumorske i virusne peptide) CD8+ citotoksičnim T-limfocitima. Prisutne su na gotovo svim stanicama s jezgrom, s iznimkom endotela rožnice, egzokrinog dijela gušterače i neurona središnjeg živčanog sustava (Žunec i sur., 2011).

1.1.6. Građa i funkcija molekula HLA razreda II

Molekula HLA razreda II građena je od težeg i lakšeg lanca koji su međusobno povezani nekovalentnim vezama. Oba su lanca slične građe i prolaze kroz staničnu membranu. Teži lanac, lanac α (33-35kDa), kodiran je A genima HLA razreda II, a lakši lanac, lanac β (26-28kDa), kodiran je B genima HLA razreda II (Grgičević i sur., 2006).

Molekule HLA razreda II predočuju izvanstanične antigene (npr. bakterijske peptide) CD4+ pomoćnićkim T-limfocitima, koji pak potiču produkciju odgovarajućih protutijela upravljenih protiv izvanstaničnog antigena. Prisutne su na površini stanica koje predočuju antigen, a to su makrofagi, monociti, limfociti B i dendritične stanice. Međutim, ekspresija molekula HLA razreda II, uz pomoć nekih agensa kao što je npr. γ-interferon, može biti inducirana i na površini fibroblasta i epitelnih stanica timusa (Žunec i sur., 2011).

1.1.7. Povezanost gena HLA i bolesti

Istraživanje povezanosti gena HLA i bolesti započelo je nakon standardizacije seroloških tehnika za određivanje antigena HLA razreda I. Godine 1967. dokazana je povećana koncentracija antigena HLA-B kod pacijenata s Hodgkinovim limfomom. Od tada nekoliko stotina autoimunih i infektivnih bolesti pokazalo je jaču ili slabju povezanost s genima HLA (Shiina i sur., 2009). Nagli razvoj na ovom području dogodio se 1973. godine kada je otkrivena povezanost između antigena HLA-B27 i ankilozantnog spondilitisa (Grough i Simmonds, 2007). Treba istaknuti da je 2009. godine predstavljena lista od čak 109 bolesti koje su povezani s genima HLA (Shiina i sur., 2009). Uglavnom je riječ o bolestima autoimune prirode kao što su šećerna bolest tipa 1, reumatoidni artritis, sistemski lupus eritematodes, multipla skleroza, mijastenija gravis, autoimune bolesti štitnjače, narkolepsija, psorijaza, ali i mnoge druge (Marsh i sur., 2000) (Tablica 2).

Kod bolesnika s reumatoidnim artritisom dokazana je povezanost reumatoidnog faktora (RF) i antitijela na cikličke citrulinirane peptide (CCP) s genom HLA-DRB1*04 (Rose i Mackay, 2014). Reaktivni artritis javlja se s većom učestalošću kod osoba koje imaju gen HLA-B*27 ili gen HLA-B*07. Kod šećerne bolesti tipa 1 (engl. *Diabetes Melitus Type 1*, DMT1) aleli HLA-DR i HLA-DQ imaju podložnu/zaštitnu ulogu u nastanku bolesti. U istraživanju iz 2014. godine zaključeno je da aleli HLA-DQA1*05:01 i HLA-DQB1*03:02 pokazuju najveći rizik za nastanak DMT1 (Rose i Mackay, 2014). Također je poznato da više od 95% oboljelih od celijakije posjeduje haplotip HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 (Starčević Čizmarević, 2015). Istraživanja poezanosti psorijaze i gena HLA otkrila su da je rizični alel za nastanak bolesti HLA-C*06:02 (Žunec, 2008). Rezultati istraživanja o raspodjeli gena HLA među bolesnicima s multiplom sklerozom (engl. *Multiple Sclerosis*, MS) pokazala su da alel HLA-A*02:01 ima zaštitnu ulogu, dok alel HLA-A*03:01 ima podložnu ulogu za nastanak MS (Gough i Simmonds, 2007). Veliki broj studija istraživao je povezanost gena HLA i sistemskog lupusa eritematodesa (SLE) i utvrdio postojanje tri rizična haplotipa (DRB1*15:01-DQB1*06:02, DRB1*03:01-DQB1*02:01 i DRB1*08:01-DQB1*04:02) koja povećavaju rizik za nastanak SLE. S druge strane, među bolesnicima s kronovom bolesti utvrđeni rizični aleli za nastanak bolesti su HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*01:03, HLA-DRB1*04 i HLA-DRB3*03:01 (Fernando i sur., 2008). Narkolepsija je također povezana s alelom HLA-DQB1*06:02 i to je jedna od najjačih povezanosti neke bolesti s genima HLA

(Oksenberg i Brassat, 2006). U tablici 2 prikazane su neke od bolesti povezanih s genima HLA.

Tablica 2. Bolesti povezane s HLA sustavom (Gough i Simmonds, 2007).

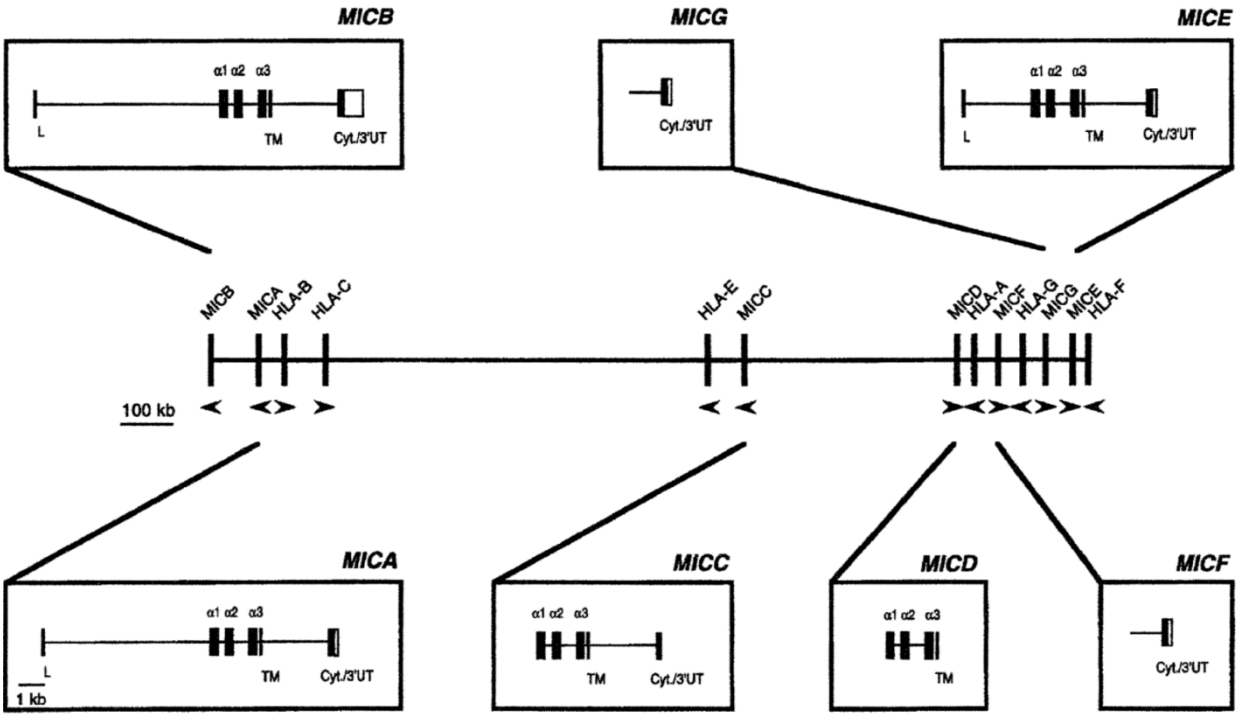
Utjecaj HLA razreda II		**AUTOIMUNA BOLEST**	**Utjecaj HLA razreda I**	
podložni	**zaštitni**		**Podložni**	**Zaštitni**
		Ankilozantni spondilitis	B*27:02 B*27:30 B*27:04 B*27:05	B*27:06 B*27:09
DR3 DRB1*08	DR7	**Gravesova bolest**	C*07 B*08	C*16 C*03 B*44
DR4 DR3	DR7	**Hashimotov tiroiditis**		
DR3		**Mijastenija gravis**		
DR3		**Addisonova bolest**		
Zajednički epitopi = DRB1*01:01 DRB1*01:02 DRB1*04:01 DRB1*04:04 DRB1*04:05 DRB1*04:08 DRB1*10:01 DRB1*14:02	DRB1*01:03 DRB1*07:01 DRB1*12:01 DRB1*13:01 DRB1*15:01	**Reumatoidni artritis**		
DQ2 DQ8		**Celijakija**		
DR15	DR14	**Multipla skleroza**	C*05 C*15	C*01
DR3 DR4 DQB1 pozicija β57	DR15 DR14	**Šećerna bolest tipa 1 (DMT1)**	B*39 B*18 A*24	A*01 A*11 A*31
DR3 DR8 DR15		**Sistemski lupus eritematodes**		

Legenda: DR3 = DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02, DR4 = DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02, DR7 = DRB1*07-DQA1*02-DQB1*02, DR14 = DRB1*14-DQA1*01:02-DQB1*06, DR15 = DRB1*15-DQA1*01-DQB1*06, DQ8 = DQB1*03:02, DQ2 = DQB1*02:01, DMT1 – engl. *Diabetes Melitus Type 1*.

1.2. GENI MIC

1.2.1. Građa, funkcija i polimorfizam gena MIC

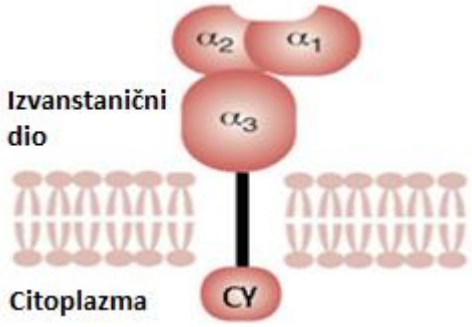
Geni MIC (engl. *MHC Class I-chain related genes*) prvi su put opisani 1994. godine kao geni pridruženi genima HLA razreda I. Poznato je da postoji 7 gena MIC, od kojih je 5 pseudogena (MICC, MICD, MICE, MICF i MICG), dok su MICA i MICB funkcionalni geni. Gen MICA veličine je 11,7 kilobaza (kb), a nalazi se 46 kb centromerno od gena HLA-B (Grubić i sur., 2006), dok je gen MICB veličine 12,9 kb, a nalazi se 141,2 kb centromerno od gena HLA-B (Veskler, 2005). Gen MICC nalazi se 70 kb telomerno od gena HLA-E, gen MICD nalazi se 28 kb centromerno od gena HLA-A, geni MICE i MICG nalaze se između gena HLA-G i –F, a gen MICF nalazi se 24 kb centromerno do HLA-G (Slika 5) (Dixon, 2001).



Slika 5. Smještaj gena MIC i njihova građa (Dixon, 2001).

Ekspresija gena MIC ograničena je na gastrointestinalni epitel, a budući da do njihove ekspresije dolazi i kod različitih tumora mogu imati ulogu u obrani organizma od tumora (Grubić i sur., 2006). Osim gastrointestinalnog epitela, dokazano je da fibroblasti, keratinociti, endotelne stanice i monociti također mogu eksprimirati molekule MIC (Shtauvere-Brameus i sur., 2002). Pretpostavlja se da stres inducira ekspresiju molekula MICA i MICB te da upravo ove molekule sudjeluju u imunološkom odgovoru na oštećene, inficirane ili transformirane epitelne stanice (Stephens, 2001).

Molekule MICA i MICB membranski su polipeptidi molekularne težine 43kDa, a građeni od 383 aminokiseline, slične su građe kao i molekule HLA razreda I, imaju tri odvojene ekstracelularne domene (α1, α2 i α3), transmembranski dio i citoplazmatski dio. Svaki od ovih dijelova kodira zaseban egzon (Slika 6) (Veskler, 2005). Za razliku od molekula HLA razreda I, lanac α molekula MICA i MICB nije povezan s β2-mikroglobulinom (Frigoul i Lefranc, 2005).



Slika 6. Građa molekule MICA (Chen i Gyllensten, 2014).

1.2.2. Gen MICA

Gen MICA veličine je 11,7 kilobaza (kb), a nalazi se 46 kb centromerno od gena HLA-B (Frigoul i Lefranc, 2005). Do danas je otkriveno preko 85 alela MICA (Tablica 3) (elektronski izvor 3). Gen MICA sastoji se od 6 egzona od kojih egzon 5 sadrži polimorfni mikrosatelit građen od trinukleotidne ponavljajuće sekvence (GCT) koja kodira aminokiselinu alanin (Frigoul i Lefranc, 2005). Ponavljajuća sekvenca nalazi se unutar transmembranske regije, a do danas je poznato osam alela STR_MICA: A4, A5, A5.1, A6, A7, A8, A9 i A10

(Tablica 4) (Oliveira i sur., 2008). Kod alela STR_MICA-A5.1 došlo je do insercije G nukleotida te je njegova ponavljajuća sekvenca GGCT (Veskler, 2005).

Tablica 3. Aleli MICA otkriveni do kraja rujna 2016 (http://hla.alleles.org/alleles/classo.html).

