

# Genetička podloga kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB) i povezanost s nastankom karcinoma pluća

---

Jantoš, Verona

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:951969>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Verona Jantoš

**Genetička podloga kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB) i  
povezanost s nastankom karcinoma pluća**

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za translacijsku medicinu, na Zavodu za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Jelene Knežević, znanstvene suradnice na IRB-u. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Jeleni Knežević i su-voditeljici prof. dr. sc. Nadi Oršolić što su mi omogućili izradu ovog diplomskog rada.

Dr. sc. Jeleni Knežević se zahvaljujem na stručnom vodstvu, savjetima i velikoj pomoći tijekom pisanja.

Zahvaljujem se mom dragom dečku Bojanu koji mi je udovoljavao, kuhao i trpio moje ispade kada nisam bila svoja.

Zahvaljujem se mojim prijateljima što su me podržavali.

Na kraju se posebno zahvaljujem najboljim i najhrabrijim ljudima, mojim roditeljima. Bez njih ovo ne bi bilo moguće. Zahvaljujem se na njihovoj podršci tijekom cijelog školovanja te im posvećujem ovaj rad.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Genetička podloga kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB) i povezanost s nastankom raka pluća**

Verona Jantoš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) sistemski je poremećaj obilježen opstrukcijom gornjih dišnih puteva koja se pogoršava tijekom napredovanja bolesti. Novija istraživanja pokazuju da je KOPB među glavnim uzrocima smrtnosti u svijetu, odmah iza kardiovaskularnih i malignih bolesti. Smatra se da je pušenje glavni faktor rizika za razvoj bolesti, slično kao i kod raka pluća, ali samo određeni postotak pušača razvija bolest. Ta činjenica ukazuje na moguće postojanje dodatnih čimbenika rizika, npr. genetička podloga pojedinca. Akutna pogoršanja bolesti kod pacijenata koji pate od KOPB-a često su povezana s virusnim i bakterijskim infekcijama. Najčešći komorbiditet kod pacijenata s KOPB-om je rak pluća koji se već od prije povezuje s nekontroliranom lokalnom i sistemskom upalom. Cilj ovog istraživanja je ispitati postoji li genetička povezanost polimorfni biljega rs352139 gen *TLR9* i rs4251545 gen *IRAK4* s nastankom i razvojem raka pluća kod osoba koje boluju od KOPB-a. Zanimalo nas je koje su to genetičke promjene u skupini ispitanika sa KOPB-om odgovorne za nastanak raka pluća, najčešćeg komorbiditeta (30%) KOPB-a i postoji li genetička povezanost ovih bolesti s genima koji sudjeluju u aktivaciji i regulaciji imunskog odgovora. U tu svrhu, ispitali smo raspodjelu genotipova unutar gena *TLR9* i *IRAK4* u navedenim skupinama i pratili učinak spola i dobi ispitanika. Naši rezultati pokazuju postojanje značajne razlike u raspodjeli genotipa A/G i alela A, polimorfni biljega rs352139 gena *TLR9*, između skupina s KOPB-om i onih koji imaju KOPB i rak pluća, koja je neovisna o dobi i spolu.

(39 stranica, 12 slika, 6 tablica, 71 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Kronična opstruktivna plućna bolest, polimorfni biljezi, gen *TLR9*, gen *IRAK4*, rs352139, rak pluća

Voditelj: Dr. sc. Jelena Knežević, znanstvena suradnica, IRB  
Su-voditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor  
Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor  
Doc. dr. sc. Petar Kružić, docent  
Doc. dr. sc. Renata Šoštarić, docent

Rad prihvaćen: 28. svibnja 2015.

# BASIC DOCUMENTATION CARD.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

## **Genetic background of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and how it is linked to development of lung cancer**

Verona Jantoš

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a systemic obstructive lung disease which worsens over time. Recent studies indicate that COPD is one of the most common causes of death worldwide and that it follows closely cardiovascular and malignant diseases. It is believed that the primary risk factor for COPD is tobacco smoking, which is similar to lung cancer, but only a certain percentage of those who are smokers develop the disease. This shows that there could be other additional risk factors such as an individual genetic background. Acute exacerbations, hallmark of patients who suffer from COPD, are often related to viral and bacterial infections. On the other hand, lung cancer, which has already been related to uncontrolled local and systemic inflammation, is the most common comorbidity reported in patients with COPD. The goal of this research was to explore if there is a genetic linkage of the polymorphisms rs352139 *TLR9* gene and rs425154 *IRAK4* gene with occurrence and development of lung cancer in COPD patients. We wanted to know which genetic changes, within the COPD subject group, could be responsible for the occurrence of lung cancer, which is the most common comorbidity in patients with COPD (30%), and if these genetic changes could be found among genes which participate in the activation and regulation of the immune response. For this purpose we analyzed the distribution of genotypes of *TLR9* and *IRAK4* genes within the indicated subject groups. Gender and age possible effect were also included. Our results show that there is a significant difference in distribution of the A/G genotype and allele A of polymorphism rs352139 *TLR9* gene among patients with COPD and those with COPD together with lung cancer.

(39 pages, 12 figures, 6 tables, 71 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Chronic obstructive pulmonary disease, polymorphic markers, *TLR9* gene, *IRAK4* gene, rs352139, lung cancer

Supervisor: Jelena Knežević, PhD, Research Associate, RBI

Co-supervisor: Prof. Nada Oršolić, PhD, Professor

Reviewers: Prof. Nada Oršolić, PhD, Professor

Doc. dr. sc. Petar Kružić, Assistant professor

Doc. dr. sc. Renata Šoštarić, Assistant professor

Thesis accepted: 28 May, 2015.

## POPIS KRATICA

- A1ATD –  $\alpha$ 1-antitripsin (engl.  *$\alpha$ 1-antitrypsin deficiency*)
- CD80 – diferencijacijski biljezi CD (engl. *Clusters of differentiation*)
- CpG-ODN – oligodeoksinukleotidi (engl. *CpG oligodeoxynucleotides*)
- DAMP – oštećenju pridruženi molekularni sljedovi (engl. *Damage -associated molecular patterns*)
- DD – N-terminalna domena *death* (engl. *Death domain*)
- DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)
- EDTA – etilen-diamin-tetraoctena kiselina (engl. *Ethylene diamine tetraacetic acid*)
- FRET – energetski transfer tipa Förster (engl. *Förster-type energy transfer*)
- IL-1 $\beta$  – interleukin 1 beta (engl. *Interleukin-1 beta*)
- IL-6 – interleukin 6 (engl. *Interleukin 6*)
- IL-8 – interleukin 8 (engl. *Interleukin 8*)
- IRAK – interleukin 1 kinaza pridružena receptoru (engl. *Interleukin-1 receptor-associated kinase*)
- KD – kinazna domena (engl. *Kinase Domain*)
- KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest (engl. *Chronic obstructive pulmonary disease, COPD*)
- LPS – lipopolisaharid (engl. *lipopolysaccharide*)
- LRR – ponavljajući sljedovi bogati leucinom (engl. *Leucine-rich repeats*)
- MAPK – protein kinaze aktivirane mitogenom (engl. *Mitogen-activated protein kinases*)
- MHC – glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (engl. *Major histocompatibility complex*)
- NK – stanice prirodne ubojice (engl. *Natural killer*)
- MYD88 – adaptorna molekula MyD88 (engl. *Myeloid differentiation factor 88*)
- NF- $\kappa$ B – jezgrin čimbenik kappa B (engl. *Nuclear factor  $\kappa$ B*)
- PAMP – patogenu pridruženi molekularni sljedovi (engl. *Pathogen-associated molecular pattern*)
- PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*)
- pDC – plazmocitoidne dendritičke stanice (engl. *Plasmacytoid dendritic cells*)
- ProST – domena bogata prolin/serin/treoninom (engl. *Proline, serine and threonine rich domain*)
- PRR – receptori za prepoznavanje uzorka (engl. *Pattern recognition receptor*)
- RCLB – pufer za lizu eritrocita (engl. *Red cell lysis buffer*)
- RPM – okretaj u minuti (engl. *Rotation per minute*)
- RT-PCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real time polymerase chain reaction*)
- SDS – natrij-dodecil sulfat (engl. *Sodium dodecyl sulfate*)
- SE pufer – pufer natrij-EDTA
- SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)
- TAK1 – transformirajući beta faktor rasta-aktivirane kinaze1 (engl. *Transforming growth factor- $\beta$ -activated protein kinase 1*)
- TE pufer – pufer tris-EDTA (engl. *Tris EDTA buffer*)
- TGF- $\beta$  – transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *Transforming growth factor beta*)
- TIR – homologna Toll/Interleukin-1 receptor domena (engl. *Toll/interleukin-1 receptor homology domain*)
- TNF- $\alpha$  – čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. *Tumor necrosis factor alpha*)

TLR – receptori slični toll-u (engl. *Toll-like receptors*)

TRAF6 – faktor prifružen receptoru TNF $\alpha$  (engl. *Tumor necrosis factor receptor-associated factor*  
6)



## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) i rak pluća .....	2
1.2. Imunosni sustav .....	4
1.3. Receptori Toll-like .....	5
1.4. Prijenos signala putem toll-like receptora.....	7
1.5. Toll-like receptor 9 .....	8
1.6. Kinaza interleukin receptora 4 (IRAK4).....	9
1.7. Polimorfizmi u genima za Toll-like receptore i bolesti .....	10
1.8. Upotreba genetičkih biljega u određivanju sklonosti za razvoj određenog poremećaja... 11	
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1. Ispitanici.....	14
3.2. Izolacija genomske DNA metodom isoljavanja.....	14
3.3. Genotipizacija uzoraka metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu .....	16
3.4. Analiza baza podataka i kriteriji odabira SNP-ova za analizu.....	19
3.5. Statistička obrada podataka.....	20
4. REZULTATI.....	21
4.1. Učestalost polimorfnog biljega rs4251545 gena IRAK4.....	22
4.2. Učestalost polimorfnog biljega rs352139 gena TLR9 .....	26
5. RASPRAVA.....	30
6. ZAKLJUČAK .....	33
7. LITERATURA.....	34
8. ŽIVOTOPIS .....	39

## 1. UVOD

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) sistemski je poremećaj obilježen opstrukcijom gornjih dišnih puteva. Predstavlja veliki javno-zdravstveni problem. Najčešći komorbiditet kod pacijenata s KOPB-om je rak pluća. Epidemiološka istraživanja su pokazala da prisutnost KOPB-a povećava rizik nastanka raka pluća 4-5 puta.

Iako se pušenje smatra glavnim čimbenikom rizika za razvoj obje bolesti, samo određeni postotak pušača ih razvije; prema literaturnim podacima 20% teških pušača razvije KOPB ili rak pluća. Ta činjenica ukazuje na postojanje dodatnih čimbenika rizika, vrlo vjerojatno uvjetovanih genetičkom podlogom pojedinca.

Progresivni ireverzibilni gubitak funkcije dišnih puteva kod KOPB-a posljedica je kronične upale. Kontrola aktivacije i regulacije upalne reakcije i imunosnog odgovora pojedinca važan je preduvjet u očuvanju homeostaze organizma i bitan čimbenik u patogenezi mnogih poremećaja. Značajan iskorak u proučavanju funkcioniranja imunosnog odgovora bilo je otkriće receptora urođene imunosti, kao npr. receptora *Toll-like* (TLR) čijom aktivacijom se pokreću složeni signalni putevi odgovorni za aktivaciju i regulaciju imunosnog odgovora.

S obzirom na to da KOPB nastaje kao posljedica kronične upale i da se upala vrlo često povezuje s nastankom i razvojem raka pluća logično je pretpostaviti povezanost ovih poremećaja s regulatorima upalne reakcije. Stoga je cilj ovog rada ispitati genetičke čimbenike rizika koji dovode do nastanka i razvoja KOPB-a i raka pluća. Ispitivanje njihovog funkcionalnog značaja dovelo bi do značajnog napretka u patobiologiji, dijagnosticiranju i liječenju KOPB-a i raka pluća.

