

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA KUNILO JAMNIK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA KUNILO JAMNIK

**UGOTAVLJANJE POLIMORFIZMA GENA *MICA* V SLOVENSKI
POPULACIJI IN POVEZANOSTI S POJAVOM CELIAKIJE PRI
OTROCIH IN MLADOSTNIKI**

**DETECTION OF *MICA* GENE POLYMORPHISM IN SLOVENIAN
POPULATION AND ITS ASSOCIATION WITH THE OCCURRENCE
OF CELIAC DISEASE IN CHILDREN AND ADOLESCENTS**

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala v Centru za tipizacijo tkiv, Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom dr. Blanke Vidan-Jeras, mag. farm., spec..

Za strokovno pomoč, usmerjanje pri delu, koristne nasvete in vzpodbudo se iskreno zahvaljujem somentorici dr. Blanki Vidan-Jeras, mag. farm., spec ter mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem..

Hvala vsem sodelavkam v Centru za tipizacijo tkiv, predvsem Nataliji Ambrož ter Veroniki Dolšak za pomoč in svetovanje pri praktični izvedbi testov.

Zahvala pa gre tudi mojemu nečaku Simonu ter sestri Ljubi za sodelovanje pri oblikovanju naloge.

Iskrena hvala mojemu možu Janiju za vso podporo, razumevanje in spodbudo ter zaupanje vame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom dr. Blanke Vidan-Jeras, mag. farm., spec..

Sabina Kunilo Jamnik

Ljubljana, september 2014

Predsednik komisije:izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Član komisije: doc. dr. Žiga Jakopin

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
POVZETEK	IX
ABSTRACT	XI
1 UVOD	1
1.1 GLAVNI HISTOKOMPATIBILNOSTNI KOMPLEKS (<i>MHC</i> ANG.: MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX)	2
1.2 STRUKTURA MOLEKUL HLA TER MICA	3
1.2.1 Genski polimorfizem <i>HLA</i> ter <i>MICA</i>	3
1.2.2 Nomenklatura sistema <i>HLA</i> ter <i>MICA</i>	5
1.2.3 Dedovanje genov znotraj sistema <i>MHC</i>	6
1.3 VEZAVNO NERAVNOVESJE IN POGOSTOST POJAVLJANJA REKOMBINACIJ	6
1.4 HARDY-WEINBERGOVO PRAVILO	7
1.5 IMUNSKA TOLERANCA IN AVTOIMUNOST	7
1.6 <i>MICA</i>	7
1.6.1 Funkcije molekul <i>MICA</i>	8
1.6.2 Porazdelitev alelov <i>MICA</i> znotraj populacij	9
1.6.3 Povezanost gena <i>MICA</i> z avtoimunskimi boleznimi	10
1.6.3.1 Celiakija	10
1.6.3.2 Celiakija in geni <i>MHC</i> I	11
1.6.3.3 Celiakija pri sladkornih bolnikih tipa 1	12

1.7	METODE TIPIZACIJE GENA <i>MICA</i> TER <i>HLA</i>	12
1.7.1	Reakcija verižne polimerizacije z reverznimi sekvenčno specifičnimi oligonukleotidi (PCR-rSSO)	12
1.7.2	Reakcija verižne polimerizacije s sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (PCR-SSP)	13
2	NAMEN DELA	14
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	MATERIALI	15
3.1.1	Preiskovanci	15
3.1.1.1	Vzorci zunanje kontrole kakovosti	15
3.1.1.2	Vzorec slovenske populacije	15
3.1.1.3	Vzorci bolnikov s CD ter vzorci bolnikov s SB1 in CD hkrati	15
3.2	METODE	16
3.2.1	Izolacija DNK z aparatom Geno-M6 ali EZ1	16
3.2.2	Določanje koncentracije in čistosti izolirane DNK	17
3.2.3	Postopki priprav za elektroforezo na gelu	18
3.2.3.1	Agarozna gelska elektroforeza in priprava 2% agaroznega gela	18
3.2.3.2	Kapilarna gelska elektroforeza ter priprava aparata Qiaxcel	20
3.2.4	Določanje tipa <i>MICA</i> ter <i>HLA-B</i> in <i>HLA-DQ</i> z metodo PCR- rSSO	22
3.2.4.1	Priprava PCR mešanice in pomnoževanje	22
3.2.4.2	Kontrola produktov pomnoževanja	25
3.2.4.2.1	Agarozna gelska elektroforeza	25
3.2.4.2.2	Kapilarna gelska elektroforeza z aparatom QIAxcel	26
3.2.4.3	Denaturacija in nevtralizacija	26
3.2.4.4	Hibridizacija	27
3.2.4.5	Označevanje	28
3.2.4.6	Merjenje fluorescentnega signala vzorcev z aparatom LABScan™ 100 in analiza rezultatov	30
3.2.5	Določanje tipa <i>HLA-B</i> ter <i>HLA-DQ</i> z metodo PCR- SSP	32
3.2.5.1	Priprava mešanice PCR in pomnoževanje	32

3.2.5.1.1	Material	32
3.2.5.1.2	Postopek	32
3.2.5.2	Preverjanje produktov pomnoževanja	33
3.2.5.2.1	Agarozna gelska elektroforeza	33
3.2.5.2.2	Kapilarna gelska elektroforeza z aparatom Qiaxcel	34
3.2.5.3	Analiza produktov pomnoževanja in podajanje rezultatov	34
3.2.6	Statistične metode	35
3.2.6.1	Pogostost (frekvenca - f)	35
3.2.6.2	Fisherjev eksaktni test in razmerje obojev	35
3.2.6.3	Določanje frekvenc genotipov s pomočjo Hardy-Weinbergovega ravnoesja	36
3.2.6.4	Stratifikacija	36
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	37
4.1	VREDNOTENJE REZULTATOV	37
4.1.1	Vrednotenje rezultatov, dobljenih z metodo PCR-rSSO	37
4.1.1.1	Kontrola produktov pomnoževanja z elektroforezo	37
4.1.1.2	Analiza rezultatov PCR-rSSO s programom HLA Fusion	38
4.1.1.3	Rezultati zunanje kontrole kakovosti	40
4.1.2	Vrednotenje rezultatov PCR-SSP s programom Helmberg Score	41
4.1.3	Statistična analiza populacijsko genetskih parametrov znotraj kontrolne skupine	43
4.1.3.1	Zaznane genske različice <i>MICA</i>	43
4.1.3.2	Zaznane alelna skupina <i>HLA-B</i>	44
4.1.3.3	Najpogostejši zaznani haplotipi <i>B~MICA</i>	45
4.1.4	Primerjava genetskih parametrov znotraj opazovanih skupin (K, CD in SB1+CD)	46
4.1.4.1	Primerjava zaznanih genskih različic <i>MICA</i> v preiskovanih skupinah	47
4.1.4.2	Primerjava zaznanih alelnih skupin <i>HLA-B</i> v preiskovanih skupinah	48
4.1.4.3	Primerjava haplotipov <i>HLA-B~MICA</i> , ki se med seboj signifikantno razlikujejo v preiskovanih skupinah	49

4.1.5	Aleli <i>DQB1</i> in <i>DQA1</i> , povezani z zvišanim ali znižanim tveganjem za razvoj bolezni CD in SB1+CD	50
4.1.6	Stratifikacija na <i>DQA1*05:01-DQB1*02:01</i> in dokaz vpliva genetskih parametrov na pojav bolezni CD ali SB1+CD	51
4.1.6.1	Stratifikacija na <i>DQA1*05:01-DQB1*02:01</i> in dokaz vpliva alelov <i>MICA</i> na pojav bolezni CD ali SB1+CD	51
4.1.6.2	Stratifikacija na <i>DQA1*05:01-DQB1*02:01</i> in dokaz vpliva alelne skupine <i>HLA-B</i> na pojav bolezni CD ali SB1+CD	51
4.1.6.3	Stratifikacija na <i>DQA1*05:01-DQB1*02:01</i> in dokaz vpliva haplotipov <i>HLA-B~MICA</i> na pojav bolezni CD ali SB1+CD	52
5	SKLEPI	54
6	LITERATURA	55

KAZALO SLIK

- Slika 1: Regije genov *HLA* I., II. in III. razreda z genom *MICA* in njihov položaj na krajšem kraku šestega kromosoma. (13)
- Slika 2: Struktura klasičnih molekul *HLA* I. in *HLA* II. razreda ter *MICA*. (9, 13, 15)
- Slika 3: Razporeditev eksonov in prikaz njihovih molekulskih produktov pri genih *HLA* I., *HLA* II. razreda in *MICA*. (21, 22)
- Slika 4: Primer kodominantnega dedovanja genov *HLA*.
- Slika 5: Prikazuje vlogo molekul *MICA* pri virusni okužbi, sodelujejo tako pri pridobljeni imunosti z aktivacijo celic NK ali T $\gamma\delta$, kot pri pridobljeni imunosti s kostimulacijo celic T CD8⁺ $\alpha\beta$. (31, 32)
- Slika 6: Prikazuje dva mehanizma uničenja epitelnih celic. A- z vezavo deaminiranega peptida ter aktivacijo celic T pomagalk CD4⁺. B- z aktivacijo citotoksičnih limfocitov T CD8⁺ brez vpletenosti prepoznavne peptida ali pa z vpletenostjo prepoznavne peptida (prisotnost infekcije z rota virusom), kot smo ga prikazali na sliki 5. (34, 58)
- Slika 7: Metoda PCR-rSSO. (62)
- Slika 8: Delovna miza aparata EZ1 ter način vstavljanja kartice v režo na sprednji strani aparata. (64)
- Slika 9: Elektroforezna kadička in usmernik električnega toka.
- Slika 10: Princip delovanja aparata QIAxcel. (67)
- Slika 11: Kadička s pufri in kartuša za aparat QIAxcel. (67)
- Slika 12: Presvetljevanje vsake mikrokroglice z dvema laserjema. (68)
- Slika 13: Slika gela kapilarne elektroforeze z aparatom QIAxcel.
- Slika 14: Primer prikaza rezultata s programom *HLA Fusion*.
- Slika 15: Preglednica porazdelitve sond za posamezni vzorec, obkrožen je rezultat tipizacije in sonda 1.
- Slika 16: Prikaz sonde 1, ki nam pove, kateri aleli *MICA* se lahko vežejo na to sondo, podčrtani pa so tisti aleli *MICA* posameznega vzorca, ki se dejansko vežejo na sondo 1.
- Slika 17: Certifikati o uspešno opravljenem zunanjem preverjanju kakovosti.
- Slika 18: Vdolbinice 1-12 agaroznega gela za subtipizacijo skupine alelov *HLA-B*50*, 49K in vnos v Score. Subtipizacijo *B*50* smo izvedli v primeru, ko smo z metodo PCR-

rSSO dobili rezultat z alelnimi kombinacijami npr. *B*40:19*, *B*50:01* ali *B*40*, *B*49*, kjer smo s PCR-SSP izključili *B*50* ter prvo kombinacijo, zato smo lahko zaključili drugo kombinacijo z *B*40* ter *B*49*.

KAZALO PREGLEDNIC

- Preglednica I: Sistem poimenovanja alelov *HLA* ter *MICA*. (24)
- Preglednica II: Prikazuje alele *MICA*, značilne za določeno bolezen. (14)
- Preglednica III: Primer plana mikroplošče z 12 vzorci.
- Preglednica IV: Sestava mešanice za PCR. (61)
- Preglednica V: Temperaturni program Luminex za metodo PCR-rSSO. (61)
- Preglednica VI: Priprava hibridizacijske mešanice. (61)
- Preglednica VII: Priprava raztopine 1X SAPE. (61)
- Preglednica VIII: Priprava mešanice za PCR-SSP z reagenti Olerup SSP. (70)
- Preglednica IX: Temperaturni program metode PCR-SSP z reagenti Olerup SSP. (70)
- Preglednica X: Kontingenčna tabela 2x2.
- Preglednica XI: Interpretacijska tabela subtipizacije *HLA-B*50*, 49K, kjer so označene pozitivne reakcije ter rezultat tipizacije. (72)
- Preglednica XII: Preglednica A: fenotipske frekvence *MICA*, preglednica B: genske frekvence *MICA*.
- Preglednica XIII: Preglednica A: fenotipske frekvence *HLA-B*, preglednica B: genske frekvence *HLA-B*.
- Preglednica XIV: Deleži najpogostejših dvo-lokusnih haplotipov *B~MICA* pri predstavnikih slovenske populacije. Leva preglednica: fenotipske frekvence *HLA-B~MICA*, desna preglednica: genske frekvence *HLA-B~MICA*.
- Preglednica XV: Genske različice *MICA*, zaznane pri kontrolni skupini, bolnikih s CD in bolnikih s SB1+CD, njihova pogostost pojavljanja ter vrednosti p in OR za kombinacije skupin CD vs K, SB1+CD vs K ter SB1+CD vs CD.
- Preglednica XVI: Alelne skupine lokusa *HLA-B*, zaznane pri kontrolni skupini, bolnikih s CD in bolnikih s SB1+CD, njihova pogostost pojavljanja ter vrednosti p in OR za kombinacije skupin CD vs K, SB1+CD vs K ter SB1+CD vs CD.
- Preglednica XVII: Haplotipi *HLA-B~MICA*, ki se statistično značilno razlikujejo znotraj kontrolne skupine, bolnikov s CD in bolnikov s SB1+CD, njihova pogostost pojavljanja ter vrednosti p in OR za kombinacije skupin CD vs K, SB1+CD vs K ter SB1+CD vs CD.
- Preglednica XVIII: Genske različice *DQB1* ter *DQA1*, ki so povezane s povišanim ali znižanim tveganjem za razvoj CD ali SB1+CD. Z rdečo barvo so označeni aleli, ki

kodirajo molekulo DQ2, z modro barvo pa so označeni aleli, ki kodirajo molekulo DQ8.

Preglednica XIX: Prikazuje vpliv alelne skupine lokusa *HLA-B* na pojav CD ter SB1+CD po stratifikaciji na *DQA1*05:01*-*DQB1*02:01*.

Preglednica XX: Prikazuje vpliv dvo-lokusnega haplotipa *HLA-B~MICA* na pojav CD ter SB1+CD po stratifikaciji na *DQA1*05:01*-*DQB1*02:01*.

POVZETEK

Celiakija je avtoimuna bolezen tankega črevesja, ki nastane zaradi delovanja več dejavnikov, poleg glavnega sprožilca glutena so pomembni predvsem geni kompleksa *MHC* na šestem avtolognem kromosomu. Znano je tudi, da se celiakija pogosto pojavlja skupaj z diabetesom tipa 1. Največ statistično pomembnih povezav s celiakijo je z zaporedji genov *HLA* II. razreda, ki kodirajo molekulo DQ2 (*DQB1*02:01-DQA1*05:01*) in so prisotni kar pri 90% bolnikov evropskega porekla s celiakijo. Manj je znanega o vpletenosti gena *HLA-B* v regiji *HLA* I. razreda ter njemu bližnjega gena *MICA*. Ta kodira molekulam *HLA* I. razreda podobne glikoproteine, ki jih prepozna receptor NKG2D na naravnih celicah ubijalkah, limfocitih T CD8+ $\alpha\beta$ ter intraepitelnih limfocitih T $\gamma\delta$. Vpliv *MICA* na razvoj celiakije, bi lahko pričakovali prav zaradi ekspresije njegovih molekulskih produktov v tankem črevesju. Glavni namen te naloge je poiskati možne povezave gena *HLA-B* ter alelov *MICA* z razvojem celiakije ali sopojavljanja te s sladkorno boleznijo tipa 1. Zaradi vezavnega neravnovesja težko dokažemo neodvisen vpliv genov *HLA-DQ*, *HLA-B* ali *MICA* na nastanek bolezni.

V okviru naše študije smo uvedli metodo PCR-rSSO, ki smo jo poleg PCR-SSP uporabili za tipizacijo genov *MICA*, *HLA-B* ter *HLA-DQ*. V raziskavo je bilo vključenih 130 vzorcev oseb v kontrolni skupini, 68 vzorcev bolnikov s celiakijo ter 69 vzorcev bolnikov s celiakijo ter diabetesom tipa 1 hkrati. Rezultate tipizacij vzorcev preiskovanih skupin smo z računalniškim programom, katerega izračuni temeljijo na Fischerjevem ekzaktnem testu, primerjali med seboj. Vplivu gena *HLA-DQ* smo se izognili s stratifikacijo na molekulo DQ2 in s tem dokazali neodvisen vpliv *HLA-B*08* ($p=0,03$; $OR=3,06$) kot rizičnega dejavnika na razvoj obeh bolezni hkrati. Odsotnost *HLA-B*18* v skupini bolnikov s celiakijo v primerjavi s prisotnostjo v kontrolni skupini ($p=0,04$; $OR=0,07$) kaže na zaščitno vlogo te alelne skupine pri razvoju celiakije. Neposrednega vpliva posameznih alelov *MICA* na razvoj celiakije ali obeh bolezni hkrati, nismo uspeli dokazati. Zanimivo pa je, da smo dokazali statistično značilno povezavo haplotipa *B*07~MICA*008* ($p=9,03 \times 10^{-4}$; $OR=0,12$), ki predstavlja zaščitno kombinacijo za razvoj obeh bolezni hkrati. S pomočjo izsledkov te študije ter dodatnimi raziskavami znotraj skupine bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1 bi lahko doprinesli k boljšemu razumevanju

prispevka genetskih faktorjev na 6. avtolognem kromosomu na razvoj celiakije ali obeh bolezni hkrati.

Ključne besede: *MICA*, *HLA*, celiakija, sladkorna bolezen tipa 1, PCR-rSSO, vezavno neravnovesje, haplotip

ABSTRACT

Celiac disease is an autoimmune disease of the small intestine caused by several factors. In addition to the main trigger gluten, the *MHC* complex genes on the autologous chromosome 6 are particularly important. It is also known that celiac disease often occurs together with type 1 diabetes. Statistically most significant association with celiac disease is with the sequences of the *HLA* class II genes encoding the DQ2 (*DQB1*02:01-DQA1*05:01*) molecule and are present in 90% of patients of European descent with celiac disease. Less is known about the involvement of the *HLA-B* gene in the region of *HLA* class I and *MICA* gene located close to it. This gene encodes the *HLA* class I molecules like glycoproteins that are recognized by the receptor NKG2D on the natural killer cells, CD8+ $\alpha\beta$ T lymphocytes and $\gamma\delta$ intraepithelial T lymphocytes. The influence of *MICA* on the development of celiac disease might be expected due to the expression of its molecular products in the small intestine. The main purpose of this thesis is to look for possible association of the *HLA-B* gene and *MICA* alleles with the development of celiac disease or its co-occurrence with type 1 diabetes. Due to linkage disequilibrium it is difficult to prove an independent influence of *HLA-DQ*, *HLA-B* and *MICA* genes on the occurrence of the disease.

In the present study, we introduced the PCR-rSSO method, which was used apart from the PCR-SSP method for typing *MICA*, *HLA-B* and *HLA-DQ* genes. The research involved 130 individuals constituting the control group, 68 patients with celiac disease and 69 patients having celiac disease with the co-occurrence of type 1 diabetes. Statistical analysis was carried out using a computer program, which calculations are based on Fischer's exact test. The effect of the *HLA-DQ* gene was overcome by the stratification on the DQ2 molecule and thus proved an independent influence of *HLA-B*08* ($p=0,03$; $OR=3,06$) gene as a risk factor on the development and co-occurrence of both diseases. The absence of *HLA-B*18* gene in a group of patients with celiac disease in comparison with the frequency in the control group ($p=0,04$; $OR=0,07$) indicates a possible protective role of this allele group in the development of celiac disease. The direct influence of individual *MICA* alleles on the development of celiac disease or co-occurrence of both diseases could not be proven. Interestingly, we observed a statistically significant association of *B*07~MICA*008* ($p=9,03 \times 10^{-4}$; $OR=0,12$) haplotype, which represents a

protective combination in the development and co-occurrence of celiac disease and diabetes. Conjoining the results of this study and obtaining additional information with further research on the group of patients with type 1 diabetes only could contribute to a better understanding of the importance of genetic factors on the autologous chromosome 6 in the development of celiac disease and/or co-occurrence of celiac disease and type 1 diabetes.

