

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maruša LAMPIČ

**VPLIV POLIMORFIZMA GENOV *HLA*
NA DOVZETNOST ZA HASHIMOTOV TIROIDITIS
PRI OTROCIH S SLADKORNO BOLEZNIJO TIPA 1**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maruša LAMPIČ

**VPLIV POLIMORFIZMA GENOV *HLA* NA DOVZETNOST ZA
HASHIMOTOV TIROIDITIS PRI OTROCIH S SLADKORNO
BOLEZNIJO TIPA 1**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF *HLA* POLYMORPHISM ON THE
SUSCEPTIBILITY TO HASHIMOTO'S THYROIDITIS IN
CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo v Centru za tipizacijo tkiv na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 10. novembra 2011 za mentorico imenovala prof. dr. Tanjo Kunej in somentorico doc. dr. Blanko Vidan-Jeras.

Recenzent: doc. dr. Jernej JAKŠE

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Tanja KUNEJ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Blanka VIDAN-JERAS

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Center za tipizacijo
tkiv

Član: doc. dr. Jernej JAKŠE

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 24. september 2012

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Maruša LAMPIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 575:616(043.2)=163.6
KG molekularna genetika/geni HLA/polimorfizem/medicina/
Hashimotov tiroiditis/sladkorna bolezen
AV LAMPIČ, Maruša
SA KUNEJ, Tanja (mentor)/VIDAN-JERAS, Blanka (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2012
IN VPLIV POLIMORFIZMA GENOV *HLA* NA DOVZETNOST ZA
HASHIMOTOV TIROIDITIS PRI OTROCIH S SLADKORNO BOLEZNIJO
TIPA 1
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIV, 64 str., 14 pregl., 14 sl., 1 pril., 83 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Avtoimunski endokrini bolezni sladkorna bolezen tipa 1 (T1D) in Hashimotov
tiroiditis (HT) se pogosto se pojavljata sočasno pri istem posamezniku ali družini,
zato obstaja možnost za skupno genetsko etiologijo, najverjetneje povezano z
avtoimunostjo. V naši študiji smo z metodama PCR-SSO in PCR-SSP tipizirali in
primerjali alele *HLA* I. in II. razreda skupin bolnikov s T1D, T1D+HT in kontrolne
skupine. Ugotovili smo, da so s povišanim tveganjem za razvoj T1D in T1D+HT
povezani aleli, ki so del haplotipov *DR4-DQ8* in *DR3-DQ2-B8*, z znižanim
tveganjem pa aleli, ki so del haplotipov *DR1-DQ5*, *DR11-DQ7*, *DR13-DQ5/6*,
DR15-DQ5/6 in *DR14-DQ5* (slednja le pri T1D). Večina alelov je pokazala
močnejšo povezavo s T1D samo kot z obema boleznima. Skupne etiologije bolezni
nismo mogli z gotovostjo potrditi. Ugotavljamо tudi možen vpliv aminokislinskih
ostankov na 86., 71. in 74. mestu verige DR β ter 57. in 45. mestu verige DQ β
molekul HLA na dovzetnost za bolezni.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 575:616(043.2)=163.6
CX molecular genetics/genes HLA/polymorphism/medicine/
Hashimoto's thyroiditis/diabetes
AU LAMPIČ, Maruša
AA KUNEJ, Tanja (supervisor)/VIDAN-JERAS, Blanka (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Programme in
Biotechnology
PY 2012
TI THE EFFECT OF *HLA* POLYMORPHISM ON THE SUSCEPTIBILITY TO
HASHIMOTO'S THYROIDITIS IN CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIV, 64 p., 14 tab., 14 fig., 1 ann., 83 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Autoimmune endocrine diseases type 1 diabetes (T1D) and Hashimoto's thyroiditis (HT) often coexist in the same individual or family, therefore common genetic etiology has been proposed, presumably connected to autoimmunity. We performed genetic typings of *HLA* class I and class II alleles using PCR-SSO and PCR-SSP methods. We then compared the results of typing of patients with T1D, T1D+HT and control group. We conclude that patients with T1D and T1D+HT significantly over-represent alleles present in *DR4-DQ8* and *DR3-DQ2-B8* haplotypes, and significantly under-represent alleles present in *DR1-DQ5*, *DR11-DQ7*, *DR13-DQ5/6*, *DR15-DQ5/6* and *DR14-DQ5* haplotypes (*DR14* is under-represented only in T1D patients). Most of the alleles expressed a stronger correlation with T1D alone than with T1D+HT. Common etiology of the diseases could not be confirmed. We propose possible effects of amino acids at positions 86, 71 and 74 of HLA-DR β chain, and amino acids at positions 57 and 45 of HLA-DQ β chain to disease susceptibility.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
Slovarček	XIV
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KOMPLEKS <i>HLA</i>	3
2.2 NOMENKLATURA SISTEMA <i>HLA</i>	4
2.2.1 Imunološka nomenklatura	4
2.2.2 Molekularna nomenklatura	4
2.3 DEDOVANJE GENOV <i>HLA</i>	5
2.4 VEZAVNO NERAVNOVESJE	6
2.5 POLIMORFIZEM REGIJE GENOV <i>HLA</i>	6
2.6 SELEKCIJA V PRID POLIMORFIZMU IN HETEROZIGOTNOSTI TER RAZLAGA RAZNOLIKOSTI MOLEKUL <i>HLA</i> MED RAZLIČNIMI POPULACIJAMI	7
2.7 ZGRADBA MOLEKUL <i>HLA</i>	8
2.7.1 Molekule <i>HLA I.</i> razreda	8
2.7.2 Molekule <i>HLA II.</i> razreda	9
2.8 FUNKCIJE MOLEKUL <i>HLA</i>	10
2.8.1 Vloga molekul <i>HLA</i> pri naboru TCR	10
2.8.2 Vloga molekul <i>HLA</i> pri celičnem imunskem odzivu	11
2.8.2.1 Molekule <i>HLA I.</i> razreda	11
2.8.2.2 Molekule <i>HLA II.</i> razreda	11

2.9	IMUNOLOŠKA TOLERANCA IN POJAV AVTOIMUNOSTI	12
2.10	POVEZANOST GENOV <i>HLA</i> Z AVTOIMUNSKIMI BOLEZNIMI	13
2.11	SLADKORNA BOLEZEN TIPA 1	15
2.11.1	Genetski dejavniki za T1D	15
2.11.2	T1D in <i>HLA</i>	15
2.12	HASHIMOTOV TIROIDITIS	16
2.12.1	Genetski dejavniki za HT	17
2.12.2	HT in <i>HLA</i>	17
2.12.3	Skupna genetska predispozicija za T1D in AITD	18
2.13	METODE TIPIZACIJE GENOV <i>HLA</i>	19
2.13.1	Metoda, ki uporablja PCR in hibridizacijo s sekvenčno specifičnimi oligonukleotidi (PCR-SSO, angl. <i>polymerase chain reaction based sequence-specific oligonucleotide hybridisation</i>) ter tehnologijo Luminex	19
2.13.2	Metoda, ki uporablja PCR s sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (PCR-SSP, angl. <i>polymerase chain reaction based sequence-specific priming</i>)	21
3	MATERIALI IN METODE	22
3.1	PREISKOVANCI	22
3.2	IZVEDBA TIPIZACIJE GENOV <i>HLA</i>	22
3.3	PRIPRAVA AGAROZNEGA GELA ZA ELEKTROFOREZO	23
3.3.1	Material	23
3.3.2	Postopek dela	23
3.4	TIPIZACIJA <i>HLA-A</i> , <i>HLA-B</i> , <i>HLA-DQB1</i> in <i>HLA-DRB1</i> Z METODO, KI UPORABLJA PCR IN HIBRIDIZACIJO S SEKVENČNO SPECIFIČNIMI OLIGONUKLEOTIDI (PCR –SSO) TER TEHNOLOGIJO LUMINEX	23
3.4.1	Material	23
3.4.2	Postopek dela	25
3.4.2.1	Priprava mešanice za PCR in pomnoževanje	25
3.4.2.2	Kontrola produktov pomnoževanja	26
3.4.2.3	Denaturacija in nevtralizacija	26
3.4.2.4	Hibridizacija	27
3.4.2.5	Označevanje	28

3.3.2.6 Izvajanje meritev z aparaturom LABScan 100 in analiza podatkov	28
3.5 TIPIZACIJA IN SUBTIPIZACIJA <i>HLA</i> Z METODO, KI UPORABLJA PCR S SEKVENČNO SPECIFIČNIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI (PCR-SSP)	29
3.5.1 Material	29
3.5.2 Postopek dela	29
3.5.2.1 Priprava mešanice za PCR in pomnoževanje	29
3.5.2.2 Zaznavanje produktov na elektroforeznem gelu	29
3.5.2.3 Analiza rezultatov	30
3.6 STATISTIČNE METODE	31
4 REZULTATI	33
4.1 VREDNOTENJE REZULTATOV	33
4.1.1 Vrednotenje rezultatov, pridobljenih z metodo PCR-SSO	33
4.1.2 Vrednotenje rezultatov, pridobljenih z metodo PCR-SSP	34
4.2 VSI V RAZISKAVI ZAZNANI ALELI <i>HLA</i> IN DELEŽI STATISTIČNO POMEMBNIH ALELOV <i>HLA</i>	36
4.3 ALELI IN HAPLOTIPI <i>HLA</i>, POVEZANI S POVIŠANIM TVEGANJEM ZA RAZVOJ T1D IN T1D+HT	37
4.3.1 T1D v primerjavi s kontrolno skupino	37
4.3.2 T1D+HT v primerjavi s kontrolno skupino	37
4.3.3 T1D v primerjavi s T1D+HT	38
4.3.4 Haplotipi, povezani s povиšanim tveganjem za nastanek T1D in T1D+HT	38
4.4 ALELI IN HAPLOTIPI <i>HLA</i>, POVEZANI Z ZNIŽANIM TVEGANJEM ZA T1D IN T1D+HT	39
4.4.1 T1D v primerjavi s kontrolno skupino	39
4.4.2 T1D+HT v primerjavi s kontrolno skupino	40
4.4.3 T1D v primerjavi s T1D+HT	40
4.4.4 Haplotipi, povezani z znižanim tveganje za T1D in T1D+HT	40
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	41
5.1 DELEŽ ALELOV <i>HLA</i>, ZAZNANIH V NAŠEM VZORCU SLOVENSKE POPULACIJE, V PRIMERJAVI Z VSEMI DO ZDAJ ZNANIMI ALELI <i>HLA</i>	41

5.2	HAPLOTIPI, POVEZANI S POVIŠANIM TVEGANJEM ZA RAZVOJ T1D IN T1D+HT	41
5.3	HAPLOTIPI, POVEZANI Z ZNIŽANIM TVEGANJEM ZA RAZVOJ T1D IN T1D+HT	42
5.4	VLOGA POSAMEZNIH ALELOV IN AMINOKISLINSKIH OSTANKOV	42
5.4.1	<i>DRB1*11</i>	44
5.4.2	<i>DRB1*04</i>	44
5.4.3	<i>DRB1*03:01</i>	45
5.4.4	<i>DQB1*03</i>	45
5.4.5	<i>DQB1*05</i>	46
5.4.6	<i>B*27</i>	47
5.4.7	<i>DQB1*06</i>	47
5.4.8	<i>DRB1*01:01</i>	47
5.4.9	<i>DRB1*14:01</i>	47
5.5	PROBLEM VREDNOTENJA REZULTATOV ASOCIACIJSKIH ŠTUDIJ	48
5.6	SKLEPI	50
5.7	NADALJNJE DELO	50
6	POVZETEK	52
7	VIRI	54

ZAHVALA**PRILOGE**

Priloga A: Vse skupine alelov/aleli, zaznane pri kontrolni skupini, bolnikih s T1D in bolnikih s T1D+HT, njihova pogostnost pojavljanja ter vrednosti p in RR za kombinacije skupin T1D in K, T1D+HT in K ter T1D in T1D+HT

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Imunološka nomenklatura alelov <i>HLA</i> (prirejeno po <i>HLA Antigens..., 2011</i>)	4
Preglednica 2: Molekularna nomenklatura alelov <i>HLA</i> (prirejeno po <i>Nomenclature of Factors..., 2011</i>)	4
Preglednica 3: Specifičnosti <i>HLA</i> , ki so povezane s povišanim tveganjem za različne avtoimunske bolezni (prirejeno po <i>Vozelj, 2000; Rodey, 2000</i>)	14
Preglednica 4: Sestava mešanice za PCR	25
Preglednica 5: Program, uporabljen za pomnoževanje DNA z metodo PCR	26
Preglednica 6: Priprava hibridizacijske mešanice	27
Preglednica 7: Priprava raztopine 1x SAPE	27
Preglednica 8: Priprava mešanice za pomnoževanje z metodo PCR	29
Preglednica 9: Temperaturni program za pomnoževanje z metodo PCR	30
Preglednica 10: 2x2 kontingenčna tabela, ki jo računalniški program uporablja za izračun rezultatov	31
Preglednica 11: Aleli <i>HLA</i> , povezani s povišanim tveganjem za razvoj T1D in T1D+HT	37
Preglednica 12: Aleli <i>HLA</i> , povezani s znižanim tveganjem za razvoj T1D in T1D+HT	39
Preglednica 13: Aminokislinski ostanki na nekaterih za vezavo peptidnega antiga na pomembnih mestih na verigi β molekul <i>HLA-DR</i> pri statistično pomembnih alelih	43
Preglednica 14: Aminokislinski ostanki na 57. mestu verige β molekul <i>HLA-DQ</i> pri statistično pomembnih alelih	43

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Genomska lokacija lokusa <i>HLA</i> (prirejeno po Mehra in Kaur, 2003)	3
Slika 2: Dedovanje genov <i>HLA</i>	5
Slika 3: Prikaz molekul I. (a) in II. razreda (b) in genskih zapisov zanju (prirejeno po Vidan-Jeras, 2003; Marsh in sod., 2000)	7
Slika 4: Zgradba molekul HLA I.razreda (prirejeno po Abbas in Lichtman, 2009: 52)	9
Slika 5: Zgradba molekul HLA II. razreda (prirejeno po Abbas in Lichtman, 2009: 53)	10
Slika 6: Vloga molekul HLA I. razreda (a) in II. razreda (b) pri imunskega odzivu (prirejeno po Abbas in Lichtman, 2009: 58)	12
Slika 7: Princip delovanja metode PCR-SSO (prirejeno po LABType SSO Class I..., 2011; Brescia, 2008)	20
Slika 8: Princip delovanja metode PCR-SSP	21
Slika 9: Analiza rezultatov s programom HLA Fusion	33
Slika 10: Odsek iz preglednice, kakršna je vnesena v program HLA Fusion (prirejeno po Bead probe information..., 2012)	34
Slika 11: Agarozni gel, slikan pod UV svetlobo, za subtipizacijo skupin alelov <i>HLA-DRB1*07</i> s komercialnim kompletem PCR-SSP HLA-DQB1 (Olerup SSP)	35
Slika 12: Vnos rezultata, pridobljenega z elektroforezno ločbo na agaroznem gelu, v program Olerup SSP AB SCORE	35
Slika 13: Preglednica, na podlagi katere deluje program Olerup SSP AB SCORE (prirejeno po Interpretation table..., 2012)	36
Slika 14: Vpliv 57. mesta verige DQ β na režo za vezavo peptida (prirejeno po Jeneway in sod., 2001)	46

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vse skupine alelov/aleli, zaznani pri kontrolni skupini, bolnikih s T1D in bolnikih s T1D+HT, njihova pogostnost pojavljanja ter vrednosti p ter RR za kombinacije skupin T1D in K, T1D+HT in K ter T1D in T1D+HT

Priloga A1: Skupine alelov *HLA-A*, zaznane pri kontrolni skupini, bolnikih s T1D in bolnikih s T1D+HT, njihova pogostnost pojavljanja ter vrednosti p in RR za kombinacije skupin T1D in K, T1D+HT in K ter T1D in T1D+HT

Priloga A2: Skupine alelov *HLA-B*, zaznane pri kontrolni skupini, bolnikih s T1D in bolnikih s T1D+HT, njihova pogostnost pojavljanja ter vrednosti p in RR za kombinacije skupin T1D in K, T1D+HT in K ter T1D in T1D+HT

Priloga A3: Aleli *HLA-DQB1*, zaznani pri kontrolni skupini, bolnikih s T1D in bolnikih s T1D+HT, njihova pogostnost pojavljanja ter vrednosti p in RR za kombinacije skupin T1D in K, T1D+HT in K ter T1D in T1D+HT

Priloga A4: Aleli *HLA-DRB1*, zaznani pri kontrolni skupini, bolnikih s T1D in bolnikih s T1D+HT, njihova pogostnost pojavljanja ter vrednosti p in RR za kombinacije skupin T1D in K, T1D+HT in K ter T1D in T1D+HT

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AITD	avtoimunske bolezni ščitnice (angl. <i>autoimmune thyroid diseases</i>)
AK	aminokislinski ostanek
Ala	alanin (A)
APC	antigen predstavljena celica (angl. <i>antigen presenting cell</i>)
Arg	arginin (R)
Asp	asparaginska kislina (D)
CTLA4	citotoksični T-celični antigen 4 (angl. <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>)
Cys	cistein (C)
dH ₂ O	deionizirana voda
Glu	glutaminska kislina (E)
Gly	glicin (G)
HLA	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl. <i>human leukocyte antigen</i>)
HSP-70	stresni protein HSP-70 (angl. <i>heat shock protein 70</i>)
HT	Hashimotov tiroiditis
Lys	lizin (K)
MFI	srednja fluorescenčna intenziteta (angl. <i>median fluorescence intensity</i>)
NS	ni statistično značilno
p	vrednost p
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-SSO	metoda, ki uporablja PCR in hibridizacijo s sekvenčno specifičnimi oligonukleotidi (angl. <i>polymerase chain reaction based sequence-specific oligonucleotide hybridisation</i>)
PCR-SSP	metoda, ki uporablja PCR s sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi; metoda, ki uporablja prileganje specifičnega zaporedja (angl. <i>polymerase chain reaction based sequence-specific priming</i>)
PTPN22	angl. <i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RR	relativno tveganje (angl. <i>relative risk</i>)

SAPE	R-fikoeritrin-konjugirani streptavidin (angl. <i>R-phycoerythrin-conjugated strepavidin</i>)
Ser	serin (S)
ssDNA	enoverižna DNA (angl. <i>single-stranded DNA</i>)
T1D	slatkorna bolezen tipa 1 (angl. <i>type I diabetes</i>)
T1D+HT	hkratna prisotnost slatkorne bolezni tipa 1 in Hashimotovega tiroiditisa pri istem bolniku
T ₃	trijodtironin (angl. <i>triiodothyronine</i>)
T ₄	tiroksin (angl. <i>thyroxine</i>)
TAP	angl. <i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-celični receptor (angl. <i>T-cell receptor</i>)
Tg	tiroglobulin
TNF	tumorje-nekrotizirajoči faktor (angl. <i>tumor necrosis factor</i>)
TPO	ščitnična peroksidaza (angl. <i>thyroid peroxidase</i>)
TSH	hormon, ki stimulira ščitnico (angl. <i>thyroid stimulating hormone</i>)
TSH-R	tirotropinski receptor, receptor za hormon, ki stimulira ščitnico (angl. <i>thyrotropin receptor, thyroid-stimulating hormone receptor</i>)
Val	valin (V)
VNTR	spremenljivo število tandemskih ponovitev (angl. <i>variable number tandem repeats</i>)

SLOVARČEK

GENI HLA: Genski kompleks *HLA* (angl. *human leukocyte antigen*) se nahaja na 6. kromosomu in predstavlja genetski zapis za molekule HLA I. razreda (HLA-A, -B, -C idr.) in molekule HLA II. razreda (HLA-DR, -DQ, -DP, -DM), ki so udeležene v predstavljanju mikrobnih antigenov celicam T in selekciji celic T v limfnih organih. Gre za zelo polimorfno regijo, ki jo povezujejo s povišano dovzetnostjo za mnoge avtoimunske bolezni.

POLIMORFIZEM: O polimorfizmu govorimo takrat, kadar sta v populaciji prisotna vsaj dva fenotipa (ali vsaj dva genotipa), od katerih ima vsak pogostnost pojavljanja vsaj 1%. Sistem *HLA* je eden najbolj polimorfnih genskih kompleksov v naravi.

VEZAVNO NERAVNOVESJE: Vezavno neravovesje je pojav, pri katerem dva ali več genov na istem kromosomu najdemo skupaj pogosteje, kot bi pričakovali glede na njihove posamične pogostnosti pojavljanja v populaciji.

HAPLOTIP: Termin haplotip se nanaša na kombinacijo genov, ki se zaradi fizične bližine na kromosomu v bloku prenese na potomca z enega starševskega kromosoma.

AVTOIMUNOST: Avtoimunost je definirana kot imunski odziv proti lastnim (avtolognim) antigenom in je posledica zatajitve mehanizmov imunske tolerance. Pojav avtoimunost je posledica delovanja mnogih genov, med katerimi so najpomembnejši geni *HLA*, in okoljskih dejavnikov.

HASHIMOTOV TIROIDITIS: Hashimotov tiroiditis je avtoimunska bolezen, za katero so značilne kronične vnetne spremembe ščitnice z infiltracijo celic T in prisotnost ščitničnih protiteles v serumu. Prevalenca je povišana pri posameznikih in družinah s sladkorno boleznijo tipa 1, zato obstaja možnost skupne etiologije obeh bolezni. Kot enega od dejavnikov tveganja omenjajo tudi alele *HLA*.

1 UVOD

Avtoimunske endokrine bolezni so bolezni, pri katerih zaradi napak v delovanju imunskega sistema pride do imunskega napada na lastne endokrine žleze. Najpogosteje avtoimunske endokrine bolezni so sladkorna bolezen tipa 1 (T1D, angl. *type 1 diabetes*) in avtoimunske bolezni ščitnice (AITD, angl. *autoimmune thyroid diseases*), kamor spada tudi Hashimotov tiroiditis (HT, angl. *Hashimoto's thyroiditis*).

Tako T1D kot HT sta za organ specifični bolezni - prva deluje na trebušno slinavko, druga na ščitnično žlezo - in imata podobno patogenezo, ki vključuje infiltracijo celic T. Na obe vpliva več genskih in okoljskih dejavnikov, pogosto pa se pojavita hkrati pri istem posamezniku ali v isti družini. V serumu 20% bolnikov s T1D je moč najti ščitnična protitelesa - od teh jih 50% razvije AITD. Protitelesa proti celicam trebušne slinavke so prisotna pri 2,3% otrok z AITD in pri 0% zdravih otrok (Levin in Tomer, 2003).

Zaradi skupnih točk študije nakazujejo, da bi etiologija teh dveh bolezni lahko temeljila na skupnih genetskih dejavnikih, najverjetneje povezanih z avtoimunostjo. Za vsaj dva imunoregulatorna gena, poglaviti histokompatibilnostni kompleks (*HLA*, angl. *human leukocyte antigen*) in citotoksični T-celični antigen 4 (*CTLA-4*, angl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), je bilo pokazano, da doprinašata k dovzetnosti za T1D in HT. Regija *HLA* je razen s tema dvema boleznima povezana še z razvojem več kot 500 drugih bolezni (Yang in sod., 2010), tipično kroničnih, povezanih z dolgotrajnimi vnetji in avtoimunostjo. Produkti genov *HLA* so molekule HLA, ki so ključno vpletene v predstavitev imunogenega peptida celicam T in v sprožitev imunskega odgovora. Posamezne alelne variante *HLA* lahko vplivajo na konformacijo molekule in tako večjo ali manjšo verjetnost za vezavo lastnih antigenov.