Aleli MICA				
MICA*001	MICA*009:01	MICA*023	MICA*044	MICA*065
MICA*002:01	MICA*009:02	MICA*024	MICA*045	MICA*066
MICA*002:02	MICA*010:01	MICA*025	MICA*046	MICA*067
MICA*002:03	MICA*010:02	MICA*026	MICA*047	MICA*068
MICA*002:04	MICA*011	MICA*027	MICA*048	MICA*069
MICA*004	MICA*012:01	MICA*028	MICA*049	MICA*070
MICA*005	MICA*012:02	MICA*029	MICA*050	MICA*072
MICA*006	MICA*012:03	MICA*030	MICA*051	MICA*073
MICA*007:01	MICA*012:04	MICA*031	MICA*052	MICA*074
MICA*007:02	MICA*012:05	MICA*032	MICA*053	MICA*075
MICA*007:03	MICA*013	MICA*033	MICA*054	MICA*076
MICA*007:04	MICA*014	MICA*034	MICA*055	MICA*077
MICA*007:05	MICA*015	MICA*035	MICA*056	MICA*078
MICA*007:06	MICA*016	MICA*036	MICA*057	MICA*079
MICA*007:07	MICA*017	MICA*037	MICA*058	MICA*080
MICA*008:01:01	MICA*018:01	MICA*038	MICA*059	MICA*081
MICA*008:01:02	MICA*018:02	MICA*039	MICA*060	MICA*082
MICA*008:02	MICA*019:01	MICA*040	MICA*061	MICA*083
MICA*008:03	MICA*019:02	MICA*041	MICA*062	MICA*084
MICA*008:04	MICA*020	MICA*042	MICA*063N	MICA*085
MICA*008:05	MICA*022	MICA*043	MICA*064N	MICA*086
				MICA*087

Tablica 4. Aleli STR_MICA i pripadajući aleli MICA (bp) (Frigoul i Lefranc, 2005; Oliveira i sur., 2008).

Aleli STR_MICA-	Veličina (bp)	Aleli MICA
A4	179	MICA*01, MICA*07, MICA*12, MICA*18, MICA*43, MICA*45, MICA*58, MICA*60, MICA*73
A5	182	MICA*10, MICA*16, MICA*19, MICA*27, MICA*33, MICA*48, MICA*65
A5.1	183	MICA*08, MICA*23, MICA*28, MICA*54
A6	185	MICA*04, MICA*06, MICA*09, MICA*11, MICA*26, MICA*47, MICA*49, MICA*56
A7	188	MICA*50
A8	191	MICA*55
A9	194	MICA*02, MICA*15, MICA*17, MICA*41, MICA*46
A10	197	MICA*20

Daljnjim sekvenciranjem gena MICA utvrđeno je postojanje 54 različita alela, od kojih za njih 47 pretpostavlja da kodiraju glikoproteinske molekule.

Molekule MICA nisu stalno izražene na površini stanica. Dokazano je da ekspresija molekula MIC nije pod utjecajem gena HLA već da na nju djeluju promotorni elementi proteina toplinskog šoka (engl. *Heat Shock Protein*, HSP), virusi, bakterije i oksidativni stres. Osim toga, dokazano je da ekspresija molekula MICA može biti inducirana u CD4+ i CD8+ T-limfocitima pod utjecajem fitohemaglutinina. Molekule MICA nemaju ulogu u prezentaciji antigena limfocitima. Njihova uloga je detektirati narušenu ravnotežu unutar stanica, nakon čega potiču aktivaciju stanične citotoksičnosti, sekreciju citokina i staničnu proliferaciju.

Molekula MICA djeluje i kao ligand za NKG2D receptor koji je eksprimiran na γδ T-limfocitima, CD8+28- αβ T-limfocitima, urođeno-ubilačkim stanicama (engl. *Natural Killer cells*, NK) i CD4+CD28- αβ T-limfocitima (Veskler, 2005).

.

1.2.3. Povezanost gena MIC i bolesti

Smještaj gena MICA unutar regije HLA, visoka stopa neravnoteže udruživanja alela MICA i njima strukturno bliskih alela HLA-B te polimorfizam gena MICA zajedno sa tkivno specifičnom ekspresijom molekula MICA ukazuje na mogućnost povezanosti gena MICA i autoimunih bolesti (Dixon, 2001; Park i sur., 2001). Istraživanje provedeno u Latviji među bolesnicima s DMT1 pokazalo je da je alel STR_MICA-A5 prisutan s većom učestalošću kod bolesnika u odnosu na kontrolu (Shtauvere-Brameus i sur., 2002). Alel STR_MICA-A5.1 prisutan je s većom učestalošću kod bolesnika s ulcerativnim kolitisom (Ding i sur., 2005), dok je kod bolesnika s autoimunim tiroiditisom (AT) dokazana povezanost s alelom STR_MICA-A9 (Ide i sur., 2007). Nadalje, uočena je i povezanost alela STR_MICA-A4 s psorijatičnim artritisom u hrvatskoj populaciji (Gubić i sur., 2004), kao i povezanost alela STR_MICA-A5.1 s povećanim rizikom za pojavu hepatocelularnog karcinoma (Chen i Gyllensten, 2014). Većina bolesnika s Addisonovom bolesti, njih 79%, pozitivna je za alel STR_MICA-A5.1 (Gambelunghe i sur., 1999). Istraživanje o raspodjeli alela STR_MICA među bolesnicima sa sistemskim lupus eritematodesom pokazalo je da su aleli STR_MICA-A5 i STR_MICA-A5.1 podložni za razvoj, dok je alel STR_MICA-A9 zaštitni. Ispitivanje skupine bolesnika s celijakijom pokazalo je slične rezultate kao i kod bolesnika sa sistemskim lupusom eritematodesom (Frigoul i Lefranc, 2005).

1.3. AUTOIMUNE BOLESTI

Temeljni zadatak imunosnog sustava svake jedinke je visokospecifični odgovor na strane antigene s istodobnom nereaktivnošću na vlastite antigene. Sposobnost točnog razlikovanja vlastitog od stranog odlučujuća je značajka besprijekorno djelotvornog imunosnog sustava. Ova pojava poznata je kao imunološka tolerantnost. U autoimunosnom procesu organizam na vlastite antigene reagira kao na tuđe te se prekida prirodna imunotolerancija nekih vlastitih antigena (Andreis i sur., 2010).

Poznato je da autoimune bolesti zahvaćaju oko 5-7% svjetske populacije, pri čemu je u većini slučajeva riječ o mladoj i radno sposobnoj populaciji. Stoga su jedan od glavnih medicinskih problema industrijaliziranih društava (Žunec, 2008). Danas je poznato više od 80 bolesti koje se klasificiraju kao bolesti autoimunog podrijetla, a naznaka je da će taj broj sve više rasti (Rose i Mackay, 2014).

Autoimune bolesti složene su bolesti za čiji su nastanak važni genetski čimbenici, ali i čimbenici okoliša koji utječu na dob pojavljivanja, tijek i težinu bolesti. Geni sustava HLA najvažniji su genetski faktori uključeni u razvoj većine autoimunih bolesti za koje su takva istraživanja provedena (Žunec, 2008).

1.3.1. Autoimune bolesti štitnjače

Autoimune bolesti štitnjače (engl. *Autoimmune Thyroid Disease*, AITD) najčešće su autoimune bolesti koje pogađaju ljudsku populaciju. Čak 10% populacije boluje od nekog oblika AITD-a, a bolest u većem broju pogađa žene nego muškarce (Schott i Scherbaum, 2006). Dvije glavne autoimune bolesti štitnjače su: autoimuni tiroiditis (AT) i Gravesova bolest (GB) (Rose i Mackay, 2014).

Infiltracija limfocita karakteristična za AT prvi put zabilježena je 1912. godine od strane znanstvenika Hashimota. Puno godina nakon toga Rose i Witebsky (1956.) utvrdili su da AT nastaje uslijed gubitka tolerancije na vlastite antigene. Infiltracija limfocita, plazma stanica i makrofaga u štitnjači u konačnici dovodi do apoptoze tiroidnih stanica i hipotireoze

(Rose i Mackay, 2014). Kod oboljelih od AT prisutna su antitijela protiv tiroid-specifične peroksidaze (engl. *Thyroid peroxidase*, TPO) te antitijela protiv tireoglobulina (Schott i Scherbaum, 2006).

Gravesovu bolest prvi put opisao je Caleb Parry 1825. godine, a bolest je dobila ime po Robertu Gravesu koji je 1835. godine objavio rad u kojem je opisao četiri slučaja ove bolesti. Više od sto godina kasnije, Adams i Purves (1956.), dokazali su da u serumu oboljelih od GB postoje tvari koje stimuliraju štitnu žlijezdu, a razlikuju se od tireotropno stimulirajućeg hormona. Bolest karakterizira infiltracija limfocita štitnjače koja dovodi do aktivacije B-limfocita, koji proizvode stimulirajuća antitijela za receptor TSH, antitijela aktiviraju receptor i dovode do hiperplazije i hipertrofije folikularnih stanica te hipersekrecije tiroidnih horomona što u konačnici rezultira hipertiteozom (Rose i Mackay, 2014).

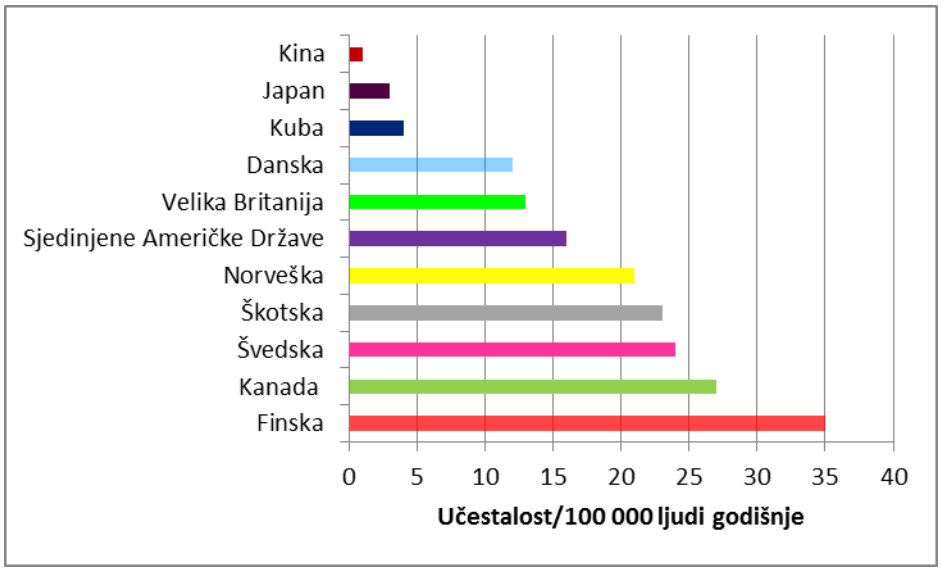
Gen HLA-DRB1*03 prvi je gen za kojeg je utvrđeno da je povezan s GB i primarni je rizični gen za GB. Učestalost antigena HLA-DR3 kod bolesnika s GB iznosi 40-50%, dok je u općoj populaciji 15-30%, osim njega, rizični gen za nastanak GB je i HLA-DRB1*08 (Jacobson i sur., 2008). Osim gena HLA podložnih za nastanak GB, utvrđeno je i postojanje zaštitnog haplotipa za razvoj ove bolesti, riječ je o haplotipu: HLA-DRB1*07-DQA1*02-DQB1*02 (Gough i Simmonds, 2007).

Istraživanja provedena među bolesnicima AT-om pokazala su da su rizični haplotipovi za nastanak bolesti: HLA-DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02 i HLA-DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02, dok je zaštitni haplotip HLA-DRB1*07-DQA1*02-DQB1*02 (Gough i Simmonds, 2007).

1.3.2. Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 autoimuna je bolest koja nastaje kod genetski podložnih osoba pod utjecajem okolišnih faktora (Rose i Mackay, 2014). U DMT1 dolazi do autoimunog uništavanja β-stanica Langerhansovih otočića gušterače autoreaktivnim T-limfocitima. Ovaj proces dovodi do potpunog nedostatka inzulina. Uslijed oštećenja β-stanica dolazi do otpuštanja antigena koji do tada nisu bili u kontaktu s imunosnim sustavom i stvaranja autoantitijela.

To je najčešća kronična autoimuna bolest koja pogađa dječju populaciju, a broj oboljelih od DMT1 je u stalnom porastu (Mehra, 2010). Zanimljiv je podatak da je DMT1 autoimuna kronična bolest koja ima najveće razlike u učestalosti pojavljivanja u različitim zemljama. Primjerice, dijete u Finskoj ima 400 puta veće šanse da će razviti DMT1 nego dijete u Kini (Slika 7) (Sperling, 2003).



Slika 7. Učestalost nastanka DMT1 na 100000 ljudi u različitim zemljama (Sperling, 2003).