### *1.1. Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) i rak pluća*

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) sistemski je poremećaj obilježen ireverzibilnom opstrukcijom gornjih dišnih puteva nastalom kao posljedica kronične upale. Bolest je sporo progresivna, a stanje opstrukcije se pogoršava tijekom napredovanja bolesti. Najčešći simptomi bolesti su nedostatak daha i kronični produktivni kašalj. Novija istraživanja pokazuju da je KOPB među glavnim uzrocima smrtnosti u svijetu, a broj oboljelih u stalnom je porastu. Bolest predstavlja veliki javno-zdravstveni problem. Iako se pušenje smatra kao glavi čimbenik rizika za razvoj bolesti, samo određeni postotak pušača razvije bolest; prema literaturnim podacima oko 20% teških pušača razvije KOPB [1]. Ta činjenica ukazuje na postojanje dodatnih čimbenika rizika, kako uvjetovanih okolinom (zagađenje okoliša i profesionalna orijentacija), tako i vrlo vjerojatnom genetičkom podlogom pojedinca. Jedno od značajnijih obilježja KOPB-a je i pogoršanje stanja, tzv. egzacerbacije, koje u kombinaciji s infekcijom dišnih puteva, također predstavljaju jedan od čimbenika patogeneze i tijeka bolesti. Tako je poznato da su bakterijske i virusne infekcije jedan od najčešćih uzroka akutnog pogoršanja stanja bolesti. Učestalost kroničnih bakterijskih infekcija progresivno raste s pogoršanjem bolesti. Težina bolesti povezana je s kroničnom upalom, a bronhoalveolarni ispirak pacijenata s KOPB-om obiluje stanicama imunskog sustava [2]. Poznato je da duhanski dim aktivira stanice urođene imunosti, kao što su epitelne stanice i makrofagi, stimuliranjem receptora odgovornih za prepoznavanje molekula pridruženih patogenu. Stanice plućnog epitela, nakon izlaganja dimu duhana, luče proupalne citokine i kemokine, kao što je npr. TNF- $\alpha$  i IL-8, što potiče novačenje neutrofila i monocita u pluća. Pokazano je da je broj neutrofila i makrofaga povećan u plućima pušača i bolesnika s KOPB-om. Stanice odgovorne za aktivaciju stečene imunosti također su unovačene i aktivirane u plućima pušača i bolesnika s KOPB-om – mijeloidne dendritičke stanice izolirane iz bronhoalveolarnih ispiraka pokazuju znatno jaču ekspresiju kostimulirajućih molekula kao što su CD80 i CD86 [2].

Rak pluća je zloćudna bolest koja nastaje iz stanica dišnog epitela. Smanjena plućna aktivnost, koja je jedan od glavnih simptoma KOPB-a, je dokazani čimbenik rizika za razvoj raka pluća. Pa tako, među pušačima, oni s opstrukcijom dišnih puteva imaju 4-5 puta veći rizik za razvoj raka pluća, a nekoliko istraživanja je pokazalo da je rizik razvoja raka pluća ovisan i o stupnju KOPB; povećava se kod težih oblika bolesti [3-6]. Povećan rizik raka pluća je povezan s KOPB-om čak i kod ljudi koji nikada nisu pušili, što naglašava važnost

genetičkih i epigenetičkih čimbenika [7, 8]. Međutim, genetička podloga KOPB-a i raka pluća još uvijek je nedovoljno poznata. Do sada je pronađena samo jedna genetička poveznica s KOPB-om, gdje određeni broj bolesnika s KOPB-om (ispod 1%) ima nasljednu deficijenciju  $\alpha$ 1-antitripsina (A1ATD), relativno rijetkog sindroma koji uključuje i KOPB kao dio kliničke slike [9].

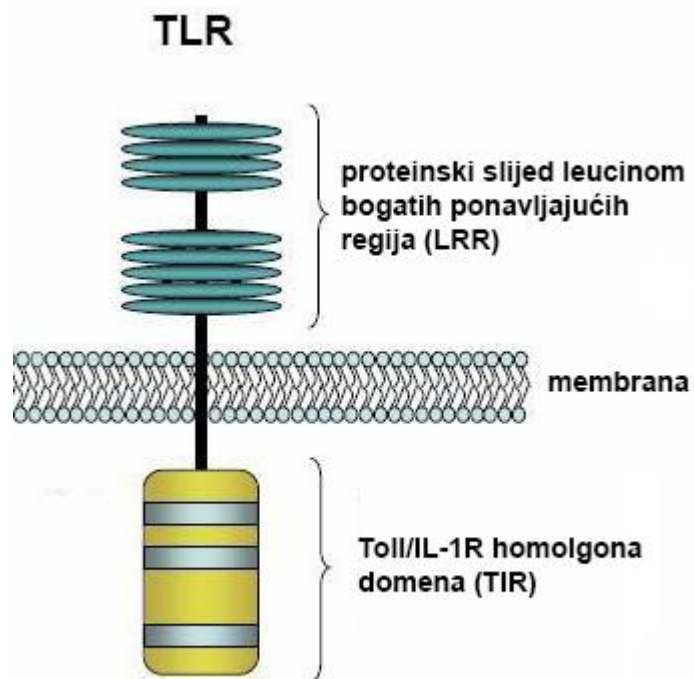
## 1.2. Imunosni sustav

Glavna uloga imunskog sustava je održavanje zdravlja i stabilnosti ljudskog organizma. Ta uloga očituje se u prepoznavanju i eliminaciji patogena koji uzrokuju infekcije i bolesti, ali i uklanjanju endogenih produkata nastalih smrću i razgradnjom stanica [10]. Imunosni odgovor može biti nespecifičan (tzv. urođena imunost) koji ujedno služi i kao prva linija obrane organizma i specifičan (tzv. stečena imunost). Urođena imunost uključuje lokalnu obranu na površini organizma, poput kože i sluznice, te sistemsku obranu koja se odvija fagocitozom i različitim nespecifičnim tvarima u izvanstaničnoj tekućini (npr. lizozim, interferon, sustav komplementa i drugi) [10, 11]. Provode je stanice koje potječu iz mijeloidnih progenitorskih stanica poput granulocita (neutrofila, bazofila i eozinofila), dendritičkih stanica, makrofaga i mastocita te stanice prirodne ubojice (engl. *Natural killer cells*, NK). Nalaze se obično u perifernim tkivima, te su zbog toga prve stanice koje dolaze u doticaj s patogenima [12-14]. Nakon što infekcija prijeđe određenu granicu, urođena imunost može aktivirati stečenu imunost. Stečene imunosne reakcije nadopunjuju stanični receptori za prepoznavanje uzorka (engl. *Pattern recognition receptors*, *PRRs*) koji se aktiviraju patogenom pridruženim molekularnim sljedovima (engl. *Pathogen-associated molecular pattern*, *PAMPs*) [11, 15]. PRR imunskog sustava aktiviraju se i endogenim molekulama koje nastaju u uvjetima oštećenja tkiva. Nazivamo ih molekularnim sljedovima pridruženim oštećenju (engl. *Damage-associated molecular patterns*, *DAMPs*) [16]. Osim na površini makrofaga i dendritičkih stanica, PRR-i su izraženi i u epitelnim stanicama, endotelnim stanicama i fibroblastima [17]. Nakon aktivacije patogenom PRR-i pokreću proizvodnju i lučenje antimikrobnih i pro-upalnih efektornih molekula. Veliku ulogu u funkcioniranju urođene imunosti (indukcija pro-upalnih citokina, kemokina i interferona), kao i u pokretanju stečene imunosti ima skupina receptora koja pripada obitelji Toll-like receptora (TLR) [18].

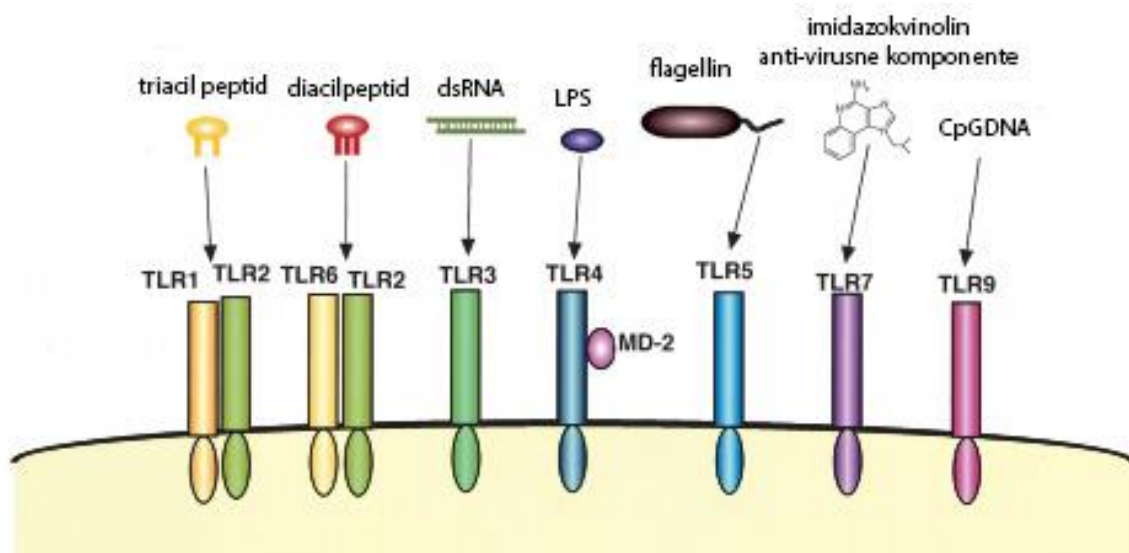
### 1.3. Receptori Toll-like

TLR pripadaju skupini transmembranskih proteina uključenih u prepoznavanje molekularnih slijedova viralnog i bakterijskog porijekla. Receptor Toll otkriven je 1985. godine u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) gdje je pokazana njegova uloga u embrionalnom razvoju i obrani organizma od gljivičnih infekcija [19]. Kod sisavaca je opisana homologna obitelj receptora nazvana receptori Toll-like. Do sada je kod ljudi otkriveno 13 različitih TLR-a [17].

TLR su membranski proteini tipa 1 i sastoje se od izvanstanične regije N-terminalnog ponavljanja bogatog leucinom (engl. leucine-rich repeat, LRR), transmembranske regije i citoplazmatske regije odgovorne za prijenos signala, Toll/IL-1R homologne domene (TIR) [20] (Slika 1). Receptori Toll-like se s obzirom na smještaj u stanici dijele u dvije skupine. TLR 1, 2, 4, 5, 6 su primarno izraženi na plazma membrani i aktiviraju ih molekule koje potječu od bakterija, gljivica i protozoa, dok su TLR 3, 7, 8 i 9 izraženi na membrani lizosoma i endosoma i aktiviraju ih nukleinske kiseline bakterijskog i viralnog porijekla [21, 22]. Ligandi koji aktiviraju TLR2 su diacil i triacil lipopeptidi [17]. Ligand za TLR4 je lipopolisaharid (LPS) koji potječe iz gram negativnih bakterija [23-25]. TLR 3 je aktiviran dvolančanom DNA viralnog porijekla, a TLR7 i 8 uključeni su u prepoznavanje jednolančane DNA, također viralnog podrijetla. TLR5 veže flagelin, dok se TLR9 aktivira vezanjem nemetilirane dvolančane DNA bakterijskog i viralnog porijekla [26, 27] (Slika 2). TLR su izraženi na mnogim stanicama urođene i stečene imunosti, ali i epitelnim stanicama i stanicama mnogih tumora [17, 28]. Važna značajka signalnog puta TLR-a je pokretanje imunskog odgovora, u prvom redu dozrijevanje antigen predočnih stanica. Najznačajnije antigen predočne stanice su dendritičke stanice koje na membrani izražavaju molekule glavnog sustava tkivne snošljivosti, MHC I i MHC II (engl. *Major histocompatibility complex*) i kostimulirajuće molekule CD80 i CD86. Nakon stimulacije TLR-a aktivirane antigen predočne stanice povećavaju ekspresiju ovih membranskih proteina što im omogućava pojačano predočavanje antigena limfocitima T [29]. Nadalje, poznato je da prijenos signala putem TLR-a sudjeluje i u održavanju ravnoteže epitelnog tkiva kontroliranim lučenjem IL-6, IL-8 i TGF- $\beta$  (engl. *Transforming growth factor  $\beta$* ) koji su neophodni za proliferaciju i oporavak tkiva nakon ozljede [30].



