

Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

TEZĂ DE DOCTORAT

-REZUMAT-

**CONTRIBUȚII LA STUDIUL MARKERILOR GENETICI ÎN
DIABETUL ZAHARAT TIP 1, CAZURI UNICE ȘI
FAMILIALE**

**Conducător științific:
Prof. Univ. Dr. Ioan Victor Pop**

**Autor:
Durbală Irina**

-2011-

CUPRINS

INTRODUCERE	11
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Etiologia diabetului zaharat tip 1	15
1.1. Tipuri etiopatogenice de diabet zaharat	15
1.2. Determinismul diabetului zaharat tip 1	18
1.3. Factori de mediu implicați în diabetul zaharat tip 1	20
1.4. Factori genetici implicați în diabetul zaharat tip 1	23
2. Complexul major de histocompatibilitate	35
2.1. Organizarea generală a regiunii MHC	35
2.2. Asocierea genelor HLA cu bolile autoimune	40
2.3. Implicarea alelelor HLA de clasa a II-a în DZ tip 1	44
2.4. Stadiul actual al cunoașterii privind importanța determinării alelelor HLA în DZ tip 1	45
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Obiective	49
2. Metodologie generală	51
2.1. Proiectarea studiului	51
2.2. Subiecții luați în studiu	51
2.3. Metode utilizate	53
3. Studiul 1 - Studiarea riscului pentru diabet zaharat tip 1 conferit de alelele HLA-DRB1 și DQB1	65
3.1. Introducere	65
3.2. Ipoteza de lucru	65
3.3. Material și metodă	65
3.4. Rezultate	92
3.5. Discuții	112
3.6. Concluzii	116
4. Studiul 2 – Corelații între manifestările clinice la debutul diabetului zaharat tip 1 și prezența genotipurilor HLA-DR cu risc diferit pentru boală	119
4.1. Introducere	119
4.2. Ipoteza de lucru	119
4.3. Material și metodă	120
4.4. Rezultate	122
4.5. Discuții	136
4.6. Concluzii	140
5. Concluzii generale	143
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	145
REFERINȚE: 185 de titluri bibliografice	147
ANEXE: Prezentarea studiului, Loturile de studiu, Deteminările alelelor HLA la pacienți și martori, Date clinice, Frecvența alelelor HLA-DRB1 și DQB1 în Europa.	161
Cuvinte cheie: diabet zaharat tip 1, factori genetici, complexul major de histocompatibilitate, HLA-DRB1, HLA-DQB1, determinări moleculare, evaluarea riscului genetic, corelații genotip – aspecte clinice, istoric familial pentru diabet zaharat tip 1, cazuri unice de diabet zaharat tip 1	

I. Introducere

Diabetul zaharat tip 1 este o boală caracterizată prin distrugerea autoimună a celulelor β -pancreatice cu pierderea secreției de insulină și deficit insulenic absolut¹. Diabetul zaharat (DZ) tip 1 reprezintă aproximativ 10% din totalul cazurilor de diabet zaharat, cu o incidență în continuă creștere și se dezvoltă mai ales la copii, adolescenți sau adulți tineri. Aproximativ 40% dintre pacienți dezvoltă boala înainte de 20 de ani, ceea ce face ca DZ tip 1 să reprezinte cea mai frecventă boală cronică a copilăriei. Mai multe gene contribuie la susceptibilitatea pentru DZ tip 1, iar identificarea acestora a permis identificarea etapelor precoce în producerea bolii: toleranța imună inadecvată, declanșarea autoimunității împotriva celulelor β și, în final, distrugerea acestora. Întrucât principalul factor genetic implicat în DZ tip 1 este reprezentat de complexul major de histocompatibilitate (MHC), în special genele MHC de clasa a II-a HLA-DRB1 și HLA-DQB1, mi-am propus să determin variația alelică a acestor gene la un lot de pacienți cu diabet zaharat tip 1 și la rudele de gradul I ale acestora, precum și corelația variantelor alelice cu manifestările clinice la debutul bolii.

II. Stadiul actual al cunoașterii

1. Etiologia diabetului zaharat tip 1

Marea majoritate a cazurilor de diabet sunt clasificate în două mari categorii etiopatogenice: diabetul zaharat tip 1 (DZ tip 1), unde cauza hiperglicemiei este deficitul absolut al secreției de insulină, și diabetul tip 2, unde cauza hiperglicemiei este o combinație între rezistența la acțiunea insulinei și un răspuns secretor compensator inadecvat.

Determinismul diabetului zaharat tip 1

Istoricul natural al diabetului zaharat tip 1 sugerează dezvoltarea unui proces autoimun în prezența susceptibilității genetice, inițial fără modificări clinice, apoi urmat de apariția simptomelor caracteristice diabetului zaharat²⁸. Deși se cunoaște faptul că autoanticorpii anti-insulari apar precoce în evoluția bolii și modul cum factorii genetici influențează apariția lor, diferiți factori din mediu par a fi de asemenea implicați în modularea proceselor autoimune care conduc la producerea bolii. Cu toate că în majoritatea cazurilor nu există istoric familial pozitiv pentru boală, există totuși o agregare familială semnificativă cu o prevalență medie de 6% la frații pacienților, comparativ cu 0.4% în populația generală. Agregarea familială (λ_s = riscul relativ al fraților) poate fi calculată ca raportul dintre riscul fraților și prevalența în populația generală, deci $\lambda_s = 6/0.4 = 15^{31}$.

O serie de factori declanșatori exogeni, cum ar fi anumiți factori din dietă și virusurile, induc procesul mediat imun conducând la distrugerea extensivă a celulelor β și, în final, la diabetul zaharat manifest clinic⁴⁷. Pe lângă rolul lor de factori declanșatori, factorii de mediu pot de asemenea avea un efect de accelerare a evoluției sau protector, modificând astfel cursul procesului prediabetic.

Factorii genetici implicați în diabetul zaharat tip 1

Loci de susceptibilitate pentru DZ tip 1 sunt notați convențional folosind prescurtarea IDDM și un număr – de exemplu *IDDM1*, *IDDM2*, etc., numărul reflectând de obicei ordinea în care acești loci au fost raportați. Principalele gene implicate în determinismul DZ tip 1 sunt (1) regiunea HLA (*IDDM1*) și (2) locusul genei insulinei *INS* (*IDDM2*). Acești doi loci contribuie la o parte din agregarea familială (50% pentru *IDDM1* și 10% pentru *INS*) sugerând existența unor loci adiționali⁶³.

Regiunea genelor HLA clasa a II-a

Majoritatea pacienților caucazieni prezintă alelele de clasa a II-a HLA-DR3 sau DR4, și aproximativ 30-50% din pacienți sunt heterozigoți DR3/DR4. Genotipul DR3/DR4 conferă cel mai mare risc, prin modul sinergic de acțiune, urmat de genotipurile homozigote DR4,

respectiv DR3. Ulterior, locusul HLA-DQ a fost găsit a fi mai puternic asociat cu susceptibilitatea la DZ tip1. La populația caucaziană, asocierea cea mai puternică cu diabetul este prezentă pentru moleculele DQ8 și DQ2, codificate de alelele DQA1*0301, DQB1*0302 și respectiv DQA1*0501, DQB1*0201⁶⁸. Aceste alele DQ sunt în dezechilibru de linkage cu alelele HLA-DR4 și respectiv DR3⁶⁹.

2. Complexul major de histocompatibilitate

Complexul major de histocompatibilitate uman, denumit HLA, reprezintă un ansamblu de gene, dispuse în continuitate pe un fragment de ADN de aproximativ 4000 kb, pe brațul scurt al cromozomului 6 (6p21)¹¹⁷. Dintre genele acestui complex, genele de clasa a II-a HLA-DRB1 și DQB1 sunt implicate în determinismul diabetului zaharat tip 1.

Tăria asocierii dintre alelele HLA și boli - Valoarea clinică a unei asocieri HLA-boală vine din posibilitatea tipizării HLA pentru confirmarea diagnosticului sau prezicerea probabilității ca un individ să dezvolte boala. Calcularea tăriei asocierii dintre o alelă HLA și o boală se face prin determinarea frecvenței alelelor HLA exprimate la bolnavi și compararea cu frecvența lor în populația generală – se calculează un raport al probabilităților numit *risc relativ*.

Implicarea alelelor HLA de clasa a II-a în DZ tip 1 - Anumite alele HLA codifică moleculele care predispun la DZ tip 1; acestea prezintă o structură a șanțului de legare a antigenelor care interacționează slab cu anumite antigene insulare, ceea ce duce în final la persistența clonelor de limfocite T autoreactive și efect diabetogen.

