

Učinci lokusa kvantitativnih svojstava (eQTL) na transkripciju T-bet, EOMES i RUNX3 gena u T stanicama oboljelih od Hashimotove bolesti

Legac, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:576039>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Josipa Legac

**UČINCI LOKUSA KVANTITATIVNIH
SVOJSTAVA (eQTL) NA
TRANSKRIPCIJU T-BET, EOMES I
RUNX3 GENA U T STANICAMA
OBOLJELIH OD HASHIMOTOVE
BOLESTI**

Diplomski rad

Osijek, 2018.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Josipa Legac

**UČINCI LOKUSA KVANTITATIVNIH
SVOJSTAVA (eQTL) NA
TRANSKRIPCiju T-BET, EOMES I
RUNX3 GENA U T STANICAMA
OBOLJELIH OD HASHIMOTOVE
BOLESTI**

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren na Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: Doc.dr.sc. Stana Tokić

Rad ima 56 lista, 7 tablica i 22 slike.

Zahvaljujem svojoj mentorici, izuzetnoj osobi, doc. dr. sc. Stani Tokić na svesrdnoj i nesebičnoj pomoći i stalnom poticanju na izradu ovoga diplomskog rada. Hvala na neizmjernej stručnoj pomoći, savjetima, razumijevanju i sugestijama.

Hvala svim članovima Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, na ugodnoj radnoj atmosferi, dobrom društvu i kolegijalnosti.

Posebnu zahvalu upućujem svojim roditeljima, ocu Josipu i majci Jadranki, te sestri Mateji, braći i zaručniku bez čije podrške, ljubavi, odricanja i brige u trenucima kada je bila najpotrebnija moje obrazovanje, kao ni izrada ovoga rada, ne bi bilo moguće.

Bok. Moje je ime Hashimoto. Nevidljiva sam autoimuna bolest koja napada tvoju štitnu žlijezdu i uzrokuje oboljenje od hipotireoze. Sada sam se kao čičak pričvrstio za tvoj život. Ako imaš hipotireozu, vjerojatno imaš i mene. Glavni sam uzročnik hipotireoze u mnogim državama diljem svijeta. Veoma sam lukav i podmukao- na tvojim se analizama krvi ne pokazujem uvijek. Drugi oko tebe ne mogu me vidjeti ni čuti, ali tvoje me tijelo osjeća. Ako to želim, mogu te napasti bilo gdje i na bilo koji način. Mogu uzrokovati jaku bol pa čak i, ako sam dobro raspoložen, bol cijeloga tvog tijela....

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Štitnjača i hashimotova bolest	1
1.1.1. Anatomija štitnjače	1
1.1.2. Funkcija štitne žlijezde	2
1.1.3. Hashimotov tireoiditis.....	4
1.1.4. Etiologija Hashimotove bolesti.....	5
1.1.5. Imunopatogeneza Hashimotove bolesti	6
1.2. Promotorske i regulatorne regije gena TBX21, EOMES i RUNX3.....	10
1.2.1. TBX21.....	10
1.2.2. EOMES	11
1.2.3. RUNX3	11
1.3. Ekspresija lokusa kvantitativnih svojstava	12
2. HIPOTEZA	17
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	18
4. MATERIJALI I METODE	19
4.1. Ispitanici	19
4.1.1. Skupina oboljelih od Hashimotova tireoiditisa.....	19
4.1.2. Kontrolna skupina.....	19
4.2. Kemikalije	20
4.3. Metode	20
4.3.1. Izolacija DNA	20
4.3.2. Kvantifikacija DNA pomoću Qubit fluorometra	21
4.3.3. Lančana reakcija polimeraze uz TaqMan probe	22
4.3.4. Identifikacija alelnih varijanti u post – PCR fazi analize	25
4.3.5. Statistička obrada podataka.....	30
5. REZULTATI.....	31

5.1. Opća deskriptivna analiza ispitanika	31
5.2. Distribucija alela i genotipova eQTL polimorfizama.....	33
5.3. Ekspresijski profili gena TBX21, EOMES i RUNX3	34
5.4. Kvantitativni učinci polimorfizma rs4794067 na ekspresiju gena TBX21	37
5.5. Kvantitativni učinci polimorfizma rs11129295 na ekspresiju gena EOMES.....	39
5.6. Kvantitativni učinci polimorfizma rs4648889 na ekspresiju gena RUNX3	40
6. RASPRAVA.....	42
7. ZAKLJUČAK	46
8. SAŽETAK.....	47
9. SUMMARY	48
10. LITERATURA.....	49
11. ŽIVOTOPIS	55

POPIS KRATICA

anti-Tg- protutijelo na tireoglobulin

anti-TPO- protutijelo na tireoidnu peroksidazu

CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*)- površinski receptor, negativni regulator aktivacije limfocita T

CTL (engl. *cytotoxic T lymphocytes*)- citotoksični limfociti T

DIT- dijodtirozin

EOMES- Eomesodermin

eQTL (od engl. *expression quantitative trait loci*)- genski lokus kvantitativnih svojstava

HLA (od engl. *human leukocyte antigen*)- humani leukocitni antigen

HT- Hashimotov tireoiditis

ICAM- 1 (od engl. *intercellular adhesion molecule 1*)- međustanična adhezijska molekula

IL- Interleukin

INF- γ - Interferon gamma

MIT- monojodtirozin

NK (od engl. *natural killer*)- prirodne ubilačke stanice

PCR (od engl. *polymerase chain reaction*)- lančana reakcija polimerazom

PTPN22 (od engl. *protein tyrosine phosphatases*)

RUNX3 (od engl. *Runt-related transcription factor 3*)

SLC26A4 (od engl. *solute carrier family 26, member 4*)

T3- trijodtironin

T4- tiroksin

T- bet (od engl. *T-box transcription factor*)

Tg- tireoglobulin

TNF- α (od engl. *Tumor necrosis factor*)

TPO- tireoidna peroksidaza

TRH (od engl. *thyrotropin-releasing hormone*)- hormon koji oslobađa tireotropin

TSH (od engl. *thyroid stimulating hormone*)- tireostimulirajući hormon (tireotropin)

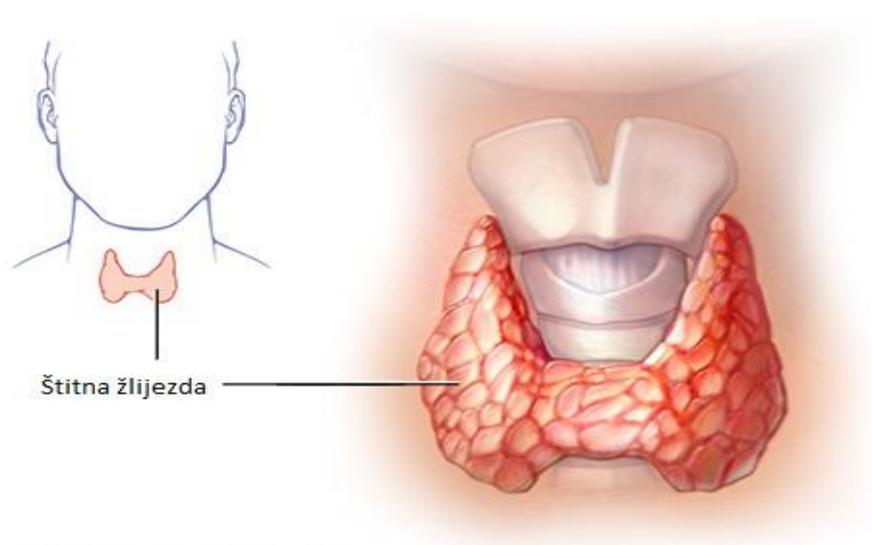
TSHR- receptor za tireotropin

1. UVOD

1.1. ŠTITNJAJA I HASHIMOTOVA BOLEST

1.1.1. Anatomija štitnjače

Štitnjača (lat. *glandula thyroidea*) neparna je žlijezda unutarnjega izlučivanja smještena u donjem dijelu vrata, ispred dušnika. Teška je 16 – 25 grama. Sastoji se od desnoga i lijevoga režnja (lat. *lobus dexter et sinister*) koje povezuje središnji suženi dio (lat. *isthmus glandulae thyroideae*) što žlijezdi daje oblik slova H. Veličina režnjeva različita je i individualna. Površina štitnjače neravna je i izbrazdana brojnim arterijskim i venskim žljebovima. Medijalne površine režnjeva oblikuju duboki žlijeb u kojem se nalaze dušnik i jednjak. Središnji, suženi dio štitnjače nalazi se neposredno ispred dušnika, u visini druge do treće trahealne hrskavice, dok medijalna strana režnjeva pokriva početni dio dušnika. Položaj tkivne prenosnice štitnjače (lat. *isthmus glandulae thyroideae*) značajno varira, a može biti i nerazvijen pa su, u tom slučaju, režnjevi odvojeni. Štitnjača prima arterijsku krv od dviju donjih i dviju gornjih tireoidnih arterija koje su ogranci arterije subklavije i vanjske karotidne arterije. Štitnjača je inervirana simpatičkim i parasimpatičkim živcima koje donose povratni i gornji grkljanski živac (lat. *nervus laryngeus recurrens et nervus laryngeus superior*) (1).



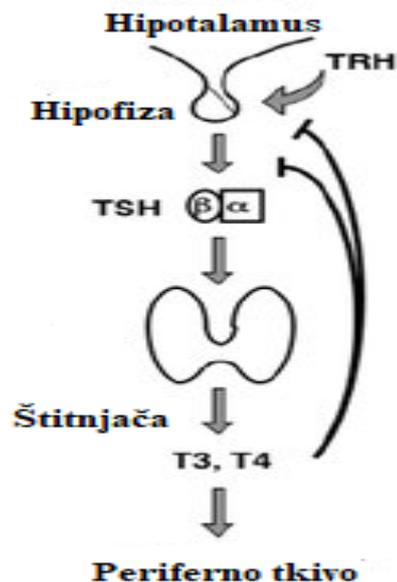
Slika 1. Lokalizacija štitnjače u organizmu (Preuzeto i prilagođeno 2).

1.1.2. Funkcija štitnjače

Na mikroskopskoj razini tkivo štitnjače izgrađuju folikuli, okrugle strukture oblikovane od jednoslojnih epitelnih stanica koje okružuju jodom bogatu želatinoznu tekućinu -koloid. Sinteza hormona štitnjače, trijodtironina (T3) i tiroksina (T4), nužnih za pravilnu regulaciju metabolizma i rad velikoga broja tkivnih i organskih sustava, odvija se u tireocitima, a njihova pohrana u koloidu folikula. Proizvodnju hormona T3 i T4 mehanizmom povratne sprege regulira hormon hipofize, tireotropin (TSH), koji je pod nadzorom hipotalamusa, i tireotropin oslobađajućega hormona (TRH, od engl. *Thyroid Stimulating Hormone*). TSH se oslobađa iz prednjega režnja hipofize i prepoznaje TSH receptor na bazolateralnoj membrani folikularnih stanica štitnjače te uzrokuje aktivaciju G-proteina vezanoga za receptor. Posljedična aktivacija sekundarnih glasnika poput cAMP prenosi aktivacijski signal i potiče ekspresiju enzima tiroidne peroksidaze, sintezu tireoglobulina i absorpciju jodida iz cirkulacije (3).

Apsorpcija i oksidacija jodidnih iona u stanicama štitnjače ključni su preduvjeti uspješne sinteze tireoidnih hormona. Enzim tireoidna peroksidaza (TPO) nalazi se na luminalnoj površini folikularnih stanica gdje, uz pomoć vodikova peroksida, katalizira oksidaciju jodidnih iona (I^-) i njihovu organifikaciju vezanjem za tirozilne aminokiselinske ostatke na površini tireoglobulina. Tireoglobulin je veliki glikozilirani protein, preteča T3 i T4. Sadrži 115 tirozinskih aminokiselinskih ostataka od kojih je svaki potencijalno mjesto vezanja jodidnih iona. U tireoglobulinu 70% jodida nalazi se u obliku neaktivnih prekursora, monojodtirozina (MIT) i dijodtirozina (DIT), dok je 30% u obliku jodtironilnih ostataka, T3 i T4. Tijekom izgradnje tireoidnih hormona tireoglobulin osigurava prostor vezanju tirozilnih ostataka i ugradnji jodida u organsku strukturu. Tireoglobulin se sintetizira u bazalnom dijelu folikularnih stanica, a zatim se izlučuje u koloid i služi pohrani hormona T3 i T4. U eutireoidnoj štitnjači postoje zalihe hormona dovoljne višetjednim potrebama. Nakon TSH stimulacije, tireoglobulin iz koloida endocitozom dopijeva u lizosome folikularnih stanica gdje kisele proteaze i peptidaze kataliziraju hidrolizu tireoglobulina do njegovih sastavnih aminokiselina. Pri tome se T3 i T4 oslobađaju iz bazalnoga dijela stanice u krvotok. Na taj način tireoglobulin djeluje kao međuskladišnica hormona štitnjače.

U slučaju smanjene sinteze T3 i T4 hipofiza proizvodi veću količinu TSH nastojeći stimulirati štitnjaču na pojačan rad. Suprotno tome, pri pretjeranoj aktivnosti štitnjače, lučenje TSH značajno se umanjuje pa razine TSH u serumu mogu biti čak i nemjerljive.



Slika 2. Prikaz mehanizma negativne povratne sprege. Lučenje T3 i T4 hormona.

Hormoni štitnjače do ciljnih tkiva i organa putuju krvlju, vezani za serumske transportne proteine kao što je globulin, koji veže hormone štitnjače (TBG), ili albumin, a manjim dijelom kao slobodni (*free*) T4 i T3 (FT4, FT3). Kada dosegnu ciljno mjesto, T3 i T4 napuštaju kompleks s transportnim proteinima kako bi ušli u stanicu procesom difuzije ili aktivnim transportom. Vezanjem za nuklearne receptore hormoni štitnjače-prvenstveno T3-posrednici su aktivacije ekspresije ciljnih gena te upravljaju razvojem specifičnoga staničnog odgovora (4).

Hormoni štitnjače djeluju na gotovo sve organske sustave u tijelu, uključujući srce, autonomni živčani sustav, kosti, probavni trakt i imunološki sustav. Imaju ključnu ulogu u regulaciji bazalnoga metabolizma, tjelesne temperature, funkcije i pokretljivosti probavnoga trakta te pravilnom razvoju neurološkoga sustava i kognitivnih sposobnosti (4).

1.1.3. Hashimotov tireoiditis

Hashimotov tireoiditis (HT), kronični limfociti tireoiditis ili autoimuni tireoiditis naziv je za kroničnu autoimunu upalu štitnjače složene genetičke podloge i nepoznate etiologije (5). Japanski liječnik Hakaru Hashimoto 1912. god. prvi je opisao četiri bolesnika s kroničnom bolešću štitnjače, karakterističnoga patohistološkog nalaza u kojemu su navedena ključna obilježja HT bolesti: limfocitna infiltracija žljezdanoga tkiva, fibroza i atrofija parenhima te pojava morfološki promijenjenih, eozinofilnim granulama ispunjenih folikularnih (Hürthleovih) stanica (6).

Hashimotovu bolest obilježava razvoj staničnoga i humoralnoga imunskog odgovora koji je usmjeren protiv tkivnih antigena štitnjače, među njima i tiroidne peroksidaze (anti-TPOAb), tireoglobulina (anti-TgAb) te receptora za tireotropin (anti-TSHRAb). Visoki titar anti-TPOAb i anti-TgAb moguće je detektirati u serumu većine HT pacijenata (90 – 95%), a progresijom bolesti dolazi do razvoja hipotireoze, smanjene funkcije štitnjače i posljedično smanjene sinteze hormona štitnjače. Ovisno o napretku bolesti i stupnju funkcije štitnjače, među pacijentima se razvijaju lakši i teži oblici bolesti. U blažoj, eutiroidnoj formi bolesti serumske koncentracije hormona T3, T4 i TSH većinom se zadržavaju unutar referentnih, fizioloških vrijednosti. Subklinički status obilježava povišena koncentracija serumskih vrijednosti TSH uz uredan FT4 i FT3. U težoj, hipotirodnoj ili kliničkoj formi bolesti serumske koncentracije TSH povišene su, FT4 smanjene, a FT3 fluktuiraju od niskih do fizioloških vrijednosti (7). HT je najčešći uzrok hipotireoze na područjima dovoljnoga dijetalnog unosa joda, odnosno u većem dijelu zapadnoga svijeta. Većina oboljelih održava eutiroidno stanje bez ikakvih medicinskih intervencija, dok kod drugih bolest napreduje do hipotireoze. Napredovanje od subkliničke do kliničke forme hipotireoze obično se odvija unutar nekoliko godina, rjeđe brže, a prisutnost subkliničke hipotireoze, kao i povećanje broja autoreaktivnih protutijela, povećava rizik razvoja manifestne hipotireoze (7). Osim toga, gotovo ništa drugo nije poznato o čimbenicima koji upravljaju evolucijom bolesti, odnosno progresijom benigne, stacionarne forme u destruktivnu fazu. Progresijom bolesti javljaju se simptomi poput oticanja vrata (gušavosti), umora i tjeskobe, povećane osjetljivosti na hladnoću, konstipacije, blijede i suhe kože, krhkih noktiju, gubitka kose, otoka očiju, lica, nogu te ruku, povećanja tjelesne mase, bolova u mišićima, ukočenosti, slabosti mišića, pretjeranoga ili produljenoga menstrualnog krvarenja, bradikardije, psihomotorne usporenosti,

kognitivne disfunkcije te depresije (8). Klinička hipotireoza, kao i subklinička bolest u izabranim ciljnim skupinama, liječi se nadomjesnim hormonskim pripravcima, ponajprije L-tiroksinom. Dnevna doza L-T4 potrebna za normalizaciju serumske razine FT4, FT3 i TSH ovisi o brojnim čimbenicima, prvenstveno o dobi, tjelesnoj masi i preostaloj funkcijskoj rezervi štitnjače bolesnika.