**Slika 1.** Grada Toll-like receptora (preuzeto i prilagođeno iz [31]).

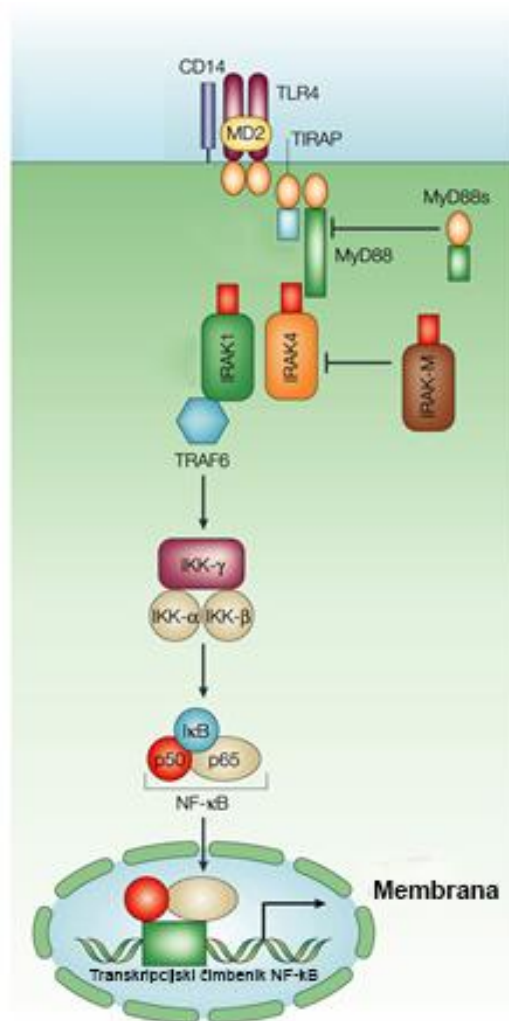


**Slika 2.** Toll like receptori i njihovi ligandi (preuzeto i prilagođeno iz [32]).

#### 1.4. Prijenos signala putem toll-like receptora

Receptori TLR dijele zajednički signalni put koji završava aktivacijom transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B (engl. *Nuclear factor  $\kappa$ B*) i mitogenom aktivirane protein kinaze MAPK (engl. *Mitogen-activated protein kinase*) [33]. Adaptorna molekula MyD88 (engl. *Myeloid differentiation primary response protein 88*) ključna je molekula za prijenos signala kod gotovo svih TLR signalnih puteva. Za daljnji nastavak prijenosa signala neophodni su proteini obitelji IRAK (engl. *Interleukin-1 receptor-associated kinase 4*) koja sadrži četiri člana: IRAK1, IRAK2, IRAK3 (IRAK-M) i IRAK4 [34]. Vezanje liganda na TLR dovodi do konformacijskih promjena receptora što omogućava zakretanje domene TIR i novačenje MyD88-a i pojedinih članova obitelji IRAK. Fosforilacija proteina IRAK1 i IRAK4 dovodi do njihove disocijacije s adaptorskog proteina MyD88 i seriju nizvodnih aktivirajućih događaja koji uključuju molekule TRAF6 (engl. *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) [35] i TAK1 (engl. *Transforming growth factor- $\beta$ -activated protein kinase 1*) i na kraju fosforilaciju i aktivaciju IKK kompleksa (engl. *Inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B (I $\kappa$ B-kinase complex)*) te oslobađanje NF- $\kappa$ B i njegovu translokaciju u jezgru [31] (Slika 3). Oslobađanje NF- $\kappa$ B pokreće transkripciju mnogih gena uključenih u upalnu reakciju kao što su npr. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1b i neki drugi [36].





**Slika 3.** Prijenos signala putem Toll-like receptora (preuzeto i prilagođeno iz [31]).

### 1.5. Toll-like receptor 9

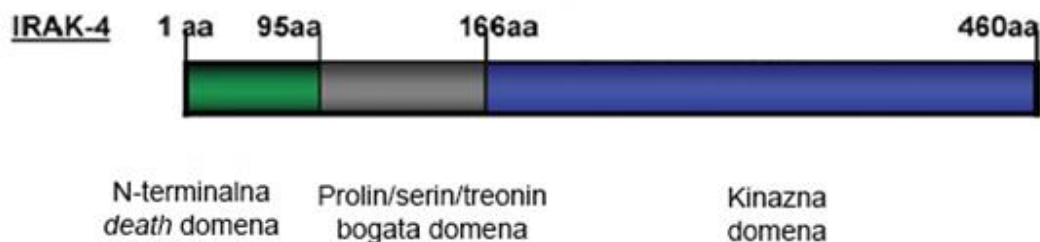
Gen *TLR9* čovjeka nalazi se na kraćem kraku kromosoma 3. Analizom slijeda nukleotida utvrđeno je da sadrži dva eksona [37]. Gotovo cijeli protein kodiran je drugim eksonom čijim prepisivanjem nastaje transkript veličine 1032 aminokiseline i molekulske mase 115,9 kDa [38]. Toll-like receptor 9 izražen je u stanicama imunskog sustava; limfocitima B, plazmacitoidnim dendritičkim stanicama, stanicama monocitno-makrofagne loze, ali i normalnim epitelnim stanicama i stanicama tumora [28, 39]. Njegova aktivacija na antigen predočnim stanicama je ključna za produkciju interferona tipa 1 [40]. U stanicama je smješten na stjenkama endoplazmatskoga retikuluma [41]. Nakon ulaska specifičnog liganda u stanicu,

TLR9 se premješta u endosomalne i lizosomalne odjeljke gdje veže ligand u uvjetima sniženog pH što se smatra važnim preduvjetom za prepoznavanje DNA; fiziološki uvjeti u endosomima i lizosomima omogućavaju razgradnju bakterija i virusnih čestica, što olakšava pristup ligandu [42]. TLR9 prepoznaje nemetilirane CpG odsječke unutar dvolančane DNA koja se nalazi u bakterijskoj i virusnoj DNA, a rijede u DNA sisavaca te zbog toga genomska DNA domaćina ima slabo imunostimulatorno djelovanje [43]. Signalizaciju preko TLR9 mogu pokrenuti i sintetski modificirani CpG-oligonukleotidi, CpG-ODN, i tako aktivirati imunosni odgovor [44].

#### 1.6. Kinaza interleukin receptora 4 (IRAK4)

Kinaze interleukin-1 pridružene receptoru (gen IRAK) (engl. *Interleukin-1 receptor associated kinase*) čine obitelj unutarstaničnih serin/treonin kinaza; IRAK1, IRAK2, IRAK3 i IRAK4. Prva klonirana kinaza iz te obitelji je IRAK1 za koju se pokazalo da je visoko homologna s kinazom *Pelle* iz vinske mušice, koja sudjeluje u aktivaciji homologa transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B. Na osnovu tih rezultata pretpostavila se i uloga IRAK1 u istom signalnom putu. Svi članovi obitelji IRAK dijele sličnu strukturu funkcionalnih podjedinica: N-terminalna *death* domena (DD), prolin/serin/treonin bogata domena (ProST) i kinazna domena (KD) (Slika 4). Glavna uloga DD su homologne međureakcije s adaptornim i drugim kinaznim molekulama iste obitelji, dok kinazna regija proteina IRAK ima značajnu ulogu u prijenosu signala omogućavanjem fosforilacije silaznih signalnih molekula, ali i autofosforilacije. Domena ProST važna je za post-translacijske modifikacije kao što je npr. ubikvitinizacija [45-47].

Gen za IRAK4 nalazi se na kromosomu 12, na poziciji 12p11.22. Protein IRAK4 sastavljen je od 460 aminokiselina (Slika 4), molekulske mase 52 kDa [48]. Pokusi na miševima koji ne izražavaju IRAK4 pokazali su da nakon stimulacije stanica imunskog sustava takvih miševa s ligandima za različite TLR-e ne dolazi do aktivacije NF- $\kappa$ B. Ovim istraživanjem je dokazano da je molekula IRAK4 važna u prijenosu signala putem TLR-a i aktivaciji transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B [48].



**Slika 4.** Shematska slika građe IRAK4 (Preuzeto i prilagođeno iz [46]).

### 1.7. Polimorfizmi u genima za Toll-like receptore i bolesti

Do danas je objavljen značajan broj funkcionalnih i epidemioloških istraživanja koje ukazuju na povezanost receptora TLR i pridruženih adaptorskih molekula, s osjetljivošću na razvoj različitih bolesti, kao što su infekcije, upalne bolesti, autoimune bolesti, ali i nastanak i razvoj tumora [40]. Toll-like receptori omogućuju stanicama koje ih izražavaju prepoznavanje potencijalnih patogena i imaju značajnu ulogu u oblikovanju imunskog odgovora domaćina. Za očekivati je da bi genetičke varijacije ovih receptora mogle uvelike utjecati na njihovu funkcionalnu aktivnost u smislu obrane od patogena, a hipotetski možda i regeneraciji tkiva ili/i selekciji tumorskih stanica [49].

Svaka promjena strukture genomske DNA zbog koje nastaje više alelnih oblika jednog gena u nekoj populaciji, uočena u više od 1% ukupne populacije, naziva se genetički polimorfizam. Polimorfizmi samo jedne baze u slijedu nukleotida tzv. SNP-ovi (engl. *Single nucleotide polymorphism*) najčešće se koriste u populacijskim istraživanjima povezanosti patoloških promjena i pojedinog lokusa u genomu. Oni se mogu nalaziti u kodirajućoj ili nekodirajućoj regiji gena. SNP-ovi smješteni unutar kodirajuće regije mogu, ali i ne moraju, utjecati na slijed aminokiselina u proteinu (engl. *non-synonymous SNP*, odnosno *synonymous SNP*). SNP-ovi koji mijenjaju genetski kod i slijed aminokiselina mogu imati utjecaj i na funkciju proteina, ako su smješteni unutar promotorske regije mogu utjecati na razinu ekspresije gena [50].

Polimorfizmi unutar gena *TLR4*, D299G i T399I, proučavani su u modelima *in vitro* i pokazano je da stanice s ovim mutacijama značajno slabije odgovaraju na stimulaciju LPS-om. Genetičkim istraživanjima potvrđeno je da su nosioci navedenih SNP-ova imali smanjeni imunski odgovor nakon stimulacije endotoksinima [51]. Funkcionalna istraživanja varijante

proteina TLR2 (R753Q) pokazale su smanjeni odgovor stanica na stimulaciju različitim bakterijskim lipopeptidima [50, 52], a kasnijim epidemiološkim istraživanjima potvrđena je veća učestalost tog polimorfizma kod pacijenata s tuberkulozom [53]. Funkcionalna i epidemiološka istraživanja pokazale su da je polimorfizam gena *TLR5*, R392X, koji uvodi preuranjeni stop kodon i samim tim dokida odgovor receptora na specifični ligand flagelin, povezan s osjetljivošću pojedinca na razvoj autoimune bolesti lupus [54]. Nadalje, drugo istraživanje pokazalo je da je polimorfni biljeg F616L u istom genu povezan s boljom prognozom kod pacijenata s kolorektalnim rakom, a pojedinci koji ga nose imaju oslabljen odgovor nakon stimulacije flagelinom [55].

### *1.8. Upotreba genetičkih biljega u određivanju sklonosti za razvoj određenog poremećaja*

Genetička epidemiologija bavi se ispitivanjem uloge genetičkih čimbenika u nastanku bolesti u obitelji ili populaciji. Za cilj ima određivanje obrazaca nasljeđivanja bolesti u smislu pronalaženja genetičkih biljega povezanih s osjetljivošću pojedinca za razvoj bolesti. Proces rekombinacije, koji doprinosi raznolikosti genoma čovjeka, koristi se u metodama analize povezanosti nekog genskog lokusa i sklonosti za razvoj određenog patološkog fenotipa [50]. Prilikom analiziranja povezanosti genetičkog biljega i specifičnog fenotipa, primjenom statističkih metoda određuje se udio rekombinacije između biljega i gena odgovornog za fenotip od interesa. Naime, primjenom matematičkih modela određujemo razmjere u kojima se neki biljeg nasljeđuje zajedno s patološkim fenotipom [56]. Na taj način procjenjujemo da li se potencijalni lokus unutar humanog genoma, koji je odgovoran za bolest, nalazi u blizini testiranog biljega, i ako da koliko blizu. Ako pretpostavimo da su u jednom trenutku u prošlosti postojale dvije populacije, "D" koja daje neki patološki fenotip i "N" koja daje fenotip divljeg tipa, tada svi oni biljezi unutar populacije "N" biti će vezani samo uz divlji tip tog alela, za razliku od skupine alela "D" koji sadrže sve one promjene koje povećavaju vjerojatnost pojave patološkog fenotipa [53]. Tijekom vremena dolazi do značajne razlike u učestalosti alela koji nose polimorfne genetičke biljege, između te dvije populacije alela što predstavlja osnovu na kojoj se zasnivaju asocijacijska istraživanja (engl. *case control studies*). Asocijacijska istraživanja koriste se za pronalaženje genetičkih biljega koji su statistički značajnije zastupljeni u skupini npr. pacijenata (engl. *case*) u odnosu na normalnu populaciju (engl. *controls*) [54]. U primjeni to znači da se testiranjem određenog broja biljega, u samoj

blizini ili unutar gena, za koji se pretpostavlja da mijenja fenotip, može pronaći povezanost ili asocijacija biljega, uz uvjet da je jedan od tih biljega dovoljno blizu traženom genu.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je ispitati postoji li genetička povezanost polimorfnih biljega rs352139 gena *TLR9* i rs4251545 gena *IRAK4* s nastankom i razvojem raka pluća kod osoba koje boluju od KOPB-a. Zanimalo nas je koje su to genetičke promjene u skupini ispitanika s KOPB-om odgovorne za nastanak raka pluća, najčešćeg komorbiditeta (30%) KOPB-a i postoji li genetička povezanost ovih bolesti s genima koji sudjeluju u aktivaciji i regulaciji imunskog odgovora. U tu svrhu ispitali smo raspodjelu genotipova gena *TLR9* i *IRAK4* unutar navedenih skupina i pratili učinak spola i dobi ispitanika. Svrha ovog istraživanja je pronaći genetičke biljege povezane s nastankom raka pluća u proupalnom miljeu KOPB-a kako bi se poboljšala prevencija nastanka i razvoja maligne bolesti, kao i određivanje potencijalnih epidemioloških biomarkera u svrhu bolje prevencije bolesti.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### *3.1. Ispitanici*