Do danas je otkriveno više od 18 genskih lokusa povezanih s nastankom DMT1. Geni HLA koji kodiraju molekule HLA-DR i HLA-DQ nose 40–50% rizika za nastanak DMT1. Uočeno je da je DMT1 kod populacija europskog porijekla povezan s dva haplotipa: HLA-DQ2 (HLA-DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01) i HLA-DQ8 (HLA-DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02). Navedeni haplotipovi HLA prisutni su kod približno 5% zdravih ispitanika europskog porijekla (Huber i sur., 2008). Osim rizičnih haplotipova HLA, uočeni su i zaštitni haplotipovi: HLA-DRB1*15:01-DQB1*06:02, odnosno HLA-DQA1*01:02-DQB1*06:02 (Gorodezky i sur., 2006). Utjecaj gena HLA razreda I manje je istraživan, no dokazano je da su rizični geni HLA razreda I: HLA-A*24, HLA-A*02:01, HLA-A*03:02, HLA-A*01:01 i HLA-B*39 (Rose i Mackay, 2014).

1.3.3. Autoimuni poliglandularni sindrom

Autoimuni poliglandularni sindrom tipa 3 (engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*, APS3v) uključuje pojavu AITD i druge organospecifične autoimune bolesti (najčešće DMT1) kod istog bolesnika (Shoenfeld i sur., 2010). Organospecifična autoimunost česta je kod osoba s DMT1. Kod jedne trećine ljudi oboljelih od DMT1 autoantitijela se ne razvijaju samo protiv β-stanica Langerhansovih otočića već i protiv drugih tkiva. 15–30% oboljelih od DMT1 razvija neki oblik AITD-a, 5-10% obolijeva od autoimunog gastritisa i/ili perniciozne anemije. Kod 4-9% oboljelih javlja se celijakija, a Addisonova bolest zabilježena je kod 0,5% bolesnika (Schott i Scherbaum, 2006).

Većina studija pokazala je jak utjecaj gena HLA razreda II na pojavu APS3v-a. Povezanost s genima HLA jača je u bolesnika oboljelih od obje bolesti nego u onih s izoliranim AITD (Stipančić i sur., 2008). Dokazano je da haplotipove HLA-DRB1*03-DQB1*02:01 i HLA-DRB1*04-DQB1*03:02 češće nasljeđuju potomci koji imaju DMT1 ili APS3v, dok potomci koji imaju samo AITD češće nasljeđuju samo haplotip HLA-DRB1*03-DQB1*02:01. To upućuje na povezanost haplotipa HLA-DRB1*03-DQB1*02:01 s istovremenom pojavom obje bolesti, dok je haplotip HLA-DRB*04-DQB1*03:02 specifičan za DMT1. (Golden i sur., 2005). Ispitivanja provedena na skupini bolesnika s APS3v-om pokazala su povezanost s haplotipovima HLA-DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 i HLA-DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (Hansen i sur., 2015).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Brojna istraživanja tijekom proteklih godina koja su provedena na bolesnicima s AITD, bolesnicima s DMT1 te na bolesnicima koji imaju i AITD i DMT1, tj. APS3v, dokazala su povezanost gena HLA s navedenim bolestima. Smještaj gena MIC unutar regije HLA i polimorfizam gena MIC ukazuje na mogućnost povezanosti s autoimunim bolestima. Dosad provedena istraživanjima ukazala su na povezanost gena MIC i nekih autoimunih bolesti, među kojima su i AITD i DMT1.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Istražiti raspodjelu alela mikrosatelita STR_MICA unutar skupine bolesnika s autoimunom bolesti štitnjače
2. Analizirati polimorfizam alela mikrosatelita STR_MICA unutar skupine bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1
3. Ispitati raspodjelu alela mikrosatelita STR_MICA unutar skupine bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 i autoimunom bolesti štitnjače
4. Analizirati distribuciju alela mikrosatelita STR_MICA unutar kontrolne skupine
5. Usporediti raspodjelu alela lokusa STR_MICA između navedenih skupina bolesnika i u odnosu na kontrolnu skupinu
6. Utvrditi postoji li razlika u raspodjeli alela STR_MICA između istraživanih skupina s obzirom na alele HLA-DRB1
7. Utvrditi postoje li podložni, odnosno zaštitni aleli STR_MICA za nastanak neke od istraživanih bolesti
8. Usporediti dobivene rezultate s rezultatima za druge populacije

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL (UZORCI)

U ovo istraživanje uključeno je 290 nesrodnih bolesnika (141 bolesnik s AITD i 149 bolesnika s DMT1). Među bolesnicima s DMT1 njih 86 imalo je samo DMT1, dok je 63 bolesnika imalo APS3v. Dob bolesnika bila je između 1,1 do 25,8 godina života, porijeklom iz različitih dijelova Republike Hrvatske. Svi su liječeni u zavodu za endokrinologiju i diabetes Klinike za pedijatriju, KBC Zagreb (Tablica 5).

Kontrolna skupina obuhvaćala je 86 zdravih nesrodnih ispitanika odgovarajuće dobi i spola, također iz različitih dijelova Republike Hrvatske, a kod kojih su isključene istraživane bolesti.

Svim ispitanicima uzeto je 5 ml periferne venske krvi za određivanje alela mikrosatelita STR_MICA. Svim su ispitanicima prethodno određeni geni lokusa HLA-DRB1.

Tablica 5. Osobine ispitanika uključenih u istraživanje

		Broj bolesnika (N)	Dob kod dijagnoze – srednja dob (raspon)	Spol	
				M	Ž
DMT1 ukupno		149	8,35 (1,12-19,36)	64	85
	DMT1	86	8,76 (1,45-16,72)	44	42
	APS3v	63	7,83 (1,12-19,36)	20	43
AITD		141	12,49 (4,17-25,87)	33	108
	AT	29	11,75 (4,17-19,04)	7	22
	GB	112	15,43 (6,50-25,87)	26	86
Kontrolna skupina		86	11,99 (4,65-21,46)	45	41

Legenda: M – muškarci; Ž – žene; DMT1 – šećerna bolesti tipa 1, AITD – autoimuna bolest štitnjače; APS3v engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; AT – autoimuni tiroiditis; GB – Gravesova bolest.

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija DNA

Iz uzorka periferne venske krvi ispitanika izolirana je DNA brzom metodom izolacije na silikonskoj membrani pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA (NucleoSpin® Blood, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Metoda se temelji na liziranju limfocita pomoću pufera B3 te uklanjanju staničnih proteina i drugih makromolekula enzimskom reakcijom koristeći proteinazu K. Sama DNA adsorbira se na silikatnu membranu kolumne za izolaciju pomoću etanola te se ispire korištenjem pufera BW i B5 nakon čega se suši, tj. centrifugira na velikom broju okretaja (Slika 8). Zatim se na membranu nanosi pufer BE koji služi za otapanje DNA, uspješnost same izolacije provodi se elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu.

Liziranje sastojaka krvi		200 µl krvi 25 µl proteinaze K 200 µl B3 Promiješati 70°C 10-15 min
Prilagoditi uvjete za vezanje DNA		210 µl etanola
Vezanje DNA		Promiješati sve 1 min 11 000 x g
Ispiranje silikatne membrane		500 µl BW 600 µl B5 1 min 11 000 x g 1 min 11 000 x g
Sušenje silikatne membrane		1 min 11 000 x g
Eluacija čiste DNA		100 µl BE (70°C) RT 1 min 1 min 11 000 x g

Slika 8. Postupak izolacije DNA pomoću komercijalnog seta za izolaciju.

3.2.2. Umnažanje alela lokusa STR_MICA

Mikrosatelit STR_MICA umnaža se metodom PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) korištenjem početnica koje su na 5' kraju bile obilježene fluorescentnom bojom (Tablica 6). Ukupni volumen reakcijske smjese za PCR iznosio je 10 µL, u što je bilo uključeno 5,5 µL H_2O, 1 µL pufera 10X, 1 µL glicerola, 0,8 µL početnica 5' i 3' koncentracije 10pmol/µL, 0,1 µL enzima *Taq* polimeraze (koncentracija 5U/µL), 0,1 µL deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) koncentracije 10mM te 0,8 µL $MgCl_2$ (Tablica 7). Umnažanje se odvija pod slijedećim uvjetima: 94°C – 15', 55°C – 30', 72°C – 1' (35 ciklusa).

Tablica 6. Slijed nukleotida početnica 5' i 3' za umnažanje mikrosatelita STR_MICA

POČETNICA	SLIJED NUKLEOTIDA
5'	CCT TTT TTT CAG GGA AAG TGC
3'	CCT TAC CAT CTC CAG AAA CTG C

Tablica 7. Količine sastojaka potrebnih za umnažanje alela lokusa STR_MICA

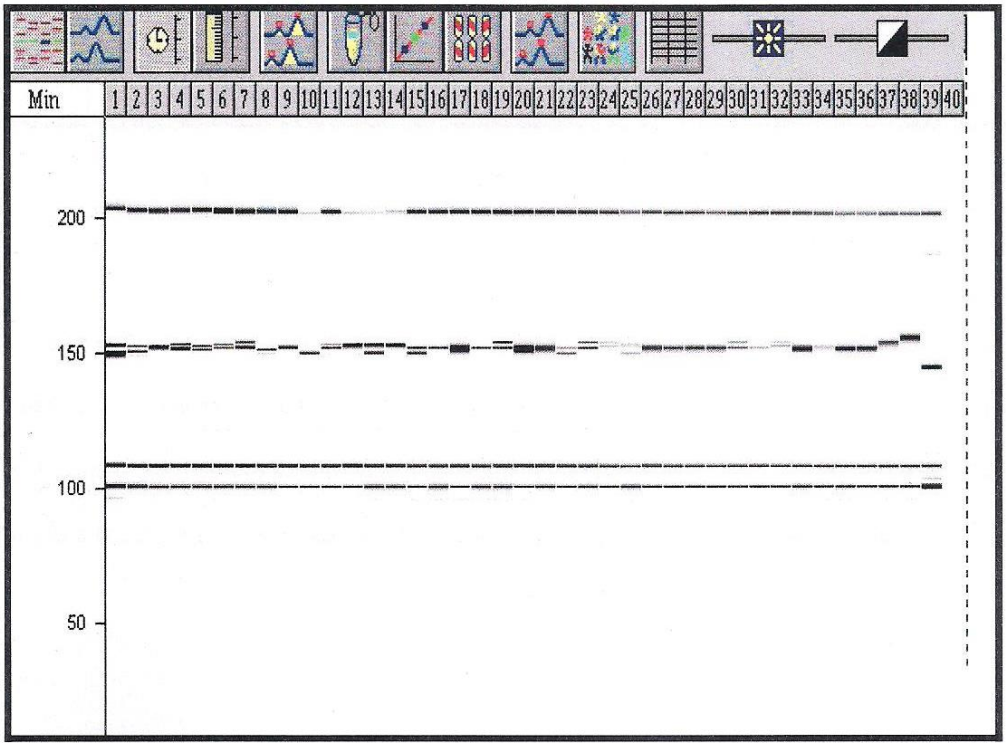
	1x
H_2O	5,5 µL
PCR pufer (bez $MgCl_2$) (10X)	1 µL
GLICEROL	1 µL
$MgCl_2$ (2mM)	0,8 µL
5' POČETNICA (10 pmol/µl)	0,8 µL
3' POČETNICA (10 pmol/µl)	0,8 µL
dNTP (10mM)	0,1 µL
Taq Polimeraza (5 U/µl)	0,1 µL

3.2.3. Elektroforeza

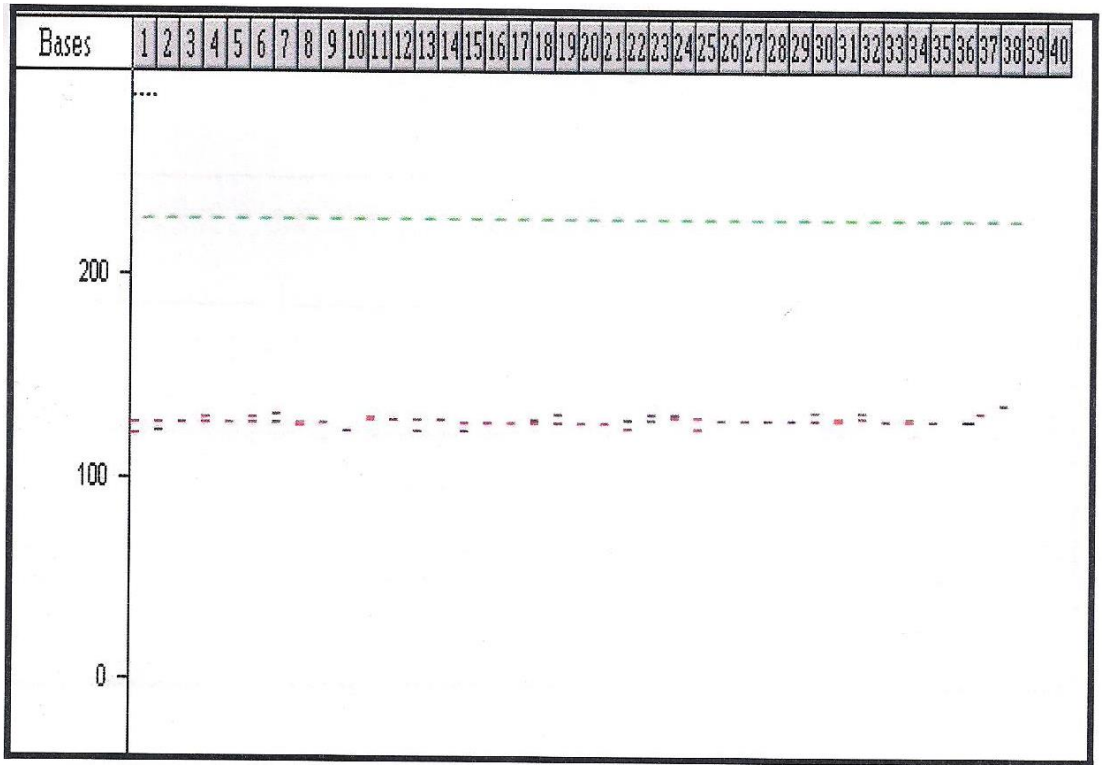
Umnoženi produkti PCR analizirani su elektroforezom na 6%-tnom poliakrilamidnom gelu debljine 0,5 mm u aparatu za automatsko određivanje dužine sljedova DNA (ALFexpress, Amersham Pharmacia/Pharmacia-Biotech, Uppsala, Švedska). Produkti reakcije PCR prije nanošenja na gel, tj. elektroforeze, pomiješaju se s puferom i bojom te standardima koje čine fragmenti DNA poznate duljine. U svaki je uzorak stavljan tzv. unutarnji standard. Osim njih, na svakom gelu bio je uključen i tzv. vanjski standard koji je stavljen u zadnju jažicu. Prilikom analize mikrosatelita STR_MICA vanjski standard su bile tzv. alelne ljestve (engl. *allelic ladder*) dobivene miješanjem umnoženih uzoraka DNA izolirane iz B staničnih linija kojima su prethodno određeni aleli za pojedini mikrosatelitni lokus STR_MICA.