1.1.4. Etiologija Hashimotove bolesti

Etiologija Hashimotova tireoiditisa do danas ostaje nepotpuno razjašnjena, ali su prepoznati brojni genetički i okolišni čimbenici koji doprinose povećanju rizika za razvoj ove autoimune bolesti. Genetički čimbenici generalno se mogu podijeliti na HLA (od engl. *human leukocyte antigen*) i ne-HLA gene. Među njima razvoju bolesti najviše doprinose geni koji kodiraju molekule HLA razreda II, poput HLA-DR, receptorske i regulatorne molekule u kontroli imunološkoga odgovora kao što su CTLA4, CD40, FCRL3, PTPN22, te štitni antigeni TG i TSHR (9). Okolišni čimbenici s potencijalnom ulogom u razvoju HT jesu pušenje, jod, selen, onečišćenje, infektivna stanja, fizički i emocionalni stres. Fiziološka stanja poput puberteta, rasta, trudnoće i menopauze također dijelom doprinose povećanju rizika razvoja HT bolesti (6). U kontekstu rizične genetičke podloge okolišni čimbenici imaju značajnu ulogu u inicijaciji patološkoga imunološkog odgovora. Među njima, primjerice, prekomjeren unos joda potencijalno doprinosi razvoju novih tireoglobulinskih epitopa, povećava stupanj oksidacije jodida i pospješuje razvoj štetnih reaktivnih kisikovih vrsta. Nastali slobodni radikali potiču ekspresiju adhezijskih molekula i pospješuju razaranje tireocita što potencijalno uzrokuje olakšanu prezentaciju autoantigena i akumulaciju imunskih stanica u tkivu štitnjače. Nedostatan unos selena također se povezuje sa smanjenom sintezom i perifernom konverzijom hormona štitnjače, prvenstveno kao posljedicom smanjene aktivnosti dvaju selenoproteina; deijodinaze i glutation peroksidaze (10).

Hipotireoza pogađa približno 5% odrasle populacije zapadnoga svijeta. Kod žena se pojavljuje deset puta češće nego kod muškaraca što ženski spol čini najrizičnijim fiziološkim čimbenikom. Na učestalost bolesti utječe i dob (6), pozitivna obiteljska anamneza autoimunih bolesti štitnjače te komorbiditet s drugim autoimunim oboljenjima poput reumatoidnoga artritisa, dijabetesa i eritematoznoga lupusa (11).

1.1.5. Imunopatogeneza Hashimotove bolesti

1.1.5.1. Inicijacija autoimunoga odgovora

Hashimotov tireoiditis drugi je najrašireniji endokrini poremećaj koji karakterizira autoimuno uništavanje tkiva štitnjače (6). Imunopatogenezu bolesti obilježava pojava autoreaktivnih pomoćničkih $CD4^+$ i citotoksičnih $CD8^+$ limfocita, i B koji, združenim djelovanjem, prepoznaju štitne antigene i posrednici su u uništenju folikularnih stanica apoptozom i citokinskom ozljedom. Ranu fazu imunopatogeneze HT čini pojačano nakupljanje antigen predočnih stanica u štitnjači što je vjerojatno posljedica upalne reakcije inducirane okolišnim čimbenicima. Antigen predočne stanice fagocitiraju antigene štitnjače, izlučuju upalne citokine IL (interleukin)-1, IL-6, INF- γ (od engl. *interferon-gamma*), TNF- α (od engl. *tumor necrosis factor-alpha*) te stimuliraju okolne tireocite na ekspresiju kemokinskih liganada (12). U uvjetima upalnoga mikrookoliša predočne stanice sazrijevaju u profesionalne antigen predočne stanice. One putuju u regionalne limfne čvorove i prezentiraju autoantigene štitnjače imunskom nadzoru limfocita T. Razvoj autoimunoga odgovora odvija se u prisutnosti autoreaktivnih $CD4^+$ pomoćničkih limfocita T (Th) koji su izbjegli kontrolnim mehanizmima centralne i periferne tolerancije (13).

1.1.5.2. Uloga i diferencijacija $CD4^+$ pomoćničkih limfocita T

Ovisno o načinu predočavanja antigena, kostimulacije i citokinskoga mikrookoliša, $CD4^+$ limfociti T diferenciraju u Th1, Th2 ili Th17 pomoćničke stanice. Značajnu ulogu u inicijaciji i razvoju HT bolesti imaju Th1 limfociti koji nakon aktivacije izlučuju IL-2, INF- γ , i TNF- α te stimuliraju aktivaciju makrofaga, prirodno ubilačkih (NK) stanica i $CD8^+$ citotoksičnih T limfocita (CTL) (14). U HT oboljelih povećana ekspresija upalnih biljega INF- γ i TNF- α zabilježena je u perifernim limfocitima i u tkivu štitnjače te je povezana s povišenim titrom anti-TPOAb protutijela i apoptozom folikularnih stanica. Sazrijevanje i proliferaciju Th1 loze regulira transkripcijski čimbenik T-bet vezanjem za promotorske sekvence velikoga broja gena koji sudjeluju u razvoju tip I imunsnoga odgovora (15).

Limfociti Th2 pospješuju razvoj humoralnoga odgovora posrednom aktivacijom limfocita B koji diferenciraju u plazma stanice odgovorne za sintezu protutijela usmjerenih protiv antigena štitnjače, poput anti-TPOAb (16). Protutijela Anti-TPOAb prepoznaju

komponente sustava komplementa, ali i NK stanice koje posreduju lizu opsoniziranih folikularnih stanica citotoksičnim mehanizmom ovisnim o protutijelima (17). Diferencijacijom Th2 stanica upravlja TF GATA3 koji potiče ekspresiju upalnih citokina poput IL-4, IL-5 i IL-10. Kod HT oboljelih zabilježen je povećani omjer Th1/Th2 stanica (18), povezan s razvojem težih formi oboljenja.

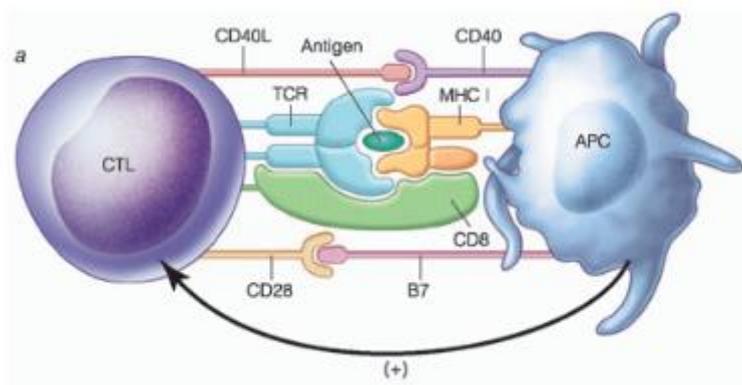
U prisutnosti upalnih citokina IL-6, IL-21, i TGF β dolazi do razvoja Th17 imunskih stanica koje obilježava lučenje upalnih citokina IL-17 i IL-21 te ekspresija receptora za IL-23 (19). Ključnu ulogu u razvoju Th17 fenotipa ima transkripcijski čimbenik ROR γ t (od engl. *RAR-related orphan receptor gamma t*) koji upravlja ekspresijom IL-23R, upalnih citokina poput IL-17A, IL-17F te kemokinskih liganada i receptora CCL20 i CCR6 (20). U serumu i žljezdanom tkivu oboljelih zabilježena je povećana frekvencija Th17 stanica i porast ekspresije IL-17, razmjerno fibrozaciji i smanjenoj funkciji štitne žlijezde (21).

Autoimuni odgovor pospješuju i sami tireociti koji, u uvjetima upalnoga mikrookolišta, na svojoj površini prezentiraju tkivne antigene u kompleksu s molekulama HLA razreda II i tako potiču razvoj autoimunoga odgovora.

1.1.5.3. Uloga i diferencijacija CD8⁺ citotoksičnih limfocita T

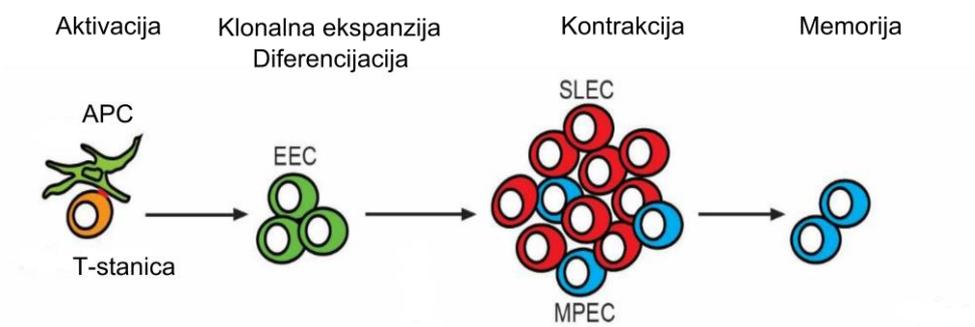
Aktivirani pomoćnički limfociti T pospješuju aktivaciju kolokaliziranih autoreaktivnih CTL i B limfocita te zajedno migriraju na mjesto upale slijedeći trag kemokinskih liganada. Masovna limfocitna infiltracija štitne žlijezde rezultira razvojem specifičnih obilježja bolesti: disfunkcijom i metaplazijom tireocita, pojavom organiziranih tzv. tercijarnih limfoidnih struktura te limfocitotoksičnim razaranjem folikularne arhitekture. Ključnu ulogu u destrukciji štitnoga parenhima imaju CD8⁺ CTL limfociti koji čine značajnu komponentu upalnoga infiltrata štitnjače u oboljelih, osobito hipotiroidnih. Unutar štitnjače uvjeti upalnoga mikrookolišta i kronične stimulacije pospješuju diferencijaciju autoreaktivnih efektorskih i memorijskih CD8⁺ potomaka među kojima važnu ulogu u patogenezi bolesti imaju efektorske linije poput Tc1 (22), Tc17 (23) i prirodno-bilačke T (NKT) stanice (24). Povećana frekvencija perifernih CD8⁺Tc1, Tc17 efektora i INF- γ ⁺ NKT stanica povezana je s visokim titrom anti-TPO protutijela, progresivnim oštećenjem žljezdanoga tkiva i razvojem težih, hipotiroidnih formi oboljenja.

CD8⁺ T stanice imaju važnu ulogu u stvaranju imunološkoga odgovora koji nastaje djelovanjem intracelularnih patogena i tumora. Antigen prezentirajuće stanice (APC) predstavljaju specifični peptid naivnim CD8⁺T stanicama, a kostimulacijske molekule i citokini (IL-2, IL-12) amplificiraju primarni TCR signal i usmjeravaju diferencijaciju u efektorske CD8⁺ stanice (24).



Slika 3. Aktivacija i diferencijacija CD8⁺ stanica (Preuzeto i prilagođeno 24).

Nakon klonalne ekspanzije glavnina kratkoživućih efektorskih stanica (SLEC, od engl. *short lived effector cells*) umire apoptozom, a dio preživjelih antigen-specifičnih CD8⁺ stanica formira dugoživući memorijski odjeljak u krvotoku i tkivima koji, nakon ponovnoga susreta s antigenom, podliježe brznoj reaktivaciji i reekspanziji (25).



Slika 4. Prikaz faza kroz koje prolaze CD8 T limfociti nakon infekcije (Preuzeto i prilagođeno 25).

Dakle, ključnu ulogu u uklanjanju celularnih antigena imaju citotoksični T limfociti: efektorske CD8⁺ stanice, Tc1, a dijelom i CD4⁺CTL Th1 stanice. Tc1 stanice mogu ubiti patogenu stanicu oslobađajući brojne citolitičke i proapoptotske molekule kao što su perforini i granzimi te IFN- γ i TNF α (26).

Razvoj, fenotip i funkciju CD8+Tc1 stanica regulira niz transkripcijskih čimbenika. U razvoju efektorskih Tc1 stanica, među ostalima, posreduju TF T-bet (od engl. *T-box transcription factor*) i RUNX3 (od engl. *Runt-related transcription factor 3*), a diferencijacijom i održavanjem dugoživućih memorijskih Tc1 limfocita upravljaju EOMES (od engl. *Eomesodermin*), BCL-6 (od engl. *B cell CLL/lymphoma 6*) i TCF7 (od engl. *transcription factor 7*).

Visoka razina T-bet čimbenika pospješuje razvoj citotoksičnoga kapaciteta efektorskih Tc1 stanica pozitivnom regulacijom ekspresije i izlučivanja proteolitičkih i proapoptskih enzima poput perforina (PRF) i granzima B (GZMB). T-bet je također neophodan za proizvodnju upalnih citokina tipa I i β -kemokina, a EOMES održava ekspresiju INF- γ i stabilizira memorijski fenotip CD8+ stanica. Ekspresija EOMES-a veća je kod memorijskih CD8+ stanica nego kod efektorskih (27). Genska varijanta PTPN22 udružena s HT, PTPN22(1858T) (28) potiče razvoj i akumulaciju EOMES+ citotoksičnih Th-stanica, a CTLA4, druga ključna regulacijska molekula u patogenezi HT, selektivno inhibira ekspresiju EOMES-a u citotoksičnim CD8+ T stanicama (29).

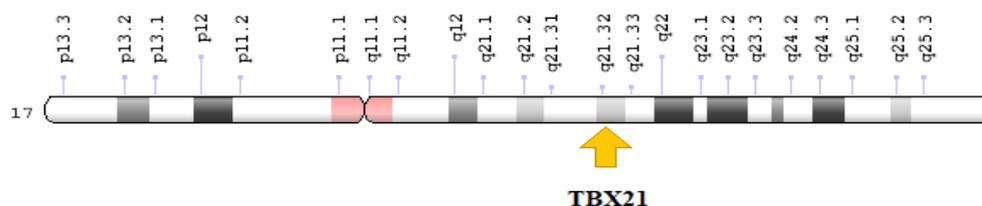
RUNX3 i T-bet, samostalno i u sinergiji, orkestriraju citolitičkim programom Tc1, Th1 i NK loze. RUNX3 nužno je potreban za razvoj CD8+ T stanica, klonalnu ekspanziju i razvoj citotoksičnoga fenotipa u CD8+ efektorima, održavanje funkcijskoga integriteta citotoksične loze i zadržavanje memorijskih CD8+T stanica u tkivu. U suradnji s T-bet, RUNX3 regulira ekspresiju granzima B te potiče ekspresiju EOMES-a i perforina. U odsustvu RUNX3, CD8+T stanice pokazuju smanjenu ekspresiju IFN- γ i granzima B (30).

Nasuprot Tc1, diferencijaciju Tc17 potiču IL6, IL21 i TGF- β . Tc17 stanice proizvode citokine kao što su IL-17, IL-21, a na svojoj površini izražavaju receptor za IL-23. Diferencijacijom Tc17 fenotipa upravljaju transkripcijski faktori ROR γ t i ROR α (31). U usporedbi s Tc1 limfocitima, Tc17 stanice pokazuju nižu ekspresiju transkripcijskih čimbenika EOMES i T-bet. Posljedično proizvode manje citolitičkih enzima smanjena citotoksičnoga učinka (23). U perifernim limfocitima HT oboljelih nedavno je utvrđena povećana ekspresija T-bet (32), EOMES (33) i RUNX3 (rukopis u pripremi) transkripcijskih čimbenika. Štoviše, deregulacija njihove ekspresije povezana je s progresijom bolesti prema hipotireozu, atrofičnoj formi HT i nadomjesnome hormonskom liječenju. Unatoč novim spoznajama i boljem razumijevanju uloge povećane ekspresije gena T-bet, EOMES i RUNX3 u HT patogenezi, uzročni mehanizmi u pozadini nedostatne transkripcijske kontrole ostaju nepoznati.