U ovom radu analizirali smo genomsku DNA ispitanika s dijagnozom kronične opstruktivne plućne bolesti i raka pluća. Uzorci periferne krvi svih ispitanika, iz kojih je kasnije izolirana genomsku DNA, prikupljeni su u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Klinika za plućne bolesti Jordanovac, u periodu od travnja 2012. do prosinca 2014. godine. Ovaj rad dio je već postojećeg projekta koji se odrađuje na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za translacijsku medicinu, i etičko povjerenstvo suradne ustanove odobrilo je predloženo istraživanje. Svi ispitanici koji su uključeni u ovo istraživanje potpisali su informirani pristanak. U istraživanju je sudjelovalo 449 ispitanika. Ispitanici su bili podijeljeni u tri skupine: 183 ispitanika s dijagnozom KOPB-a, 151 ispitanik s dijagnozom KOPB-a i raka pluća i 115 ispitanika koji su imali dijagnozu raka pluća. Na svim ispitanicima primjenjeni su standardni dijagnostički kriteriji na osnovu kojih su svrstani u definirane podskupine.

#### *3.2. Izolacija genske DNA metodom izoliranja*

Genomska DNA, korištena u ovom radu, izdvojena je iz uzorka periferne krvi ispitanika metodom izoliranja. Ukratko, prvo se primjenom osmotske lize stanica uklone eritrociti iz uzorka krvi te se potom razgrade leukociti iz kojih se oslobodi genomsku DNA. Proteini se iz otopine uklanjanju izoliranjem, pomoću natrijevog klorida [57], a preostala DNA precipitira alkoholom.

Uzorci krvi (5 mL) su prikupljeni u epruveti s antikoagulansom EDTA te pohranjeni na -20°C. Nakon što se krv otopi na sobnoj temperaturi, jednom volumenu krvi dodan je trostruki volumen pufera za lizu eritrocita (RCLB) nakon čega je smjesa prebačena na led i inkubirana 15 minuta. Nakon toga uzorak smo centrifugirali 15 min na 800 g (Eppendorf centrifuga 5403, Njemačka) pri temperaturi od +4°C. Nakon centrifugiranja nadtalog, s ostacima liziranih eritocita, smo dekantirali, a preostali talog leukocita višekratno isprali s novom količinom RCLB-a (dok talog ne bude čist, najčešće 2-3 puta). Na isprani talog dodali smo pufer SE (2 mL), 10% otopinu SDS-a (200 µL) i proteinazu K koncentracije 0,1 mg/mL (2 µL) (Roche, Njemačka). Smjesu smo blago protresli, da se talog odvoji od dna epruvete, i

inkubirali preko noći na 37°C u vodenoj kupelji, ili 2 sata na 56°C u vodenoj kupelji. Nakon prekonoćne inkubacije, smjesu smo pomiješali sa 1/3 volumena 5 M NaCl (750 µL), u svrhu taloženja proteina. Smjesu smo snažno promiješali te zatim centrifugirali (Eppendorf centrifuga 5403, Njemačka) 15 minuta na 800 g, pri sobnoj temperaturi. Dekantirani nadtalog ponovno je centrifugiran pod istim uvjetima. Nakon toga je pročišćeni nadtalog pomiješan sa istim volumenom 2-propanola, a istaložena DNA staklenom kukicom prenešena u ledeni 70% etanol. Tako ispranu DNA prenijeli smo u TE pufer i pohranili na +4°C. Kvaliteta izolirane DNA ispitana je elektroforezom u gelu agaroze, a koncentracija DNA određena je metodom spektrofotometrije, na UV/VID spektrofotometru (BioSpec-nano UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu Scientific Instruments, Japan).

#### Popis kemikalija i pufera

- pufer RCLB (Red Cell Lysis Buffer): 10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl (Kemika, Hrvatska), pH 7,6; steriliziran autoklaviranjem, čuvan na +4°C
- pufer SE: 75 mM NaCl, 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Kemika, Zagreb), pH 8; steriliziran autoklaviranjem, čuvan na +4°C
- SDS (natrijev laurilsulfat, Sigma, SAD)
- NaCl 5 M (Kemika, Hrvatska), steriliziran autoklaviranjem
- pufer TE: 10 mM Tris-HCl; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0
- izopropanol
- 70% etanol
- agarozna (Type i-A, Low EQ), (Sigma, SAD)
- etidij bromid, 1 µg/mL (Sigma, SAD)

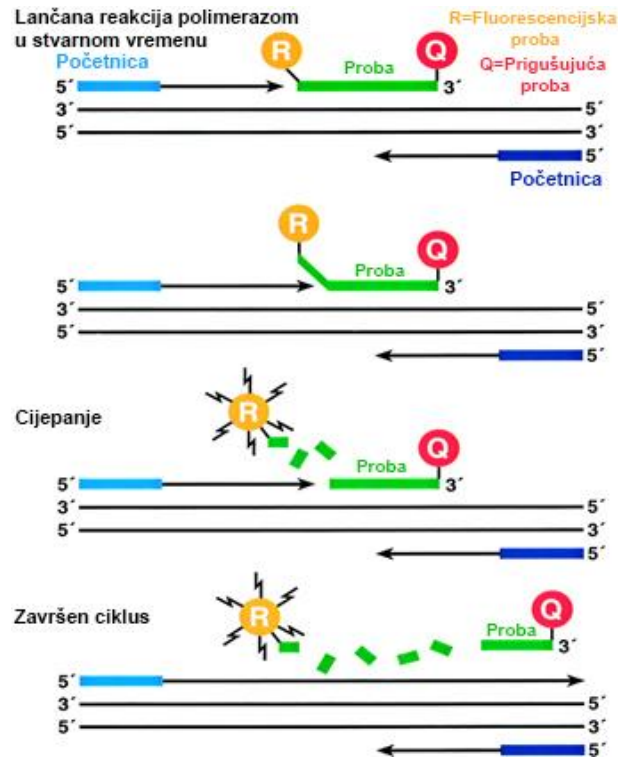


### 3.3. Genotipizacija uzoraka metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *Polymerase chain reaction*) metoda je umnažanja željenog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*, pomoću termostabilnog enzima, Taq-DNA polimeraze i dvije konstruirane oligonukleotidne početnice. Reakcija se odvija u tri koraka koji se ponavljaju 30 do 35 puta; a) proces denaturacije kalupa DNA (najčešće pri temperaturi od 95°C), b) sparivanje početnica (engl. *annealing*) i c) sinteza komplementarnih lanaca DNA.

Razvojem tehnologije došlo je do unaprijeđenja reakcije PCR, naime, omogućeno je praćenje nastanka produkta reakcije u stvarnom vremenu. Reakcijski proces unaprijeđen je uvođenjem inačice oligonukleotidnih početnica, specifično dvostruko obilježenog odsječka genomske DNA, tzv. probe. TaqMan probe su jedan od primjera tzv. hidrolizirajućih proba koje koriste 5'-3' egzonukleaznu aktivnost enzima Taq polimeraze, što omogućava cijepanje dvostruko obilježene komplementarne probe prethodno vezane za kalup DNA.

Praćenje reakcije u stvarnom vremenu zasniva se na paralelnom vezanju početnice i obilježene probe na kalup što omogućava enzimu Taq polimerazi da 5'-3' egzonukleaznom aktivnošću odcijepi 5' kraj probe obilježene fluorogenom. Naime, hibridizirajuća proba je oligonukleotidini odsječak visoko komplementaran kalupu DNA i obilježen fluorescencijskom probom (engl. *reporter*) i prigušujućom probom (engl. *quencher*). One se nalaze na suprotnim krajevima probe i kad su u međusobnoj blizini, kao rezultat energetskog transfera Förster-tipa, blizina prigušivača onemogućava fluorescenciju reporterske boje. Taj mehanizam poznat je kao FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) (Slika 5).



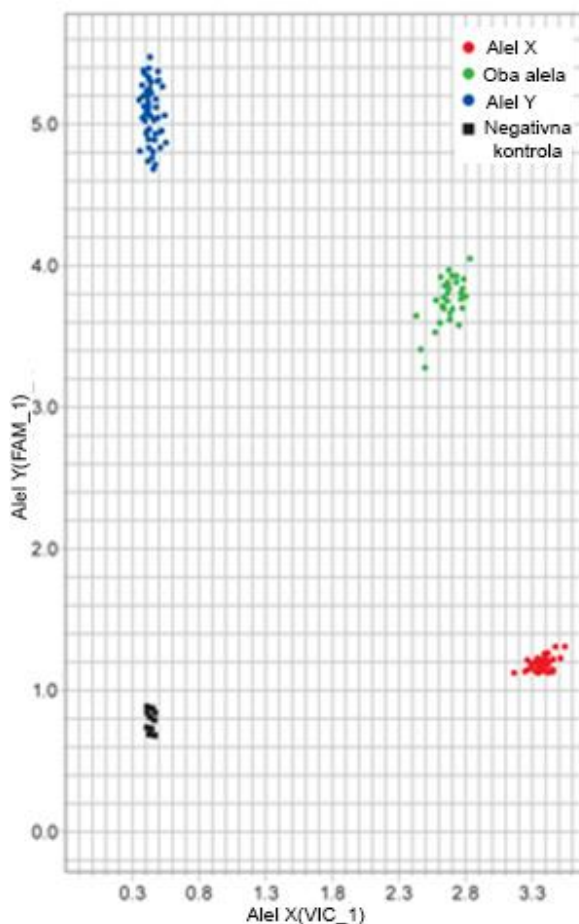
Slika 5. Metoda genotipizacije putem 5' nukleazne reakcije (preuzeto i prilagođeno iz [58])

U ovom radu uzorci su genotipizirani metodom *alelne diskriminacije* koja omogućava istovremeno umnažanje specifičnih odsječaka metodom lančane reakcije polimeraze i njihovu detekciju. Općenito, pojam genotipizacije odnosi se na analizu raznolikosti genomske DNA pojedinaca. Postoje različiti metodološki pristupi genotipizacije; analiza razlike u duljini fragmenata nastalih cijepanjem restrikcijским enzimom (engl. *restriction fragment length polymorphism*), analiza slijeda nukleotida, analiza raznolikosti duljine umnoženih fragmenata i dr.

Princip genotipizacije uzoraka DNA, korišten u ovom radu, sastoji se u tome što smo u reakcijsku smjesu unosili obilježene probe koje su specifične za oba alela koja testiramo na određenom lokusu. U ovom radu analizirali smo tzv. točkaste polimorfizme – SNP-ove. Primjenom ove metode polazi se od pretpostavke da uzorak genomske DNA svakog ispitanika može biti ili heterozigot, ili jedan odnosno drugi homozigot. Komercijalno dostupni eseji su dizajnirani tako da sadrže specifične početnice za odsječak DNA od interesa i visoko komplementarne probe za jedan i drugi alel. Ukoliko je uzorak ispitanika homozigot, tada će

analiza alelne diskriminacije pokazati da je u krajnjem očitavanju ukupne fluorescencije na kraju reakcije PCR (engl. *end-point analysis*) instrument očitao samo fluorescenciju karakterističnu za taj alel. U slučaju kada je ispitanik heterozigot, krajnja analiza očitat će razinu fluorescencije specifične za oba alela (Slika 6).

U ovom radu analizirani su polimorfni biljezi unutar gena *TLR9* i *IRAK4*. U tu svrhu koristili smo komercijalno dostupne eseje (Applied Biosystems, Life Technologies, SAD). Analizu smo provodili na instrumentu Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System. Za potrebe reakcije PCR koristili smo univerzalnu smjesu koja je u sebi sadržavala polimerazu Taq, odgovarajući pufer i potrebne nukleotide (TaqMan Universal MasteMix, Applied Biosystems, Life Technologies, SAD).