Prije elektroforeze, pripremljeni uzorci denaturiraju se 3 minute na 95°C nakon čega se pohranjuju na ledu do trenutka nanošenja na gel. Elektroforeza se provodi pod sljedećim uvjetima: 350 min, 1200 V, 40 mA, 50 W i 50°C. Očitavanje alela provedeno je u aparatu za automatsko određivanje dužine fragmenata DNA (ALFexpress, Amersham Pharmacia/Pharmacia-Biotech, Uppsala, Švedska) uz pomoć lasera koji pobuđuje fluorescenciju boje vezane za fragmente DNA te fotodetektora koji očitavaju fluorescenciju u trenutku kada fragment DNA prolazi kroz lasersku zraku.

Za određivanje dužine alela STR_MICA korišten je računalni program AlleleLocator (Amersham Pharmacia/Pharmacia-Biotech, Uppsala, Švedska). Program na temelju vremena elektroforeze standarda poznate duljine izračunava duljinu alela STR_MICA. Gel prije obrade programom „AlleleLocator“ prikazan je na slici 9, a gel nakon obrade prikazan je na slici 10.



Slika 9. Gel prije obrade programom „AlleleLocator“.



Slika 10. Gel nakon obrade programom „AlleleLocator“.

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Učestalost alela lokusa STR_MICA određena je izravnim brojanjem. Pri tome je osoba smatrana homozigotom ukoliko je na njemu određen samo jedan alel STR_MICA. Učestalost pojedinog alela, odnosno njegov udio među svim alelima, izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$f_a = \frac{2(AA) + (Aa)}{2n}$$

f_a – učestalost alela a
AA – broj homozigotnih genotipova
Aa – broj heterozigotnih genotipova
n – broj osoba u ispitivanom uzorku

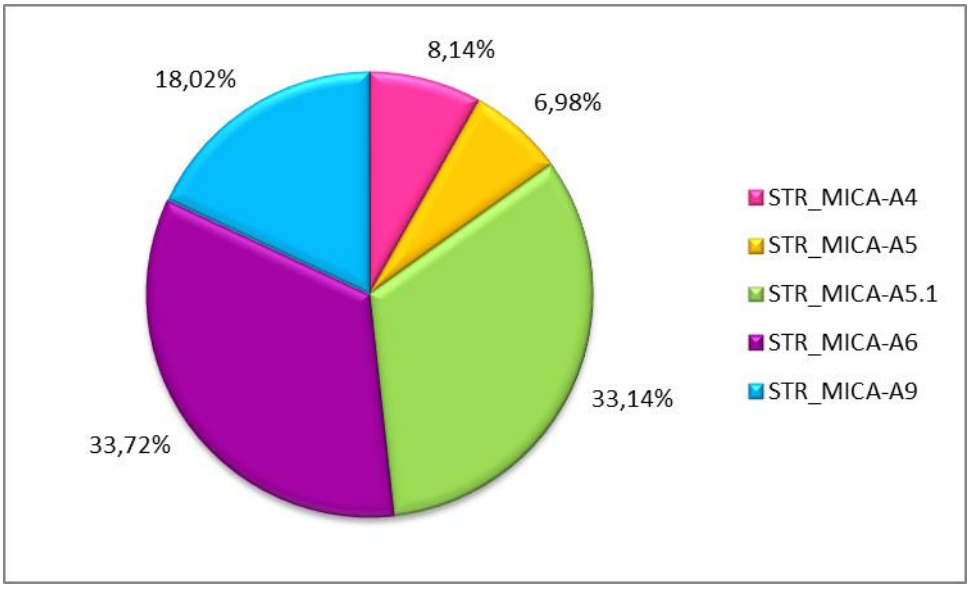
Povezanost pojedinih kliničkih i genetskih čimbenika procijenjena je uz pomoć 2x2 tablica pri čemu je razina statističke značajnosti bila 0,05. U slučaju kada je broj pojedinog čimbenika bio manji od 5, koristio se Fisherov test.

4. REZULTATI

4.1. RASPODJELA ALELA STR_MICA MEĐU BOLESNICIMA S DMT1, APS3v, AITD I U KONTROLNOJ SKUPINI

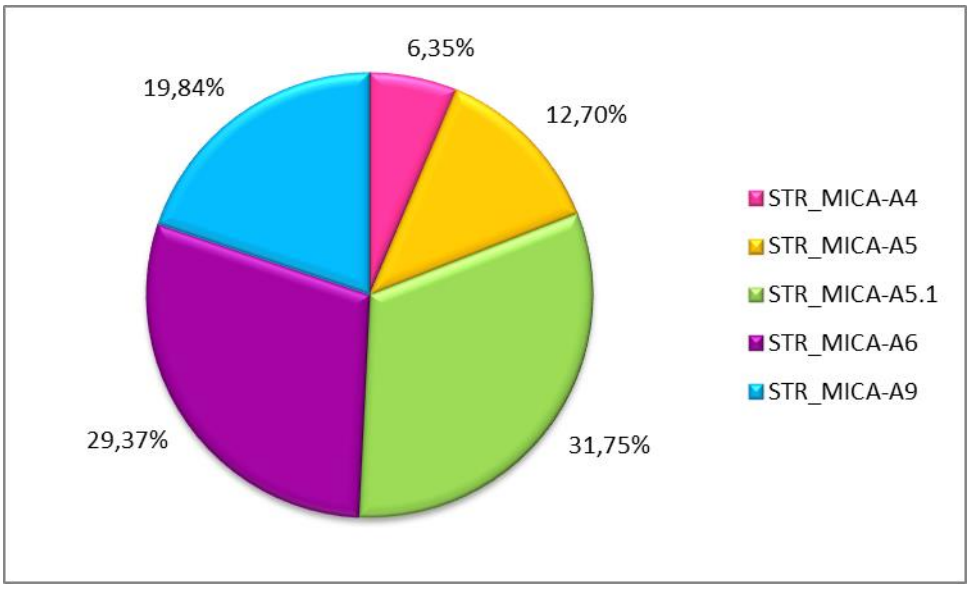
Uzorci DNA izolirani iz krvi bolesnika testirani su za alele STR_MICA lančanom reakcijom polimeraze i potom analizirani elektroforezom na 6%-tnom poliakrilamidnom gelu u aparatu za automatsko određivanje dužine fragmenata DNA.

Skupina bolesnika s DMT1 obuhvaćala je 86 ispitanika. Od ukupno 8 poznatih alela STR_MICA, uočeno je njih 5 (Slika 11). Među otkrivenim alelima STR_MICA najčešće su se pojavljivali aleli: STR_MICA-A6 (33,72%) i STR_MICA-A5.1 (33,14%). Nije uočena statistički značajna razlika u raspodjeli alela STR_MICA između bolesnika s DMT1 i kontrolnih ispitanika.



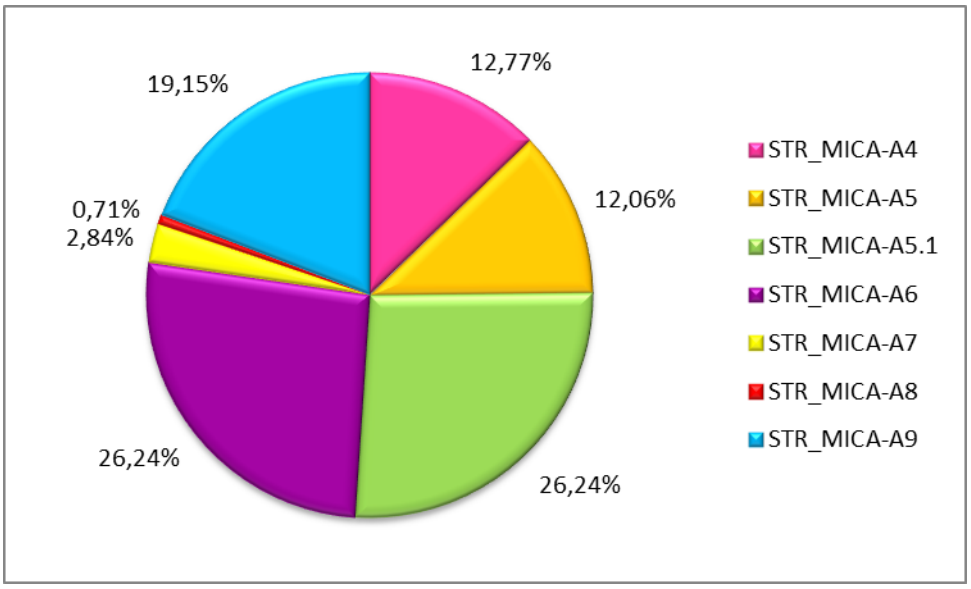
Slika 11. Raspodjela alela STR_MICA među bolesnicima sa šećernom bolesti tipa 1 (N=86)

Među bolesnicima s APS3v-om također je uočeno 5 alela STR_MICA (Slika 12). Najveću učestalost pokazao je alel STR_MICA-A5.1 (31,75%) te alel STR_MICA-A6 (29,37%). Zanimljivo je da se alel STR_MICA-A5 dvostruko češće pojavljuje u skupini bolesnika s APS3v-om u odnosu na kontrolnu skupinu (APS3v-12,7%, kontrola-6,4%), no ta razlika nije bila statistički značajna ($p>0,05$). Nije uočena statistički značajna razlika u raspodjeli alela STR_MICA između bolesnika s APS3v i zdravih ispitanika.



Slika 12. Raspodjela alela STR_MICA među bolesnicima s autoimunim poliglandularnim sindromom tipa 3 (N=63)

Skupina bolesnika s AITD obuhvaćala je 141 ispitanika među kojima je otkriveno 7 različitih alela STR_MICA. Alel STR_MICA-A5.1 i alel STR_MICA-A6 bili su najčešći s istom učestalošću od 26,24% (Slika 13). Alel STR_MICA-A5 je statistički značajno (p=0,05) bio prisutan među bolesnicima s AITD-om (12,03%) u odnosu na kontrolnu skupinu (6,4%). Ni jedan alel STR_MICA nije bio statistički značajno manje zastupljen među bolesnicima s AITD-om u usporedbi s kontrolnom skupinom.



Slika 13. Raspodjela alela STR_MICA među bolesnicima s autoimunom bolesti štitnjače (N=141)

Međusobna usporedba raspodjele alela STR_MICA između tri testirane skupine bolesnika pokazala je sljedeće rezultate.

Između bolesnika s DMT1 i preostale dvije skupine bolesnika nije uočena statistički značajna razlika u raspodjeli alela STR_MICA.

Unutar skupine bolesnika s APS3v-om alel STR_MICA-A4 je statistički značajno manje prisutan u odnosu na bolesnike s AITD (APS3v-6,35%, AITD-12,77%; p=0,058).

U Tablici 8 prikazane su raspodjele alela STR_MICA u istraživanim skupinama bolesnika.