III. Contribuția personală

1. Obiective

Am efectuat un studiu analitic caz-martor privind prezența principalilor markeri genetici pentru diabetul zaharat tip 1, reprezentați de alelele genelor complexului major de histocompatibilitate de clasa a II-a, HLA-DRB1 și HLA-DQB1, la un lot de pacienți cu diabet zaharat tip 1 și rudele de gradul I sănătoase ale acestora. Am efectuat de asemenea și un studiu comparativ al manifestărilor clinice înregistrate la debutul bolii la diferite grupe de pacienți definite prin prezența genotipurilor HLA-DR recunoscute ca având risc diferit pentru boală.

2. Metodologie generală

Include proiectarea studiilor, subiecții luați în studiu, dimensiunea loturilor de studiu, criteriile de includere sau de excludere, precum și metodele utilizate ca fișa de lucru, metodele de laborator necesare investigațiilor genetice și metodele statistice utilizate pentru evaluarea rezultatelor obținute în studiile propriu-zise.

3. Studiul 1 - Studiul riscului pentru diabet zaharat tip 1 conferit de alelele HLA-DRB1 și DQB1

Capitolul 3.1. – *Introducere*, prezintă o motivație a metodelor alese pentru realizarea studiului, precum și obiectivele primului studiu, respectiv determinarea alelelor HLA-DRB1 și HLA-DQB1 la subiecții înscriși în studiu și detectarea alelelor, genotipurilor sau haplotipurilor generate de acestea, ce acționează ca factori de risc sau de protecție pentru diabetul zaharat tip 1.

Capitolul 3.2. – *Ipoteza de lucru*, aduce argumentația studiului ca studiu analitic caz-martor, considerând că reprezentarea în exces în lotul de pacienți a factorilor genetici testați poate conferi un risc crescut pentru diabetul zaharat tip 1, în timp ce reprezentarea lor în exces la lotul martor poate fi considerată a conferi protecție pentru boală.

Capitolul 3.3. – *Material și metodă*, descrie analitic modul de determinare a alelelor HLA-DRB1 și DQB1 și dimensiunea lotului de studiu.

Au fost luați în studiu 121 de subiecți. Lotul a fost alcătuit dintr-un număr de 62 de pacienți cu diabet zaharat tip 1, cu vârste cuprinse între 2 și 25 ani, pacienți aflați în evidența Clinicii de Pediatrie a Spitalului Județean Constanța în perioada octombrie 2008 – septembrie 2009, precum și rude de gradul I ale acestora care la rândul lor prezintă diabet zaharat tip 1. Lotul martor este alcătuit din 59 de persoane, rude de gradul I sănătoase ale pacienților cu diabet (unul sau ambii părinți, precum și frați sau surori ai pacienților).

Pentru toți subiecții selectați a fost izolat ADN-ul genomic (după un prealabil consimțământ informat, standardizat și acceptat în scris, sub semnătură). Ulterior am determinat alele HLA prin metoda cu oligonucleotide specifice pentru secvență (SSO), cu amplificarea regiunilor polimorfice ale genelor HLA-DRB1 și HLA-DQB1 și cu hibridizarea inversă a produșilor de amplificare cu sonde SSO specifice pentru HLA-DRB1 și HLA-DQB1, iar pentru determinarea alelelor HLA prin metoda cu primeri specifici pentru secvență (SSP) au fost amplificate genele HLA-DRB1 și HLA-DQB1 cu primeri specifici pentru secvență (SSP) folosind diverse kit-uri adecvate, urmate de electroforeza în gel de agaroză. Pentru a evalua semnificația rezultatelor am utilizat în mod adecvat o metodologie de prelucrare statistică ce a inclus calculul descriptiv, procentual în funcție de natura variabilelor studiate și calculul de semnificații (testarea riscului relativ și a intervalelor de încredere 95%, testarea semnificației statistice – testul χ^2 , corectarea erorilor și creșterea puterii statistice etc).

Capitolul 3.4. – Rezultate

Alelele DRB1 – în tabelele VII și VIII sunt prezentate frecvențele alelelor DRB1 la pacienți și la lotul martor, precum și riscul relativ conferit de alelele HLA-DRB1 pe eșantionul studiat:

Tabel VII. Frecvențele alelelor DRB1 la pacienți și la lotul martor

Alelă/locus	Pacienți		Lot martor		χ^2	Valoare p	p^s
	nr.	frecv.	nr.	frecv.			
DRB1							
01	6	4.84	8	6.78	0.42	0.51	
0101	4	3.23	7	5.93	1.02	0.31	
0102	2	1.61	1	0.85	0.29	0.59	
0301	41	33.06	19	16.10	9.33	0.0023	<0.05
04	49	39.51	30	25.42	5.46	0.019	0.214
0401	21	16.94	14	11.86	1.26	0.26	
0402	10	8.06	6	5.08	0.87	0.35	
0403	2	1.61	1	0.85	0.29	0.59	
0404	6	4.84	2	1.69	1.87	0.17	
0405	7	5.74	2	1.69	2.63	0.10	
0407	2	1.61	3	2.54	0.26	0.61	
0408	1	0.81	2	1.69	0.39	0.53	
0701	1	0.81	3	2.54	1.12	0.29	
0801	1	0.81	1	0.85	0.001	0.97	
0901	2	1.61	1	0.85	0.29	0.59	
11	2	1.61	19	16.10	16.02	6.28×10^{-5}	<0.001
1101	1	0.81	5	4.24	2.94	0.086	
1104	1	0.81	14	11.86	12.72	3.62×10^{-4}	<0.01
13	6	4.84	12	10.17	3.95	0.047	0.517
1301	4	3.23	9	7.63	3.86	0.049	0.893
1302	2	1.61	3	2.54	0.26	0.61	
1401	2	1.61	6	5.08	2.28	0.13	
1501	1	0.81	4	3.39	1.99	0.16	
1601	13	10.48	15	12.71	0.29	0.59	

Se observă că doar în trei cazuri alelele au putut fi desemnate ca alele de risc (DRB1*0301) sau de protecție (grupul DRB1*11 și alela *1104).

Tabel VIII. Riscul pentru DZ tip 1 conferit de alelele HLA-DRB1 pe eșantionul studiat (selectat)

<i>HLA-DRB1</i>	<i>RR</i>	<i>Intervale de încredere 95%</i>	<i>p_c</i>
*0301	2.53	1.39 - 4.61	<0.05
*04	1.9	1.11 - 3.26	0.214
*13	0.46	0.22 - 0.98	0.517
*1301	0.43	0.18 - 0.99	0.893
*11	0.1	0.03 - 0.31	<0.001
*1104	0.08	0.02 - 0.33	<0.01

Alelele DQB1 – în tabelele IX și X sunt prezentate frecvențele alelelor DQB1 la pacienți și la lotul martor, precum și riscul relativ conferit de alelele HLA-DQB1 pe eșantionul studiat:

Tabel IX. Frecvențele alelelor DQB1 la pacienți și la lotul martor

<i>Alelă/locus</i>	<i>Pacienți</i>		<i>Lot martor</i>		χ^2	<i>Valoare p</i>	<i>p^c</i>
	<i>Alele nr.</i>	<i>Alele frecv.</i>	<i>Alele nr.</i>	<i>Alele frecv.</i>			
DQB1							
DQ2	45	36.29	23	19.49	9.40	0.0022	<0.05
0201	40	32.26	22	18.64	5.88	0.015	0.105
0202	5	4.03	1	0.85	2.54	0.11	
DQ7	6	4.84	25	21.19	14.47	1.43 × 10 ⁻⁴	<0.001
0301	4	3.23	22	18.64	14.99	1.08 × 10 ⁻⁴	<0.01
0304	2	1.61	3	2.54	0.26	0.61	
DQ8 - 0302	43	34.68	24	20.34	6.21	0.013	0.076
DQ9 - 0303	2	1.61	1	0.85	0.29	0.59	
DQ5	21	16.94	29	24.58	2.15	0.14	
0501	6	4.84	8	6.78	0.42	0.41	
0502	13	10.48	15	12.71	0.29	0.59	
0503	2	1.61	6	5.08	2.28	0.13	
DQ6	7	5.65	16	13.56	4.40	0.036	0.216
0602	1	0.81	4	3.39	1.99	0.16	
0603	4	3.23	9	7.63	2.30	0.13	
0604	2	1.61	3	2.54	0.26	0.61	

Se observă că doar în trei cazuri alelele au putut fi desemnate ca alele de risc (grupul DQB1*02) sau de protecție (grupul DQB1*03 DQ7 și alela DQB1*0301).