Cilj študije je bil identificirati alele *HLA*, ki so rizični ali zaščitni za HT v slovenski populaciji s T1D. Primerjali smo izsledke tipizacij bolnikov z obema boleznima (T1D+HT), bolnikov s samo T1D ter kontrolne skupine, ki so jo sestavljeni predstavniki zdrave slovenske populacije. Na ta način smo skušali zbrati morebitne dokaze za skupno etiologijo obeh bolezni in identificirati alele *HLA*, ki bi lahko bili specifično pomembni za

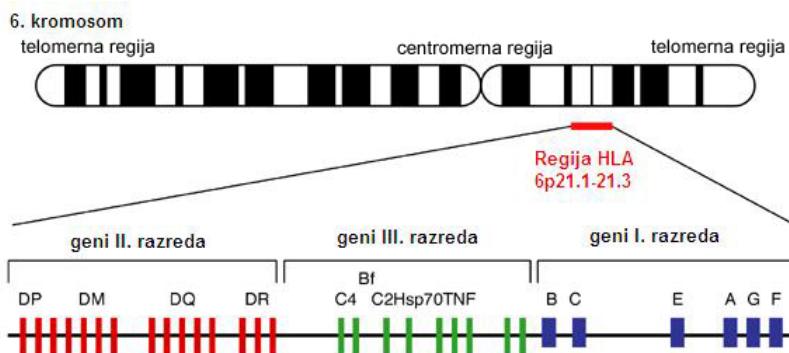
razvoj HT samega. S primerjanjem aminokislinskega zaporedja alelov smo skušali poiskati možne razloge za povišano tveganje za razvoj bolezni pri posameznikih z določenimi alelnimi variantami genov *HLA*.

Nadaljnje raziskave skupne genetike T1D in AITD ter boljše razumevanje mehanizma nastanka teh in drugih podobnih avtoimunskih bolezni bi lahko doprinesli k razvoju boljših načinov zdravljenja in preventivnih strategij, usmerjenih proti etiološkim dejavnikom, ki vodijo v avtoimunost.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KOMPLEKS HLA

Genski kompleks *HLA* zajema približno 4,1 Mb in več kot 200 genov na krajšem kraku 6. kromosoma, na regiji 6p21.1-21.3. Gene *HLA* združujemo v tri regije. Na centromernem koncu ležijo geni II. razreda, na telomernem geni I. razreda, v vmesni regiji pa geni III. razreda (Mehra in Kaur, 2003; Forbes in Trowsdale, 1999), kot prikazuje Slika 1.



Slika 1: Genomska lokacija lokusa *HLA* (prirejeno po Mehra in Kaur, 2003).

Znotraj regije *HLA* I. razreda se nahajajo tri polimorfna območja z geni za težko verigo klasičnih molekul HLA-A, -B in -C, neklasični geni *HLA-E*, *-F*, *-G*, *MICA*, *MICB* in mnogi psevdogeni. Psevdogeni so geni z mutacijami ali delecijami, ki onemogočajo njihovo izražanje. Lahka veriga molekul HLA I. razreda, β_2 -mikroglobulin, je kodirana na 15. kromosому (Rodey, 2000; Marsh in sod., 2000; Huges, 1995).

Na regiji *HLA* II. razreda se nahajajo zapisi za verigi α in β molekul HLA-DR, -DQ, -DP, -DM, pa tudi geni, katerih produkti sodelujejo pri tvorbi peptidov (*LMP2*, *LMP7*) in transportu peptidov v endoplazemski retikulum (*TAP1*, *TAP2*). Nekateri geni II. razreda so psevdogeni (Rodey, 2000).

Produkti regije *HLA* III. razreda so po strukturi in funkciji raznolike molekule. Med njimi so sestavine komplementa C4 in C2, faktor B, 21-hidroksilaza, tumorje-nekrotizirajoči

faktor (TNF, angl. *tumor necrosis factor*) in stresni protein HSP-70 (angl. *heat shock protein 70*) (Rodey, 2000). Ta regija ne vsebuje genov *HLA* (Forbes in sod., 1999).

2.2 NOMENKLATURA SISTEMA *HLA*

Danes sta v uporabi dve obliki nomenklature sistema *HLA*, imunološka in molekularna. Prva metoda, vzpostavljena leta 1975, temelji na specifičnih lastnostih genskih produktov *HLA* (epitopov), definiranih z imunološkimi (serološkimi ali celičnimi) tehnikami. Druga, v uporabi od leta 1987, temelji na alelih, odkritih z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja DNA (Rodey, 2000).

2.2.1 Imunološka nomenklatura

Preglednica 1 prikazuje načela poimenovanja sistema *HLA* z imunološko nomenklaturo.

Preglednica 1: Imunološka nomenklatura sistema *HLA* (prirejeno po HLA Antigens..., 2011)

<i>Nomenklatura</i>	<i>Pomen</i>
HLA-	regija <i>HLA</i>
HLA-A, HLA-C	podregije <i>HLA</i>
HLA-A23	ožja specifičnost, antigen
HLA-A23(9)	širša specifičnost A9 (v oklepaju) zajema ožji specifičnosti/antigena A23 in A24

2.2.2 Molekularna nomenklatura

Preglednica 2 prikazuje načela poimenovanja sistema *HLA* z molekularno nomenklaturo.

Preglednica 2: Molekularna nomenklatura sistema *HLA* (prirejeno po Nomenclature of Factors..., 2011)

<i>Nomenklatura</i>	<i>Pomen</i>
HLA-	regija <i>HLA</i>
HLA-DRB1	lokus <i>HLA</i>
HLA-DRB1*13	skupina alelov, ki kodirajo antigen DR13
HLA-DRB1*13:01	specifični alel

se nadaljuje

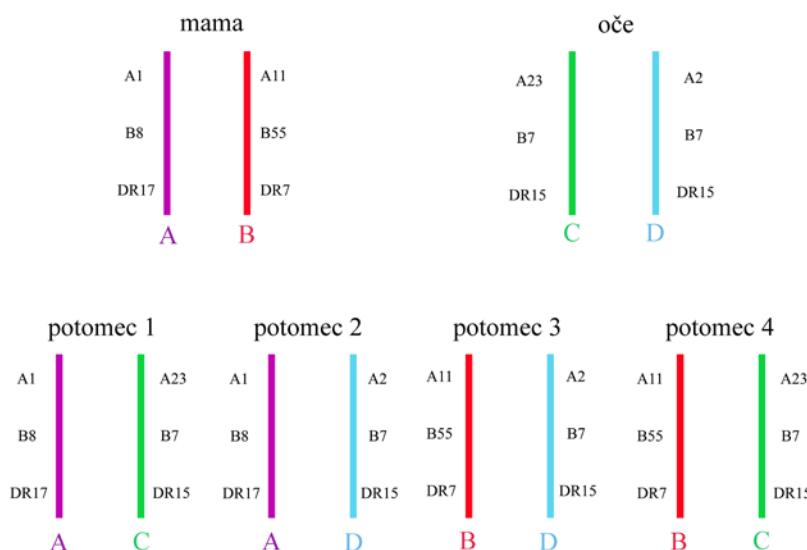
nadaljevanje

Nomenklatura	Pomen
<i>HLA-DRB1*13:01:02</i>	alel, ki se od <i>DRB1*13:01:01</i> razlikuje za sinonimno mutacijo
<i>HLA-DRB1*13:01:01:02</i>	alel, ki se od <i>DRB1*13:01:01</i> razlikuje za mutacijo zunaj kodirajoče regije
<i>HLA-A*24:09N</i>	alel, ki ni izražen, ne daje produkta (angl. <i>null</i>)
<i>HLA-A*30:14L</i>	alel, ki kodira protein z znižanim izražanjem na celični površini (angl. <i>low</i>)
<i>HLA-A*24:02:01:02L</i>	alel, ki kodira protein z znižanim izražanjem na celični površini, kjer je mutacija zunaj kodirajoče regije
<i>HLA-B*44:02:01:02S</i>	alel, ki kodira protein, ki je izražen le kot sekretorna molekula (angl. <i>secreted</i>)
<i>HLA-A*32:11Q</i>	alel z mutacijo, za katero je bilo pokazano, da vpliva na izražanje na celični površini, vendar to še ni bilo potrjeno (angl. <i>questionable</i>)

2.3 DEDOVANJE GENOV *HLA*

Geni sistema *HLA* se dedujejo kodominantno – potomec podeduje en gen vsakega lokusa od matere in drugega od očeta, na celicah se izražajo produkti obeh (Vidan-Jeras, 2003).

Primer dedovanja je prikazan na Sliki 4.



Slika 2: Dedovanje genov *HLA*.

Termin haplotip se nanaša na kombinacijo genov *HLA*, ki se zaradi fizične bližine na kromosomu v bloku prenese na potomca z enega starševskega kromosoma. Kljub kompleksnosti sistema *HLA* potomec torej navadno deduje enega od štirih možnih

genotipov. Verjetnost, da imata potomca identičen genotip, je 25%, če ne pride do rekombinacije (v približno 2% primerov). Rekombinantni haplotipi *HLA* so rezultat preloma kromatid in izmenjave dednega materiala med kromatidama v mejotski delitvi celice. Pogostnost rekombinacije med dvema lokusoma *HLA* je odvisna od razdalje med obema lokusoma (Rodey, 2000).

2.4 VEZAVNO NERAVNOVESJE

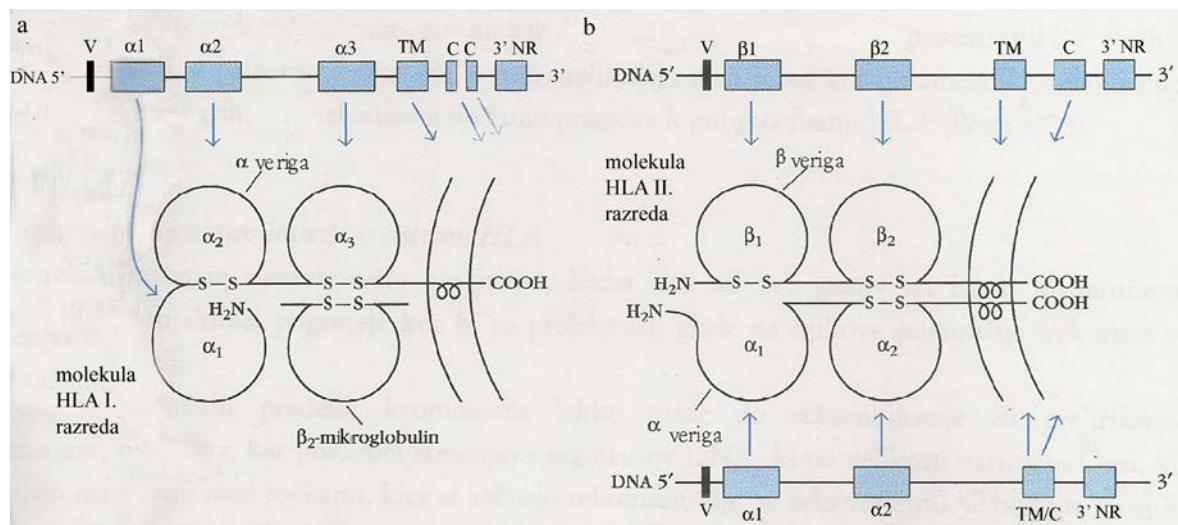
Vezavno neravovesje je pojav, pri katerem dva ali več genov na istem kromosому najdemo skupaj pogosteje, kot bi pričakovali glede na njihove posamične pogostnosti v populaciji. Med lokusi, ki se nahajajo zelo blizu skupaj, je rekombinacija redka. Znotraj regije *HLA* pride do prekrižanja v približno 2% primerov. Geni, ki se nahajajo med točkama začetka rekombinacije, se prenesejo na potomstvo združeni v skupine, kot haplotipi. Tako lahko ostanejo v vezavnem neravovesju skozi mnoge generacije. Določeni haplotipi so zaradi vezavnega neravovesja v nekaterih populacijah pogostejši kot v drugih (Vidan-Jeras, 2003; Rodey, 2000).

2.5 POLIMORFIZEM REGIJE GENOV *HLA*

O polimorfizmu govorimo takrat, kadar najdemo v populaciji vsaj dva fenotipa (ali vsaj dva genotipa), od katerih ima vsak pogostnost pojavljanja vsaj 1% (Klein, 1986). Sistem *HLA* je eden najbolj polimorfnih genskih kompleksov v naravi. Z genetskim tipiziranjem je bilo odkritih že preko 8000 alelov I. in II. razreda (IMGT/HLA Database..., 2012). K nastanku polimorfizma je prispevalo več mehanizmov, med njimi podvajanje, spremembe enega samega nukleotida in izmenjave različno dolgih nukleotidnih predelov. Variacije niso naključno razporejene, ampak so nakopičene v hipervariabilnih regijah, ki kodirajo domene za vezavo peptidnega antiga (Little in Parham, 1999).

Geni *HLA* I. razreda zajemajo osem eksonov, pri čemer prvi kodira vodilno sekvenco, drugi domeno $\alpha 1$, tretji domeno $\alpha 2$, četrти domeno $\alpha 3$, preostali eksoni pa vsebujejo zapis za citoplazemski rep molekule (Slika 3, a). Ker se pri molekulah I. razreda peptid veže v režo, ki jo tvorita domeni $\alpha 1$ in $\alpha 2$, ravno drugi in tretji ekson kažeta največji

polimorfizem. Podobno je sestavljen tudi genski zapis za molekulo HLA II. razreda (Slika 3, b). Geni kažejo največji polimorfizem v drugem eksonu, ki kodira domeni $\alpha 1$ in $\beta 1$, kamor se veže peptidni antigen. Tretji ekson kodira konstantni regiji $\alpha 2$ in $\beta 2$ in ni polimorfen (Goldsby in sod., 2001).



Slika 3: Prikaz molekul I. (a) in II. razreda (b) in genskih zapisov zanju (prijejeno po Vidan-Jeras, 2003; Marsh in sod., 2000). V – vodilno zaporedje; $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$ – eksoni, ki kodirajo verige α in β molekule HLA; TM – ekson, ki kodira transmembranski del molekule HLA; C – ekson, ki kodira citoplazemski rep molekule HLA; 3' NR – 3' neprevedena regija.

2.6 SELEKCIJA V PRID POLIMORFIZMU IN HETEROZIGOTNOSTI TER RAZLAGA RAZNOLIKOSTI MOLEKUL HLA MED RAZLIČNIMI POPULACIJAMI

Dejstvo, da je raznolikost lokusov *HLA* največja v eksonih, ki vsebujejo zapis za režo za vezavo peptida, kaže na to, da je polimorfizem sistema *HLA* nastal kot posledica naravne selekcije. Ključno vlogo so najverjetneje odigrali patogeni mikroorganizmi. Molekule HLA, zmožne predstavljanja imunogenih peptidov, ki izvirajo iz teh mikroorganizmov, so pomenile evolucijsko prednost (Rodey, 2000).

Ker različne molekule HLA lahko vežejo različne peptide, se s heterozigotnostjo dodatno poveča zmožnost predstavljanja večjega spektra imunogenih peptidov, kar vpliva na moč

in obseg imunskega odgovora ter predstavlja evolucijsko prednost. Znižano raven homozigotnosti dokazujejo tudi populacijske študije (Vidan-Jeras, 2003; Rodey, 2000).

Populacije oz. etnične skupine so se razvijale v zelo različnih geografskih področjih s specifičnimi mikroorganizmi, kar se odseva tudi v izražanju molekul HLA. Selekcija je v različnih okoljih dala prednost različnim alelnim variantam in haplotipom genov *HLA*.

Razlike so vidne na treh ravneh:

- aleli *HLA* se pojavljajo pri vseh populacijah, a z različnimi pogostnostmi,
- določeni aleli *HLA* so omejeni le na specifično populacijo,
- določeni haplotipi so omejeni na specifično populacijo (Rodey, 2000).

V populacijah evropskega izvora je 75% haplotipov sestavljenih iz ne več kot 35 predniških haplotipov. Geni teh konzerviranih haplotipov se držijo skupaj, ker specifične kombinacije genov pomenijo evolucijsko prednost v populacijah, kjer so jih našli (Rodey, 2000).

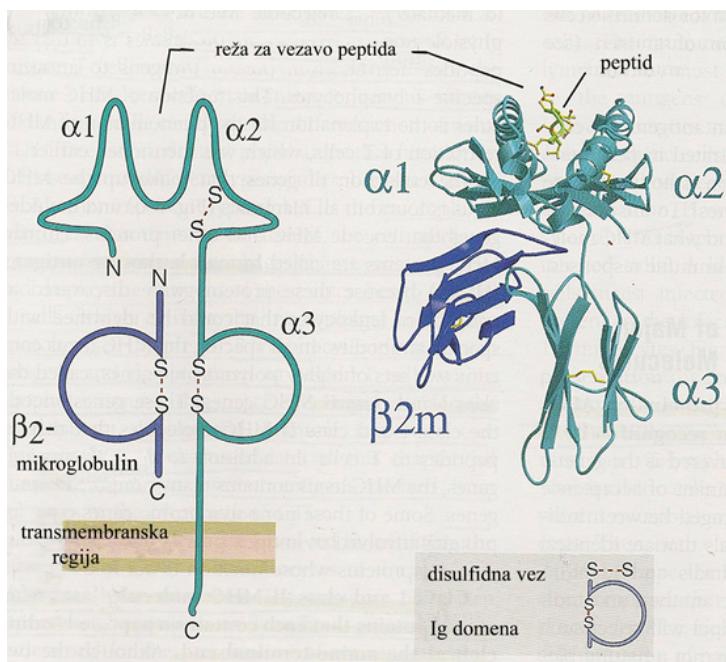
2.7 ZGRADBA MOLEKUL HLA

Molekule HLA I. in II. razreda so glikoproteinski heterodimeri, sestavljeni iz dveh proteinskih verig. Čeprav je tridimensionalna zgradba obeh molekul podobna, se razporeditev peptidnih verig pri obeh razlikuje (Rodey, 2000).

2.7.1 Molekule HLA I. razreda

Molekule HLA I. razreda so sestavljene iz transmembranske težke verige α in nanjo nekovalentno vezanega proteina β_2 -mikroglobulina. Veriga α je sestavljena iz treh strukturnih podenot, $\alpha 1$, $\alpha 2$ in $\alpha 3$. N-končni domeni $\alpha 1$ in $\alpha 2$ tvorita režo, ki omogoča vezavo 8 do 11 AK dolgega peptida. Ti dve domeni sta tudi najbolj polimorfni. Domena $\alpha 3$ ni polimorfna in vsebuje vezavno mesto za T-celični koreceptor CD8. Zato lahko le celice T CD8+ (citotoksični limfociti) reagirajo na peptid, predstavljen znotraj molekule HLA I.

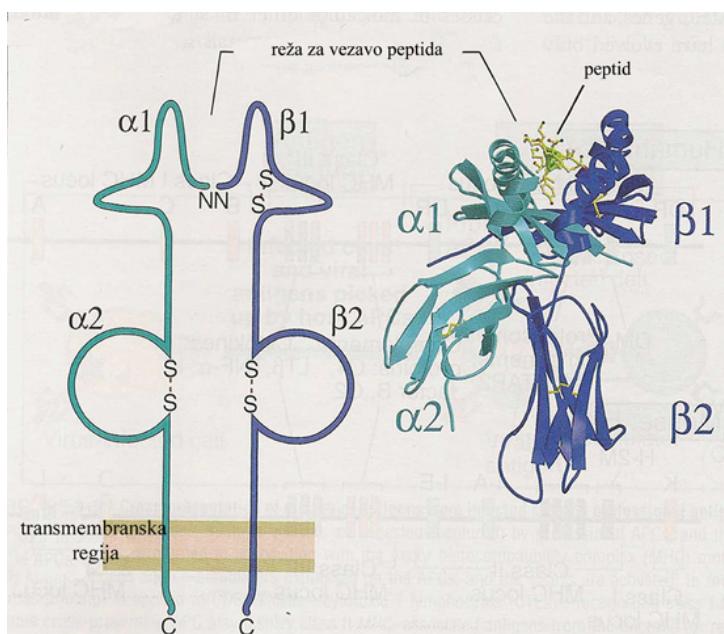
razreda. Shema zgradbe molekule je prikazana na Sliki 4. Molekule HLA I. razreda se izražajo na vseh celicah z jedrom in celicam T predstavljajo citoplazemske peptide (Abbas in Lichtman, 2009).



Slika 4: Zgradba molekul HLA I. razreda (prirejeno po Abbas in Lichtman, 2009: 52).

2.7.2 Molekule HLA II. razreda

Molekule HLA II. razreda so sestavljene iz dveh različnih transmembranskih glikoproteinskih verig, α in β . Polimorfni N-končni domeni $\alpha 1$ in $\beta 1$ tvorita režo za vezavo 10 do 30 aminokislinskih ostankov (AK) dolgega peptida. Nepolimorfna regija $\beta 2$ nosi vezavno mesto za T-celični koreceptor CD4, zaradi česar na peptide, vezane znotraj HLA II. razreda, lahko reagirajo le celice T CD4+ (celice pomagalke). Zgradba molekule je prikazana na Sliki 5. Molekule HLA II. razreda se izražajo na specializiranih antigen predstavitevih celicah (APC, angl. *antigen-presenting cells*) kot so dendritične celice, makrofagi in limfociti B. Celicam T predstavljajo izvencelične proteine, ki se znotraj APC nahajajo v veziklih (Abbas in Lichtman, 2009).



Slika 5: Zgradba molekul HLA II.razreda (prijejeno po Abbas in Lichtman, 2009: 53).

2.8 FUNKCIJE MOLEKUL HLA

Molekule HLA imunskemu sistemu pomagajo razlikovati med lastnimi in tujimi antigeni, sodelujejo pri naboru T-celičnih receptorjev (TCR, angl. *T-cell receptor*), predstavljanju peptidov celicam T ter regulaciji citotoksične aktivnosti naravnih celic ubijalk (Rodey, 2000).

2.8.1 Vloga molekul HLA pri naboru TCR

Selekcija TCR je pozitivna in negativna. Tekom tega procesa se prvotna populacija naivnih celic T zniža na 2%. V procesu pozitivne selekcije se v korteksu timusa sproži apoptoza celic T brez afinitete, v procesu negativne selekcije v meduli pa še apoptoza celic z visoko afiniteto do lastnih peptidov, s čimer se zmanjša možnost za avtoimunske reakcije (Abbas in Lichtman, 2009). Končni nabor celic T so torej celice s TCR, ki prepozna spremembe lastnih molekul HLA zaradi vezave tujega peptida, nimajo pa receptorjev, ki bi prepoznavali lastne peptide, vezane na molekulo HLA (Rodey, 2000).

2.8.2 Vloga molekul HLA pri celičnem imunskem odzivu

2.8.2.1 Molekule HLA I. razreda

Če se mikrobeni peptidi nahajajo v citoplazmi katerekoli celice z jedrom, se razgradijo v proteasomu in nato s pomočjo prenašalca TAP (angl. *transporter associated with antigen processing*) aktivno prenesejo v endoplazemski retikulum. Tam jih lahko prestrežejo ustrezne molekule HLA I. razreda, kompleks se stabilizira in prenese na celično površje (Abbas in Lichtman, 2009; Logar, 2001). Proses je prikazan na Sliki 6, a.

T-celični receptor (TCR) za antigen specifične celice T prepozna mikrobne antogene, predstavljene v molekuli HLA I. razreda, T-celični koreceptor CD8 pa nepolimorfne dele na domeni $\alpha\beta$ molekule HLA, kar vodi v aktivacijo celic T in zorenje v citotoksične limfocite T. Te z izločenimi proteini povzročijo permeabilizacijo membrane, fragmentacijo DNA in apoptozo okuženih celic. Frakcija aktiviranih celic T se razvije v spominske celice, ki se nahajajo v telesu še mesece in leta in so zmožne hitrega odziva ob ponovni izpostavitvi istemu mikrobu (Abbas in Lichtman, 2009).