Tablica 8. Usporedba učestalost alela STR_MICA među bolesnicima s DMT1 (N=86), APS3v (N=63), AITD (N=141) i u kontrolnoj skupini (N=86)

ALEL STR_MICA-	DMT1 n (%)	APS3v n (%)	AITD n (%)	Kontrolna skupina n (%)
A3	0	0	0	1 (0,58)
A4	14 (8,14)	**8 (6,35)**	36 (12,77)	18 (10,47)
A5	12 (6,98)	**16 (12,70)**	**34 (12,06)**	11 (6,40)
A5.1	**57 (33,14)**	**40 (31,75)**	**74 (26,24)**	62 (36,05)
A6	**58 (33,72)**	**37 (29,37)**	**74 (26,24)**	49 (28,49)
A7	0	0	8 (2,84)	3 (1,74)
A8	0	0	2 (0,71)	0
A9	31(18,02)	25 (19,84)	54 (19,15)	28 (16,28)

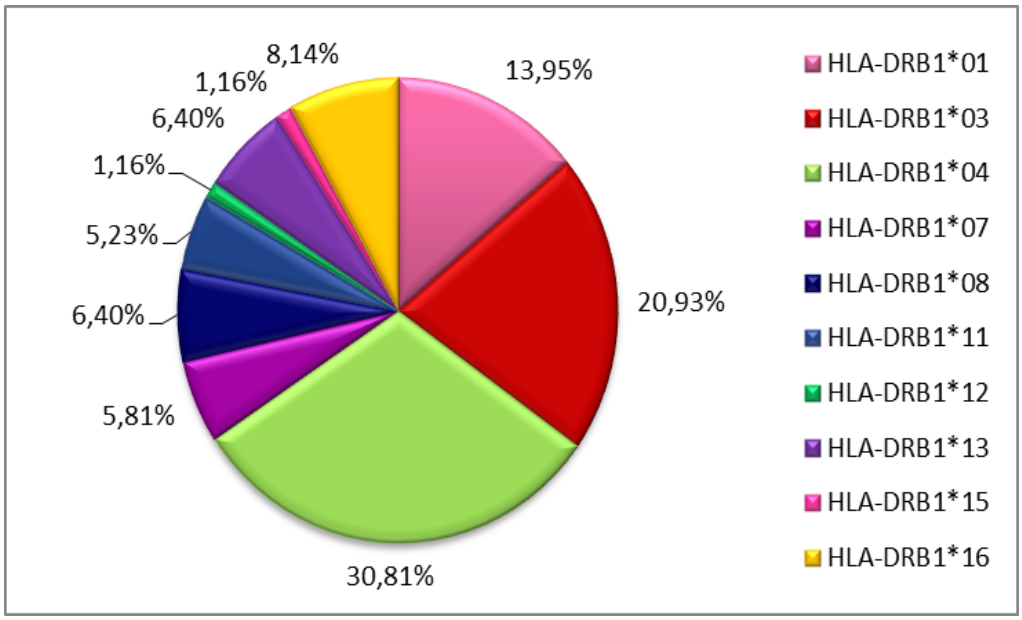
Legenda: DMT1 – šećerna bolest tipa 1, APS3v – autoimuni poliglandularni sindrom tipa 3, AITD – autoimuna bolest štitnjače, N – broj ispitivanih osoba, n – broj uočenih alela

4.2. RASPODJELA GENA HLA-DRB1 MEĐU BOLESNICIMA S DMT1, APS3v, AITD I U KONTROLNOJ SKUPINI

Analiza gena HLA-DRB1 unutar skupine bolesnika s DMT1 pokazala je nazočnost 10 različitih gena HLA-DRB1, od ukupno 13 poznatih (Slika 14).

Raspodjela gena HLA-DRB1 među bolesnicima s DMT1 pokazala je da je gen DRB1*04 bio prisutan kod približno trećine bolesnika (30,81%) što je statistički znatno više ($p<0,0001$) nego među kontrolnim ispitanicima (5,23%) (Tablica 9). Drugi najčešći gen HLA-DRB1 u skupini bolesnika s DMT1 bio je HLA-DRB1*03 koji je sa zastupljenošću od 20,93% bio statistički značajno ($p=0,0285$) više zastupljen nego među zdravim ispitanicima (11,63%). Zanimljivo je spomenuti da nitko od ispitanika nije bio pozitivan za gen HLA-DRB1*09, DRB1*10 i DRB1*14.

S druge strane, geni HLA-DRB1 koji su bili statistički značajno manje zastupljeni kod bolesnika s DMT1 u usporedbi s kontrolom su geni: HLA-DRB1*07 ($p=0,0583$), zatim DRB1*11 ($p=0,0002$) i DRB1*15 ($p=0,0009$).

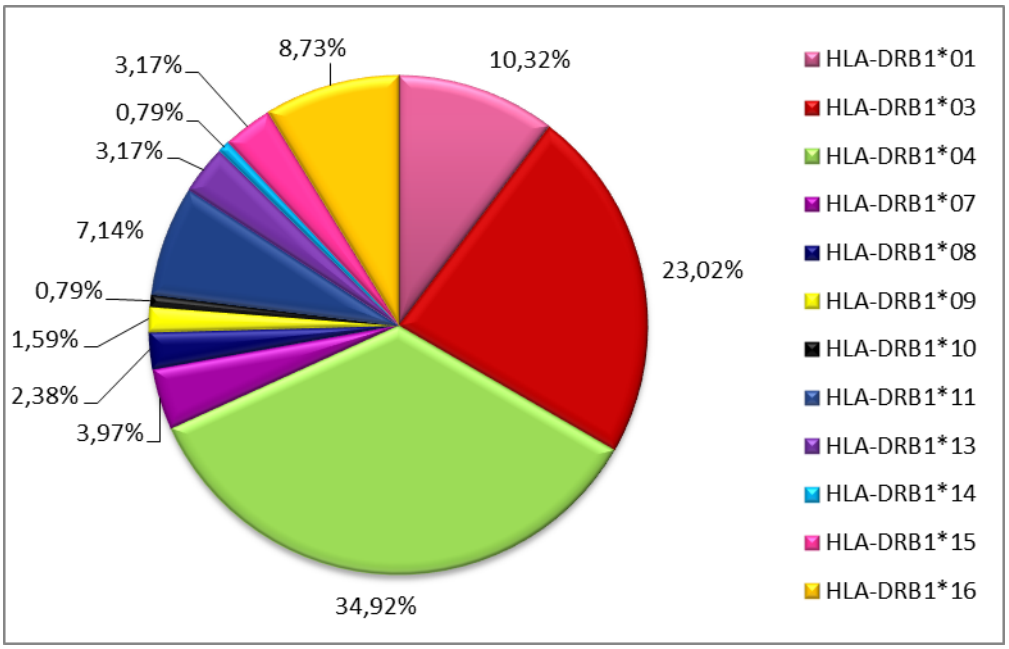


Slika 14. Raspodjela gena HLA-DRB1 među bolesnicima sa šećernom bolesti tipa 1 (N=86)

Među bolesnicima s APS3v-om uočeno je 12 različitih gena HLA-DRB1 (Slika 15), samo gen HLA-DRB1*12 nije bio zastupljen.

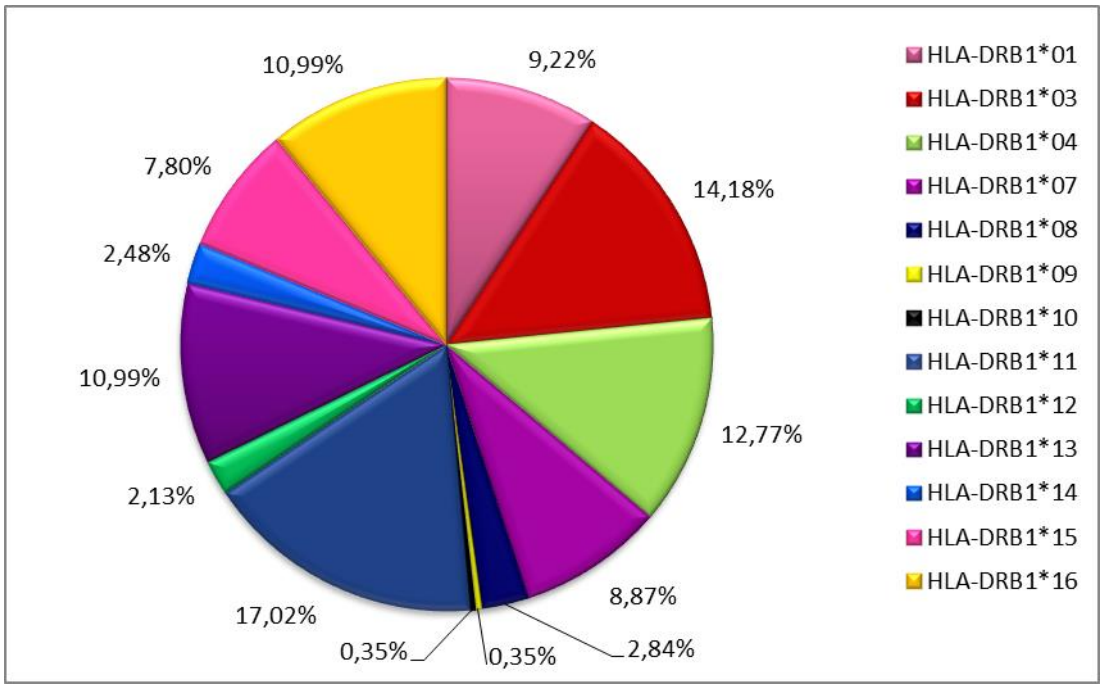
Najveću učestalost među bolesnicima s APS3v-om pokazao je gen HLA-DRB1*04 (34,92%) što je statistički značajno (p<0,0001) više nego u kontrolnoj skupini (5,23%). Učestalost gena HLA-DRB1*03 također je bila statistički značajno viša u usporedbi s kontrolnim ispitanicima (APS3v-23,02%, kontrola-11,63%; p=0,0111).

S druge strane, geni HLA-DRB1 koji su pokazali statistički značajno manju zastupljenost u skupini bolesnika s APS3v-om su: HLA-DRB1*07 (p=0,0207), HLA-DRB1*11 (p=0,0059) i HLA-DRB1*15 (p=0,05). Preostali geni HLA-DRB1 pojavili su se s podjednakom učestalošću u obje skupine (Tablica 9).



Slika 15. Raspodjela gena HLA-DRB1 među bolesnicima s autoimunim poliglandularnim sindromom tipa 3 (N=63)

Unutar skupine bolesnika s AITD (N=141) otkriveno je svih 13 gena HLA-DRB1. Na slici 16 prikazana je analiza raspodjele gena lokusa HLA-DRB1 unutar grupe bolesnika s AITD-om. Usporedba s kontrolom pokazala je statistički značajnu razliku (p=0,0202) samo za gen HLA-DRB1*04 koji je s učestalošću od 12,77% među bolesnicima s AITD-om bio dva puta češći nego u kontroli (5,23%).



Slika 16. Raspodjela gena HLA-DRB1 među bolesnicima s autoimunom bolesti štitnjače (N=141)

Usporedbom raspodjele gena HLA-DRB1*04 između skupina bolesnika s DMT1, APS3v-om i AITD-om uočeno je da je navedeni gen statistički značajno češće prisutan u skupinama bolesnika s DMT1 i APS3v-om u odnosu na skupinu bolesnika s AITD-om (DMT1-30,81%, APS3v-34,92%, AITD 12,77%, $p<0,0001$).

Gen HLA-DRB1*03 koji je uočen kod 23,02% bolesnika s APS3v-om pokazao je statistički značajno veću zastupljenost samo u odnosu na bolesnike s AITD-om (14,18%, $p=0,0323$).

Učestalost gena HLA-DBR1*11 među bolesnicima s AITD-om odgovara onoj u kontroli, a usporedba sa skupinom bolesnika s DMT1 pokazala je statistički značajnu razliku ($p=0,0002$), kao i sa bolesnicima s APS3v-om ($p=0,0082$).

Gen HLA-DRB1*13 je također pokazao razlike u raspodjeli kada smo usporedili 3 skupine bolesnika. Naime, statistički značajno ($p=0,0114$) je češće prisutan u skupini bolesnika s AITD-om (10,99%) u odnosu na skupinu bolesnika s APS3v-om (3,17%), ali ne i u usporedbi s bolesnicima koji boluju od DMT1-a (6,40%) (Tablica 9).

Usporedba raspodjele gena HLA-DRB1*15 između skupine bolesnika s AITD-om (7,80%) u odnosu na bolesnike s DMT1 (1,16%) i s APS3v-om (3,17%) pokazala je graničnu p vrijednost ($p=0,05$).