Tabel X. Riscul pentru DZ tip 1 conferit de alelele HLA-DQB1 pe eșantionul studiat (selectat)

<i>HLA-DQB1</i>	<i>RR</i>	<i>Intervale de încredere 95%</i>	<i>p_c</i>
*02	2.32	1.35 - 3.98	<0.05
*0201	2.05	1.14 - 3.68	0.105
*0302 DQ8	2.05	1.16 - 3.63	0.076
*06	0.39	0.16 - 0.94	0.216
*03 DQ7	0.2	0.08 - 0.45	<0.001
*0301	0.16	0.06 - 0.4	<0.01

Haplotipurile DRB1/DQB1 – în tabelele XI și XII sunt prezentate frecvențele haplotipurilor DRB1/DQB1 la pacienți și la lotul martor, precum și riscul relativ conferit de acestea pe eșantionul studiat.

Se observă că un singur haplotip poate fi desemnat ca fiind asociat cu boala, și anume *1104/*0301 ca haplotip protector.

Tabel XI. Frecvențele haplotipurilor DRB1/DQB1 la pacienți și la lotul martor

Haplotip DRB1/DQB1	Pacienți		Lot martor		χ^2	Valoare p	p ^s
	nr.	frecv.	nr.	frecv.			
*0101/*0501	4	3.22	7	5.93	1.02	0.31	
*0301/*0201	40	32.26	19	16.1	8.561	0.0034	0.544
*0401/*0302	20	16.13	13	11.02	1.34	0.25	
*0402/*0302	10	8.06	6	5.08	0.87	0.35	
*0404/*0302	5	4.03	1	0.85	2.54	0.11	
*0405/*0202	3	2.42	1	0.85	0.92	0.34	
*0405/*0302	4	3.22	2	1.69	0.58	0.44	
*0407/*0301	1	0.81	3	2.54	1.12	0.29	
*1101/*0301	1	0.81	5	4.24	2.94	0.086	
*1104/*0301	1	0.81	14	11.86	12.72	3.66 × 10⁻⁴	<0.01
*1301/*0603	4	3.22	9	7.63	2.30	0.13	
*1302/*0604	2	1.61	3	2.54	0.26	0.61	
*1401/*0503	2	1.61	6	5.08	2.28	0.13	
*1501/*0602	1	0.81	4	3.39	1.99	0.16	
*1601/*0502	13	10.48	15	12.71	0.29	0.59	
Alte haplotipuri	13	10.48	10	8.47	0.29	0.59	

Tabel XII. Riscul pentru DZ tip 1 conferit de haplotipurile DRB1-DQB1 pe eșantionul studiat (selectat)

Haplotipuri DR/DQ	RR	Intervale de încredere 95%	p _c
*0301/*0201	2.44	1.34 - 4.45	0.544
*1104/*0301	0.08	0.02 - 0.33	<0.01

Genotipurile DR – în tabelele XIII și XIV sunt prezentate frecvențele genotipurilor DR la pacienți și la lotul martor, precum și riscul relativ conferit de acestea pe eșantionul studiat:

Tabel XIII. Frecvențele genotipurilor DR la pacienți și la lotul martor

Genotip DR	Pacienți		Lot martor		χ^2	Valoare p	p ^s
	nr.	frecv.	nr.	frecv.			
DR3/DR4	19	30.64	2	3.39	15.66	7.59 × 10⁻⁵	<0.001
DR4/DR4	7	11.29	4	6.78	0.744	0.39	
DR3/DR3	5	8.06	0	0	4.963	0.026	0.156
DR4/X	16	25.80	20	33.90	0.947	0.33	
DR3/X	12	19.35	17	28.81	1.484	0.22	
nonDR3-nonDR4	3	4.84	16	27.12	11.34	7.59 × 10⁻⁴	<0.01

Tabel XIV. Riscul pentru DZ tip 1 conferit de genotipurile DR pe eșantionul studiat (selectat)

Genotipuri DR	RR	Intervale de încredere 95%	p _c
DR3/DR3	11.38	1.33 - 96.72	0.156
DR3/DR4	10.31	3.24 - 32.74	<0.001
nonDR3-nonDR4	0.15	0.05 - 0.45	<0.01

Se observă că genotipul DR3/4 este asociat pozitiv cu boala (risc), iar genotipul nonDR3-nonDR4 este negativ asociat cu boala (protector).

Capitolul 3.5. – *Discuții*, rezultatele obținute sunt evaluate comparativ cu datele raportate în literatura internațională de specialitate atât în populații din Europa^{14,31,32,45,66,67,68,71,80,146} cât și în țara noastră^{162,163,164}, selectând ca studiu de referință studiul lui Erlich și colab.¹⁴ Rezultatele noastre concordă cu cele din studiile prezentate, care însă nu au putut fi reproduse în totalitate.

Capitolul 3.6 – *Concluzii*, am demonstrat o serie de asocieri atât negative cât și pozitive ale alelelor HLA-DRB1 și DQB1 cu diabetul zaharat tip 1, dar am observat și rezultate neconcludente, care ar putea fi rezultate reale, dar studiul nu a avut puterea statistică de a le demonstra.

4. Studiul 2 – Corelații între manifestările clinice la debutul diabetului zaharat tip 1 și prezența genotipurilor HLA-DR cu risc diferit pentru boală

Capitolul 4.1. – *Introducere* prezintă o motivație a metodelor alese pentru realizarea celui de-al 2-lea studiu.

Capitolul 4.2. – *Ipoteza de lucru*, este că prezența genotipurilor DR cu risc crescut se va corela cu manifestări clinice mai severe/mai precoce/istoric familial prezent și, invers, iar prezența genotipurilor DR cu risc redus se va putea corela cu un debut mai puțin sever al bolii/mai tardiv/istoric familial absent.

Capitolul 4.3. – *Material și metodă*. Am subîmpărțit cei 62 de pacienți cu diabet zaharat tip 1 pe categorii, în funcție de mai multe variabile: genotipurile DR cu risc diferit, vârsta la debut, modul de debut și istoricul familial (ca variabile discrete), iar glicemia la debut a fost analizată ca variabilă continuă. Categoriile în cadrul *genotipului DR* au fost: genotipul heterozigot DR3/DR4 – risc înalt, genotipul DR4/nonDR3 – risc moderat pentru boală, genotipul DR3/X – risc redus (dar totuși mai mare decât unitatea) și genotipul nonDR3/nonDR4 – nu conferă risc pentru DZ tip 1. Categoriile în cadrul *vârstei la debut* au fost clasificate în ordinea severității: debut precoce – sub vârsta de 5 ani este considerat un semn de severitate a bolii și debut tardiv – peste vârsta de 5 ani, acesta fiind considerat mai puțin sever. După *modul de debut*, pacienții au fost împărțiți, pe baza severității simptomatologiei la debut și pe baza informațiilor despre pH și concentrația serică a ionului bicarbonat, în trei categorii: cetoacidoză ușoară, cetoacidoză moderată și cetoacidoză severă. Pentru analiza *istoricului familial de boală*, am separat pacienții în două categorii, cazuri familiale – pacienții care au rude afectate cu diabet zaharat tip 1, indiferent de gradul de rudenie și respectiv cazuri unice – pacienții care nu au rude afectate cu diabet zaharat tip 1. Testarea semnificației statistice s-a făcut prin testul hi pătrat (χ^2), și analiza ANOVA.

Capitolul 4.4. – *Rezultate*. În cele cinci secțiuni am analizat:

Asocierea între genotipul DR și vârsta pacienților la debut – testul semnificației statistice arată că există o asociere între cele două variabile. Se observă că genotipurile de risc înalt și moderat (DR3/4 și DR4/Y) sunt mai bine reprezentate la categoria cu debut tardiv, în vreme ce celelalte două genotipuri au o distribuție echilibrată în cele două categorii de vârstă

Tabel XVII. Analiza asocierii între Genotipul DR și Vârsta la debut (date selectate)

		Vârsta la debut			
		0-5 ani	>5ani	Total	
Genotip DR	3/4	Număr cazuri	1	18	19
		% din Total	1.6%	29.0%	30.6%
	4/Y	Număr cazuri	6	17	23
		% din Total	9.7%	27.4%	37.1%
	3/X	Număr cazuri	7	10	17
		% din Total	11.3%	16.1%	27.4%
	Z/Z	Număr cazuri	2	1	3
		% din Total	3.2%	1.6%	4.8%
	Total	Număr cazuri	16	46	62
		% din Total	25.8%	74.2%	100.0%
χ^2 8.902		Valoarea p 0.031			

Asocierea între genotipul DR și modul de debut – cele două variabile nu sunt asociate în acest studiu ($p > 0.05$). S-a constatat, totuși o frecvență mai mare a formei severe la pacienții cu genotip DR3/X.