1.2. PROMOTORSKE I REGULATORNE REGIJE GENA TBX21, EOMES I RUNX3

1.2.1. TBX21

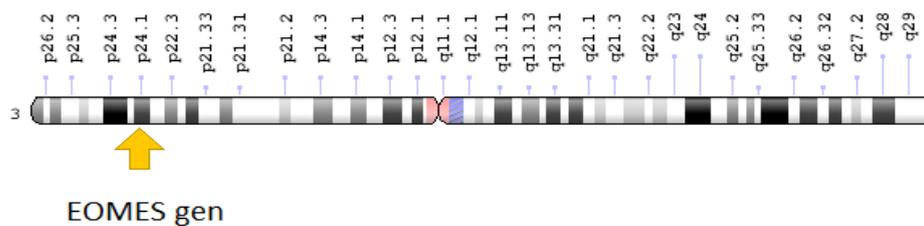
Gen TBX21 i njegov produkt, transkripcijski čimbenik T-bet (TBX21, T-box 21, TBET, TBLYM), regulira razvoj tip I imunološkoga odgovora u stanicama prirodene i stečene imunosti. T bet izravno kontrolira ekspresiju INF- γ , kemokinskoga receptora CXCR3, te inhibira sintezu IL-4, IL-10 i IL-17 i time indirektno suprimira diferencijaciju Th2 i Th17 stanica. Povezan je s razvojem autoimunoga odgovora u HT, ali i u nekim drugim autoimunim bolestima poput multiple skleroze (34), reumatoidnoga artritisa, sistemskoga eritematoznog lupusa, dijabetesa tipa 1, primarne bilijarne ciroze (35) i autoimunoga hepatitisa (36). Gen koji kodira T-bet, TBX21, nalazi se na položaju 17q21.32, odnosno na dugome kraku kromosoma 17 na poziciji 21 te sadržava 6 egzona (37). Sukladno važećoj referentnoj bazi podataka humanoga genoma GRCh38.p12, veličina TBX21 gena iznosi 12,875 nukleotidnih baza (ENSG00000073861), a genska ekspresija pod kontrolom je niza regulatornih elemenata koji se nalaze u promotorskoj regiji, ali i unutar udaljenih uzvodnih 5' i nizvodnih 3' sekvenci. U promotoru gena TBX21 nalaze se vezna mjesta za transkripcijske čimbenike AP-1, STAT1, c-Jun, ATF-2 i c-Fos, (38), ključnih posrednika u prijenosu aktivacijskih i proliferativnih signala koje posreduju upalni citokini IL-2 i IL-12. U distalnoj 5' uzvodnoj regiji (GeneHancer ID GH17I047728) nalaze se sekvencijski motivi za vezanje RUNX3, IRF4, BLIMP1 i drugi transkripcijski faktori koji, pak, imaju važnu ulogu u diferencijaciji i održavanju funkcijskoga kapaciteta efektorskih i memorijskih T staničnih linija (39).



Slika 5. Položaj T-bet gena na kromosomu 17 (Preuzeto i prilagođeno 37).

1.2.2. EOMES

EOMES je transkripcijski čimbenik koji kontrolira diferencijaciju limfocita T i NK stanica (Gene ID: 8320, updated on 11-Mar-2018). Nalazi se na kratkom kraku kromosoma 3 na poziciji 24.1., i ima 6 egzona. Sukladno važećoj referentnoj bazi podataka humanoga genoma GRCh38.p12, veličina EOMES gena iznosi 6,762 baze (ENSG00000163508), a genska ekspresija pod kontrolom je niza regulatornih elemenata koji se nalaze u promotorskoj regiji, ali i unutar udaljenih uzvodnih 5' i nizvodnih 3' sekvenci. U promotoru gena EOMES nalaze se vezna mjesta sljedećih transkripcijskih čimbenika: STAT1 AP-1 STAT1beta STAT1alpha c-Jun ATF-2 Pax-4a (38). Združenim djelovanjem, T-bet i EOMES, ključni su u diferencijaciji i održavanju funkcijskoga kapaciteta citotoksičnih efektorskih i memorijskih CD8+ linija (39).

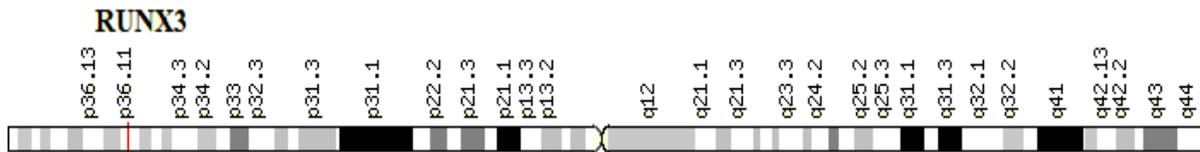


Slika 6. Položaj EOMES gena na kromosomu 3 (Preuzeto i prilagođeno 38).

1.2.3. RUNX3

RUNX3 član je obitelji transkripcijskih čimbenika koji regulira razvoj NKT stanica, kao i efektorskih i memorijskih CD8+ CTL stanica (40). Nalazi se na kratkom kraku kromosoma 1, na poziciji 36.11, te sadrži 6 egzona. Prema referentnoj bazi podataka humanoga genoma GRCh38.p12, veličina RUNX3 gena iznosi 65,610 baza (ENSG00000020633), a genska ekspresija pod kontrolom je niza regulatornih elemenata koji se nalaze u promotorskoj regiji, ali i unutar udaljenih uzvodnih 5' i nizvodnih 3' sekvenci. U promotorskoj regiji gena RUNX3 nalaze se vezna mjesta sljedećih transkripcijskih čimbenika: STAT3, p300, STAT2, STAT1. STAT1 se aktivira pod utjecajem različitih liganda kao što su interferon-alfa, interferon-gama, IL-6, EGF. Nakon vezanja IFN- α na receptore, koji se nalaze

na površini stanice, dolazi do aktivacije JAK/STAT signalnoga puta i posljedične ekspresije ciljnih gena poput RUNX3 (41). RUNX3 izravno upravlja ekspresijom triju glavnih čimbenika efekorskoga CTL programa: INF- γ , granzima B i perforina te, u suradnji s T-bet i EOMES, posreduje u stabilizaciji efekorskih CD8⁺ CTL (40., 41., 42.)



Slika 7. Položaj RUNX3 gena na kromosomu 1 (Preuzeto i prilagođeno 38).

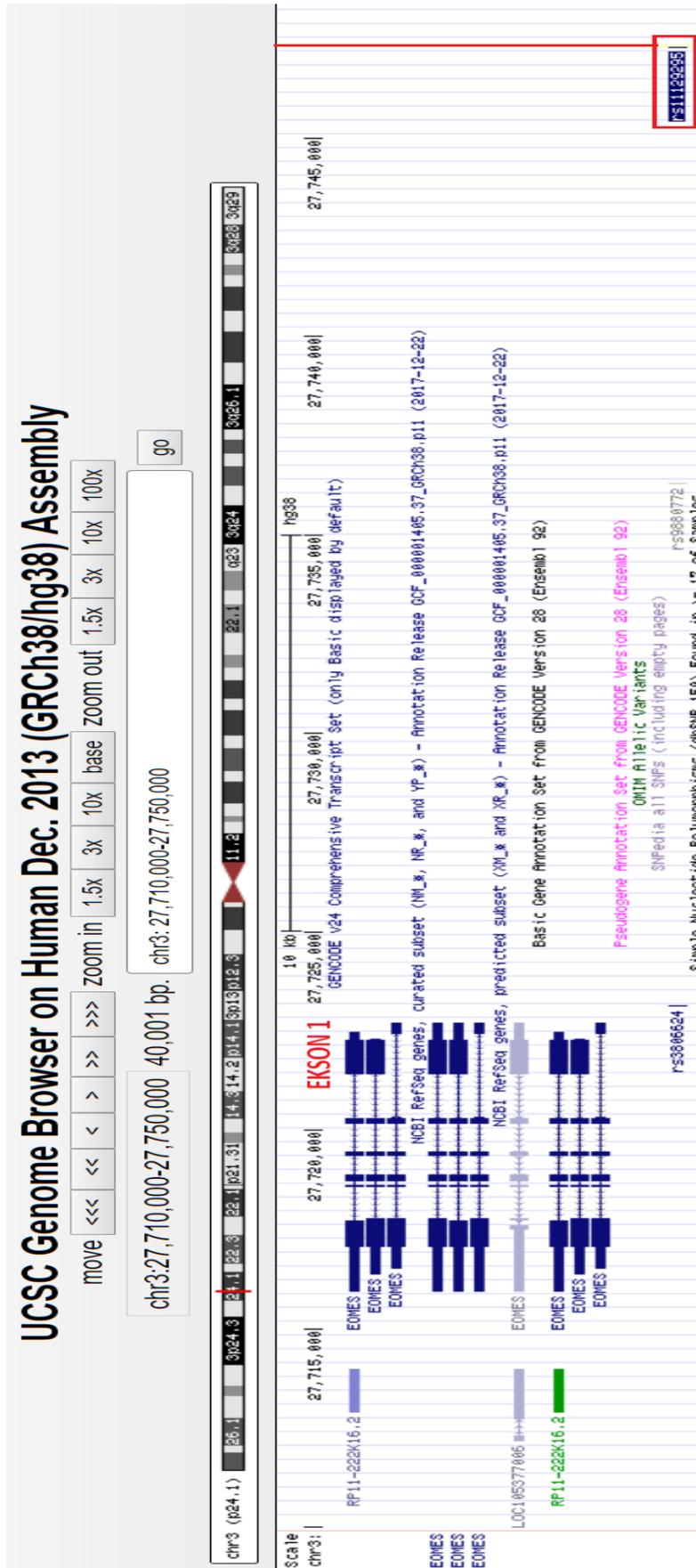
1.3. EKSPRESIJA LOKUSA KVANTITATIVNIH SVOJSTAVA

Ekspresija lokusa kvantitativnih svojstava (eQtl) dolazi od engleskoga izraza *expression quantitative trait loci*. U posljednjih nekoliko godina uložen je veliki napor u analizu funkcije genoma, osobito u kontekstu varijacije genoma. Jedan je od najistaknutijih smjerova eQTL, odnosno otkriće genske varijante koja objašnjava varijaciju na razini genske ekspresije. Bio je to preduvjet za razumijevanje osnovnih procesa regulacije gena te karakterizaciju funkcionalnih sekvencijskih varijacija. eQTL proučava ekspresiju kvantitativnih obilježja lokusa, odnosno analizira varijante ekspresije gena izmjerenih u stanicama i tkivima. Standardna eQTL analiza uključuje izravni test udruživanja genetičke varijacije s razinama ekspresije gena izmjerenih u pojedinca. Jedna je od glavnih prednosti eQTL mapiranja mogućnost prepoznavanja novih funkcionalnih lokusa bez prethodnoga znanja o specifičnim učincima cis i trans-regulatornih regija na ekspresiju ispitivanoga gena (43). eQTL alelne varijante, koje posreduju kvantitativne učinke na razinu ekspresije gena u neposrednoj blizini, opisuju se nazivom cis eQTL. Suprotno tome, trans eQTL polimorfizmi nalaze se izvan regulatornih promotorskih regija ciljnih gena i posredno utječu na regulaciju genske ekspresije. Analizom alelnih varijanti eQTL polimorfizama moguće je identificirati genetičke biljege koji potencijalno moduliraju razinu ekspresije ključnih gena i time doprinose razvoju pojedinih bolesti.

Nedavno je objavljen katalog polimorfni lokusa kvantitativnih svojstava koji moduliraju gensku ekspresiju u CD4+ i CD8+ limfocitima T (44). Među njima, alelne varijante rs4794067, rs11129295 i rs4648889 eQTL posredno sudjeluju u kontroli ekspresije gena RUNX3, EOMES i T-bet (46., 34., 45.). Navedeni bialelni polimorfizmi nalaze se uzvodno od promotorskih sekvenci ciljnih gena i utječu na dinamiku i afinitet vezanja regulatornih transkripcijskih elemenata, poput pojačivača i transkripcijskih čimbenika.

Preciznije, na poziciji chr17:47731462 (GRCh38/hg38), -1993 nukleotidne baze, uzvodno od početnoga mjesta transkripcije gena TBX21, nalazi se polimorfizam rs4794067 (Slika 8). Alelna varijanta „C“ rs4794067 eQTL, izmjenom veznoga mjesta za transkripcijski represor YY1 (od engl. *Ying-Yang 1*), inhibira ekspresiju gena TBX21 (36). Nadalje, 25kb uzvodno od gena EOMES, na poziciji chr3: 27747289 (ENSG00000163508), nalazi se polimorfizam rs11129295 (Slika 9). Inačica „T“ rs11129295 polimorfizma povezana je sa smanjenom transkripcijom EOMES gena (47). Konačno, polimorfizam rs4648889 nalazi se na poziciji chr1: 24967338, -2217 nukleotidnih baza uzvodno od 5' kraja RUNX3 gena (Slika 10). Alelna varijanta „A“ rs4648889 eQTL, posreduje smanjenu ekspresiju gena RUNX3 izmjenom veznoga mjesta za IRF4 u RUNX3 promotorskoj sekvenci (46).

Potencijalno važni učinci brojnih eQTL utvrđeni su u različitim autoimunim oboljenjima (48). Štoviše, alelne varijante rs4648889, rs11129295 i rs4794067 povezane su s razvojem ankilozantnoga spondilitisa (46), multiple skleroze (34) i autoimunoga hepatitisa (36). Unatoč značajnom napretku u katalogizaciji i razumijevanju uloge eQTL u autoimunim oboljenjima, gotovo ništa, međutim, nije poznato o njihovoj ulozi u HT. Jednako tako, u potpunosti je nepoznata uloga i mogući funkcionalni učinak rs4648889, rs11129295 i rs4794067 eQTL u transkripcijskoj kontroli gena RUNX3, EOMES i T-bet u perifernim limfocitima T, HT pacijenata.



Slika 9. Prikaz genetičkog krajolika i položaja polimorfizma rs1129295 u okolici gena EOMES. (USCS Genome Browser (GRCh38/hg38) Assembly).

2. Hipoteza

1. Alelne i genotipske frekvencije rs4648889, rs11129295 i rs4794067 eQTL zdravih i HT oboljelih ispitanika razlikuju se.
2. Alelne i genotipske varijante rs4648889, rs11129295 i rs4794067 eQTL posreduju funkcionalne učinke na ekspresiju gena RUNX3, EOMES i T-bet u perifernim limfocitima T, HT oboljelih.

3. Ciljevi istraživanja

1. Probir DNA uzoraka za formiranje kontrolne i HT skupine ispitanika. Kontrola kvalitete DNA uzoraka, kvantifikacija DNA pomoću Qubit fluorometra.
2. Genotipizacija rs4648889, rs11129295 i rs4794067 polimorfizama lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu na uređaju QuantStudio 5 upotrebom TaqMan proba i početnica.
3. Analiza povezanosti genotipskih varijanti rs4648889, rs11129295 i rs4794067 s ekspresijom gena RUNX3, EOMES i T-bet.

4. Materijali i metode

4.1. ISPITANICI

Istraživanjem je obuhvaćena kolekcija arhivskih DNA uzoraka izoliranih iz periferne krvi punoljetnih, nesrodnih, HT ispitanika i zdravih osoba kojima je u perifernim limfocitima T prethodno izmjerena razina ekspresije gena TBX21, EOMES i RUNX3. Sukladno populaciji prethodno definiranih ispitanika, za genotipizaciju eQTL polimorfizama izabrani su pripadajući uzorci DNA i ustanovljene skupine HT i kontrolnih uzoraka za rs4794067 (HT/CTRL = 30/10), rs11129295 (HT/CTRL = 28/9) i rs4648889 (HT/CTRL = 33/10). Probir ispitanika kontrolne i HT skupine, prikupljanje i izolacija biološkoga materijala (DNA i RNA) te analiza ekspresije gena TBX21, EOMES i RUNX3 prethodno su provedeni u okviru studije koja je odobrena odlukom Etičkoga povjerenstva Kliničkoga bolničkog centra Osijek (Potvrda br. 29-1:9890-11/2007).

4.1.1. Skupina oboljelih od Hashimotova tireoiditisa

Hashimotova bolest definirana je, kako je ranije opisano (49), na temelju pozitivnoga nalaza anti-TPO protutijela u serumu, karakterističnoga ehosonografskog nalaza ultrazvuka štitnjače i citološkoga nalaza kroničnoga limfocitnog tiroiditisa u ciljanoj citološkoj punkciji pod kontrolom ultrazvuka. Isključni kriteriji definirani su kako je ranije navedeno (50., 51). Mjerenje FT4, TSH, volumena štitnjače i TPOAb učinjeno je kako je prethodno opisano (52).

4.1.2. Kontrolna skupina

Kontrolna skupina sastavljena je od odraslih, nesrodnih, zdravih, eutiroidnih ispitanika urednoga nalaza ultrazvuka štitnjače, bez obiteljske anamneze bolesti štitnjače, autoimunih ili endokrinih bolesti, kod kojih je analizom krvi potvrđeno odsustvo anti-TPO protutijela.

4.2. KEMIKALIJE

- Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States)
- TaqMan SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States)
- TaqMan Universal PCR MasterMix II (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD).

4.3. METODE

4.3.1. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA iz periferne krvi HT ispitanika i zdravih kontrola korišten je komercijalni komplet High Pure PCR Template Preparation Kit (RocheDiagnostics, Mannheim, Njemačka) prema uputama proizvođača. Metoda se temelji na svojstvu enzima proteinaze K koja, pomoću pufera za lizu, pospješuje razgradnju staničnih proteina i jezgrene membrane te omogućava vezanje slobodne DNA za silikonsku mrežicu kolekcijske tubice.