Keywords: *MICA*, *HLA*, celiac disease, type 1 diabetes, PCR-rSSO, linkage disequilibrium, haplotype

SEZNAM OKRAJŠAV

A	absorbanca
Ag	antigen
AK	amino kislina
APC	antigen predstavljena celica (ang.: antigen presenting cell)
CD	celiakija (ang.: celiac disease)
CD4	koreceptor celic T pomagalk (ang.: cluster of differentiation 4)
CD8	koreceptor citotoksičnih limfocitov T (ang.: cluster of differentiation 8)
CTLA4	ang.: cytotoksic T-lymphocyte antigen 4
CTT	Center za tipizacijo tkiv
DAP10/12	aktivacijski protein 10/12 deoksiribonukleinske kisline
DGP	protitelesa proti deamidiranemu gliadinskemu peptidu
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dvDNK	dvojnoverižna deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EM	algoritem maksimalizacije matematičnega upanja (EM.: angl.expectation maximization)
EMA	antiendomizijska protitelesa
ESPGAN	Evropsko združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano
f	frekvenca, pogostost
FasL	ang.: factor related apoptosis ligand
GCT	gvanin-citozin-timin trinukleotid
HD	visoka stopnja ločljivosti (ang.: high definition)
HLA	humani levkocitni antigen (ang.: human leukocyte antigen)
HSP-70	stresni protein HSP-70 (ang.: heat shock 70 kDa protein)
IEL	intraepitelni limfociti
IFN γ	interferon gama
K	kontrolna skupina (slovenska populacija)
MFI	srednja fluorescenčna intenziteta (ang.: median fluorescence intensity)
MHC	glavni histokompatibilnostni kompleks (ang.: major histocompatibility complex)
MICA	ang.: <u>m</u> ajor histocompatibility complex class <u>I</u> <u>c</u> hain-related gene <u>A</u>

MICB	ang.: <u>m</u> ajor histocompatibility complex class <u>I</u> <u>c</u> hain-related gene <u>B</u>
MY09B	ang.: myosin IXB
NC	negativna kontrola (ang.: negative controle)
NK	naravne celice ubijalke (ang.: natural killer)
NKG2D	ang.: natural killer group 2 member D
NS	ni statistično značilno
OR	razmerje obetov (ang.: odds ratio)
p	vrednost p
PCR	reakcija verižne polimerizacije (ang.: polymerase chain reaction)
PCR-rSSO	reakcija verižne polimerizacije s sekvenčno specifičnimi reverznimi oligonukleotidi (ang.:polymerase chain reaction based reverse sequence specific oligonucleotide hybridisation)
PCR-SSP	reakcija verižne polimerizacije s sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (ang.: polymerase chain reaction based sequence specific priming)
PE	fikoeritrin (ang.: phycoerythrin)
Pt	protitelo
RNK	ribonukleinska kislina
Rp	receptor
SAPE	R-konjugirani streptavidin (ang.: R-phycoerythrin-conjugated streptavidin)
SB1	sladkorna bolezen tipa 1 (ang.: diabetes mellitus type 1)
SB1+CD	celiakija pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1
SSO	sekvenčno specifični oligonukleotidi (ang.: sequence specific oligonucleotide)
SSP	sekvenčno specifični začetni oligonukleotidi (ang.: sequence specific priming)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borat-EDTA
TCR	celični receptor limfocitov T
TNF	tumor nekrotizirajoči faktor (ang.: tumor necrosis factor)
Tris	tri(hidroksimetil)aminometan
t-TG	protitelesa proti tkivni transglutaminazi tipa 2
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

Celiakija (CD ang.: celiac disease) ali glutenska enteropatija je kronična avtoimuna bolezen tankega črevesa, ki nastane zaradi delovanja imunskih, dednih in okoljskih dejavnikov. Na splošno jo lahko opredelimo kot najpogostejšo obliko preobčutljivosti na gluten v hrani, tako pri otrocih, kot pri odraslih. V večini evropskih držav prizadane okoli 1% vseh ljudi v populaciji. Toksični so predvsem peptidi v zrnju pšenice (gliadin), rži (secalin) in ječmena (hordein) ter drugih žitaric (oves, pira, kamut in tritikala), ki jih s skupnim imenom imenujemo "gluten". (1, 2) Pojav CD pri bolnikih z diabetesom tipa 1 je pogostejši kot v splošni populaciji. (3, 4)

Zaradi dednih, oziroma genetskih dejavnikov, imunski sistem nekaterih posameznikov ne prepozna glutena in razvije proti njemu obsežno imunsko reakcijo limfocitov T, ki prizadenejo predvsem črevesno sluznico, kjer vidimo značilne histološke spremembe, posledično pa pride do okvar drugih organov (jetra, ščitnica, kosti), predvsem v času, ko CD ni diagnosticirana in zdravljena pravočasno. (3) Po uvedbi stroge brezglutenske diete, kot edinemu načinu zdravljenja, pri večini bolnikov (70-93%) pride do izboljšanja kliničnih znakov že v nekaj dneh ali nekaj tednih. Izboljšanje histoloških sprememb na sluznici, je opazno po nekaj mesecih, lahko tudi nekaj letih. Način življenja brez glutena pa zmanjša možnost kasnejših zapletov bolezni. (3, 4, 5)

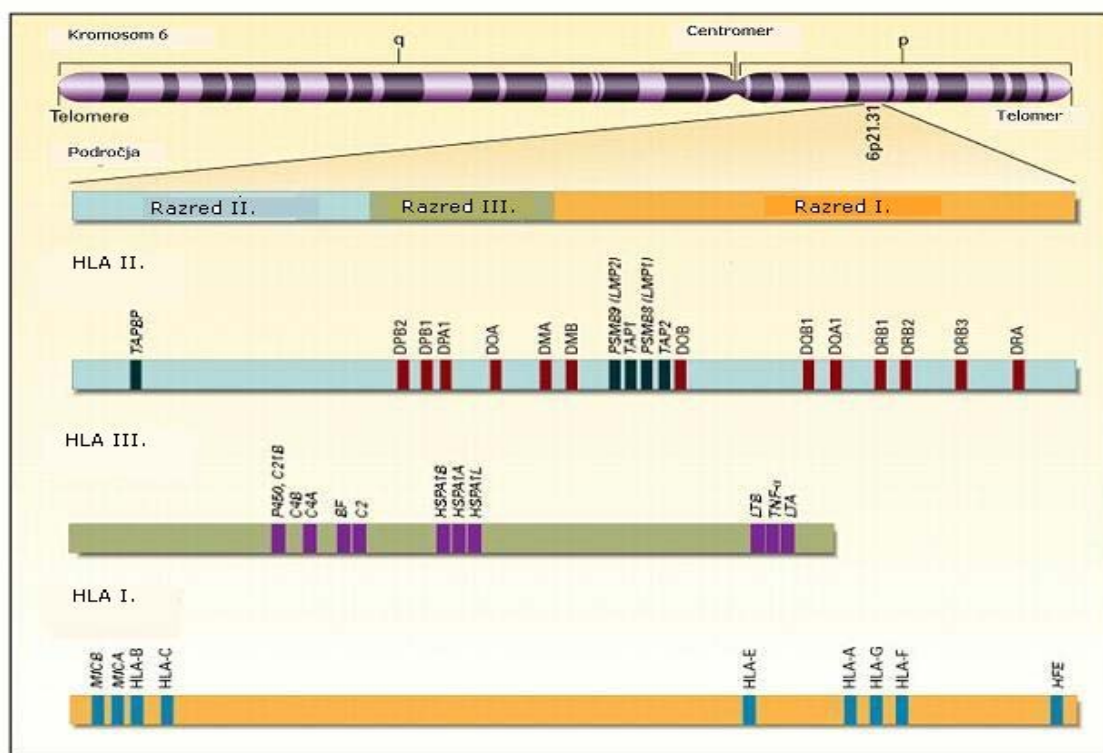
Gluten ni edini dejavnik okolja, saj naj bi prezgodnja, pred četrtem mesecem ali prepozna, po sedmem mesecu, seznanitev z glutensko hrano pri dojenčkih, ravno tako vplivala na razvoj CD, zato je izključno dojenje, priporočljivo vsaj do starosti pet mesecev. V otroški dobi, okužbe z virusi ali bakterijami (rotavirus, citomegalovirus in *Escherichia coli*), ki povzročajo črevesne infekcije, lahko ravno tako doprinesejo k nastanku bolezni. (4)

Vpliv genov na pojav bolezni je najbolj raziskan pri sistemu *HLA* (ang.: human leukocyte antigen) in sicer pri heterodimerah DQ2 in DQ8 *HLA* II. razreda, ki sta v tesni povezavi z boleznijo, njihova odsotnost pa skoraj zanesljivo izključi CD iz diferencialne diagnostike. (6) Nikakor pa ne smemo pozabiti klasičnih alelov *HLA* I. razreda ter ne-klasičnih genov *HLA*, kot so *MICA* (ang.: major histocompatibility complex class I chain-related gene A), *MICB* (ang.: major histocompatibility complex class I chain-related gene B), *MYO9B* (ang.: myosin IXB) ter *CTLA4* (ang.: cytotoksični T-lymphocyte antigen 4), ki so v zadnjem času

predmet veliko študij v okviru celiakije. (6, 7, 8) Tako gene *HLA*, kot tudi gena *MICA* ter *MICB*, uvrščamo v genski kompleks na regiji 6p21.3 krajšega kraka šestega kromosoma, ki se imenuje glavni histokompatibilnostni kompleks. (9)

1.1 GLAVNI HISTOKOMPATIBILNOSTNI KOMPLEKS (MHC ANG.: MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX)

Pri človeku obsega približno 3.6 milijonov baznih parov deoksiribonukleinske kisline (DNK) ter vsebuje gene, ki kodirajo humane levkocitne antigene ter preko 140 funkcijsko pomembnih ostalih genov, ki sodelujejo pri imunskem odzivu, veliko pa je tudi psevdogenov ter genov, katerih funkcija še ni dovolj raziskana. (10, 11) Geni *HLA*, se v obliki različnih genskih različic ali alelov, nahajajo na šestem avtolognem kromosomu na različnih položajih, ki jih imenujemo lokusi, te v grobem združujemo v tri regije. Na centromernem koncu kromosoma je regija *HLA* II. razreda, na telomernem delu regija *HLA* I. razreda, vmes so pa geni regije *HLA* III. razreda, kot jih prikazuje slika 1. (10, 12)



Slika 1: Regije genov *HLA* I., II. in III. razreda z genom *MICA* in njihov položaj na krajšem kraku šestega kromosoma. (13)

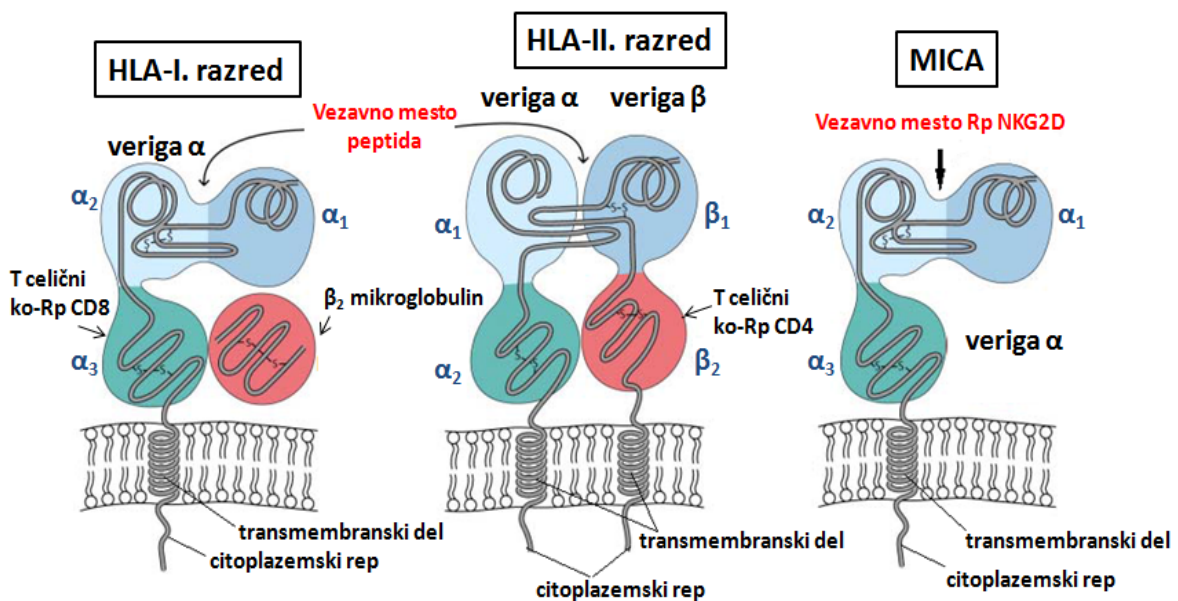
Regija III. razreda vsebuje gene za komponente komplementnega sistema, tumor nekrotizirajoči faktor (*TNF*), stresni protein *HSP-70* ter ostale, ne vsebuje pa genov *HLA*.

Regija *HLA* I. razreda, vsebuje zapise za klasične molekule lokusa *HLA*-A, -B in -C, ne-klasične molekule *HLA*-E, -F, -G, *MICA*, *MICB* ter psevdogene. (9, 13) Na regiji *HLA* II. razreda so zapisi za molekule *HLA*-DR, -DQ, -DP in DM.

1.2 STRUKTURA MOLEKUL *HLA* TER *MICA*

Težka polipeptidna veriga α je pri molekulah *HLA* I. razreda ter *MICA*, sestavljena iz treh globularnih domen imenovanih α_1 , α_2 in α_3 . Pri klasičnih antigenih I. razreda imamo še četrto domeno, ki jo predstavlja lahka veriga β_2 -mikroglobulina, katere zapis je na 15 kromosomu. β_2 -mikroglobulina, pa v svoji strukturi, ne vsebujejo proteini *MICA* ter *MICB*, ki ravno tako ne vežejo peptida in služijo kot ligand receptorju (Rp) NKG2D (ang.: natural killer group 2 member D). (14) Na regiji *HLA* II. razreda so zapisi za dve polipeptidni verigi α in β , molekul *HLA*-DR, -DQ, -DP in DM.

Vse zgoraj naštetne strukturne posebnosti tako klasičnih *HLA* (*HLA* I., *HLA* II.) kot tudi ne-klasičnih molekul *HLA* (*MICA*) prikazuje slika 2.



Slika 2: Struktura klasičnih molekul *HLA* I. in *HLA* II. razreda ter *MICA*. (9, 13, 15)

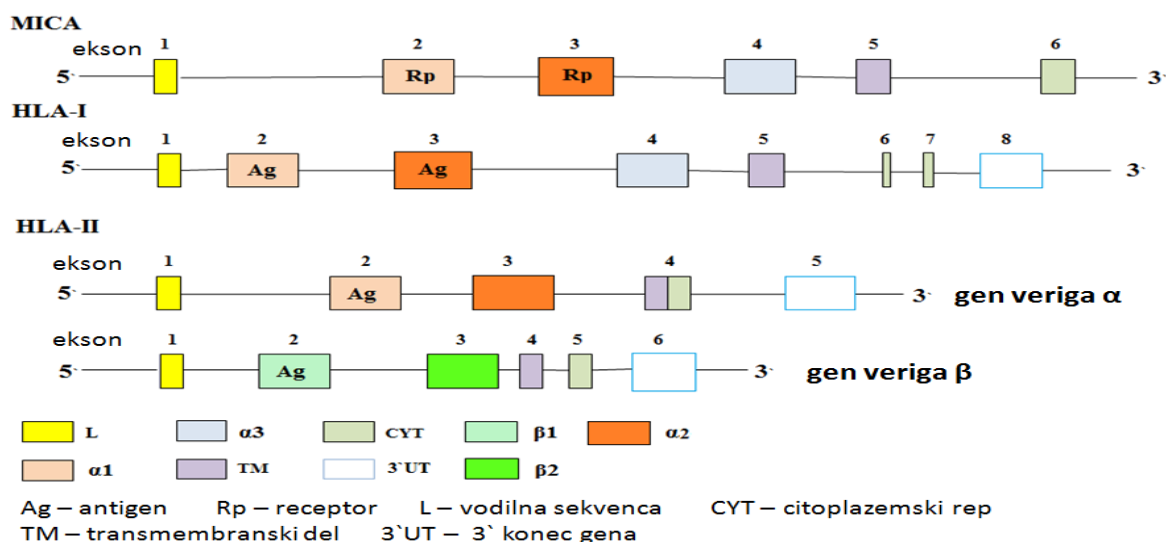
1.2.1 Genski polimorfizem *HLA* ter *MICA*

Polimorfizem je stanje, v katerem najdemo v populaciji, oziroma večji skupini oseb iste narodnosti, vsaj dva fenotipa ali predvidoma dva genotipa, od katerih ima vsak pogostost pojavljanja 1% ali več. (16, 17) Z izrazom fenotip označujemo morfološke in fiziološke

(vidne) lastnosti organizma, ki so posledica genetske sestave oziroma genotipa v kombinaciji z okoljem. (18)

MHC je najbolj polimorfen sistem genov, kar jih poznamo. (9) Do januarja 2014 je bilo odkritih 10.533 alelov sistema *HLA* ter 158 ne-klasičnih alelov *HLA*. Znotraj *HLA* je največ alelov lokusa B, odkrili so jih kar 3.285, pri ne-klasičnih *HLA* pa omenimo 94 alelov *MICA*. (19, 20) Vzrok za razsežnost sistema MHC je naravna selekcija, za katero predvidevajo, da so velik del prispevali številni virusni in bakterijski peptidi z vezavo na določena mesta v molekuli HLA, ki so pri HLA I. razreda samo na verigi α ($\alpha 1$ in $\alpha 2$ domeni) pri HLA II. razreda pa so na verigi α in β ($\alpha 1$ in $\beta 1$). Na ta način se je organizem prilagodil številnim novim mikrobnim peptidom in njihovim mehanizmom, ki skušajo ukaniti obrambo oziroma imunski odgovor organizma. Same spremembe v genomu nastanejo s podvajanjem, zamenjavo enega samega nukleotida ali izmenjave različno dolgih predelov z nukleotidi. (12, 13, 18, 21)

Razlike med posameznimi geni *HLA* ter *MICA* nastopijo zaradi različnega števila eksonov ter molekulskih produktov, ki jih le-ti kodirajo. Največ razlik zasledimo na tistih eksonih, ki kodirajo domene z vezavnim mestom za peptidni antigen (Ag) ali Rp NKG2D pri molekuli MICA. Tako imamo pri *HLA* I. razreda 8 eksonov, pri *HLA* II. razreda 5 eksonov za verigo α in 6 eksonov za verigo β , *MICA* pa skupno zajema 6 eksonov, kar nam tudi prikazuje slika 3.



Slika 3: Razporeditev eksonov in prikaz njihovih molekulskih produktov pri genih HLA I., HLA II. razreda in MICA. (21, 22)

Prvi ekson pri vseh kodira vodilno sekvenco tako verige α kot tudi β . Drugi ter tretji ekson pri *MICA* ter genih *HLA* I. razreda, vsebujeta zapise za globularno domeno $\alpha 1$ in $\alpha 2$ z veziščem za antigen oziroma za Rp NKG2D, medtem ko vezavno mesto za Ag, tako pri verigi α , kot pri verigi β *HLA* II. razreda kodira drugi ekson, tretji ekson določa domeni $\alpha 2$ in $\beta 2$. Molekule *HLA* I. razreda ter *MICA* imajo še domeno $\alpha 3$, ki jo kodira četrti ekson. Zapisi za transmembransko domeno so na četrtem (*HLA* II.) ali petem (*HLA* I., *MICA*) eksonu, za citoplazemski rep pa na četrtem (veriga α *HLA* II.), petem (veriga β *HLA* II.), šestem (*MICA*) oziroma šestem ter sedmem eksonu pri *HLA* I. razredu. (10, 22, 23)

1.2.2 Nomenklatura sistema *HLA* ter *MICA*

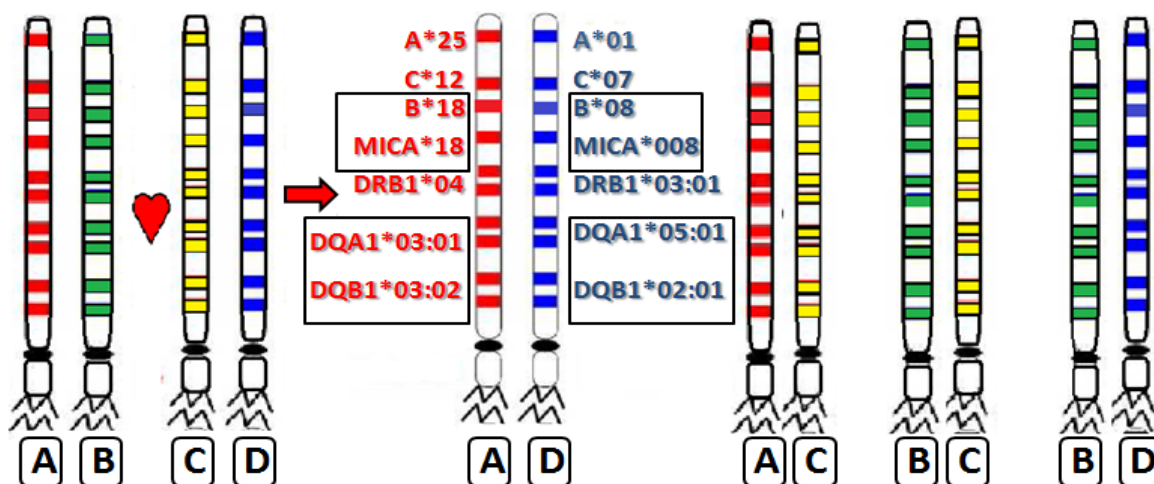
Odkritje *HLA* je spodbudilo ustanovitev Nomenklaturne komisije leta 1968, ki je poskrbela za red in uvrstila serološko določljive Ag v tako imenovano imunološko nomenklaturu, kjer so Ag označeni s črkami in številkami (primer *HLA-B8*). Odkritje metod za analizo DNK, je povzročilo, da so poleg ostalih, tudi gen *MICA* in *HLA* določali na tej osnovi ter jih leta 1987 uvrstili v molekularno nomenklaturu. Molekularna nomenklatura alelov *MICA* ni tako dobro definirana kot nomenklatura *HLA*, ker ne opredeljuje alelov *MICA* tako podrobno, kot naprimer alele lokusa *HLA-B*, ki smo jih tudi prikazali v preglednici I. (17)

Preglednica I: Sistem poimenovanja alelov *HLA* ter *MICA*. (24)

Nomenklatura	Razlaga	Nomenklatura	Razlaga
<i>HLA</i>	regija <i>HLA</i>	<i>MIC</i>	regija <i>MIC</i>
<i>HLA-B</i>	lokus	<i>MICA</i>	lokus <i>A</i>
<i>HLA-B*08</i>	kupina alelov, ki kodirajo antigen B8	<i>MICA*008</i>	skupina alelov, ki kodirajo tip <i>MICA*008</i>
<i>HLA-B*08:01</i>	natančno določen alel tipa <i>B*08</i>	<i>MICA*008:02</i>	natančno določen alel tipa <i>MICA*008</i>
<i>B*08:01:01</i>	alel tipa <i>B*08</i> s tiho mutacijo	<i>MICA*008:01:01</i>	alel tipa <i>MICA*08</i> s tiho mutacijo
<i>B*08:08N</i>	neizražen alel tipa <i>B*08</i>	<i>MICA*063N</i>	neizražen alel tipa <i>MICA*063</i>
<i>B*15:01:01:01</i>	alel, ki vsebuje mutacijo izven kodirajoče regije		
<i>A*30:14L</i>	alel, ki kodira protein z opazno reducirano oziroma nizko ekspresijo na površini celice		
<i>B*39:01:01:02L</i>	alel, ki kodira protein z opazno reducirano oziroma nizko ekspresijo na površini celice, mutacija je izven kodirajoče regije		
<i>B*44:02:01:02S</i>	alel, ki kodira topno molekulo <i>HLA</i>		
<i>B*37:16Q</i>	alel, ki kodira antigen <i>HLA</i> za katerega še ne vemo, kako je izražen na celični površini		

1.2.3 Dedovanje genov znotraj sistema *MHC*

Ko potomci od vsakega starša dobijo po en set genov *MHC* in se vsi produkti genov izrazijo na celični površini, pravimo, da se geni dedujejo kodominantno. Položaj genov na kromosomu, oziroma njihova fizična bližina pripomore, da se na potomce prenašajo v kompletu imenovanem haplotip, kar nam tudi prikazuje slika 4.



Slika 4: Primer kodominantnega dedovanja genov HLA.