Tabel XVIII. Analiza asocierii dintre Genotipul DR și Modul de debut (date selectate)

			Mod de debut			Total
			CAD severă	CAD moderată	CAD usoară	
Genotip DR	3/4	Număr cazuri	2	8	9	19
		% din Total	3.2%	12.9%	14.5%	30.6%
	4/Y	Număr cazuri	3	10	10	23
		% din Total	4.9%	16.1%	16.1%	37.1%
	3/X	Număr cazuri	4	5	8	17
	% din Total	6.4%	8.1%	12.9%	27.4%	
Z/Z	Număr cazuri	0	1	2	3	
	% din Total	0.0%	1.6%	3.2%	4.9%	
Total	Număr cazuri	9	24	29	62	
	% din Total	8%	38.7%	46.8%	100.0%	
χ^2 1.725			Valoarea p 0.786			

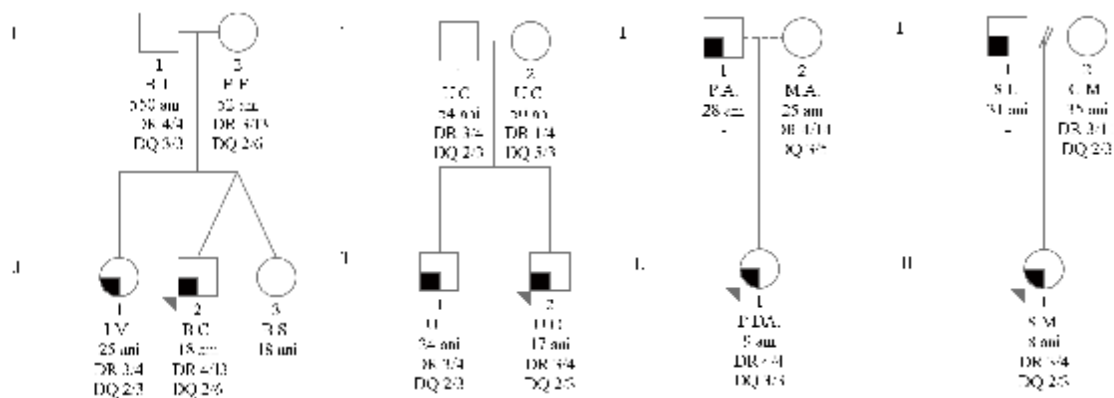
Asocierea între genotipul DR și valoarea glicemiei la debut – nu se confirmă asocierea ($p > 0.05$), glicemia la debut a avut valori omogene între categorii: 475 ± 163 mg/dl la pacienții cu genotipul DR3/4, 462 ± 115 mg/dl la pacienții cu genotipul DR4/Y, 507 ± 128 mg/dl la pacienții cu genotipul DR3/X și, respectiv, 370 ± 121 mg/dl la pacienții cu genotipul DR Z/Z.

Asocierea între modul de debut și vârsta la debut – între aceste două categorii s-a demonstrat existența unei asocieri ($p = 0.04$) bazată în principal pe prezența cazurilor severe la categoria cu debut precoce.

Tabel XX. Analiza asocierii dintre Modul de debut și Vârsta la debut (date selectate)

			Vârsta la debut		Total
			(0-5)	[5-...)	
Mod de debut	CAD severă	Număr cazuri	5	4	9
		% din Total	8.1%	6.5%	14.5%
	CAD moderată	Număr cazuri	3	21	24
		% din Total	4.8%	33.9%	38.7%
	CAD usoară	Număr cazuri	8	21	29
		% din Total	12.9%	33.9%	46.8%
Total	Număr cazuri	16	46	62	
	% din Total	25.8%	74.2%	100.0%	
χ^2 6.427			Valoarea p 0.040		

Analiza cazurilor familiale – dintre cele 60 de cazuri index 8 (13.33%) au prezentat istoric familial de boală, dintre acestea au fost prezentate 4 cazuri cu rude de gradul 1 afectate. Arborii genealogici sunt prezentați în figurile 33-36. Doi dintre probanzi au avut frați afectați, iar ceilalți doi au avut un părinte afectat (tatăl în ambele cazuri).



5. Concluzii generale

1. În studiul asocierii genelor HLA-DRB1 și DQB1 cu DZ tip 1 am observat asocierea ca alelă de risc pentru DZ tip 1 doar pentru alela DRB1*0301. Au fost respinse, după aplicarea corecțiilor pentru comparații multiple, asocierile pozitive cu grupul DRB1*04 și cu alelele DQB1*0201 și *0302, cunoscute ca diabetogene.

2. Am observat asocierea negativă, protectoare, cu DZ tip 1 pentru alela DRB1*1104, pentru alela DQB1*0301 și pentru haplotipul care poartă aceste două alele, haplotipul DRB1/DQB1 *1104/*0301.

3. Genotipurile DR au avut o distribuție diferită față de alte studii efectuate în România, cu frecvență mai mare în studiul nostru a genotipului de risc DR3/4 și frecvență mai mică a genotipului fără risc nonDR3-nonDR4, dar s-au încadrat în valorile medii pentru populații din Europa.

4. Repartiția genotipurilor de risc înalt (DR3/4) și moderat (DR4/Y) a fost scăzută în categoriile clinice considerate de severitate crescută, cum ar fi vârsta la debut sub 5 ani.

5. Pentru celelalte aspecte clinice analizate în raport cu genotipul pacienților nu am putut demonstra existența unei asocieri. Istoricul familial pentru DZ tip 1 prezintă diferențe evidente în distribuția genotipurilor DR, dar acestea nu au avut semnificație statistică.

6. În familiile pacienților cu DZ tip 1 tipul înrudirii (părinte, frate, copil), precum și prezența la membrii familiei a haplotipurilor de risc identice prin descendență modulează riscul de apariție a bolii.

6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei – constau în (1) prezentarea unui studiu al genelor HLA într-un eșantion din populația regiunii Dobrogea, regiune cu diversitate etnică accentuată, (2) implementarea metodelor de diagnostic molecular pentru detectarea alelelor HLA și (3) desemnarea cu rezoluție înaltă a alelelor HLA-DRB1 și DQB1, pentru o mai bună înțelegere a asocierii lor cu DZ tip 1.

CURICULUM VITAE

1. Date personale

Nume: **DURBALĂ**

Prenume: **IRINA**

Data nașterii: 15.09.1969

Locul nașterii: GALAȚI, jud. Galați, România

Stare civilă: divorțată

2. Studii

1983 – 1987: Liceul „Vasile Alecsandri” Galați

1989 – 1995: Universitatea de Medicină și Farmacie ‘Carol Davila’ București – promoția 1995

3. Pregătire postuniversitară

01.02.1996 – 31.05.2001: Rezidențiat în Neonatologie la Spitalul Clinic Județean Constanța, medic specialist Neonatolog prin OMS 238/2001

2005 – 2007: masterat „Medicină moleculară și neuroștiințe” UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, lucrare de dizertație cu tema „Metode de detectare a polimorfismelor genelor MHC de clasa a II-a”.

4. Experiență profesională

Februarie 1996 – mai 2001– Medic rezident, Spitalul Clinic Județean Constanța

Februarie 2000 – mai 2000 – Medic rezident, Secția de Terapie Intensivă, Maternitatea ‘Polizu’, București

Octombrie 1999 – ianuarie 2000: Cadru didactic asociat, Disciplina Biologie Celulară, Catedra Discipline Biologice, Facultatea de Medicină, Constanța

Din octombrie 2002: Asistent universitar, Disciplina Biologie Celulară și Moleculară, Facultatea de Medicină, Constanța

Din septembrie 2007: integrare clinică în secția Neonatologie II a Spitalului Clinic de Urgență Constanța

5. Experiență în cercetare

01.11 2003 – 31.10.2011: Doctorand în specialitatea Genetică medicală cu tema „Contribuții la studiul markerilor genetici de susceptibilitate pentru diabetul zaharat de tip 1, cazuri unice și familiale”, Conducător științific – Prof.Dr. Ioan Victor Pop

Participare ca membru în granturile:

Universitatea „Ovidius” Constanța : „Studiul anomaliilor cromozomiale la nou-născuții malformați în scopul elaborării unui program de reducere a incidenței riscului malformativ” VIASAN 203/27.07.2003

UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca: „Rolul scheletului membranei eritrocitare umane în patogeneza anemiilor hemolitice prin defect genetic” CNCSIS 560/2007

6. Limbi străine

- engleză (vorbit, citit, scris) – foarte bine

- franceză (vorbit, citit, scris) – satisfăcător

7. Specializări și calificări

Curs practic pentru tehnica PCR – februarie 2002, GeneticLab, București

Al 3-lea curs germano-român de genetică medicală – septembrie 2002, Oradea

Curs de instructor reanimare neonatală – International Relief Teams, martie 2006, Constanța

4th International Summer School on Immunogenetics, 6-9 Septembrie 2007, Pécs, Ungaria

Curs de instructor stabilizare pre-transport și post-reanimare neonatală S.T.A.B.L.E. – martie 2008, Constanța

8. Membru în societăți științifice naționale și internaționale: Societatea Națională de Biologie Celulară, Uniunea Medicală Balcanică, Societatea Română de Genetică Medicală, European Society of Human Genetics, European Federation of Immunogenetics.