Postupak:

U sterilnu tubicu volumena 1,5 mL, u kojoj je izdvojeno 200 µL uzorka pune krvi, dodano je 200 µL pufera za razgradnju proteina i 40 µL vodene otopine proteinaze K. Sadržaj u tubici promiješan je i inkubiran 10 minuta na 70 °C. Nakon inkubacije dodano je 100 µL izopropanola. Smjesa je promiješana i prebačena u tubicu sa silikonskom mrežicom koja je zatim udružena s kolekcijskom tubicom. Nakon centrifugiranja 1 min na 8000 x g, tubica sa silikonskom mrežicom udružena je s novom kolekcijskom tubicom te je dodano 500 µL pufera za uklanjanje inhibitora. Nakon centrifugiranja 1 min na 8000 x g, kolekcijska tubica zamijenjena je novom te je dodano 500 µL pufera za ispiranje i postupak centrifugiranja ponovljen je. Postupak ispiranja ponovljen je dva puta. Ostatak pufera s mrežice uklonjen je dodatnim kratkim centrifugiranjem (10 s, 13000 x g). DNA je eluirana sa silikonske kolone dodatkom 200 µL prethodno zagrijanoga (70 °C) elucijskog pufera centrifugiranjem na 8000 x g, 1 min. Dobiveni eluat prebačen je u obilježenu plastičnu sterilnu tubicu za čuvanje uzoraka volumena 2,0 mL. Svakom uzroku DNA pridružena je jedinstvena identifikacijska oznaka. Eluirana DNA pohranjena je na -20 °C do sljedeće analize.

4.3.2. Kvantifikacija DNA pomoću Qubit fluorometra

Kvantifikacija DNA postupak je određivanja količine i kvalitete izolirane DNA. Čistoća i koncentracija DNA uzorka dobivenoga izolacijom ključna je za sve analitičke korake koji slijede. U odnosu na klasične spektrofotometrijske metode, mjerenje koncentracije DNA fluorescencijskom metodom osigurava povećanu osjetljivost i specifičnost koja je utemeljena na afinitetnom vezanju fluorescentne boje i DNA molekule, dok druge komponente smjese (ostatni proteini, organska otapala) ostaju neobilježene. Na taj način koncentraciju DNA moguće je precizno izmjeriti i u prisutnosti RNA. Dodatna je prednost metode mala potrošnja ispitivanoga DNA materijala. Qubit Fluorometar instrument je koji se koristi za fluorescencijsko mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina i proteina.

Postupak:

Mjerenje koncentracije DNA u ispitivanim uzorcima provedeno je primjenom QUBIT dsDNA Broad Range Assay kompleta sukladno uputama proizvođača. Na samom početku utvrđen je ukupan broj DNA uzoraka za mjerenje, uključujući uzorke poznate koncentracije ili standarde, Std 1 (100 pg/ul) i Std2 (1000 ng/ul). Sljedeći je korak bio pripremanje odgovarajućega volumena Qubit radne otopine miješanjem Qubit™ dsDNA BR reagensa i dsDNA BR pufera u omjeru 1:200. Standardni uzorci pripremljeni su u dvjema odvojenim tubicama miješanjem 190 ul Qubit radne otopine i 10 ul Qubit standarda Std1, odnosno Std2. Potom je u tubice s uzorkom DNA (5 µL) dodana Qubit radna otopina volumena 195 µL. Nakon vorteksiranja 2-3 sekunde, tubice su inkubirane dvije minute na sobnoj temperaturi. Nakon toga, na QUBIT sučelju odabrane su redosljedom dsDNA i Qubit dsDNA BR Assay ikone te je očitana vrijednost fluorescencije u standardima, a zatim i u uzorcima nepoznate koncentracije DNA. U konačnici, koncentraciju DNA u nepoznatim uzorcima Qubit fluorometar određuje automatski prema jednadžbi:



$$c(DNA) = QF \times \frac{200}{X}$$

QF – veličina izmjerene fluorescencije

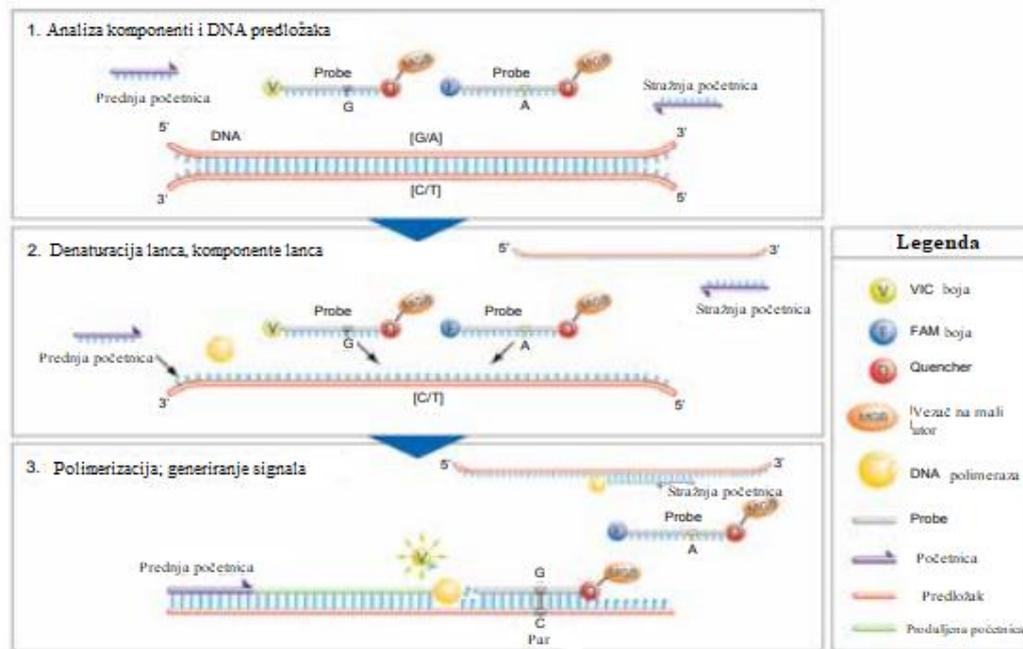
X – volumen DNA uzorka korištena za mjerenje koncentracije DNA

Na temelju izmjerenih vrijednosti koncentracije DNA pripravljena su radna razrjeđenja DNA uzoraka, finalne koncentracije 2 ng/ul, koja su zatim pohranjena na -20°C sve do sljedećega korištenja.

Slika 11. Qubit fluorometar za fluorescencijsko mjerenje koncentracije DNA.

4.3.3. Lančana reakcija polimeraze uz TaqMan probe

Primjena TaqMan proba osigurava brzu i jednostavnu genotipizaciju genskih lokusa u kojima je česta pojava alternativnih nukleotidnih varijanti ili polimorfizma u jednome nukleotidu (SNP, od engl. *Single Nucleotide Polymorphism*). Analiza pojedinačnih nukleotidnih varijanti ili SNP alela započinje amplifikacijom ciljnoga genskog odsječka. Nakon toga slijedi specifično vezanje TaqMan proba koje se temelji na komplementarnosti probe i umnoženoga DNA fragmenta. U tu se svrhu koristi smjesa neobilježenih oligonukleotidnih početnica i dviju TaqMan proba. Svaka je obilježena različitom fluorescentnom bojom i sposobna je vezati specifičnu SNP alelnu varijantu. U kontekstu ciljne sekvence u kojoj se nalazi SNP alel, primjerice xxxxx [A/B] xxxxxx, A alelna varijanta uvijek je obilježena VIC, a B alelna inačica FAM fluorokromom. Tijekom amplifikacije ciljnoga DNA odsječka, TaqMan probe prepoznaju i vežu komplementarne sekvence, a veličina specifičnoga fluorescentnog signala u testnim jažicama omogućava identifikaciju alelna varijante u ispitivanim uzorcima (Slika 12). Popis alel-specifičnih TaqMan proba i pridruženih fluorokroma, koji su korišteni za diskriminaciju alelnih varijanti u ispitivanim uzorcima, nalazi se u Tablici 1.



Slika 12. Prikaz TaqMan PCR-a (preuzeto i prilagođeno 53).

Tablica 1. Popis TaqMan SNP testova i alelnih varijanti ispitivanih eQTL polimorfizama.

Assay ID	SNP ID	Ime gena	Alelne varijante	DNA ciljna sekvenca
C__2826384_20	rs4648889	RUNX3	A -VIC G -FAM	AGGGGCTCCCCCTCCCTGG[A/G]AACCTGAGTC
C__8050724_20	rs11129295	Eomes	C -VIC T -FAM	CAGTTTTCTAACTTCT[C/T]TGTGTCTCAGTTTAT
C__11626504_10	rs4794067	TBX21	C - VIC T -FAM	GGTACGGAGAAATGG[C/T]GGGTAAGGTGTTGG

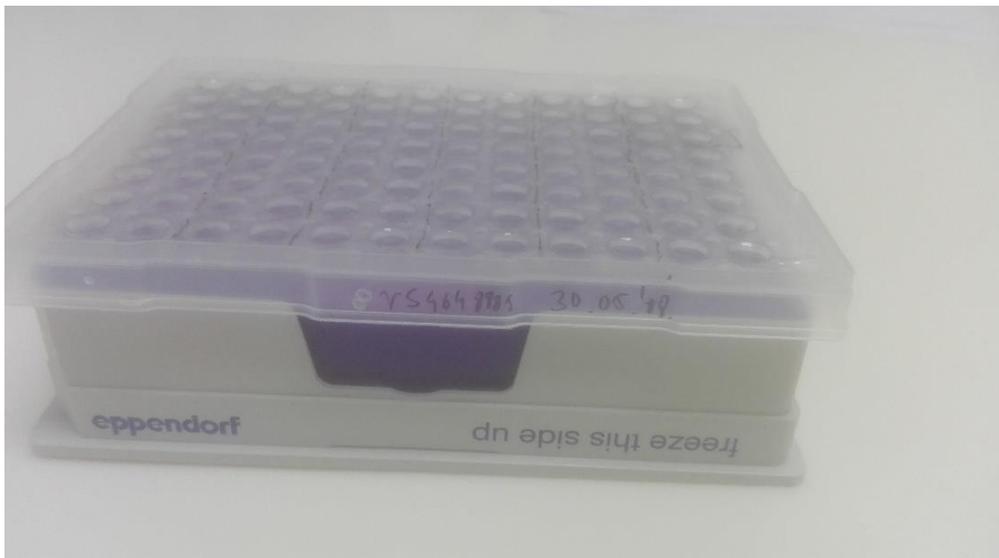
Postupak:

U računalnom programu QuantStudio Design & Analysis Software v 1.3.1 definirani su temperaturni uvjeti PCR reakcije i raspored pipetiranja ispitivanih uzoraka DNA na PCR ploči sukladno shemi na Slici 13. Za genotipizaciju polimorfizama rs4648889, rs11129295 i rs4794067 korišteni su predizajnirani setovi TaqMan proba i početnica (TaqMan SNP Genotyping Assay) te kompletirana PCR smjesa (TaqMan Universal PCR MasterMix II) proizvođača Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD. PCR reakcijska smjesa,

ukupnoga volumena 15 ul, sadržavala je 7,5 ul TaqMan PCR MasterMix-a, 0,75 ul specifičnoga kompleta TaqMan proba i početnica te 6,75 ul DNA razrjeđenja finalne koncentracije 2ng/ul. Povrh pripremljene PCR ploče zalijepljena je prozirna plastična folija i ploča je centrifugirana 1 min na 3000 rpm (Slika 14). Amplifikacija DNA materijala provedena je u QuantStudio 5 PCR uređaju (Slika 15). tijekom ponavljajućih ciklusa zagrijavanja i hlađenja PCR smjese prema unaprijed zadanom temperaturnom protokolu (Tablica 2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	56	56	62	62	793	793	74	74	31	31	803	803
B	64	64	66	66	732	732	63	63	77	77	NC	NC
C	79	79	737	737	807	807	68	68	82	82		
D	67	67	65	65	26	26	88	88	93	93		
E	808	808	27	27	817	817	735	735	97	97		
F	28	28	94	94	57	57	739	739	98	98		
G	25	25	80	80	34	34	1	1	728	728		
H	76	76	819	819	61	61	3	3	730	730		

Slika 13. Prikazuje mikrotitarsku ploču.



Slika 14. Mikrotitarska ploča koja sadrži MMX i DNA. Nakon što programiramo PCR prema tablici 2., ploča je spremna za analizu.



Slika 15. QuantStudio 5 real-time PCR uređaj.

Tablica 2. Prikaz temperaturnih uvjeta PCR reakcije.

		Temperatura	Vrijeme
Pre-Read stage		60 °C	30 s
Hold		95 °C	10 min
PCR Stage (40 cycles)	Denature	95 °C	15 s
	Anneal/extend	60 °C	1 min
Post-Read Stage		60 °C	30 s

4.3.4. Identifikacija alelnih varijanti u post-PCR fazi analize

U post-PCR fazi istraživanja alelne varijante ispitivanih polimorfizama određene su pomoću računalnoga alata QuantStudio Design & Analysis Software v.1.3.1. Tom prilikom korišten je automatski algoritam za usporedbu vrijednosti fluorescencije VIC i FAM reporter boje izmjerenih na početku („Pre-Read Stage“) i kraju („Post-PCR Stage“) PCR reakcije.

Podaci o fluorescenciji reporter boja u svakom uzorku normalizirani su u odnosu na intenzitet pozadinske boje, ROX, i zatim su korišteni u izračunu razlike u fluorescenciji ili ΔR_n prema sljedećoj formuli:

$$\Delta R_n = R_n \text{ (post-PCR očitavanje)} - R_n \text{ (pre-PCR očitavanje)},$$

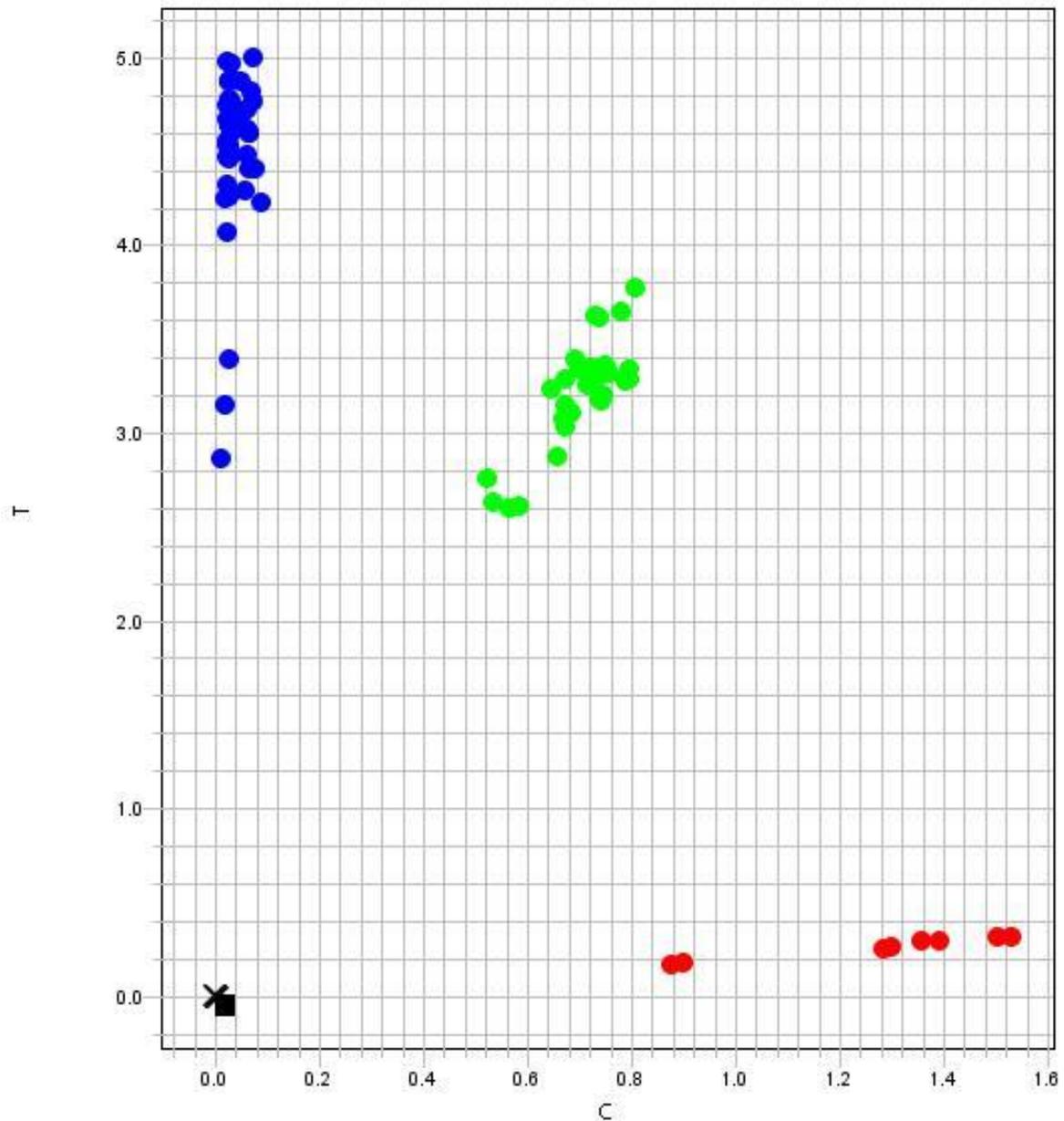
R_n = normalizirana vrijednost reporter boje (VIC ili FAM)

Alelne varijante u svakom ispitivanom uzorku određene su na temelju razlike u intenzitetu normaliziranih vrijednosti fluorescencije reporter boja VIC i FAM kao identifikacijskih biljega alela 1 i 2. Za prikaz rezultata korištena je grafička analiza pri čemu su normalizirane vrijednosti VIC signala, $R_n(\text{VIC})$, raspodijeljene horizontalno na osi X, $R_n(\text{FAM})$ očitavanja vertikalno na osi Y, a kombinirani signal VIC i FAM reporter boja dijagonalno (Slika 16 -18). U konačnici, genotip svakoga ispitivanog uzorka automatski je određen na temelju algoritma koji je opisan u Tablici 3.