**Slika 6.** Primjer prikaza rezultata genotipizacije SNP-ova. Crveno i plavo označeni uzorci su homozigoti jednog ili drugog tipa, dok su zeleno označeni uzorci heterozigoti. Uzorci označeni crno su negativni kontrolni uzorci, uzorci bez genomske DNA.

### 3.4. Analiza baza podataka i kriteriji odabira SNP-ova za analizu

U ovom radu analizirali smo dva polimorfna biljega; SNP smješten unutar promotorske regije gena *TLR9* (rs352139) i SNP smješten unutar kodirajuće regije gena *IRAK4* (rs4251545). Prilikom odabira biljega koji ćemo uključiti u analizu koristili smo se slijedećim kriterijima: 1) epidemiološki ili molekularno biološki literaturni nalazi koji bi upućivali na povezanost testiranih gena s poremećenom regulacijom upalne reakcije i nastankom tumora; 2) da polimorfni biljezi djeluju na razinu ekspresije gena/proteina ili na funkcionalnost proteina mijenjanjem slijeda aminokiselina; 3) učestalost manje zastupljenog alela (engl. *Minor Allele Frequency*) u testiranim populacijama morala je biti  $\geq$  od 1%. U tu svrhu koristili smo se bazama podataka National Center for Biotechnology Information (NCBI) i PubMed.

### 3.5. Statistička obrada podataka

U svrhu statističke obrade podataka korišten je statistički program SAS, verzija 9.2 (SAS Institute, Sjeverna Karolina, SAD). U svrhu određivanja razlike u učestalosti genotipova između ispitivanih skupina, korišten je  $\chi$ -kvadrat test (<http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>). Metodu omjera izgleda (engl. *odds ratio*, OR) koristili smo za određivanje vjerojatnosti pojave raka pluća u skupini s KOPB-om, ovisno o genotipu. Omjer izgleda i njegov interval pouzdanosti (engl. *confidens interval*, CI) izračunati su pomoću logističke regresije [59]. OR je smatran statistički značajan ako 95% CI ne sadrži vrijednost 1, tj. ako je manja ili veća od 1, a *P*-vrijednost je manja od 0,05.

## 4. REZULTATI

Ovim istraživanjem analizirali smo genetičku varijabilnost polimorfnih biljega unutar gena *TLR9* (rs352139) i *IRAK4* (rs4251545) unutar tri različite skupine ispitanika s ciljem ispitivanja povezanosti testiranih biljega s nastankom raka pluća kod ispitanika koji boluju od KOPB-a. Naime, epidemiološka istraživanja pokazuju da osobe koje boluju od KOPB-a imaju 4-5 puta veću mogućnost razviti rak pluća. Genetička podloga opisanog fenomena potpuno je nepoznata, a osobito malo se zna o tome kako geni uključeni u aktivaciju i regulaciju imunskog odgovora sudjeluju u tom procesu. Nakon kliničke obrade (uzimanja anamnestičkih podataka i učinjenih pretraga), ispitanici su bili razvrstani u tri skupine: skupina **0** (ispitanici koji boluju isključivo od KOPB-a, kontrolna skupina; N=183); skupina **1** (ispitanici koji uz KOPB boluju i od raka pluća (KP); N=151) i skupina **2** (ispitanici koji boluju isključivo od raka pluća (KP); N=115). U istraživanje je bilo uključeno ukupno 499 ispitanika; 201 ispitanica ženskog spola i 298 ispitanika muškog spola. Uzorci krvi ispitanika skupljeni su u Klinici za plućne bolesti Jordanovac, Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu, u vremenu od siječnja 2013. do prosinca 2014. godine.

Nakon genotipizacije uzoraka metodom alelne diskriminacije pomoću specifičnih proba Taqman i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, svi dobiveni rezultati bili su unešeni u tablicu koja je sadržavala podatke o svakom ispitaniku, i to: kodni broj ispitanika (kodni broj pod kojim je uzorak zaprimljen u laboratorij), spol ispitanika, dob ispitanika, oznaku skupine u koju ispitanik pripada (0, 1 ili 2) i pripadajući genotip. Tako pripremljena tablica koristila se za statističku obradu podataka. Tablice 1, 2, 3, 4, 5 i 6 prikazuju učestalost pojedinih genotipova i njihov međusobni odnos ( $P$  vrijednosti rezultata  $\chi$ -kvadrat testa i logističke regresije) unutar tri skupine ispitanika. Ispitanici su dodatno bili razvrstani i u grupe prema spolu, odnosno prema dobi, kako bismo vidjeli utječu li ta dva parametra na snagu statističkog izračuna.

#### 4.1. Učestalost polimorfnog biljega rs4251545 gena IRAK4

Polimorfni biljeg *rs4251545* smješten je u kodirajućoj regiji gena *IRAK4*, unutar regije proteina odgovorne za kinaznu aktivnost. Rezultati analize baze podataka NCBI pokazali su da je učestalost manje zastupljenog alela (A), u općoj populaciji, na približno 1400 analiziranih ispitanika, 18%. Karakterizira ga promjena nukleotida G→A, što na proteinskom nivou dovodi do zamjene aminokiseline alanin u treonin (Ala428Thr). Analiza učestalosti polimorfnog biljega *rs4251545* provedena je na tri ranije navedene skupine ispitanika (0, 1 i 2).

Statistička obrada rezultata genotipizacije polimorfnog biljega *rs4251545*, s ciljem određivanja raspodjele genotipova unutar skupina ispitanika, pokazala je da ne postoji značajna razlika u raspodjeli genotipova. Niti u jednoj korelaciji navedenih skupina, bilo da se radi o usporedbi kontrolne skupine s pacijentima KOPB+rak pluća, ili onih koji imaju samo rak pluća, nismo pokazali postojanje povezanosti pojedinih genotipova s kliničkom slikom ispitanika (Tablica 1, Slika 7). Kao što je prikazano Tablicama 2 i 3, niti uzimanjem u obzir spola i dobi ispitanika, usporedbom unutar već opisanih skupina nisu pronađene statistički značajne razlike (Slike 8 i 9). Naime, vrijednosti *P* za sve analizirane raspodjele genotipova polimorfnog biljega *rs4251545*, u svim skupinama ispitanika bile su veće od 0,05 ( $P > 0,05$ ), točnije statistički neznačajne.

**Tablica 1.** Učestalost genotipova polimorfnog biljega rs4251545 gena *IRAK4* unutar skupina ispitanika

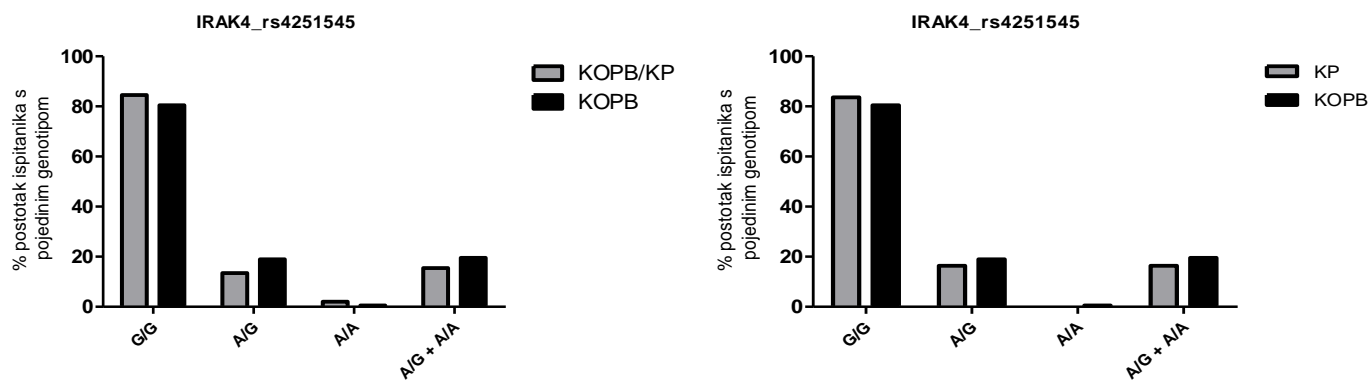
IRAK4_rs4251545_GA								
KOPB+KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	126	84,56%	144	80,45%		1	
	A/G	20	13,42%	34	18,99%	0,194	0,67 (0,37-1,23)	0,057
	A/A	3	2,00%	1	0,56%	0,260	3,43 (0,35-33,38)	0,317
	A/G + A/A	23	15,44%	35	19,55%	0,330	0,75 (0,42-1,34)	0,115
KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	97	83,62%	144	80,45%		1	0,002
	A/G	19	16,38%	34	18,99%	0,553	0,83 (0,45-1,54)	0,039
	A/A	0	0,00%	1	0,56%	0,412	0,00 (0,00-1)	0,317
	A/G + A/A	19	16,38%	35	19,55%	0,491	0,81 (0,44-1,49)	0,029

P vrijednost\* - *P* vrijednost rezultata dobivenih  $\chi$ -kvadrat testom

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

KP – rak pluća

OR – omjer izgleda



**Slika 7.** Učestalost genotipova biljega rs4251545 gena *IRAK4* u skupinama ispitanika prije raspodjele prema spolu i dobi.



**Tablica 2.** Učestalost genotipova polimorfnog biljega rs4251545 gena *IRAK4* unutar skupina ispitanika nakon raspodjele prema spolu

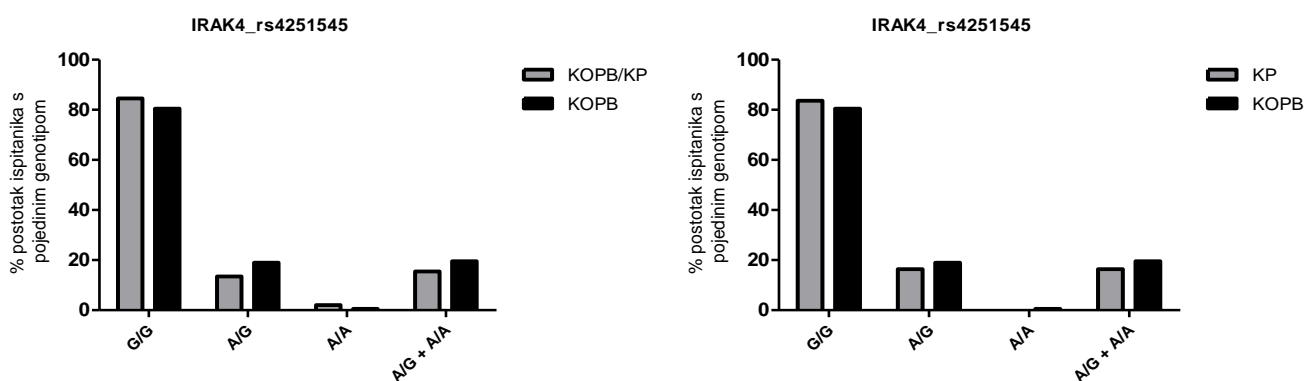
IRAK4_rs4251545_GA		Raspodijela prema spolu						
KOPB+KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	126	84,56%	144	80,45%		1	
	A/G	20	13,42%	34	18,99%	0,194	0,69 (0,38-1,27)	0,235
	A/A	3	2,00%	1	0,56%	0,260	3,56 (0,36-34,85)	0,275
	A/G + A/A	23	15,44%	35	19,55%	0,330	0,77 (0,43-1,39)	0,387
KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	97	83,62%	144	80,45%		1	
	A/G	19	16,38%	34	18,99%	0,553	0,78 (0,42-1,45)	0,430
	A/A	0	0,00%	1	0,56%	0,412	0,00 (0,00-1)	0,987
	A/G + A/A	19	16,38%	35	19,55%	0,491	0,76 (0,41-1,41)	0,382

P vrijednost\* - P vrijednost rezultata dobivenih  $\chi$ -kvadrat testom

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

KP – rak pluća

OR – omjer izgleda



**Slika 8.** Učestalost genotipova biljega rs4251545 gena *IRAK4* nakon raspodjele ispitanika prema spolu

**Tablica 3.** Učestalost genotipova polimorfnog biljega rs4251545 gena *IRAK4* unutar skupina ispitanika nakon raspodjele prema dobi