9. Lucrări științifice: comunicări și postere la congrese naționale și internaționale, lucrări publicate în reviste naționale.

Lucrări reprezentative:

Durbală I, Dimofte I, Enache LC, Balaban DP, Popa A, Broască Madar V. Retinitis pigmentosa, metaphyseal chondrodysplasia and brachiodactyly: an affected brother and sister. European Human Genetics Conference 25 – 29 Mai 2002, Strasbourg, France.

Durbală I, Dimofte I, Popa A. Importanța teoretică și practică a amplificării ADN. A XXXI-a Sesiune Științifică Anuală a SNBC 5 – 8 Iunie 2003, Zalău.

Rusu G, **Durbală I**, Dimofte I. Actualități privind susceptibilitatea la diabetul zaharat de tip 1. BMJ – ediția în limba română, 2004;11(8):419-21.

Durbală I, Dimofte I, Popa A, Cozaru G, Papuc A. Genetic counseling and recurrence risks for monogenic diseases registered to the Medical Genetics Centre, Constanta. XXVIIIth Balkan Medical Week 16 – 19 Septembrie 2004, Oradea.

Durbală I. Reglarea transcrierii genei insulinei – perspective în terapia diabetului zaharat tip 1. Al II-lea Congres Național de Genetică Medicală cu participare internațională 20 – 23 septembrie 2006, Cluj-Napoca.

Durbală I. Assessment of the risk for type 1 diabetes mellitus conferred by HLA class II genes. Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 2009; 14(2):123-9.

Durbală I, Mihai CM. Correlation of HLA-DRB1 alleles and clinical aspects in a group of Romanian children with type 1 diabetes. 24th Conference of Immunogenetics and Histocompatibility, Florence, May 2010.

Martinescu A, **Durbală I**, Circo E. Assessment of the risk for autoimmune thyroiditis conferred by HLA class II genes. Archives of the Balkan Medical Union, 2011; 46(1):52-5.

Durbală I, Mihai CM, Catrinoiu D, Maffei P. Effect of HLA-DR genotypes on the clinical manifestations at the onset of type 1 diabetes in a group of patients from Constanta county. Romanian Journal of Diabetes Nutrition & Metabolic Diseases, 2011;18(2):93-9.

University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

DOCTORATE THESIS

-SUMMARY-

**CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF GENETIC MARKERS
IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS,
UNIQUE AND FAMILY CASES**

**Scientific guiding:
Prof. Univ. Dr. Ioan Victor Pop**

**Author:
Durbală Irina**

-2011-

CONTENTS

INTRODUCTION	11
THE STATE OF KNOWLEDGE IN THE FIELD	
1. Etiology of type 1 diabetes	15
1.1. Pathogenic types of diabetes	15
1.2. Determinism of type 1 diabetes	18
1.3. Environmental factors in type 1 diabetes	20
1.4. Genetic factors in type 1 diabetes	23
2. Complexul major de histocompatibilitate	35
2.1. General organisation of MHC region	35
2.2. HLA genes association with autoimmune diseases	40
2.3. Involvement of HLA class II alleles in type 1 diabetes	44
2.4. The current state of knowledge on the importance of determining HLA alleles in type 1 diabetes	45
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Objectives	49
2. General methodology	51
2.1. Study design	51
2.2. Subjects studied	51
2.3. Methods used	53
3. Study 1 – Study of risk for type 1 diabetes conferred by HLA-DRB1 and DQB1 alleles	65
3.1. Introduction	65
3.2. Working hypothesis	65
3.3. Materials and methods	65
3.4. Results	92
3.5. Discussions	112
3.6. Conclusions	116
4. Study 2 – Correlation between clinical manifestations at the onset and the presence of HLA-DR genotypes with different risk for type 1 diabetes	119
4.1. Introduction	119
4.2. Working hypothesis	119
4.3. Materials and methods	120
4.4. Rezults	122
4.5. Discussions	136
4.6. Conclusons	140
5. General conclusions	143
6. Originality and inovative contributions of the thesis	145
REFERENCES – 185 quotes	147
APPENDICES: Study presentation, Lots of study, HLA determinations in patients and controls, Clinical data, The frequency of HLA-DRB1 and DQB1 alleles in Europe.	161
Keywords: type 1 diabetes, genetic factors, major histocompatibility complex, HLA-DRB1, HLA-DQB1, molecular analyses, genetic risk assessment, correlation genotype – clinical aspects, family history for type 1 diabetes, unique cases of diabetes type 1.	

I. Introduction

Type 1 diabetes is a disease characterised by autoimmune destruction of pancreatic β cells with loss of insulin secretion and absolute insulin deficiency¹. Type 1 diabetes mellitus (T1DM) represents about 10% of all cases of diabetes, with a continuously growing incidence, and develops mainly in children, teenagers and young adults. Approximately 40% of patients develop the disease before 20 years of age, fact that makes type 1 diabetes the most common chronic childhood disease. Several genes contribute to susceptibility to type 1 diabetes and by finding them was possible to identify the early stages of disease production: inappropriate immune tolerance, triggering autoimmunity against β cells and, ultimately, β cells destruction. Since the main genetic factor involved in type 1 diabetes is the major histocompatibility complex (MHC), especially class II MHC genes HLA-DRB1 and HLA-DQB1, I set out to determine the allelic variation of these genes in a group of patients with type 1 diabetes and their first degree relatives, as well as correlation of allelic variants with clinical manifestations at disease onset.

II. The current state of knowledge

1. Etiology of type 1 diabetes

The vast majority of diabetes cases are classified into two broad pathogenic categories: type 1 diabetes mellitus (T1DM), where hyperglycemia is due to absolute deficiency of insulin secretion, and type 2 diabetes, where hyperglycemia is due to a combination of resistance to the insulin action and an inadequate compensatory secretory response.

Determinism of type 1 diabetes

The natural history of type 1 diabetes suggests the development of an autoimmune process in the presence of genetic susceptibility, initially without clinical changes, then followed by symptoms of diabetes²⁸. Although it is known that anti-insular autoantibodies occur early in the disease and how genetic factors influence their occurrence, various factors in the environment seem to be also involved in modulating the autoimmune process leading to the production of disease. Although in most cases there is no family history of disease, there is a significant familial aggregation with an average prevalence of 6% in siblings of patients, compared with 0.4% in the general population. Family aggregation (λ_s = relative risk of siblings) can be calculated as the ratio of risk of siblings and prevalence in the general population, so $\lambda_s = 6/0.4 = 15$ ³¹.

A number of exogenous triggers, such as dietary factors and viruses, are able to induce the immune-mediated process leading to extensive destruction of β cells and, finally, to manifest diabetes⁴⁷. In addition to their role as triggers, environmental factors may also have an effect of accelerating the disease development or protector role, thus changing the course of pre-diabetic processes.

Genetic factors involved in type 1 diabetes

Susceptibility loci for type 1 diabetes are conventionally noted with IDDM and a number - for example IDDM1, IDDM2, etc. The number usually reflects the order in which these loci have been reported. The main genes involved in type 1 diabetes determinism are (1) HLA region (IDDM1) and (2) insulin gene *INS* locus (IDDM2). These two loci contribute to part of the family aggregation (50% for *IDDM1* and 10% for *INS*) suggesting the existence of additional loci⁶³.

Region of class II HLA genes

Most Caucasian patients have class II alleles HLA-DR3 or DR4, and about 30-50% of the patients are DR3/DR4 heterozygous. DR3/DR4 genotype confers the highest risk by

synergistic mode of action, followed by genotypes homozygous DR4, and DR3 respectively. Subsequently, HLA-DQ locus was found to be more strongly associated with susceptibility to type 1 diabetes. In Caucasian populations, the strongest association with diabetes is present with DQ8 and DQ2 molecules encoded by alleles DQA1*0301, DQB1*0302 and DQA1*0501 and DQB1*0201, respectively⁶⁸. The DQ alleles are in linkage disequilibrium with HLA-DR4 alleles and DR3, respectively⁶⁹.