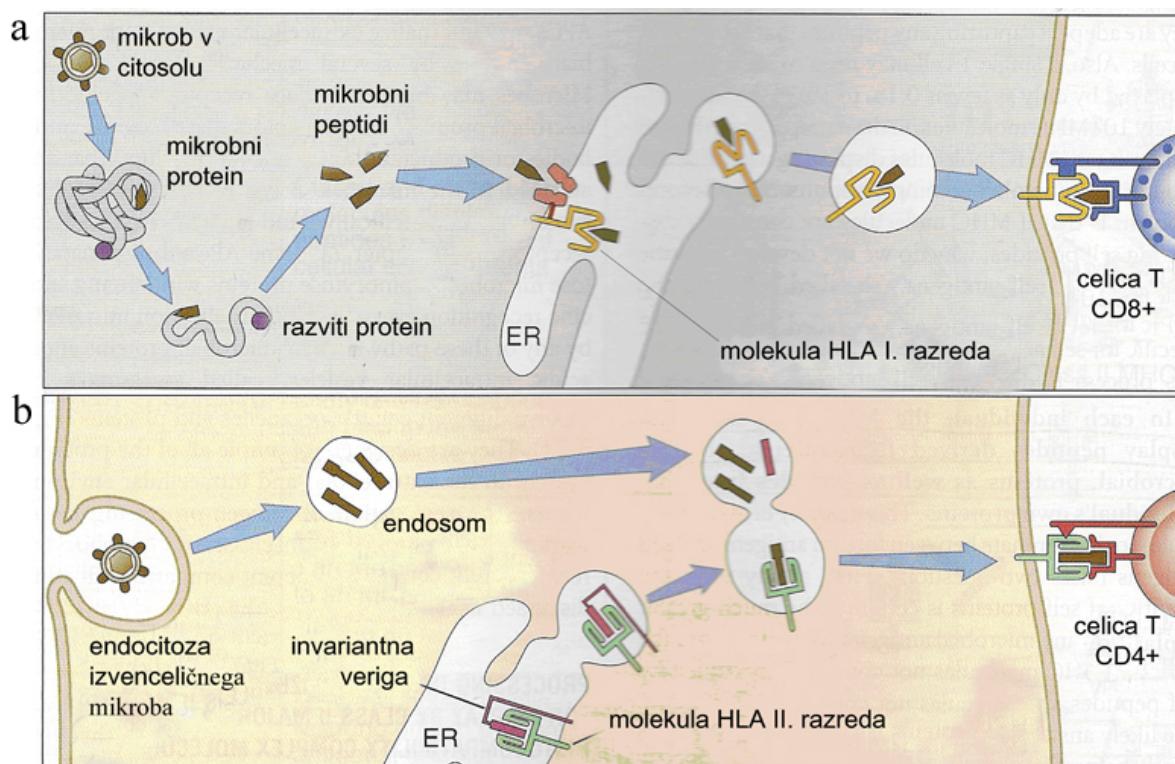
2.8.2.2 Molekule HLA II. razreda

Antigen predstavljene celice (APC) so celice, specializirane za zajetje mikrobnih antigenov in njihovo predstavitev na celičnem površju, kjer jih prepoznajo celice T (Abbas in Lichtman, 2009). APC v endoplazemskem retikulumu neprestano sintetizirajo molekule HLA II. razreda in jih z vezikli pošiljajo proti celičnemu površju. Mikrobeni proteini v APC vstopijo z endocitozo. Po združitvi endosomov z lizosomi se proteini razgradijo na krajše mikrobeni peptide. Na poti lahko pride do zlitja veziklov z molekulami HLA in endosomov z mikrobnimi antigeni. Če je molekula HLA zmožna vezave katerega od peptidov, se kompleks stabilizira in prenese na celično površino (Abbas in Lichtman, 2009; Logar, 2001). Proses je prikazan na Sliki 6, b.

Medtem APC migrirajo v limfne vozle, kjer se srečajo z naivnimi celicami T. Tam za antigen specifične celice T preko TCR prepoznajo mikrobeni peptide, predstavljene znotraj

molekule HLA II. razreda. Hkrati T-celični koreceptor CD4 zazna nepolimorfne dele na domeni $\beta 2$ molekule HLA. To je prvi signal za aktivacijo celic T CD4+, celic pomagalk. Za popolno aktivacijo je potrebno še izražanje kostimulatorjev na APC, od katerih je najpomembnejši protein B7, ki se veže z receptorjem CD28 na celici T.

V odziv začnejo celice T pospešeno izločati vnetne dejavnike citokine. Po enem do dveh dneh se začne proliferacija in klonalna ekspanzija za antigen specifičnih celic T. Sledi diferenciacija v efektorske celice, ki proizvajajo razne površinske molekule in citokine, s katerimi spodbujajo fagocite, limfocite B in druge APC k razgradnji endocitiranih mikrobnih proteinov (Abbas in Lichtman, 2009).



Slika 6: Vloga molekul HLA I. razreda (a) in II. razreda (b) pri imunskega odziva (prirejeno po Abbas in Lichtman, 2009: 58).

2.9 IMUNOLOŠKA TOLERANCA IN POJAV AVTOIMUNOSTI

Ena ključnih lastnosti imunskega sistema je, da je zmožen razlikovanja med lastnimi in tujimi (največkrat mikrobnimi) antigeni. Neodzivnosti na lastne antigene pravimo

imunološka toleranca in je rezultat izpostavljenosti celic T tem antigenom v centralnih limfnih organih (t.i. centralna toleranca) in perifernih tkivih (t.i. periferna toleranca). Če mehanizem imunološke tolerance zataji, se razvijejo reakcije avtoimunosti in avtoimunske bolezni.

Avtoimunost je definirana kot imunski odziv proti lastnim (avtolognim) antigenom in je posledica zatajitve mehanizmov imunske tolerance. Avtoimunost povzroči kombinacija genetskih in okoljskih dejavnikov. Študije, opravljene pri dvojčkih, so pokazale prisotnost genetskega dejavnika pri kar 80% primerov (Tomer in Davies, 2003). Večina avtoimunskih bolezni je poligenih in povezanih z več lokusi, med katerimi so najpomembnejši lokusi *HLA*. Okoljski sprožilec največkrat predstavljajo infekcije ali druge oblike vnetij, torej razmere, pri katerih je povečano izražanje kostimulatorjev na APC, ki so nujni za aktivacijo imunskih celic (Abbas in Lichtman, 2009).

2.10 POVEZANOST GENOV *HLA* Z AVTOIMUNSKIMI BOLEZNIMI

Prvo močno povezavo bolezni z antigeni *HLA* so odkrili leta 1973, ko sta Schlosstein s sod. in Brewerton s sod. neodvisno odkrila močno povišano izražanje antiga HLA-B27 pri bolnikih z vnetno boleznijo hrbteničnih sklepov ankilozirajočim spondilitisom (Marsh in sod., 2000). HLA-B27 je prisoten pri 92% bolnikov in le 8% zdravih predstavnikov evropske populacije (Khan, 2010). Od takrat so ugotovili povezanost genov *HLA* z razvojem več kot 500 bolezni (Yang in sod., 2010). Od velikega števila identificiranih alelov *HLA* jih je 30 pokazalo povezanost z boleznimi, od tega manj kot 15 močno povezanost (Rodey, 2000). Študije antigenov *HLA* v povezavi z boleznimi so se začele še v času, ko so bili poznani le antigeni I. razreda, zato so vse zgodnje raziskave kazale povezanost z antigeni tega razreda. Pri mnogih se je naknadno izkazalo, da je povezava močnejša z antigeni II. razreda, ki so v vezavnem neravnovesju z antigeni I. razreda, za katere je bila povezava sprva pokazana. Danes za večino bolezni velja, da so močneje povezane z antigeni II. razreda.

Vprašanje, ki se pri teh študijah vedno pojavi, je, ali je vzrok za bolezen res povezan s polimorfizmom genov *HLA* ali pa je *HLA* le znamenje za še neodkriti polimorfizem gena v

bližini regije *HLA*. Dokler mehanizem bolezni ni odkrit, na to vprašanje ne moremo z gotovostjo odgovoriti. Primera bolezni, kjer so bili geni *HLA* le v vezavnem neravnovesju z geni, ki povzročajo bolezni, sta hemokromatoza in kongenitalna adrenalna hiperplazija (Marsh in sod., 2000).

Bolezni, pri katerih so aleli *HLA* direktno vpleteni v mehanizem nastanka bolezni, so tipično kronične bolezni, povezane z dolgotrajnimi vnetji in avtoimunostjo (nekatere so podane v Preglednici 3). Poudariti je potrebno, da posamezni aleli *HLA* prispevajo le k večji verjetnosti za pojav bolzeni, nikakor nujno ne vodijo vanjo. Na primer, samo 2% ljudi z antigenom HLA-B27 razvije ankilozirajoči spondilitis. Incidenca je sicer višja pri ljudeh z družinsko anamnezo. To kaže na vpletjenost več genetskih dejavnikov, kar je prav tako ena od značilnosti s *HLA* povezanih bolezni. Za sprožitev bolezenskega stanja je potreben okoljski dejavnik, na primer infekcija z mikroorganizmom (Rodey, 2000; Marsh in sod., 2000). Zaradi molekularne mimikrije med antigeni mikroorganizmov in avtoantigeni, ki se oboji predstavljajo z molekulami HLA, pride do navzkrižne reaktivnosti, katere tarče so lastna peptidna zaporedja, podobna tistim iz patogenega mikroorganizma (Vidan-Jeras, 2003).

Statistično značilnost povezave med izražanjem določenega alela *HLA* in prisotnostjo avtoimunske bolezni navadno ponazorimo z verjetnostjo p , ki jo izračunavamo s Fischerjevim ekzaktnim testom. Izračun relativnega tveganja (RR, angl. *relative risk*) nam pove, kolikokrat bolj pogosto se bolezen pojavi pri osebah, ki določen alel imajo, kot pri tistih, ki tega alela nimajo.

Preglednica 3: Specifičnosti HLA, ki so povezani s povisanim tveganjem za različne avtoimunske bolezni (prirejeno po Vozelj, 2000; Rodey, 2000)

<i>Bolezen</i>	<i>HLA</i>	<i>Relativno tveganje - RR</i>
Ankilozirajoči spondilitis	B27	90
Diabetes tipa 1	DR4/DR3	20
	DR3/DQ8	100
Reiterjev sindrom	B27	37
Revmatoidni artritis	DR4	10

se nadaljuje

nadaljevanje

Miastenija gravis	DR3	10
Multipla skleroza	DR2	5
Sistemski lupus eritematozus	DR3	5
Gravesova bolezen	B8/DR3	3-4

2.11 SLADKORNA BOLEZEN TIPA 1

T1D povzroča avtoimunski napad na celice β v Langerhansovih otočkih v trebušni slinavki, katerih funkcija je izločanje insulina. Zaradi uničenja celic β je izdelovanje insulina zmanjšano, posledica tega pa je povišana koncentracija glukoze v krvi. Razkroj celic je predvsem posledica infiltracije velikega števila celic T CD4+ in makrofagov, ki izločajo vnetne citokine in litične encime, k uničenju pa prispevajo tudi protitelesa. T1D prizadene 0,2% populacije (Vozelj, 2000).

2.11.1 Genetski dejavniki za T1D

Genetska predispozicija za T1D je ena najbolj raziskanih. Študije predlagajo okrog 20 genomskeh regij, ki bi lahko bile vključene v nastanek bolezni. Kot kandidatne gene največkrat omenjajo *CTLA4* (2q33), spremenljivo število tandemskih ponovitev (VNTR, angl. *variable number tandem repeats*) insulinskega gena (11p5) in gene *HLA* (6p21) (Levin in Tomer, 2003).

2.11.2 T1D in *HLA*

Kompleks *HLA* predstavlja približno 45% celotne genetske nagnjenosti k T1D. Haplotipa, najbolj povezana s T1D, sta *DR4-DQA1*03:01-DQB1*03:02* in *DR3-DQA1*05:01-DQB1*02:01*. Vsaj 95% otrok evropskega porekla s T1D ima ali *HLA-DR4* ali *HLA-DR3*, medtem ko je pogostnost teh haplotipov pri kontrolni skupini 50%. Štirideset odstotkov otrok s T1D ima tako *HLA-DR3* kot *HLA-DR4*, medtem ko enako vidimo le pri 3% splošne populacije. Otroci, ki ne nosijo haplotipov *HLA-DR3* ali *HLA-DR4*, zbolevajo pri višjih starostih (nad 15 let). Bratanič in sod. (2010) so tudi pri slovenskih bolnikih s T1D potrdili

močno vlogo alelov *DRB1*04:01* ($P=1,36 \times 10^{-7}$), *DQB1*03:02* ($P=1,00 \times 10^{-13}$) in *DQA1*03:01* ($P=3,74 \times 10^{-11}$), ki sestavljajo haplotip *HLA-DR4*, ter v manjši meri haplotipa *HLA-DR3*. Za haplotip *DR2-DQA1*01:02-DQB1*06:02* so ugotovili močno zaščitno vlogo. Manj kot 1% otrok s T1D nosi haplotip *HLA-DR2*, medtem ko je pogostnost pri kontrolni populaciji belcev v ZDA 20%.

V študijah so opazili tudi močan vpliv aminokislinskega ostanka (AK) na 57. mestu verige β HLA-DQ. Če je na tem mestu na obeh verigah asparaginska kislina (Asp), je verjetnost za pojav T1D zelo nizka. Ravno nasprotno pa je pri posameznikih, ki na nobeni od verig β HLA-DQ nimajo Asp, RR za T1D kar 107. Prav tako je višje tveganje za razvoj bolezni pri ljudeh z argininom (Arg) na 52. mestu verige α HLA-DQ. Oblika reže, v katero se veže imunogeni peptid, je pogojena tako s konformacijo verige DQ α kot DQ β . Kombinacija takšnih dveh verig naj bi dovoljevala avtoantigenu, da se lažje veže v molekulo HLA (Levin in Tomer, 2003; Tait in Harrison, 1991; Thorsby in sod., 1991).

2.12 HASHIMOTOV TIROIDITIS

Avtoimunske bolezni ščitnice (AITD) zajemajo različna stanja motene funkcije ščitnice, ki so posledica imunskega odziva proti lastnim ščitničnim antigenom. V serumu bolnikov se pojavljajo protitelesa proti ščitnični peroksidazi (TPO), tiroglobulinu (Tg) in receptorju za hormon, ki stimulira ščitnico (TSH, angl. *thyroid stimulating hormone*) (TSH-R, angl. *thyrotropin receptor*). AITD se lahko izražajo kot hipertiroze (povečano delovanje ščitnice in nastajanje ščitničnih hormonov) ali hipotiroze (zmanjšano delovanje ščitnice in nastajanje ščitničnih hormonov) (Biček, 2010; Zaletel, 2002; Zaletel, 2007). Glavni oblici AITD sta bazedovka in Hashimotov tiroiditis (HT).

Hashimotov tiroiditis (HT) je avtoimunska bolezen, za katero so značilne kronične vnetne spremembe ščitnice z močno infiltracijo limfocitov, plazmatk in makrofagov. Pri več kot 90% primerov je v serumu bolnikov povišana koncentracija protiteles anti-TPO, v 40-70% pa tudi anti-Tg. V začetnih stadijih bolezni ščitnica kljub povišani koncentraciji avtoprotiteles deluje normalno. Sledijo lahko krajsa obdobja hipertiroze, kasneje pa se zaradi uničenja ščitničnega tkiva delovanje ščitnice postopoma zmanjša, kar vodi v

hipotirozo (Vozelj, 2000; Zaletel in sod., 2002). Prevalenca bolezni je približno 10%, po petdesetem letu 30%. Pri ženskah se pojavi 15- do 20-krat pogosteje kot pri moških (Zaletel, 2002; Zaletel, 2007). Pri sumu na HT se navadno najprej preveri raven hormonov trijodtironina (T_3) in tiroksina (T_4), da se potrdi hipotiroidizem. Sledi testiranje prisotnosti protiteles anti-Tg in anti-TPO, značilnih za HT. Za zdravljenje, če je le-to potrebno, se uporablja sintetična oblika T_4 (Zeitlin, 2010).

2.12.1 Genetski dejavniki za HT

Pri AITD genetski dejavniki k celotni nagnjenosti k bolezni prispevajo približno 30% (Zaletel in sod., 2002). Regije, ki so jih povezali tako z bazedovko kot s HT, so 6p (*AITD-1*) (Tomer in sod., 1999), 7q (*D7S502*), 8q (*D8S284*) in 10q (*D10S537*) (Tomer in Davies, 2003), samo z bazedovko regije 14q31 (*GD-1*), 20q11.2 (*GD-2*), Xq21.33-22 (*GD-3*), samo s HT pa 13q32 (*HT-1*) in 12q22 (*HT-2*) (Tomer in sod., 1999). Taylor in sod. (2006) so v povezavi z AITD prepoznali samo tri kromosomska območja, in sicer 18p11, 2q36 in 11p15. Kot vzročne dejavnike za povišano nagnjenost k HT so identificirali štiri gene oz. genska območja: regijo *HLA* (6p), *CTLA4* (2q33), *Tg* (8q24) in *PTPN22* (angl. *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) (1p13) (Zeitlin, 2010).

2.12.2 HT in HLA

Prvo večjo analizo povezave regije *HLA* s HT so izvedli v Kanadi. Obsegala je 127 bolnikov in 135 oseb kontrolne skupine. Povezanost z boleznijsko so odkrili za specifičnost HLA-DR3 (RR=3,5) (Moens in sod., 1978). Leto kasneje je analiza 199 Avstrijcev (39 bolnikov in 160 predstavnikov kontrolne skupine) pokazala povezano HT s specifičnostjo HLA-DR5 (RR=3,2) (Weissel in sod., 1980). Farid in sod. (1981) so pri kanadskih obolelih našli povišano pojavnost tako DR3 kot DR5. Tipizacije madžarskih bolnikov so zopet pokazale na vlogo DR3 (Stenszky in sod., 1987), prav tako tipizacije 186 Britancev (Tandon in sod., 1991). Leta 2001 je študija, ki je vključevala 334 Britancev, pokazala, da je za razvoj HT pomemben *DRB1*03* (P=0,02, OR=1,9) (Hunt in sod., 2001).

Poleg specifičnosti DR3 in DR5 je bilo v nekaterih raziskavah pri bolnikih s HT statistično pomembno višja pojavnost haplotipa *HLA-DR4 (DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03)* (Farid in Thompson, 1986; Petrone in sod., 2001). Badenhoop in sod. so leta 1990 pri bolnikih ugotovili povišano pojavnost *DQA1*02:01/03:01* in *DQA1*03:01/03:01* ($R=4,7$). Zeitlin je leta 2010 objavil rezultate raziskave, ki je zajemala 625 bolnikov s HT in 619 oseb kontrolne skupine, v kateri je pri bolnikih ugotovil statistično značilno pogostejše pojavljanje *DRB1*04* ($p=0,002$, $OR=1,37$), *DQB1*03:01/4* ($p=3,47 \times 10^{-4}$, $OR=1,43$), *DQA1*03:011/12* ($p=1,53 \times 10^{-4}$, $OR=1,44$), *DRB1*03*, *DRB1*08*, *DQB1*04* in *DQA1*04:01*, oz. haplotipov *HLA-DR4 (DRB1*04-DQB1*03:01/4-DQA1*03:011/12)* ($p=6,79 \times 10^{-2}$, $OR=1,98$), *HLA-DR8 (DRB1*08-DQB1*04-DQA1*04)* ($p=0,038$, $OR=1,8$) in *HLA-DR3 (DRB1*03-DQB1*02-DQA1*05)* ($p=0,05$). Za zaščitne so se izkazali aleli *DRB1*07*, *DRB1*13*, *DQB1*06*, *DQA1*01:012/3* in *DQA1*02:01* in haplotipa *HLA-DR7* in *HLA-DR13 (DRB1*13-DQB1*06-DQA1*01)* ($p=0,001$, $OR=0,61$) (Zeitlin, 2010). Kljub zgoraj navedenim rezultatom je bila večina študij, ki so iskale morebitno povezavo regije genov *HLA* z AITD, negativnih, ali pa so ugotovile le blago povezanost (Levin in Tomer, 2003).

2.12.3 Skupna genetska predispozicija za T1D in AITD

Okrog 10% otrok s T1D ima hkrati tudi HT (Kontiainen in sod., 1990; Rodan in sod., 1999). Močnejšo povezavo so odkrili pri študijah pri pacientkah z družinsko anamnezo T1D, kjer je imelo HT kar 54-75% (razlike glede na starost) žensk s sladkorno boleznijo (McCanlies in sod., 1998). V populaciji otrok s T1D v Nemčiji so odkrili, da so AITD pogostejše pri skupini s *HLA-DR3/DR4* (Holl in sod., 1999). V Tajvanski študiji se je haplotip *DRB1*04:05-DQA1*03:01-DQB1*04:01* izkazal za pogostejšega pri skupini pacientov s tako T1D kot AITD (Chuang in sod., 1996). V sklopu študije, kjer so tipizirali člane 25 družin z družinsko anamnezo T1D, so opazili štirikratno povišanje haplotipa *DQA1*05:01-DQB1*02:01* pri posameznikih, ki so poleg T1D imeli tudi AITD, v primerjavi z bolniki, ki so imeli le T1D (Dorman in sod., 1996).

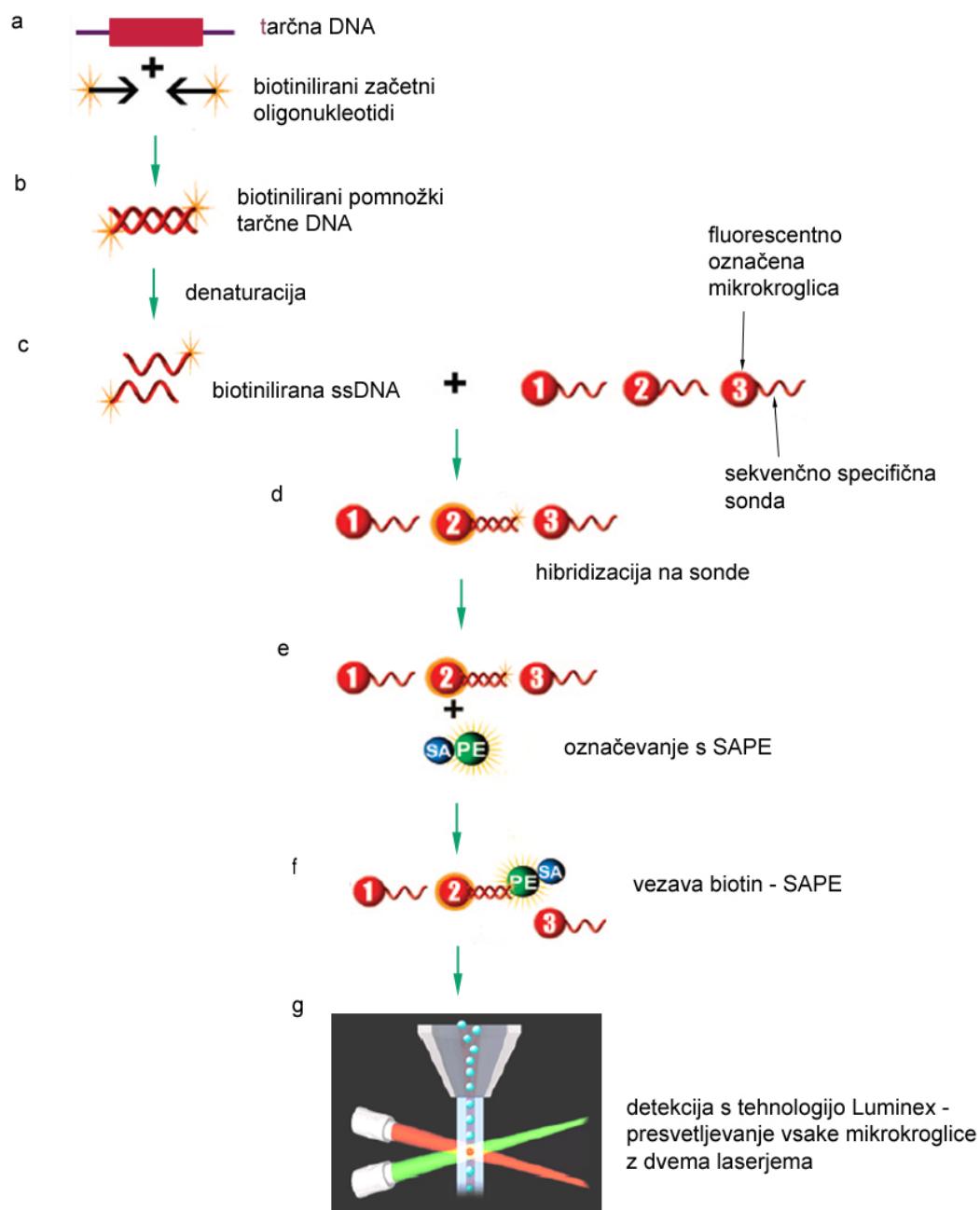
2.13 METODE TIPIZACIJE GENOV *HLA*

Tipizacija genov *HLA* z analizo DNA se je začela sredi 80-ih let 20. stoletja z metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP, angl. *restriction fragment length polymorphism*). V zgodnjih 90-ih letih so se začele pojavljati metode tipizacije, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*), ki zdaj v mnogih laboratorijih v veliki meri nadomeščajo serološko tipizacijo. Glavna pomanjkljivost tipiziranja z analizo DNA je pojavljanje alelnih kombinacij, ki se jih ne da razločiti (Rodey, 2000).