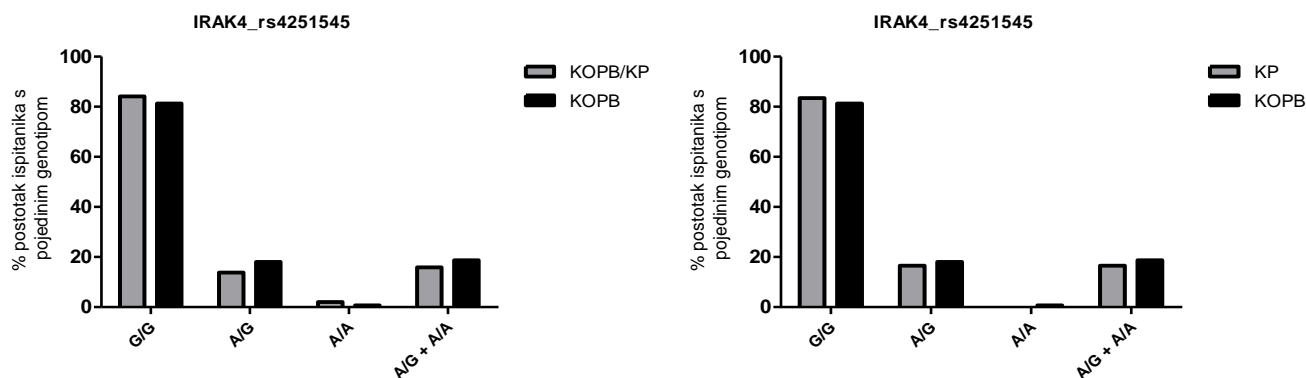
IRAK4_rs4251545_GA		Raspodjela prema dobi						
KOPB+KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	122	84,14%	122	81,33%		1	
	A/G	20	13,79%	27	18,00%	0,350	0,73 (0,38-1,40)	0,340
	A/A	3	2,00%	1	0,67%	0,321	3,75 (0,37-37,76)	0,262
	A/G + A/A	23	15,86%	28	18,67%	0,524	0,83 (0,44-1,54)	0,548
KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	96		122	81,33%		1	
	A/G	19	16,52%	27	18,00%	0,734	0,90 (0,47-1,71)	0,739
	A/A	0	0,00%	1	0,67%	0,376	0,00 (0,00-1)	0,986
	A/G + A/A	19	16,52%	28	18,67%	0,651	0,87 (0,46-1,65)	0,661

P vrijednost\* - P vrijednost rezultata dobivenih  $\chi$ -kvadrat testom

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

KP – rak pluća

OR – omjer izgleda



**Slika 9.** Učestalost genotipova biljega rs4251545 gena *IRAK4* nakon raspodjele ispitanika prema dobi

#### 4.2. Učestalost polimorfnog biljega rs352139 gena TLR9

Polimorfni biljeg rs352139 smješten je unutar promotorske regije gena TLR9. Rezultati analize baze podataka NCBI pokazali su da je učestalost manje zastupljenog alela (G) u općoj populaciji, na približno 1200 analiziranih ispitanika, 50%. Karakterizira ga promjena nukleotida A→G.

Analiza učestalosti genotipova polimorfnog biljega rs352139 također je provedena na sve tri navedene skupine ispitanika, kao što je opisano za biljeg u genu *IRAK4*. Statistička obrada rezultata dobivenih nakon genotipizacije pokazala je postojanje značajne razlike u raspodjeli genotipova unutar analiziranih skupina ispitanika. Iz Tablice 4. možemo zaključiti da je u kontrolnoj skupini ispitanika (KOPB) statistički značajnije zastupljen genotip A/G (53,01%) u odnosu na skupinu bolesnika koji boluju od KOPB-a i raka pluća (KOPB+KP) (36,42%; P-vrijednost 0,0059). Unutar iste korelacijske grupe uočeno je da je ukupna učestalost alela A (A/G+A/A) značajno češća u kontrolnoj skupini; KOPB (68,31%), a KOPB+KP (56,95%;  $P < 0,0328$ ). Korelacijom ispitanika kontrolne skupine i ispitanika koji boluju samo od raka pluća (KP) nisu uočene razlike u učestalosti genotipova (Slika 10).

**Tablica 4.** Učestalost genotipova polimorfnog biljega rs352139 gena *TLR9* unutar skupina ispitanika

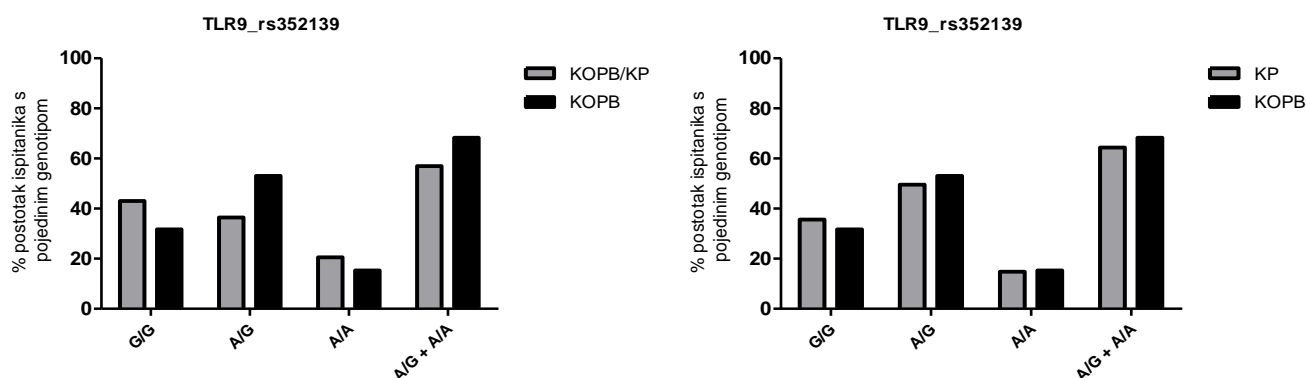
TLR9_rs352139_GA								
KOPB+KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	65	43,05%	58	31,69%		1	
	A/G	55	36,42%	97	53,01%	<b>0,0056</b>	0,51 (0,31-0,82)	<b>0,0059</b>
	A/A	31	20,53%	28	15,30%	0,9750	0,99 (0,53-1,84)	0,9694
	A/G + A/A	86	56,95%	125	68,31%	<b>0,0323</b>	0,61 (0,39-0,96)	<b>0,0328</b>
KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	41	35,65%	58	31,69%		1	
	A/G	57	49,57%	97	53,01%	0,4830	0,83 (0,50-1,39)	0,4833
	A/A	17	14,78%	28	15,30%	0,6801	0,86 (0,42-1,77)	0,6802
	A/G + A/A	74	64,35%	125	68,31%	0,4810	0,84 (0,51-1,37)	0,4803

P vrijednost\* - P vrijednost rezultata dobivenih  $\chi$ -kvadrat testom

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

KP – rak pluća

OR – omjer izgleda



**Slika 10.** Učestalost genotipova biljega rs352139 gena *TLR9* u skupinama ispitanika prije raspodjele prema spolu i dobi.

Kada je statistička obrada učestalosti genotipova bila prilagođena na spol ispitanika rezultati su pokazali gotovo isti obrazac kao i bez tog parametra; usporedbom kontrolne skupine i skupine KOPB+KP uočena je povećana učestalost genotipa A/G u kontrolnoj skupini ( $P < 0,0052$ ) i povećana ukupna učestalost alela A unutar kontrolne skupine ( $P < 0,0275$ ) (Tablica 5, Slika 11). Usporedbom kontrolne skupine i skupine ispitanika koji boluju samo od raka pluća nije pronađena statistički značajna raspodjela genotipova i alela.

**Tablica 5.** Učestalost genotipova polimorfnog biljega rs352139 gena *TLR9* unutar skupina ispitanika nakon raspodjele prema spolu

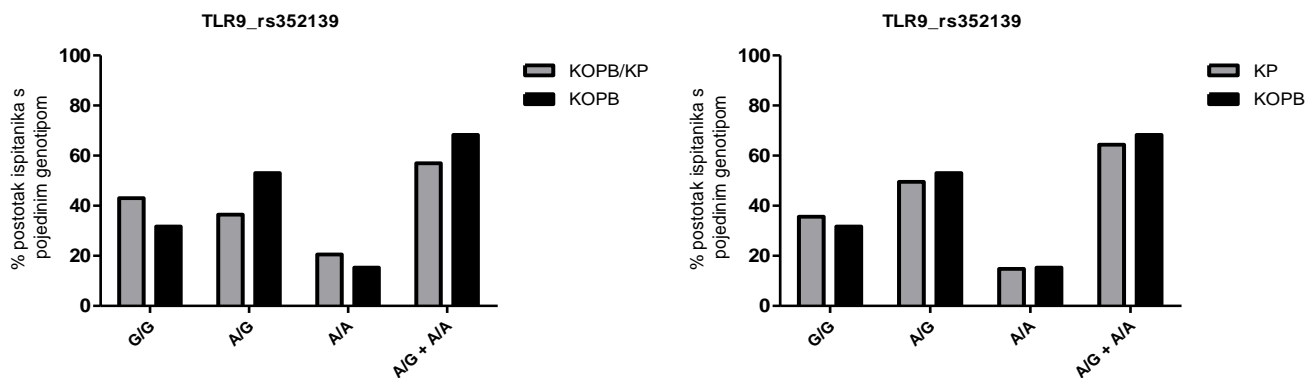
TLR9_rs352139_GA		Raspodjela prema spolu						
KOPB+KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	65	43,05%	58	31,69%		1	
	A/G	55	36,42%	97	53,01%	<b>0,0056</b>	0,50 (0,31-0,81)	<b>0,0052</b>
	A/A	31	20,53%	28	15,30%	0,9750	0,96 (0,51-1,79)	0,8979
	A/G + A/A	86	56,95%	125	68,31%	<b>0,0323</b>	0,60 (0,38-0,95)	<b>0,0275</b>
KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	41	35,65%	58	31,69%		1	
	A/G	57	49,57%	97	53,01%	0,4830	0,81 (0,48-1,36)	0,4254
	A/A	17	14,78%	28	15,30%	0,6801	0,88 (0,43-1,83)	0,7421
	A/G + A/A	74	64,35%	125	68,31%	0,4810	0,83 (0,50-1,36)	0,4493

P vrijednost\* - P vrijednost rezultata dobivenih  $\chi$ -kvadrat testom

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

KP – rak pluća

OR – omjer izgleda



**Slika 11.** Učestalost genotipova biljega rs352139 gena *TLR9* u skupinama ispitanika nakon raspodjele prema spolu.

Kada je statistička obrada učestalosti genotipova bila prilagođena na dob ispitanika rezultati su pokazali nešto izmjenjeni obrazac, usporedbom kontrolne skupine i skupine KOPB+KP uočena je povećana učestalost genotipa A/G u kontrolnoj skupini ( $P < 0,0247$ ), ali učestalost alela A bila je neznačajno raspoređena ( $P > 0,0825$ ) (Tablica 6, Slika 12). Usporedbom kontrolne skupine i skupine ispitanika koji boluju samo od raka pluća nije pronađena statistički značajna raspodjela genotipova i alela.

**Tablica 6.** Učestalost genotipova polimorfnog biljega rs352139 gena *TLR9* unutar skupina ispitanika nakon raspodjele prema dobi.