2. The major histocompatibility complex

The human major histocompatibility complex, called HLA, is a set of genes, arranged in a continuous DNA fragment of about 4000 kb on the short arm of chromosome 6 (6p21)¹¹⁷. From the genes of this complex, class II genes HLA-DRB1 and DQB1 are involved in the determinism of type 1 diabetes.

The strength of association between HLA alleles and diseases – The clinical value of an association HLA-disease comes from the possibility of HLA typing to confirm the diagnosis or predict the likelihood that an individual developing the disease. Calculation of strength of association between an HLA and a disease is made by determining the frequency of HLA alleles expressed in patients and comparing with their frequency in the general population - a ratio of probabilities is calculated called **relative risk**.

Involvement of HLA class II alleles in type 1 diabetes – Some HLA alleles encode for molecules that predispose to type 1 diabetes; these molecules have a structure of the antigen-binding groove that interact poorly with certain island antigens, leading ultimately to persistence of autoreactive T lymphocyte clones and diabetogenic effect.

III. Contribuția personală

1. Objectives

We conducted a case-control analytical study on the presence of key genetic markers for type 1 diabetes, represented by alleles of class II genes of major histocompatibility complex, HLA-DRB1 and HLA-DQB1, on a group of patients with diabetes type 1 and healthy first-degree relatives of these. We also performed a comparative study of clinical manifestations at onset recorded at different groups of patients defined by presence of HLA-DR genotypes recognized as having different risk for disease.

2. General methodology

Includes study design, subjects studied, size of study lots, inclusion or exclusion criteria and methods used such as the worksheet, the laboratory methods required for the genetic investigation and statistical methods used for evaluation of the results.

3. Study 1 – Study of risk for type 1 diabetes conferred by HLA-DRB1 and DQB1 alleles

Chapter 3.1. – *Introduction*, presents a motivation for the selected methods used in the study and aims of the first study, that is: determination of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles in subjects enrolled in the study and detection of alleles, genotypes or haplotypes generated by them, that act as risk or protection factors for type 1 diabetes.

Chapter 3.2. – *Working hypothesis*, brings study arguments as case-control analytic study, considering that the overrepresentation of tested genetic factors in patients may confer an increased risk for type 1 diabetes, while their overrepresentation in the control group may be considered to confer protection for disease.

Chapter 3.3. – *Materials și methods*, analytically describes how to determine the HLA-DRB1 and DQB1 alleles and the size of the study group.

There were 121 subjects studied. The lot was composed of a number of 62 patients with type 1 diabetes, aged between 2 and 25 years, patients recorded in the Pediatrics Clinic

Constanta County Hospital from October 2008 - September 2009, and their first degree relatives which also have type 1 diabetes. Control group consists of 59 people, healthy first degree relatives of patients with diabetes (one or both parents and siblings of patients). ☒

For all selected subjects genomic DNA was isolated (after a prior standardized informed consent, accepted in writing and signed). Subsequently we determined the alleles HLA by sequence specific oligonucleotides method (SSO), with amplification of polymorphic regions of the gene HLA-DRB1 and HLA-DQB1 and reverse hybridization of amplification products with SSO probes specific for HLA-DRB1 and HLA-DQB1; when necessary we determined the HLA alleles by sequence-specific primer method (SSP) - genes were amplified HLA-DRB1 and HLA-DQB1 with primers specific for the sequence (SSP) using various appropriate kits, followed by agarose gel electrophoresis. To assess the significance of the results we used adequately a methodology of statistical processing including descriptive calculation of percentage depending on the nature of variables studied and calculation of significance (relative risk test and 95% confidence intervals, statistical significance testing - test χ^2 , correcting errors and increasing statistical power, etc.).

Chapter 3.4. – *Rezults*

DRB1 alleles – DRB1 allele frequencies to patients and the control group and relative risk conferred by HLA-DRB1 alleles in the sample studied are presented in tables VII and VIII:

Table VII. Frequency of DRB1 alleles in patients and controls

Alelă/locus	Pacienți		Lot martor		χ^2	Valoare p	p ^s
	nr.	frecv.	nr.	frecv.			
DRB1							
01	6	4.84	8	6.78	0.42	0.51	
0101	4	3.23	7	5.93	1.02	0.31	
0102	2	1.61	1	0.85	0.29	0.59	
0301	41	33.06	19	16.10	9.33	0.0023	<0.05
04	49	39.51	30	25.42	5.46	0.019	0.214
0401	21	16.94	14	11.86	1.26	0.26	
0402	10	8.06	6	5.08	0.87	0.35	
0403	2	1.61	1	0.85	0.29	0.59	
0404	6	4.84	2	1.69	1.87	0.17	
0405	7	5.74	2	1.69	2.63	0.10	
0407	2	1.61	3	2.54	0.26	0.61	
0408	1	0.81	2	1.69	0.39	0.53	
0701	1	0.81	3	2.54	1.12	0.29	
0801	1	0.81	1	0.85	0.001	0.97	
0901	2	1.61	1	0.85	0.29	0.59	
11	2	1.61	19	16.10	16.02	6.28 × 10⁻⁵	<0.001
1101	1	0.81	5	4.24	2.94	0.086	
1104	1	0.81	14	11.86	12.72	3.62 × 10⁻⁴	<0.01
13	6	4.84	12	10.17	3.95	0.047	0.517
1301	4	3.23	9	7.63	3.86	0.049	0.893
1302	2	1.61	3	2.54	0.26	0.61	
1401	2	1.61	6	5.08	2.28	0.13	
1501	1	0.81	4	3.39	1.99	0.16	
1601	13	10.48	15	12.71	0.29	0.59	

It is noted that only in three cases the alleles could be designated as risk alleles (DRB1*0301) or protective (allele group DRB1*11 and *1104).

Table VIII. Risk conferred by HLA-DRB1 alleles on the sample studied (selected data)

<i>HLA-DRB1</i>	<i>RR</i>	<i>Intervale de încredere 95%</i>	<i>p_c</i>
*0301	2.53	1.39 - 4.61	<0.05
*04	1.9	1.11 - 3.26	0.214
*13	0.46	0.22 - 0.98	0.517
*1301	0.43	0.18 - 0.99	0.893
*11	0.1	0.03 - 0.31	<0.001
*1104	0.08	0.02 - 0.33	<0.01

DQB1 alleles – DQB1 allele frequencies to patients and the control group and relative risk conferred by individual HLA-DQB1 alleles in the sample studied are presented in tables IX and X:

Table IX. Frequency of DQB1 alleles in patients and controls

<i>Alelă/locus</i>	<i>Pacienți</i>		<i>Lot martor</i>		χ^2	<i>Valoare p</i>	<i>p^c</i>
	<i>Alele nr.</i>	<i>frecv.</i>	<i>Alele nr.</i>	<i>frecv.</i>			
DQB1							
DQ2	45	36.29	23	19.49	9.40	0.0022	<0.05
0201	40	32.26	22	18.64	5.88	0.015	0.105
0202	5	4.03	1	0.85	2.54	0.11	
DQ7	6	4.84	25	21.19	14.47	1.43×10^{-4}	<0.001
0301	4	3.23	22	18.64	14.99	1.08×10^{-4}	<0.01
0304	2	1.61	3	2.54	0.26	0.61	
DQ8 - 0302	43	34.68	24	20.34	6.21	0.013	0.076
DQ9 - 0303	2	1.61	1	0.85	0.29	0.59	
DQ5	21	16.94	29	24.58	2.15	0.14	
0501	6	4.84	8	6.78	0.42	0.41	
0502	13	10.48	15	12.71	0.29	0.59	
0503	2	1.61	6	5.08	2.28	0.13	
DQ6	7	5.65	16	13.56	4.40	0.036	0.216
0602	1	0.81	4	3.39	1.99	0.16	
0603	4	3.23	9	7.63	2.30	0.13	
0604	2	1.61	3	2.54	0.26	0.61	

It is noted that only in three cases alleles could be designated as risk alleles (DQB1*02 group) or protective (allele group DQB1*03 DQ7 and DQB1*0301).

Table X. Risk conferred by HLA-DQB1 alleles on the sample studied (selected data)

<i>HLA-DQB1</i>	<i>RR</i>	<i>Intervale de încredere 95%</i>	<i>p_c</i>
*02	2.32	1.35 - 3.98	<0.05
*0201	2.05	1.14 - 3.68	0.105
*0302 DQ8	2.05	1.16 - 3.63	0.076
*06	0.39	0.16 - 0.94	0.216
*03 DQ7	0.2	0.08 - 0.45	<0.001
*0301	0.16	0.06 - 0.4	<0.01

DRB1/DQB1 haplotypes – DRB1/DQB1 frequencies to patients and the control group and relative risk conferred by DRB1/DQB1 haplotypes in the sample studied are presented in tables IX and X.