Dva haplotipa sestavljata genotip posameznika. Imamo štiri možne genotipe, katere lahko potomec dobi od staršev in posledično samo 25% možnosti, da sta dva sorojenca enaka. (9, 20, 25) To možnost še dodatno zmanjšajo rekombinacije znotraj sistema *MHC*, saj pri 2% družin opazimo prisotnost rekombinantnih haplotipov, ki so posledica preloma kromatid in izmenjave dednega materiala med njima v času mejotske delitve celice. (9)

1.3 VEZAVNO NERAVNOVESJE IN POGOSTOST POJAVLJANJA REKOMBINACIJ

O vezavnem neravnovesju govorimo, kadar dva ali več genov na istem kromosomu najdemo skupaj pogostejše, kot bi to pričakovali glede na njihove posamične frekvence v populaciji. Določeni haplotipi so zaradi naravne selekcije v nakaterih populacijah pogostejši kot v drugih. (17)

Geni ki se nahajajo blizu, se tekom delitve verjetno ne bodo razdvojili, tako da dvo-lokusni haplotipi ostanejo skupaj v vezavnem neravnovesju tudi skozi več generacij (geni lokusa *HLA-B* ter *MICA* ter *HLA-DQ* in *HLA-DRB1*). Medtem pa pri genih, ki so daleč drug od drugega, hitreje pride do rekombinacije (geni lokusa *HLA-A* ter *HLA-DP*). (9)

1.4 HARDY-WEINBERGOVO PRAVILO

Angleški matematik Hardy in nemški zdravnik Weinberg sta prišla neodvisno drug od drugega do ugotovitve, da se frekvence genov znotraj populacij pri naključnem razmnoževanju ohranjajo. To pravilo velja v odsotnosti mutacij in migracij znotraj populacije in ni prednjačenja enega alela pred drugimi. Večji odklik od pravila pa lahko pomeni napake pri vzorčenju ali laboratorijski določitvi določenega alela. (17, 26)

1.5 IMUNSKA TOLERANCA IN AVTOIMUNOST

Avtoimunske bolezni v širšem smislu pomenijo imunski odziv proti lastnim molekulam oziroma zatajitev imunske tolerance, vendar se nam ob tem pojavi vprašanje: "Kaj je lastno in kaj je tuje?" (12, 27) Neodzivnost na lastne antigene označujemo kot imunsko toleranco, pri kateri gre za izpostavljenost celic T Ag v centralnih limfatičnih organih (centralna toleranca) ter perifernih tkivih (periferna toleranca). (12) Ob tem pridemo do spoznanja, da ima lahko takšen imunski odziv tudi pozitivne vplive oziroma obrambne funkcije. Tipičen primer za to je imunski odziv s protitelesi na lastne maligno preobražene celice ter odziv na znotrajcelične infekcije. Med vzroke, ki vodijo do nastanka preko 100 tovrstnih kroničnih bolezni, uvrščamo genetske dejavnike (*HLA*), hormonsko stanje (laktacija, nosečnost) in vplive iz okolja (infekcije, ki povečajo število kostimulatorjev na antigen predstavitveni celici (APC), ki so kritični za aktivacijo). (12, 27) Infekcije prispevajo peptidne Ag, ki jih zaradi molekularne mimikrije med lastnimi avto Ag in mikrobnimi Ag, imunski sistem ne prepozna kot lastne ter pride do navzkrižne reaktivnosti proti lastnim peptidnim zaporedjem, tako kot da bi šlo za tuj patogen. (17)

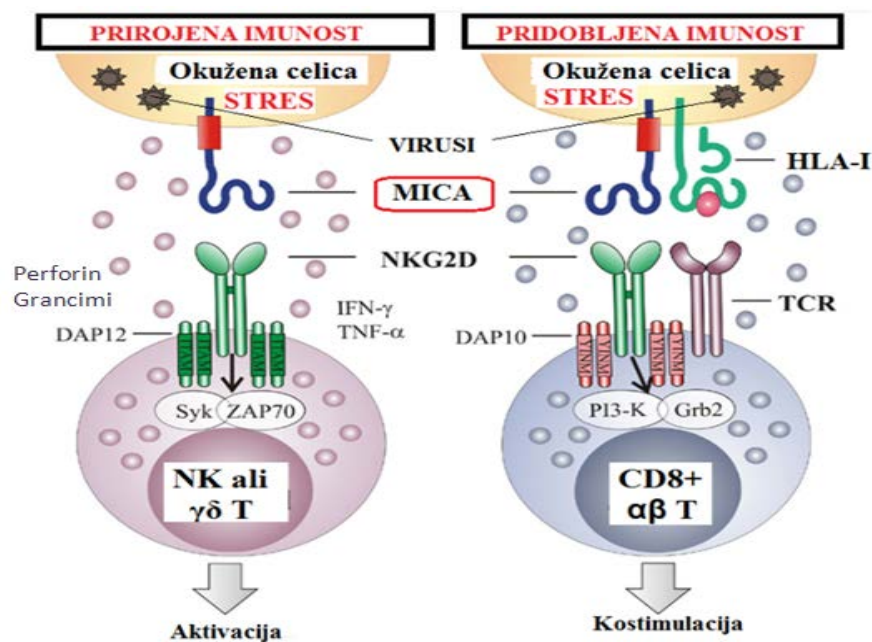
1.6 MICA

MICA in *MICB* sta funkcionalna gena, ki poleg ostalih psevdogenov (od *MICC* do *MICG*) sodita v regijo *HLA* I. razreda na krajšem kraku šestega kromosoma, vendar ne vežeta peptidnih antigenov in posledično ne sodelujeta pri predstavitvi Ag limfocitom T. Ravno tako njihovi proteinski produkti ne vežejo $\beta 2$ mikroglobulina, kot smo to že predstavili na sliki 1, ki prikazuje še ostale strukturne podrobnosti. (14) Gen *MICA* leži 46,3 kb centromerno od alelne skupine *HLA-B* ter 89 kb telomerno od gena *MICB* ter kodira glikoproteine, (iz 383 amino kislin) na površini epitelnih celic tankega črevesa,

keratinocitih, fibroblastih, endotelnih celicah ter nekaterih vrstah tumorjev (melanomi, T celične levkemije). (24, 28) Zaradi njihove bližine z lokusom *HLA-B* so z geni tega v tesnem vezavnem neravnovesju in tako se tudi skupaj dedujejo iz staršev na potomce.

1.6.1 Funkcije molekul MICA

MICA molekule pa eni strani predstavljajo obrambo pred virusi po drugi strani skrbijo za uničenje rakavo spremenjenih celic v telesu. Služijo kot ligand za aktivacijo R_p NKG2D na naravnih celicah ubijalkah (NK, ang.: natural killer), celicah T CD8+ $\alpha\beta$ ter celicah T $\gamma\delta$ intraepitelnih limfocitov (IEL) in posledično sodelujejo pri vzpodbuditvi prirojenega in pridobljenega imunskega odgovora, kot vidimo na sliki 5. (28, 29, 30)



Slika 5: Prikazuje vlogo molekul MICA pri virusni okužbi, sodelujejo tako pri pridobljeni imunosti z aktivacijo celic NK ali T $\gamma\delta$, kot pri pridobljeni imunosti s kostimulacijo celic T CD8+ $\alpha\beta$. (31, 32)

Pri celicah T CD8+ $\alpha\beta$, kompleks NKG2D/MICA pospešuje prepoznavo Ag, T celičnega receptorja (TCR) na tarčnih molekulah, medtem pa pri celicah NK ter T $\gamma\delta$ deluje kot aktivirajoči R_p pri transdukciji znotraj celičnih signalov oziroma sproži od NK posredovano citotoksičnost z izločanjem citokinov (perforina in ostalih), kar vodi do perforacije membrane in posledično lize celic. (28, 29, 30, 31, 32) Povečano izražanje molekul MICA na površini celic je povezano s celičnim stresom, kot je vročina, virusna ali bakterijska infekcija, vnetje ter poškodbe DNK. Protitelesa (Pt) MICA lahko dokažemo pri transplantacijskih zavrnitvah, imunskem odgovoru na viruse in znotrajcelične bakterije,

moteni homeostazi epitelja, toleranci matere na plod ter tumorskem imunskem odgovoru. (24, 33)

1.6.2 Porazdelitev alelov *MICA* znotraj populacij

Do januarja 2014 je bilo odkritih 94 alelov ter 73 proteinov *MICA*. (19) Razlike med aleli v eksonih 2, 3, 4, kjer pride do zamenjave nukleotidov ter posledično spremenjene amino kislinske sestave v domenah $\alpha 1$, $\alpha 2$ in $\alpha 3$ ekstracelularno izraženega proteina, so izven hipotetičnega mesta za vezavo Ag. (24) Medtem, ko je polimorfizem eksona 5 omejen na različno število gvanin-citozin-timin-trinukleotididnih (GCT) ponovitev, ki kodirajo od 4 do 10 amino kislinskih (AK) ostankov v transmembranskem delu in jih označujemo z oznakami *A4*, *A5*, *A5.1*, *A6*, *A7*, *A9* in *A10* pri kateri številka pomeni število GCT ponovitev, pri alelih *A5.1* pa je še dodatni gvanin med drugo in tretjo ponovitvijo. (14, 34, 35) Nomenklaturu alelov *MICA* smo že predhodno predstavili v tabeli 1, vendar ta ne upošteva polimorfizma alelov v eksonu 5. (22)

Nekatere strukturne spremembe v molekuli proteina *MICA*, lahko vplivajo na ekspresijo molekul ter afiniteto interakcij z ligandom NKG2D in sicer mesto 129 na domeni $\alpha 2$, kjer z vezavo AK metionina pride do močne afinitete do liganda (*MICA*001*, **002*, **007*, **017*), z vezavo AK valin pa dobimo šibko afiniteto do liganda (*MICA*004*, **006*, **008*, **009* ter *MICA*010*). Ta polimorfizem bi lahko vplival na prag aktivacije NK ter T celic. (24)

*MICA*008* (spada v skupino *A5.1*) je alel, ki mu manjka del transmembranske domene ter citoplazemski rep (nastanek stop kodona), kljub temu je njegova ekspresija na površini celic zadostna ter se lahko veže na R_p NKG2D. (28) Predstavlja alel, ki je najbolj zastopan pri Evropejcih ter populacijah evropskega izvora, v visokem odstotku pa ga najdemo tudi pri Kitajcih in Japoncih. (28, 34, 36) Ker je njegova zastopanost tako velika in je prisoten v različnih haplotipih, zanj predvidevamo, da je predniški alel, iz katerega so se tekom evolucije razvili še ostali aleli *MICA*. (37) *MICA*002*, *MICA*004*, *MICA*010* ter *MICA*009* v različnem odstotku, odvisno od izbrane populacije, sledijo alelu *MICA*008*, predvsem če se omejimo na Evropo, drugje po svetu lahko zasledimo tudi druge alele, ki pa so v naši okolici precej redki (v Južni Ameriki zasledimo *MICA*027*). (36)

1.6.3 Povezanost gena *MICA* z avtoimunskimi boleznimi

Veliko raziskav je bilo narejenih, ki so skušale dokazati vpliv gena *MICA* na dovzetnost za določene bolezni, ker je bilo sprva mišljeno, da so značilne povezave verjetno posledica močnega vezavnega neravnovesja bližnjih genov *HLA-B* v regiji *HLA* I. razreda (ankilozirajoči spondilitis, Behcetova bolezen, psoriatični artritis) ter genov *HLA-DQ* v regiji *HLA* II. razreda (sladkorna bolezen tipa 1, Addisonova bolezen, ulcerozni kolitis ter celiakija), kasneje pa so to teorijo skušali ovreči ter dokazati vpletenost gena *MICA* neodvisno od drugih genov, kar tudi prikazuje preglednica II. (34)

Preglednica II: Prikazuje alele *MICA*, značilne za določeno bolezen. (14)

BOLEZEN	ALEL MICA: polimorfizem		DRŽAVA	LITERATURA
	Eksoni 2 – 4	Ekson 5		
Behcetova bolezen	MICA*009-dovzetnost		Japonska	38
	MICA*004, *006, *009, *011, *026, *047, *048, *056-dovzetnost	A6-dovzetnost	Italija	39
			Koreja	40
Sladkorna bolezen tipa 1		A5-dovzetnost	Italija	41
		A4-dovzetnost	Španija (baski)	42
		A9-zaščita		
		A5.1-dovzetnost	Španija	43
		A6-zaščita		
		A9-zaščita		
		A5.1-dovzetnost	Japonska	44
A4-dovzetnost				
A9-zaščita				
Addinsova bolezen		A5.1-dovzetnost	Italija	45
		A5.1/A5.1-dovzetnost		
		A6-zaščita		
Ankilozirajoči spondilitis	MICA*007-dovzetnost		Japonska	46
	MICA*010-dovzetnost			
	MICA*001, *007, *012, *018, *043, *045, *058, *060, *073-dovzetnost	A4-dovzetnost	Sardinija in Italija	47
CD		A5.1-dovzetnost	Španija	43 ,48, 49, 50, 51
		A9-zaščita		
		A5.1-dovzetnost	Italija Finska	
Ulcerozni kolitis		A6-dovzetnost	Japonska	54, 55
		A5-dovzetnost	Nemčija	56
		A5.1-dovzetnost	Španija	57

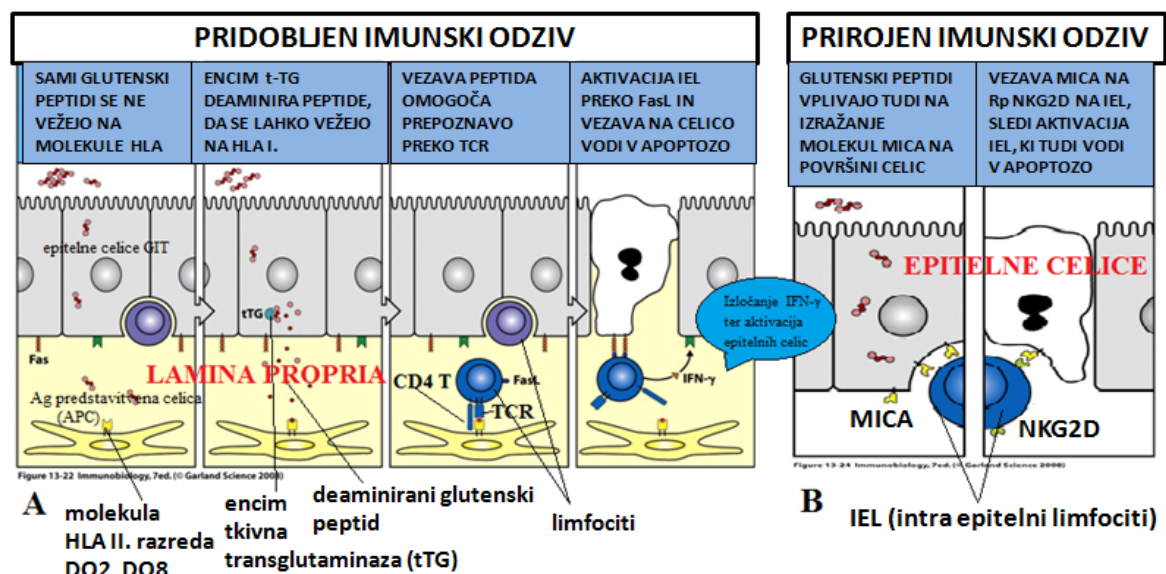
1.6.3.1 Celiakija

Je avtoimuna bolezen tankega črevesa, ki se kaže z delno ali popolno atrofijo črevesnih resic, hiperplazijo kript in infiltracijo IEL, ki jo dokažemo v bioptičnem odvzetem tkivu ter histološko analizo le-tega. Za postavitev končne diagnoze CD v skladu z revidiranimi merili Evropskega združenja za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano (ESPGAN), je poleg biopsije tankega črevesa potrebna še potrditev prisotnosti za celiakijo značilnih seroloških označevalcev v krvi ter normalizacija le-teh po prehodu na

brezglutensko dieto. (7) Serološki označevalci v krvi so protitelesa: t-TG (protitelesa proti tkivni transglutaminazi tipa 2), EMA (antiendomizijska protitelesa) in DGP (protitelesa proti deamidiranemu gliadinskemu peptidu). (1) V pomoč pri diagnozi CD pa so nam tudi genetske preiskave, s katerimi določamo za celiakijo značilne gene II. razreda *HLA-DQ*, katerih odsotnost zanesljivo izključi celiakijo. (4) Geni *HLA-DQ*, ki kodirajo heterodimer DQ2 (*DQB1*02:01-DQA1*05:01*), se pri bolnikih s CD pojavijo približno v 90%, medtem ko heterodimer DQ8 (*DQB1*03:02-DQA1*03:01*) zasledimo približno pri 5% bolnikov. Ti podatki se nanašajo predvsem na bolnike s CD v Evropi ter bolnike evropskega izvora. (6, 30) Medtem, ko je pri splošnih populacijah evropskega izvora pogostost pojavljanja heterodimere DQ2 le med 20% ter 30%. (6)

1.6.3.2 Celiakija in geni MHC I

Gluten oziroma njegovi toksični gliadini vzpodbudijo tako prirojeno v epitelu, kot tudi pridobljeno imunost v lamini proprii kot to vidimo na sliki 6.



Slika 6: Prikazuje dva mehanizma uničenja epitelnih celic. A- z vezavo deaminiranega peptida ter aktivacijo celic T pomagalk CD4+. B- z aktivacijo citotoksičnih limfocitov T CD8+ brez vpletenosti prepoznavne peptida ali pa z vpletenostjo prepoznavne peptida (prisotnost infekcije z rota virusom), kot smo ga prikazali na sliki 5. (34, 58)

Pri pridobljenem imunskem odzivu deaminiran gliadinski peptid vezan na molekule DQ (DQ2, DQ8) prepoznajo TCR celic APC ter pride do aktivacije celic T pomagalk CD4+ ob sočasnem izražanju kostimulatorjev. V odziv prično celice T izločati citokine (interferon γ – IFN γ) ter nadalje vplivajo na druge celice kot so limfociti B (nastanek Pt, pomembnih za diagnostiko), epitelne celice (vezava preko FasL) ter ostale, kar v končni

fazi vodi do apoptoze epitelnih celic. (12, 33) Pri prirojeni oziroma naravni imunosti v epitelnih celicah, glutenski peptidi, kot stresni dejavniki poškodujejo celice in povzročijo povečano izražanje Ag MICA na površini celic ter izločanje interleukina 15, ki pa vpliva na povečano ekspresijo Rp NKG2D IEL. Sledi vezava molekul MICA na Rp NKG2D IEL, ki se aktivirajo ter sprožijo postopke, ki zopet vodijo v apoptozo epitelnih celic.

1.6.3.3 Celiakija pri sladkornih bolnikih tipa 1

Pogostost pojava CD pri sladkornih bolnikih tipa 1 (SB1) variira po statistikah med 3 % in 16% v povprečju pa 8% glede na ostalo populacijo. Skupno obema boleznima je podobna genetska osnova *DR*, *DQ*, *MICA-A5*, prisotnost Pt (t-TG) ter dejstvo, da gre pri obeh za nepravilen imunski odziv, usmerjen predvsem na tanko črevo in s tem tudi povezane posledice. (59)

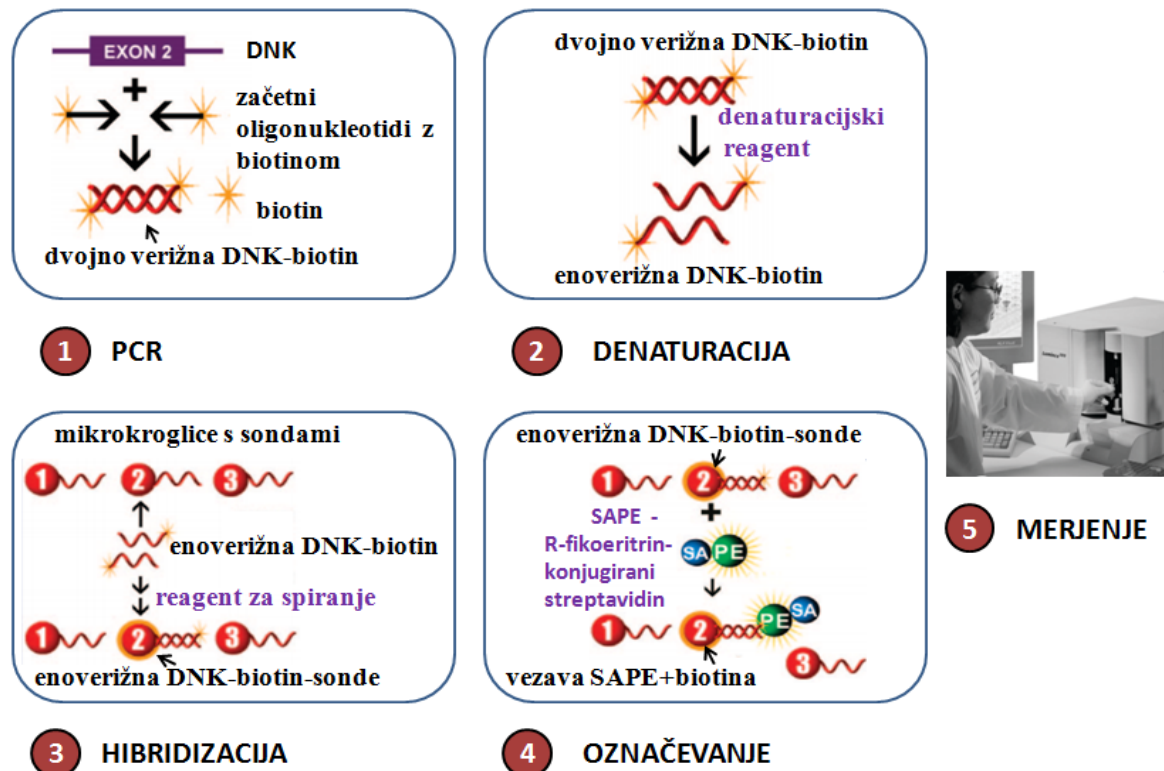
1.7 METODE TIPIZACIJE GENA *MICA* TER *HLA*

Sprva so se za analizo molekul *HLA* I. in II. razreda uporabljale serološke metode, ki so imele veliko pomanjkljivosti, predvsem za molekule *HLA* II. razreda, sedaj pa se v veliki večini uporabljajo metode, ki temeljijo na določanju genov na ravni DNK, katerih osnova je reakcija verižne polimerizacije (PCR, ang.: polymerase chain reaction), odkrita leta 1983, s katero v kratkem času dobimo veliko število kopij določenega odseka DNK. PCR reakcija poteka v cikličnem termostatu in je sestavljena iz treh stopenj, kjer pride najprej do denaturacije dvojne verige DNK (94-95 °C), sledi prileganje oligonukleotidnih začetnikov (40-60 °C) ter končno izgrajevanje komplementarne verige s temperaturno stabilno polimerazo Taq (*Thermus aquaticus*) pri temperaturi 72 °C. (60)

1.7.1 Reakcija verižne polimerizacije z reverznimi sekvenčno specifičnimi oligonukleotidi (PCR-rSSO)

Metoda temelji na uporabi sekvenčno specifičnih oligonukleotidov (SSO) ali sond, ki so vezane na fluorescentno označene polistirenske mikrokroglice v že pripravljenem kompletu, ki vsebuje maksimalno 100 kroglic z vezano eno sondo (za tipizacijo na srednji stopnji ločljivosti) ali več sond hkrati (za tipizacijo na visokem nivoju ločljivosti). Prva stopnja metode PCR-rSSO, ki jo vidimo tudi na sliki 7, je PCR z uporabo biotiniranih začetnih oligonukleotidov, ki omogočajo pomnožitev določenega odseka DNK. Pri *HLA* I. in II. razreda zajema območje eksona 2 ter 3, medtem za določitev alelov *MICA*

pomnožujemo eksone 2, 3, 4 in 5. V naslednji stopnji razklenemo dvojne verižne DNK na enoverižne DNK, ki jih v nadaljni stopnji hibridizacije inkubiramo z mikrokroglicam s sondami. Sledi spiranje nevezanih sond ter produktov in dodatek fluorescentnega barvila R-fikoeritrin-konjugiranega streptavidina (SAPE), ki se z veliko afiniteto veže na biotin produktov tarčne DNK, vezane na sonde. (61)



Slika 7: Metoda PCR-rSSO. (62)

Take sonde zazna aparat LABScanTM 100, pretočni citometer, ki uporablja tehnologijo Luminex®, preko dveh laserjev, katerih naloga je zaznava mikrokroglic (vrsto mikrokroglice in katere sonde so vezane na njih). (61, 62) Na osnovi dobljenega signala, računalniški program te podatke obdela in poda rezultate.

1.7.2 Reakcija verižne polimerizacije s sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (PCR-SSP)

Začetni oligonukleotidi (SSP) se v tarčni DNK komplementarno vežejo in se v sklopu PCR pomnožijo, njihovo prisotnost pa preverjamo z gelsko elektroforezo, kjer potujejo pomnožki različno hitro glede na njihovo molekularno maso (najlažji najdlje, težji najkrajšo pot). Začetni oligonukleotidi morajo biti narejeni tako, da pokrijejo vse znane alele preiskovanega lokusa. (12, 60, 63)

2 NAMEN DELA

Do sedaj so s celiakijo ter celiakijo v sopojavljanju z diabetesom tipa 1 povezovali predvsem gene *HLA* II. razreda, ki kodirajo nam dobro znane molekule HLA-DQ2 ter HLA-DQ8. Mi pa bomo pod drobnogled vzeli gen *MICA*, kot ne-klasični predstavnik *HLA* I. razreda ter z njimi povezane gene klasičnega lokusa *HLA-B*, na ta način bomo nekako združili ocenjevanje vpliva prirojene in pridobljene imunosti ter skušali dokazati vlogo genov *HLA* I. razreda neodvisno od genov *HLA* II. razreda na pojav celiakije ter sopojavljanje le-te s SB1. Ne moremo tudi mimo dejstva, da molekule *MICA* najdemo prav na sluznici gastrointestinalnega trakta, ki je pri CD najbolj prizadeta in bi prav zaradi tega molekule *MICA* lahko imele vlogo pri razvoju in poteku bolezni, kar smo želeli dokazati.