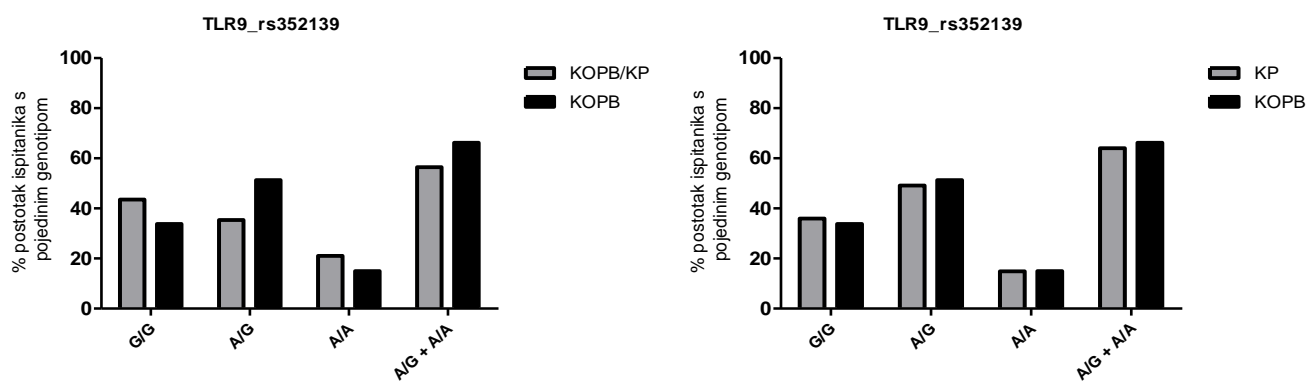
TLR9_rs352139_GA		Raspodjela prema dobi						
KOPB+KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	64	43,54%	52	33,77%		1	
	A/G	52	35,37%	79	51,30%	<b>0,0151</b>	0,55 (0,33-0,93)	<b>0,0247</b>
	A/A	31	21,00%	23	14,94%	0,7842	0,98 (0,50-1,91)	0,9474
	A/G + A/A	83	56,46%	102	66,23%	0,0825	0,65 (0,40-1,06)	0,0825
KP vs KOPB	Genotip	Bolesnici		Kontrola		P vrijednost*	OR	P vrijednost
	G/G	41	35,96%	52	33,77%		1	
	A/G	56	49,12%	79	51,30%	0,6960	0,90 (0,53-1,53)	0,6926
	A/A	17	14,91%	23	14,94%	0,8650	0,86 (0,40-1,84)	0,6985
	A/G + A/A	73	64,04%	102	66,23%	0,7083	0,89 (0,53-1,48)	0,6519

P vrijednost\* - P vrijednost rezultata dobivenih  $\chi$ -kvadrat testom

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

KP – rak pluća

OR – omjer izgleda



**Slika 12.** Učestalost genotipova biljega rs352139 gena *TLR9* u skupinama ispitanika nakon raspodjele prema dobi.

## 5. RASPRAVA

KOPB je jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu i predstavlja veliki javno-zdravstveni problem. Rak pluća, koji je prema epidemiološkim istraživanjima najčešći komorbiditet KOPB-a, vodeći je uzrok smrtnosti od malignih bolesti; godišnje se u Hrvatskoj registrira oko 3000 novih bolesnika. Nažalost, umre ih gotovo isto toliko. S obzirom na to da su simptomi bolesti nespecifični i javljaju se tek u uznapredovaloj fazi, pacijenti se često javljaju prekasno zbog čega je rano otkrivanje neuspješno. Najčešći čimbenik rizika KOPB-a i raka pluća je pušenje. Ipak, samo 20-30% teških pušača razvije KOPB, a 10-15% rak pluća. Međutim, postoje radovi koji pokazuju da prisutnost KOPB-a 4-5 puta povećava vjerojatnost razvoja raka pluća, neovisno o pušačkim navikama [60]. Stoga je logično pretpostaviti da postoje i neki drugi čimbenici rizika, kao na primjer genetička podloga koja bi bila povezana sa sklonošću pojedinca za razvoj raka pluća.

Sve više literaturnih podataka upućuje na činjenicu da je kronična upala kao posljedica izlaganja toksičnim spojevima, osim pušenja, jedan od zajedničkih čimbenika rizika za razvoj KOPB-a i raka pluća [61]. Pretpostavlja se da proces karcinogeneze u proupalnom okruženju nastaje tijekom ciklusa popravka i oštećenja tkiva. Međutim, u literaturi i dalje ne postoje podaci koji bi upućivali koji su točno geni aktivatori/modulatori imunskog odgovora uključeni u te procese i koja je njihova uloga u epitelnim stanicama dišnih puteva. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati kako je proupalno okruženje, nastalo na mjestu oštećenja plućnog parenhima, kod ispitanika s KOPB-om, povezano s nastankom maligne bolesti. U tu svrhu ispitali smo postoji li genetička povezanost polimorfnih biljega smještenih unutar gena odgovornih za aktivaciju i regulaciju urođene imunosti i upale (geni *TLR9* i *IRAK4*) s nastankom KOPB-a i raka pluća. Ispitanike smo podijelili u 3 skupine (0,1 i 2; pogledati dio rada Rezultati) i međusobnim uspoređivanjem navedenih skupina pratili raspodjelu pronađenih genotipova.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su statistički značajnu raspodjelu genotipa A/G i ukupnu učestalost alela A polimorfnog biljega rs352139 gena *TLR9* unutar kontrolne skupine ispitanika. Pokazali smo da je alel A znatno češće zastupljen unutar kontrolne skupine ispitanika iz čega smo zaključili da bi taj alel mogao imati zaštitnu ulogu. Kako se dobiveni rezultat uklapa u postavljeni cilj i hipotezu? U ovom radu krenuli smo od pretpostavke da bi strukturne promjene u genima odgovornim za aktivaciju i regulaciju imunskog

odgovora/upalne reakcije mogle imati veze s nastankom i razvojem raka pluća kod osoba s KOPB-om. Od prije je poznato da je poremećena regulacija i aktivacija upale, kao i polimorfnost gena odgovornih za pokretanje imunskog odgovora, povezana s nastankom i razvojem tumora [62]. KOPB je definitivno povezana s poremećenom regulacijom upalne reakcije respiratornog tkiva na inhalirane štetne tvari i posljedičnim ubrzanim propadanjem plućne funkcije [63], [64]. Tako su Hogg i suradnici pokazali da je prisutnost upalnih stanica u dišnim putevima i plućnom parenhimu prisutna već u najranijim fazama bolesti što ukazuje na vrlo vjerojatnu sklonost pojedinca ka razvoju KOPB-a [65]. Poznato je da duhanski dim aktivira stanice urođene imunosti, kao što su epitelne stanice i makrofagi, putem receptora urođene imunosti, točnije TLR4, što dovodi do pojačane ekspresije pro-interleukina-1 $\beta$  koji se dalje cijepa u aktivni oblik IL-1 $\beta$ . Miševi bez ekspresije IL-1R pokazuju smanjenu upalnu reakciju nakon akutnog izlaganja duhanskom dimu koja ostaje na istoj razini i nakon prestanka izlaganja štetnom spoju [66]. Vrlo je vjerojatno da upalom inducirana razgradnja izvanstaničnog matriksa omogućuje oslobađanje proupalnih ulomaka kemotaksičnih svojstava za neutrofile i monocite koji bi i dalje podržavali upalu. S druge strane, moguće je da poremećena imunska reakcija u dišnim putevima predisponira za kolonizaciju bakterija i infekciju, što povećava oštećenje epitela dišnih puteva, te se tako zatvara krug događaja koji za posljedicu imaju samo povećanje upale. Kako je TLR9 odgovoran za aktivaciju urođene imunosti nakon stimulacije nukleinskim kiselinama, pretpostavljamo da bi njegova uloga u ovim procesima mogla biti dvojaka; ili sudjeluje u aktivaciji imunskog odgovora preko koloniziranih bakterija u dišnom sustavu, ili je aktiviran endogenim ligandima nastalim razgradnjom tkiva. Prema literaturnim podacima, polimorfni biljeg rs352139 se povezuje s promjenom ekspresije gena TLR9. Naime, Tao i suradnici su pokazali da je alel G ovog lokusa povezan sa smanjenom ekspresijom gena [67]. Na osnovu naših rezultata zaključili smo da alel A ima zaštitnu ulogu, obzirom na povećanu učestalost u kontrolnoj skupini. Jednostavnim zaključivanjem moglo bi se reći da bi povećana ekspresija gena TLR9, zbog prisutnosti alela A, bila povezana s povoljnijim ishodom. Ipak treba uzeti u obzir i neke druge literaturne podatke kao npr. rad u kojem su autori pokazali da ista mutacija unutar TLR9 gena (R892W), na različitim primarnim staničnim kulturama istog donora ima različiti funkcionalni ishod [68]. Za donošenje zaključaka neophodno je provesti opsežna funkcionalna istraživanja ne samo na stanicama imunskog sustava koje dominantno ekspimiraju TLR9 (pDC i stanice leukocita B), već i na epitelnim stanicama dišnog sustava.



Rezultati analize raspodjele polimornog biljega rs4251545, smještenog unutar kodirajuće regije gena IRAK4, pokazali su da ne postoji statistički značajna raspodjela genotipova analiziranih unutar našeg sustava. Na osnovu tih rezultata zaključili smo da, u našem uzorku, ne postoji povezanost gena IRAK4 s nastankom raka pluća kod osoba s KOPB-om. IRAK4 pripada obitelji unutarstaničnih serin/treonin kinaza i ima značajnu ulogu u prijenosu signala putem TLR-a. Analizirani polimorfni biljeg smješten je unutar regije proteina odgovorne za kinaznu aktivnost. Ovaj polimorfizam ima za posljedicu promjenu slijeda aminokiselina u proteinu, alanin prelazi u treonin, te smo stoga pretpostavili da bi pronalaženje povezanosti ovog biljega s analiziranim skupinama bile izuzetno zanimljivo. Prema našem saznanju, do sada ne postoje radovi koji su ispitivali povezanost ovog polimornog biljega i KOPB-a i raka pluća. Funkcionalne posljedice ovog polimorfizma opisali su Yeyeodu i suradnici [69]. Na molekularno-dinamičkom simulacijskom modelu (*in silico*) su pokazali da vrlo vjerojatno dolazi do promjene polarosti regije odgovorne za kinaznu aktivnost, ali i razine transkripcije proteina IRAK4, obzirom na smještaj polimorfizma u regulatornom dijelu gena (mjesto odgovorno za vezanje pojačivača i utišavača transkripcije). Nadalje, asocijacijska istraživanja pokazala su da osobe koje nose alel A imaju oko 5 puta veću vjerojatnost da će razviti rak dojke [69]. Roger i suradnici pokazali su da osobe koje nose alel A imaju oko 50% manju vjerojatnost da će razviti rak prostate, dok su Yin i suradnici pokazali da osobe koje nose alel A imaju povećanu sklonost ka razvoju septičkog šoka [70], [71].

Zaključno, pronalaženje genetičkih odrednica povezanih s patološkim stanjem i ispitivanje njihovog funkcionalnog značaja izuzetno je značajno u modernoj medicini. U konkretnom slučaju pretpostavljamo da će i ovi naši rezultati doprinijeti razvojjima novih proboja u patobiologiji, dijagnosticiranju i liječenju KOPB-a i raka pluća.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Analiza podataka pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova polimorfnog biljega rs4251545, smještenog u kodirajućoj regiji gena *IRAK4*, unutar ispitivanih skupina ispitanika.
2. U našem uzorku ispitanika ne postoji povezanost polimorfnog biljega rs4251545 gena *IRAK4* i ispitivanih fenotipova.
3. Pronađena je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipa A/G polimorfnog biljega rs352139 gena *TLR9* i alela A; značajno su češće zastupljeni unutar kontrolne skupine ispitanika (KOPB).
4. Prema našim rezultatima pokazali smo postojanje povezanosti biljega rs352139 gena *TLR9* i ispitivanih fenotipova, tj. alel A je znatno češće zastupljen unutar kontrolne skupine ispitanika te zaključujemo da ima zaštitnu ulogu u razvoju raka pluća kod osoba sa KOPB-om.
5. Usporedbom učestalosti genotipova biljega rs352139 gena *TLR9* unutar kontrolne skupine i skupine ispitanika s rakom pluća nismo pronašli statistički značajnu raspodjelu, stoga zaključujemo da je zaštitna uloga povezana s prisutnošću KOPB-a.
6. Zaključno, ukoliko ispitanik s KOPB-om koji na lokusu rs352139 ima alel A, ima statistički značajno manju vjerojatnost za razvoj raka pluća.

## 7. LITERATURA

1. Pauwels R. A., Rabe K. F. 2004. *Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. Lancet, **364**, 613-20.
2. Lommatzsch M., Bratke K., Knappe T., Bier A., Dreschler K., Kuepper M., Stoll P., Julius P., Virchow J. C. 2010. *Acute effects of tobacco smoke on human airway dendritic cells in vivo*. Eur Respir J, **35**, 1130-6.
3. Mannino D. M., Aguayo S. M., Petty T. L., Redd S. C. 2003. *Low lung function and incident lung cancer in the United States: data From the First National Health and Nutrition Examination Survey follow-up*. Arch Intern Med, **163**, 1475-80.
4. Tockman M. S., Anthonisen N. R., Wright E. C., Donithan M. G. 1987. *Airways obstruction and the risk for lung cancer*. Ann Intern Med, **106**, 512-8.
5. Skillrud D. M., Offord K. P., Miller R. D. 1986. *Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study*. Ann Intern Med, **105**, 503-7.
6. Purdue M. P., Gold L., Jarvholm B., Alavanja M. C., Ward M. H., Vermeulen R. 2007. *Impaired lung function and lung cancer incidence in a cohort of Swedish construction workers*. Thorax, **62**, 51-6.
7. Turner M. C., Chen Y., Krewski D., Calle E. E., Thun M. J. 2007. *Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers*. Am J Respir Crit Care Med, **176**, 285-90.
8. Mannino D. M., 2007. *COPD and lung cancer have come a long way ...baby*. Am J Respir Crit Care Med, **176**, 108-9.
9. Sun Z., Yang P. 2004. *Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression*. Lancet Oncol, **5**(3): p. 182-90.
10. Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik J. M. 2001. *Immunobiology, 5th edition*. New York: Garland Science.
11. Murphy K., Travers P. 2008. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science.
12. Janeway C. A., Jr., Medzhitov R. 2002. *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, **20**, 197-216.
13. Lee M. S., Kim Y. J. 2007. *Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk*. Annu Rev Biochem, **76**, 447-80.
14. Chaplin D. D. 2010. *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, **125**, S3-23.
15. Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. J. 2001. *The Immune system in Health and Disease*. New York and London: Garland science.
16. Piccinini A. M., Midwood K. S. 2010. *DAMPening inflammation by modulating TLR signalling*. Mediators Inflamm, **2010**.
17. Takeuchi O., Akira S. 2010. *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, **140**, 805-20.
18. Akira S., Takeda K., Kaisho T. 2001. *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, **2**, 675-80.
19. Anderson K. V., Jurgens G., Nusslein-Volhard C. 1985. *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product*. Cell, **42**, 779-89.