2.13.1 Metoda, ki uporablja PCR in hibridizacijo s sekvenčno specifičnimi oligonukleotidi (PCR-SSO, angl. *polymerase chain reaction based sequence-specific oligonucleotide hybridisation*) ter tehnologijo *Luminex*

Metoda PCR-SSO identificira alele v vzorcu DNA z uporabo sekvenčno specifičnih oligonukleotidnih sond (SSO), vezanih na fluorescentno označene mikrokroglice. Tarčno DNA najprej pomnožimo s PCR z lokusno specifičnimi biotiniliranimi začetnimi oligonukleotidi, ki omogočajo pomnoževanje polimorfnih delov lokusa *HLA*, ki ga analiziramo (drugega eksona pri genih *HLA* II. razreda ter drugega in tretjega eksona pri genih *HLA* I. razreda) (Slika 7, a). Rezultat so z biotinom označeni pomnožki (Slika 7, b). Sledi denaturacija pomnoženih zaporedij na enoverižne odseke DNA (ssDNA, angl. *single-stranded DNA*) (Slika 7, c) ter inkubacija s sondami, konjugiranimi na mikrokroglice. Sonde so specifične za alel ali skupino alelov. V posameznem kompletu za tipiziranje alelov *HLA* je tudi po več sto različnih sond. V procesu hibridizacije se enoverižni odseki vzorčne DNA vežejo na sonde s komplementarnimi zaporedji (Slika 7, d). Po spiranju nevezanih pomnožkov mešanici dodamo R-fikoeritrin-konjugirani streptavidin (SAPE, angl. *R-phycoerythrin-conjugated strepavidin*) (Slika 7, e). Fikoeritrin, vezan znotraj SAPE, ima izredno visoko afiniteto do biotina, zato se veže na biotinilirane pomnožke DNA, ki so se hibridizirali na sonde (Slika 7, f), s čimer je omogočeno fluorescentno zaznavanje teh sond v procesu analize. Analizator Luminex presevetli vsako posamezno mikrokroglico z vezanimi sondami z dvema laserjema (Slika 7, g). Rdeči laser vzbudi barvilo znotraj mikrokroglice s specifičnimi sondami in jo tako razpozna. Zeleni laser

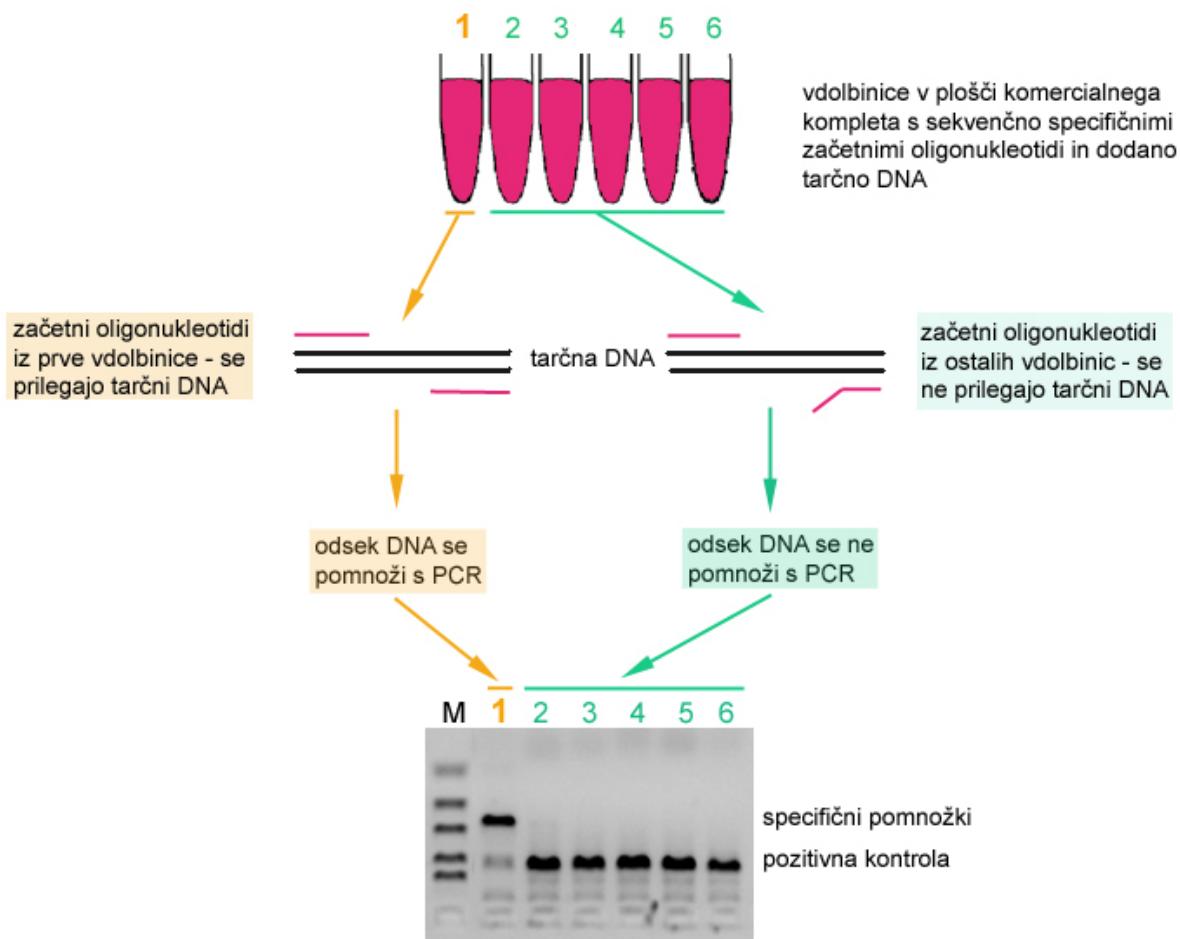
vzbudi fikoeritrin znotraj SAPE, torej zazna le tiste sonde, na katere se je vezala z biotinom označena vzorčna DNA. Podatki o intenzitetah fluorescence so pretvorjeni v elektronsko obliko, alel oz. skupina alelov pa nato določena z uporabo računalniškega programa (Dalva in Beksac, 2007; Testi in sod., 2012; LABType SSO..., 2010; Saiki in sod., 1986; Heinemann, 2009; Little, 2007).



Slika 7: Princip delovanja metode PCR-SSO (prirejeno po LABType SSO Class I..., 2011; Brescia, 2008). SAPE - R-fikoeritrin-konjugirani streptavidin; ssDNA – enoverižna DNA.

2.13.2 Metoda, ki uporablja PCR s sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (PCR-SSP, angl. *polymerase chain reaction based sequence-specific priming*)

Metoda PCR-SSP za tipizacijo uporablja sekvenčno specifične začetne oligonukleotide. Začetni oligonukleotidi z zaporedji, komplementarnimi vzorčni DNA, v procesu PCR pomnožijo odseke tarčne DNA. Končni izbor parov začetnih oligonukleotidov mora pokriti vse znane alele preiskovanega lokusa. Specifičnost pomnožene sekvence je določena z njeno molekulsko težo, ki se kaže v mobilnosti na agarozni gelski elektroforezi. Pomnožki z nižjo molekulsko maso potujejo hitreje od pomnožkov z višjo molekulsko maso. Dolžina fragmenta oz. molekulska masa pomnožene sekvence je vsota dolžin obeh začetnih oligonukleotidov in dolžine DNA, ki se je pomnožila (Olerup in Zetterquist, 1991; 1992). Princip delovanja metode PCR-SSP je prikazan na Sliki 8.



Slika 8: Princip delovanja metode PCR-SSP. M – označevalec velikosti.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

Tipizacijo genov *HLA* smo izvedli pri 131 otroških bolnikih s T1D, 52 otroških bolnikih s T1D+HT ter pri kontrolni skupini, ki jo je sestavljalo 131 predstavnikov zdrave slovenske populacije. Vzorčenje bolnikov je potekalo na Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, v okviru raziskovalnega programa P-0343 »*Etiologija, zgodnje odkrivanje in zdravljenje bolezni pri otrocih in mladostnikih*«, ki ga vodi prof. dr. Tadej Batellino. Uporabljen material v poskusih je bila DNA, ki so jo iz krvi bolnikov izolirali na Pediatrični kliniki.

3.2. IZVEDBA TIPIZACIJE GENOV *HLA*

V okviru diplomske naloge smo tipizirali skupino bolnikov s T1D+HT in del bolnikov s T1D. Del bolnikov s T1D in zdrave predstavnike slovenske populacije, ki so predstavljali kontrolno skupino, so predhodno tipizirali na Centru za tipizacijo tkiv.

Tipizacijo genov *HLA* smo najprej za vse preiskovance izvedli po metodi PCR-SSO, in sicer na nizki stopnji ločljivosti za *HLA-A* in *HLA-B* ter na visoki stopnji ločljivosti za *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* in *HLA-DQB1*. Metodo PCR-SSO za *HLA-DQA1/DQB1* na visoki stopnji ločljivosti smo v Centru za tipizacijo tkiv v okviru diplomske naloge uporabili prvič. Prednost metode PCR-SSO je, da lahko analiziramo veliko število vzorcev hkrati. Njena slabost je pogosto pojavljanje alelnih kombinacij, ki se jih ne da razločiti. V takšnih primerih smo za subtipizacijo uporabili metodo PCR-SSP. Pri tipizaciji lokusa *HLA-DQA1* je bilo nerazločljivih kombinacij preveč, zato smo podatke za ta lokus izločili iz študije.

3.3 PRIPRAVA AGAROZNEGA GELA ZA ELEKTROFOREZO

3.3.1 Material

- agarozna gel (Sigma, #A6877-1kg)
- 10x pufer TBE (108 g Tris baze, 55 g H_3BO_3 in 40 ml EDTA; pH 8)
- deionizirana voda (dH₂O)
- mikrovalovna pečica
- etidijev bromid (Olerup SSP, #103.301-10; koncentracija: 0,625 mg/ml)
- nosilec za elektroforezo
- kadička za elektroforezo
- 0,5x pufer TBE

3.3.2 Postopek dela

Za 2% agarozni gel smo mešanico pripravili tako, da smo čašo s 6,4 g agaroze, 16 ml 10x pufera TBE in 304 ml dH₂O za 7 minut postavili v mikrovalovno pečico pri moči 600 W. Ko se je zmes nekoliko ohladila, smo dodali kapljico etidijevega bromida, premešali in zmes vlili v nosilec. Ko se je gel strdil, smo ga prestavili v kadičko za elektroforezo z 0,5x puferom TBE. 0,5x pufer TBE smo pripravili z redčenjem 10x pufera TBE.

3.4. TIPIZACIJA *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DQBI* IN *HLA-DRBI* Z METODO, KI UPORABLJA PCR IN HIBRIDIZACIJO S SEKVENČNO SPECIFIČNIMI OLIGONUKLEOTIDI (PCR –SSO) TER TEHNOLOGIJO LUMINEX

3.4.1 Material

- komercialni komplet za PCR-SSO *HLA-A* Low resolution (One Lambda LABType SSO)
- komercialni komplet za PCR-SSO *HLA-B* Low resolution (One Lambda LABType SSO)

- komercialni komplet za PCR-SSO *HLA-DRB1* High resolution (One Lambda LABType SSO)
- komercialni komplet za PCR-SSO *HLA-DQA1/DQB1* High resolution (One Lambda LABType SSO)
- reagent za PCR (D-mix) (del komercialnega kompleta)
- mešanica za lokus specifičnih začetnih oligonukleotidov (del komercialnega kompleta)
- *Taq* polimeraza (Fermentas, #EP0402; koncentracija: 5 U/ μ l)
- denaturacijski pufer (del komercialnega kompleta)
- nevtralizacijski pufer (del komercialnega kompleta)
- hibridizacijski pufer (del komercialnega kompleta)
- pufer za spiranje (del komercialnega kompleta)
- pufer SAPE (del komercialnega kompleta)
- SAPE (del komercialnega kompleta)
- mešanica mikrokroglic (del komercialnega kompleta)
- mikrotitrská plošča s 96 vdolbinicami
- stojalo za mikrotitrsko ploščo
- hladilno stojalo
- mikroplošča s 96 vdolbinicami po 250 μ l iz polistirena
- 2% agarozni gel
- označevalec velikosti (Fermentas, Fastruler Low Range DNA Ladder, #SM113)
- naprava za PCR (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems)
- aparatura za elektroforezo (BIO-RAD, Power Pack Basic)
- transiluminator z UV svetilko in kamero (GeneFlash, Syngene Bio Imaging)
- analizator LABScan 100 »flow« (Luminex, γ MAP Technology)
- Podlaga Luminex XY
- centrifuga (Centrifuge 5804, Eppendorf)
- stresalnik

3.4.2 Postopek dela

3.4.2.1 Priprava mešanice za PCR in pomnoževanje

Pred uporabo smo komplet že pripravljenih reagentov, ki se sicer hranijo zamrznjeni na temperaturi od -20°C do -80°C v originalni embalaži, ločili na reagente, ki jih rabimo pred (pre) in tiste, ki jih rabimo po (post) PCR. Preostanek pre-PCR reagentov smo po uporabi ponovno zamrznili, post-PCR reagente pa prenesli v hladilnik, zaščitili pred svetlobo in nikoli ponovno zamrzovali. Reagent za spiranje smo hranili pri sobni temperaturi.

Pomnoževanje DNA s PCR je potekalo v mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinicami. V prvo vdolbinico smo vedno odpipetirali 1 µl dH₂O, v ostale pa po 1 µl DNA koncentracije 20 ng/µl. Nato smo v vsako vdolbinico dodali 10 µl mešanice za PCR, ki smo jo predhodno pripravili v 1,5 ml epruveti v razmerju, kot je za različno število vzorcev predstavljeno v Preglednici 4.

Preglednica 4: Sestava mešanice za PCR

Število vzorcev	Začetni oligonukleotid (µl)	D-mix (µl)	Taq polimeraza, 5 U/µl (µl)
1	2	6,9	0,1
10	26,6	91,8	1,32
20	53,13	183,5	2,64
40	96,6	333,6	4,8
50	100	345	5
60	144,9	500,4	7,2
80	193,2	667,2	9,6
96	226	780	11,3

Po dodatku mešanice za PCR smo vdolbinice prelepili z zaščitno folijo, ki preprečuje izhlapevanje vzorcev, premešali na stresalniku, na kratko zavrteli v centrifugi (na 500-600 vrt/min) in mikrotitrsko ploščo prenesli v napravo za PCR, kjer smo uporabili program, prikazan v Preglednici 5.

Preglednica 5: Program, uporabljen za pomnoževanje DNA z metodo PCR

Korak	Temperatura (°C)	Čas inkubacije (min)	Število ciklov
1	96	03:00	1
2	96	00:20	5
	60	00:20	
	72	00:20	
3	96	00:10	30
	60	00:15	
	72	00:20	
4	72	10:00	1
5	4		1

3.4.2.2 Kontrola produktov pomnoževanja

Na mikrotitrski plošči smo iz vsake vdolbinice v vrsti, ki vsebuje negativno kontrolo, odvzeli 3 µl produktov in jih nanesli na agarozni gel. V enega od žepkov na gelu smo nanesli 5 µl označevalca velikosti. Elektroforezo smo pustili teči 20 minut pri 180 V. Po končani elektroforezi mora biti pod UV svetlogočno svetlobo viden en produkt pri *HLA II.* razreda, kjer se pomnožuje le drugi ekson, oziroma dva produkta pri *HLA I.* razreda, kjer se pomnožujeta drugi in tretji ekson. Pričakovane dolžine pri *HLA-DRB1* so okrog 450 bp, pri *HLA-DQB1* okrog 280 bp, pri *HLA-A* in *HLA-B* pa 350 bp in 500 bp.

3.4.2.3 Denaturacija in nevtralizacija

Po 2,5 µl produktov smo prenesli iz vsake vdolbinice v novo mikrotitrsko ploščo in dodali 1,25 µl denaturacijskega pufra. Ploščo smo prekrili s folijo, premešali na stresalniku, zavrteli na centrifugi in nato 10 minut inkubirali na sobni temperaturi. V tem času se je barva spremenila iz svetlo rožnate v temnejšo. Po končani inkubaciji smo dodali 2,5 µl nevtralizacijskega pufra, spet premešali in zavrteli v centrifugi ter opazovali spremembo barve v rumeno. Mikrotitrsko ploščo smo na tem mestu prestavili v hladilno stojalo, da smo preprečili onesnaženje produktov PCR z vodo.

3.4.2.4 Hibridizacija

V epruveto smo napisali hibridizacijski pufer in mešanico kroglic (SSO Bead mix – A, B, DR ali DQ), kot je predstavljeno v Preglednici 6. Mešanico kroglic smo pred uporabo dobro premešali na stresalniku.

Preglednica 6: Priprava hibridizacijske mešanice

Število vzorcev	Hibridizacijski pufer (μl)	Mešanica kroglic (μl)
1	17	2
10	198,7	23,4
20	397,4	46,8
40	722,6	85
50	850	100
60	1083,9	127,5
80	1445,2	170
96	1735	204

V mikrotitrsko ploščo z denaturiranimi produkti PCR smo dodali v vsako vdolbinico 19 μl pripravljene mešanice, prekrili s folijo, premešali in zavrteli v centrifugi, nato pa 15 minut inkubirali v napravi za PCR pri 60°C. Po 15 minutah smo dodali 50 μl pufra za spiranje, prekrili s folijo, premešali in centrifugirali 5 minut pri 2800 vrt/min. Pufer smo nato odstranili in postopek spiranja ponovili trikrat. Med tretjim centrifugiranjem smo s pomočjo Preglednice 7 pripravili raztopino 1x SAPE.

Preglednica 7: Priprava raztopine 1x SAPE

Število vzorcev	Koncentrat SAPE – SS (μl)	Pufer SAPE – SB (μl)
1	0,25	24,8
10	2,97	292,5
20	5,94	584,9
40	10,8	1062,6
50	12,5	1238
60	16,2	1593,9
80	21,6	2125,2
96	25,8	2550

Ker koncentrat SAPE vsebuje fluorescentno barvilo, mora biti zaščiten pred svetlobo.

3.4.2.5 Označevanje

Vzorcem smo dodali 25 µl raztopine 1x SAPE, prekrili s folijo, premešali, zavrteli v centrifugi in 5 minut inkubirali pri 60°C. Nato smo hitro dodali 50 µl pufra za spiranje, znova prekrili s folijo, premešali in centrifugirali 5 minut na pri 2800 vrt/min. Po vrtenju smo odstranili pufer, dodali 35 µl svežega pufra za spiranje, premešali in zavrteli v centrifugi, nato pa po 40 µl iz vsake vdolbinice prenesli v ploščo za merjenje.

3.3.2.6 Izvajanje meritev z aparaturom LABScan 100 in analiza podatkov

Srednja fluorescenčna intenziteta (MFI, angl. *median fluorescence intensity*) upošteva fluorescenčno intenziteto vsake mikrokroglice oz. sonde v vzorcu. Vrednost MFI je normalizirana z vrednostjo za pozitivno kontrolo in izražena kot odstotek MFI pozitivne kontrole. V vsaki mešanici sond jih je namreč tudi nekaj, ki reagirajo z vsemi aleli znotraj lokusa zanimanja. Te vrednosti predstavljajo pozitivne kontrole. MFI negativne kontrole mora biti med 1200 in 7000 in je v izračunu odšteta.

Odstotek pozitivne vrednosti je izračunan po naslednjem principu:

$$\text{Odstotek pozitivne vrednosti} = 100 \times \frac{\text{MFI (sonda } n \text{)} - \text{MFI (sonda negativna kontrola)}}{\text{MFI (sonda pozitivna kontrola)} - \text{MFI (sonda negativna kontrola)}}$$

Reakcija je pozitivna, če je odstotek pozitivnih vrednosti za sondu višji od vnaprej določene mejne vrednosti za sondu, in negativna, če je odstotek pozitivnih vrednosti za sondu nižji od vnaprej določene mejne vrednosti za sondu. Alel *HLA*, prisoten v preiskovani DNA, je določen na podlagi vzorca pozitivnih in negativnih reakcij za sonde (LABType SSO..., 2010). Za analizo rezultatov smo uporabili program HLA Fusion.

3.5 TIPIZACIJA IN SUBTIPIZACIJA *HLA* Z METODO, KI UPORABLJA PCR S SEKVENČNO SPECIFIČNIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI (PCR-SSP)

3.5.1 Material

- komercialni komplet za PCR-SSP *HLA-A* (Olerup SSP)
- komercialni komplet za PCR-SSP *HLA-DRB1* (Olerup SSP)
- komercialni komplet za PCR-SSP *HLA-DQB1* (Olerup SSP)
- reagent za PCR (del komercialnega kompleta)
- *Taq* polimeraza (Fermentas, #EP0402; koncentracija: 5 U/μl)
- tarčna DNA
- naprava za PCR (GeneAmp PCR system, Applied Biosystems)
- aparatura za elektroforezo (BIO-RAD, Power Pack Basic)
- 2% agarozni gel
- označevalec velikosti (Fastruler Low Range DNA Ladder, Fermentas, #SM1103)
- transiluminator z UV svetilko in kamero (GeneFlash, Syngene Bio Imaging)

3.5.2 Postopek dela

3.5.2.1 Priprava mešanice za PCR in pomnoževanje

V 2 ml epruveto smo zmešali glede na koncentracijo DNA predpisane količine reagenta za PCR, dH₂O, tarčne DNA in *Taq* polimeraze, kot je to prikazano v Preglednici 8.

Preglednica 8: Priprava mešanice za pomnoževanje z metodo PCR

Število vdolbin	Reagent za PCR (μl)	Tarčna DNA (μl)	dH ₂ O (μl)	<i>Taq</i> polimeraza, 5 U/μl (μl)
96	312	208	511,7	8,3

Mešanico smo premešali na stresalniku, nato pa po 10 μl napipetirali v vsako od vdolbinic na plošči s sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Vdolbinice smo pokrili s prozorno folijo, da smo preprečili izhlapevanje med pomnoževanjem, ploščo namestili v napravo za PCR in vključili primeren temperaturni program, prikazan v Preglednici 9.