It is noted that a single haplotype can be designated as being associated with the disease, namely *1104 / *0301, as protective haplotype.

Table XI. Frequency of DRB1/DQB1 haplotypes in patients and controls

Haplotip DRB1/DQB1	Pacienți		Lot martor		χ^2	Valoare p	p [§]
	nr.	frecv.	nr.	frecv.			
*0101/*0501	4	3.22	7	5.93	1.02	0.31	
*0301/*0201	40	32.26	19	16.1	8.561	0.0034	0.544
*0401/*0302	20	16.13	13	11.02	1.34	0.25	
*0402/*0302	10	8.06	6	5.08	0.87	0.35	
*0404/*0302	5	4.03	1	0.85	2.54	0.11	
*0405/*0202	3	2.42	1	0.85	0.92	0.34	
*0405/*0302	4	3.22	2	1.69	0.58	0.44	
*0407/*0301	1	0.81	3	2.54	1.12	0.29	
*1101/*0301	1	0.81	5	4.24	2.94	0.086	
*1104/*0301	1	0.81	14	11.86	12.72	3.66 × 10⁻⁴	<0.01
*1301/*0603	4	3.22	9	7.63	2.30	0.13	
*1302/*0604	2	1.61	3	2.54	0.26	0.61	
*1401/*0503	2	1.61	6	5.08	2.28	0.13	
*1501/*0602	1	0.81	4	3.39	1.99	0.16	
*1601/*0502	13	10.48	15	12.71	0.29	0.59	
Alte haplotipuri	13	10.48	10	8.47	0.29	0.59	

Table XII. Risk conferred by DRB1/DQB1 haplotypes on the sample studied (selected data)

Haplotipuri DR/DQ	RR	Intervale de încredere 95%	p _c
*0301/*0201	2.44	1.34 - 4.45	0.544
*1104/*0301	0.08	0.02 - 0.33	<0.01

DR genotypes – tables XIII and XIV show the frequencies of DR genotypes la in patients and controls, and also the relative risk conferred by them on the sample studied:

Table XIII. Frequency of DR genotypes in patients and controls

Genotip DR	Pacienți		Lot martor		χ^2	Valoare p	p [§]
	nr.	frecv.	nr.	frecv.			
DR3/DR4	19	30.64	2	3.39	15.66	7.59 × 10⁻⁵	<0.001
DR4/DR4	7	11.29	4	6.78	0.744	0.39	
DR3/DR3	5	8.06	0	0	4.963	0.026	0.156
DR4/X	16	25.80	20	33.90	0.947	0.33	
DR3/X	12	19.35	17	28.81	1.484	0.22	
nonDR3-nonDR4	3	4.84	16	27.12	11.34	7.59 × 10⁻⁴	<0.01

Table XIV. Risk conferred by DR genotypes on the sample studied (selected data)

Genotipuri DR	RR	Intervale de încredere 95%	p _c
DR3/DR3	11.38	1.33 - 96.72	0.156
DR3/DR4	10.31	3.24 - 32.74	<0.001
nonDR3-nonDR4	0.15	0.05 - 0.45	<0.01

It is noted that the genotype DR3/4 is positively associated with T1DM (risk) and the genotype nonDR4-nonDR3 is negatively associated with disease (protective).

Chapter 3.5. – *Discussions*, the results are compared with data reported in specialized international literature both in populations from Europe^{14,31,32,45,66,67,68,71,80,146} and in our country^{162,163,164}, choosing as referencestudy the study of Erlich et al.¹⁴ Our results are consistent with the studies presented, which however could not be reproduced in totality.

Chapter 3.6 – *Conclusions*, we have demonstrated a range of both negative and positive association of HLA-DRB1 and DQB1 with type 1 diabetes, but we also observed inconclusive results, which could be real results, but the study didn't have the statistical power to demonstrate them.

4. Study 2 – Correlation between clinical manifestations at the onset and the presence of HLA-DR genotypes with different risk for type 1 diabetes

Chapter 4.1. – *Introduction* presents the motivation of the methods used for the second study.

Chapter 4.2. – *Working hypothesis*, is that the presence of high-risk DR genotypes correlate with clinical manifestations will be more severe / early / positive family history and vice versa, and the presence of low-risk DR genotypes will be able to correlate with less severe disease onset / more late / absent family history.

Chapter 4.3. – *Materials și methods*. We subdivided the 62 patients with type 1 diabetes by categories, depending on several variables: DR genotypes with different risk, age at onset, mode of onset and family history (as a discrete variables), and glucose at onset was analyzed as a continuous variable. Categories in the DR genotype were DR3/DR4 heterozygous genotype - high risk genotype, DR4/nonDR3 - moderate risk for disease, genotype DR3 / nonDR4 - low risk (but still greater than unity) and genotype nonDR3/nonDR4 - does not confer risk for type 1 diabetes. The age at onset categories were ranked in order of severity: early-onset under the age of 5 years is considered a sign of disease severity and late onset - over the age of five years, which is considered less severe. By mode of onset, patients were divided based on severity of symptoms at onset and the information about pH and serum bicarbonate ion in three categories: mild ketoacidosis, diabetic ketoacidosis, diabetic ketoacidosis, moderate and severe. For the analysis of family history of disease, we separated patients into two groups, family cases - patients who have relatives affected with type 1 diabetes, regardless of the degree, and that unique cases - patients who don't have relatives affected with type 1 diabetes. Statistical significance testing was done by chi square test (χ^2), and ANOVA analysis.

Chapter 4.4. – *Rezults*. In the five sections we analyzed:

Association between DR genotype and age of onset – statistical significance test shows that there is an association between two variables. It is noted that high and moderate risk genotype (DR3 / 4 and DR4 / Y) are better represented in the category of late-onset, while the other two genotypes have a balanced distribution in the two age groups.

Table XVII. Analysis of association between DR genotype and age of onset (selected data)

		<i>Vârsta la debut</i>			
		0-5 ani	>5ani	Total	
Genotip DR	3/4	Număr cazuri	1	18	19
		% din Total	1.6%	29.0%	30.6%
	4/Y	Număr cazuri	6	17	23
		% din Total	9.7%	27.4%	37.1%
	3/X	Număr cazuri	7	10	17
		% din Total	11.3%	16.1%	27.4%
	Z/Z	Număr cazuri	2	1	3
		% din Total	3.2%	1.6%	4.8%
	Total	Număr cazuri	16	46	62
		% din Total	25.8%	74.2%	100.0%
χ^2 8.902		Valoarea p 0.031			

Association between DR genotype and the mode of onset – the two variables are not associated in this study ($p > 0.05$). It was found, however, a higher frequency of severe forms in patients with genotype DR3 / X.

Table XVIII. Analysis of association between DR genotype and the mode of onset (selected data)

			Mod de debut			Total
			CAD severă	CAD moderată	CAD usoară	
Genotip DR	3/4	Număr cazuri	2	8	9	19
		% din Total	3.2%	12.9%	14.5%	30.6%
	4/Y	Număr cazuri	3	10	10	23
		% din Total	4.9%	16.1%	16.1%	37.1%
	3/X	Număr cazuri	4	5	8	17
	% din Total	6.4%	8.1%	12.9%	27.4%	
Z/Z	Număr cazuri	0	1	2	3	
	% din Total	0.0%	1.6%	3.2%	4.9%	
Total	Număr cazuri	9	24	29	62	
	% din Total	8%	38.7%	46.8%	100.0%	
χ^2 1.725			Valoarea p0.786			

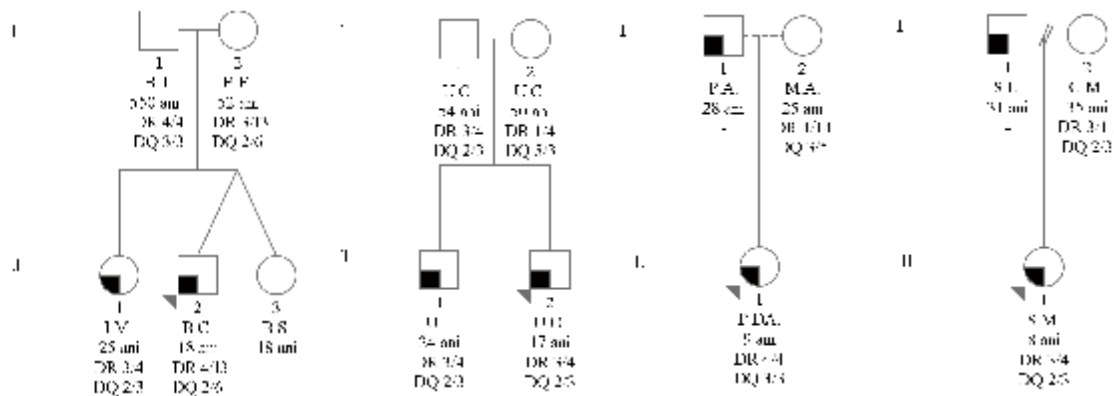
Association between DR genotype and glucose levels at onset – the association was not confirmed ($p > 0.05$), blood glucose values at onset was homogeneous between groups: 475 ± 163 mg / dl in patients with genotype DR3 / 4, 462 ± 115 mg / dl in patients with genotype DR4 / Y, 507 ± 128 mg / dl in patients with genotype DR3 / X and, respectively, 370 ± 121 mg / dl in patients with DR genotype Z / Z.