Tablica 9. Usporedba učestalosti gena HLA-DRB1 u skupinama bolesnika s DMT1 (N=86), APS3v (N=63), AITD (N=141) i kontroli (N=86)

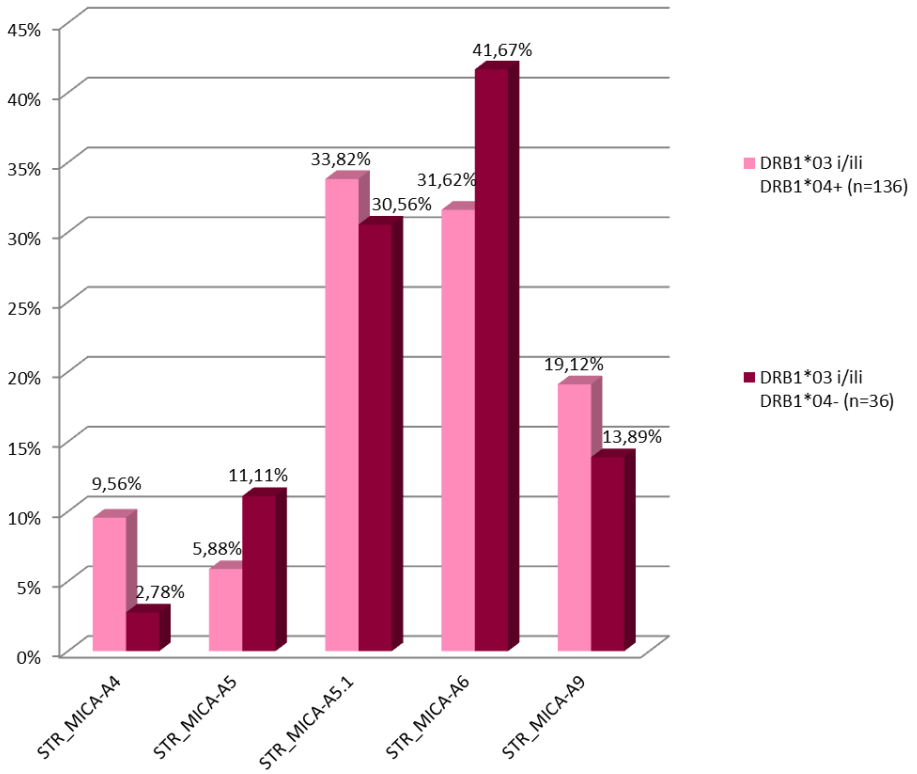
GEN HLA-DRB1*	DMT1 n (%)	APS3v n (%)	AITD n (%)	KONTROLA n (%)
01	24 (13,95)	13 (10,32)	26 (9,22)	21 (12,21)
03	36 (20,93)	29 (23,02)	40 (14,18)	20 (11,63)
04	53 (30,81)	44 (34,92)	36 (12,77)	9 (5,23)
07	10 (5,81)	5 (3,97)	25 (8,87)	21 (12,21)
08	11 (6,40)	3 (2,38)	8 (2,84)	6 (3,49)
09	0	2 (1,59)	1 (0,35)	1 (0,58)
10	0	1 (0,79)	1 (0,35)	1 (0,58)
11	9 (5,23)	9 (7,14)	48 (17,02)	32 (18,60)
12	2 (1,16)	0	6 (2,13)	7 (4,07)
13	11 (6,40)	4 (3,17)	31 (10,99)	14 (8,14)
14	0	1 (0,79)	7 (2,48)	4 (2,33)
15	2 (1,16)	4 (3,17)	22 (7,80)	16 (9,30)
16	14 (8,14)	11 (8,73)	31 (10,99)	20 (11,63)

Legenda: DMT1 – šećerna bolest tipa 1, APS3v – autoimuni poliglandularni sindrom tipa 3, AITD – autoimuna bolest štitnjače, N – broj ispitivanih osoba, n – broj uočenih alela

4.3. RASPODJELA ALELA STR_MICA MEĐU BOLESNICIMA S DMT1, APS3v, AITD S OBZIROM NA PRISUSTVO/ODSUSTVO GENA HLA-DRB1*03 I HLA-DRB1*04

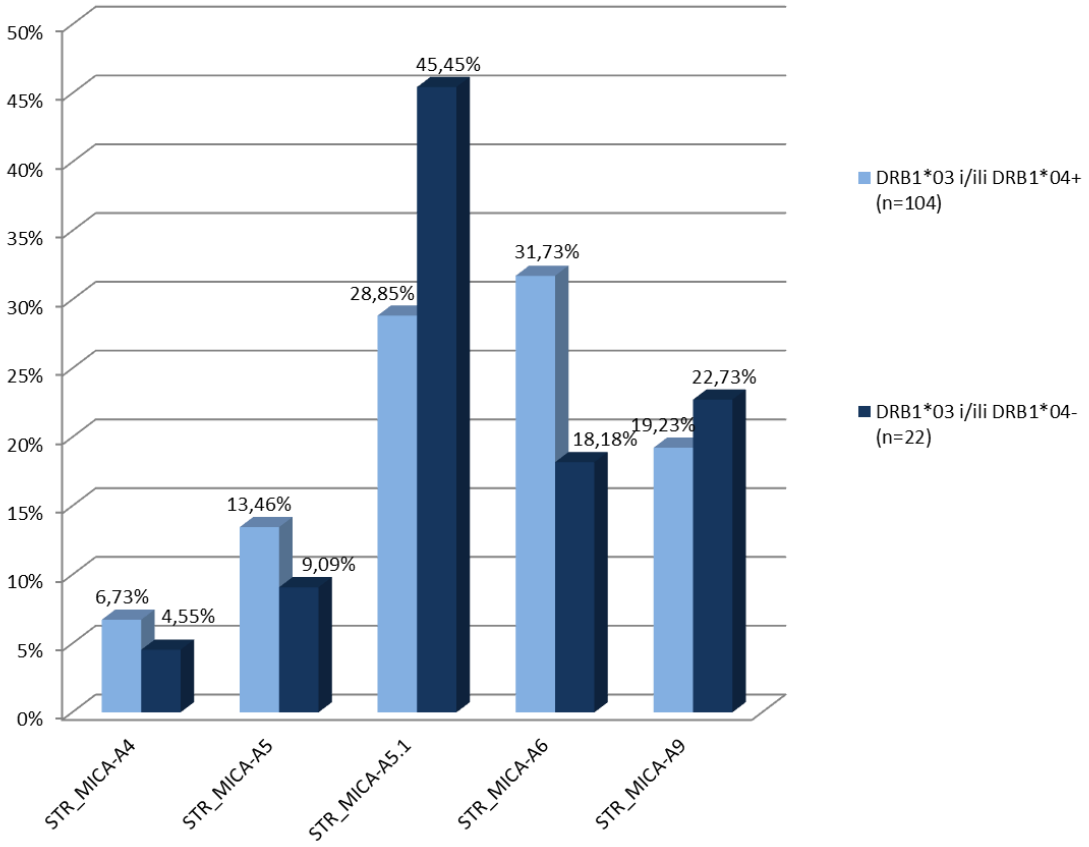
S obzirom na dobivene rezultate u raspodjeli alela STR_MICA i gena HLA-DRB1 među bolesnicima i kontroli sljedeći cilj istraživanja bio je podijeliti svaku pojedinačnu skupinu bolesnika s obzirom na prisustvo/odsustvo gena HLA-DRB1 koji su pokazali najveću zastupljenost u bolesničkim skupinama. Naime, htjeli smo istražiti jesu li povišene učestalosti pojedinih alela lokusa STR_MICA neovisne o genima HLA-DRB1 ili su rezultat neravnoteže udruživanja.

Na slici 17 prikazana je raspodjela alela STR_MICA među bolesnicima s DMT1 s obzirom na prisustvo/odsustvo gena HLA-DRB1*03 i/ili HLA-DRB1*04. Usporedbom dvije podskupine nije uočena razlika u raspodjeli alela STR_MICA.



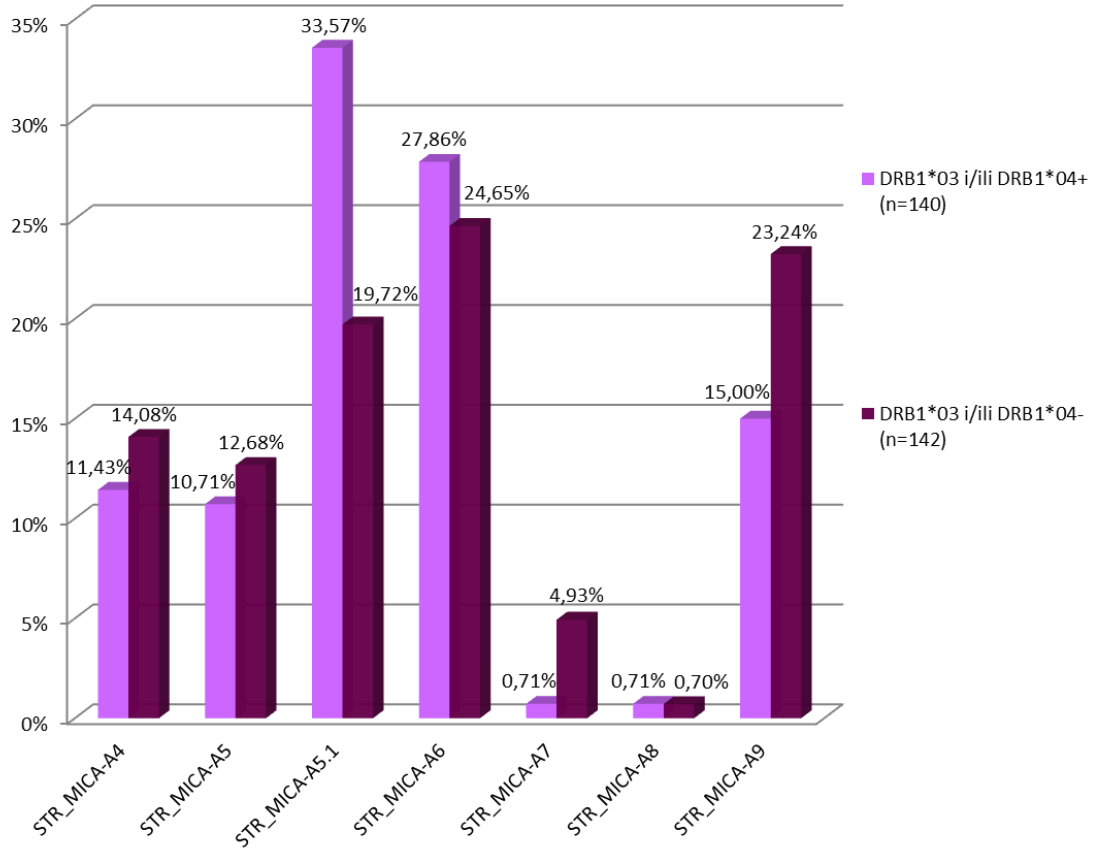
Slika 17. Raspodjela alela STR_MICA među bolesnicima sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na prisustvo/odsustvo gena HLA-DRB1*03 i/ili HLA-DRB1*04

Na slici 18 prikazana je raspodjela alela STR_MICA među bolesnicima s APS3v-om s obzirom na prisustvo/odsustvo gena HLA-DRB1*03 i/ili HLA-DRB1*04. Usporedba raspodjele alela STR_MICA između te dvije podskupine bolesnika s APS3v-om nije dala statistički značajne razlike.



Slika 18. Raspodjela alela STR_MICA među bolesnicima s autoimunim poliglandularnim sindromom tipa 3 s obzirom na prisustvo/odsustvo gena HLA-DRB1*03 i/ili HLA-DRB1*04

Raspodjela alela STR_MICA među AITD bolesnicima s obzirom na prisustvo/odsustvo gena HLA-DRB1*03 i/ili HLA-DRB1*04 prikazana je na slici 19. Unutar ove skupine bolesnika uočena je statistički značajna razlika u učestalosti alela STR_MICA-A5.1 između dvije podskupine. Alel STR_MICA-A5.1 je statistički značajno (p=0,0104) češće bio prisutan u podskupini pozitivnoj za HLA-DRB1*03 i/ili DRB1*04 (33,57%), u usporedbi s podskupinom bolesnika s AITD-om negativnim za navedene gene HLA-DRB1 (19,72%).



Slika 19. Raspodjela alela STR_MICA među bolesnicima s autoimunom bolesti štitnjače s obzirom na prisustvo/odsustvo gena HLA-DRB1*03 i/ili HLA-DRB1*04

Usporedba raspodjele alela STR_MICA između bolesnika (HLA-DRB1*03 i/ili DRB1*04 negativni) s istraživanim bolestima pokazala je statistički značajno veću zastupljenost alela STR_MICA-A5 u podskupini bolesnika s AITD-om (12,68%) u odnosu na kontrolu (4,31%, p=0,0265).

Istovremeno je za alel STR_MICA-A5.1 uočena statistički značajno (p=0,0069) manja učestalost među bolesnicima koji boluju od AITD-a (19,72%), a negativnim za HLA-DRB1*03 i/ili DRB1*04 u odnosu na kontrolu (35,34%). Učestalost alela STR_MICA-A5.1 među bolesnicima s AITD-om bila je statistički značajno smanjena (p=0,0132) i u usporedbi s bolesnicima s APS3v-om, dok usporedba s bolesnicima s DMT1 nije pokazala statistički značajne razlike (Tablica 10). Svi ostali aleli STR_MICA nisu pokazali statistički značajne razlike u raspodjeli kada smo međusobno usporedili bolesničke skupine.