Preglednica 9: Temperaturni program za pomnoževanje z metodo PCR

Korak	Temperatura (°C)	Čas inkubacije (min)	Število ciklov
1	94	02:00	1
2	94	00:10	10
	65	01:00	
3	94	00:10	20
	61	00:50	
	72	00:30	
4	4		

3.5.2.2 Zaznavanje produktov na elektroforeznem gelu

V žepke na agaroznem gelu smo nanesli po 10 µl produktov PCR iz vsake vdolbinice na plošči. V enega od žepkov smo odpipetirali 10 µl označevalca velikosti. Elektroforezo smo pustili teči 20 minut pri 180 V, nato pa smo gel izpostavili UV svetlobi ter rezultat fotografirali. V vsaki vdolbinici je poleg specifičnih začetnih oligonukleotidov še par začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje dela genoma zunaj regije *HLA*. Ta pomnožek predstavlja pozitivno kontrolo (interni kontrolo) in je pokazatelj uspešnega pomnoževanja s PCR.

3.5.2.3 Analiza rezultatov

Dolžino specifičnega produkta PCR smo ocenili s pomočjo označevalca velikosti. Nekatere vdolbinice namreč vsebujejo več parov začetnih oligonukleotidov, ki lahko pomnožijo različno dolge odseke, odvisno od alela *HLA* na vzorčni DNA. Vzorec prog na gelu smo vnesli v računalniški program Olerup SSP AB SCORE, ki je na podlagi preglednic, ki prikazujejo možne alele *HLA*, ki jih je set začetnih oligonukleotidov iz posamezne vdolbinice na komercialnem kompletu zmožen pomnožiti s PCR, prikazal specifičen alel *HLA*, prisoten v našem vzorcu (Olerup SSP HLA..., 2011).

3.6 STATISTIČNE METODE

Pri asociacijskih študijah gre za primerjanje pogostnosti pojavljanja alelov *HLA* pri bolnikih in predstavnikih kontrolne skupine, ki bolezni nimajo. Statistično analizo smo opravili s pomočjo računalniškega programa, ki so ga v Centru za tipizacijo tkiv razvili za takšne analize. Rezultate tipizacij smo vnesli v program, ki deluje na osnovi 2x2 kontingenčnih tabel, kot je prikazano v Preglednici 10. Vrednosti a, b, c in d predstavljajo število dogodkov, oziroma v našem primeru število oseb kontrolne skupine z aleлом zanimanja (a), število bolnikov z aleлом zanimanja (b), število oseb kontrolne skupine brez alela zanimanja (c) in število bolnikov brez alela zanimanja (d).

Preglednica 10: 2x2 kontingenčna tabela, ki jo računalniški program uporablja za izračun rezultatov

	Kontrolna skupina	Bolniki s T1D ali T1D+HT
Prisotnost alela	a	b
Odsotnost alela	c	d

Statistično značilnost povezanosti alela *HLA* z boleznijo smo ocenili s Fisherjevim ekzaktnim testom (vrednost p). Vrednost p se izračuna po formuli:

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

Kot mejo statistične značilnosti smo upoštevli p=0,05, kar pomeni, da je verjetnost, da je opažena povezanost naključna, manj kot 5%. Manjša kot je vrednost p, večja je verjetnost, da obstaja statistično značilnost povezave (Škerget, 2004; Zeitlin, 2010).

Relativno tveganje (RR), ki ga predstavlja prisotnost določenega alela za nastanek bolezni, se izračuna po formuli:

$$RR = \frac{(b/d)(b+d)}{(a/c)(a+c)}$$

Vrednost 1 pomeni, da je določen alel *HLA* z enako pogostnostjo izražen tako pri bolnikih kot pri kontrolni skupini, vrednosti nad 1 kažejo na povišano tveganje za nastanek bolezni

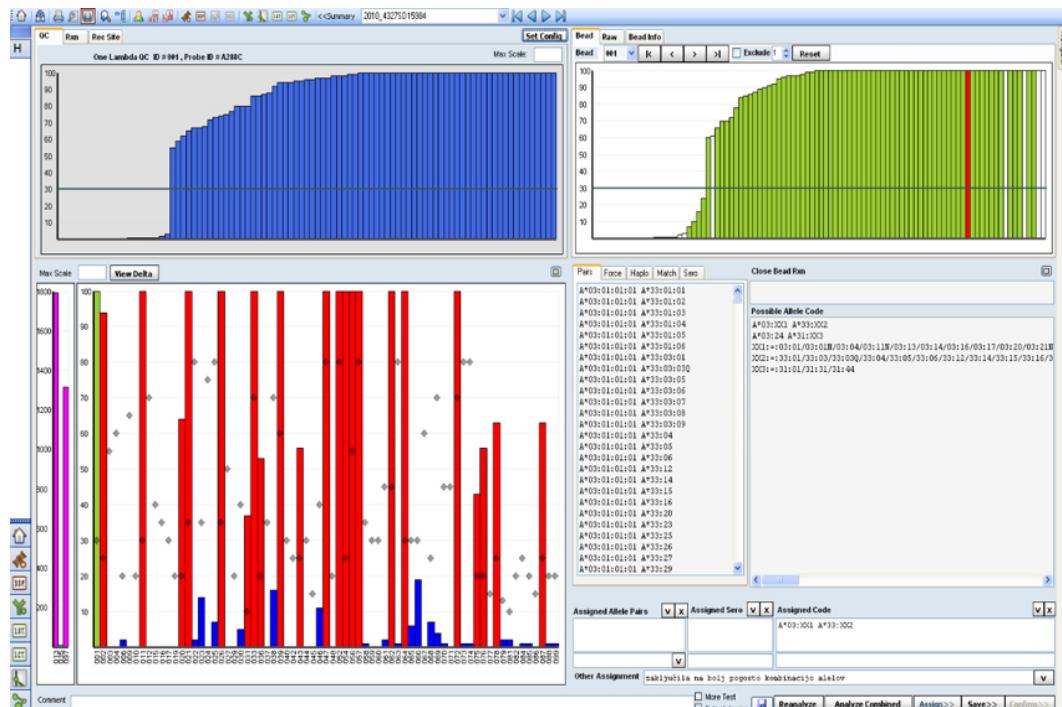
(pozitivno asociacijo alela z avtoimunsko boleznijo), vrednosti pod 1 pa na to, da bi bil dolčen gen lahko zaščiten (negativno asociacijo alela) za avtoimunsko bolezen.

4 REZULTATI

4.1 VREDNOTENJE REZULTATOV

4.1.1 Vrednotenje rezultatov, pridobljenih z metodo PCR-SSO

Za analizo in vrednotenje rezultatov, pridobljenih z metodo PCR-SSO, smo uporabili program HLA Fusion. Primer prikaza rezultata je viden na Sliki 9. Levo spodaj vsak stolpec prikazuje odstotek pozitivnih vrednosti za eno sondu. Rdeče so označene sonde, za katere je vrednost presegla vnaprej določeno mejno vrednost (sivi kvadrat), modro pa sonde, za katere ta vrednost ni bila dosežena. Skrajno levo (vijolično) so vrednosti za pozitivni in negativno kontrolo. Desno zgoraj so vrednosti za posamezne sonde razporejene po velikosti, z vodoravno črto je prikazana mejna vrednost. Vzorec pozitivnih in negativnih reakcij na sondah program nato primerja z referenčnimi vrednostmi (modri stolpci na levi), ki so za vsak komplet reagentov v program vnesene vnaprej (Slika 10). Na ta način program določi alela oz. skupino alelov, prisotno na preiskovanem lokusu *HLA* v našem vzorcu.



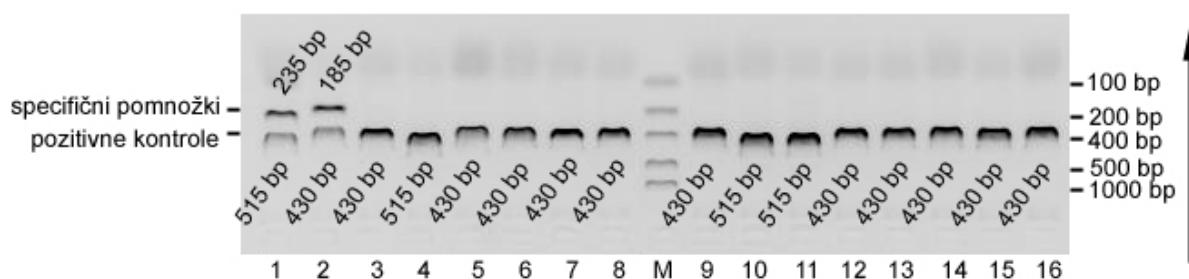
Slika 9: Analiza rezultatov s programom HLA Fusion.

Bead ID	Alleles Specificity
001	B*07:02:01~02:21/02:23~28/30~64/66~69/73~85/87~113/115~142/144; B*13:14; B*14:01:01~01:02/07N~08/10/12/14/19/26; B*15:68; B*18:43; B*27:37; B*38:01:01~04/06~32/34N~37; B*39:01:01:01~03/05:01~11/13:01~30/32~40N/42~62/64~68; B*40:40; B*42:01:01~02/04~08/10~16; B*44:130; B*48:01:01~21/23~27; B*51:57; B*53:21; B*55:10; B*57:10; B*67:01:01~03; B*81:01~05
002	B*57:01:01~19/21~52; B*58:01:01~02/05~28/30~31N/33~36
003	B*27:01~05/08/05:10~11/13~15/17/19~21/24~25/27~28/30/32~38/40~58/60~76/78~84/86; B*44:97; B*73:01~02
004	B*08:02; B*13:01:01~08Q/10~27/29~38/40~52; B*15:36/89/115; B*18:09; B*27:01; B*37:10; B*38:02:01~04/08/15/18/23/29/35; B*40:47/96/110/157; B*44:02:01:01~02:18/02:20~05/02/07~08/10~17/19N~24/26~45/47~49/51~74/76~89/91~94/96~126/128/130/132~139; B*47:04; B*49:02; B*51:54/78; B*52:20; B*53:09/11~13; B*56:07 (Bw4)
005	B*07:03/16; B*15:11:01~11/05/143/148~149N/152/209N/215; B*39:10:01/16~17/20/63; B*40:61; B*42:07
006	B*07:13; B*35:186; B*46:01:01~01:04/01:06~15N/17~21/02/23~30; B*56:14; B*67:02
007	B*08:62; B*13:23; B*15:204/210/212/225; B*18:68; B*35:63; B*40:01:01~01:12/01:14~01:23/07/14:01~16/22N~23/25/30~34/36/38/42~43/45~48/51~55/59~63/65~67/69/72:01~73/76~77/79~81/84/87:01~88/92/100~102/106/108/112~114/116~118N/121/123~126/128/130/132/134~136/138~141/146~147/150~156/158/160/163/166/168/170~172/175/178~179; B*41:01~19; B*44:15/18/55; B*45:01~13; B*46:14; B*48:22; B*49:01:01~09/11~20; B*50:01:01~12/14~15; B*55:16; B*57:39/51

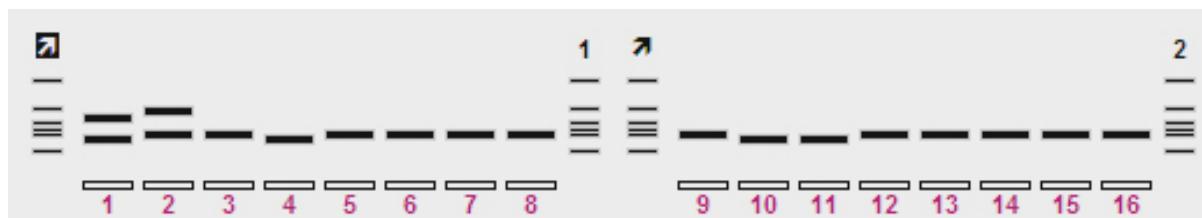
Slika 10: Odsek iz preglednice, kakršna je vnešena v program HLA Fusion (prirejeno po Bead probe information..., 2012). V levem stolpcu je podana zaporedna številka mikrokroglice oziroma sonde, v desnem stolpcu pa so podani aleli *HLA-B*, ki se na to sondo lahko vežejo. Sond je lahko znotraj posameznega komercialnega kompleta več sto.

4.1.2 Vrednotenje rezultatov, pridobljenih z metodo PCR-SSP

Vzorec prog, viden pri obsevativitvi agaroznega gela z UV svetlobo (Slika 11), smo vnesli v program Olerup SSP AB SCORE (Slika 12). Program deluje na podlagi preglednic z možnimi aleli *HLA*, ki jih je set začetnih oligonukleotidov iz posamezne vdolbinice na komercialnem kompletu zmožen pomnožiti s PCR (Slika 13). V teh preglednicah, priloženih vsakemu komercialnemu kompletu Olerup SSP, se nahajajo tudi podatki o pričakovanih dolžinah pozitivnih kontrol in specifičnih pomnožkov vsakega seta začetnih oligonukleotidov. Dolžine pomnožkov PCR smo na agaroznem gelu ocenili s pomočjo označevalca velikosti (Olerup SSP HLA..., 2011).



Slika 11: Agarozni gel, slikan pod UV svetlobo, za subtipizacijo skupine alelov *HLA-DRB1*07* s komercialnim kompletom PCR-SSP HLA-DQB1 (Olerup SSP). Označene so dolžine pozitivnih kontrol, dolžine specifičnih pomnožkov in smer poteka elektroforezne ločbe. 1-16 – produkti PCR z uporabo začetnih oligonukleotidov iz vdolbinic 1-16 komercialnega kompleta PCR-SSP *HLA-DRB1* (Olerup SSP); M – označevalec velikosti (dolžine so označene na desni strani slike).



Slika 12: Vnos rezultata, pridobljenega z elektroforezno ločbo na agaroznem gelu, v program Olerup SSP AB SCORE.

INTERPRETATION TABLE DRB1*07 PCR-SSP subtyping								INTERPRETATION TABLE DRB1*07 PCR-SSP subtyping								
Amplification patterns of the DRB1*07:01 to *07:21 alleles								Amplification patterns of the DRB1*07:01 to *07:21 alleles								
	Well ⁵								Well ⁵							
Length of spec. PCR product	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Length of int. pos. control ¹	235	185	185	90	190	170	165	165	105	165	105	210	210	215	150	220
5'-primer(s) ²	14(127) 29(174) 29(174) 14(127)	14(127) 14(127) 14(127) 37(196)	14(127) 30(175)	14(127) 30(175)	57(256) 14(127) 14(127) 20(145)	57(256) 14(127) 14(127) 20(145)	57(256) 14(127) 14(127) 14(127)	5'-primer(s) ²								
3'-primer(s) ³	78(319) 78(319) 78(319) 29(174)	78(319) 78(319) 78(319) 29(174)	64(278) 57(257) 55(250) 78(319)	64(278) 57(257) 55(250) 78(319)	78(319) 55(251) 35(191) 78(319)	78(319) 55(251) 35(191) 78(319)	78(319) 55(251) 35(191) 78(319)	3'-primer(s) ³								
Well No. DRB1 allele ⁴	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	14	16
*07:01:01:01-07:01:03	1	2														*07:01:01:01-07:01:03
*07:03	1		3													*07:03
*07:04	1			4												*07:04
*07:05	1	2			5											*07:05
*07:06	1	2				6										*07:06
*07:07	1	2					7									*07:07
*07:08	1	2						8								*07:08
*07:09	1	2	3													*07:09
*07:10N	1	2		4												*07:10N
*07:11	1				5											*07:11
*07:12	1	2														*07:12
*07:13	1	2														*07:13
*07:14	1	2														*07:14
*07:15	1	2														*07:15
*07:16	1	2														*07:16
*07:17	1	2														*07:17
*07:18	1	2														*07:18
*07:19	1	2														*07:19
*07:20	1	2														*07:20
*07:21	1	2														*07:21
*04:90, 09:08																*04:90, 09:08
DRB1 allele ⁴	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Well No.																DRB1 allele ⁴
																Well No.

Slika 13: Preglednica, na podlagi katere deluje program Olerup SSP AB SCORE™ (prirejeno po Interpretation table..., 2012). V prikazanem primeru so bili vzorec DNA s PCR zmožni pomnožiti začetni oligonukleotidi iz prve in druge vdolbinice komercialnega kompleta, iz česar sledi, da ima naš preiskovanec prisoten alel *HLA-DRB1*07:01* (označeno rdeče). Modro so označene dolžine specifičnih produktov, ki jih s PCR ustvarijo začetni oligonukleotidi v posameznih vdolbinicah, rumeno pa dolžine pozitivnih kontrol.

4.2 VSI V RAZISKAVI ZAZNANI ALELI *HLA* IN DELEŽI STATISTIČNO POMEMBNIH ALELOV *HLA*

V celotnem vzorcu (314 oseb) je bilo zaznanih 32 različnih alelov *HLA-DRB1* (od teh 10 (31%) statistično značilnih za T1D in/ali T1D+HT), 16 alelov *HLA-DQB1* (od teh 8 (50%) statistično značilnih za T1D in/ali T1D+HT), 24 skupin alelov *HLA-B* (od teh 6 (25%) statistično značilnih za T1D in/ali T1D+HT) in 18 skupin alelov *HLA-A* (od teh nobeden (0%) statistično značilen za T1D in/ali T1D+HT). Pogostnosti, vrednosti p in RR za vse zaznane alele so prikazane v Prilogi A.

4.3 ALELI IN HAPLOTIPI *HLA*, POVEZANI S POVIŠANIM TVEGANJEM ZA RAZVOJ T1D IN T1D+HT

V Preglednici 11 so prikazani aleli *HLA*, povezani s povišanim tveganjem za razvoj T1D in T1D+HT.

Preglednica 11: Aleli *HLA*, povezani s povišanim tveganjem za razvoj T1D in T1D+HT

alel	<i>K</i> <i>f</i> (%) <i>N</i> =131	<i>T1D</i> <i>f</i> (%) <i>N</i> =131	<i>T1D+HT</i> <i>f</i> (%) <i>N</i> =52	<i>T1D : K</i>		<i>T1D+HT : K</i>		<i>T1D+HT : T1D</i>	
				<i>p</i>	<i>RR</i>	<i>p</i>	<i>RR</i>	<i>p</i>	<i>RR</i>
<i>DRB1*03:01</i>	23,66	45,04	50,00	$4,14 \times 10^{-4}$	2,62	$7,58 \times 10^{-4}$	3,19	NS	NS
<i>DRB1*04:01</i>	9,92	46,56	42,31	$3,14 \times 10^{-11}$	7,66	$1,99 \times 10^{-6}$	6,48	NS	NS
<i>DRB1*04:02</i>	3,05	19,85	15,38	$2,17 \times 10^{-5}$	7,12	$5,06 \times 10^{-3}$	5,41	NS	NS
<i>DRB1*04:04</i>	3,05	5,34	11,54	NS	NS	$3,26 \times 10^{-2}$	3,96	NS	NS
<i>DQB1*02:01</i>	29,77	46,56	50,00	$7,43 \times 10^{-3}$	2,04	$1,59 \times 10^{-2}$	2,34	NS	NS
<i>DQB1*03:02</i>	12,98	71,76	65,38	$6,53 \times 10^{-23}$	16,49	$6,19 \times 10^{-12}$	12,20	NS	NS
<i>B*08</i>	13,74	31,30	40,38	$1,03 \times 10^{-3}$	2,81	$2,13 \times 10^{-4}$	4,19	NS	NS
<i>B*15</i>	7,63	23,66	13,46	$5,44 \times 10^{-4}$	3,63	NS	NS	NS	NS
<i>B*50</i>	3,05	11,45	3,85	$1,52 \times 10^{-2}$	3,77	NS	NS	NS	NS

K – kontrolna skupina; *T1D* – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1; *T1D+HT* – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in Hashimotovim tiroiditisom; *f*% - pogostnost pojavljanja v odstotkih; *N* – velikost vzorca, število oseb; *p* – vrednost *p*; *RR* – relativno tveganje; NS – razlika ni statistično značilna.

4.3.1 T1D v primerjavi s kontrolno skupino

K predispoziciji za T1D najbolj prispevata alela *DQB1*03:02* (*p*= $6,53 \times 10^{-23}$, *RR*=16,49) in *DRB1*04:01* (*p*= $3,14 \times 10^{-11}$, *RR*=7,66). Ostali aleli, katerih vplivi so se tudi pokazali za statistično značilne, so še *DRB1*04:02* (*p*= $2,17 \times 10^{-5}$, *RR*=7,12), *DRB1*03:01* (*p*= $4,14 \times 10^{-4}$, *RR*=2,62), *B*15* (*p*= $5,44 \times 10^{-4}$, *RR*=3,63), *B*08* (*p*= $1,03 \times 10^{-3}$, *RR*=2,81), *DQB1*02:01* (*p*= $7,43 \times 10^{-3}$, *RR*=2,04) in *B*50* (*p*= $1,52 \times 10^{-2}$, *RR*=3,77).

4.3.2 T1D+HT v primerjavi s kontrolno skupino

Pri bolnikih s T1D+HT so se v primerjavi s kontrolno skupino pogosteje pojavljali aleli *DQB1*03:02* (*p*= $6,19 \times 10^{-12}$, *RR*=12,20), *DRB1*04:01* (*p*= $1,99 \times 10^{-6}$, *RR*=6,48), *B*08*

($p=2,13 \times 10^{-4}$, RR=4,19), $DRB1*03:01$ ($p=7,58 \times 10^{-4}$, RR=3,19), $DRB1*04:02$ ($p=5,06 \times 10^{-3}$, RR=5,41) in $DQB1*02:01$ ($p=1,59 \times 10^{-2}$, RR=2,34). Večina alelov, ki so pogostejši pri bolnikih s T1D+HT kot pri kontrolni skupini, je hkrati pogostejših tudi pri bolnikih s samo T1D. Edini alel, ki je pogostejši pri skupini s T1D+HT, in ne hkrati pri skupini s samo T1D, je $DRB1*04:04$ ($p=3,26 \times 10^{-2}$, RR=3,96). V primerjavi s kontrolno skupino nista statistično značilno različna alela $B*15$ in $B*50$, kot se je to pokazalo pri bolnikih s T1D.

4.3.3 T1D v primerjavi s T1D+HT

Med skupinama s T1D in T1D+HT ni statistično značilnih razlik v alelih, ki povečujejo tveganje za razvoj bolezni.

4.3.4 Haplotipi, povezani s povišanim tveganjem za nastanek T1D in T1D+HT

Oba alela z močno povišano pojavnostjo pri bolnikih s T1D in T1D+HT, $DRB1*04:01$ ($p=3,14 \times 10^{-11}$ za T1D, $p=1,99 \times 10^{-6}$ za T1D+HT) in $DQB1*03:02$ ($p=6,53 \times 10^{-23}$ za T1D, $p=6,19 \times 10^{-12}$ za T1D+HT), sta del haplotipa $DR4-DQ8$. Namesto alela $DRB1*04:01$ lahko v haplotipu nastopata tudi $DRB1*04:02$ ali $DRB1*04:04$, ki sta se prav tako pokazala kot rizična alela (slednji le pri bolnikih s T1D+HT). Aleli $DRB1*03:01$ ($p=4,14 \times 10^{-4}$ za T1D, $p=7,58 \times 10^{-4}$ za T1D+HT), $DQB1*02:01$ ($p=7,43 \times 10^{-3}$ za T1D, $p=1,59 \times 10^{-2}$ za T1D+HT) in $B*08$ ($p=1,03 \times 10^{-3}$ za T1D, $p=2,13 \times 10^{-4}$ za T1D+HT) so del haplotipa $DR3-DQ2-B8$.

4.4 ALELI IN HAPLOTIPI *HLA*, POVEZANI Z ZNIŽANIM TVEGANJEM ZA RAZVOJ T1D IN T1D+HT

V Preglednici 12 so prikazani aleli *HLA*, povezani z znižanim tveganjem za razvoj T1D in T1D+HT.