Tablica 3. Algoritam za tumčenje rezultata alelne analize na uređaju QuantStudio5.

Značajno povećanje intenziteta boje:	Grupiranje podataka:	Interpretacija
VIC	Horizontalna (X) os	Homozigot za alel 1
FAM	Vertikalna (Y) os	Homozigot za alel 2
VIC i FAM	Dijagonalno	Heterozigot (alel 1 i alel 2)

Allelic Discrimination Plot

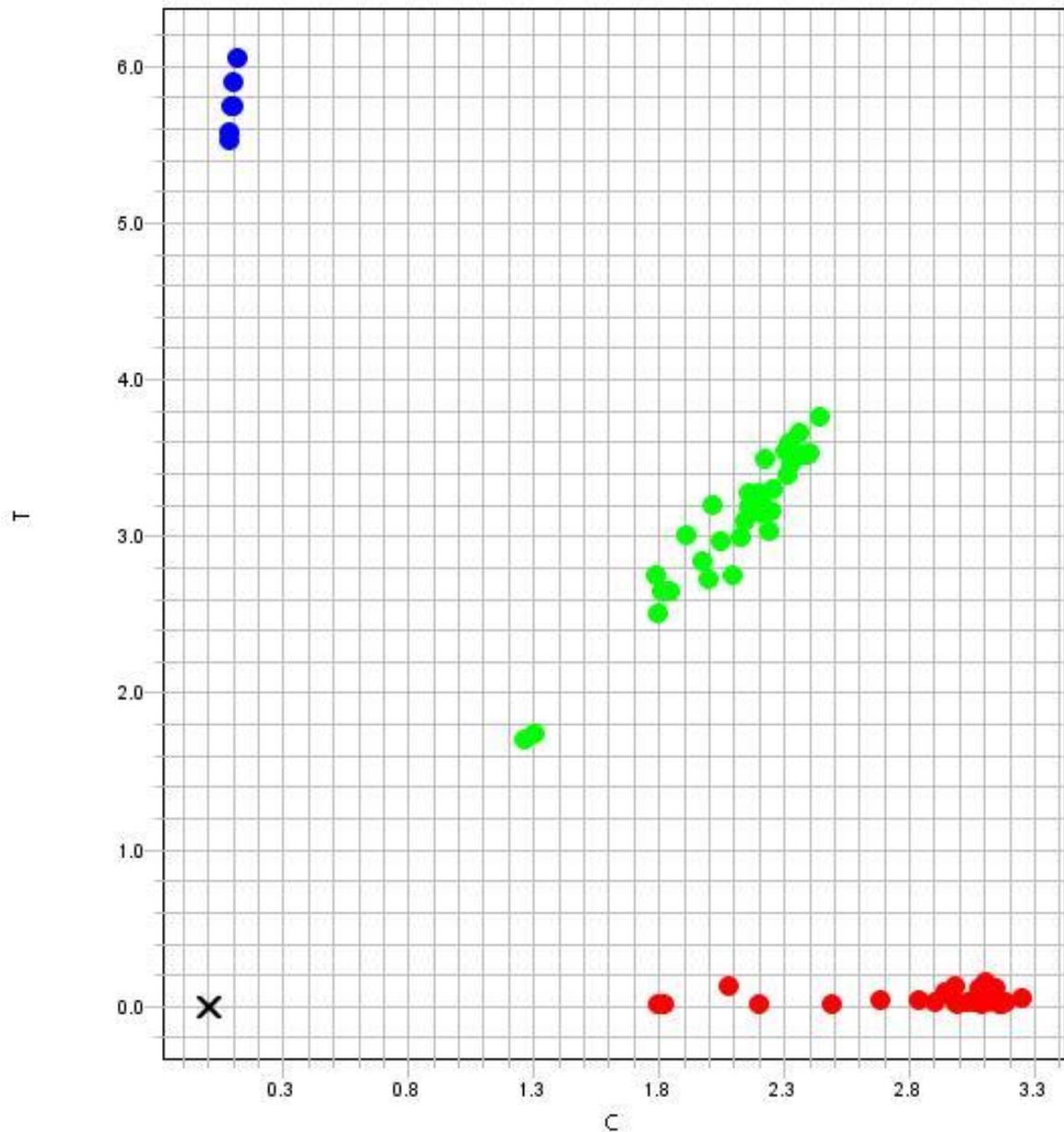


Legend

- Homozygous C/C ● Homozygous T/T
- Heterozygous C/T X Undetermined

Slika 16. Analiza rs4794067 alelne diskriminacije na uređaju QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.

Allelic Discrimination Plot

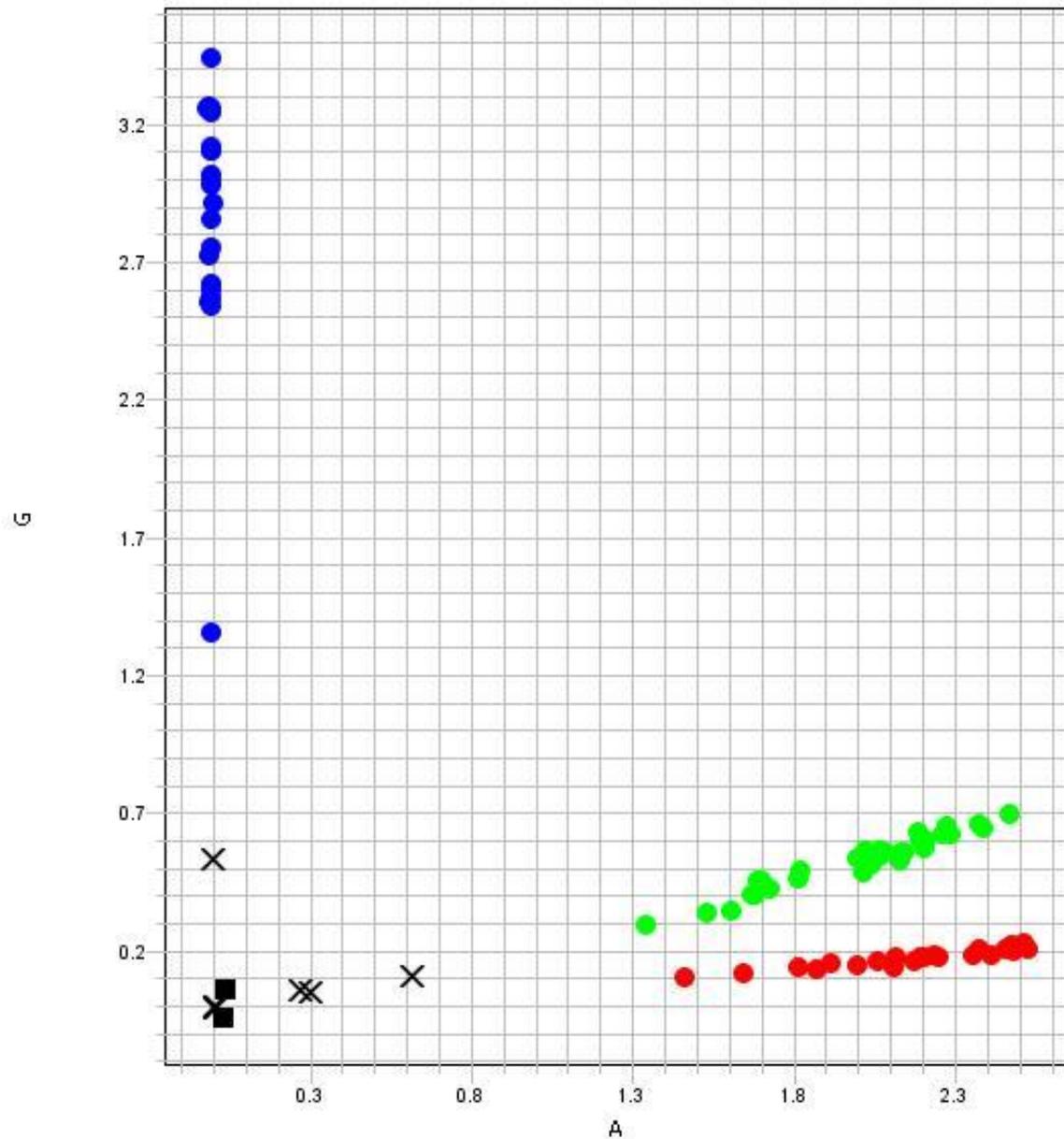


Legend

- Homozygous C/C
- Homozygous T/T
- Heterozygous C/T
- X Undetermined

Slika 17. Analiza rs11129295 alelne diskriminacije na uređaju QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.

Allelic Discrimination Plot



Legend

- Homozygous A/A
- Homozygous G/G
- Heterozygous A/G
- × Undetermined

Slika 18. Analiza rs4648889 alelne diskriminacije na uređaju QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.

4.3.5. Statistička obrada podataka

Ako nije drugačije naznačeno, statistička analiza rezultata učinjena je računalnim programom NCSS2007 (v07.1.20, NCSS LLC, Kaysville, Utah, SAD). Kategoričke varijable prikazane su apsolutnim frekvencijama i proporcijama za sva neovisna mjerenja, a omjerne varijable medijanom s interkvartilnim rasponom (IQR). Hardy-Weinberg ravnoteža genotipskih frekvencija testirana je egzaktnim Guo-Thompson testom (PyPopWin32-0.7.0, University of Berkely, Berkely, CA, SAD) koristeći se Markovljevim lancem Monte Carlo. Normalnost distribucije procijenjena je Shapiro-Wilk testom. Za testiranje razlika neovisnih skupina korišteni su Fisher-Freeman-Halton exact, Wilcoxon-Mann-Whitney i Kruskal-Wallis test s post-hoc Bonferroni-Dunn procedurom. Dvostrani $p < 0.05$ predstavlja prag značajnosti. Za grafički prikaz korišten je *ggpubr* paket za R program v3.4.1 (<http://www.R-project.org>).

5. REZULTATI

5.1. Opća deskriptivna analiza ispitanika

Ukupna kolekcija ispitivanih DNA uzoraka organizirana je u tri skupine, sukladno prethodno definiranim grupama ispitanika kod kojih je izmjerena razina ekspresije gena TBX21, EOMES i RUNX3. Demografska obilježja, kliničke i biokemijske karakteristike formiranih skupina ispitanika opisane su medianom s pripadajućim interkvartilnim rasponom (Tablice 4 – 6). S obzirom na veličinu skupina i odstupanja od normalne distribucije, usvojen je neparametrijski pristup u analizi omjernih varijabli. Hashimotov tireoiditis dijagnosticiran je na temelju prisutnosti anti-TPO-Ab (kIU/L) u serumu, karakterističnih ehosonografskih nalaza ultrazvuka štitnjače i/ili povišenih vrijednosti serumskoga TSH. Sukladno učincima povratne sprege na relaciji hipofiza – štitnjača, većina HT ispitanika pokazuje značajno povišene vrijednosti serumskoga TSH, a razine FT4 hormona uglavnom se nalaze na donjoj granici referentnoga raspona (10.0 – 28.2 pmol/L). Značajna razlika u volumenu štitnjače između oboljelih i zdravih ispitanika nije zabilježena. Jednako tako, nisu uočene značajne razlike u dobi i omjeru muških i ženskih ispitanika (ref) među skupinama (52).

Tablica 4. Kliničke i biokemijske karakteristike populacije ispitanika u kojih je učinjena analiza ekspresije gena TBX21 i genotipizacija eQTL rs4794067.

Skupine	N	Volumen (mL)	FT4 (pmol/L)	TSH (mIU/L)	Dob (god)	TPOAt (kIU/L)
HT	30	14.6 (10.2 – 19)	12 (11.1 – 14)	3.2 (1.73 – 5.93)	55 (42 – 62)	515 (112 – 1683)
Kontrolni ispitanici	11	11.8 (9.7 – 12.7)	14 (12.4 – 15.5)	1.63 (0.93 – 2.43)	43 (37 – 58)	neg
P, Mann – Whitney test		0.275	0.068	0.0093	0.222	–

N – broj analiziranih ispitanika

P – statistički značajan rezultat istaknut je podebljanim fontom ; prag značajnosti $P < 0.05$

TSH referentni raspon – 0.465 – 4.68 mIU/L

FT4 referentni raspon – 10.0 – 28.2 pmol/L

Tablica 5. Kliničke i biokemijske karakteristike populacije ispitanika kod kojih je analizirana ekspresija gena EOMES i genotipizacija eQTL rs11129295.

Skupine	N	Volumen (mL)	FT4 (pmol/L)	TSH (mIU/L)	Dob (god)	TPOAt (kIU/L)
HT	28	13.8 (11.1 – 17.5)	11.7 (11.3 – 14.7)	3.45 (2.03 – 7)	60 (46 – 64)	849 (156 – 3000)
Kontrolni ispitanici	9	11.8 (11 – 13)	12.4 (11.5 – 13.4)	1.5 (0.96 – 2.47)	42 (39 – 55)	neg
P, Mann – Whitney test		0.043	0.583	0.013	0.089	–

N- broj analiziranih ispitanika

P- statistički značajan rezultat istaknut je podebljanim fontom; prag značajnosti $P < 0.05$

TSH referentni raspon- 0.465 – 4.68 mIU/L

FT4 referentni raspon- 10.0 – 28.2 pmol/L

Tablica 6. Kliničke i biokemijske karakteristike populacije ispitanika kod kojih je analizirana ekspresije gena RUNX3 i genotipizacija eQTL rs4648889.

Skupine	N	Volumen (mL)	FT4 (pmol/L)	TSH (mIU/L)	Dob (god)	TPOAt (kIU/L)
HT	33	13.8 (10.6 – 16.3)	12 (11.3 – 13.6)	3.51 (2.17 – 6.67)	57 (43 – 64)	526 (155 – 1451)
Kontrolni ispitanici	10	13 (11.6 – 13.5)	12.4 (10.7 – 14.6)	1.5 (1.06 – 2.56)	48 (40 – 62)	neg
P, Mann – Whitney test		0.489	0.595	0.0077	0.481	–

N- broj analiziranih ispitanika

P- statistički značajan rezultat istaknut je podebljanim fontom; prag značajnosti $P < 0.05$

TSH referentni raspon- 0.465 – 4.68 mIU/L

FT4 referentni raspon- 10.0 – 28.2 pmol/L

5.2. Distribucija alela i genotipova eQTL polimorfizama

Analiza učestalosti alelnih i genotipskih varijanti polimorfizama rs4794067, rs11129295 i rs4648889 provedena je u uzorcima DNA koji su probrani i organizirani u tri skupine sukladno kriterijima i uvjetima opisanima u poglavlju 4.1. Učestalost alelnih i genotipskih varijanti u svakoj skupini ispitanika određena je izravnim brojenjem i prikazana postotnim udjelom u odnosu na ukupni broj utvrđenih alela i genotipova.

Tablica 7. Učestalost alelnih i genotipskih varijanti eQTL polimorfizama rs4794067, rs11129295 i rs4648889 u populaciji HT ispitanika i zdravih osoba.

		SNP						
		rs4794067		rs11129295		rs4648889		
		HT (n=30)	Kontrole (n=11)	HT (n=28)	Kontrole (n=9)	HT (n=33)	Kontrole (n=10)	
Genotip	CC	2	2	13	4	AA	9	2
	CT	11	5	12	5	AG	14	6
	TT	17	4	3	0	GG	10	2
FHH, p		0.298		0.745		0.722		
P (HWE)*		0.712		1		0.76		
Alel	C	24 (0.292)		51 (0.689)		A	42 (0.512)	
N (%)	T	58 (0.712)		23 (0.311)		G	44 (0.488)	
Alelni Fisher p		0.18		1		1		

* Guo – Thompson exact test, p – prag značajnosti $P < 0.05$

FHH, p – Fisher – Freeman – Halton test, p – vrijednost

HWE – Hardy – Weinberg equilibrium,

N (%) – broj (postotni udio) zabilježenih alelnih varijanti u ukupnoj populaciji ispitanika (HT+CTRL)

Učestalost genotipova svih studiranih bialelnih polimorfizama nalazi se u Hardy – Weinberg ravnoteži. Najzastupljeniji genotip polimorfizma rs4794067 „TT“ (21 \approx 1/2 ukupne populacije, n=41) zabilježen je u 17 HT (>1/2 ispitivane HT populacije, n=30), odnosno četiri zdrava ispitanika (\approx 1/3 ispitivane kontrolne populacije, n=11). U ostatku je ukupne populacije

16 (39,2%; >1/3) heterozigota genotipa „CT“ i 4 (9,75%, ≈1/10) homozigota genotipa „CC“. Statistički značajna razlika u raspodjeli genotipskih varijanti rs4794067 u odnosu na case – control status nije zabilježena (FHH test, P=0.298, Tablica 7).