Cilji naše študije so bili:

- vpeljati metodo, s katero bomo določili polimorfizem gena *MICA* ter opraviti tipizacije vzorcev znotraj skupine zdravih oseb slovenskega porekla (kontrolna skupina) ter pri njej s statistično analizo opredeliti populacijsko genetske parametre
- določiti alele *MICA*, *HLA-B* in *HLA-DQ* pri skupini bolnikov s CD ter skupini bolnikov s SB1+CD ter rezultate s statistično analizo primerjati med seboj
- z ozirom na to, da se gen *MICA* nahaja na šestem avtolognem kromosomu v bližini genov *HLA*, s katerimi je v vezavnem neravnovesju, načrtujemo pri nalogi s stratifikacijo na *HLA-DQ* pokazati neodvisni vpliv genov *HLA-B* ter *MICA* na pojavljanje CD ter SB1+CD.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Preiskovanci

3.1.1.1 Vzorci zunanje kontrole kakovosti

Vzorke zunanje kontrole kakovosti smo pridobili v sklopu zunanje sheme zagotavljanja kakovosti rezultatov, ki jih organizira referenčni laboratorij HLA svetovne zdravstvene organizacije, ki deluje znotraj Univerze v Kaliforniji. Pri preverjanju smo sodelovali od maja 2010 pa do maja 2013 ter uspešno določili tip MICA na srednji stopnji ločljivosti z uporabo metode PCR-rSSO, 40 kontrolnim vzorcem.

3.1.1.2 Vzorec slovenske populacije

Vzorčenje smo v Centru za tipizacijo tkiv (CTT) izvajali od leta 1992 do leta 2013, z namenom da bi določili antigene in alele *HLA* v okviru raznih študij. Naključno smo zbrali 130 nesorodnih Slovencev, od katerih smo pridobili soglasje za sodelovanje ter upoštevali Oviedsko konvencijo, soglasje o genski analizi krvnih in tkivnih Ag pa je dala tudi Etična komisija. Osebe, ki so bile vključene v vzorec slovenske populacije oziroma kontrolne skupine so morale biti slovenskega porekla prav tako, kot tudi njihovi starši.

Vsem 130 vzorcem smo tekom predhodnih študij v CTT-ju že določili tip *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1* in *HLA-DQB1* na visoki stopnji ločljivosti, bodisi z uporabo metod PCR-SSO, PCR-SSP ali PCR-SBT. V letu 2013, nekaterim tudi prej, pa smo tej skupini vzorcev določili tudi tip MICA na srednji stopnji ločljivosti z uporabo metode PCR-rSSO, ki se je v ta namen uporabila prvič. Za statistično analizo pa smo uporabili rezultate tipizacij *HLA-B*, *HLA-DQ* (*HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*) ter *MICA*.

3.1.1.3 Vzorci bolnikov s CD ter vzorci bolnikov s SB1 in CD hkrati

Obe skupini bolnikov, otrok in mladostnikov so vzorčili oziroma zbrali 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. (12) V Center za tipizacijo tkiv pa so poslali vzorce krvi, skupaj s soglasjem o sodelovanju v študijah. Skupaj smo prejeli oziroma shranili 68 vzorcev bolnikov s CD ter 69 vzorcev bolnikov s SB1+CD. V skupini z obema boleznima

je 47 bolnikov s SB1, ki so kasneje zboleli še za CD ter 22 bolnikov s CD, pri katerih se je naknadno pojavila še SB1. Na kliniki so vsem bolnikom postavili diagnozo CD v skladu z merili ESPGAN, katerih osnova je patološka histološka analiza biopta tankega črevesa.

Obema skupinama smo določili ali pa je že bil določen tip HLA-B ter MICA na srednji stopnji ločljivosti, tip HLA-DQB1 ter HLA-DQA1 pa na visoki stopnji ločljivosti z uporabo metode PCR-rSSO ter Luminex® tehnologije na aparatu LABScan™ 100. V primeru, da z metodo PCR-rSSO nismo dobili rezultata ali je bil le-ta nejasen ter v obliki več alelnih kombinacij, ki jih nismo mogli razločiti, smo se poslužili metode PCR-SSP za tipizacijo ali subtipizacijo lokusa *HLA-B* ter *HLA-DQ*. Pri genu *MICA* smo imeli na razpolago samo metodo PCR-rSSO s tehnologijo Luminex®.

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija DNK z aparatom Geno-M6 ali EZ1

Oba aparata omogočata avtomatizirano izolacijo DNK od 1 do 6 vzorcev hkrati, iz polne krvi odvzete z antikoagulantom ter postopkom za izolacijo DNK iz krvi (GenoPrep 350B). Komplet reagentov za izolacijo (kartuša) ima v posebnih razdelkih reagent za lizo celic, magnetne delce, pufer za spiranje ter elucijski pufer. Sama izolacija poteka s pomočjo magnetnih delcev, ki vežejo in očistijo DNK. (64)

Material

- aparat EZ1 ali Geno-M6
- pipete in konice za pipete
- centrifuga oziroma stresalnik
- komplet (kartuša) z reagenti za izolacijo DNK iz polne krvi (GenoPrep 350B)

Postopek

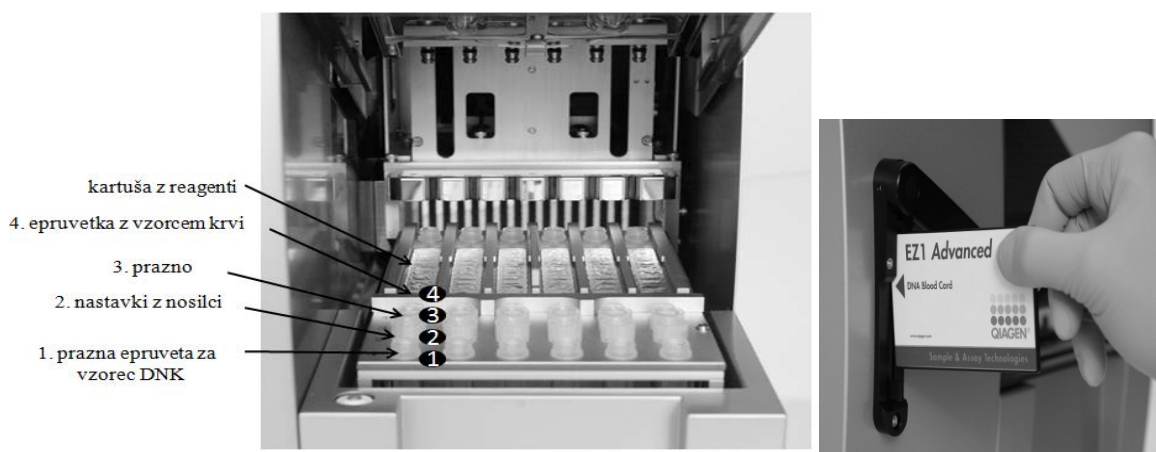
A) Ročno delo

- odpipetirali smo 350 µl dobro premešane polne krvi v ustrezno priloženo epruvetko, ki smo jo poleg kartuše ter nastavkov, nosilcev nastavkov in praznih epruvetk za eluirano DNK, vstavili v aparat, glede na sliko 8
- vstavili smo kartico za izolacijo DNK iz polne krvi (350) z ustreznim programom v režo

- nato smo vključili aparat po navodilih proizvajalca

B) Avtomatska izolacija v aparatu

- liza celic
- vezava DNK na magnetne delce
- spiranje nevezanih delcev ter ostankov reagentov
- raztapljanje DNK (v vodi ali pufu)



Slika 8: Delovna miza aparata EZ1 ter način vstavljanja kartice v režo na sprednji strani aparata. (64)

Po končani izolaciji smo odstranili epruvetke z vzorci DNK iz aparata ter centrifugirali vzorce, da se magnetni delci vsedejo na dno, kajti drugače bi lahko motili samo merjenje absorbance (A) v spektrofotometru. (64)

3.2.2 Določanje koncentracije in čistosti izolirane DNK

Koncentracijo in čistost izolirane DNK smo določili s pomočjo spektrofotometra, kjer merimo A svetlobe v ultravijoličnem (UV) področju. Nukleinske kisline imajo absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 260 nm, medtem pa proteini, ki niso bili odstranjeni tekom izolacije, absorbirajo svetlobo pri valovni dolžini 280 nm. Iz izmerjene A pri 260 nm, lahko izračunamo koncentracijo dvovijačne DNK (dvDNK) s pomočjo Beer-Lambovega zakona in znanega ekstinkcijskega koeficienta. Iz razmerja med absorbancami pri 260 nm in 280 nm, lahko sklepamo na onesnaženje s proteini. Idealno razmerje A₂₆₀/A₂₈₀ je med 1,65 in 1,90. (65, 61)

Beer-Lambergov zakon: $A = e \times c \times l$

e = molarni ekstinkcijski koeficient ($\mu\text{l/ng}$) $e(\text{dvDNK}) = 0,020 \mu\text{l/ng}$

c = koncentracija raztopine DNK (ng/ μ l)

l = dolžina žarka skozi raztopino (cm) l običajne kivete = 1cm

A = absorbanca vzorca

Po dogovoru velja, da je koncentracija enaka 50 ng/ μ l, če je absorbanca dvDNK pri valovni dolžini 260 nm enaka 1,0. To vrednost vzamemo kot faktor, s katerim pomnožimo izmerjenje absorbance nukleinskih kislin in izračunamo koncentracijo. (65)

Primer: Konc. dvDNK = $A(260\text{nm}) \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{faktor redčitve}$

Material

- spektrofotometer
- centrifuga in stresalnik
- pipete in nastavki za pipete
- puhalka za spiranje kivete
- voda za injiciranje
- epruvete za predhodno redčenje vzorcev

Postopek

- pred začetkom merjenja vzorcev smo umerili aparat na ničelno točko z destilirano vodo
- nato smo v čisto kiveto dali 70 μ l vzorca DNK, ki smo ga predhodno 10 x redčili z vodo

Na podlagi absorbanc pri 260 in 280 nm in vstavljenega faktorja smo dobili neredčeno koncentracijo, ki jo moramo pomnožiti s faktorjem redčenja (10x), da dobimo dejansko koncentracijo dvDNK. (65)

3.2.3 Postopki priprave za elektroforezo na gelu

3.2.3.1 Agarozna gelska elektroforeza in priprava 2% agaroznega gela

Agarozna gelska elektroforeza je metoda ločevanja produktov DNA po velikosti oziroma molekularni teži, ki zaradi svojega negativnega naboja potujejo v električnem polju proti

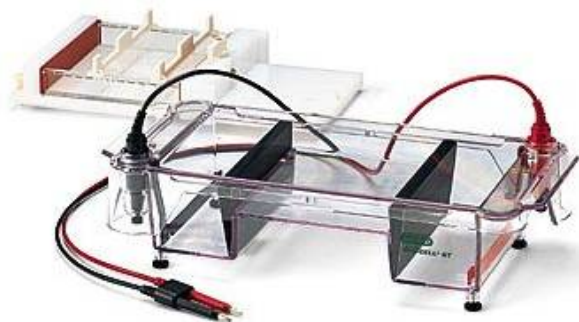
pozitivni anodi. Zamreženost agaroznega gela pa omogoča, da se manjše molekule DNK lažje prebijajo skozi pore gela in tako potujejo hitreje in dalje kot večje molekule DNK. Potovanje fragmentov dvDNK v elektroforezi detektiramo bodisi z etidijevim bromidom, ki se interkalira med bazne pare, bodisi z fluorescentnim barvilom GelRed. Pri obsevanju z UV svetlobo etidijev bromid fluorescira oranžno svetlobo valovne dolžine 590 nm. V primerjavi s standardno raztopino DNK lahko na podlagi intenzivnosti emitirane svetlobe ocenimo velikost baznih parov produktov DNK v vzorcu. (66)

Material

- agaroz
- 10 X pufer TBE (Tris baza, borovalna kislina ter EDTA)
- deionizirana voda
- tehnika
- plastična žlička
- mikrovalovna pečica
- čaša ter steklena palčka
- etidijev bromid ali barvilo GelRed
- nosilec ter kadička za elektroforezo
- usmernik električnega toka
- 0,5 X TBE (pripravimo ga iz 10 X TBE)

Postopek

- zatehtali smo 6,4 g agaroze v ustrezno plastično čašo
- dolili smo 16 ml 10 X TBE
- dopolnili smo s 304 ml deionizirane vode
- čašo smo postavili v mikrovalovno pečico za 7 minut pri moči 600 W
- nekoliko ohlajeni zmesi smo dodali kapljico etidijevega bromida ali 2-3 kapljice GelReda, premešali ter vlili zmes v nosilec kadičke, kot jo vidimo na sliki 9



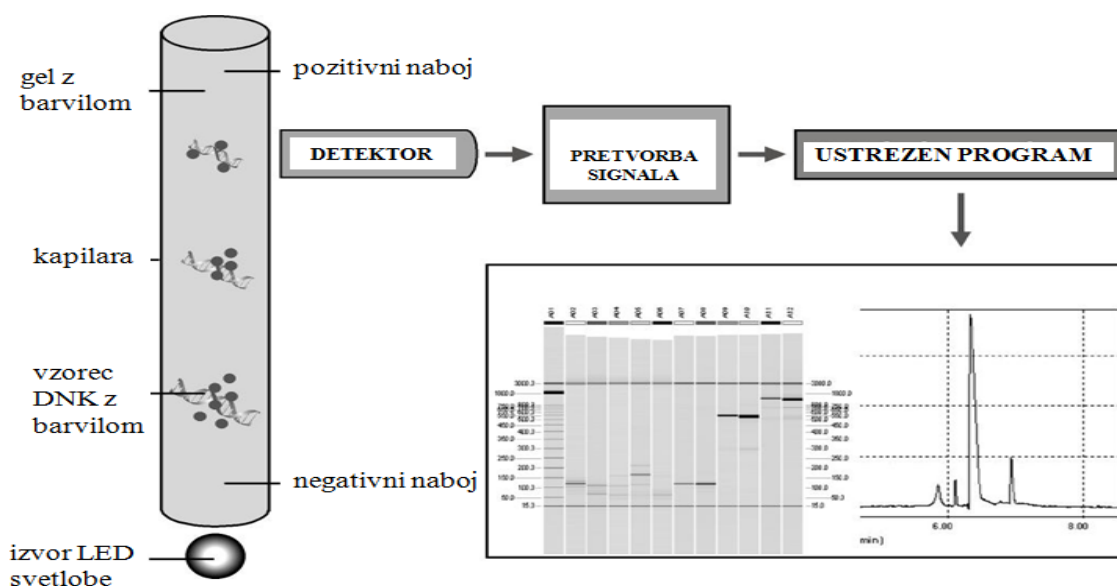
Slika 9: Elektroforezna kadička in usmernik električnega toka.

- počakali smo, da se gel strdi, zatem smo ga potopili v elektroforezno kadičko napolnjeno z 0,5 X TBE

Takšen gel je sedaj pripravljen za nanos produktov PCR dobljenih z metodo PCR-SSP ali PCR-rSSO.

3.2.3.2 Kapilarna gelska elektroforeza ter priprava aparata Qiaxcel

Kapilarna gelska elektroforeza na aparatu Qiaxcel je popolnoma avtomatizirana metoda za ločevanje negativno nabitih DNK ali ribonukleinskih (RNK) fragmentov na osnovi njihove molekulske teže oziroma velikosti, princip metode vidimo na sliki 10.



Slika 10: Princip delovanja aparata QIAxcel. (67)

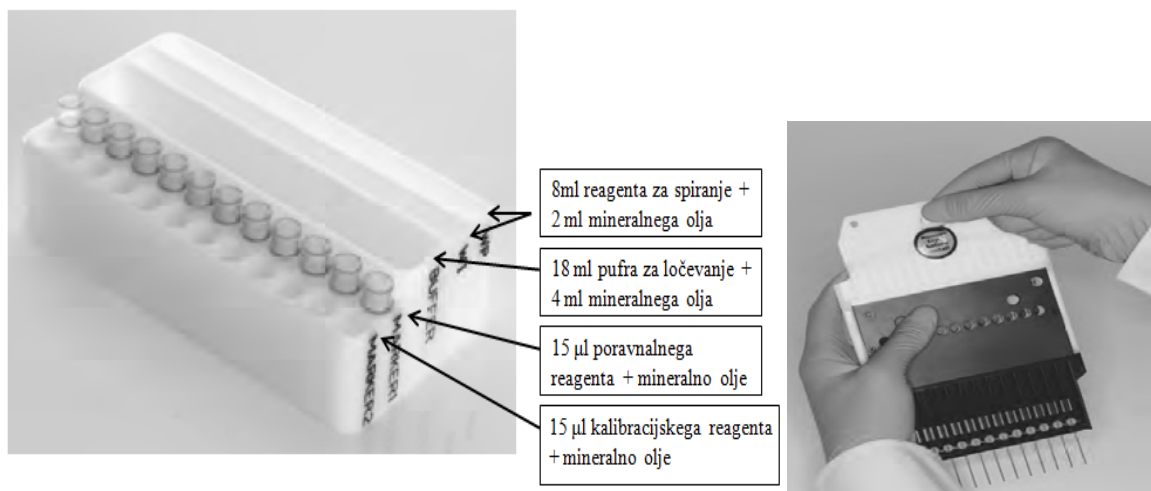
Fragmenti potujejo v 12 kapilarah napolnjenih z gelom proti pozitivni anodi, tekom poti jih zazna detektor, ki izmeri njihov fluorescentni signal ter ga pretvori v elektronske podatke, katere posreduje računalniku za nadaljnjo obdelavo. Sam postopek traja približno 40 minut in z njim lahko ločimo tudi 96 vzorcev hkrati. (67)

Material

- aparat QIAxcel
- pufer za spiranje
- pufer za redčenje
- pipete in nastavki za pipete
- set 12 epruvetk
- stresalnik
- pufer za ločevanje
- mineralno olje
- poravnavni reagent
- kalibracijski reagent
- set reagentov QIAxcel (kartuša QIAxcel Fast Analysis)
- dolžinski označevalec (ang.: size marker) od 50 bp do 1500 bp

Postopek

- vzeli smo kartušo z reagenti, ki jo vidimo na sliki 11, iz hladilnika in jo vstavili v aparat v skladu z navodili proizvajalca



Slika 11: Kadička s pufri in kartuša za aparat QIAxcel. (67)

- odpipetirali smo ustrezne količine pufrov v kadičko
- kalibrirali smo kartušo pred prvo uporabo po navodilih proizvajalca
- uspela kalibracija pomeni, da je aparat pripravljen za elektroforezo vzorcev, pomnoženih z metodo PCR-SSP ali PCR-rSSO
- istočasno z vzorci smo morali v aparatu nastaviti tudi dolžinski označevalec, katerega potrebujemo za oceno dolžine poti specifičnih produktov (67)

3.2.4 Določanje tipa *MICA* ter *HLA-B* in *HLA-DQ* z metodo PCR- rSSO

Osnovni princip metode je razložen v uvodu pod točko 1.6.1. Metodo PCR-rSSO v CTT-ju v rutini uporabljamo že kar nekaj let predvsem za določanje tipa HLA-A, HLA-B in HLA-DRB1 na nizki stopnji ločljivosti. V zadnjem letu pa smo določali tudi tip HLA-DQB1, HLA-C ter HLA-DRB1 na visoki stopnji ločljivosti. Tekom naše študije smo vpeljali metodo PCR-rSSO tudi za tipizacijo alelov *MICA*, ki smo jo predhodno preverili v okviru zunanje sheme kontrolnih testiranj Univerze v Kaliforniji v kateri smo sodelovali od maja 2010 do maja 2013 ter pravilno določili tip *MICA*, 40 kontrolnim vzorcem. Za tipizacijo vzorcev ter kontrol smo uporabili teste LABType® SSO, proizvajalca One Lambda, pri katerih smo količine vseh reagentov redčili na polovico, saj so ti testi v našem laboratoriju validirani na tak način.

3.2.4.1 Priprava PCR mešanice in pomnoževanje

Namnožili smo določen odsek DNK, ki je označen z biotinom.

Material

- 1,5 ml epruvetke s pokrovom
- konice za pipetiranje
- pokrivne folije PCR ali pokrovčki
- mehanske in elektronske pipete
- termostabilne mikroplošče PCR (0,3 ml, 96-well PCR plate)
- električni vibrator Vibromix
- centrifuga
- aparat PCR (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems)
- zamrznjena sterilna bidestilirana voda

- polimeraza Taq (Applied Biosystems)
- komplet že pripravljenih komercialnih reagentov (One Lambda LABType SSO) za uporabo pred PCR (pre PCR):
 - o biotinirani začetni oligonukleotidi za *HLA-B*, *MICA* ter *HLA-DQ*
 - o D-mix (DNTP-deoksinukleozid- trifosfati, Mg^{2+} ioni, ter reakcijski pufer)

Komplet že pripravljenih komercialnih reagentov hranimo zamrznjen pri temperaturi od -20 °C do -80 °C v originalni embalaži. Pred uporabo smo komplet odprli in ločili reagente za uporabo pred PCR (pre-PCR) in po PCR (post-PCR) reagente. Pre-PCR reagente smo takoj uporabili, ostanek pa zamrznili nazaj do ponovne uporabe.

Post-PCR reagente smo prenesli v hladilnik post PCR prostora na temperaturo od 2°C do 8 °C, kjer so zaščiteni pred svetlobo, nikoli jih ponovno ne zamrzujemo. Izjema je reagent za spiranje (Wash Buffer), ki smo ga hranili v post PCR prostoru na sobni temperaturi.

Postopek

- v prvo vdolbinico mikroplošče smo napipetirali 1 µl vode (negativna kontrola -NC)
- v vse ostale vdolbinice smo nato napipetirali 1 µl vzorca DNK, koncentracije 20 ng/µl, glede na priloženi plan vzorcev, ki smo ga predhodno sestavili, primer vidimo v preglednici III

Preglednica III: Primer plana mikroplošče z 12 vzorci.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	Vz. 8										
B	Vz. 1	Vz. 9										
C	Vz. 2	Vz. 10										
D	Vz. 3	Vz. 11										
E	Vz. 4											
F	Vz. 5											
G	Vz. 6											
H	Vz. 7											

- nato smo vsem vzorcem v vdolbinicah dodali še po 10 μ l naslednje mešanice za PCR, ki smo si jo predhodno pripravili glede na število vzorcev DNK, kot nam prikazuje preglednica IV

Preglednica IV: Sestava mešanice za PCR. (61)

Število vzorcev	Začetni oligonukleotid (μ l)	DNTP-mix (μ l)	Taq polimeraza (μ l)
1	2	6,9	0,1
5	10	34,5	0,5
10	26,6	91,8	1,3
12	30,6	105,6	1,52
20	53,1	183,5	2,6
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

- ploščo smo pokrili oziroma prelepili z zaščitno folijo, ki preprečuje izhlapevanje vzorcev v aparatu PCR
- premešali smo ploščo na stresalniku in na kratko zavrteli v centrifugi (500-700 vrt/min)
- prenesli smo ploščo z vzorci v napravo PCR in nastavili PCR program (reaction volume > 11 μ l, ramp speed 9600), ki smo ga shranili z imenom Luminex prikazan v preglednici V (68)

Preglednica V: Temperaturni program Luminex za metodo PCR-rSSO. (61)

Korak	Temperatura ($^{\circ}$ 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	neskončno	1

3.2.4.2 Kontrola produktov pomnoževanja

Kontrolirali smo samo tisto vrsto na mikroplošči, ki ima negativno kontrolo (vrsta A).