Preglednica 12: Aleli *HLA*, povezani z znižanim tveganjem za razvoj T1D in T1D+HT

alel	K f(%) N=131	T1D f(%) N=131	T1D+HT f(%) N=52	T1D : K		T1D+HT : K		T1D+HT : T1D	
				p	RR	p	RR	p	RR
<i>DRB1*01:01</i>	27,48	15,27	7,69	$2,32 \times 10^{-2}$	0,48	$2,80 \times 10^{-3}$	0,24	NS	NS
<i>DRB1*11:01</i>	15,27	4,58	1,92	$6,26 \times 10^{-3}$	0,28	$9,09 \times 10^{-3}$	0,16	NS	NS
<i>DRB1*11:04</i>	10,69	1,53	9,62	$3,18 \times 10^{-3}$	0,16	NS	NS	$2,05 \times 10^{-2}$	6,00
<i>DRB1*13:01</i>	11,45	1,53	0,00	$1,70 \times 10^{-3}$	0,15	$6,71 \times 10^{-3}$	0,07	NS	NS
<i>DRB1*14:01</i>	7,63	0,00	0,00	$1,63 \times 10^{-3}$	0,04	NS	NS	NS	NS
<i>DRB1*15:01</i>	21,37	0,00	3,85	$1,50 \times 10^{-9}$	0,01	$3,34 \times 10^{-3}$	0,18	NS	NS
<i>DQB1*03:01</i>	31,30	6,87	13,46	$5,23 \times 10^{-7}$	0,17	$1,51 \times 10^{-2}$	0,36	NS	NS
<i>DQB1*05:01</i>	28,24	16,79	11,54	$3,78 \times 10^{-2}$	0,52	$1,96 \times 10^{-2}$	0,35	NS	NS
<i>DQB1*05:02</i>	19,08	9,16	9,62	$3,22 \times 10^{-2}$	0,44	NS	NS	NS	NS
<i>DQB1*05:03</i>	6,87	0,76	0,00	$1,92 \times 10^{-2}$	0,15	NS	NS	NS	NS
<i>DQB1*06:02</i>	18,32	0,00	1,92	$3,74 \times 10^{-8}$	0,02	$3,19 \times 10^{-3}$	0,13	NS	NS
<i>DQB1*06:03</i>	12,98	1,53	0,00	$4,70 \times 10^{-4}$	0,13	$3,66 \times 10^{-3}$	0,06	NS	NS
<i>B*07</i>	24,43	11,45	19,23	$6,45 \times 10^{-3}$	0,41	NS	NS	NS	NS
<i>B*27</i>	12,98	6,11	1,92	NS	NS	$2,59 \times 10^{-2}$	0,19	NS	NS
<i>B*57</i>	6,87	0,76	0,00	$1,92 \times 10^{-2}$	0,15	NS	NS	NS	NS

K – kontrolna skupina; T1D – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1; T1D+HT – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in Hashimotovim tiroiditisom; f% - pogostnost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb; p – vrednost p; RR – relativno tveganje; NS - razlika ni statistično značilna.

4.4.1 T1D v primerjavi s kontrolno skupino

Aleli *HLA*, ki kažejo zaščitno vlogo proti razvoju T1D (so pri kontrolni skupini pogostejši kot pri bolnikih s T1D), so *DRB1*15:01* ($p=1,50 \times 10^{-9}$, RR=0,01), *DQB1*06:02* ($p=3,74 \times 10^{-8}$, RR=0,02), *DQB1*03:01* ($p=5,23 \times 10^{-7}$, RR=0,17), v manjši meri pa še *DRB1*01:01*, *DRB1*11:01*, *DRB1*11:04*, *DRB1*14:01*, *DQB1*05:01*, *DQB1*05:02*, *DQB1*05:03*, *DQB1*06:03*, *B*07* in *B*57* ($p=4,70 \times 10^{-4}$ - $3,78 \times 10^{-2}$, RR=0,04 – 0,52).

4.4.2 T1D+HT v primerjavi s kontrolno skupino

Aleli *HLA* z zaščitno funkcijo proti T1D+HT (so pri kontrolni skupini pogostejši kot pri bolnikih s T1D+HT) so *DRB1*01:01*, *DRB1*11:01*, *DRB1*13:01*, *DRB1*15:01*, *DQB1*03:01*, *DQB1*05:01*, *DQB1*06:02*, *DQB1*06:03* in *B*27* ($p=1,96\times10^{-2}$ - $2,80\times10^{-3}$, RR=0,06 – 0,36). Edina skupina alelov, ki je zaščitna le proti T1D+HT, ne pa tudi proti T1D sami, je *B*27* ($p=2,59\times10^{-2}$, RR=0,19).

4.4.3 T1D v primerjavi s T1D+HT

Alel *DRB1*11:04* kaže zaščitno vlogo proti T1D ($p=3,18\times10^{-3}$, RR=0,16), ne pa hkrati tudi za T1D+HT. Razlika v pogostnosti alela *DRB1*11:04* med bolniki s T1D in bolniki s T1D+HT je statistično značilna ($p=2,05\times10^{-2}$, RR=6).

4.4.4 Haplotipi, povezani z znižanim tveganjem za T1D in T1D+HT

Aleli *DRB1*15:01* ($p=1,50\times10^{-9}$ za T1D, $3,34\times10^{-3}$ za T1D+HT), *DQB1*06:02* ($p=3,74\times10^{-8}$ za T1D, $3,19\times10^{-3}$ za T1D+HT) in *B*07* ($p=6,45\times10^{-3}$ za T1D, NS za T1D+HT) so del razširjenega haplotipa *DR15-DQ6-B7*. *DRB1*15:01* je v vezavnem neravnovesju tudi z *DQB1*05:02* ($p=3,22\times10^{-2}$ za T1D, NS za T1D+HT), *DRB1*13:01* ($p=1,70\times10^{-3}$ za T1D, $6,71\times10^{-3}$ za T1D+HT) pa z *DQB1*05:01* ($p=3,78\times10^{-2}$ za T1D, $1,96\times10^{-2}$ za T1D+HT) ali *DQB1*06:02*. Alela *DRB1*11:01* ($p=6,26\times10^{-3}$ za T1D, $9,09\times10^{-3}$ za T1D+HT) in *DQB1*03:01* ($p=5,23\times10^{-7}$ za T1D, $1,51\times10^{-2}$ za T1D+HT) sta del razširjenega haplotipa *DR11-DQ7*, *DRB1*11:01* pa je v vezavnem neravnovesju tudi z za T1D zaščitnim *DRB1*05:02* ($p=3,22\times10^{-2}$). V vezavnem neravnovesju sta tudi zaščitna alela *DRB1*01:01* ($p=2,32\times10^{-2}$ za T1D, $2,80\times10^{-3}$ za T1D+HT) in *DQB1*05:01*. Haplotip *DRB1*14:01* ($p=1,63\times10^{-3}$)-*DQB1*05:03* ($p=1,92\times10^{-2}$) je statistično značilen le v primeru bolnikov s T1D.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 DELEŽ ALELOV *HLA*, ZAZNANIH V NAŠEM VZORCU SLOVENSKE POPULACIJE, V PRIMERJAVI Z VSEMI DO ZDAJ ZNANIMI ALELI *HLA*

Sistem *HLA* je eden najbolj polimorfnih genskih kompleksov v naravi. Septembra 2012 je bilo število odkritih alelov *HLA* preko 8000, od tega dobri dve tretjini alelov *HLA* I. razreda in slaba tretjina alelov *HLA* II. razreda. Zabeleženih alelov *HLA-DRB1* je bilo 1159, *HLA-DQB1* pa 176 (IMGT/HLA Database..., 2012). Pri naši vzorčni skupini smo opazili 32 alelov *HLA-DRB1*, kar predstavlja približno 3% vseh do zdaj znanih alelov tega lokusa, ter 16 alelov *HLA-DQB1*, kar predstavlja približno 9% do zdaj znanih alelov tega lokusa. Pri tem je treba upoštevati, da je od vseh odkritih alelov le 27-30% pogostih alelov. Kadar je govora o sistemu *HLA*, za pogoste veljajo tisti aleli, ki se pojavljajo s pogostnostjo več kot 0,1% v katerikoli referenčni populaciji, oz. so jih opazili pri več kot treh nesorodnih posameznikih (Cano in sod., 2007). Ker je naša raziskava obravnavala le predstavnike slovenske populacije, je zaznavanje le majhnega deleža vseh obstoječih alelov *HLA* razumljiva.

5.2 HAPLOTIPI, POVEZANI S POVIŠANIM TVEGANJEM ZA RAZVOJ T1D IN T1D+HT

Analiza rezultatov študije je pokazala, da je dozvetnost za T1D in T1D+HT najbolj povišana pri posameznikih, ki nosijo alel *DQB1*03:02* in/ali *DRB1*04:01*. Alela sestavljata haplotip *DR4-DQ8*. Statistično značilno povišano je tudi pojavljanje dveh drugih alelov iz skupine *DRB1*04* – *DRB1*04:02* in *DRB1*04:04* (slednjega le pri bolnikih z obema boleznima). Izследki naše študije so potrdili povezavo specifičnosti DR4 s povišano dozvetnostjo za T1D in HT, pokazano že v predhodnih študijah (Farid in Thompson, 1986; Petrone in sod., 2001; Zeitlin, 2010), tudi pri slovenski populaciji, hkrati pa pokazali na različno vlogo posameznih alelov znotraj DR4. Pri bolnikih s T1D in T1D+HT se pogosteje pojavlja tudi haplotip *DR3-DQ2-B8*. Pogostnosti pojavljanja alelov *DRB1 *03:01*, *DQB1*02:01* in *B*08* pri bolnikih so v primerjavi s pogostnostmi pri kontrolni slovenski populaciji povišane. Podobno so pokazali izsledki študij v preteklosti

(Moens in sod., 1978; Farid in sod., 1981; Stenszky in sod., 1987; Tandon in sod., 1991; Hunt in sod., 2001; Zeitlin, 2010).

5.3 HAPLOTIPI, POVEZANI Z ZNIŽANIM TVEGANJEM ZA RAZVOJ T1D IN T1D+HT

Za močno zaščitne proti T1D so se izkazali aleli *DRB1*15:01* in dva alela skupine *DQ6* - *DQB1*06:02* in *DQB1*06:03*. Čeprav tudi statistično značilno različne v primerjavi s kontrolno skupino, so razlike pri bolnikih z obema boleznima precej manjše. *DR15* in *DQ6* skupaj z *B7*, ki se tudi pojavlja z znižano pogostnostjo pri bolnikih s T1D (ne pa pri bolnikih z obema boleznima), sestavlja haplotip *DR15-DQ6-B7* oz. *DR2-DQ6-B7* (*DR15* je del serološko določenega *DR2*), ki ga je v literaturi pogosto moč zaslediti kot zaščitnega proti T1D, tudi v študiji na slovenski populaciji (Bratanič in sod., 2010). *DR15* je v vezavnem neravnovesju z aleli *DQ5*, *DRB1*13:01* z aleli *DQ5* in *DQ6*, *DQB1*03:01* pa z aleli *DRB1*11* (haplotip *DR11-DQ3*). Haplotip tvorijo tudi zaščitni aleli *DRB1*01:01* in aleli iz skupine *DQ5*, ter *DRB1*14:01* ter *DQB1*05:03*.

5.4 VLOGA POSAMEZNIH ALELOV IN AMINOKISLINSKIH OSTANKOV

Aleli, ki so v primerjavi s kontrolno skupino pokazali statistično značilno različno pojavnost pri bolnikih s T1D+HT, ne pa pri tistih s samo T1D, so alel *DRB1*04:04* in skupina alelov *B*27*. Aleli s statistično značilno različno pogostnostjo pri bolnikih s T1D v primerjavi s kontrolno skupino, ne pa pri bolnikih z obema boleznima v primerjavi s kontrolno skupino, so: *DRB1*11:04*, *DRB1*14:01*, *DQB1*05:02*, *DQB1*05:03*, *B*07*, *B*15*, *B*50* in *B*57*. Aleli, ki so pokazali nekoliko močnejšo povezavo s T1D+HT kot s T1D samo v primerjavi s kontrolno skupino, so *DRB1*01:01*, *DRB1*04:04*, *DQB1*05:01*, *B*08* in *B*27*, vendar pa je bila razlika med skupinama T1D in T1D+HT statistično značilna le pri *DRB1*11:04* (2.05×10^{-2} , RR=6).

Preglednici 13 in 14 predstavljata aminokislinske ostanke na nekaterih za vezavo peptidnega antiga na pomembnih mestih znotraj molekul *HLA-DRB1* (Preglednica 13) in *HLA-DQB1* (Preglednica 14), pri katerih je bila ugotovljena statistično značilno različna

pogostnost pojavljanja med obolelimi in kontrolno skupino. Podatke o nukleotidnih zaporedjih alelov smo pridobili s poravnavanjem zaporedij alelov v programu IMGT/HLA Sequence Alignment Tool (IMGT/HLA Sequence..., 2012).

Preglednica 13: Aminokislinski ostanki na nekaterih za vezavo peptidnega antigena pomembnih mestih na verigi β molekul HLA-DR pri statistično pomembnih alelih

alel	mesto na verigi β molekul HLA-DR			skupina bolnikov	
	71. mesto	74. mesto	86. mesto	TID	TID+HT
DRB1*03:01	Lys	Arg	Val	rizični	rizični
DRB1*04:01	Lys	Ala	Gly	rizični	rizični
DRB1*04:02	Glu	Ala	Val	rizični	rizični
DRB1*04:04	Arg	Ala	Val	NS	rizični
DRB1*01:01	Arg	Ala	Gly	zaščitni	zaščitni
DRB1*11:01	Arg	Ala	Gly	zaščitni	zaščitni
DRB1*11:04	Arg	Ala	Val	zaščitni *	NS *
DRB1*13:01	Glu	Ala	Val	zaščitni	zaščitni
DRB1*14:01	Arg	Glu	Val	zaščitni	NS
DRB1*15:01	Ala	Ala	Val	zaščitni	zaščitni

R – za bolezen/bolezni rizični alel; Z – za bolezen/bolezni zaščitni alel; NS – pogostnost pojavljanja alela ni statistično značilno različna od pogostnosti pri kontrolni skupini; * - statistično značilna razlika v pogostnosti alela med obema skupinama bolnikov.

Preglednica 14: Aminokislinski ostanki na 57. mestu verige β molekul HLA-DQ pri statistično pomembnih alelih

alel	mesto na verigi β molekul HLA-DQ		skupina bolnikov	
	57. mesto		TID	TID+HT
DQB1*02:01	Ala		rizični	rizični
DQB1*03:02	Ala		rizični	rizični
DQB1*03:01	Asp		zaščitni	zaščitni
DQB1*05:01	Val		zaščitni	zaščitni
DQB1*05:02	Ser		zaščitni	NS
DQB1*05:03	Asp		zaščitni	NS
DQB1*06:02	Asp		zaščitni	zaščitni
DQB1*06:03	Asp		zaščitni	zaščitni

R – za bolezen/bolezni rizični alel; Z – za bolezen/bolezni zaščitni alel; NS – pogostnost pojavljanja alela ni statistično značilno različna od pogostnosti pri kontrolni skupini.

5.4.1 *DRB1*11*

Alel *DRB1*11:04* se pri bolnikih s T1D pojavlja statistično značilno manj pogosto kot pri kontrolni skupini, torej deluje zaščitno, medtem ko pri obolelih za obema boleznima ne kaže znižane pogostnosti v primerjavi s kontrolno skupino. Hkrati ima alel *DRB1*11:01* zaščitno vlogo pri obeh skupinah obolelih. Molekuli *DRB1*11:01* in *DRB1*11:04* se med seboj razlikujeta le na enem mestu, in sicer na 86. mestu verige β . *DRB1*11:01* ima na tem mestu glicin (Gly), *DRB1*11:04* pa valin (Val). Omenjeni dimorfizem je dokaj razširjen, pojavlja se pri DR1, DR2, DR3, DR4, DR5 in DR6 in so ga preučevali že v preteklosti (Ong in sod., 1991). Spremembu AK na tem mestu vpliva na konformacijo reže za vezavo peptida molekule HLA II. razreda, natančneje prvega hidrofobnega žepa P1, ki je pomemben za vezavo peptida v kompleks HLA (Wu in Gorski, 1997; Hirayama in sod., 1998). Na ta način dimorfizem vpliva na specifiko vezave peptidnega antiga, na repertoar peptidov, ki se na molekulo HLA vežejo, in na T-celično prepoznavanje antiga (Busch in sod., 1991). Možen je tudi vpliv na stabilnost vezave peptida na molekulo HLA (McKinney in sod., 1994) in združevanje verig α in β (Ong in sod., 1991).

*DRB1*11* je podskupina DR5. Zanimivo je, da so nekatere starejše študije odkrile pozitivno povezavo med obolenostjo za HT in pogostnostjo pojavljanja DR5 (Weissel in sod., 1980; Farid in sod., 1981). Rezultati naše študije torej nakazujejo, da k dovzetnosti za HT ne prispevajo vsi, temveč samo določeni aleli podskupine DR5 (*DRB1*11:04*). *DRB1*11:01* se je namreč izkazal za zaščitnega. V primeru, da bi bila ena od raziskovanih skupin tudi bolniki s HT in brez T1D, bi morda alel *DRB1*11:04* še bolj izstopal kot rizičen.

5.4.2 *DRB1*04*

Alel *DRB1*04:04* se kaže kot dejavnik tveganja le pri bolnikih s T1D+HT, ne pa pri bolnikih s samo T1D. Hkrati je pogostnost pojavljanja alela *DRB1*04:01* povišana pri obeh skupinah obolelih. Molekuli, ki sta produkta teh genov, se med sabo razlikujeta le na 86. mestu verige β . *DRB1*04:04* ima na tem mestu Val, *DRB1*04:01* pa Gly. Val na 86. mestu verige β molekule DR se je torej zopet izkazal kot rizični dejavnik.

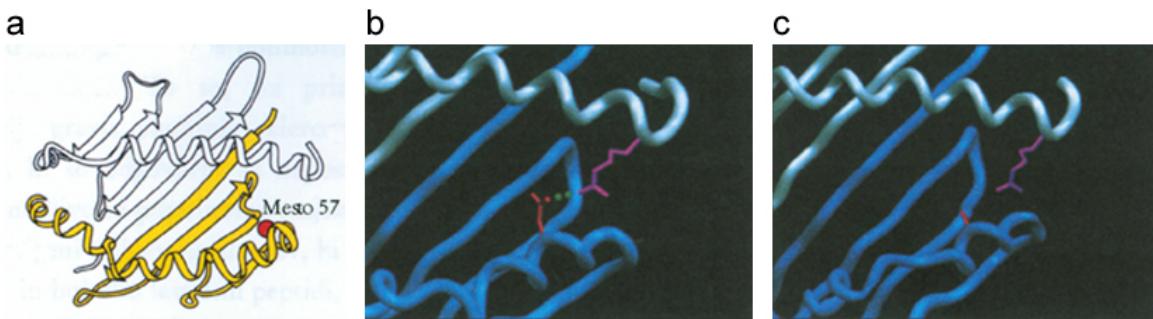
5.4.3 DRB1*03:01

Alel *DRB1*03:01* je bil najpogosteje preučevan v povezavi z bazedovko, poleg HT najbolj pogosti obliki AITD. Molekula DRB1*03:01 ima na 71. mestu verige DR β ima lizin (Lys), na 74. mestu verige DR β pa Arg. AK na teh mestih odločilno vplivata na velikost in naboj četrtega žepa P4, ki se nahaja na površini molekule HLA-DR, znotraj reže za vezavo peptida. Ker sta tako Lys kot Arg močno pozitivno nabita, dajeta prednost vezavi epitopov, ki imajo znotraj vezavnega motiva negativno nabit AK (Inaba in sod., 2010; Ban in sod., 2004). Inaba in sod. (2010) so preizkušali učinkovitost vezave zunajceličnega dela ščitničnega antigena TSH-R (TSH-R-ECD), ki ima na 4. mestu vezavnega motiva Glu ali Asp (oba AK z negativno nabitim stranskima skupinama), z različnimi molekulami HLA-DR. Epitop se je na molekule HLA-DR3 vezal z večjo afiniteto kot na molekule HLA-DR z drugačnimi AK na 71. in 74. mestu verige DQ β . Močnejši je bil tudi T-celični imunski odziv. Hkrati ima molekula DRB1*03:01 Val na 86. mestu verige, torej pomembno prispeva tudi k lastnostim vezavnega žepa P1.

5.4.4 DQB1*03

Pogostnost pojavljanja alela *DQB1*03:02* se je pokazala kot najbolj statistično značilno povišana tako pri bolnikih s T1D kot s T1D+HT. Hkrati se je alel *DQB1*03:01* pokazal za zaščitnega. Obe molekuli, ki sta produkta teh genov, se med sabo razlikujeta le v šestih AK, od tega so štiri (na 13., 26., 45. in 57. mestu verige DQ β) znotraj domen, pomembnih za imunsko prepoznavanje.

Največjo pomembnost pripisujejo 57. mestu na verigi β DQ. AK na tem mestu ima navadno negativno nabit stransko skupino, medtem ko aleli, pogostejši pri obolelih, večkrat kodirajo nevtralne AK. Molekula DQB1*03:01 ima na 57. mestu DQ β Asp (AK z negativno nabit stransko skupino), DQB1*03:02 pa nevtralni Ala. Aminokislinska zamenjava naj bi onemogočala tvorbo solnega mostička v reži za vezavo peptida molekule DQ (Kwok in sod., 1989; Kwok in sod., 1996), hkrati pa spremenila nabolj celotne okoliške regije in tako povišala afiniteto za vezavo določenih TCR (Yoshida in sod., 2010).



Slika 14: Vpliv 57. mesta verige DQ β na režo za vezavo peptida (prirejeno po Jeneway in sod., 2001). a: Umetitev 57. mesta verige DQ β znotraj molekule DQ. b: Tvorba solnega mostička je povezana z zaščito pred T1D. c: AK na tem mestu, ki onemogoča tvorbo solnega mostička, povzroči povišano dovzetnost do T1D.

Zamenjavi na 13. in 26. mestu sta konzervativni. Petinštirideseto mesto verige DQ β se sicer nahaja izven reže za vezavo peptida, torej ni direktno vpleteno v vezavo epitopa, lahko pa bi vplivalo na interakcije s TCR in T-celično prepoznavanje. Na molekuli DQB1*03:01 je prisoten Glu z negativno nabito stransko skupino, na molekuli DQB1*03:02 pa nevtralni Gly (Kwok in sod., 1989; Kwok in sod., 1996).

5.4.5 *DQB1*05*

Pogostnost alela *DQB1*05:01* je v primerjavi s kontrolno skupino nižja tako pri skupini s T1D kot s T1D+HT. Hkrati alela *DQB1*05:02* in *DQB1*05:03* kažeta nižjo pogostnost pri bolnikih s T1D v primerjavi s kontrolno skupino, ne pa tudi pri bolnikih s T1D+HT v primerjavi s kontrolno skupino. Produkt alela *DQB1*05:01* se od slednjih razlikuje na 57. mestu verige β , kjer je Val namesto serina (Ser) oz. asparaginske kisline (Asp). Mnoge študije na bolnikih s T1D kažejo močno zaščitno vlogo Asp na tem mestu, medtem ko se v primerih, ko je na 57. mestu verige alanin (Ala), Val ali Ser, zaščitna vloga zmanjša (Todd in sod., 1987; Morel in sod., 1988). Pri bolnikih s T1D+HT zaščitno deluje le Val. Ser in Asp na tem mestu ne delujeta zaščitno, morda pa pomenita celo povišano tveganje za razvoj HT.

5.4.6 *B*27*

Skupina alelov *B*27* je pokazala zaščitno vlogo pri skupini s T1D+HT, ne pa pri bolnikih s samo T1D. Pojavljanje alelov *B*27* je sicer močno povišano pri bolnikih z ankirozirajočim spondilitisom – prisotni so pri kar 92% obolelih (Khan, 2010). Ena od teorij, ki skuša razložiti, zakaj aleli pomenijo tolikšno tveganje, govori tudi o vlogi prostega cisteina (Cys) na 67. mestu verige $\alpha 1$. *In vitro* se preko Cys HLA-B*27 povezuje v homodimere, ki nimajo $\beta 2$ -mikroglobulinske domene. Frakcija celic T bolnikov bi lahko izražala ligande za HLA homodimere (Bowness, 2002).