Nadalje, genotipske varijante polimorfizma rs11129295, „CC“ i „CT“, podjednako su zastupljene u HT i kontrolnoj skupini i zabilježene su u 91,8% ukupne populacije. Najmanje zastupljena varijanta „TT“ (≈1/12 ukupne populacije) u potpunosti je nezapažena u zdravim kontrolama, a u HT skupini zabilježena je tek kod triju ispitanika. Značajne razlike u raspodjeli genotipskih varijanti polimorfizma rs11129295 u HT oboljelih i zdravih kontrola nisu zabilježene (FHH test, P=0.745, Tablica 7).

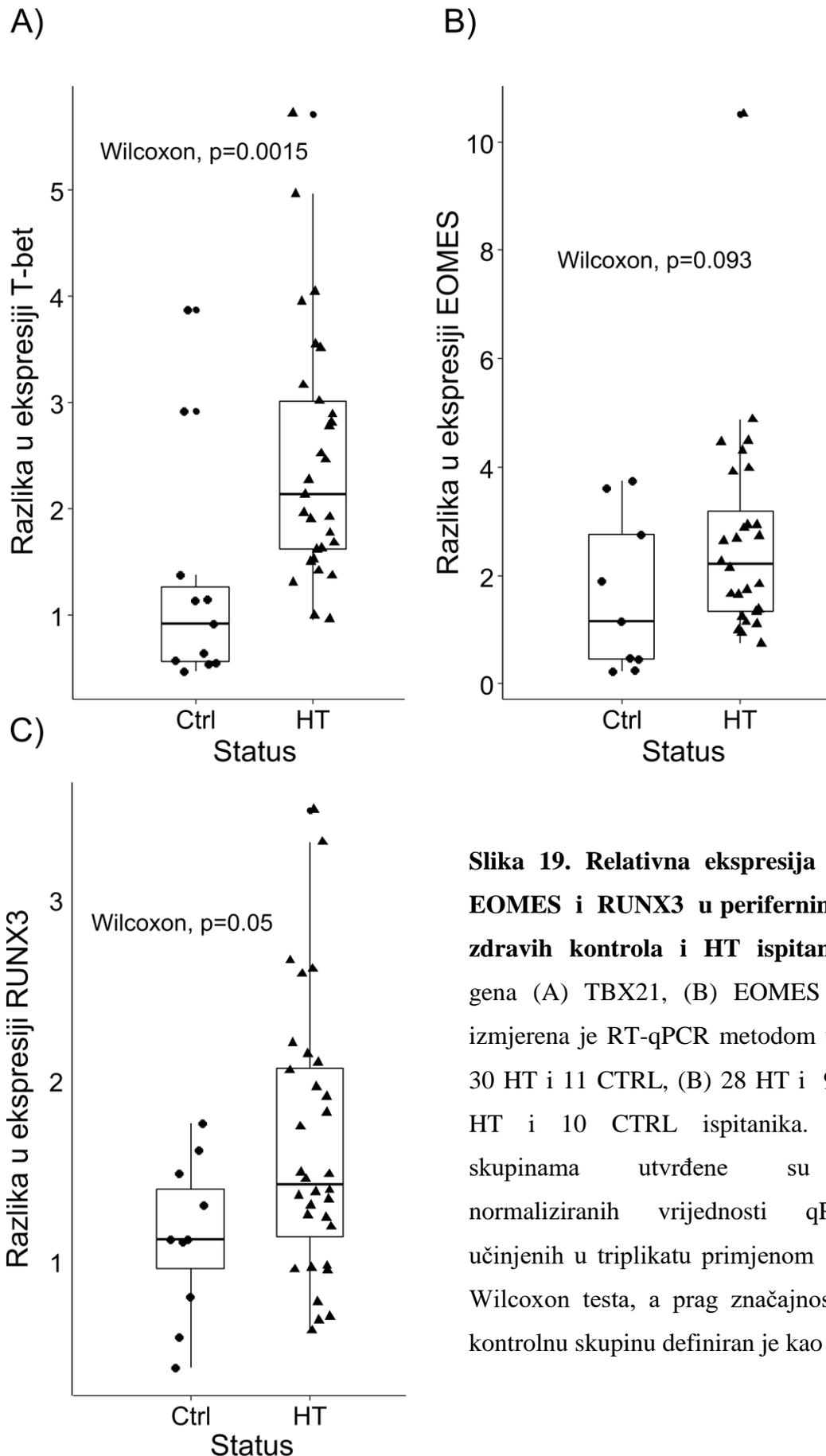
Analizom polimorfizma rs4648889 u ukupnoj populaciji ispitanika zabilježeno je 46,5% heterozigota „AG“ te podjednak udio homozigota genotipa „AA“ (25,6%, ≈1/4) i „GG“ (27,9%, ≈1/4). Značajne razlike u raspodjeli genotipskih varijanti rs4648889 u odnosu na case – control status nisu zabilježene (FHH test, P=0.722, Tablica 7).

Učestalost svih ispitivanih alelnih varijanti približno nalikuje frekvencijama zabilježenim u okviru međunarodnoga istraživačkog projekta „1000 Genome Project“. Učestalost alelnih varijanti polimorfizma rs4794067, C (29,2%) i T (71,2%) približno dostiže vrijednosti zabilježene „1000 Genome“ projektom (C=23,8%; T=76,1%), a slično vrijedi za alelne varijante rs11129295 (1000 Genome: C=63,7%; T=36,3%) i rs 4648889 (1000 Genome: A=49,1%; G=50,8%).

Statističkom analizom nije zabilježena značajna povezanost testiranih alelnih varijanti ispitivanih polimorfizama i case – control statusa, što je djelomično i posljedica maloga broja uzoraka.

5.3. Ekspresijski profili gena TBX21, EOMES i RUNX3

Relativna razina ekspresije gena TBX21 (Slika 19A), EOMES (Slika 19B) i RUNX3 (Slika 19C) utvrđena je primjenom kvantitativne RT – qPCR metode kako je ranije opisano (33). Dobivene vrijednosti normalizirane su u odnosu na TBP referentni gen, a razlike u razini mRNA u HT i kontrolnim ispitanicima utvrđene su $\Delta\Delta C_t$ metodom kako su opisali Livak i sur. (54).

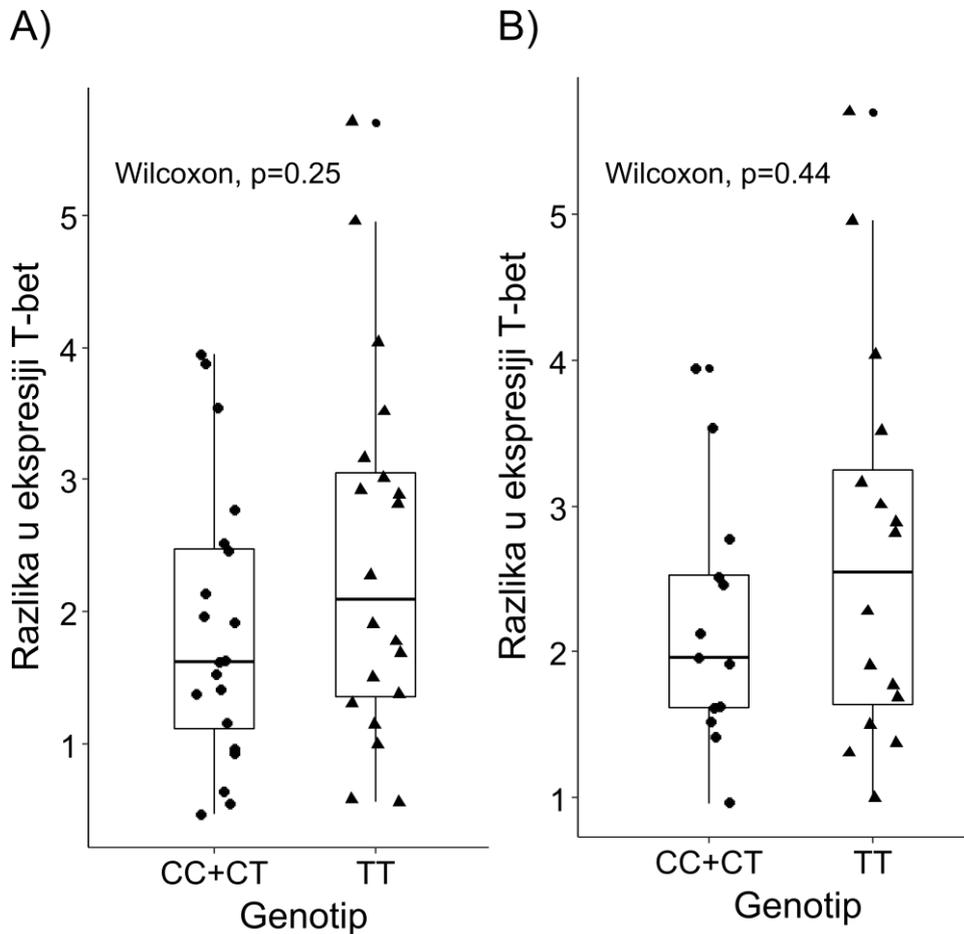


Slika 19. Relativna ekspresija gena TBX21 , EOMES i RUNX3 u perifernim limfocitima T zdravih kontrola i HT ispitanika. Ekspresija gena (A) TBX21, (B) EOMES i (C) RUNX3 izmjerena je RT-qPCR metodom u populaciji (A) 30 HT i 11 CTRL, (B) 28 HT i 9 CTRL, (C) 33 HT i 10 CTRL ispitanika. Razlike među skupinama utvrđene su usporedbom normaliziranih vrijednosti qPCR mjerenja učinjenih u triplikatu primjenom metode $\Delta\Delta Ct$ i Wilcoxon testa, a prag značajnosti u odnosu na kontrolnu skupinu definiran je kao $P < 0.05$.

U odnosu na kontrolne ispitanike (CTRL), kod oboljelih od HT bolesti značajno je povišena razina mRNA ekspresije gena TBX21 [CTRL vs HT; median 0.93 (IQR (0.55 – 1.38) vs 2.13 (1.57 – 3.09); P=0.0015] (slika 19A) i RUNX3 [1.12 (IQR (0.8 – 1.49) vs 1.42 (1.03 – 2.09); P=0.05] (Slika 19C).

Značajna razlika u ekspresiji gena EOMES između zdravih kontrola [1.15 (IQR (0.36 – 9.19)] i HT ispitanika [2.21 (1.33 – 3.67); P=0.093] nije zabilježena (Slika 19B). Izostanak značajne razlike može se objasniti smanjenjem populacije ispitanika u odnosu na populaciju u kojoj je prethodno zabilježena značajna razlika u ekspresiji gena EOMES (39). Redukcija broja ispitanika u ovom diplomskom radu posljedica je nedostatka DNA materijala za usporednu analizu genske ekspresije i alelnih varijanti eQTL lokusa.

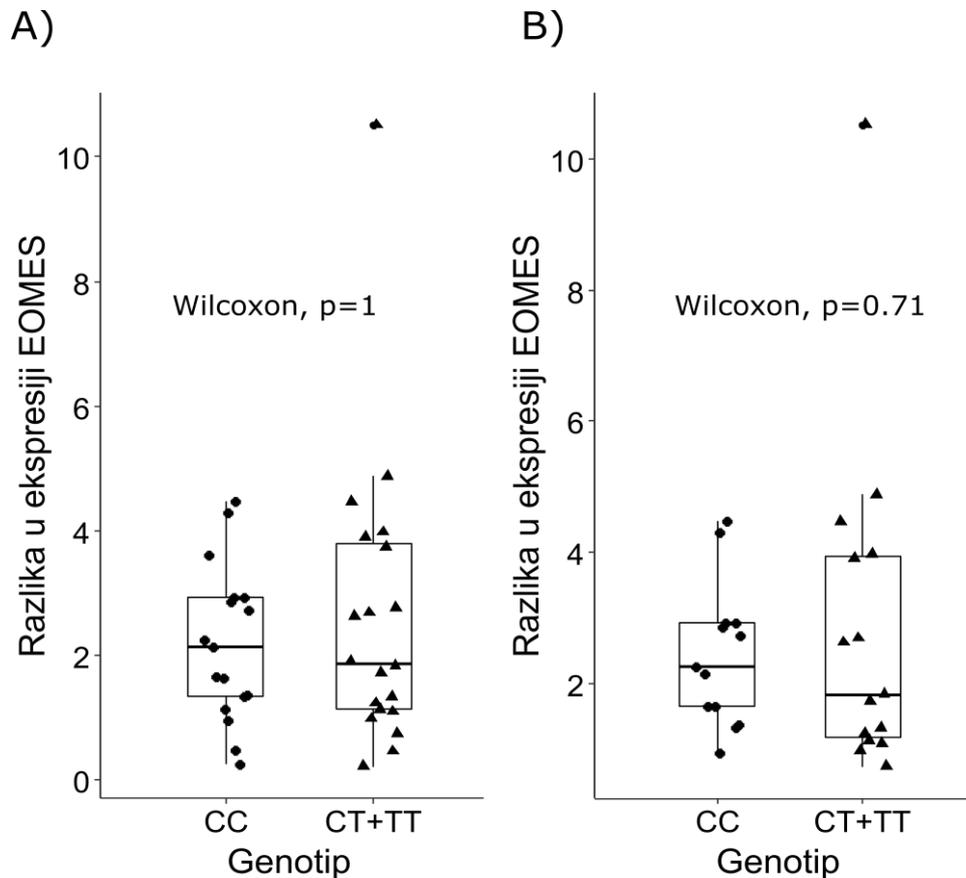
5.4. Kvantitativni učinci polimorfizma rs4794067 na ekspresiju gena TBX21



Slika 20. Genotip- specifični učinci polimorfizma rs4794067 na ekspresiju gena T-bet. Povezanost relativne ekspresije gena T-bet i genotipskih varijanti eQTL rs4794067 u (A) ukupnoj populaciji ispitanika (HT+CTRL; N=41) i (B) HT oboljelima (N=30) prikazana je pravokutnim ili box-plot dijagramom. Crta unutar pravokutnika označava median, a gornje i donje vertikalne linije 1.5xIQR. Prema Tukey-u, ekstremne vrijednosti označene su točkom. Razlike među skupinama testirane su Wilcoxonovim testom i prag značajnosti definiran je kao $P < 0.05$ (55).

Povezanost genotipskih varijanti polimorfizma rs4794067 i ekspresije T-bet gena analizirana je u ukupnoj populaciji ispitanika (HT+CTRL) (Slika 20A). Zbog maloga broja opažanja genotipa „CC“ (n=2), prikazani rezultati obuhvaćaju pulirani uzorak ispitanika genotipa „CC“ i „CT“. U odnosu na „CC+CT“ skupinu (median; $M_e = 1.62$ (IQR (1.01 – 2.51)), ispitanici „TT“ genotipa pokazuju trend povećane ekspresije gena T-bet ($M_e = 2.09$ (1.33 – 3.13)), ali statistički značajna razlika nije zabilježena ($P=0.25$). U populaciji HT oboljelih (Slika 20B) uočen je sličan stupanj razlike koja također ne dostiže statistički značajnu vrijednost („TT“ vs „CC+CT“; 2.54 (1.55 – 3.43) vs 1.96 (2.57 – 2.65), $P=0.44$).