Vidna morata biti dva produkta, kjer pomnožujemo ekson 2 in 3:

- pri *HLA* I. razreda (*HLA-B*), je močnejši produkt običajno na dolžini 350 bp, šibkejši pa na dolžini 500 bp
- pri *HLA* II. razreda (*HLA-DQ-HD*) je močnejši produkt na dolžini 280 bp, šibkejši pa na dolžini 320 bp. (61)

Vidni morajo biti trije produkti eksonov 2 ter 4 in 5:

- pri *MICA* je močnejši produkt na dolžini 400 bp, šibkejša pa sta na dolžini 500 bp ter 250 bp. (61)

Dolžino produktov smo primerjali glede na dolžinski označevalec, ki ima specifikacijo, katere dolžine baznih parov lahko z njim razlikujemo.

3.2.4.2.1 Agarozna gelska elektroforeza

Material

- pripravljen 2% agarozni gel
- pipeta in nastavki za pipeto
- elektroforezna kadička
- usmernik električnega toka
- dolžinski označevalec
- aparat GENE FLASH za slikanje pod UV svetlobo

Postopek

- na gel smo nanесли 3 μ l produktov iz vrste A ter 10 μ l dolžinskega označevalca
- elektroforezo smo pustili teči 15-20 minut pri 180 V
- kontrolirali smo produkte s slikanjem pod UV svetlobo

3.2.4.2.2 Kapilarna gelska elektroforeza z aparatom QIAxcel

Material

- pripravljen aparat QIAxcell, kot smo opisali pri točki 3.2.3.2 (67)
- plošča s produkti PCR

Postopek

- prenesli smo ploščo PCR v aparat
- nastavili smo ustrezen program elektroforeze (samo za eno vrsto) v skladu z navodili proizvajalca (s pufrom za redčenje smo morali napolniti vse vdolbinice v vrsti, če so bile le-te prazne)
- po končani elektroforezi smo analizirali rezultate

Glede na ustrezno število in dolžino produktov PCR (*HLA-B*, *HLA-DQ*, *MICA*), smo lahko nadaljevali z naslednjo stopnjo metode PCR-rSSO.

3.2.4.3 Denaturacija in nevtralizacija

Tukaj gre za razbitje dvojno verižne DNK na enojne verige, s tem smo omogočili dostop sondam, vezanim na mikrokroglice. (61)

Material

- mehanske in elektronske pipete
- nastavki za pipete
- nosilec za mikroplošče
- mikroplošče PCR (0,3 ml, 96-well)
- banjice
- stresalnik
- centrifuga
- hladilno stojalo
- pokrivne aluminijaste folije PCR (zaščita pred svetlobo)
- denaturacijski reagent
- nevtralizacijski reagent

Postopek

- prenesli smo 2,5 µl produktov PCR v novo mikroploščo PCR
- nato smo dodali 1,25 µl denuracijske raztopine, pokrili in premešali
- inkubirali smo na sobni temperaturi 10 minut ter opazovali spremembo barve iz svetlo v temno rožnato
- v naslednjem koraku smo dodali 2,5 µl nevtralizacijskega pufra, pokrili, premešali in opazovali nastanek rumene barve
- nato smo postavili ploščo v hladilno stojalo ter preprečili onesnaženje produktov PCR z vodo

3.2.4.4 Hibridizacija

Hibridizacija je prileganje sond na komplementarno mesto na enoverižni DNK. Pred samo hibridizacijo smo vklopili aparat PCR in nastavili temperaturo na 60 °C. (61)

Material

- mehanske in elektronske pipete
- nastavki za pipete
- nosilec za mikroplošče
- epruvete
- stresalnik
- centrifuga
- hladilno stojalo
- aparat PCR (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems)
- pokrivne aluminijaste folije PCR (zaščita pred svetlobo)
- hibridizacijski pufer
- mešanica mikrokroglic (SSO Bead mix – B, – MICA, -DQ)

Postopek

- glede na preglednico VI, smo v epruveto napipetirali ustrezno količino hibridizacijskega pufra ter dodali mešanico mikrokroglic, ki smo jih pred tem močno pretresli na stresalniku

Preglednica VI: Priprava hibridizacijske mešanice. (61)

Število produktov PCR (μ l)	Hibridizacijski pufer (μ l)	Mešanica kroglic (μ l)
1	17	2
5	85	10
10	198,7	23,4
12	232,7	27,4
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 vse vdolbinice mikroplošče z denaturiranimi produkti PCR smo dodali 19 μ l pripravljene mešanice, pokrili s folijo, dobro premešali na stresalniku ter zavrteli v centrifugi
- nato smo vzorce pokrili z gumijasto plastjo ter 15 minut inkubirali v ogretem aparatu PCR pri temperaturi 60 °C
- po inkubaciji smo takoj dodali 50 μ l pufra za spiranje, pokrili, premešali ter centrifugirali 5 minut na 2800 vrt/min
- nato smo odstranili pufer (s hitrim zamahom roke)
- postopek spiranja smo ponovili še dvakrat

3.2.4.5 Označevanje

Z vezavo SAPE na biotiniran produkt DNK, smo omogočili detekcijo. (68, 69) Med tretjim vrtenjem smo si pripravili raztopino 1X SAPE glede na preglednico VII.

Preglednica VII: Priprava raztopine 1X SAPE. (61)

Število produktov PCR (μ l)	Koncentrat SAPE- SS (μ l)	Pufer SAPE- SB (μ l)
1	0,25	24,8
5	1,25	124
10	2,97	292,5
12	3	297,6
20	5,96	584,9
40	10,8	1062
50	12,5	1238
60	16,2	1593,9
80	21,6	2125,2
96	25,8	2550

Material

- mehanske in elektronske pipete
- nastavki za pipete
- nosilec za mikroplošče
- epruvete
- stresalnik
- centrifuga
- aparat PCR (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems)
- pokrivne aluminijaste folije PCR (zaščita pred svetlobo)
- koncentrat SAPE
- pufer SAPE
- plošče za merjenje (Whatman V bottom)

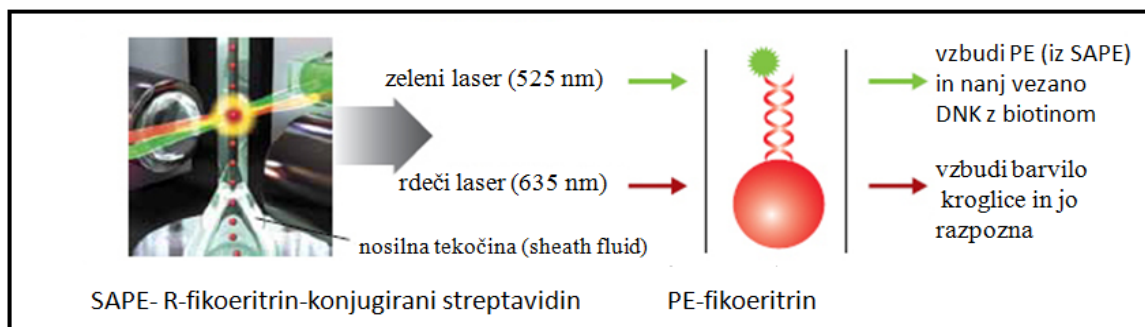
Postopek

- hibridizirani DNK smo dodali 25 µl raztopine 1X SAPE, pokrili, premešali in na hitro centrifugirali
- inkubirali smo 5 minut na 60 °C v aparatu PCR
- po inkubaciji smo takoj dodali 50 µl pufera za spiranje, pokrili, premešali ter centrifugirali 5 minut na 2800 vrt/min
- po vrtenju smo odstranili pufer ter dodali 35 µl svežega pufera za spiranje, premešali in na hitro zavrteli v centrifugi
- 40 µl označenih produktov PCR smo iz vsake vdolbinice mikroplošče prenesli v ploščo za merjenje

S tem smo ročno delo metode zaključili, sledilo je samo še merjenje fluorescentnega signala vzorcev v aparatu LABScanTM 100, pretočnem citometru, ki uporablja tehnologijo Luminex®.

3.2.4.6 Merjenje fluorescentnega signala vzorcev z aparatom LABScan™ 100 in analiza rezultatov

Aparat je pretočni citometer v katerem skozi pretočno celico teče tok nosilne tekočine z mikrokroglicami, ki jih zaznata dva laserja. Rdeči laser vzbudi fluorescenco barvila posamezne kroglice in jo tako razpozna, medtem pa zeleni laser vzbudi fluorescenco fikoeritrina (PE) znotraj SAPE ter tako omogočimo detekcijo fluorescentnega signala tistih sond z vezano tarčno DNK preko biotina, kar prikazuje slika 12. (12)



Slika 12: Presvetljevanje vsake mikrokroglice z dvema laserjema. (68)

Srednja fluorescenčna intenziteta (MFI, ang.: median fluorescence intensity) zajema fluorescenco vsake mikrokroglice ter sonde na njej. Vrednost MFI je prirejena pozitivni kontroli in jo podajamo kot odstotek MFI pozitivne kontrole. Izračunamo jo po naslednji enačbi: (61)

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

MFI pozitivne kontrole mora biti med 1.200 in 7.000. Set reagentov vsakega lokusa vsebuje eno ali več pozitivnih kontrol, katerih sonde reagirajo z vsemi aleli določenega lokusa. Za vsako sondo so določene mejne vrednosti. Če je odstotek pozitivne vrednosti nad to mejo, je rezultat pozitiven, v primeru da je odstotek pozitivne vrednosti pod to mejo, pa je rezultat negativen. (61)

Material

- Whatman plošča z označenimi produkti PCR
- aparat LABScan™ 100

- izopropanol
- nosilna tekočina (sheath fluid)
- prazna plošča za merjenje (Whatman V bottom)
- 20% raztopina hipoklorida (Arekina)
- kontrole ter kalibratorji (po potrebi)

Postopek

- po vključitvi aparata počakamo, da se ogreje laser, vmes pa smo pričeli s postopki tako imenovanega dnevnega zagona (Daily start up) v skladu z navodili proizvajalca:
 - o spirali smo sistem z izopropanolom
 - o spirali smo iglo z nosilno tekočino
- nato smo po potrebi izvedli merjenje kalibracijskih in kontrolnih raztopin
- v primeru, če so bile meritve fluorescence kontrolnih in kalibracijskih vzorcev znotraj predpisanih območij, smo začeli z merjenjem fluorescence vzorcev ter pri tem pazili:
 - o da so vrednosti MFI pozitivnih sond nad 1000
 - o da je vrednost MFI negativne kontrole blizu 0
 - o da je število mikrokroglic znotraj območja $100 \pm 25\%$
 - o da je število dogodkov (events), gledano pod grafom nad 250
 - o da je delta kalibracijska temperatura znotraj intervala $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$
- po merjenju vzorcev smo naredili postopke pred izklopom aparata (Daily shutdown) v skladu z navodili proizvajalca:
 - o spirali smo sistem z raztopino 20% hipoklorida
 - o spirali smo iglo z destilirano vodo
- nazadnje smo izključili aparat

Rezultate analiz oziroma vrednosti MFI posameznih sond smo vrednotili s pomočjo programa HLA FusionTM.

3.2.5 Določanje tipa HLA-B ter HLA-DQ z metodo PCR- SSP

PCR-SSP je metoda, ki smo jo uporabili v primeru, ko s PCR-rSSO ne moremo določiti tipa *HLA* oziroma smo dobili dvoumen rezultat z večimi alelnimi kombinacijami. Volumen izhodiščne DNK je pri tej metodi večji in je odvisen od koncentracije DNK ter uporabljenega seta reagentov za tipizacijo oziroma subtipizacijo *HLA*.

3.2.5.1 Priprava mešanice PCR in pomnoževanje

3.2.5.1.1 Material

- vzorci DNK, ki smo jih izolirali z aparatom Geno-M6 ali EZ1
- komplet komercialnih reagentov (proizvajalca Olerup ali Biorad), ki vsebuje:
 - o mikroplošče z liofiliziranimi začetnimi nukleotidi za določen tip ali subtip *HLA* (npr. *HLA-B*, *HLA-B*50*)
 - o mešanico PCR (deoksiribonukleotidi – dNTP-ji, Mg^{2+} ioni, barvilo krezol red, glicerol ter reakcijski pufer)
- encim polimeraza Taq (Thermo Scientific)
- sterilna destilirana voda
- pipete in nastavki za pipete
- epruvete
- pokrivna folija PCR
- PCR aparat (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems)

3.2.5.1.2 Postopek

- v epruveto smo odpipetirali ustrezne količine reagentov (DNK, mešanico za PCR, vodo in polimerazo Taq), glede na število vdolbinic v setu, ki jih podaja preglednica VIII
- mešanico reagentov smo premešali na stresalniku in je po 10 μ l odpipetirali v vsako vdolbinico s sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi
- vdolbinice smo zatem pokrili s pokrivno folijo PCR ter preprečili izparevanje tekočin v aparatu PCR
- nato smo prenesli ploščo v aparat PCR, ki ima nameščen ustrezen temperaturni program, ki ga prikazuje preglednica IX (71)

Preglednica VIII: Priprava mešanice za PCR-SSP z reagenti Olerup SSP. (70)

Število reakcij v setu	Mešanica PCR (μ l)	V DNK (μ l)	V H_2O (μ l)	V Taq (μ l)
2	12	8	19,7	0,3
8	30	20	49,2	0,8
16	54	36	88,6	1,4
24	81	54	132,8	2,2
36	126	84	206,6	3,4
48	162	108	265,7	4,3
96	312	208	511,7	8,3

Preglednica IX: Temperaturni program metode PCR-SSP z reagenti Olerup SSP. (70)

Korak	Temperatura ($^{\circ}$ 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	neskončno	1

3.2.5.2 Preverjanje produktov pomnoževanja

3.2.5.2.1 Agarozna gelska elektroforeza

Postopek priprave gela je podrobneje razložen že pod točko 3.2.3.1. (67)

Material

- 2% agarozni gel
- elektroforezna kadička
- usmernik električnega toka
- dolžinski označevalec (Thermo Scientific)
- aparat Gene Flash za slikanje pod UV svetlobo
- pipeta ter nastavki za pipeto

Postopek

- odmerili smo po 10 μ l vseh produktov PCR iz vdolbinic ter prenesli v žepke agaroznega gela

- nato smo v žepek na koncu ali v sredini dali še 10 µl dolžinskega označevalca
- elektroforezo smo pustili teči 20 minut pri 180 V
- nazadnje smo fotografirali produkte PCR pod UV svetlobo v aparatu Gene Flash

V vsaki vdolbinici je poleg oligonukleotidnih začetnikov *HLA* še par oligonukleotidnih začetnikov izven regije HLA, katerih produkt PCR predstavlja pozitivno kontrolo (interno kontrolo), ki je dokaz za uspešno pomnoževanje. (12)

3.2.5.2.2 Kapilarna gelska elektroforeza z aparatom Qiaxcel

Podrobnejši postopek priprave aparata ter sama kapilarna elektroforeza sta že pod točko 3.2.3.2 ter točko 3.2.4.2.2.

Pri metodi PCR-SSP smo nanašali vse produkte PCR iz vseh vdolbinic in ne samo iz vrste A, kot pri PCR-rSSO. Vedeti moramo tudi, da ne smemo pustiti praznih vdolbinic ter smo morali zapolniti vse vdolbinice z dilucijskim reagentom, tudi tiste brez oligonukleotidnih začetnikov ter produktov. Prednost metode je v majhni porabi vzorca ter možnosti, da v primeru nejasnega rezultata, produkte PCR enostavno naneseemo še na agarozni gel ter slikamo pod UV lučjo.

Rezultate elektroforeze smo s pomočjo računalniškega programa aparata QIAxcel, obdelali in oblikovali sliko gela, katero smo uporabili oziroma vstavili v programe za interpretacijo rezultatov tipizacij (Score, Biorad).

3.2.5.3 Analiza produktov pomnoževanja in podajanje rezultatov

Sam dodatek dolžinskega označevalca nam je omogočal, da smo identificirali velikost produktov s pomočjo dolžine poti, ki jo je opravil. Interne kontrole v setih pa nam povedo, če je s testom vse v redu (prisotnost DNK, polimeraze Taq). Programi določenega proizvajalca reagentov (Helmberg Score™ Software – proizvajalca Olerup, Biorad SSP Typing Software – proizvajalca Biorad) pozitivne specifične produkte s pomočjo preglednic, ki vsebujejo možne alele *HLA*, ki jih par začetnih oligonukleotidov pomnožuje, obdelajo in prikažejo rezultat v obliki specifičnega gena ali alela *HLA* prisotnega v našem vzorcu.

3.2.6 Statistične metode

Veliko študij je dokazalo ali pa skušalo dokazati povezanost nekega opazovanega parametra z določeno boleznijo, s tem predvsem mislimo na večjo ali manjšo pogostost pojavljanja tega parametra znotraj skupine bolnikov, napram kontrolni skupini. Mi smo se osredotočili predvsem na porazdelitev gena *MICA* znotraj slovenske populacije, skupine bolnikov s CD ter skupine bolnikov s SB1 + CD hkrati, z namenom odkriti statistično značilne povezave alelov *MICA* s preiskovanimi boleznimi. Ravno zaradi takšnih študij so na CTT-ju, pred leti razvili računalniški program, ki te statistične analize omogoča.

3.2.6.1 Pogostost (frekvenca - f)

Pogostost alelov *MICA* ali *HLA* temelji na štetju oseb z določenim fenotipom (n), ne glede na to ali smo ga našli v homozigotni ali heterozigotni obliki. To število n smo delili s številom vseh oseb v vzorcu (N). (65)

$$f = \frac{n}{N}$$

f = frekvenca fenotipa

n = število oseb z določenim fenotipom

N = število oseb v skupini

3.2.6.2 Fisherjev eksaktni test in razmerje oboj

Rezultate tipizacij oziroma subtipizacij smo vnesli v CTT-jev program, ki deluje na osnovi kontingenčnih tabel 2x2, kot smo jo prikazali v preglednici X z vrednostmi a , b , c in d , katere prikazujejo število oseb, ki preiskovani alel imajo ali ga nimajo.

Preglednica X: Kontingenčna tabela 2x2.

Parameter (alel)	Bolniki s CD ali SB1+CD (število oseb)	Kontrolna skupina (število oseb)	Skupaj (število oseb)
Prisotnost alela	a	b	$a+b$
Odsotnost alela	c	d	$c+d$
Skupaj	$a+c$	$b+d$	$a+b+c+d$

Fisherjev eksaktni test (vrednost p) smo uporabili za izračun statistične povezanosti *HLA* in genskih različic *MICA* s pojavom bolezni celiakije ali celiakije pri sladkornih bolnikih tipa 1.

Vrednost p je računalniški program izračunal po naslednji formuli:

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

Kot mejo statistične povezanosti smo upoštevali $p=0,05$, kar pomeni, da je verjetnost, da je opažena povezanost naključna, manj kot 5%. Manjša kot je vrednost p, večja je verjetnost, da obstaja statistična značilnost povezave. (12, 18)

Razmerje obetov (OR angl.: odds ratio) nam pove, kolikšna je povezanost med boleznijo in prisotnostjo določenega alela in smo jo izračunali po formuli:

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

Vrednost 1 pomeni, da je določen gen ali alel enako pogosto prisoten tako pri bolnikih, kot v kontrolni skupini, vrednosti blizu nič nam nakazujejo manjše tveganje, oziroma zaščito pred pojavom bolezni. Vrednosti nad 1 pa večje tveganje za pojav bolezni ($OR=11,6$ pomeni, da so obeti za pojav bolezni 11,6 krat večji ob prisotnosti tega znaka). (72)

3.2.6.3 Določanje frekvenc genotipov s pomočjo Hardy-Weinbergovega ravnovesja

S statističnega vidika gre za ravnovesje med pričakovanimi in opazovanimi kombinacijami fenotipov oziroma genotipov. (65) Za izračun Hardy-Weinbergovega ravnovesja smo se poslužili programa Gene[RATE], ki uporablja algoritem maksimalizacije matematičnega upanja (EM.: angl. expectation maximization), metodo za izračun največjega verjetja. (73) Program je bil dostopen v sklopu študije COST BM0803 »HLA-NET«, v kateri je sodeloval Center za tipizacijo tkiv.

3.2.6.4 Stratifikacija

Zaradi vezavnega neravnovesja težko dokažemo, kateri od genov znotraj haplotipa doprinese k razvoju bolezni. Ker je funkcija molekul DQ2 ter DQ8 v razvoju celiakije znana, iz statističnega vidika pa štejemo povezavo CD z molekulama DQ2 ter DQ8 kot zanesljivo, smo s stratifikacijo želeli pokazati vpliv alelov *HLA* I. razreda, neodvisno od *HLA* II. razreda.

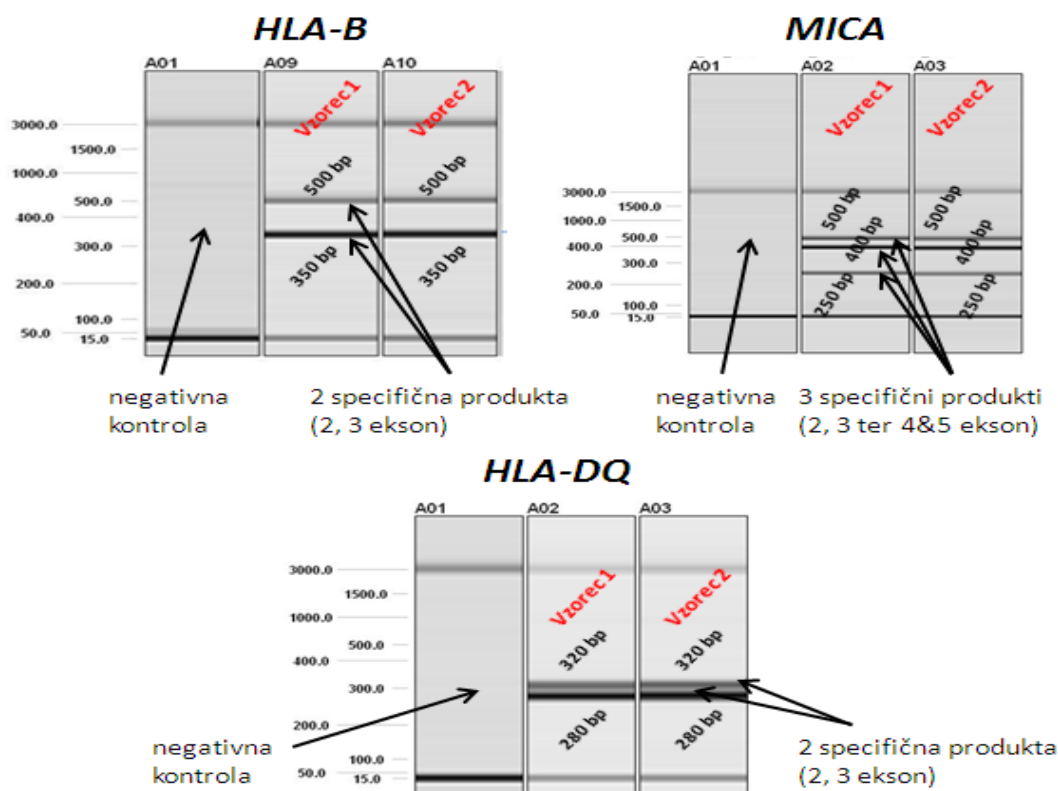
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VREDNOTENJE REZULTATOV

4.1.1 Vrednotenje rezultatov, dobljenih z metodo PCR-rSSO

4.1.1.1 Kontrola produktov pomnoževanja z elektroforezo

Pri elektroforezah *HLA-B* smo preverili gel in opazili dva specifična produkta eksonov 2 in 3, kot je prikazano na sliki 13. Močnejše viden produkt je običajno na dolžini 350 bp, šibkeje viden na dolžini 500 bp, dva produkta eksonov 2 in 3 smo videli tudi pri *HLA-DQ*, močnejši produkt je na dolžini 280 bp, šibkejši pa na dolžini 320 bp. Pri genu *MICA* smo videli tri produkte (dva produkta eksonov 2 in 3 ter skupni produkt eksonov 4 in 5), močnejše viden je produkt na dolžini 400 bp, šibkejša pa sta na dolžini 500 bp ter 250 bp.