5.4.7 *DQBI*06*

Alela *DQBI*06:02* in *DQBI*06:02* oba kažeta nižjo pojavnost pri bolnikih kot pri kontrolni skupini, torej delujeta zaščitno. Produkta imata na 57. mestu verige DQ β Asp, katere zaščitna vloga proti T1D je znana iz literature.

5.4.8 *DRBI*01:01*

V primeru HLA-DR1 Wu in Gorski (1997) poročata o kombiniranem delovanju AK na 85. in 86. mestu β verige molekule DR. Produkt alela *DRBI*01:01*, ki ima povišano pogostnost pojavnosti pri bolnikih s T1D in T1D+HT, ima na teh mestih Val in Gly, medtem ko na primer *DRB1*01:02* Ala in Val. Njihovi poskusi so pokazali, da se v primeru DR1, drugače kot pri drugih DR, Val na 86. mestu vedno pojavi le v kombinaciji z Ala na 85. mestu in da prav slednji polimorfizem poglavito vpliva na vezavo peptidov v molekulo DR.

5.4.9 *DRBI*14:01*

Alel *DRB1*14:01* na 86. mestu molekule kodira Val, medtem ko *DRB1*14:02* Gly, vendar pa obstajajo med molekulama razlike še na drugih mestih.

5.5 PROBLEM VREDNOTENJA REZULTATOV ASOCIACIJSKIH ŠTUDIJ

Glavni problem asociacijskih študij, ki raziskujejo povezave genov z boleznimi, je, da ne moremo z gotovostjo vedeti, ali je za razvoj bolezni res kritičen prav preučevani lokus ali je najdeni asociacijski gen le v vezavnem neravnovesju oz. neposredni bližini gena, ki je pravi krivec za bolezen. Odgovor na to nam lahko da le razkritje mehanizma bolezni, ki ga je moč povezati s polimorfizmom najdenega gena, kar pa je pogosto težko.

Pri študijah, ki iščejo rizične alele *HLA*, se pojavljajo še drugi dejavniki, ki otežujejo vrednotenje rezultatov. Mnogi geni *HLA* so v vezavnem neravnovesju z geni *HLA* drugih lokusov, torej se pogosto nahajajo in dedujejo skupaj. Tako je težko ugotoviti, v katerem od alelov, ki tvorijo haplotip, iskati glavnega krivca za razvoj bolezni.

Populacije iz različnih geografskih okolij izražajo različne nabore molekul *HLA* – takšne, ki so v njihovem okolju pomenile selekcijsko prednost. Razlike se kažejo bodisi v pogostnosti pojavljanja posameznih alelov ali haplotipov bodisi v prisotnosti za populacijo specifičnih alelov. Tako je rezultate študij, narejene na različnih etničnih skupinah, med seboj težko primerjati.

Primerjave otežujejo tudi pogoste spremembe nomenklature alelov *HLA*, ki so odsev hitrega napredka v razvoju metod tipizacije. Z modernejšimi metodami posamezne alele razločujejo na vedno večji resoluciji, ves čas odkrivajo nove in nove polimorfizme. Novejše študije tako pogosto razložijo nasprotujoče si rezultate študij iz preteklosti.

Manifestacija avtoimunskih bolezni, kakršni sta T1D in HT, je rezultat kombinacije mnogih genetskih in okoljskih dejavnikov, od katerih so nekateri znani, mnogi še ne. Ker v podobnih študijah zajemamo le enega ali nekaj genetskih faktorjev hkrati, so rezultati lahko zavajajoči. Tudi dejstvo, da je heterozigotnost v alelih *HLA* veliko pogostejša od homozigotnosti, pogosto zakrije učinke alelov, ki bi bili v homozigotni obliki morda bolj očitni.

Ker je regija *HLA* ena najbolj polimorfnih regij, je treba statistično primerjati zelo veliko število skupin. Posledično je v vsaki zelo omejeno število posameznikov. V takšnih pogojih se poveča možnost za lažno pozitivne rezultate.

Bowness (2002) povzema, da lahko ugotovljena statistično značilno različna pojavnost nekega alela *HLA* pomeni, da:

- je alel *HLA* v vezavnem neravnovesju s pravim vzročnim genom za razvoj bolezni,
- molekula *HLA*, produkt tega alela, prednostno veže in predstavlja avtoantigene celicam T,
- je molekula *HLA* vključena v selekcijo repertoarja celic T v timusu,
- prihaja do navzkrižne reaktivnosti med protitelesi, usmerjenimi proti bakterijskemu proteinu in proti molekuli *HLA*,
- interakcija molekule *HLA* in bakterijskega superantigena povzroča nespecifično stimulacijo clic T,
- se peptidne podenote dotične molekule *HLA* predstavljajo znotraj druge molekule *HLA*, kar sproži T-celični odziv.

Naša študija je zajemala tri skupine: bolnike s T1D, bolnike s T1D+HT in predstavnike zdrave, kontrolne populacije. Ker nismo imeli skupine z le HT, je težko z gotovostjo zaključiti, ali nekateri aleli specifično prispevajo prav k tej bolezni. Prav tako je težko potrditi skupno etiologijo T1D in HT. Čeprav je bilo mnogo alelov hkrati statistično značino bolj oz. manj pogostih pri obeh skupinah, je bila povezava s T1D samo največkrat močnejša. To bi lahko pomenilo, da ima ta isti alel pri bolnikih s HT ravno obraten učinek, da ima enak, vendar manjši učinek, ali pa, da učinka nima in se je statistična značilnost pojavila lažno, le kot posledica dejstva, da ima bolnik hkrati tudi T1D.

5.6 SKLEPI

- Najmočnejšo povezavo s T1D in T1D+HT kaže alel *DQBI*03:02*, ki z *DRB1*04* sestavlja haplotip *DR4-DQ8*. Pogosteje je tudi pojavljanje alelov, ki sestavljajo haplotip *DR3-DQ2-B8*.
- Za zaščitne so se pokazali aleli, ki sestavljajo haplotipe *DR1-DQ5*, *DR11-DQ7*, *DR13-DQ5/6*, *DR14-DQ5* in *DR15-DQ5/6*. Vsi, razen *DRB1*14* so statistično značilno različni pri obeh skupinah obolelih v primerjavi s kontrolno skupino.
- Večina alelov kaže močnejšo asociacijo s T1D samo kot s kombinacijo obeh bolezni.
- Ker se molekuli *DRB1*11:01* in *DRB1*11:04* ter molekuli *DRB1*04:01* in *DRB1*04:04* med seboj razlikujeta le v enem AK na 86. mestu verige DR β , bi valin na 86. mestu verige DR β lahko bil povezan s povišanim tveganjem za razvoj HT.
- K dovzetnosti za HT ne prispevajo vsi, temveč samo določeni aleli podskupine DR5 (*DRB1*11:04*).
- Lizin in arginin (AK s pozitivno nabito stransko skupino) na 71. in 74. mestu verige DR β bi lahko bila povezana s povišanim tveganjem za razvoj T1D in T1D+HT.
- Valin ali alanin (nevtralna AK) na 57. mestu verige DQ β bi lahko bila povezana s povišanim tveganjem za razvoj T1D, verjetno pa ne pomenita povišanega tveganja za razvoj HT ali delujeta celo zaščitno.
- Glutaminska kislina (AK z negativno nabito stransko skupino) na 45. mestu verige DQ β bi lahko bila povezana z znižanim tveganjem za razvoj bolezni.
- Skupne etiologije T1D in HT ne moremo z gotovostjo potrditi.

5.7 NADALJNJE DELO

Vzorci skupine bolnikov s samo HT bi lahko dodatno osvetlili morebitno pomembnost specifičnih alelov *HLA* za razvoj bolezni in pokazali na skupno etiologijo T1D in HT. Potrebno bi bilo tudi preveriti statistično pomembnost haplotipov, za katere predvidevamo povezanost z boleznimi.

Z napredkom tehnologije in vedno hitrejšimi in cenejšimi načini sekvenciranja DNA so vedno bolj dostopne informacije o aminokislinskih zaporedjih alelov. Izvajajo se mnoge študije sekundarne in terciarne strukture molekul HLA ter raziskave, ki proučujejo vpliv spremembe enega samega AK na učinkovitost vezave peptidnega antigena ter obseg imunskega odziva.

Ker je razvoj avtoimunskih bolezni kot sta T1D in HT rezultat mnogih genetskih in tudi okoljskih dejavnikov, pri čemer geni *HLA* prispevajo le majhen del mozaika, asociacijske študije navadno ne vodijo v direktne klinične aplikacije. Lahko pa, v kombinaciji z drugimi raziskavami, pripeljejo korak bližje k razumevanju mehanizmov avtoimunskih bolezni.

6 POVZETEK

Sladkorna bolezen tipa 1 (T1D) in Hashimotov tiroiditis (HT) sta avtoimunski endokrini bolezni s podobno patogenezo, ki vključuje infiltracijo celic T. Pogosto se pojavljata sočasno pri istem posamezniku ali družini, zaradi česar študije namigujejo, da bi njuna etiologija lahko temeljila na skupnih genetskih dejavnikih, najverjetneje povezanih z avtoimunostjo. Ena od genskih regij, ki je povezana s stopnjo dovzetnosti za T1D in HT, je regija *HLA*. Genski kompleks *HLA* kodira zapis za molekule HLA I. in II. razreda, ki so udeležene v predstavljanju mikrobnih antigenov celicam T in v selekciji celic T v limfnih organih. Molekule HLA so torej ključni igralci v imunskemu odgovoru. Hkrati pa nepravilnosti v njihovem delovanju - predstavljanje telesu lastnih molekul znotraj kompleksa - vodi v avtoimunske bolezni.

V obsegu naše študije smo z metodama PCR-SSO in PCR-SSP tipizirali in primerjali alele *HLA-A*, *-B*, *-DRB* in *-DQB* pri skupini bolnikov s T1D, T1D+HT in kontrolni skupini zdravih predstavnikov slovenske populacije. Pozitivno povezavo s T1D in T1D+HT smo odkrili za alele, ki so del haplotipov *DR4-DQ8* in *DR3-DQ2-B8*. Za zaščitne za T1D in HT so se izkazali aleli, ki so del haplotipov *DR1-DQ5*, *DR11-DQ7*, *DR13-DQ5/6* in *DR15-DQ5/6*, haplotip *DR14-DQ5* pa kaže zaščitno vlogo le pri bolnikih s T1D. Večina alelov je pokazala močnejšo asociacijo s T1D samo kot s kombinacijo obeh bolezni. Skupne etiologije bolezni ne moremo z gotovostjo potrditi. S primerjanjem posameznih alelov ugotavljamo možnost vpliva AK na 86., 71. in 74. mestu verige DR β ter 57. in 45. mestu verige DQ β molekul HLA. Valin na 86. mestu verige DR β bi lahko pomenil povišano tveganje za razvoj HT. Lizin ali arginin (AK s pozitivno nabitima stranskima skupinama) na 71. in 74. mestu verige DR β bi lahko bila povezana s povišanim tveganje za razvoj T1D in T1D+HT. Valin ali alanin (nevtralni AK) na 57. mestu verige DQ β verige bi lahko bila povezana s T1D, verjetno pa ne pomenita povišanega tveganja za razvoj HT ali delujeta celo zaščitno. Glutaminska kislina (AK z negativno nabito stransko skupino) na 45. mestu verige DQ β bi lahko delovala zaščitno.

Ker k razvoju avtoimunskih bolezni kot sta T1D in HT prispevajo mnogi genetski in okoljski faktorji, je usmerjeno zdravljenje etioloških dejavnikov težko dosegljivo. Lahko

pa, v kombinaciji s študijami o strukturi molekul HLA, vezavi peptidnih antigenov na različne molekule HLA, ovrednotenju imunskega odziva po vezavi na različne tipe molekul HLA idr., prispevajo majhen košček k razumevanju mehanizmov avtoimunskih bolezni.

7 VIRI

Abbas A.K., Lichtman A.H. 2009. Basic immunology. Functions and disorders of the immune system. 3rd edition. Philadelphia, Saunders, Elsevier Inc.: 320 str.

Badenhoop K., Schwarz G., Walfish P.G., Drummond V., Usadel K.H., Bottazzo G.F. 1990. Susceptibility to thyroid autoimmune disease: molecular analysis of HLA-D region genes identifies new markers for goitrous Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 71: 1131-1137

Ban Y., Davies T.F., Greenberg D.A., Concepcion E.S., Osman R., Oashi T., Tomer Y. 2004. Arginine at position 74 of the HLA-DR β 1 chain is associated with Graves' disease. *Genes and Immunity*, 5: 203-208

Bead probe information, LABType SSO class I B locus typing test, lot# 015. 2012. One Lambda (5. sep. 2012)
http://www.onelambda.com/Source/pdffiles/primer_information/RSSO1B_015_BP_I.pdf (5. sep. 2012)

Biček A. 2010. Vpliv genskih polimorfizmov na nastanek avtoimunske bolezni ščitnice pri slovenskih bolnikih. Doktorsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 75 str.

Bowness P. 2002. The 2000 Michael Mason Prize Essay. HLA B27 in health and disease: a double-edged sword? *Rheumatology*, 41: 857-868

Bratanič N., Šmigoc Schweiger D., Mendez A., Bratina N., Battelino T., Vidan-Jeras B. 2010. An influence of HLA-A, B, DR, DQ, and MICA on the occurrence of Celiac disease in patients with type 1 diabetes. *Tissue Antigens*, 76: 208-215

Brescia P.P. LabType Overview. 2008. One Lambda (5. sep. 2012)
<http://www.lagitre.com/cgi-bin%5CWorkshop%20Roma%202010%5CLagitre%5CVenerd%C3%AC%202026%>

20novembre%5CRome%20LABType%20Review%20-%20Peter%20Brescia.pdf

(5. sep. 2012)

Bright G.M., Blizzard R.M., Kaiser D.L., Clarke W.L. 1982. Organ-specific autoantibodies in children with common endocrine diseases. *Journal of Pediatrics*, 100, 1: 8–14

Busch R., Hill C.M., Hayball J.D., Lamb J.R., Rothbard J.B. 1991. Effect of natural polymorphism at residue 86 of the HLA-DR β chain on peptide binding. *Journal of Immunology*, 147: 1292-1298

Cano P., Klitz W., Mack S.J., Maiers M., Marsh S.G.E., Noreen H., Reed E.F., Senitzer D., Setterholm M., Smith A., Fernández-Viña M. 2007. Common and well-documented HLA alleles. Report of the ad-hoc committee of the American society for histocompatibility and Immunogenetics. *Human Immunology*, 68: 392-417

Chuang L.M., Wu H.P., Chang C.C., Tsai W.Y., Chang H.M., Tai T.Y. 1996. HLA DRB1/DQA1/DQB1 haplotype determines thyroid autoimmunity in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clinical Endocrinology*, 45, 5: 631-636

Dalva K., Beksac M. 2007. HLA typing with sequence-specific oligonucleotides primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex technology. *Methods in Molecular Medicine*, 134: 61-69

Dorak, M.T., Shao W., Machulla H.K.G., Lobashevsky E.S., Tang J., Park M.H., Kaslow R.A. 2006. Conserved extended haplotypes of the major histocompatibility complex: further characterization. *Genes and Immunity*, 7: 450-467

Dorman J., Kramer M.K., O'Lear L.A., Burke J.P., McCanlies E., McCarthy B.J. 1997. Molecular epidemiology of autoimmune thyroid disease. *Gaceta Medica de Mexico*, 133: 97-103

Farid N.R., Sampson L., Moens H., Barnard J.M. 1981. The association of goitrous autoimmune thyroiditis with HLA-DR5. *Tissue Antigens*, 17: 265-268

Farid N.R., Thompson C. 1986. HLA and autoimmune endocrine disease 1985. *Molecular Biology and Medicine*, 3: 85-97

Forbes S.A., Trowsdale J. 1999. The MHC quarterly report. *Immunogenetics*, 50: 152-159

Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A. 2001. *Kuby Immunology*. New York, W.H. Freeman and Co.

Heinemann F.M. 2009. HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the LuminexTM Multiplex Technology. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 36: 273-278

High-resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007.
Bioinformatics.NMDP.org
http://bioinformatics.nmdp.org/HLA/Haplotype_Frequencies/High_Res_HLA_Alles_US_Pop/ABDRB1DQB1.aspx (19. apr. 2012)

HLA Antigens - Naming HLA Antigens. 2011. HLA Nomenclature (5. dec. 2011).
<http://hla.alleles.org/antigens/index.html> (7. apr. 2012)

Holl R., Bohm B., Loos U. Grabert M., Heinze E., Homoki J. 1999. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. Effect of age, gender and HLA type. *Hormone Research*, 52, 3: 113-118

Hunt P.J., Marshall S.E., Weetman A.P., Bunce M., Bell J.I., Wass J.A., Welsh K.I. 2001. Histocompatibility leucocyte antigens and closely linked immunomodulatory genes in autoimmune thyroid disease. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, 55: 491-499

Hirayama K., Chen H., Kikuchi M., Yin T., Itoh M., Gu X., Zhang S., Yuan H. 1998. Glycine-Valine dimorphism at the 86th amino acid of HLA-DRB1 influenced the prognosis of postschistosomal hepatic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*, 177: 1682-1686

Huges A.L. 1995. Origin and evolution of HLA class I pseudogenes. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 2: 247-258

IMGT/HLA Database, Statistics – Database Growth. 2012. European Bioinformatics Institute.

<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html> (13. sep. 2012)

IMGT/HLA Database, Sequence Alignment Tool. 2012. European Bioinformatics Institute.

<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html> (13. sep. 2012)

Inaba H., Martin W., Ardito M., Searls De Groot A., De Groot L.J. 2010. The role of glutamic or aspartic acid in position four of the epitope binding motif and thyrotropin receptor-extracellular domain epitope selection in Graves' disease. *Journal of endocrinology and metabolism*, 95, 6: 2909-2916

Interpretation table DRB1*07 PCR-SSP subtyping. 2012. Olerup SSP (5. sep. 2012)

[http://www.olerup-
ssp.com/productfiles/interpretation_tables/DR7%202011%2026M.pdf](http://www.olerup-ssp.com/productfiles/interpretation_tables/DR7%202011%2026M.pdf) (5. sep.
2012)

Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. 2001. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5th edition. New York, Garland Publishing.

Jansson R., Totterman T.H., Sallstrom J., Dahlberg P.A. 1984. Intrathyroidal and circulating lymphocyte subsets in different stages of autoimmune postpartum thyroiditis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 58, 5: 943-946

Khan M.A. 2010. Chapter 16: HLA in spondyloarhropathies. V: The HLA Complex in Biology and Medicine. A Resource Book. Mehra N.K. (ur.). New Delhi, Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd: 259-275

Klein J. 1986. Natural history of the major histocompatibility complex. New York, John Wiley and sons, Inc.: 613 str.

Kontiainen S., Schlenzka A., Koskimies S., Rilva A., Maenpaa J. 1990. Autoantibodies and autoimmune diseases in young diabetics. Diabetes Research, 13, 4: 151–156

Kwok W.W., Domeier M.E., Johnson M.L., Nepom G.T., Koelle D.M. 1996. HLA-DQB1 codon 57 is critical for peptide binding and recognition. Journal of Experimental Medicine, 183: 1253-1258

Kwok W.W., Lotshaw C., Milner E.C.B., Knitter-Jack N., Nepom G.T. 1989. Mutational analysis of the HLA-DQ3.2 insulin-dependent diabetes mellitus susceptibility gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Immunology, 86: 1027-1030

LABType SSO class I & class II – Revolutionary rSSO DNA typing by flow analysis. 2011. One Lambda (5. sep. 2012)
http://www.onelambda.com/source/pdffiles/productsheets/LType_ps_web.pdf (5. sep. 2012)

LABType SSO Typing Tests. Product insert. 2010. One Lambda, Inc.
http://www.labs-inc.org/files/labs//docs/package_inserts/IG/labtype_pi_EN.pdf (8. apr. 2012)

Levin L., Tomer Y. 2003. The etiology of autoimmune diabetes and thyroiditis: evidence for common genetic susceptibility. Autoimmune Reviews, 2: 377-286

Little A.M. 2007. An Overview of HLA Typing for Hematopoietic Stem Cell Transplantation. V: Methods in Molecular Medicine, vol. 134. Bone Marrow and Stem Cell Transplantation. Beksac M. (ed.). Totowa, NJ, Humana Press: 35-49

Little A.M., Parham P. 1999. Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Reviews in Immunogenetics*, 1, 1:105-123

Logar D. 2001. Povezava genov lokusa DQ glavnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) s tvorbo avtoprotiteles proti antigenom Ro pri bolnikih s sistemskim lupusom eritematozusom. Doktorsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 76 str.

Marsh S.G.E., Parham P., Barber L.D. 2000. The HLA facts book. San Diego, Academic Press: 412 str.

McCanlies E., O'Leary L.A., Foley T.P., Kramer M.K., Burke J.P., Libman A. 1998. Hastnimoto's thyroiditis and insulin-dependent diabetes mellitus: differences among individuals with and without abnormal thyroid function. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83, 5: 1548-1551

McKinney J.S., Fu X.T., Swearingen C., Klohe E., Karr R.W. 1994. Individual effects of the DR11-variable β -chain residues 67, 71, and 86 upon DR(α,β 1*1101)-restricted, peptide-specific T cell proliferation. *Journal of Immunology*, 153, 12: 5564-5571

McPhee S.J., Ganong W.F. 2006. Pathophysiology of disease. An introduction to clinical medicine. 5th edition. New York, The McGraw-Hill Companies, Inc.: 769 str.

Mehra N.K., Kaur G. 2003. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. Expert reviews in molecular medicine, No. 5. Cambridge, Cambridge University Press

http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_07/S1462399403005957sup001.pdf (4. jan. 2012)

Menconi F., Oppenheim Y.L., Tomer Y. 2008. Graves' disease. V: Diagnostic criteria of autoimmune diseases. Shoenfeld Y., Cervera R., Gershwin M.E. (eds.). Totowa, NJ, Humana Press: 231-235

Moens H., Farid N.R., Sampson L., Noel E.P., Barnard J.M. 1978. Hashimoto's thyroiditis is associated with HLA-DRw3. New England Journal of Medicine, 299: 133-134

Morel P.A., Dorman J.S., Todd J.A., McDevitt H.O., Trucco M. 1998. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85, 21: 8111-8115

Nomenclature of Factors of the HLA System - Nomenclature of HLA Allels. 2011. HLA Nomenclature (5. dec. 2011).

<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> (7. apr. 2012)

Olerup O., Zetterquist H. (1991). HLA-DRB101 subtyping by allele-specific PCR amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tissue antigens*, 37, 5: 197-204

Olerup O., Zetterquist H. 1992. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue antigens*, 39: 225-235

Olerup SSP HLA typing kits without Taq polymerase. Instructions for use. Product insert. 2011. Olerup SSP: 25 str.