5.5. Kvantitativni učinci polimorfizma rs1129295 na ekspresiju gena EOMES

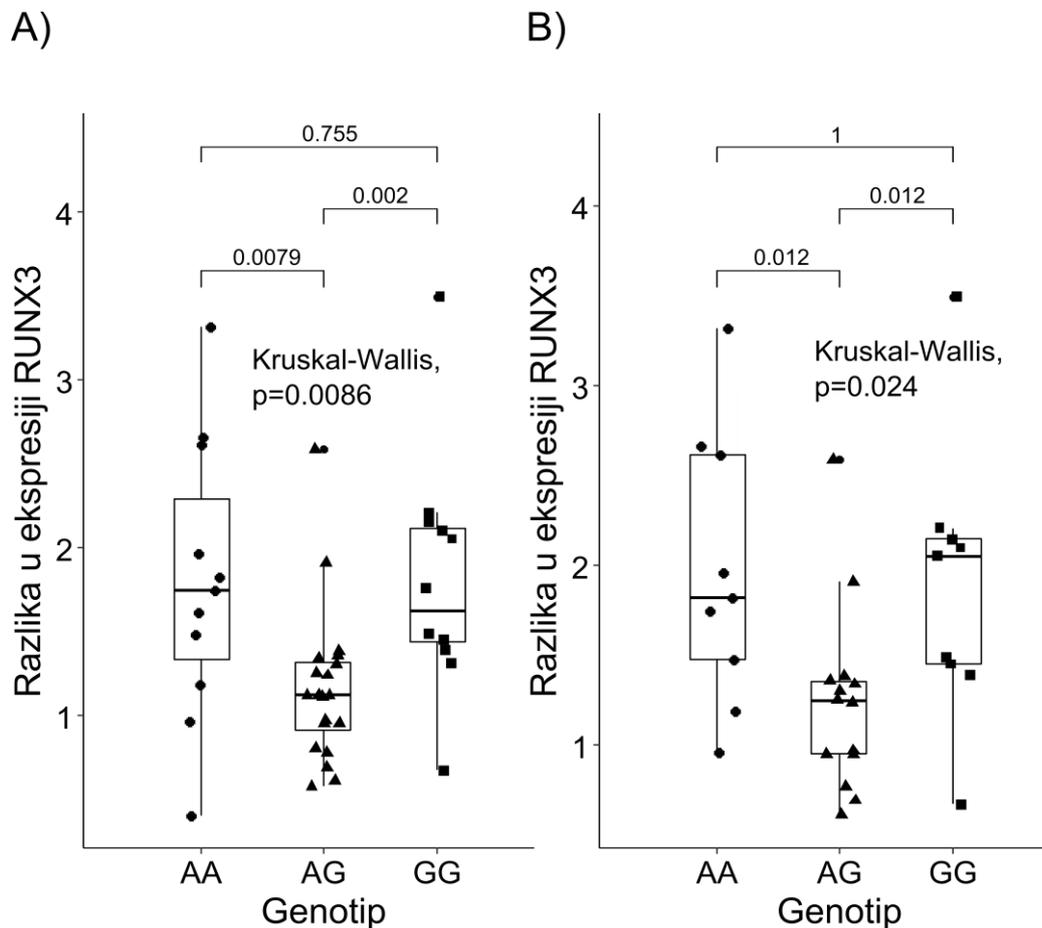


Slika 21. Genotip- specifični učinci polimorfizma rs1129295 na ekspresiju gena EOMES. Povezanost relativne ekspresije gena EOMES i genotipskih varijanti eQTL rs1129295 u (A) ukupnoj populaciji ispitanika (HT+CTRL; N=37) i (B) HT oboljelima (N=28) prikazana je pravokutnim ili box-plot dijagramom. Crta unutar pravokutnika označava median, a gornje i donje vertikalne linije 1.5xIQR. Prema Tukey-u, ekstremne vrijednosti označene su točkom. Razlike među skupinama testirane su Wilcoxonovim testom i prag značajnosti definiran je kao $P < 0.05$.

Prikazana je povezanost genskih varijanti polimorfizma rs1129295 i relativne ekspresije gena EOMES u ukupnoj populaciji ispitanika (Slika 21A) i HT oboljelih (Slika 21B). Zbog maloga broja opažanja genotipa „TT“ (n=3), prikazani rezultati obuhvaćaju pulirani uzorak ispitanika genotipa „CT“ i „TT“. U ukupnoj populaciji ispitanika, statistički značajna razlika između testiranih skupina nije zabilježena („CC“ vs „CT+TT“; 2.15 (1.25 – 2.93) vs 1.87 (1.11 – 3.87), $P=1$). Jednako tako, u HT skupini ispitanika nema razlike u

ekspresiji gena EOMES između ispitanika „CC“ (2.26 (1.51 – 2.93)) i „CT+TT“ (1.84 (1.14 – 3.98)) genotipa ($P=0.71$).

5.6. Kvantitativni učinci polimorfizma rs4648889 na ekspresiju gena RUNX3



Slika 22. Genotip- specifični učinci polimorfizma rs4648889 na ekspresiju gena RUNX3.

Povezanost relativne ekspresije gena RUNX3 i genotipskih varijanti eQTL rs4648889 u (A) ukupnoj populaciji ispitanika (HT+CTRL; $N=43$) i (B) HT oboljelima ($N=33$) prikazana je pravokutnim ili box-plot dijagramom. Crta unutar pravokutnika označava median, a gornje i donje vertikalne linije $1.5 \times IQR$. Prema Tukey-u, ekstremne vrijednosti označene su točkom. Razlike među skupinama testirane su Kruskal – Wallis testom s post – hoc Bonferroni – Dunn procedurom, a prag značajnosti za parne komparacije definiran je kao $P < 0.017$.

Prikazana je povezanost genskih varijanti polimorfizma rs4648889 i ekspresije gena RUNX3 u ukupnoj populaciji ispitanika (Slika 22A). Ispitanici genotipa „AG“ pokazuju

statistički značajno smanjenu ekspresiju gena RUNX3 (median (IQR); 1.12 (0.84 – 1.33) u odnosu na homozigote genotipa „AA“ [1.74 (1.19 – 2.62), $P=0.0079$] ili „GG“ [1.63 (1.41 – 2.14), $P=0.002$]. Istovremeno nema značajne razlike u ekspresiji gena RUNX3 između ispitanika „AA“ i „GG“ genotipa ($P=0.98$). Sličan obrazac raspodjele genotipova u odnosu na ekspresiju gena RUNX3 zabilježen je i u HT skupini ispitanika (Slika 22B) gdje homozigoti genotipa „AA“ [1.82 (1.33 – 2.64), $P=0.012$] i „GG“ [2.05 (1.42 – 2.18), $P=0.012$] pokazuju značajno povećanu ekspresiju gena RUNX3 u odnosu na ispitanike genotipa „AG“ [1.24 (0.9 – 1.37)]. Značajna razlika u ekspresiji gena RUNX3 između HT ispitanika genotipa „AA“ i „GG“ nije zabilježena ($P=1$).

6. RASPRAVA

U studiji je istražena povezanost alelnih i genskih varijanti polimorfizma rs4648889 rs11129295 i rs4794067 s razinom ekspresije gena RUNX3, EOMES i T-bet u perifernim limfocitima T, HT oboljelih i zdravih ispitanika. U istraživanje je uključena kolekcija arhivskih uzoraka DNA koji su podijeljeni u tri skupine, sukladno prethodno definiranim grupama ispitanika kod kojih je izmjerena razina ekspresije gena TBX21, EOMES i RUNX3. Povišena razina ekspresije gena T-bet (32), EOMES (33) i RUNX3 (rukopis u pripremi) prethodno je zabilježena u perifernim T limfocitima HT oboljelih i povezana s razvojem hipotireoze, atrofije žljezdanoga tkiva i razinom nadomjesne hormonske terapije. Unatoč boljem razumijevanju uloge navedenih transkripcijskih čimbenika u razvoju HT bolesti, mehanizmi u pozadini regulacije genske ekspresije ostaju nepoznati.

Nedavno je opisana uloga velikoga broja lokusa kvantitativnih svojstava u kontroli genske ekspresije. Među njima ustanovljena je povezanost alelnih varijanti polimorfizama rs4648889, rs11129295 i rs4794067 s razinom mRNA ekspresije gena RUNX3, EOMES i T-bet (46., 34., 56.)

U namjeri ispitivanja uloge kvantitativnih učinaka navedenih eQTL lokusa u razvoju HT bolesti, provedena je genotipizacija i analiza povezanosti pojedinačnih nukleotidnih varijanti polimorfizama rs4648889, rs11129295 i rs4794067 eQTL u zdravih ispitanika i HT oboljelih. U prvom koraku analize rezultata provjereno je nalazi li se učestalost genotipskih varijanti ispitivanih polimorfizama u Hardy – Weinberg ravnoteži. Hardy – Weinberg zakon opisuje populaciju u kojoj dolazi do slučajnoga parenja, a frekvencije gena i genotipova stalne su. Ako je ispitivana populacija u ravnoteži, učestalost alela, gena i genotipova ostaje nepromijenjena tijekom niza generacija. Sukladno očekivanom, analiza učestalosti genotipova u skupini HT pacijenata i kontrolnoj skupini za sva tri ispitana polimorfizma pokazala je da su opažene distribucije u skladu s očekivanim frekvencijama te s principima Hardy – Weinberg ravnoteže.

Analizom rezultata genske ekspresije u nastavku je utvrđeno da HT ispitanici pokazuju značajno veću ekspresiju gena T-bet u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0.0015$) (Slika 19A). Unatoč tome, u HT ispitanika nije zabilježena značajna razlika u distribuciji

genotipskih varijanti eQTL polimorfizma rs4794067 u odnosu na zdrave kontrole te je potencijalni kvantitativni učinak rs4794067 ostao nezapažen, barem u ovim radom ispitivanoj populaciji. Istraživanjem koje je provedeno u populaciji oboljelih od kroničnoga parodontitisa (CP, N=123) i kontrolnih ispitanika (H, N=63) utvrđeno je da ispitanici genotipa „TT“ obiju skupina pokazuju povećanu ekspresiju gena T-bet u odnosu na heterozigote „CT“ (Fisher exact test, $p=0.0128$) i homozigote genotipa „CC“ (Fisher exact test, $p=0.021$) (54). Sličan trend zabilježen je i u ovim radom ispitivanoj populaciji HT ispitanika (Slika 20B), ali statistički značajna razlika nije uočena ($p=0.25$).

Opisani trend u skladu je s objavljenim dokazima koje su prikazali Li i suradnici. Ondje je zabilježen kvantitativni učinak „T“ alelne inačice eQTL rs4794067 na povećanu ekspresiju gena TBX21, potencijalno stoga što prisutnost „T“ alelne inačice ometa vezanje Yin Yang 1 transkripcijskoga represora i tako doprinosi povećanoj ekspresiji gena TBX21. Ovi rezultati upućuju na to da genotipska varijanta „TT“ polimorfizma rs4794067 potencijalno nosi veliki rizik za razvoj autoimunih oboljenja (57).

Povećanu učestalost genotipa „TT“ („TT“ vs „CT“) polimorfizma rs4794067 u pozadini autoimunih bolesti također su pokazali Sun i suradnici (36). U studiji je dokazana povećana ekspresija gena TBX21 u oboljelih od autoimunoga hepatitisa (AIH) genotipa „TT“ u odnosu na oboljele i zdrave ispitanike genotipa „CT“. Zaštitnu ulogu u razvoju AIH ima alelna inačica „C“ jer osigurava snažno vezanje Yin – Yang 1 represora i dovodi do smanjene transkripcijske aktivnosti TBX21 gena (36). Ovim radom prikazano istraživanje nije dokazalo značajnu razliku u ekspresiji gena T-bet, što je moguća posljedica maloga broja ispitanika.

Analiza povezanosti alelnih i genotipskih varijanti polimorfizma rs11129295 i ekspresije gena EOMES nije zabilježila značajne kvantitativne učinke eQTL rs11129295 u ukupnoj populaciji („CC“ vs „CT+TT“, Slika 19A), kao i u populaciji HT ispitanika („CC“ vs „CT+TT“; Slika 21B). Sličan rezultat opisali su McKay i suradnici nakon analize povezanosti ekspresije gena EOMES i alelnih varijanti polimorfizma rs11129295 u populaciji od 70 ispitanika oboljelih od multiple skleroze (MS) i 23 pripadnika kontrolne skupine (58). Za razliku od HT ispitanika u studiji prikazanoj ovim radom, oboljeli od MS pokazali su smanjenu ekspresiju gena TBX21 i EOMES, ali značajna povezanost rs11129295 s genskom ekspresijom također nije zabilježena. Zanimljivo je kako su u kineskoj populaciji oboljelih od multiple skleroze Chen i suradnici zabilježili značajnu učestalost genotipa „TT“ eQTL rs11129295 i utvrdili da je „T“ alelna varijanta povezana s povećanim rizikom razvoja MS

(47). Međutim, povezanost genotipa „TT“ s ekspresijom gena EOMES nije bila istraživana u toj skupini ispitanika. U populaciji iz studije prikazane ovim radom zabilježen je mali broj ispitanika genotipa rs11129295 „TT“; u HT skupini tri, a u zdravim kontrolama ni jedan ispitanik genotipa „TT“. Za precizniju analizu uloge rs11129295 eQTL varijanti u razvoju HT bolesti potrebna je veća populacija ispitanika.

Važan rezultat ove studije su genotip – specifični učinci polimorfizma rs4648889 na ekspresiju gena RUNX3. U ukupnoj populaciji ispitanika, Kruskal – Wallis test pokazao je značajnu povezanost alelnih varijanti „AA“, „AG“ i „GG“ s ekspresijom gena RUNX3. Najučestalija genotipska varijanta „AG“ zabilježena je u 46,5% svih ispitanika, koji su u odnosu na homozigote genotipa „AA“ i „GG“ pokazivali smanjenu ekspresiju gena RUNX3 (Slika 22A). Dokazana je i statistički značajna razlika u ekspresiji gena RUNX3 u odnosu na case – control status (Slika 19C).

Usporedno sa studijom prikazanom ovim radom, Vacellio i suradnici zabilježili su značajno manju učestalost genotipa „AA“ u oboljelih od ankilozantnoga spondilitisa (AS) (46). Štoviše, genotip „AA“ povezan je sa smanjenom, a genotip „GG“ s povećanom ekspresijom gena RUNX3 u oboljelih od AS. Potencijalni mehanizam u pozadini smanjene ekspresije gena RUNX3 u „AA“ homozigota uključuje vezanje transkripcijskoga čimbenika IRF4 distalno od promotora gena RUNX3, što djeluje inhibitorno na ekspresiju gena. Također, Vecellio i suradnici otkrili su, 2kb uzvodno od promotora gena RUNX3, u neposrednoj blizini lokusa rs4648889, regiju pojačivača genske ekspresije bogatu mono-metiliranim histonskim jedinicama H3K4Me1. U odnosu na alelnu varijantu „G“, alelna inačica „A“ povezana je sa smanjenom aktivnosti pojačivačke regije i smanjenom ekspresijom RUNX3 mRNA (46). Rezultati studije prikazane ovim radom ukazuju, pak, na povećanu ekspresiju gena RUNX3 kod HT ispitanika genotipa „AA“ i „GG“, u odnosu na oboljele intermedijarnoga genotipa „AG“. Usporedbom homozigotnih ispitanika „AA“ i „GG“ nije zabilježena statistički značajna razlika u ekspresiji gena RUNX3 „AA“ vs „GG“ (Slika 22A). Potencijalni mehanizam u pozadini zabilježenih kvantitativnih učinaka genotipskih varijanti rs4648889 na ekspresiju gena RUNX3 u perifernim T limfocitima HT ispitanika ostaje nerazjašnjen.

S obzirom na mali broj uzoraka ispitanika moguće je samo pretpostavljati o uključenosti polimorfizama rs4648889, rs11129295 i rs4794067 u razvoju HT. Ulogu navedenih polimorfizama u pojavi i progresiji HT bolesti trebalo bi istražiti u budućim

studijama s većim brojem ispitanika, što bi omogućilo i razvrstavanje bolesnika prema podtipu bolesti.

7. ZAKLJUČAK

- Relativna ekspresija gena TBX21 i RUNX3 značajno je povišena u perifernim limfocitima T, HT ispitanika u odnosu na zdrave osobe.
- Kvantitativni učinak genotipskih varijanti polimorfizma rs4794067 na razinu ekspresije gena T-bet nije zabilježen u populaciji perifernih T limfocita HT i kontrolnih ispitanika.
- Kvantitativni učinak genotipskih varijanti polimorfizma rs11129295 na razinu ekspresije gena EOMES nije zabilježen u populaciji perifernih T limfocita HT i kontrolnih ispitanika.
- Ispitanici genotipa „AG“ polimorfizma rs4648889 pokazuju značajno smanjenu ekspresiju gena RUNX3 u odnosu na homozigote genotipa „AA“ i „GG“.
- Za preciznu analizu potencijalnih kvantitativnih učinaka polimorfizama rs4794067 i rs11129295 u razvoju HT bolesti istraživanje je potrebno provesti na većem broju ispitanika.

8. SAŽETAK

Uvod: Hashimotov tireoiditis (HT) kronična je autoimuna upala štitnjače složene genetičke podloge i nepoznate etiologije. Imunopatogeneza HT bolesti dijelom je posredovana djelovanjem autoreaktivnih limfocita T, čiji su razvoj i funkcijska obilježja promijenjeni, potencijalno kao posljedica povećane ekspresije gena TBX21, EOMES i RUNX3. Alelne varijante polimorfizama rs4648889, rs11129295 i rs4794067 posreduju kvantitativne učinke na ekspresiju gena RUNX3, EOMES i TBX21, ali njihova uloga u razvoju HT bolesti nije istražena.

Ciljevi istraživanja: Genotipizacija polimorfizama rs4648889, rs11129295 i rs4794067 te ispitati i usporediti povezanost alelnih i genotipskih varijanti s ekspresijom gena RUNX3, EOMES i TBX21 u perifernim limfocitima T HT i kontrolnih ispitanika.

Materijali i metode: Istraživanjem je obuhvaćena kolekcija arhivskih DNA uzoraka izoliranih iz periferne krvi punoljetnih, nesrodnih, HT ispitanika i zdravih osoba, kojima je u perifernim limfocitima T prethodno izmjerena razina ekspresije gena TBX21, EOMES i RUNX3. Sukladno populaciji prethodno definiranih ispitanika, za genotipizaciju eQTL polimorfizama izabrani su pripadajući uzorci DNA i ustanovljene skupine HT i kontrolnih uzoraka za genotipizaciju polimorfizma rs4794067 (HT/CTRL = 30/10), rs11129295 (HT/CTRL = 28/9) i rs4648889 (HT/CTRL = 33/10).