Association between the mod of onset and the age at onset – between these two categories was demonstrated an association ($p = 0.04$) based primarily on the presence of severe cases with early onset category

Table XX. Analysis of association between mode of onset and age at onset (selected data)

			Vârsta la debut		Total
			(0-5)	[5-...)	
Mod de debut	CAD severă	Număr cazuri	5	4	9
		% din Total	8.1%	6.5%	14.5%
	CAD moderată	Număr cazuri	3	21	24
		% din Total	4.8%	33.9%	38.7%
	CAD usoară	Număr cazuri	8	21	29
		% din Total	12.9%	33.9%	46.8%
Total	Număr cazuri	16	46	62	
	% din Total	25.8%	74.2%	100.0%	
χ^2 6.427			Valoarea p0.040		

Family history analysis –of the 60 index cases, 8 (13.33%) had family history of disease, of which 4 cases were presented that had a first-degree relative affected. Family trees are presented in Figures 33-36. Two probands had brothers affected and the other two had an affected parent (father in both cases).



5. General conclusions

1. In the gene association study of HLA-DRB1 and DQB1 genes with type 1 diabetes we observed the association as risk allele for type 1 diabetes only with DRB1*0301 allele. Were rejected, after correction for multiple comparisons, positive associations with DRB1*04 group alleles and of DQB1*0201 and *0302 and known as diabetogenic.

2. We observed negative association, protective, with type 1 diabetes for alleles DRB1*1104 and DQB1*0301 and for the DRB1/DQB1 haplotype bearing the two alleles, *1104/*0301.

3. DR genotypes had a distribution different from other studies in Romania, with higher frequency in our study for the risk genotype DR3/4 and a smaller frequency of the no-risk genotype nonDR3-nonDR4, but they resembled the mean values for populations in Europe.

4. Distribution of high-risk genotypes (DR3/4) and moderate-risk genotype (DR4/Y) was low in the clinical categories considered with increased severity, such as age at onset less than 5 years.

5. For other clinical aspects analyzed in relation to patients' genotype we could not demonstrate the existence of an association. Family history for type 1 diabetes showed obvious differences in the distribution of DR genotypes, but they were not statistically significant.

6. In type 1 diabetes patients' families the risk of disease is modulated by the type of the relationship (parent, sibling, child) and the presence at family members of the risk haplotypes identical by descent.

6. Originality and inovative contributions of the thesis – consist of (1) presentation of a study of HLA genes on a sample population from Dobrogea region, a region with increased ethnic diversity, (2) implementation of molecular diagnostic methods to detect HLA alleles and (3) designation of high-resolution HLA-DRB1 and DQB1 alleles, for a better understanding of their association with type 1 diabetes.

CURRICULLUM VITAE

1. Personal data

Surname: **DURBALĂ**

First name: **IRINA**

Date of birth: 15.09.1969

Place of birth: Galați, Galați County, Romania

Marital status: divorced

2. Education

1983 – 1987: „Vasile Alecsandri” Highschool Galați

1989 – 1995: University of Medicine and Pharmacy ‘Carol Davila’ București

3. Post university education:

01.02.1996 – 31.05.2001 – Residency in Neonatology at Emergency Clinical County Hospital Constanța, Specialty Diploma by OMS 238/2001

01.10.2005 – 30.06.2007 – Master studies in ‘Molecular medicine and neurosciences’, UMF “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Master grade with the theme “Polimorphisms detection in class II genes of MHC”.

4. Professional experience:

February 1996 – May 2001– resident physician , Emergency Clinical County Hospital Constanța

February 2000 – May 2000 – resident physician, Intensive Care Unit, ‘Polizu’ Maternity, București

October 1999 – January 2000 – associated teacher, Cellular and Molecular Biology Department, Faculty of Medicine, “Ovidius” University Constanța

Present position: Assistant professor, Cellular and Molecular Biology Department, Faculty of Medicine, “Ovidius” University Constanța – since 01.10.2002

Neonatology Specialist, Emergency Clinical County Hospital Constanța - since 15.09.2007

5. Research domains:

01.11.2003 – 31.10.2011: PhD student – Medical genetics specialty, the theme „Contribution to the study of genetic markers to the susceptibility for diabetes mellitus type 1, isolated and familial cases”; Scientific guidance – Prof.Dr. Ioan Victor Pop

Participation as member in research grants:

VIASAN 203/27.07.2003, Oct 2003 – Sept 2005 „Studiul anomaliilor cromozomiale la nou-născuții malformați în scopul elaborării unui program de reducere a incidenței riscului malformativ” (“Study of chromosomal abnormalities in malformative syndromes in newborn in order to elaborate a plan for decreasing the incidence of malformations”)

CNCSIS 560/2007, Ian 2007 – Dec 2007 “Diagnosticul molecular al anemiilor microcitare” (“Molecular diagnosis of microcytic anemia”)

6. Foreign languages:

English (speaking, reading, writing) – very good

French (speaking, reading, writing) – good

7. Specializations:

Practical training for PCR technique – Feb. 2002, GeneticLab, București
The 3rd German-Romanian Course for Medical Genetics – Sept. 2002, Oradea
Neonatal resuscitation training for instructors – March 2006, Constanța
EFI Summerschool on Immunogenetics September 2007, Pécs, Hungary
S.T.A.B.L.E (pre-transport and post-resuscitation stabilization) training for instructors – March 2008, Constanța

8. Member of professional associations: Romanian Society of Cell Biology, Balkan Medical Union, Romanian Society of Medical Genetics, European Society of Human Genetics, European Federation of Immunogenetics

9. Scientific work: communications and posters at national and international sessions and congresses, papers in national journals

Representative work:

Durbală I, Dimofte I, Enache LC, Balaban DP, Popa A, Broască Madar V. Retinitis pigmentosa, metaphyseal chondrodysplasia and brachiodactyly: an affected brother and sister. European Human Genetics Conference 25 – 29 Mai 2002, Strasbourg, France.

Durbală I, Dimofte I, Popa A. Importanța teoretică și practică a amplificării ADN. A XXXI-a Sesiune Științifică Anuală a SNBC 5 – 8 Iunie 2003, Zalău.

Rusu G, **Durbală I**, Dimofte I. Actualități privind susceptibilitatea la diabetul zaharat de tip 1. BMJ – ediția în limba română, 2004;11(8):419-21.

Durbală I, Dimofte I, Popa A, Cozaru G, Papuc A. Genetic counseling and recurrence risks for monogenic diseases registered to the Medical Genetics Centre, Constanta. XXVIIIth Balkan Medical Week 16 – 19 Septembrie 2004, Oradea.

Durbală I. Reglarea transcrierii genei insulinei – perspective în terapia diabetului zaharat tip 1. Al II-lea Congres Național de Genetică Medicală cu participare internațională 20 – 23 septembrie 2006, Cluj-Napoca.

Durbală I. Assessment of the risk for type 1 diabetes mellitus conferred by HLA class II genes. Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 2009; 14(2):123-9.

Durbală I, Mihai CM. Correlation of HLA-DRB1 alleles and clinical aspects in a group of Romanian children with type 1 diabetes. 24th Conference of Immunogenetics and Histocompatibility, Florence, May 2010.

Martinescu A, **Durbală I**, Circo E. Assessment of the risk for autoimmune thyroiditis conferred by HLA class II genes. Archives of the Balkan Medical Union, 2011; 46(1):52-5.

Durbală I, Mihai CM, Catrinoiu D, Maffei P. Effect of HLA-DR genotypes on the clinical manifestations at the onset of type 1 diabetes in a group of patients from Constanta county. Romanian Journal of Diabetes Nutrition & Metabolic Diseases, 2011;18(2):93-9.