Ong B., Willcow N., Wordsworth P., Beeson D., Vincent A., Altmann D., Lanchbury J.S.S., Harcourt G.C., Bell J.I., Newsom-Davis J. 1991. Critical role for the Val/Gly⁸⁶ HLA-DRβ dimorphism in autoantigen presentation to human T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Immunology*, 88: 7343-7347

- Petrone A., Giorgi G., Mesturino C.A., Capizzi M., Cascino I., Nistico L., Osborn J., Di Mario U., Buzzetti R. 2001. Association of DRB1*04-DQB1*0301 haplotype and lack of association of two polymorphic sites at CTLA-4 gene with Hashimoto's thyroiditis in an Italian population. *Thyroid*, 11: 171-175
- Phenekos C., Vryonidou A., Gritzapis A.D., Bawevanis C.N., Goula M., Papamichail M. 2004. Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2). *Neuroimmunomodulation*, 11: 209-213
- Rocchi R., Rose N.R., Caturegli P. 2008. Hashimoto thyroiditis. V: Diagnostic criteria of autoimmune diseases. Shoenfeld Y., Cervera R., Gershwin M.E. (eds.). Totowa, NJ, Humana Press: 217-222
- Roldan M.B., Alonso M., Barrio R. 1999. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes, Nutrition and Metabolism*, 12, 1: 27-31
- Rodey G.E. 2000. HLA. Beyond tears. Introduction to human histocompatibility. 2nd edition. Durango, CO, De Novo, Inc.: 313 str.
- Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. 1986. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324:163-166
- Stenszky V., Balazs C., Kraszits E., Juhasz F., Kozma L., Balazs G., Farid N.R. 1987. Association of goitrous autoimmune thyroiditis with HLA-DR3 in eastern Hungary. *Journal of Immunogenetics*, 14: 143-148
- Škerget K. 2004. Vpliv polimorfizma genov HLA II. Razreda na dovzetnost za multiplo sklerozo v kočevki populaciji. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 55 str.

Tait B.D., Harrison L.C. 1991. Overview: the major histocompatibility complex and insulin dependent diabetes mellitus. V: Bailliere's clinical endocrinology and metabolism. International practice and research. Vol. 5, No. 2. Genetics of diabetes. Part I. Harrison L.C., Tait B.D. (eds.). London, Baillière Tindall W.B. Saunders: 211- 228

Tandon N., Zhang L., Weetman A.P. 1991. HLA associations with Hashimoto's thyroiditis. Clinical Endocrinology (Oxford), 34: 383-386

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. 2006. A genome-wide screen in 1119 relative pairs with autoimmune thyroid disease. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 91: 646-653

Testi M., Iannelli S., Testa G., Troiano M., Capelli S., Truet F., Federici G., Bontadini A., Andreani M. 2012. Evaluation of DRB1 high resolution typing by a new SSO-based Luminex method. Molecular Biology Reports, 39: 13-16

Thorsby E., Gjertsen H.A., Lundin K.E., Rønningen K.S. 1991. Insulin dependent diabetes mellitus susceptibility or protection may be determined by certain HLA-DQ molecules. V: Bailliere's clinical endocrinology and metabolism. International practice and research. Vol. 5, No. 3. Genetics of diabetes. Part II. Harrison L.C., Tait B.D. (eds.). London, Baillière Tindall W.B. Saunders: 361-373

Todd J.A., Bell J.I., McDevitt H.O. 1987. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. Nature (London), 329: 599-604

Tomer Y., Barbesino G., Greenberg D.A., Conception E., Davies T.F. 1999. Mapping the major susceptibility loci for familial Graves' and Hashimoto's Diseases: evidence

for genetic heterogeneity and gene interactions. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 48, 12: 4656-4664

Tomer Y., Davies T.F. 2003. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocrine Reviews*, 24: 694-717

Vidan-Jeras B. 2003. Vpliv polimorfizma in vezavnega neravnovesja genov HLA na humoralno imunsko odzivnost in na nekatere bolezni monogenskega in poligenskega izvora v slovenski populaciji. Doktorsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 119 str.

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS: 566 str.

Weetman A.P. 2000. Graves' disease. *The New England Journal of Medicine*, 343: 1236-1248

Weissel M., Hofer R., Zasmeta H., Mayr W.R. 1980. HLA-DR and Hashimoto's thyroiditis. *Tissue Antigens*, 16: 256-257

Wu S., Gorski J. 1997. Polymorphism at β 85 and not β 86 of HLA-DR1 is predominantly responsible for restricting the nature of the anchor side chain: implication for concerted effects of class II MHC polymorphism. *International Immunology*, 9, 19: 1495-1502

Yang L., Wang L.J., Shi G.L., Ni L., Song C.X., Zhang Z.X., Xu S.F. 2010. Analysis of HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 alleles in Chinese patients with lung cancer. *Genetics and Molecular Research*, 9, 2: 750-755

Yoshida K., Corper A.L., Herro R., Jabri B., Wilson I.A., Teyton L. 2010. The diabetogenic mouse MHC class II molecule I-Ag7 is endowed with a switch that modulates TCR affinity. *Journal of Clinical Investigation*, 120, 5: 1578-1590

Zaletel K. 2002. Vpliv polimorfizma A/G v eksonu 1 gena za citotoksični T limfocitni antigen 4 na tvorbo protiteles in klinično sliko pri bolnikih z avtoimunske boleznijo ščitnice. Doktorsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 56 str.

Zaletel K. 2007. Avtoimunske bolezni ščitnice. V: Bolezni ščitnice, podiplomska šola za zdravnike, Logarska dolina, 18-19 maj 2007. Gaberšček S., Zaletel K. (ur.). Ljubljana, Slovensko združenje za nuklearno medicino: 37-41

Zaletel K., Gaberšček S., Pirnat E., Hojker S. 2002. Incidence of hyperthyroidism in Slovenia since improved iodine supply. V: Radioactive isotopes in clinical medicine and research, 25th International symposium, Bad Gastein. The Austrian society of nuclear medicine, The departments of nuclear medicine and biomedical engineering and physics, University of Vienna, 2002: 73

Zeitlin A. 2010. The role of the HLA region in Hashimoto's thyroiditis. Birmingham, Department of Medicine, Division of Medical Sciences: 157 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorici Blanki Vidan-Jeras, da me je pospremila v svet sistema *HLA*, sodelavkam s Centra za tipizacijo tkiv, da so me sprejele medse, me seznanile z metodologijo (hvala, Sabina Kunilo Jamnik), poleg tega pa bile tudi odlična družba, mentorici Tanji Kunej za podporo, vztrajnost in pedantnost, recenzentu Jerneju Jakšetu za konstruktivne predloge in pripombe, in predsednici komisije Branki Javornik, da je skrbno bdela nad nami tekom celotnega študija.

Hvala vsem, ki ste bili del mojega življenja v času študija in nastajanja diplomskega dela. Prav posebej pa tistim, ki ste to bili že prej in boste tudi vnaprej.

PRILOGE

Priloga A

Vse skupine alelov/aleli, zaznani pri kontrolni skupini, bolnikih s T1D in bolnikih s T1D+HT, njihova pogostnost pojavljanja ter vrednosti p in RR za kombinacije skupin T1D in K, T1D+HT in K ter T1D in T1D+HT

Priloga A1: Skupine alelov *HLA-A*, zaznane pri kontrolni skupini, bolnikih s T1D in bolnikih s T1D+HT, njihova pogostnost pojavljanja ter vrednosti p in RR za kombinacije skupin T1D in K, T1D+HT in K ter T1D in T1D+HT

Skupina alelov	K f(%) N=131	T1D f(%) N=131	T1D+HT f(%) N=52	T1D - K		T1D+HT - K		T1D+HT - T1D	
				p	RR	p	RR	p	RR
A*01	16,79	21,37	28,85	$4,32 \times 10^{-1}$	1,34	$1,01 \times 10^{-1}$	2,01	$3,34 \times 10^{-1}$	1,50
A*02	48,09	51,15	48,08	$7,11 \times 10^{-1}$	1,13	1,00	1,00	$7,45 \times 10^{-1}$	0,89
A*03	27,48	30,53	38,46	$6,83 \times 10^{-1}$	1,16	$1,58 \times 10^{-1}$	1,65	$3,83 \times 10^{-1}$	1,43
A*04	0,00	0,76	0,00	1,00	3,02	1,00	2,50	1,00	0,83
A*08	0,76	0,00	0,00	1,00	0,33	1,00	0,83	1,00	2,50
A*11	12,98	5,34	7,69	$5,20 \times 10^{-2}$	0,39	$4,42 \times 10^{-1}$	0,61	$5,10 \times 10^{-1}$	1,54
A*23	5,34	3,05	0,00	$5,40 \times 10^{-1}$	0,59	$1,94 \times 10^{-1}$	0,16	$5,79 \times 10^{-1}$	0,27
A*24	18,32	27,48	30,77	$1,05 \times 10^{-1}$	1,68	$7,61 \times 10^{-2}$	1,98	$7,17 \times 10^{-1}$	1,18
A*25	3,05	6,87	7,69	$2,55 \times 10^{-1}$	2,20	$2,26 \times 10^{-1}$	2,63	1,00	1,20
A*26	9,92	7,63	3,85	$6,63 \times 10^{-1}$	0,76	$2,39 \times 10^{-1}$	0,43	$5,14 \times 10^{-1}$	0,57
A*29	4,58	2,29	9,62	$5,00 \times 10^{-1}$	0,53	$2,98 \times 10^{-1}$	2,24	$4,28 \times 10^{-2}$	4,25
A*30	3,82	6,87	1,92	$4,11 \times 10^{-1}$	1,78	$6,76 \times 10^{-1}$	0,67	$2,86 \times 10^{-1}$	0,38
A*31	6,87	4,58	5,77	$5,97 \times 10^{-1}$	0,67	1,00	0,91	$7,15 \times 10^{-1}$	1,37
A*32	6,87	3,05	1,92	$2,55 \times 10^{-1}$	0,46	$2,86 \times 10^{-1}$	0,38	1,00	0,83
A*33	4,58	3,05	1,92	$7,49 \times 10^{-1}$	0,68	$6,75 \times 10^{-1}$	0,56	1,00	0,83
A*34	0,76	0,00	0,00	1,00	0,33	1,00	0,83	1,00	2,50
A*66	1,53	0,00	0,00	$4,98 \times 10^{-1}$	0,20	1,00	0,49	1,00	2,50
A*68	8,40	10,69	7,69	$6,75 \times 10^{-1}$	1,29	1,00	0,97	$7,84 \times 10^{-1}$	0,75

K – kontrolna skupina; T1D – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1; T1D+HT – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in Hashimotovim tiroiditisom; f% - pogostnost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb; p – vrednost p; RR – relativno tveganje. Opomba: Skupni seštevek pogostnosti v vsakem stolpcu bi bil 200% (ker ima vsak posameznik po dva gena istega lokusa), če med analiziranimi ne bi bilo nobenega homozigota.

Priloga A2: Skupine alelov *HLA-B*, zaznane pri kontrolni skupini, bolnikih s T1D in bolnikih s T1DD+HT, njihova pogostnost pojavljanja ter vrednosti p in RR za kombinacije skupin T1D in K, T1D+HT in K ter T1D in T1D+HT

Skupina alelov	K f(%) N=131	T1D f(%) N=131	T1D+HT f(%) N=52	T1D - K		T1D+HT - K		T1D+HT - T1D	
				p	RR	p	RR	p	RR
B*07	24,43	11,45	19,23	6,45x10⁻³	0,41	5,60x10 ⁻¹	0,76	2,31x10 ⁻¹	1,86
B*08	13,74	31,30	40,38	1,03x10⁻³	2,81	2,13x10⁻⁴	4,19	2,99x10 ⁻¹	1,49
<i>B*13</i>	6,87	4,58	3,85	5,96x10 ⁻¹	0,67	7,31x10 ⁻¹	0,64	1,00	0,96
<i>B*14</i>	3,05	2,29	1,92	1,00	0,77	1,00	0,83	1,00	1,07
B*15	7,63	23,66	13,46	5,44x10⁻⁴	3,63	2,60x10 ⁻¹	1,91	1,58x10 ⁻¹	0,53
<i>B*18</i>	16,03	14,50	13,46	8,64x10 ⁻¹	0,89	8,21x10 ⁻¹	0,85	1,00	0,95
B*27	12,98	6,11	1,92	6,23x10 ⁻²	0,45	2,59x10⁻²	0,19	4,49x10 ⁻¹	0,42
<i>B*35</i>	23,6	25,19	19,23	8,86x10 ⁻¹	1,09	5,62x10 ⁻¹	0,79	4,44x10 ⁻¹	0,73
<i>B*37</i>	3,05	1,53	0,00	6,84x10 ⁻¹	0,55	5,79x10 ⁻¹	0,27	1,00	0,49
<i>B*38</i>	8,40	6,11	1,92	6,35x10 ⁻¹	0,72	1,84x10 ⁻¹	0,31	4,49x10 ⁻¹	0,42
<i>B*39</i>	3,05	5,34	9,62	5,40x10 ⁻¹	1,71	1,21x10 ⁻¹	3,28	3,26x10 ⁻¹	1,92
<i>B*40</i>	9,92	9,92	3,85	1,00	1,00	2,39x10 ⁻¹	0,43	2,39x10 ⁻¹	0,43
<i>B*41</i>	1,53	1,53	1,92	1,00	1,00	1,00	1,51	1,00	1,51
<i>B*44</i>	17,56	12,98	15,38	3,91x10 ⁻¹	0,71	8,29x10 ⁻¹	0,88	6,41x10 ⁻¹	1,25
<i>B*47</i>	0,00	2,29	0,00	2,47x10 ⁻¹	7,16	1,00	2,50	5,59x10 ⁻¹	0,35
<i>B*49</i>	4,58	1,53	5,77	2,81x10 ⁻¹	0,37	7,15x10 ⁻¹	1,37	1,40x10 ⁻¹	3,66
B*50	3,05	11,45	3,85	1,52x10⁻²	3,77	1,00	1,40	1,58x10 ⁻¹	0,37
<i>B*51</i>	12,98	18,32	21,15	3,08x10 ⁻¹	1,49	1,77x10 ⁻¹	1,81	6,80x10 ⁻¹	1,22
<i>B*52</i>	2,29	0,76	0,00	6,22x10 ⁻¹	0,42	5,59x10 ⁻¹	0,35	1,00	0,83
<i>B*53</i>	3,05	0,00	0,00	1,22x10 ⁻¹	0,11	5,79x10 ⁻¹	0,27	1,00	2,50
<i>B*55</i>	4,58	1,53	1,92	2,81x10 ⁻¹	0,37	6,75x10 ⁻¹	0,56	1,00	1,51
<i>B*56</i>	0,76	0,76	0,00	1,00	1,00	1,00	0,83	1,00	0,83
B*57	6,87	0,76	0,00	1,92x10⁻²	0,15	6,22x10 ⁻²	0,12	1,00	0,83
<i>B*58</i>	3,05	2,29	3,85	1,00	0,77	1,00	1,40	6,24x10 ⁻¹	1,82

K – kontrolna skupina; T1D – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1; T1D+HT – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in Hashimotovim tiroiditisom; f% - pogostnost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb; p – vrednost p; RR – relativno tveganje. Opomba: Skupni seštevek pogostnosti v vsakem stolpcu bi bil 200% (ker ima vsak posameznik po dva gena istega lokusa), če med analiziranimi ne bi bilo nobenega homozigota.

Priloga A3: Aleli *HLA-DQBI*, zaznani pri kontrolni skupini, bolnikih s T1D in bolnikih s T1D+HT, njihova pogostnost pojavljanja ter vrednosti p in RR za kombinacije skupin T1D in K, T1D+HT in K ter T1D in T1D+HT

Alel	K f(%) N=13 I	T1D f(%) N=131	T1D+HT f(%) N=52	T1D - K		T1D+HT - K		T1D+HT - T1D	
				p	RR	p	RR	p	RR
<i>DQBI*02:01</i>	29,77	46,56	50,0	7,43x10⁻³	2,04	1,59x10⁻²	2,34	7,44x10 ⁻¹	1,15
<i>DQBI*02:02</i>	6,87	9,16	7,69	6,50x10 ⁻¹	1,35	1,00	1,20	1,00	0,89
<i>DQBI*02:10</i>	0,00	0,00	1,92	1,00	1,00	2,84x10 ⁻¹	7,66	2,84x10 ⁻¹	7,66
<i>DQBI*03:01</i>	31,30	6,87	13,46	5,23x10⁻⁷	0,17	1,51x10⁻²	0,36	1,59x10 ⁻¹	2,13
<i>DQBI*03:02</i>	12,98	71,76	65,38	6,53x10⁻²³	16,49	6,19x10⁻¹²	12,20	4,75x10 ⁻¹	0,74
<i>DQBI*03:03</i>	4,58	1,53	0,00	2,81x10 ⁻¹	0,37	1,86x10 ⁻¹	0,18	1,00	0,49
<i>DQBI*03:04</i>	0,76	3,05	3,85	3,70x10 ⁻¹	3,07	1,95x10 ⁻¹	4,31	1,00	1,40
<i>DQBI*03:20</i>	0,00	0,00	1,92	1,00	1,00	2,84x10 ⁻¹	7,66	2,84x10 ⁻¹	7,66
<i>DQBI*04:02</i>	1,53	6,87	7,69	5,99x10 ⁻²	4,02	5,55x10 ⁻²	4,81	1,00	1,20
<i>DQBI*05:01</i>	28,24	16,79	11,54	3,78x10⁻²	0,52	1,96x10⁻²	0,35	4,96x10 ⁻¹	0,68
<i>DQBI*05:02</i>	19,08	9,16	9,62	3,22x10⁻²	0,44	1,83x10 ⁻¹	0,48	1,00	1,11
<i>DQBI*05:03</i>	6,87	0,76	0,00	1,92x10⁻²	0,15	6,23x10 ⁻²	0,12	1,00	0,83
<i>DQBI*06:02</i>	18,32	0,00	1,92	3,74x10⁻⁸	0,02	3,19x10⁻³	0,13	2,84x10 ⁻¹	7,66
<i>DQBI*06:03</i>	12,98	1,53	0,00	4,70x10⁻⁴	0,13	3,66x10⁻³	0,06	1,00	0,49
<i>DQBI*06:04</i>	3,82	9,92	1,92	8,49x10 ⁻²	2,62	6,76x10 ⁻¹	0,67	1,18x10 ⁻¹	0,26
<i>DQBI*06:09</i>	3,82	0,00	3,85	6,01x10 ⁻²	0,09	1,00	1,14	7,96x10 ⁻²	13,02

K – kontrolna skupina; T1D – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1; T1D+HT – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in Hashimotovim tiroiditisom; f% - pogostnost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb; p – vrednost p; RR – relativno tveganje. Opomba: Skupni seštevek pogostnosti v vsakem stolpcu bi bil 200% (ker ima vsak posameznik po dva gena istega lokusa), če med analiziranimi ne bi bilo nobenega homozigota.

Priloga A4: Aleli *HLA-DRB1*, zaznani pri kontrolni skupini, bolnikih s T1D in bolnikih s T1D+HT, njihova pogostnost pojavljanja ter vrednosti p in RR za kombinacije skupin T1D in K, T1D+HT in K ter T1D in T1D+HT

Alel	K f(%) N=131	T1D f(%) N=131	T1D+HT f(%) N=52	T1D - K		T1D+HT - K		T1D+HT - T1D	
				p	RR	p	RR	p	RR
DRB1*01:01	27,48	15,27	7,69	2,32x10⁻²	0,48	2,80x10⁻³	0,24	2,27x10 ⁻¹	0,50
<i>DRB1*01:02</i>	0,76	0,76	0,00	1,00	1,00	1,00	0,83	1,00	0,83
<i>DRB1*01:03</i>	0,00	0,00	1,92	1,00	1,00	2,84x10 ⁻¹	7,66	2,84x10 ⁻¹	7,66
DRB1*03:01	23,66	45,04	50,0	4,14x10⁻⁴	2,62	7,58x10⁻⁴	3,19	6,23x10 ⁻¹	1,22
<i>DRB1*03:02</i>	0,00	0,76	0,00	1,00	3,02	1,00	2,50	1,00	0,83
DRB1*04:01	9,92	46,56	42,31	3,14x10⁻¹¹	7,66	1,99x10⁻⁶	6,48	6,25x10 ⁻¹	0,85
DRB1*04:02	3,05	19,85	15,38	2,17x10⁻⁵	7,12	5,06x10⁻³	5,41	5,35x10 ⁻¹	0,76
<i>DRB1*04:03</i>	0,00	1,53	1,92	4,98x10 ⁻¹	5,08	2,84x10 ⁻¹	7,66	1,00	1,51
DRB1*04:04	3,05	5,34	11,54	5,40x10 ⁻¹	1,71	3,26x10⁻²	3,96	1,99x10 ⁻¹	2,32
<i>DRB1*04:05</i>	0,00	1,53	3,85	4,98x10 ⁻¹	5,08	7,96x10 ⁻²	13,02	3,20x10 ⁻¹	2,56
<i>DRB1*04:08</i>	2,29	2,29	3,85	1,00	1,00	6,24x10 ⁻¹	1,82	6,24x10 ⁻¹	1,82
<i>DRB1*07:01</i>	18,32	10,69	7,69	1,13x10 ⁻¹	0,54	1,09x10 ⁻¹	0,41	7,84x10 ⁻¹	0,75
<i>DRB1*08:01</i>	1,53	5,34	5,77	1,72x10 ⁻¹	3,12	1,40x10 ⁻¹	3,66	1,00	1,17
<i>DRB1*08:02</i>	0,76	1,53	0,00	1,00	1,68	1,00	0,83	1,00	0,49
<i>DRB1*08:03</i>	0,76	0,00	0,00	1,00	0,33	1,00	0,83	1,00	2,50
<i>DRB1*08:04</i>	0,00	0,76	1,92	1,00	3,02	2,84x10 ⁻¹	7,66	4,89x10 ⁻¹	2,53
<i>DRB1*09:01</i>	0,00	0,76	0,00	1,00	3,02	1,00	2,50	1,00	0,83
<i>DRB1*10:01</i>	0,76	0,76	1,92	1,00	1,00	4,89x10 ⁻¹	2,53	4,89x10 ⁻¹	2,53
DRB1*11:01	15,27	4,58	1,92	6,26x10⁻³	0,28	9,09x10⁻³	0,16	6,75x10 ⁻¹	0,56
<i>DRB1*11:02</i>	0,00	0,76	0,00	1,00	3,02	1,00	2,50	1,00	0,83
<i>DRB1*11:03</i>	1,53	1,53	0,00	1,00	1,00	1,00	0,49	1,00	0,49
DRB1*11:04	10,69	1,53	9,62	3,18x10⁻³	0,16	1,00	0,94	2,05x10⁻²	6,00
<i>DRB1*12:01</i>	0,76	0,76	1,92	1,00	1,00	4,89x10 ⁻¹	2,53	4,89x10 ⁻¹	2,53
DRB1*13:01	11,45	1,53	0,00	1,70x10⁻³	0,15	6,71x10⁻³	0,07	1,00	0,49
<i>DRB1*13:02</i>	8,40	10,69	5,77	6,75x10 ⁻¹	1,29	7,60x10 ⁻¹	0,74	4,03x10 ⁻¹	0,57
<i>DRB1*13:03</i>	2,29	0,00	0,00	2,47x10 ⁻¹	0,14	5,59x10 ⁻¹	0,35	1,00	2,50
DRB1*14:01	7,63	0,00	0,00	1,63x10⁻³	0,04	6,45x10 ⁻²	0,11	1,00	2,50
<i>DRB1*14:54</i>	0,76	0,00	0,00	1,00	0,33	1,00	0,83	1,00	2,50
DRB1*15:01	21,37	0,00	3,85	1,50x10⁻⁹	0,01	3,34x10⁻³	0,18	7,96x10 ⁻²	13,02
<i>DRB1*15:02</i>	0,76	0,76	0,00	1,00	1,00	1,00	0,83	1,00	0,83
<i>DRB1*16:01</i>	13,74	8,40	9,62	2,37x10 ⁻¹	0,59	6,22x10 ⁻¹	0,71	7,77x10 ⁻¹	1,21
<i>DRB1*16:02</i>	2,29	0,00	0,00	2,47x10 ⁻¹	0,14	5,59x10 ⁻¹	0,35	1,00	2,50

K – kontrolna skupina; $T1D$ – bolniki s slatkorno boleznijo tipa 1; $T1D+HT$ – bolniki s slatkorno boleznijo tipa 1 in Hashimotovim tiroiditisom; $f\%$ - pogostnost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb; p – vrednost p; RR – relativno tveganje. Opomba: Skupni seštevek pogostnosti v vsakem stolpcu bi bil 200% (ker ima vsak posameznik po dva gena istega lokusa), če med analiziranimi ne bi bilo nobenega homozigota.