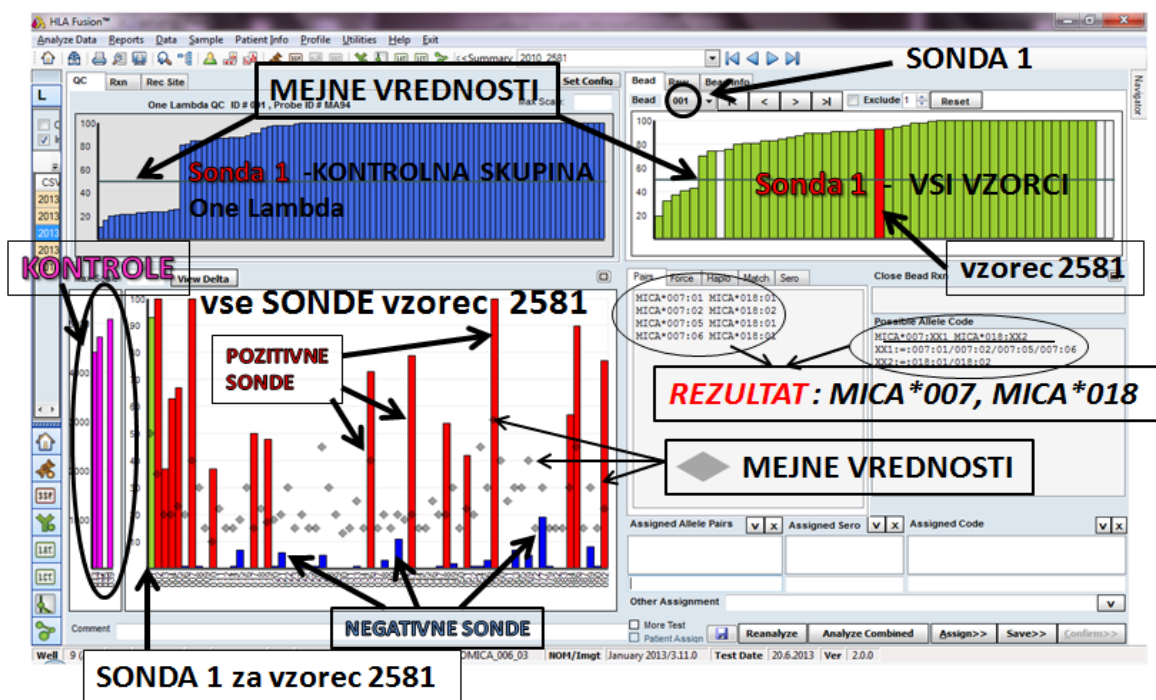
Slika 13: Slika gela kapilarne elektroforeze z aparatom QIAxcel.

Na zgornji sliki 13 smo prikazali prepoznavo produktov *HLA-B*, *HLA-DQ* ter *MICA* na gelu kapilarne elektroforeze aparata QIAxcel. V primeru, da smo produkte PCR nanesti na 2% agarozni gel in ga nato slikali pod UV lučko, produkti niso bili tako dobro vidni ter smo jim težje določili dolžino, čeprav nam je bil v pomoč dolžinski označevalec.

4.1.1.2 Analiza rezultatov PCR-rSSO s programom HLA Fusion

Preden smo začeli z analizo, smo preverili, če program vsebuje serijske številke testov, katere smo uporabili. V nasprotnem primeru smo jih morali uvoziti z internetne strani proizvajalca reagentov. Ko smo to storili, je sledil še uvoz meritev naših vzorcev in analiza. Ko je program zaključil z analizo in podal rezultate, smo le-te pogledali in preverili, če je bilo dovolj mikrokroglic, če so pozitivne kontrole MFI nad 1.000, če je negativna kontrola negativna, če so posamezne sonde močno pozitivne ter negativne, oziroma primerljive s sondami kontrolne skupine s strani proizvajalca (One Lambda QC).

Slika 14 prikazuje podajanje rezultatov programa HLA Fusion. Zgoraj levo modri stolpci prikazujejo meritve določene sonde (npr. sonda 1) za 96 vzorcev kontrolne skupine proizvajalca. Desno zgoraj zeleni stolpci, so meritve iste sonde in porazdeljitev vseh naših vzorcev, znotraj katerih je en stolpec obarvan rdeče. Meritve in rezultat tega imamo v grafu spodaj. Modre vodoravne črte v grafih zgoraj, ki opredeljujejo pozitivne in negativne sonde ter sivi štirikotniki spodaj levo, prikazujejo mejne vrednosti. Meritve posameznega vzorca so v grafu levo spodaj (npr. vzorec 2581), kjer so pozitivne sonde obarvane rdeče, negativne pa modro. Skrajno levo so z vijolično barvo označeni stolpci referenčnih sond, tako da služijo kot pozitivne in negativne kontrole.



Slika 14: Primer prikaza rezultata s programom HLA Fusion.

Program na podlagi preglednic s pozitivnimi in negativnimi sondami oziroma alelov, ki se na te sonde vežejo, poda rezultate tipizacij *MICA* ali *HLA*.

Primer takšne preglednice sond, lahko vidimo na sliki 15, slika 16 pa nam pove, kateri aleli *MICA* se lahko vežejo na sondo 1.

HLA Fusion™

Analyze Data Reports Data Sample Patient Info Profile Utilities Help Exit

QC Rn Rec Site Find Allele Rn Reset

Sample Rn	1	2	3	4	5	7	10	17	19	36	43	48	51	55	66	67	71	8	8	9	11	12	13	14	15
001	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*007:01	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*007:02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*007:05	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*007:06	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*018:01	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*018:02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*001	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*002:01	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*002:02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*002:03	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*002:04	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*004	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*005	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*006	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*007:03	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*007:04	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*008:01:01	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*008:01:02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*008:02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*008:03	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*008:04	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*008:05	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*009:01	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*009:02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*010:01	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
MICA*010:02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								

Max Scale View Delta

Comment More Test Patient Assign Reanalyze Analyze Combined Assign>> Save>> Confirm>>

Well 9 (A2) PID LID SID 20130613_RSSOMICA_006 CID RSSOMICA_006_03 NON/Imgt January 2013/3.11.0 Test Date 20.6.2013 Ver 2.0.0

Slika 15: Preglednica porazdelitve sond za posamezni vzorec, obkrožen je rezultat tipizacije in sonda 1.

Read ID #: 001 Rec Site: 292-----296

MICA*001, MICA*002:01, MICA*002:03, MICA*002:04, MICA*004, MICA*006, <u>MICA*007:01, MICA*007:03,</u> <u>MICA*007:04, MICA*007:05, MICA*007:06, MICA*008:01:02, MICA*009:01, MICA*009:02, MICA*010:01,</u> <u>MICA*010:02, MICA*011, MICA*012:01, MICA*015, MICA*016, MICA*017, MICA*018:01, MICA*018:02,</u> MICA*019, MICA*020, MICA*026, MICA*027, MICA*029, MICA*030, MICA*033, MICA*041, MICA*043, MICA*045, MICA*046, MICA*047, MICA*048, MICA*049, MICA*050, MICA*051, MICA*052, MICA*054, MICA*055, MICA*056, MICA*061, MICA*063N, MICA*064N, MICA*065, MICA*066, MICA*067, MICA*068, MICA*069, MICA*071, MICA*072, MICA*074, MICA*075
--

Slika 16: Prikaz sonde 1, ki nam pove, kateri aleli *MICA* se lahko vežejo na to sondo, podčrtani pa so tisti aleli *MICA* posameznega vzorca, ki se dejansko vežejo na sondo 1.

4.1.1.3 Rezultati zunanje kontrole kakovosti

Vpeljali smo metodo PCR-rSSO, s katero smo določili polimorfizem gena *MICA*. Preverili smo jo s pomočjo 40 kontrolnih vzorcev zunanje sheme zagotavljanja kakovosti rezultatov, ki jih organizira referenčni laboratorij HLA Svetovne zdravstvene organizacije, ki deluje znotraj Univerze v Kaliforniji. (75) Določili smo tip *MICA* 40 vzorcem ter prejeli Certifikate o uspešno opravljenem zunanjem preverjanju kakovosti, katere vidimo na sliki 17.

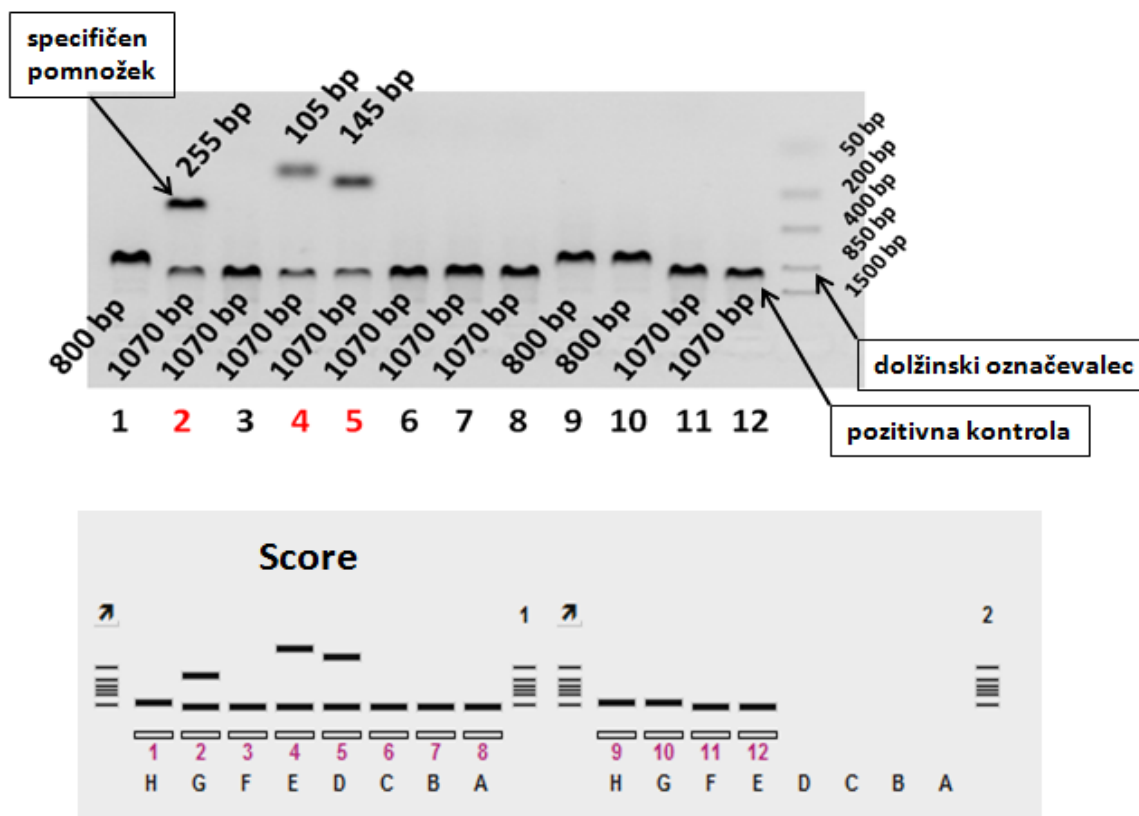


Slika 17: Certifikati o uspešno opravljenem zunanjem preverjanju kakovosti.

Ti rezultati kontrolnih testiranj alelov *MICA* so nam bili v pomoč tudi pri interpretaciji rezultatov naše študije, saj smo povzeli enoten način poročanja rezultatov.

4.1.2 Vrednotenje rezultatov PCR-SSP s programom Helmborg Score

Sliko gela, bodisi iz aparata QIAxcel, kapilarne elektroforeze, bodisi slikano pod UV lučjo aparata Gene Flash, smo pregledali ter vnesli pozitivne PCR produkte (specifične pomnožke), katerih dolžina ustreza predpisani, v program Score, vnesemo tudi odsotnost pozitivnih kontrol ter označimo, če je kakšen produkt slabše viden. Slika 18 prikazuje 12 vdolbinic agaroznega gela določene subtipizacije ter vnos rezultatov v program Score.



Slika 18: Vdolbinice 1-12 agaroznega gela za subtipizacijo skupine alelov HLA-B*50, 49K in vnos v Score. Subtipizacijo B*50 smo izvedli v primeru, ko smo z metodo PCR-rSSO dobili rezultat z alelnimi kombinacijami npr. B*40:19, B*50:01 ali B*40, B*49, kjer smo s PCR-SSP izključili B*50 ter prvo kombinacijo, zato smo lahko zaključili drugo kombinacijo z B*40 ter B*49.

Dolžine specifičnih produktov ter internih kontrol so določene s strani proizvajalca testa in smo jih ocenili s pomočjo dolžinskega označevalca.

Program ima vse pare oligonukleotidnih začetnikov ter alele, katere ti pomnožujejo zbrane v preglednicah, s pomočjo katerih izračuna in poda rezultat tipizacije HLA, ki ga lahko tudi ročno določimo na osnovi pozitivnih reakcij ter izključevanj alelov, kjer ni prisotnih specifičnih produktov PCR. Primer takšne preglednice XI je prikazan spodaj.

Preglednica XI: Interpretacijska tabela subtipizacije HLA-B*50, 49K, kjer so označene pozitivne reakcije ter rezultat tipizacije. (72)

Well No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
HLA-B allele ¹												
*50:01:01-50:01:02	1			4	5	6	7					
*50:02		2		4	5	6	7					
*50:04	1		3	4	5	6	7					
*50:05	1			4	5	6	7	8				
*50:06	1			4		6	7		9			
*50:07	1			4	5	6	7			10		
*50:08	1			4	5	6	7				11	
*50:09	1				5							12
*07:78, 54:20, 55:09	1			4			w					
*07:84, 08:09, 13:04, 13:35, 15:04, 15:16, 15:67, 15:83, 15:95, 15:155, 27:14, 35:37, 39:06:01-39:06:02, 39:33-39:34, 39:50, 39:57, 40:93, 40:96, 40:109-40:110, 41:05, 42:04, 49:04-49:05, 51:01:01-51:03, 51:05, 51:07:01-51:14, 51:16-51:22, 51:24:01-51:24:03, 51:26-51:41N, 51:43-51:44N, 51:48-51:55, 51:57-51:58, 51:60-51:61, 51:63, 51:65-51:69, 51:71-51:80, 51:82-51:96, 52:01:01-52:14, 52:16-52:21, 54:04, 54:11, 54:14-54:15, 55:13, 55:17, 55:20, 55:23, 55:27-55:28, 55:32, 56:05:01-56:06, 56:15, 56:21-56:22, 58:08, 59:02-59:03, 73:01-73:02, 78:01-78:07	1											
*13:01:01-13:01:05, 13:06-13:07N, 13:11-13:12, 13:17, 13:22:01-13:23, 13:25, 13:28-13:29, 13:36, 13:39, 15:86, 44:10, 56:02, 56:10						6						
*13:02:01-13:03, 13:08Q-13:09, 13:14-13:15, 13:19, 13:27, 13:30, 13:32-13:34, 13:37-13:38, 35:60, 46:11, 46:18, 49:01:02, 51:15, 54:01-54:03, 54:05N, 54:07-54:08N, 54:12-54:13, 54:17-54:19, 54:21-54:23, 55:02:01-55:02:06, 55:07, 55:10, 55:12, 55:16, 55:18-55:19, 55:22, 55:26, 55:30, 55:34-55:35, 55:41, 55:43, 56:01:01-56:01:04, 56:07-56:08, 56:14, 56:16-56:17, 56:19N-56:20, 56:23-56:24, 56:26-56:29, 59:01, 59:04-59:05	1			4		6						
*13:16, 15:42, 55:01:01-55:01:06, 55:03, 55:05, 55:11, 55:15, 55:24-55:25, 55:29, 55:31, 55:33, 55:36, 55:38, 55:40, 56:25	1			4		6	w					
*13:18, 13:31, 54:10, 54:16, 55:21, 55:37, 56:13	1			4								
*13:20						6	w					
*15:18:03, 15:73, C*03:12, C*03:19, C*15:26			3									
*15:46, 15:53, 15:106, 15:143, 18:48, 35:19, 35:47, 35:63, 40:01:01-40:05, 40:07-40:11:02, 40:14:01-40:16, 40:18, 40:20, 40:22N-40:40, 40:42-40:43, 40:45, 40:49-40:52, 40:54-40:69, 40:72:01-40:74, 40:77-40:82, 40:84-40:85, 40:87-40:92, 40:94, 40:97-40:102, 40:104-40:108, 40:111-40:116, 40:118N-40:126, 40:128-40:130, 40:132-40:136, 40:138-40:147, 41:02:01-41:04, 41:08, 41:10-41:11, 44:09, 44:46, 44:75, 44:90, 47:02					5							
*15:137	1											12
*39:17, 56:04			3			6						
*40:06:01:01-40:06:03, 40:44, 40:53, 40:70, 40:75, 40:86, 40:95, 40:103, 40:127, 40:131, 41:01, 41:06-41:07, 41:09, 41:12	1				5							
*40:48, 40:71			3		5	6						
*40:83	1				5					10		
*44:07										10		
*44:15, 44:18		2		4								
*44:20, 44:47, 44:100, 51:23, 52:15		2										
*45:01, 45:03, 45:05-45:07, 45:11-45:12		2		4	5							
*45:02		2			5							12
*45:04, 45:08, 45:10	1			4	5							
*45:09		2			5							
*47:03					w							
*49:01:01, 49:02-49:03, 49:06-49:10	1			4		6	7					
*51:62			3			6	w					
*53:07, C*04:08, C*04:34, C*05:27, C*05:39, C*17:07												12
*55:39, 55:42	1					6						
Length of spec. PCR product	255	255	80	105	145	160	150	135	150	90	280	180
Well No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Specific Reaction												
1st match: B*												
2nd match: B*												
Control Reaction												
Failed Controls												
False Positive												
False Negative												

4.1.3 Statistična analiza populacijsko genetskih parametrov znotraj kontrolne skupine

Frekvence genetskih parametrov smo dobili s štetjem oseb z določenim fenotipom, ne glede na to ali smo ga našli v homozigotni ali heterozigotni obliki. (65) Genske frekvence smo pa izračunali s pomočjo programa Gene[rate], kjer se pri homozigotih alel upošteva dvakrat. (74) V pomoč pri analizi so nam bili tudi izsledki predhodne študije, ki je potekala v Centru za tipizacijo tkiv in je obsegala 70 vzorcev kontrolne skupine ter pregledni članki ostalih populacijskih raziskav polimorfizma gena *MICA* drugje po Evropi in po svetu.

4.1.3.1 Zaznane genske različice *MICA*

V vzorcu 130 oseb slovenske populacije smo zaznali 17 različnih genskih različic *MICA*, zajeten delež 61,54% pripada *MICA**008, sledita mu *MICA**002 z 32,31% ter *MICA**009 z 20%. Ostali aleli se znotraj populacije Slovencev porazdeljujejo v odstotkih med 0 in 13,85%, kot nam tudi prikazuje preglednica XII.

Preglednica XII: Preglednica A: fenotipske frekvence *MICA*, preglednica B: genske frekvence *MICA*.

Genske različice	Kontrolna skupina (K) N=130 f(%)
<i>MICA</i> *008	61,54
<i>MICA</i> *002	32,31
<i>MICA</i> *009	20,00
<i>MICA</i> *018	13,85
<i>MICA</i> *007	13,08
<i>MICA</i> *004	10,00
<i>MICA</i> *010	6,15
<i>MICA</i> *017	6,15
<i>MICA</i> *012	5,38
<i>MICA</i> *027	4,62
<i>MICA</i> *016	3,85
<i>MICA</i> *006	2,31
<i>MICA</i> *011	2,31
<i>MICA</i> *001	1,54
<i>MICA</i> *005	1,54
<i>MICA</i> *019	0,77
<i>MICA</i> *026	0,77

A: Fenotipske frekvence

f(%) – pogostost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb

Genske različice	Kontrolna skupina (K) N=130 f(%)
<i>MICA</i> *008	36,15
<i>MICA</i> *002	17,31
<i>MICA</i> *009	10,38
<i>MICA</i> *018	6,92
<i>MICA</i> *007	6,54
<i>MICA</i> *004	5,00
<i>MICA</i> *017	3,08
<i>MICA</i> *010	3,08
<i>MICA</i> *012	2,69
<i>MICA</i> *027	2,31
<i>MICA</i> *016	1,92
<i>MICA</i> *006	1,15
<i>MICA</i> *011	1,15
<i>MICA</i> *001	0,77
<i>MICA</i> *005	0,77
<i>MICA</i> *019	0,38
<i>MICA</i> *026	0,38

B: Genske frekvence

Najpogostejši alel *MICA*, znotraj kontrolne skupine Slovencev je *MICA*008* (61,54%), ki se pojavlja v višjem odstotku, kot v skupini Američanov evropskega izvora (55%), ki smo jo zasledili v literaturi ter v nižjem odstotku, če jo primerjamo z drugo skupino ameriških državljanov, ki ravno tako izvirajo iz Evrope (66,9%) ter populacijo iz Velike Britanije (74,0%). (37, 76, 77) Porazdelitev ostalih alelov *MICA* je primerljiva s podatki iz literature razen odstopanja alela *MICA*018*, ki je prisoten kar pri 13,85% Slovencev in ima visoko frekvenco pojavljanja v primerjavi s populacijami iz Amerike (3,9%), Španije (2,5%), Brazilije (3,9%) ter Velike Britanije (0%). (78, 79, 80, 81)

4.1.3.2 Zaznane alelne skupine HLA-B

Preglednica XIII: Preglednica A: fenotipske frekvence HLA-B, preglednica B: genske frekvence HLA-B.