Rezultati: U odnosu na kontrolne ispitanike (CTRL), oboljeli od HT bolesti pokazuju značajno povišene razine mRNA ekspresije gena TBX21 i RUNX3. Kvantitativni učinak genotipskih varijanti polimorfizma rs4794067 i rs11129295 na razinu ekspresije gena TBX21 i EOMES nije zabilježen. Suprotno tome, ispitanici genotipa „AG“ polimorfizma rs4648889 pokazuju značajno smanjenu ekspresiju gena RUNX3 u odnosu na homozigote genotipa „AA“ i „GG“.

Zaključak: Za preciznu analizu kvantitativnih učinaka navedenih polimorfizama u razvoju HT bolesti istraživanje je potrebno provesti na većem broju ispitanika.

Ključne riječi: Hashimotov tireoiditis, genotipizacija, eQTL, RUNX3, EOMES, T-bet.

9. SUMMARY

Introduction: Hashimoto thyroiditis (HT) is a chronic autoimmune inflammation of the thyroid gland with a complex genetic background and of unknown etiology. Immunopathogenesis of HT is partially mediated by autoreactive T lymphocytes with altered development functional features, potentially as a consequence of the increased expression of TBX21, EOMES and RUNX3 genes. Allelic forms of the rs4648889, rs11129295 and rs4794067 polymorphisms quantitatively affect expression of RUNX3, EOMES and TBX21 genes, but their role in the incidence of HT has not been investigated.

Research objectives: Genotyping of the rs4648889, rs11129295 and rs4794067 polymorphisms and analysis of the connection between allelic and genotypic forms with expression of RUNX3, EOMES and TBX21 genes in peripheral T lymphocytes in HT patients and the controls.

Materials and methods: The research included a collection of archive DNA samples isolated from the peripheral blood of adult, unrelated, HT patients and healthy individuals with previously measured level of TBX21, EOMES and RUNX3 genes expression in peripheral T lymphocytes. From the previously defined patients population, the DNA samples were chosen for genotyping of eQTL polymorphisms and the groups of HT patients and controls were defined for genotyping of rs4794067 (HT/CTRL= 30/10), rs11129295 (HT/CTRL=28/9) and rs4648889 polymorphisms (HT/CTRL= 33/10).

Results: Compared to controls (CTRL), the HT patients show a significantly increased mRNA expression of TBX21 and RUNX3 genes. A quantitative effect of genotype forms of rs4794067 and rs 11129295 polymorphisms on the expression level of TBX21 and EOMES genes has not been observed. Conversely, the „AG“ genotype patients of rs 4648889 polymorphism show a significantly decreased expression of RUNX3 compared to the homozygous genotypes „AA“ and „GG“.

Conclusion: For a precise analysis of quantitative effects of the specified polymorphisms on HT development, a higher number of patients have to be included in the research.

Keywords: Hashimoto thyroiditis, genotyping, eQTL, RUNX3, EOMES, T-bet.

10. LITERATURA

1. Periša Milković Marija Imunohistokemijska izraženost i prognostička vrijednost proteina nm23 – H1 i COX – 2 u papilarnom karcinomu štitnjače. PhD thesis, Sveučilište u Zagrebu, 2011.
2. HealthJade Team. Healthy Eating and Healthy Living site. Dostupno na adresi: <https://healthjade.com/hypoparathyroidism/>. Datum pristupa: 12.04.2018.
3. Shahid MA, Sharma S. Physiology, Thyroid, Hormone. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
4. Murray R, Bender D, Botham K, Kennelly P, Rodwell V, Weil P. Harperova ilustrirana biokemija. 28.izd. Zagreb. Medicinska naklada. 2011.
5. Tomer Y. Mechanisms of autoimmune thyroid diseases: from genetics to epigenetics. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:147 – 56.
6. Baretić Maja. 100 godina Hashimotova tireoiditisa, bolesti koja još uvijek intrigira – prikaz bolesnice. *Acta Med Croatica*, 65 (2011) 453 – 457.
7. Guo Y, Zynat J, Xing S, Xin L, Li S, Mammatt N, i sur. Immunological changes of T helper cells in flow cytometer – sorted CD4⁺ T cells from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Exp Ther Med.* 2018; 15(4): 3596–3602.
8. Hashimoto's thyroiditis. American Thyroid Association ATA/Founded 1923. Dostupno na adresi: <https://www.thyroid.org/hashimotos – thyroiditis/>. Datum pristupa: 19.04.2018.
9. Inoue N, Watanabe M, Yamada H, Takemura K, Hayashi F, Yamakawa N, i sur. Associations between autoimmune thyroid disease prognosis and functional polymorphisms of susceptibility genes, CTLA4, PTPN22, CD40, FCRL3, and ZFAT, previously revealed in genome – wide association studies. *J Clin Immunol.* 2012;32(6):1243 – 52.
10. Ventura M, Melo M, Carriho F. Selenium and Thyroid Disease: From Pathophysiology to Treatment. *Int J Endocrinol.* 2017.
11. Ruggeri RM, Trimrchi F, Giuffrida G, Certo R, Cama E, Campenni A i sur. Autoimmune comorbidities in Hashimoto's thyroiditis: different patterns of association in adulthood and childhood/adolescence. *Eur J Endocrinol.* 2017 Feb;176(2):133 – 141.

12. Ganesh B, Bhattacharya P, Gopisetty A, Prabhakar B. Role of Cytokines in the Pathogenesis and Suppression of Thyroid Autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res.* 2011; 31(10): 721–731.
13. Ian R Macky. Tolerance and autoimmunity. *Journal List. West J Med.* 2001;174:118–123.
14. Rydzewska M, Jaromin M, Pasierowska I, Stozek K, Bossowki A. Role of the T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Thyroid Res.* 2018; 11: 2.
15. Solomou E, Keyvanfar K, Young N. T-bet, a Th1 transcription factor, is up – regulated in T cells from patients with aplastic anemia. *Blood* 2006; 107:3983 – 3991.
16. Kawashima ST, Tagami T, Nakao K, Nanba K, Tamanaha T, Usui T, i sur. Serum levels of IgG and IgG4 in Hashimoto thyroiditis. *Endocrine*, 2014; 236–243.
17. Frohlich E, Wahl R. Thyroid Autoimmunity: Role of Anti – thyroid Antibodies in Thyroid and Extra – Thyroidal Diseases. *Front Immunol.* 2017; 8: 521.
18. Nanba T, Watanabe M, Inoue N, Iwatani Y. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto’s disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves’ disease,” *Thyroid*, 2009; 495–501.
19. Bossowski A, Moniuszko M, Dabrowska M. Rusak M, Jeznach M, Lukaszyk A, i sur. Role of Th17 cells and IL – 17, IL – 23 cytokines in pathogenesis of autoimmune thyroid disease in children. *Thyroid Res.* 2013; 6.
20. Castro G, Liu X, Ngo K, De Leon – Tabaldo A, Zhao S, Luna – Roman R, i sur. ROR γ t and ROR α signature genes in human Th17 cells. *Plos one.* 2017.
21. Li D, W Cai, Gu R, Zhang Y, Tang H, Xu P, i sur. Th17 cell plays a role in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis in patients. *Clin Immunol.* 2013 Dec;149(3):411 – 20.
22. Karanikas G, Schuetz M, Wahl K, Paul M, Kontur S, Pietschmann P, i sur. Relation of anti – TPO autoantibody titre and T – lymphocyte cytokine production patterns in Hashimotos thyroiditis. *Clin Endocrinol.* 2005;63:191 – 6.
23. Liu Y, You R, Yu N, Gong Y, Qu C, Zhang Y, i sur. Increased proportions of Tc17 cells and NK cells may be risk factors for disease progression in Hashimotos thyroiditis. *Int Immunopharmacol.* 2016;40:332 – 338.

24. Guo H, Xu B, Yang Y, Wang Y, Liu X, Cui C, i sur. A high frequency of peripheral blood NKG2D+NK and NKT cells in euthyroid patients with new onset hashimoto thyroiditis—a pilot study. *Immunol Invest.*2014;43:312 – 23.
24. Hall BM. T Cells: Soldiers and Spies—The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015; 10: 2050–2064.
25. Qiu Z, Khairallah C, Sheridan B.S. *Listeria Monocytogenes*. A Model Pathogen Continues to Refine Our Knowledge of the CD8 T Cell Response. *Pathogens* 2018; 7:55.
26. Mittrücker H.W. Visekruna A. Huber M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2014;62:449–458.
27. Knox J, Cosma G, Betts MR, McLane LM. Characterization of T-bet and Eomes in peripheral human immune cells. *Front. Immunol.*, 2014; 5:217.
28. Chemin K, Ramskold D, Diaz – Gallo L, Herrath J, Houtman M, Tandre K i sur. EOMES-positive CD4⁺ T cells are increased in *PTPN22* (1858T) risk allele carriers. *Eur J Immunol.*2018; 4:655 – 669.
29. Rudd C. CTLA – 4 co – receptor impacts on the function of Treg and CD8⁺ T – cell subsets. *Eur J Immunol.*2009;39:687–690.
30. Cruz – Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic IM, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG, i sur. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J. Exp. Med.* 2017; 206:51–59.
31. Chen H, Tsai Jy, Yao T, Hsieh C, Chen I, Liu S. TGF- and IL-21 cooperatively stimulate activated CD8+ T cells to differentiate into Tc17 cells. *Immunology Letters* 2016;174:23–27.
32. Tokić S, Štefanić M, Glavaš-Obrovac Lj, Jaman S, Novosadova E, Petrkova J. The Expression of T Cell FOXP3 and T-Bet Is Upregulated in Severe but Not Euthyroid Hashimoto’s Thyroiditis. *Med Inflamm* 2016; 2016: 3687420.
33. Štefanić M, Tokić S, Stević M, Glavaš-Obrovac Lj. Association of increased eomesodermin, BCL6, and granzyme B expression with major clinical manifestations of Hashimoto’s thyroiditis – an observational study. *Immunol Invest* 2018; 279-292.

34. Parnell G, Gatt P, Krupa M, Nickles D, McKay F, Schilbeci S, i sur. The autoimmune disease – associated transcription factors EOMES and TBX21 are dysregulated in multiple sclerosis and define a molecular subtype of disease. *Clinical Immunology*. 2014; 151:16 – 24.
35. Seldin M. The Genetics of Human Autoimmune Disease: A Perspective on Progress in the Field and Future Directions. *J Autoimmun*. 2015; 64: 1-12.
36. Sun W, Wu H, Chen S. Influence of TBX21 T – 1993C variant on autoimmune hepatitis development by Yin – Yang 1 binding. *World J Gastroenterol* 2017; 23: 8500 – 8511.
37. U.S.National Library of Medicine. Genetics Home Reference. Dostupno na adresi: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TBXT#location>. Datum pristupa: 20.04.2018.
38. GeneCardsSuite. GeneCards® Human Gene Database. Dostupno na adresi: <https://www.genecards.org>. Datum pristupa: 19.06.2018.
39. McLane LM, Banerjee PP, Cosma GL, Makedonas G, Wherry EJ, Orange JS i sur. Differential localization of T-bet and Eomes in CD8 T cell memory populations. *J Immunol* 2013; 190:3207 – 15.
40. Cruz – Guilloty F, Pipkin M, Djuretic I, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld M i sur. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med* 2009;1:51 – 9.
41. Collins PL, Chang S, Henderson M, Soutto M, Davis GM, McLoed AG, i sur. Distal regions of the human IFNG locus direct cell type – specific expression. *J Immunol*. 2010; 185:1492 – 501.
42. Shan Q, Zeng Z, Shaojun X, Fengyun L, Hartwing S, Gullicksrud J, i sur. Runx3 guards cytotoxic CD8⁺ effector T cells against deviation towards T_{FH}cell lineage. *Nature Immunol*.2017; 18:931 – 939.
43. Nica A, Dermitzakis ET. Expression quantitative trait loci: present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*.2013;368: 20120362.
44. Kasela S, Kisand K, Tserel L, Kaleviste E, Remm A, Fischer K, i sur. Pathogenic implications for autoimmune mechanisms derived by comparative eQTL analysis of CD4⁺ versus CD8⁺ T cells. *PLoS Genet*. 2017; 13: e1006643.

45. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res* 2012;40:D930 – D4.
46. Vecellio M, Roberts R.A, Cohen C, Cortes A, Knight J, Bowness P, i sur. The genetic association of RUNX3 with ankylosing spondylitis can be explained by allele – specific effects on IRF4 recruitment that alter gene expression. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75: 1534 – 1540.
47. Chen S, Zhang J, Liu Q, Zhuang J, Wu L, Xu Y, Li H, i sur. Variant of EOMES Associated with Increasing Risk in Chinese Patients with Relapsing – remitting Multiple Sclerosis. *Chin Med J (Engl)*. 2018; 131: 643–647.
48. Peters J.E., Lyons P, Lee J, Richard A, Fortune M, Newcombe P, i sur. Insight into Genotype – Phenotype Associations through eQTL Mapping in Multiple Cell Types in Health and Immune – Mediated Disease. *PLoS Genet*. 2016; 12:e1005908.
49. Stefanic M, Papić S, Suver M, Glavas – Obrovac L, Karner I. Association of vitamin D receptor gene 3' – variants with Hashimoto's thyroiditis in the Croatian population. *Int J Immunogenet*. 2008;35:125–31.
50. Stefanic M, Karner I. Thyroid peroxidase autoantibodies are associated with a lesser likelihood of late reversion to hyperthyroidism after successful non – ablative treatment of Graves' disease in Croatian patients. *J Endocrinol Invest* 37: 71 – 77, 2014.
51. Tokić S, Štefanić M, Karner I, Glavaš – Obrovac Lj. Altered expression of CTLA – 4, CD28, VDR, and CD45 mRNA in T cells of patients with Hashimoto's thyroiditis – a pilot study. *Endokrynol Pol* 2017 ;68:274 – 828.
52. Tokić S, Štefanić M, Glavaš – Obrovac Lj, Kishore A, Navratilova Z, Petrek M. miR – 29a – 3p/T-bet Regulatory Circuit Is Altered in T Cells of Patients With Hashimoto's Thyroiditis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9: 264.
53. Thermo Fisher Scientific. TaqMan SNP Genotyping Assays. Dostupno na adresi:https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_040597.pdf. Datum pristupa: 04.05.2018.

54. Livak K, Schmittgen. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2^{-DDCT} Method. *Methods*. 2001 ;25:402 – 8.
55. McGill, R., Tukey, J. W. and Larsen, W. A. (1978) Variations of box plots. *The American Statistician* 32. 1978:12 – 16.
56. Cavalla F, Bigueti CC, Colavite PM, Silveira EV, Martins W Jr, Letra A, i sur. TBX21 – 1993T/C (rs4794067) polymorphism is associated with increased risk of chronic periodontitis and increased T-bet expression in periodontal lesions, but does not significantly impact the IFN – g transcriptional level or the pattern of periodontopathic bacterial infection. *Virulence*. 2015;6:293 – 304.
57. Li JR, Li JG, Deng GH, Zhao WL, Dan YJ, Wang YM, i sur. A common promoter variant of TBX21 is associated with allele specific binding to Yin – Yang 1 and reduced gene expression. *Scand J Immunol* 2011; 73:449 – 58.
58. McKay F, Gatt P, Fewings N, Parnell G, Schibeci S, Basuki M, i sur. The low EOMES/TBX21 molecular phenotype in multiple sclerosis reflects CD56 + cell dysregulation and is affected by immunomodulatory therapie. *Clinical Immunology*.2016; 96 – 107.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Josipa Legac

Datum rođenja: 19.12.1994.

Mjesto rođenja: Požega

Državljanstvo: hrvatsko

Narodnost: Hrvatica

Adresa: Šeovci 6, Požega

e-mail: legacjosipa0@gmail.com

Telefon: 098 / 96 00 – 781

Radno iskustvo:

Naobrazba:

2016. – 2018. - Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2013. – 2016. - Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (bacc.med.lab.diagn.)

2009. – 2013. - Srednja medicinska škola u Slavanskom Brodu

2000. – 2009. - osnovno obrazovanje

Vještine:

- aktivno i pasivno služenje engleskim jezikom,
- digitalna kompetentna u području obrade informacija i komunikacijskih vještina,
- dobre komunikacijske i društvene vještine stečene tijekom naobrazbe,
- vozačka dozvola B kategorije.

Aktivnosti:

1. Festival znanosti: 20. – 25.04.2015. – postersko priopćenje
2. Završni rad – Biološka svojstva novih nukleobaza
3. Sudjelovanje na kongresu HKZR: 3.kongres SR MLD (Opatija, 02. – 05.06.2016.) – postersko priopćenje
4. Festival znanosti: 24. – 29.04.2017. – postersko priopćenje, dvije radionice
5. Sudjelovanje na kongresu u Pečuhu – postersko priopćenje (3. Cholnoky 11. – 12.05.2017.)
6. 2. simpozij: Primarna i sekundarna prevencija bolesti suvremenoga čovjeka (Osijek, 24. – 25.11.2017.)
7. Festival znanosti: 16. – 21.4.2018. – postersko priopćenje
8. Dameo 2018 – Dani studenata Medicinskoga fakulteta Osijek; aktivni sudionik
9. Sudjelovanje na kongresu HKZR: 4. kongres SR MLD (Zagreb, 07. – 09.06.2018.) – postersko priopćenje
10. Aktivna članica udruge CMLDS-a te potpredsjednica Studenskoga zbora Medicinskoga fakulteta u Osijeku