Tablica 10. Raspodjela alela STR_MICA u podskupinama bolesnika negativnih za gen HLA-DRB1*03 i/ili HLA-DRB1*04

ALEL STR_MICA-	DMT1		APS3v		AITD		KONTROLNA SKUPINA	
	DRB1*03 i/ili DRB1*04- (N=18)		DRB1*03 i/ili DRB1*04- (N=11)		DRB1*03 i/ili DRB1*04- (N=71)		DRB1*03 i/ili DRB1*04- (N=58)	
	N	%	n	%	N	%	n	%
A3	0	0	0	0	0	0	1	0,86
A4	1	2,78	1	4,55	20	14,08	14	12,07
5	4	11,11	2	9,09	18	12,68	5	4,31
5.1	11	30,56	10	45,45	28	19,72	41	35,34
A6	15	41,67	4	18,18	35	24,65	31	26,72
A7	0	0	0	0	7	4,93	2	1,72
A8	0	0	0	0	1	0,70	0	0
A9	5	13,89	5	22,73	33	23,24	22	18,98

Legenda: DMT1 – šećerna bolest tipa 1, APS3v – autoimuni poliglandularni sindrom tipa 3, AITD – autoimuna bolest štitnjače, N – broj ispitivanih osoba, n – broj uočenih alela

5. RASPRAVA

Istraživanja povezanosti gena MICA i različitih autoimunih bolesti, provedena tijekom posljednjih godina, ukazala su na njihovu povezanost s nastankom tih bolesti, ali sam mehanizam do danas nije razjašnjen (Park i sur., 2001). Naime, funkcija molekula MICA nije poznata u potpunosti te još uvijek nije sasvim jasan mehanizam djelovanja u razvoju autoimunih bolesti (Gambelunghe i sur., 1999). Rezultati istraživanjima su oprečni, s jedne strane radovi govore o važnosti samih alela MICA za razvoj bolesti, dok s druge strane pojedini radovi iznose zaključke da je ta podložnost rezultat neravnoteže udruživanja gena MICA s genima HLA (Frigoul i Lefranc, 2005). Postoje brojni radovi o međusobnoj povezanosti DMT1 i AITD-a, ali je malo podataka koji govore o zajedničkim podložnim, odnosnom zaštitnim genima za nastanak ove dvije bolesti (Golden i sur., 2005). U dosadašnjim istraživanjima genetske podloge ove dvije bolesti jedan od najčešće istraživanih gena je HLA-DRB1, ali i drugi geni unutar regije HLA. Stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi povezanost alela mikrosatelita STR_MICA s nastankom DMT1, APS3v-a i AITD-a u Hrvatskoj te otkriti je li povezanost s alelima STR_MICA neovisna ili je rezultat neravnoteže udruživanja s klasičnim genima HLA.

Raspodjela alela unutar testirane kontrolne skupine je u skladu s rezultatima raspodjele iz prethodnog istraživanja provedenog u Hrvatskoj (Grubić i sur., 2006). Potvrđeno je da su najčešći aleli STR_MICA u hrvatskoj populaciji alel STR_MICA-A5.1 i alel STR_MICA-A6, što vrijedi i za druge europske populacije. Podatci za Brazil također govore da su aleli STR_MICA-A5.1 i STR_MICA-A6 najzastupljeniji aleli, što ukazuje na to da su područje Brazila naselili europski doseljenici (Sens-Abuazar i sur., 2009). Poznato je da su neki aleli HLA karakteristični za određenu populaciju ili etničku skupinu, dok su u drugoj prisutni s vrlom malom učestalošću ili ih uopće nema, a isto se može zaključiti i za alele mikrosatelita STR_MICA. Tako je zastupljenost alela STR_MICA drugačija je u južnoj Kini gdje su najčešće nađeni alel STR_MICA-A7 i STR_MICA-A5 (Lin i sur., 2015). U istraživanju koje su proveli Grubić i sur. (2006), aleli STR_MICA-A7 i STR_MICA-A10 nisu zabilježeni. U ovom istraživanju alel STR_MICA-A7 pronađen je u kod 8 bolesnika s AITD-om te kod 3 ispitanika iz kontrolne skupine.

Rezultati raspodjele alela STR_MICA u skupini bolesnika s DMT1 nisu odstupali od onih u kontroli. Najčešće pronađeni aleli su alel STR_MICA-A6 i alel STR_MICA-A5.1. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima iz istraživanja provedenog 2008. godine kojim je također dokazano da upravo ova dva alela najčešća u skupini bolesnika s DMT1 (Dittmar i sur., 2008). Provedenim istraživanjem nije utvrđen niti jedan alel STR_MICA koji bi bio

rizični, odnosno zaštitni alel za nastanak DMT1. Nasuprot rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, dokazano je da je u kineskoj populaciji alel STR_MICA-A9 rizični alel za nastanak DMT1 kod oboljele djece (Lee i sur., 2000). Iste rezultate o raspodjeli alela STR_MICA među bolesnicima s DMT1 u Kini dobili su Nejentsev i sur. (2000). U Italiji je primarni rizični alel za nastanak DMT1 alel STR_MICA-A5. Drugi najčešći alel u tamošnjoj populaciji je alel STR_MICA-A5.1 koji je statistički značajno češće uočen i ovim istraživanjem među bolesnicima s DMT1, ali se ne smatra rizičnim alelom za nastanak ove bolesti (Ide i sur., 2006).

U skupini bolesnika s APS3v-om ukupno je uočeno 5 alela STR_MICA. Najčešće zastupljeni aleli STR_MICA su alel STR_MICA-A5.1 i alel STR_MICA-A6, jednako kao i među bolesnicima s DMT1. Dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima analize raspodjele alela mikrosatelita STR_MICA koju su proveli Dittmar i sur. (2008). Zanimljivo je da se alel STR_MICA-A5 dvostruko češće pojavljuje u ovoj skupini bolesnika u odnosu na ispitanike iz kontrolne skupine. Budući da ta razlika nije statistički značajna ne može se okarakterizirati kao rizični alel za nastanak APS3v-a. Ovim istraživanjem također je utvrđeno da je alel STR_MICA-A4 statistički značajno manje zastupljen u odnosu na skupinu bolesnika s AITD-om te se smatra se zaštitnim alelom za nastanak ove bolesti. Ranije provedena studija među bolesnicima s APS3v-om ukazala je na značajno manju zastupljenost alela STR_MICA-A6 u odnosu na bolesnike s DMT1 i AITD-om te je zaključeno da navedeni alel ima zaštitnu ulogu u nastanku APS3v-a (Dittmar i sur., 2008), što ovim istraživanjem nije potvrđeno.

Istraživanje o raspodjeli alela STR_MICA u skupini bolesnika s AITD-om u Njemačkoj pokazalo je povezanost s alelom STR_MICA-A5.1 i STR_MICA-A9 (Ide i sur., 2006), što nije slučaj u našem radu. U našoj populaciji je alel STR_MICA-A5 statistički značajno češće nađen u bolesnika s AITD-om u odnosu na kontrolu, a to je u skladu s podacima grupe autora iz 2003. godine koji su među djecom oboljelom od GB uočili kao najčešće alele STR_MICA-A5.1 i STR_MICA-A6 (Lo i sur., 2003).

Brojni radovi pokazali su povezanosti tri istraživane bolesti s genima HLA-DRB1*03 i HLA-DRB1*04 istraživanjima provedenim u drugim populacijama (Golden i sur., 2005; Jacobson i sur., 2008; Dittmar i sur., 2008; Raha i sur., 2009; Fourati i sur., 2011). I među našim bolesničkim skupinama s DMT1 i APS3v-om uočena je povezanost s HLA-DRB1*04 i HLA-DRB1*03, a među našim bolesnicima s AITD-om uočena samo povezanost s genom HLA-DRB1*04 što je u skladu s rezultatima Goldena i suradnika iz 2005. godine (Golden i

sur., 2005). Zanimljiv je podatak da je AITD među brazilskom populacijom također povezan s genom HLA-DRB1*03, što potvrđuje europsko porijeklo tamošnjih doseljenika (Jacobson i sur., 2008). S druge strane, rizični gen za nastanak AITD-a u populaciji Kine je gen HLA-DRB1*09, što nije slučaj među našim bolesnicima s AITD-om gdje je samo jedan bolesnik imao ovaj gen (Jacobson i sur., 2008). Međutim, treba napomenuti da je učestalost gena HLA-DRB1*09 u hrvatskoj populaciji općenito niska što je u skladu s podacima za druge populacije europskog porijekla (Ikegami i sur., 2006).

Na temelju dobivenih rezultata ispitivane smo skupine bolesnika podijelili na bolesnike pozitivne za HLA-DRB1*03 i/ili DRB1*04 i na bolesnike negativne na navedene gene HLA-DRB1 te pratili raspodjelu alela lokusa STR_MICA. Cilj nam je bio utvrditi imaju li aleli STR_MICA neovisan utjecaj na podložnost/zaštitu za razvoj ovih bolesti ili je rezultat neravnoteže udruživanja s genima HLA-DRB1.

Dobiveni rezultati u ovom radu ne ukazuju na neovisnu povezanost alela STR_MICA s DMT1 i APS3v-om jer nismo uočili razlike između podijeljenih skupina bolesnika, što je u skladu s rezultatima iz nekih ranije provedenih istraživanja (Bilbao, 2002; Field i sur., 2008; Raha i sur., 2009). Međutim, postoje i suprotni rezultati istraživanja u kojima je utvrđeno da utjecaj alela STR_MICA nije posljedica neravnoteže udruživanja s genima HLA-DRB1 (Gambelunghe i sur., 2001; Park i sur., 2001; Shtauvere-Brameus i sur., 2002, Bilbao, 2002).

Na temelju naših rezultata, ali i malobrojnih studija o povezanosti alela STR_MICA u nastanku istraživanih bolesti na kraju možemo reći da je neophodno nastaviti istraživanja na većem broju ispitanika i u većem broju populacija.

6. ZAKLJUČCI

1. U skupini bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 niti jedan od alela STR_MICA nije pokazao podložnu/zaštitnu ulogu u razvoju bolesti. Najčešći aleli bili su alel STR_MICA-A6 i STR_MICA-A5.1.

2. Među bolesnicima s autoimunim poliglandularnim sindromom tipa 3 zaštitni alel za nastanak bolesti je alel STR_MICA-A4. Iako se alel STR_MICA-A5 dvostruko češće pojavljivao u skupini bolesnika s APS3v-om u odnosu na kontrolu ta razlika nije statistički značajna, stoga se ne može smatrati rizičnim alelom za nastanak APS3v-a.

3. Bolesnici s autoimunom bolesti štitnjače su statistički značajno ($p=0,05$) češće imali alel STR_MICA-A5 u usporedbi s kontrolom što ukazuje na njegovu moguće podložnu ulogu za razvoj AITD-a.

4. Geni HLA-DRB1*04 i -DRB1*03 su podložni geni za nastanak DMT1-a i APS3v-a, dok su geni HLA-DRB1*07, -DRB1*11 i -DRB1*15 zaštitni za razvoj ovih bolesti.

5. Rizični gen za nastanak AITD-a je gen HLA-DRB1*04, dok ni jedan od testiranih gena HLA-DRB1 nije pokazao zaštitnu ulogu.

6. Povezanost alela mikrosatelita STR_MICA s nastankom DMT1, APS3v-a i AITD-a ovisna je o genima HLA-DRB1, tj. rezultat je neravnoteže udruživanja.

7. Bolesnici s DMT1 i APS3v-om imaju isti HLA-DRB1 profil, dok bolesnici s AITD-om pokazuju drugačiji HLA-DRB1 profil.

7. LITERATURA

Andreis I. Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. (2010): *Imunologija, sedmo obnovljeni i dopunjeno izdanje*. Medicinska naklada, Zagreb, str. 100-104, 110, 344.

Bilbao J. R., Martin-Pagola A., Calvo B., Perez de Nanclares G., Gepv N., Castano L. (2002): *Contribution of MIC-A polymorphism to type 1 diabetes mellitus in Basques*. Ann N Y Acad Sci. 958: 321-24.

Bodmer W. F. (1987): *The HLA system: structure and fuction.* J Clin Pathol. 40: 948-958.

Bolognesi E., Dalfonso S., Rolando V., Fasano M. E., Pratico L., Momigliano-Richiardi P. (2001): *MICA and MICB microsatellite alleles in HLA extendes haplotypes*. Eur J Immunogenet. 28: 523-30.

Chen D., Gyllensten U. (2014): *MICA polymorphism: biology and importance in cancer*. Carcinogenesis 35: 2633-42.

Ding Y., Xia B., Lü M., Zhang Y., Li J., Ye M., Luo H., Yu J., Zhang X., Tan J. (2005): *MCH class I chain-related gene A-A5•1 allele is associated with ulcerative colitis in Chinese population.* Clin Exp Immunol. 142: 193-98.

Dixon F. J. (2001): *Advances in immunology*. U: Bahram S. (ur.) MIC genes: From genetics to biology. Academic Press, Sjedinjene Američke Države.

Dittmar M., Ide M., Wurm M., Kahaly G. J. (2008): *Early onset of polyglandular failure is associated with HLA-DRB1*03*. Eur J Endocrinol. 159: 55-60.

Farid N. R. (2000): *The immunogenetics of autoimmune disease*. CRC Press, Florida, str. 173.

Fernando M. M. A., Stevens C. R., Walsh E. C., De Jager P. L., Goyette P., Plenge R. M., Vyse T. J., Rioux J. D. (2008): *Defining the role of MHC in autoimmunnity: A review and pooled analysis*. PLoS Genet. 4: 1-9.

Field S. F., Nejentsev S., Walker N. M., Howson J. M. M., Godfrey L. M., Jolley J. D., Hardy M. P. A, Todd J. A. (2008): *Sequencing-based genotyping and association analysis of the MICA and MICB genes in type 1 diabetes*. Diabetes 57: 1753-56.

Fourati H., Mahfoudh N., Abida O., Kammoun A., Mnif F., Haddouk S., Ben Ayed M., Ben Hadj Hmida Y., Rekik N, Abid M, Makni H., MAsmoudi H. (2011): *HLA-*

DRB1/DQB1 susceptibility for autoimmune polyglandular syndrome type II and III in south of Tunisia. Ann Endocrinol. 72: 232-38.