20. Bowie A., O'Neill L. A. 2000. *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products*. J Leukoc Biol, **67**, 508-14.
21. Palm N. W., Medzhitov R. 2009. *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity*. Immunol Rev, **227**, 221-33.
22. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. 2006. *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, **124**, 783-801.
23. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M. Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. 1998. *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, **282**, 2085-8.
24. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C. A., Jr. 1997. *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, **388**, 394-7.
25. Qureshi S. T., Lariviere L., Leveque G., Clermont S., Moore K. J., Gros P., Malo D. 1999. *Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)*. J Exp Med, **189**, 615-25.
26. Kawai T., Akira S. 2006. *TLR signaling*. Cell Death Differ, **13**(5): p. 816-25.
27. Trinchieri G., Sher A. 2007. *Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence*. Nat Rev Immunol, **7**, 179-90.
28. Droemann D., Albrecht D., Gerdes J., Ulmer A. J., Branscheid D., Vollmer E., Dalhoff K., Zabel P., Goldmann T. 2005. *Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9*. Respir Res, **6**, 1.
29. Peng S. L. 2005. *Signaling in B cells via Toll-like receptors*. Curr Opin Immunol, **17**, 230-6.
30. Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S., Medzhitov R. 2004. *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell, **118**, 229-41.
31. Akira S., Takeda K. 2004. *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, **4**, 499-511.
32. Takeda K., Akira S. 2003. *Toll receptors and pathogen resistance*. Cell Microbiol, **5**, 143-53.
33. Barton G. M., Medzhitov R. 2003. *Toll-like receptor signaling pathways*. Science, **300**, 1524-5.
34. Kobayashi K., Hernandez L. D., Galan J. E., Janeway C. A., Jr., Medzhitov R., Flavell R. A. 2002. *IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling*. Cell, **110**, 191-202.
35. Huang B., Zhao J., Unkeless J. C., Feng Z. H., Xiong H. 2008. *TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword*. Oncogene, **27**, 218-24.
36. Kawai T., Akira S. 2007. *TLR signaling*. Semin Immunol, **19**, 24-32.
37. Chuang T. H., Ulevitch R. J. 2000. *Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9*. Eur Cytokine Netw, **11**, 372-8.
38. Takeshita F., Gursel I., Ishii K. J., Suzuki K., Gursel M., Klinman D. M. 2004. *Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9*. Semin Immunol, **16**, 17-22.
39. Eaton-Bassiri A., Dillon S. B., Cunningham M., Ryczyn M. A., Mills J., Sarisky R. T., Mbow M. L. 2004. *Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells*. Infect Immun, **72**, 7202-11.

40. O'Neill L. A., Bryant C. E., Doyle S. L. 2009. *Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer*. *Pharmacol Rev*, **61**, 177-97.
41. Merrell M. A., Ilvesaro J. M., Lehtonen N., Sorsa T., Gehrs B., Rosenthal E., Chen D., Shackley B., Harris K. W., Selander K. S. 2006. *Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity*. *Mol Cancer Res*, **4**, 437-47.
42. Bauer S., Pigisch S., Hangel D., Kaufmann A., Hamm S. 2008. *Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9*. *Immunobiology*, **213**, 315-28.
43. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. 2000. *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. *Nature*, **408**, 740-5.
44. Takeda K., Akira S. 2001. *Roles of Toll-like receptors in innate immune responses*. *Genes Cells*, **6**, 733-42.
45. Rosati O., Martin M. U. 2002. *Identification and characterization of murine IRAK-M*. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**, 1472-7.
46. Flannery S., Bowie A. G. 2010. *The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling*. *Biochem Pharmacol*, **80**, 1981-91.
47. Neumann D., Kollewe C., Pich A., Cao P., Resch K., Martin M. U. 2008. *Threonine 66 in the death domain of IRAK-1 is critical for interaction with signaling molecules but is not a target site for autophosphorylation*. *J Leukoc Biol*, **84**, 807-13.
48. Suzuki N., Suzuki S., Duncan G. S., Millar D. G., Wada T., Mirtsos C., Takada H., Wakeham A., Itie A., Li S., Penninger J. M., Wesche H., Ohashi P. S., Mak T. W., Yeh W. C. 2002. *Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4*. *Nature*, **416**, 750-6.
49. Garantziotis S., Hollingsworth J. W., Zaas A. K., Schwartz D. A. 2008. *The effect of toll-like receptors and toll-like receptor genetics in human disease*. *Annu Rev Med*, **59**, 343-59.
50. Schroder N. W., Diterich I., Zinke A., Eckert J., Draing C., von Baehr V., Hassler D., Priem S., Hahn K., Michelsen K. S., Hartung T., Burmester G. R., Gobel U. B., Hermann C., Schumann R. R. 2005. *Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by *Borrelia burgdorferi* and protects from late stage Lyme disease*. *J Immunol*, **175**, 2534-40.
51. Arbour N. C., Lorenz E., Schutte B. C., Zabner J., Kline J. N., Jones M., Frees K., Watt J. L., Schwartz D. A. 2000. *TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans*. *Nat Genet*, **25**, 187-91.
52. Lorenz E., Mira J. P., Cornish K. L., Arbour N. C., Schwartz D. A. 2000. *A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection*. *Infect Immun*, **68**, 6398-401.
53. Ogun A. C., Yoldas B., Ozdemir T., Uguz A., Olcen S., Keser I., Coskun M., Cilli A., Yegin O. 2004. *The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease*. *Eur Respir J*, **23**, 219-23.
54. Hawn T. R., Wu H., Grossman J. M., Hahn B. H., Tsao B. P., Aderem A. 2005. *A stop codon polymorphism of Toll-like receptor 5 is associated with resistance to systemic lupus erythematosus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10593-7.
55. Klimosch S. N., Forsti A., Eckert J., Knezevic J., Bevier M., von Schonfels W., Heits N., Walter J., Hinz S., Lascorz J., Hampe J., Hartl D., Frick J. S., Hemminki K.,

- Schafmayer C., Weber A. N. 2013. *Functional TLR5 genetic variants affect human colorectal cancer survival*. *Cancer Res*, **73**, 7232-42.
56. Burton P. R., Tobin M. D., Hopper J. L. 2005. *Key concepts in genetic epidemiology*. *Lancet*, **366**, 941-51.
57. Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. 1988. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. *Nucleic Acids Res*, **16**, 1215.
58. Yuan C. P. R. J., Wang C., Goodsaid F., Waters J.D. 2000. *5' Nuclease Assays for the Loci CCR5-+/Δ32, CCR2-V64I, and SDF1-G801A Related to Pathogenesis of AIDS*. *Clinical Chemistry*, January. **46**, 24-30.
59. Sperandei S. 2014. *Understanding logistic regression analysis*. *Biochemia Medica*, **24**, 12-8.
60. Koshiol J., Rotunno M., Consonni D., Pesatori A. C., De Matteis S., Goldstein A. M., Chaturvedi A. K., Wacholder S., Landi M. T., Lubin J. H., Caporaso N. E. 2009. *Chronic obstructive pulmonary disease and altered risk of lung cancer in a population-based case-control study*. *PLoS One*, **4**, e7380.
61. Sekine Y., Hata A., Koh E., Hiroshima K. 2014. *Lung carcinogenesis from chronic obstructive pulmonary disease: characteristics of lung cancer from COPD and contribution of signal transducers and lung stem cells in the inflammatory microenvironment*. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, **62**, 415-21.
62. Demaria S., Pikarsky E., Karin M., Coussens L. M., Chen Y. C., El-Omar E. M., Trinchieri G., Dubinett S. M., Mao J. T., Szabo E., Krieg A., Weiner G. J., Fox B. A., Coukos G., Wang E., Abraham R. T., Carbone M., Lotze M. T. 2010. *Cancer and inflammation: promise for biologic therapy*. *J Immunother*, **33**, 335-51.
63. Jankovic M., Samarzija M., Jakopovic M., Kulis T., Znaor A. 2012. *Trends in lung cancer incidence and mortality in Croatia, 1988-2008*. *Croat Med J*, **53**(2): p. 93-9.
64. Roche N., Huchon G. 2004. *[Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease]*. *Rev Prat*, **54**, 1408-13.
65. Hogg J. C., Chu F., Utokaparch S., Woods R., Elliott W. M., Buzatu L., Cherniack R. M., Rogers R. M., Sciurba F. C., Coxson H. O., Pare P. D. 2004. *The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease*. *N Engl J Med*, **350**, 2645-53.
66. Brusselle G. G., Joos G. F., Bracke K. R. 2011. *New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease*. *Lancet*, **378**, 1015-26.
67. Tao K., Fujii M., Tsukumo S., Maekawa Y., Kishihara K., Kimoto Y., Horiuchi T., Hisaeda H., Akira S., Kagami S., Yasutomo K. 2007. *Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population*. *Ann Rheum Dis*, **66**, 905-9.
68. Knezevic J., Pavlinic D., Rose W. A., 2nd, Leifer C. A., Bendelja K., Gabrilovac J., Parcina M., Lauc G., Kubarenko A. V., Petricevic B., Vrbanec D., Bulat-Kardum L., Bekeredjian-Ding I., Pavelic J., Dembic Z., Weber A. N. 2012. *Heterozygous carriage of a dysfunctional Toll-like receptor 9 allele affects CpG oligonucleotide responses in B cells*. *J Biol Chem*, **287**, 24544-53.
69. Yeyeodu S. T., Kidd L. R., Oprea-Ilies G. M., Burns B. G., Vancleave T. T., Shim J. Y., Kimbro K. S. 2013. *IRAK4 and TLR3 Sequence Variants may Alter Breast Cancer Risk among African-American Women*. *Front Immunol*, **4**, 338.
70. Rogers E. N., Jones D. Z., Kidd N. C., Yeyeodu S., Brock G., Ragin C., Jackson M., McFarlane-Anderson N., Tulloch-Reid M., Sean Kimbro K., Kidd L. R. 2013. *Toll-like receptor-associated sequence variants and prostate cancer risk among men of African descent*. *Genes Immun*, **14**, 347-55.

71. Yin J., Yao C. L., Liu C. L., Song Z. J., Tong C. Y., Huang P. Z. 2012. *Association of genetic variants in the IRAK-4 gene with susceptibility to severe sepsis*. *World J Emerg Med*, **3**, 123-7.

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

**Ime i prezime:** Verona Jantoš

**Datum i mjesto rođenja:** 27. lipnja 1990., Osijek, Republika Hrvatska

**Kontakt:** verona.jantos@gmail.com

### OBRAZOVANJE

- 2012.-                    Biološki odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu  
Diplomski eksperimentalni studij biologije, modul Fiziologija i imunobiologija
- 2009.- 2012.            Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Odjel za biologiju, Osijek  
Preddiplomski studij biologije, Osijek
- 2006.- 2009.            Opća gimnazija, Donji Miholjac
- 1997.- 2006.            Osnovna škola »August Harambašić«, Donji Miholjac

### PROFESIONALNO OBRAZOVANJE

- izrada diplomskog rada u Laboratoriju za translacijsku medicinu, na Zavodu za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković (Zagreb, 2014 -2015)
- obavljanje prakse na Imunološkom zavodu (Zagreb, 2013.)
- sudjelovanje na studentskom terenu (Rovinj, 2011; Sunger, 2012)

### STIPENDIJE

2009. – 2015. Stipendija grada Donji Miholjac

### OSOBNJE VJEŠTINE I KOMPETICIJE:

- napredno poznavanje engleskog jezika
- vladanje Office paketom i drugim standardnim računalnim aplikacijama
- vozačka dozvola B kategorije