Skupina alelov	Kontrolna skupina (K) N=130 f(%)
B*07	24,62
B*35	23,08
B*44	18,46
B*18	15,38
B*08	14,62
B*51	14,62
B*27	12,31
B*38	9,23
B*40	9,23
B*13	6,92
B*15	6,92
B*57	6,92
B*55	5,38
B*39	3,85
B*49	3,85
B*37	3,08
B*50	3,08
B*53	3,08
B*58	3,08
B*14	2,31
B*41	1,54
B*52	1,54
B*56	0,77

A: Fenotipske frekvence

f(%) – pogostost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb

Skupina alelov	Kontrolna skupina (K) N=130 f(%)
B*07	13,85
B*35	11,92
B*44	10,38
B*18	7,69
B*08	7,31
B*51	7,31
B*27	6,15
B*40	4,62
B*38	4,62
B*57	3,46
B*13	3,46
B*15	3,46
B*55	2,69
B*49	1,92
B*39	1,92
B*53	1,54
B*37	1,54
B*58	1,54
B*50	1,54
B*14	1,15
B*52	0,77
B*41	0,77
B*56	0,38

B: Genske frekvence

V vzorcu 130 oseb slovenskega porekla smo zaznali 23 različnih alelnih skupin lokusa *HLA-B*, od tega največji delež pripada *B*07* z 24,62%, ki mu sledita *B*35* z 23,08% ter *B*44* z 18,46%, kot vidimo v preglednici XIII. Frekvenca nad 10% pripada še *B*18* s 15,38%, *B*08* in *B*51* z deležema 14,62% ter *B*27* z 12,31%. Ostali *HLA-B* pa se znotraj populacije Slovencev porazdeljujejo v odstotkih med 0 in 10%, kjer najmanjši delež 0,77% pripada alelu *B*56*.

4.1.3.3 Najpogostejši zaznani haplotipi *B~MICA*

V preglednici XIV, smo predstavili najpogostejše haplotipe *B~MICA*, katere najdemo pri 130 predstavnikov slovenskega porekla, z deležem nad 1% pa tja do 25%.

Preglednica XIV: Deleži najpogostejših dvo-lokusnih haplotipov B~MICA pri predstavnikih slovenske populacije. Leva preglednica: fenotipske frekvence HLA-B~MICA, desna preglednica: genske frekvence HLA-B~MICA.

<i>Haplotip B~MICA</i>	<i>Kontrolna skupina (K)</i> <i>N=130</i> <i>f(%)</i>	<i>Haplotip B ~MICA</i>	<i>Kontrolna skupina (K)</i> <i>N=130</i> <i>f(%)</i>
<i>B*07~MICA*008</i>	24,62	<i>B*37~MICA*008</i>	3,08
<i>B*08~MICA*008</i>	14,62	<i>B*57~MICA*008</i>	3,08
<i>B*35~MICA*002</i>	14,62	<i>B*07~MICA*009</i>	3,08
<i>B*44~MICA*008</i>	12,31	<i>B*27~MICA*009</i>	3,08
<i>B*18~MICA*018</i>	12,31	<i>B*50~MICA*009</i>	3,08
<i>B*27~MICA*007</i>	11,54	<i>B*44~MICA*018</i>	3,08
<i>B*51~MICA*009</i>	10,77	<i>B*53~MICA*002</i>	3,08
<i>B*38~MICA*002</i>	9,24	<i>B*58~MICA*002</i>	3,08
<i>B*51~MICA*008</i>	8,46	<i>B*51~MICA*006</i>	2,31
<i>B*18~MICA*008</i>	7,69	<i>B*39~MICA*008</i>	2,31
<i>B*35~MICA*008</i>	7,69	<i>B*40~MICA*009</i>	2,31
<i>B*35~MICA*009</i>	6,92	<i>B*44~MICA*009</i>	2,31
<i>B*13~MICA*008</i>	6,15	<i>B*41~MICA*004</i>	1,54
<i>B*38~MICA*008</i>	6,15	<i>B*15~MICA*008</i>	1,54
<i>B*40~MICA*008</i>	6,15	<i>B*41~MICA*008</i>	1,54
<i>B*44~MICA*004</i>	5,38	<i>B*53~MICA*008</i>	1,54
<i>B*57~MICA*017</i>	5,28	<i>B*58~MICA*008</i>	1,54
<i>B*55~MICA*008</i>	4,62	<i>B*08~MICA*009</i>	1,54
<i>B*55~MICA*012</i>	4,62	<i>B*18~MICA*009</i>	1,54
<i>B*49~MICA*004</i>	3,85	<i>B*37~MICA*009</i>	1,54
<i>B*27~MICA*008</i>	3,85	<i>B*52~MICA*009</i>	1,54
<i>B*07~MICA*018</i>	3,85	<i>B*50~MICA*018</i>	1,54
<i>B*35~MICA*016</i>	3,85	<i>B*51~MICA*018</i>	1,54
<i>B*39~MICA*002</i>	3,85	<i>B*44~MICA*005</i>	1,54
<i>B*40~MICA*027</i>	3,70		

Prevladuje haplotip *B*07~MICA*008* s 24,62%, kateremu sledita *B*08~MICA*008* ter *B*35~MICA*002* z 14,62%, nato sta *B*44~MICA*008* ter *B*18~MICA*018*, ki se

pojavljata v odstotku 12,31%. Frekvenco nad 10% imata še haplotipa *B*27~MICA*007* ter *B*51~MICA*009*. Ostali haplotipi kot so *B*38~MICA*002*, *B*51~MICA*008*, *B*18~MICA*008*, *B*35~MICA*008*, *B*35~MICA*009*, *B*13~MICA*008*, *B*38~MICA*008*, *B*40~MICA*008*, *B*44~MICA*004* ter *B*57~MICA*017* zajemajo deleže od 9,24% pa do 5,28%. Odstotki ostalih haplotipov, ki še sledijo so nižji od 4,42% (*B*55~MICA*008*) ter višji od 1,54% (*B*44~MICA*005*).

Aleli *MICA* (*MICA*008*, *MICA*009*) z visoko pogostostjo pojavljanja v evropskih populacijah, so v vezavnih neravnovesjih z več različnimi alelnimi skupinami lokusa *HLA-B*, ta je namreč njihov najbližji gen na kromosomu 6. Alel *MICA*008* ima tudi znotraj slovenske populacije, daleč največje število vezavnih neravnovesij, saj je povezan kar z 18 različnimi alelnimi skupinami lokusa *HLA-B*, če omejimo pogostost pojavljanja haplotipov *B~MICA* na 1% in več. Najmočnejše vezavno neravnovesje je v haplotipu *B*07~MICA*008*, ki se pojavlja v 24,62%, sledita mu *B*08~MICA*008* s 14,62% ter *B*44~MICA*008* z 12,31%. Sledita alela, ki imata tudi več vezavnih neravnovesij, *MICA*009*, tega največkrat najdemo v haplotipu z *B*51* (10,77%) in z *B*35* (6,92%) ter *MICA*018*. Zanimivo je, da smo ravno alel *MICA*018*, ki je v naši populaciji bolj zastopan kot drugod, našli v kombinaciji s kar štirimi alelnimi skupinami *HLA-B* (*B*18*, *B*07*, *B*50*, in *B*51*), medtem ko se drugje pojavlja samo v kombinaciji z *B*18*. (78, 79, 80)

4.1.4 Primerjava genetskih parametrov znotraj opazovanih skupin (K, CD in SB1+CD)

Osredotočili smo se predvsem na porazdelitev genetskih parametrov znotraj slovenske populacije, skupine bolnikov s CD ter skupine bolnikov s SB1 + CD hkrati, z namenom odkriti statistično značilne povezave teh parametrov s preiskovanimi boleznimi. V ta namen smo uporabili Fisherjev eksaktni test (vrednost p) ter razmerje obetov (OR). Kot mejo statistične povezanosti smo upoštevali $p=0,05$, kar pomeni, da je verjetnost, da je opažena povezanost naključna, manj kot 5%. Manjša kot je vrednost p, večja je verjetnost, da obstaja statistična značilnost povezave. (12, 18) V nadaljnji statistični postopek stratifikacije smo vzeli tiste genetske predstavnike, ki imajo vrednost p manjšo kot 0,05. Vrednost $OR=1$ pomeni, da je določen gen ali alel enako pogosto prisoten tako pri bolnikih, kot v kontrolni skupini, vrednosti blizu nič nam nakazujejo manjše tveganje,

oziroma zaščito pred pojavom bolezni. Vrednosti nad 1 pa večje tveganje za pojav bolezni. (72)

4.1.4.1 Primerjava zaznanih genskih različ *MICA* v preiskovanih skupinah

Medtem, ko smo pri slovenski populaciji zaznali 17 genskih različ *MICA*, smo jih pri bolnikih s CD, zaznali le 13, pri bolnikih s SB1+CD pa 16. S preglednico XV smo želeli prikazati porazdelitev alelov *MICA* znotraj vseh treh preiskovanih skupin.

Preglednica XV: Genske različice MICA, zaznane pri kontrolni skupini, bolnikih s CD in bolnikih s SB1+CD, njihova pogostost pojavljanja ter vrednosti p in OR za kombinacije skupin CD vs K, SB1+CD vs K ter SB1+CD vs CD.

Alel	K N=130 f (%)	CD N=68 f (%)	SB1+CD N=69 f (%)	CD vs K		SB1+CD vs K		SB1+CD vs CD	
				p	OR	P	OR	p	OR
<i>MICA*001</i>	1,54	0,00	2,90	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*002</i>	32,31	19,12	26,09	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*004</i>	10,00	13,24	10,14	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*005</i>	1,54	0,00	1,45	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*006</i>	2,31	2,94	2,90	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*007</i>	13,08	10,29	2,90	NS	NS	0,02	0,20	NS	NS
<i>MICA*008</i>	61,54	80,88	85,51	$6,21 \times 10^{-3}$	2,63	$3,61 \times 10^{-4}$	3,69	NS	NS
<i>MICA*009</i>	20,00	23,53	17,39	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*010</i>	6,15	5,88	1,45	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*011</i>	2,31	2,94	2,90	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*012</i>	5,38	1,47	5,80	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*016</i>	3,85	1,47	4,35	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*017</i>	6,15	2,94	1,45	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*018</i>	13,85	0,00	5,80	$4,34 \times 10^{-4}$	0,04	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*019</i>	0,77	1,47	4,35	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*026</i>	0,77	0,00	0,00	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MICA*027</i>	4,62	2,94	2,90	NS	NS	NS	NS	NS	NS

K – kontrolna skupina; CD – bolniki s celiakijo; SB1+CD – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in celiakijo; f(%) – pogostost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb; p – vrednost p; OR – razmerje obetov.

*MICA*018* ne najdemo pri bolnikih s celiakijo, pri bolnikih z obema boleznima je prisoten samo v 5,80%, medtem ko se v kontrolni skupini nahaja visoko na četrtem mestu pogostosti pojavljanja. *MICA*008* prednjači pri bolnikih (80,88% pri CD in 85,51% pri SB1+CD), medtem ko se pri zdravih pojavlja v 61,54%. *MICA*007* najdemo v manjšem deležu pri bolnikih z obema boleznima (2,90%) v primerjavi s K (13,08%) ter CD (10,29%).

S primerjavo alelov gena *MICA* znotraj preiskovanih skupin, smo ugotovili, da razlike v frekvencah ter vrednost *p* manjšo kot 0,05, opazimo pri alelih: *MICA*007*, *MICA*008* ter *MICA*018*, katere smo tudi vzeli v nadaljnje statistične analize.

4.1.4.2 Primerjava zaznanih alelnih skupin *HLA-B* v preiskovanih skupinah

Pri slovenski populaciji smo zaznali 23 alelnih skupin *HLA-B*, pri bolnikih s CD 17, pri bolnikih s SB1+CD pa 20, kot nam prikazuje preglednica XVI.

Preglednica XVI: Alelne skupine lokusa HLA-B, zaznane pri kontrolni skupini, bolnikih s CD in bolnikih s SB1+CD, njihova pogostost pojavljanja ter vrednosti p in OR za kombinacije skupin CD vs K, SB1+CD vs K ter SB1+CD vs CD.

Skupina alelov	K N=130 f (%)	CD N=68 f (%)	SB1+CD N=69 f (%)	CD vs K		SB1+CD vs K		SB1+CD vs CD	
				p	OR	P	OR	p	OR
<i>B*07</i>	24,62	22,06	4,35	NS	NS	$1,71 \times 10^{-4}$	0,14	$2,26 \times 10^{-3}$	0,16
<i>B*08</i>	14,62	55,88	75,36	$2,60 \times 10^{-9}$	7,14	$2,03 \times 10^{-17}$	17,87	0,02	2,41
<i>B*13</i>	6,92	11,76	7,25	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*14</i>	2,31	4,41	2,90	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*15</i>	6,92	5,88	4,35	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*18</i>	15,38	0,00	13,04	$2,39 \times 10^{-4}$	0,04	NS	NS	$2,96 \times 10^{-3}$	0,05
<i>B*27</i>	12,31	8,82	2,90	NS	NS	0,04	0,21	NS	NS
<i>B*35</i>	23,08	13,24	15,94	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*37</i>	3,08	0,00	0,00	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*38</i>	9,23	5,88	4,35	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*39</i>	3,85	2,94	4,35	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*40</i>	9,23	7,35	1,45	NS	NS	0,04	0,14	NS	NS
<i>B*41</i>	1,54	5,88	1,45	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*44</i>	18,46	13,24	10,14	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*45</i>	0,00	1,47	0,00	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*49</i>	3,85	0,00	5,80	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*50</i>	3,08	5,88	10,14	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*51</i>	14,62	19,12	11,59	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*52</i>	1,54	0,00	0,00	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*53</i>	3,08	0,00	0,00	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*55</i>	5,38	0,00	4,35	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*56</i>	0,77	4,41	2,90	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*57</i>	6,92	2,94	1,45	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B*58</i>	3,08	0,00	2,90	NS	NS	NS	NS	NS	NS

K – kontrolna skupina; CD – bolniki s celiakijo; SB1+CD – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in celiakijo; f(%) – pogostost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb; p – vrednost p; OR – razmerje obetov.

Delež HLA-B*08 je v obeh skupinah bolnikov s CD (55,88%) ter s SB1+CD (75,36%) precej višji kot v kontrolni skupini (14,62%). Razlike opazimo tudi v porazdelitvi HLA-B*07, katerega je najmanj v skupini bolnikov z obema boleznima (4,23%), medtem ko je delež le-tega pri bolnikih s CD 22,06%, pri kontrolni skupini pa 24,62%. Pri bolnikih s celiakijo ne najdemo B*18, pri bolnikih z obema boleznima je prisoten v odstotku 13,04%, v kontrolni skupini pa se nahaja visoko na šestem mestu pogostosti pojavljanja s frekvenco 15,38%.

S primerjavo skupin alelov lokusa *HLA-B* znotraj preiskovanih skupin, smo ugotovili, da razlike v frekvencah ter vrednost *p* manjšo kot 0,05, opazimo predvsem znotraj alelnih skupin: *B*07*, *B*08*, *B*18*, *B*27* ter *B*40*, katere smo tudi vzeli v nadaljnje statistične postopke.

4.1.4.3 Primerjava haplotipov *HLA-B~MICA*, ki se med seboj signifikantno razlikujejo v preiskovanih skupinah

V preglednici XVII smo predstavili haplotipe *HLA-B~MICA*, ki se znotraj treh preiskovanih skupin statistično značilno razlikujejo in je njihova vrednost *p* manjša od vrednosti 0,05. Te haplotipe smo zatem vključili v statistični postopek stratifikacije, kjer smo poskušali izključiti vpliv genov *HLA-DQ2*.

Preglednica XVII: Haplotipi HLA-B~MICA, ki se statistično značilno razlikujejo znotraj kontrolne skupine, bolnikov s CD in bolnikov s SB1+CD, njihova pogostost pojavljanja ter vrednosti p in OR za kombinacije skupin CD vs K, SB1+CD vs K ter SB1+CD vs CD.

Haplotip <i>B~MICA</i>	K N=130 <i>f</i> (%)	CD N=68 <i>f</i> (%)	SB1+CD N=69 <i>f</i> (%)	CD vs K		SB1+CD vs K		SB1+CD vs CD	
				<i>p</i>	OR	<i>P</i>	OR	<i>p</i>	OR
<i>B*07~MICA*008</i>	24,62	22,06	4,35	NS	NS	$1,71 \times 10^{-4}$	0,14	$2,26 \times 10^{-3}$	0,16
<i>B*08~MICA*004</i>	0,00	5,88	4,35	0,01	18,18	0,04	13,74	NS	NS
<i>B*08~MICA*008</i>	14,62	55,88	72,46	$2,60 \times 10^{-9}$	7,14	$4,30 \times 10^{-16}$	15,37	NS	NS
<i>B*08~MICA*009</i>	1,54	13,24	11,59	$1,31 \times 10^{-3}$	10,00	$3,65 \times 10^{-3}$	8,39	NS	NS
<i>B*18~MICA*008</i>	7,69	0,00	8,70	0,02	0,08	NS	NS	0,03	0,07
<i>B*18~MICA*018</i>	12,31	0,00	5,80	$1,51 \times 10^{-3}$	0,05	NS	NS	NS	NS
<i>B*35~MICA*009</i>	6,92	2,94	0,00	NS	NS	0,03	0,09	NS	NS
<i>B*50~MICA*008</i>	0,00	4,41	8,70	0,04	13,89	$1,50 \times 10^{-3}$	1,92	NS	NS

K – kontrolna skupina; CD – bolniki s celiakijo; SB1+CD – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in celiakijo; f(%) – pogostost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb; p – vrednost p; OR – razmerje obetov; NS – razlika ni statistično značilna

Razlike v frekvencah znotraj vseh treh preiskovanih skupin, opazimo pri haplotipih *B~MICA*, predvsem kadar so v haplotipu prisotni *B*08*, *B*18*, *MICA*008* ter *MICA*018*.

4.1.5 Aleli *DQB1* in *DQA1*, povezani z zvišanim ali znižanim tveganjem za razvoj bolezni CD in SB1+CD

V spodnji preglednici XVIII smo želeli potrditi že znane povezave CD ali CD v kombinaciji s SB1, z aleli II. razreda *HLA-DQ*. (82, 83, 84) Tudi tokrat smo uporabili Fisherjev eksaktni test (vrednost *p*) ter razmerje obetov (OR). Kot mejo statistične povezanosti smo upoštevali *p*=0,05, manjša kot je vrednost *p*, večja je verjetnost, da obstaja statistična značilnost povezave. (12, 18)

Preglednica XVIII: Genske različice DQB1 ter DQA1, ki so povezane s povišanim ali znižanim tveganjem za razvoj CD ali SB1+CD. Z rdečo barvo so označeni aleli, ki kodirajo molekulo DQ2, z modro barvo pa so označeni aleli, ki kodirajo molekulo DQ8.

Alel	K	CD	SB1+CD	CD vs K		SB1+CD vs K		SB1+CD vs CD	
	N=130 <i>f</i> (%)	N=68 <i>f</i> (%)	N=69 <i>f</i> (%)	<i>p</i>	OR	<i>P</i>	OR	<i>p</i>	OR
<i>DQA1*01:01</i>	30,00	7,35	10,14	2,44x10 ⁻⁴	0,19	1,39x10 ⁻³	0,26	NS	NS
<i>DQA1*01:02</i>	43,85	14,71	15,94	3,21x10 ⁻⁵	0,22	7,32x10 ⁻⁵	0,24	NS	NS
<i>DQA1*01:03</i>	12,31	2,94	2,90	0,04	0,22	0,04	0,21	NS	NS
<i>DQA1*01:04</i>	10,00	7,35	0,00	NS	NS	4,84x10 ⁻³	0,06	0,03	0,08
<i>DQA1*02:01</i>	20,00	25,00	8,70	NS	NS	0,04	0,38	0,01	0,29
<i>DQA1*03:01</i>	12,31	11,76	33,33	NS	NS	6,30x10 ⁻⁴	3,56	3,83x10 ⁻³	3,75
<i>DQA1*03:03</i>	0,77	2,94	7,25	NS	NS	0,02	10,08	NS	NS
<i>DQA1*05:01</i>	37,69	83,82	86,96	3,00x10 ⁻¹⁰	8,33	1,20x10 ⁻¹¹	11,02	NS	NS
<i>DQA1*05:05</i>	10,00	23,53	4,35	0,02	2,78	0,27	0,41	1,17x10 ⁻³	0,15
<i>DQB1*02:01</i>	22,31	83,82	86,96	3,82x10 ⁻¹⁷	16,67	3,10x10 ⁻¹⁹	23,22	NS	NS
<i>DQB1*02:02</i>	13,85	25,00	8,70	NS	NS	NS	NS	0,01	0,29
<i>DQB1*03:01</i>	32,31	23,53	5,80	NS	NS	1,35x10 ⁻⁵	0,13	3,62x10 ⁻³	0,20
<i>DQB1*03:02</i>	12,31	10,29	37,68	NS	NS	5,11x10 ⁻⁵	4,31	2,48x10 ⁻⁴	5,27
<i>DQB1*03:03</i>	6,92	4,41	0,00	NS	NS	0,03	0,09	NS	NS
<i>DQB1*05:01</i>	30,77	8,82	8,70	3,64x10 ⁻⁴	0,22	3,48x10 ⁻⁴	0,21	NS	NS
<i>DQB1*05:02</i>	16,15	2,94	8,70	4,72x10 ⁻³	0,16	NS	NS	NS	NS
<i>DQB1*06:02</i>	19,23	11,76	0,00	NS	NS	1,76x10 ⁻⁵	0,03	2,96x10 ⁻³	19,60
<i>DQB1*06:03</i>	14,62	2,94	1,45	0,01	0,18	2,31x10 ⁻³	0,09	NS	NS

*K – kontrolna skupina; CD – bolniki s celiakijo; SB1+CD – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in celiakijo; *f*(%) – pogostost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb; *p* – vrednost *p*; OR – razmerje obetov; NS – razlika ni statistično značilna*

Tako tudi v slovenski populaciji, pozitivno povezavo oziroma zvišano tveganje za pojav CD predstavljata alela *DQA1*05:01* (*p*=3,00x10⁻¹⁰; OR=8,33), in *DQB1*02:01*

($p=3,82 \times 10^{-17}$; OR=16,67), ki kodirata molekulo DQ2, zvišano tveganje za pojav obeh bolezni (SB1+CD) pa alela *DQA1*03:01* ($p=6,30 \times 10^{-4}$; OR=3,56) in *DQB1*03:02* ($p=5,11 \times 10^{-5}$; OR=4,31), ki kodirata molekulo DQ8 ter alela *DQA1*05:01* ($p=1,20 \times 10^{-11}$; OR=11,02) in *DQB1*02:01* ($p=3,10 \times 10^{-19}$; OR=23,22), ki kodirata molekulo DQ2.

4.1.6 Stratifikacija na *DQA1*05:01-DQB1*02:01* in dokaz vpliva genetskih parametrov na pojav bolezni CD ali SB1+CD

Zaradi vezavnega neravnovesja težko dokažemo, kateri od genov (*HLA-B*, *MICA* ali *DQ*) znotraj haplotipa doprinese k razvoju bolezni. Funkcija molekul DQ2 ter DQ8 je v razvoju celiakije znana. S statističnega vidika pa povezavo CD z molekulama DQ2 ter DQ8 štejemo kot zanesljivo, smo s stratifikacijo na DQ2 želeli izključiti vpliv te molekule.