Frigoul A., Lefranc M. P. (2005): *MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphism and diseases*. Res Devel Human Genet. 3: 94-145.

Gambelunghe G., Falorni A., Ghaderi M., Laureti S., Tortoioli C., Santeusanio F., Brunetti P., Sanjeevi C. B. (1999): *Microsatellite polymorphism of the MHC class I-chain related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk of autoimmune Addison's disease*. J Clin Endocrinol Metab. 84: 3701-07.

Gambelunghe G., Ghaderi M., Tortoioli C., Falorni A., Santeusanio F., Brunetti P., Sanjeevi C. B., Falorni A. (2001): *Distinct MICA gene markers discriminate major autoimmune diabetes types*. J Clin Endocrinol Metab. 86: 3754-60.

Golden B., Levin L., Ban Y., Concepcion E., Greenberg D. A., Tomer Y. (2005): *Genetic analysis of families with autoimmune diabetes and thyroiditis: Evidence for common and aunique genes*. J Clin Endocrinol Metab. 98: 4904-11.

Gorodezky C., Alaez C., Murguia A., Rodriguez A., Balladares- A., Vasquez M., Flores H., Robles C. (2006): *HLA and autoimmune disease: Type 1 diabetes (T1D) as an example*. Autoimmun Rev. 5: 187-94.

Gough S. C. L., Simmonds M. J. (2007): *The HLA region and autoimmune disease: Associations and mechanisms of action.* Curr Genomics 8: 453-65.

Grgičević D. i suradnici. (2006): *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*. U: Kerhin-Brkljačić V. i Grubić Z. (ur.) Glavni sustav tkivne snošljivosti u ljudi, Medicinska naklada, Zagreb, str. 254-258.

Grubić Z., Perić P., Čečuk-Jeličić E., Žunec R., Štingl K., Ćurković B., Kerhin-Brkljačić V. (2004): *The MICA-A4 triplet repeats polymorphism in the transmembrane region confers additional risk for development of psoriatic arthritis in the Croatian population.* Eur J Immunogenet. 31: 93-98.

Grubić Z., Štingl K., Žunec R., Car H., Čečuk-Jeličić E., Ćurković B., Brkljačić-Kerhin V. (2006): *Linkage disequilibria between human leucocyte antigen-B and closely linked microsatellites in the Croatian population.* Journal compliation 69: 86-94.

Hansen M. P., Matheis N., Kahaly G. J. (2015): *Type 1 diabetes and polyglandular autoimmune syndrome: A review*. World J Diabetes 6: 67-79.

Huber A., Menconi F., Corathers S., Jacobson E. M., Tomer Y. (2008): *Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes ad autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanism*. Endocr Rev. 29: 697-725.

Ide M., Dittmar M., Wurm M., Kanitz M., Kahaly G. J. (2007): *Polymorphismen des MICA-Mikrosatelliten bei thyreoidaler Autoimmunität.* Medizinische Klinik 102: 11-15.

Ikegami H., Fujisawa T., Kawabata Y., Noso S., Ogihara T. (2006): *Genetics of type 1 diabetes: similarities and differences between Aisan and Caucasian populations*. Ann N Y Acad Sci. 1079: 51-59.

Jacobson E. M., Huber A., Tomer Y. (2008): *The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: From epidemiology to etiology*. J Autoimmun. 30: 58-62.

Klein J., Sato A. (2000): *The HLA system*. N Engl J Med. 343: 702-709.

Lahita R.G., Tsokos G., Buyon J., Koike T. (2011): *Systemic lupus erythematosus, fifth edition.* Academic Press, London, str. 3.

Lee Y. J., Huang F. Y., Wang C. H., Lo F. S:, Tsan K. W., Hsu C. H., Huang C. Y., Chang S. C, Chang J. G. (2000): *Polymorphism in the transmembrane region of MICA gene and type 1 diabetes*. J Pediatr Endocrinol Metab. 13: 489-96.

Lin L., Yang W., Chen E., Gong Z., Luo Q. Z., Wei X. B., Yu P. (2015): *MIC gene polymorphism and haplotype diversity in Li nationality of Southern China*. Tissue Antigens 85: 45-49.

Lo F. S., Lee Y. J., Huang C. Y., Lin C. H., Chang S. C., Dang C. W., Liu H. F. (2003): *Polymorphism in the transmembrane region of the major histocompatibility complex class I chain-related gene A: association of five GCT repetitions with Graves' disease in children*. Thyroid 13: 839-43.

Marsh S. G. E., Parham P., Barber L. D. (2000): *The HLA facts book.* Academic Press, London, str. 52-82.

Mehra N. K. (2010): *The HLA complex in biology and medicine: A resource book*. Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd., New Delhi: 206-240, 276.

Mungall A. J., Palmer S. A., Sims S. K., Edwards C. A., Ashurst J. L., Wilming L., Jones M. C., Horton R. i sur. (2003): *The DNA sequence and analysis of human chromosome 6*. Nature 425: 805-11.

Nejentsev S., Gombos Z., Laine A. P., Veijola R., Knip M., Simell O., Vaarala O., Akerblom H. K., Ilonen J. (2000): *Non-class II HLA gene associated with type 1 diabetes maps to the 240-kb region near the HLA-B*. Diabetes 49: 2217-21.

Oliveira L. A., Ribas F., Bicalho M. G., Tsuneto L. T., Petzl-Erler M. L. (2008): *High frequencies of alleles MICA*020 and MICA*027 in Amerindians and evidence of positive selection on exon 3*. Genes Immun. 9: 697-705.

Oksenberg J., Brassat D. (2006): *Immunogenetics of autoimmune disease*. Landes Bioscience, Sjedinjene Američke Države, str. 67.

Parham P., Adams E. J., Arnett K. L. (1995): *The origins of HLA-A, B, C polymorphism.* Immunol Rev. 143: 141-180.

Park Y., Lee H., Sanjeevi C. B., Eisenbarth G.S. (2001): *MICA polymorphism is associated with type 1 diabetes in the Korean population.* Diabetes Care 24: 33-38.

Raha O., Chowdhury S., Dasgupta S., Raychaudhuri P., Sarkar B. N., Veer Raju P., Rao V. R. (2009): *Approaches in type 1 diabetes research: A status report*. Int J Diabetes Dev Ctries. 29: 85-101.

Rose N. R., Mackay I. R. (2014): *The autoimmune diseases.* Fifth edition. Academic Press, London, str. 19.

Schott M., Scherbaum W. A. (2006): *Autoimmune thyroid disease*. Dtsch Arztebl. 103: 3023-32.

Sens-Abuazar C., Santos P. S., Bicalho M. G., Petzl-Erler M. L., Sperandio-Roxo V. (2009): *MHC microsatellites in a Southern Brazilian population*. Int J Immunogenet. 63: 269-274.

Sertić J. (2008): *Klinička kemija i molekularna dijagnostika*. U: Žunec R. (ur.) Molekularna tipizacija HLA, primjena u transplantaciji i dijagnostici. Medicinska naklada, Zagreb, str. 292-300.

Shiina T., Hosomici K., Inoko H., Kulsku J.K. (2009): *The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease.* J Hum Genet. 54: 15-39.

Shoenfeld Y., Cervera R., Gershwin M. E. (2010): *Diagnostic criteria in autoimmune diseases*. U: Ticani A. i sur. (ur.) Autoimmune polyendocrine syndromes. Springer Science & Business Media, Sjedinjene Američke Države, str. 265-270.

Shtauvere-Brameus A., Ghaderi M., Rumba I., Sanjeevi C. B. (2002): *Microsatellite allele 5 of MHC class I chain-related gene A increases the risk for insulin-dependent diabetes mellitus in Latvians.* Ann N Y Acad Sci. 958: 349-52.

Sperling M. A. (2003): *Type 1 diabetes: Etiology and treatment*. Springer Science i Business Media, New York, str. 3-54.

Starčević Čizmarević N., Mijandrušić-Sinčić B., Licul V., Kapović M., Ristić S. (2015): *Geni i celijakija*. Paediatr Croat. 59: 88-98.

Stephens H. A. (2001): *MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?* Trends Immunol. 22: 378-85.

Stipančić G., La Grasta Sabolić L., Malenica M., Radica A., Škrabić V., Kujundžić Tiljak M. (2008): *Incidence and trends of childhood type 1 diabetes in Croatia from 1995 to 2003*. Diabetes Res Clin Pract. 80: 122-127.

Thorsby E. (2009): *A shirt history of HLA.* Tissue Antigens 74: 101-116.

Veskler B. A. (2005): *Trends in immunology research*. U: Gambelunghe G., Falorni A. (ur.) MICA gene: New polymorphic major histocompatibility complex (MHC) susceptibility gene for autoimmune endocrine diseases. Nova Biomedical Books, New York, str. 17-32.

Žunec R., Grubić Z., Balen S. (2011): *Važnost imunogenetike u transplantaciji organa*. Medix 92/93: 208-213.

ELEKTRONSKI IZVORI PODATAKA

1. http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html
2. http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html
3. http://hla.alleles.org/alleles/classo.html

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Marina Bošnjak

Plješevička 56, 31000 Osijek (Hrvatska)

(+385) 98 955 91 93

marina.bosnjak13@gmail.com

Spol Žensko | Datum rođenja 21/08/1992 | Državljanstvo hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

svibanj 2013–srpanj 2013

Pomoćni radnik u tiskari

Glas Slavonije
31000 Osijek (Hrvatska)

- slaganje novina
- umetanje različitih reklamnih proizvoda

rujan 2014–listopad 2015

Supervizor, promotorica

Kuna Event d.o.o.
Psunjska ulica 48, 31000 Osijek (Hrvatska)

- rad s ljudima
- rad s novcima
- terenski rad
- vođenje tima

studeni 2014–prosinac 2015

Promotorica

EX-ALTO d.o.o.
Zavrtnica 17/1, 10000 Zagreb (Hrvatska)

- rad s ljudima

srpanj 2015–veljača 2016

Pomoćno osoblje u ugostiteljskom objektu

Kubo d.o.o.
Ulica kneza Trpimira 16, 31000 Osijek (Hrvatska)

- rad s ljudima

travanj 2016–danas

Supervizorica, promotorica

DEKRA d.o.o.
Horvatova 82, 10000 Zagreb (Hrvatska)

- rad s ljudima
- držanje edukacija
- vođenje tima
- organizacija posla

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

rujan 1999–lipanj 2007

Osnovna škola "Retfala"
Kapelska 51a, 31000 Osijek (Hrvatska)

rujan 2007–svibanj 2011

Klasičar

Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku
Trg Vatroslava Lisinskog 1, 31000 Osijek (Hrvatska)

rujan 2011–rujan 2014

Prvostupnica (baccalaurea) biologije

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Odjel za biologiju
Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek (Hrvatska)

- glavni predmeti: biologija stanice, mikrobiologija, botanika, zoologija, biokemija, kemija (organska, anorganska), anatomija (čovjeka, biljaka i životinja), evolucija, neurobiologija, fiziologija (čovjeka, biljaka i životinja), genetika, biogeografija i dr.
- determiniranje pojedinih vrsta biljaka, životinja i algi
- rad na terenu i uzorkovanje
- rad u laboratoriju

rujan 2014–danas

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb (Hrvatska)

- glavni predmeti: Imunologija i imunogenetika, Metode u imunologiji, Opća onkologija, Molekularna onkologija, Parazitologija, Neurofiziologija i endokrinologija, Transplantacijska imunologija, Neuroimunologija, Biologija starenja, Osnove patofiziologije, Biološka antropologija, Fiziologija metabolizma i bioenergetika, Virusi i subvirusni patogeni, Ekofiziologija životinja i dr.

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik: Hrvatski

Ostali jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C1	C1	C1	C1	C1
njemački	A1	A1	A1	A1	A2

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine: Sposobnost timskog te samostalnog rada. Odgovornost prema poslu te jako dobre komunikacijske vještine. Vještine stečene na poslu, tijekom fakultetskog obrazovanja, izlaganjem različitih seminara, prijedloga istraživanja i slično.

Organizacijske / rukoviteljske vještine: Organizacijske vještine stečene na poslu i fakultetu, vođenjem i sudjelovanjem na određenim projektima. Sposobnost preuzimanja uloge vođe tima i upravljanje ljudima.

Poslovne vještine

Upoznata s radom u laboratorijima, opremom i strojevima koji se u njima nalaze. Znanje stečeno kroz brojne praktikumske zadatke i izradu diplomskoga rada.

Digitalna kompetencija

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

Informacijsko-komunikacijske tehnologije - tablica za samoprocjenu

Napredno korištenje Microsoft Office alatima. Vrlo dobro se služim radom na računalu, uključujući korištenje brojnih programa i interneta te uklanjanje pogrešaka ukoliko se pojave.

Ostale vještine

Tijekom fakultetskog obrazovanja upoznata sam s radom na terenu (planinarenje na Bjelolasicu, terenska nastava u PP Kopački rit, Pulu, Sunger, ribnjak Grudnjak).

Izvrsna prostorna organizacija.

Vozačka dozvola

AM, B

DODATNE INFORMACIJE

Suosnivačica udruge studenata biologije ZOA - Osijek.

Volonterka u Volonterskom centru Osijek.

Datum popunjavanja ili zadnjeg ažuriranja životopisa

10.02.2017.