4.1.6.1 Stratifikacija na *DQA1*05:01-DQB1*02:01* in dokaz vpliva alelov *MICA* na pojav bolezni CD ali SB1+CD

S stratifikacijo smo želeli pokazati vpliv alelov *MICA*, neodvisno od *HLA* II. razreda, na razvoj celiakije kot same bolezni ali pa v kombinaciji s SB1, vendar nismo našli statistično signifikantne povezave med aleli *MICA* in preiskovanimi boleznimi. V literaturi smo zasledili, da sta Bolognesi ter Karell v študiji finskih in italijanskih družin s CD, prikazala neodvisno vlogo *MICA*008* kot samostojnega faktorja tveganja za razvoj CD. (52) V prvi študiji smo tudi mi dokazali pozitivno povezavo alela *MICA*008* in *B*08* v skupini bolnikov z obema boleznima v primerjavi s skupino sladkornih bolnikov tipa 1, ki jo tokrat nismo vključili v raziskavo. Za nadaljnje delo bi bilo smotno v raziskavo dodati še prvotno skupino bolnikov s SB1 (67 oseb) ter ponovno izvesti postopke stratifikacije, na ta način bi ugotovili, kako lahko povečanje skupin (K ter SB1+CD) vpliva na značilnost povezav alelov *MHC* I. (*HLA-B*, *MICA*) in II. razreda (*HLA-DQ*) znotraj vseh štirih preiskovanih skupin.

4.1.6.2 Stratifikacija na *DQA1*05:01-DQB1*02:01* in dokaz vpliva alelne skupine *HLA-B* na pojav bolezni CD ali SB1+CD

S stratifikacijo smo želeli pokazati vpliv alelne skupine *HLA-B* neodvisno od *HLA* II. razreda, na razvoj celiakije kot same bolezni ali pa v kombinaciji s SB1, kot nam prikazuje tabela XIX.

Preglednica XIX: Prikazuje vpliv alelne skupine lokusa HLA-B na pojav CD ter SB1+CD po stratifikaciji na DQA1*05:01- DQB1*02:01.

Skupina alelov	K	CD	SB1+CD	CD vs K		SB1+CD vs K		SB1+CD vs CD	
	N=130	N=68	N=69	p	OR	P	OR	p	OR
	f(%)	f(%)	f(%)						
B*08	62,07	66,67	83,33	NS	NS	0,03	3,06	NS	NS
B*18	10,34	0,00	11,67	0,04	0,07	NS	NS	0,01	0,06

K – kontrolna skupina; CD – bolniki s celiakijo; SB1+CD – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in celiakijo; f(%) – pogostost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb; p – vrednost p; OR – razmerje obetov; NS – razlika ni statistično značilna

Statistično značilen rizični vpliv ima *HLA-B*08* ($p=0,03$; $OR=3,06$), na razvoj obeh bolezni. Odsotnost *HLA-B*18* v skupini bolnikov s celiakijo v primerjavi s prisotnostjo v kontrolni skupini ($p=0,04$; $OR=0,07$) kaže na zaščitno vlogo te alelne skupine pri razvoju celiakije. *B*07*, ki je v prejšnji študiji predstavljal zaščitno vlogo pred izbruhom obeh bolezni (SB1+CD), sedaj nima signifikantne povezave. Da bi izboljšali statistično verodostojnost smo povečali skupino bolnikov s SB1+CD iz prve študije iz 37 na 69 oseb, kar je imelo za posledico izgubo negativne signifikantne povezave *HLA-B*07* z obema boleznima, medtem pa je rizičen vpliv *HLA-B*08* ostal.

4.1.6.3 Stratifikacija na DQA1*05:01-DQB1*02:01 in dokaz vpliva haplotipov *HLA-B~MICA* na pojav bolezni CD ali SB1+CD

S stratifikacijo smo želeli pokazati vpliv haplotipa *HLA-B~MICA*, na razvoj celiakije kot same bolezni ali pa v kombinaciji s SB1, ki nam jo prikazuje preglednica XX.

Preglednica XX: Prikazuje vpliv dvo-lokusnega haplotipa *HLA-B~MICA* na pojav CD ter SB1+CD po stratifikaciji na DQA1*05:01- DQB1*02:01.

Haplotip B~MICA	K	CD	SB1+CD	CD vs K		SB1+CD vs K		SB1+CD vs CD	
	N=130	N=68	N=69	p	OR	P	OR	p	OR
	f(%)	f(%)	f(%)						
B*07~MICA*008	13,79	24,62	3,33	NS	NS	NS	NS	$9,03 \times 10^{-4}$	0,12

K – kontrolna skupina; CD – bolniki s celiakijo; SB1+CD – bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in celiakijo; f(%) – pogostost pojavljanja v odstotkih; N – velikost vzorca, število oseb; p – vrednost p; OR – razmerje obetov; NS – razlika ni statistično značilna

Zanimivo je, da haplotip *B*07~MICA*008* ($p=9,03 \times 10^{-4}$; $OR=0,12$) sedaj predstavlja zaščitno kombinacijo za razvoj obeh bolezni hkrati, medtem ko je *B*07* tekom prve študije predstavljal zaščitno vlogo, *MICA*008* pa rizično vlogo v skupini bolnikov z obema boleznima v primerjavi z skupino sladkornih bolnikov tipa 1.

Tudi tukaj bi bilo smotrno nadaljnje delo ter dodatne raziskave znotraj skupine bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1. Mogoče bi na ta način dobili boljšo sliko tudi za tiste bolnike, ki bolehamo za obema boleznima ter bi odkrili tiste dejavnike tveganja, ki povzročijo prehod ene avtoimunske bolezni v drugo oziroma bi definirali tiste alele ali skupino alelov, ki predstavljajo zaščito pred izbruhom druge bolezni. Smiselno bi bilo tudi razbiti skupino bolnikov z obema boleznima na dve podskupini, kjer bi eno skupino sestavljali bolniki s SB1, ki so naknadno zboleli še za CD, drugo pa bi sestavljali bolniki s CD, ki so kasneje zboleli še za SB1. Vse te raziskave ki jih omenjamo, so tako imenovane asociacijske študije, kjer pa lahko preko dobre povezanosti nekega alela z boleznijo, sklepamo na vpliv molekule (ki jo ta alel ali gen kodira) na razvoj bolezni.

5 SKLEPI

V magistrski nalogi smo ugotavljali polimorfizem gena *MICA* v slovenski populaciji in povezanosti s pojavom celiakije pri otrocih in mladostnikih. Zastavili smo si nekaj ciljev, ki smo jih skozi študijo, tudi dosegli.

- Vpeljali smo metodo PCR-rSSO za tipizacijo gena *MICA*, ki smo jo preverili s pomočjo sheme kontrolnih testiranj referenčnega laboratorija HLA, Univerze v Kaliforniji s 40 kontrolnimi vzorci.
- Z metodo PCR-rSSO smo določili polimorfizem gena *MICA* v slovenski populaciji in ugotovili, da le-ta v grobem ne odstopa od ostalih evropskih populacij ter populacij evropskega izvora z izjemo alela *MICA*018*, ki ima višjo frekvenco pojavljanja in je prisoten v kombinaciji s kar štirimi alelnimi skupinami *HLA-B*, medtem ko se druge pojavlja samo kombinaciji z eno samo alelno skupino.
- S študijo smo potrdili že znane povezave CD ali CD v kombinaciji s SB1, z aleli *HLA-DQ*. Tako tudi v slovenski populaciji, zvišano tveganje za pojav CD predstavljata alela, ki kodirata molekulo DQ2, zvišano tveganje za pojav obeh bolezni pa predstavljajo aleli, ki kodirajo molekuli DQ8 ter DQ2.
- Neposredne povezanosti posameznih alelov *MICA* na razvoj CD ali obeh bolezni hkrati nismo uspeli dokazati.
- Dokazali pa smo statistično značilno povezavo haplotipa *B*07~MICA*008*, ki predstavlja zaščitno kombinacijo za razvoj obeh bolezni hkrati.
- Ravno tako smo dokazali neodvisen vpliv *HLA-B*08* kot rizičnega dejavnika na razvoj obeh bolezni.
- Z odsotnostjo *B*18* v skupini bolnikov s CD v primerjavi s prisotnostjo v kontrolni skupini, smo prikazali zaščitno vlogo te alelne skupine pri razvoju CD.

S pomočjo izsledkov te študije ter dodatnimi raziskavami znotraj skupine bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1, bi lahko doprinesli k boljšemu razumevanju prispevka genetskih faktorjev na 6. avtolognem kromosomu na razvoj CD ali obeh bolezni hkrati. Preko dobre povezanosti genetskih faktorjev z boleznijo, lahko sklepamo tudi na prispevek njihovih molekulskih produktov na sam razvoj in potek bolezni.

6 LITERATURA

- 1) Nova diagnostična merila za celiakijo pri otrocih in mladostnikih. http://drustvo-celiakija.si/strokovni_prispevki/genericList-all/, dostop 06.01.2014
- 2) Dolinšek J, Ornik T: Vprašanja in odgovori o celiakiji - informacijska brošura podjetja Schär, Conzepta, Athesia, Italia, 2007: 6-9.
- 3) Celiakija. <http://www.cenim.se/wellness/celiakija/>, dostop 15.01.2014
- 4) Green P, Cellier C: Celiac disease. N Engl J Med 2007; 357: 1731-43.
- 5) Shoenfeld Y, Meroni PL: The General Practice Guide to Autoimmune Diseases, PABST Science Publishers, Lengerich, 2012: 193-201.
- 6) Gujral N, Freeman HJ, Thomson ABR: Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. World J Gastroenterol 2012; 18 (42): 6036-59.
- 7) Dolinšek J, Urlep-Žužej D, Mičetić-Turk D: Sodobni principi diagnostike celiakije. Zdrav vestn 2006; 75: II-89-97.
- 8) Celiac disease. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1727/>, dostop 14.03.2014
- 9) Rodey GE: Beyond tears. 2nd edition, De Novo Inc, Durango, 2000: 13-24.
- 10) Kemperle I: Vpliv raznolikosti tkivnih antigenov HLA-C na izbiro nesorodnega darovalca krvotvornih matičnih celic. Diplomaska naloga. Maribor, 2009.
- 11) Human (Homo sapiens) MHC locus at 6p21.3. <http://www.imgt.org/LocusView/docs/humanMHClocus.pl/>, dostop 15.03.2014
- 12) Lampič M: Vpliv polimorfizma genov HLA na dovzetnost za Hashimotov tiroiditis pri otrocih s sladkorno boleznijo tipa 1. Diplomaska naloga. Ljubljana, 2012.
- 13) Klein J, Sato A: The HLA System. N Engl J Med 2002; 343: 702-9.
- 14) Frigoul A, Lefranc MP: MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases. Human Genet 2005; 3: 95-145.
- 15) Fernández-Messina L, Reyburn TH, and Valés-Gómez M: Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. Front Immunol September 2012; 299: 1-9.
- 16) Klein J: Natural history of the major histocompatibility complex, John Wiley and sons, New York, 1986: 613.
- 17) Vidan-Jeras B: Vpliv polimorfizma in vezavnega ravnovesja genov HLA na humoralno imunsko odzivnost in na nekatere bolezni monogenega in poligenega izvora v slovenski populaciji. Doktorsko delo. Ljubljana, 2003.

- 18) Škerget K: Vpliv polimorfizma genov HLA II. razreda na dovzetnost za multiplo sklerozo v kočevski populaciji. Diplomsko delo. Ljubljana, 2004.
- 19) HLA Alleles Numbers. <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>, dostop 20.03.2014
- 20) Nomenclature of HLA alleles. <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>, dostop 20.03.2014
- 21) Little AM, Parham P: Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. Immunogenetics 1999; 1: 105-23.
- 22) Muro M, Lopez-Hernandez R, Campillo JA, Lucas D, Martinez-Garcia P, Botella C, Minguela A, Alvarez-Lopez MR: Current Immunology Reviews, MICA Gene and Relevance to Immune Responses in Organ Transplants and Inflammatory, Tumoral and Autoimmune Diseases, Bentham Science Publisher Ltd, Murcia, 2009: 122-34.
- 23) Marsh SGE, Parham P, Barbe LD: The HLA Facts Book, Academic Press, London, 2000: 7-27.
- 24) Nomenclature of HLA alleles. <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>, dostop 20.03.2014
- 25) Molinero LL, Marcos CY, Mirbaha F, Fainboim L, Stastny P, Zwirner NW: Codominant expression of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region. European Journal of Immunogenetics 2002; 29: 315–19.
- 26) Petković M: Preverjanje Hardy-Weinbergovega pravila pri določanju pojavnosti patoloških alelov za celiakijo v splošni populaciji. Raziskovalna naloga. Maribor, 2011.
- 27) Omersel J, Božič B: Avtoimunost – mehanizmi in pomen redoks procesov. Farm vestn 2010; 61: 137.
- 28) Kirijas M, Spiroski M: MICA Polymorphism, Association with Diseases and Role of Anti-MICA Antibodies in Organ and Stem Cell Transplantation. Macedonian Journal of Medical Sciences 2013; 6(3): 285-295.
- 29) Pagola AM, Pérez-Nanclares G, Ortiz L, Vitoria JC, Hualde I, Zaballa R, Preciado E, Castaño L, Bilbao JR: MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. Immunogenetics 2004; 56(5): 49-54.
- 30) Bratanic N, Smigoc Schweiger D, Mendez A, Bratina N, Battelino T, Vidan-Jeras B: An influence of HLA-A, B, DR, DQ and MICA on the occurrence of Celiac disease in patients with type 1 diabetes. Tissue Antigens 2010; 76(3): 208-15.

- 31) Slavuljica I, Krmpotić A, Jonjić S: Manipulation of NKG2D ligands by cytomegaloviruses: impact on innate and adaptive immune response. *Frontiers in Immunology* 2011; 2: 85.
- 32) Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C: *Immunology* 2nd edition, Lippincott Williams & Wilkin, Baltimore, 2012: 514.
- 33) Wenda S, Fae I, Sanchez-Mazas A, Nunes JM, Mayr WR, Fischer GF: The distribution of MICA alleles in an Austrian population: Evidence for increasing polymorphism. *Human Immunology* 2013; 74: 1295-99.
- 34) González S, Groh V, Spies T: Immunobiology of Human NKG2D and Its Ligands. *CTMI* 2006; 298: 121–38.
- 35) Glas J, Werner AI, Brännler G, Witter K, Scholz S, Weiss EH, Albert ED: Linkage disequilibria between HLA-B, C1_4_1, MICA and MICB. *Tissue Antigens* 2001; 58: 411-18.
- 36) Allele frequencies in worldwide populations.
<http://www.allelefreqencies.net/mic6001a.asp>, dostop 27.03.2014
- 37) Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA: Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* 1999; 49: 605-612.
- 38) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Ohno S and Inoko H. Association analysis between the MIC-A and HLA-B alleles in Japanese patients with Behcet's disease. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1961-66.
- 39) Picco P, Porfirio B, Gattorno M, Buoncompagni A, Falcini F, Cusano R, Bordo D, Pistoia V, Ravazzolo R and Seri M: MICA gene polymorphisms in an Italian paediatric series of juvenile Behcet disease. *Int J Mol Med* 2000; 10: 575-78.
- 40) Park SH, Park KS, Seo YI, Min DJ, Kim WU, Kim TG, Cho CS, Mok JW, Park KS and Kim HY: Association of MICA polymorphism with HLA-B51 and disease severity in Korean patients with Behcet's disease. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 366-70.
- 41) Gambelunghe G, Ghaderi M, Cosentino A, Falorni A, Brunetti P, Falorni A and Sanjeevi CB: Association of MHC Class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with Type I diabetes. *Diabetologia* 2000; 43: 507-14.

- 42) Bilbao JR, Martin-Pagola A, Calvo B, Perez de Nanclares G, Gepv-N and Castano L: Contribution of MIC-A polymorphism to type 1 diabetes mellitus in Basques. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 958: 321-24.
- 43) Bilbao JR, Martin-Pagola A, Perez De Nanclares G, Calvo B, Vitoria JC, Vazquez F and Castano L: HLA-DRB1 and MICA in autoimmunity: common associated alleles in autoimmune disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1005: 314-318.
- 44) Kawabata Y, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Hotta M, Ueda H, Shintani M, Nojima K, Ono M, Nishino M, Taniguchi H, Noso S, Yamada K, Babaya N and Ogihara T: Age-related association of MHC class I chain-related gene A (MICA) with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Hum Immunol* 2000; 61: 624-629.
- 45) Gambelunghe G, Falorni A, Ghaderi M, Laureti S, Tortoioli C, Santeusano F, Brunetti P and Sanjeevi CB: Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3701-07.
- 46) Tsuchiya N, Shiota M, Moriyama S, Ogawa A, Komatsu-Wakui M, Mitsui H, Geraghty DE and Tokunaga K: MICA allele typing of HLA-B27 positive Japanese patients with seronegative spondylarthropathies and healthy individuals: differential linkage disequilibrium with HLA-B27 subtypes. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 68-73.
- 47) Ricci-Vitiani L, Vacca A, Potoicchio I, Scarpa R, Bitti P, Sebastiani G, Passiu G, Mathieu A and Sorrentino R: MICA gene triplet repeat polymorphism in patients with HLA-B27 positive and negative ankylosing spondylitis from Sardinia. *J Rheumatol* 2000; 27: 2193-97.
- 48) Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousono C, Garcia-Fernande S, Martinez-Borra J, Gonzalez S and Lopez-Larrea C: MICA-A5.1 allele is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients. *Immunogenetics* 2002; 53: 989-991.
- 49) Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousono C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S and Lopez-Larrea C: MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201. *Gut* 2002; 50: 336-340.

- 50) Rueda B, Pascual M, Lopez-Nevot MA, Koeleman BP, Ortega E, Maldonado J, Lopez M and Martin J: Association of MICA-A5.1 allele with susceptibility to celiac disease in a family study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 359-362.
- 51) Fernandez L, Fernandez-Arquero M, Gual L, Lazaro F, Maluenda C, Polanco I, Figueredo MA and Gomez de la Concha E: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene in celiac disease. *Tissue Antigens* 2002; 59: 219-222.
- 52) Bolognesi E, Karell K, Percopo S, Coto I, Greco L, Mantovani V, Suoraniemi E, Partanen J, Mustalahti K, Maki M and Momigliano-Richiardi P: Additional factor in some HLA DR3/DQ2 haplotypes confers a fourfold increased genetic risk of celiac disease. *Tissue Antigens* 2003; 61: 308-316.
- 53) Woolley N, Mustalahti K, Maki M and Partanen J: Cytokine gene polymorphisms and genetic association with coeliac disease in the Finnish population. *Scand J Immunol* 2005; 61: 51-56.
- 54) Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Mizuki N, Seki SS, Honma T, Inoko H and Asakura H: A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2001; 57: 9-14.
- 55) Seki SS, Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Suzuki K, Yoneyama O, Mizuki N, Honma T, Inoko H and Asakura H: Stratification analysis of MICA triplet repeat polymorphisms and HLA antigens associated with ulcerative colitis in Japanese. *Tissue Antigens* 2001; 58: 71-76.
- 56) Glas J, Martin K, Brunnler G, Kopp R, Folwaczny C, Weiss EH and Albert ED: MICA, MICB and C1_4_1 polymorphism in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2001; 58: 243-249.
- 57) Fdez-Morera JL, Rodrigo L, Lopez-Vazquez A, Rodero SR, Martinez-Borra J, Nino P, Gonzalez S and Lopez-Larrea C: MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism modulates the extension of ulcerative colitis. *Hum Immunol* 2003; 64: 816-822.
- 58) Murphy KM, Travers P, Walport M: *Immunobiology* 7th edition, Garland Publishing, 2008: 13-24.

- 59) Volta U, Tovoli F, Caio G: Clinical and Immunological Features of Celiac Disease in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 5(4): 479-487.
- 60) Ostanek B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki. *Farmacevtski vestnik* 2004; 55: 215-220.
- 61) LABType SSO Typing Test, Product insert. http://www.onelambda.com/Source/pdf/files/productinserts/labtype_pi_EN.pdf, dostop 04.04.2014
- 62) LABType SSO class I & class II. http://www.onelambda.com/source/pdf/files/productsheets/LType_ps_web.pdf, dostop 04.04.2014
- 63) Study blue. <http://www.studyblue.com/notes/note/n/biooooo5/deck/4651081>, dostop 04.04.2014
- 64) EZ1 Advanced User Manual. <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=01b398f2-56d2-43b8-8d6e-17b92757708d&lang=en>, dostop 05.04.2014
- 65) Vidan-Jeras B: Vrednotenje uporabnosti statističnih metod populacijske genetike pri določanju polimorfizma genov HLA I. razreda v slovenski populaciji. Magistrsko delo. Ljubljana, 2002.
- 66) Škrlić N: Priprava in delna karakterizacija rekombinantnega proteina smoc-2 ter identifikacija njegovih interakcijskih partnerjev. Diplomsko delo. Ljubljana, 2006.
- 67) QIAxcel DNA Handbook. <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=f6158498-a857-4a2f-b40b-569fba3793e2&lang=en>, dostop 06.04.2014
- 68) Automated electrophoresis - qiaxcel advanced system. <http://www.envisionsci.com/745988/automated-electrophoresis-qiaxcel-advanced-system>, dostop 04.05.2014
- 69) Product insert LABType® SSO Typing Tests. http://www.onelambda.com/Source/pdf/files/productinserts/labtype_pi_EN.pdf, dostop 08.04.2014
- 70) Flow cytometry-Based analysis. <https://www.google.si/search?q=flow+cytometry&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ei=>

- [0XxEU4bcM8riywPln4GwBA&ved=0CAYQ_AUoAQ&biw=1280&bih=685#q=flow+cytometry%2C+Luminex&tbm=isc](http://www.olerup-spp.com/products/technical/instructions-for-use/), dostop 08.04.2014
- 71) Olerup HLA Instructions for Use. <http://www.olerup-spp.com/products/technical/instructions-for-use/>, dostop 09.04.2014
- 72) HLA-B: <http://www.olerup-spp.com/products/downloads/hla-kits/hla-b/>, dostop 28.04.2014
- 73) Frelih T, Kraigher A, Učakar V, Čakš Jager N, Kustec T, Šubelj M, Vrdelja M: Preiskava izbruha, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, 2012: 36/47.
- 74) Tools for handling and analysing data with ambiguities. <http://geneva.unige.ch/generate/>, dostop 01.05.2014
- 75) UCLA Immunogenetics center. <http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/Cell/summaryMica.htm>, dostop 12.05.2014
- 76) Zhang Y, Lazaro AM, Lavingia B, Stastny P: Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Immunol* 2001; 62: 620-31.
- 77) Middleton D, Menchaca L, Rood H: New Allele Frequency Database. *Tissue Antigens* 2003; 61: 403-7.
- 78) Gao X, Single RM, Karacki P, Marti D, O'Brien SJ, Carrington M: Diversity of MICA and linkage disequilibrium with HLA-B in two North American populations. *Hum Immunol* 2006; 67: 152-8.
- 79) Lucas D, Campillo JA, López-Hernández R, Martínez-García P, López-Sánchez M, Botella C, Salgado G, Minguela A, Álvarez-López MR, Muro M: Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain. *Hum Immunol* 2008; 69: 655-60.
- 80) Ribas F, Oliveira LA, Petzl-Erler ML, Bicalho MG: Major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B alleles in Euro-Brazilians. *Tissue Antigens* 2008; 72: 532-8.
- 81) Norris S, Kondeatis E, Collins R et al: Mapping MHC-encoded susceptibility and resistance in primary sclerosis cholangitis: The role of MICA polymorphism. *Gastroenterology* 2001; 120: 1475-82.
- 82) Sollid LM: Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev immunol* 2002; 2: 647-55.

- 83) Sollid LM, Lie BA: Coeliac disease genetics: current concepts and practical applications. Clin Gastroenterol Hepatol 2005; 3(9): 843-51.
- 84) Howson JM, Walker NM, Clayton D, Todd JA: Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A. Diabetes Obes Metab 2009; 11(1): 31-45.