

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

TATJANA ĆATIPOVIĆ ARDALIĆ

**GENETSKA PODLOGA RIZIKA OBOLJEVANJA OD ZARAZNIH BOLESTI:
ULOGA RIJETKIH GENETSKIH VARIJANTI**

Doktorski rad

Split, 2025.

Rad je izrađen na Katedri za javno zdravstvo i Katedri za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

Voditelj rada prof. dr. sc. Ozren Polašek

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Zarazne bolesti.....	2
1.2. Zarazne bolesti i zdravlje.....	3
1.3. Je li gen isključivi krivac – genetska teorija zaraznih bolesti	5
1.4. Jedan gen ili više gena?	6
1.4.1. Primarne imunodeficijencije	6
1.4.2. Idiopatske i mendelske infekcije.....	8
1.4.3. Monogeniski-uvjetovane infekcije.....	10
1.5. Genetska arhitektura – prirodna selekcija i genetske varijante	12
1.6. Geni kandidati i cjelogenomske studije.....	14
1.6.1. Geni kandidati	15
1.6.2. Cjelogenomske studije povezanosti - GWAS.....	16
1.7. Utjecaj okoliša i međudjelovanje gena	18
1.8. Izolirane otočne populacije	20
1.9. Personalizirana medicina i zarazne bolesti	23
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	25
2.1. Ciljevi.....	26
2.2. Hipoteze.....	26
3. ISPITANICI I POSTUPCI.....	27
3.1. Ispitanici.....	28
3.2. Definicija ispitivanih osobina	28
3.3. Genotipizacija i imputacija SNPova.....	29
3.4. Statistička analiza	30
3.4.1. Cjelogenomska analiza povezanosti	30
3.4.2. Meta-analiza	31
3.4.3. Analiza genetskih puteva (Pathway analysis).....	31
4. REZULTATI.....	32
5. RASPRAVA	62
6. ZAKLJUČAK.....	69
7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU.....	71
8. LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	73
9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU	75
10. LAIČKI SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU.....	77
11. LITERATURA	79
12. ŽIVOTOPIS.....	95

Popis oznaka i kratica

AD –	autosomno dominantno
AIDS –	sindrom stečene imunodeficijencije (<i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>)
AR –	autosomno recesivno
COVID 19 –	<i>Corona Virus Infectious Disease 2019</i>
DNA –	deoksiribonukleinska kiselina
EBV –	Epstein Barr virus
EV –	<i>Epidermodyplasia verruciformis</i>
<i>FAT4</i> –	FAT atipični kadherin 4 gen
GWAS –	cjelogenomske studije, od engl. <i>Genome-Wide Association Studies</i>
HIV –	virus humane imunodeficijencije (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HLA –	humani leukocitni antigen
HBV –	hepatitis B virus
HCV –	hepatitis C virus
HPV –	humani papiloma virus
LD –	<i>Linkage Disequilibrium</i>
LoF –	gubitak funkcije, od engl. <i>Lost of Function</i>
<i>MACROD2</i> –	<i>MACRO Domain containing 2</i> gen
MCC –	mukokutana kandidijaza, od engl. <i>MucoCutaneous Candidiasis</i>
miRNK –	mikro ribonukleinska kiselina
MSMD –	mendelska sklonost mikobakterijskim bolestima
NGS –	sekvencioniranje sljedeće generacije (engl. <i>Next-Generation Sequencing</i>)
NK –	<i>Natural Killers</i>
<i>NTM</i> –	neurotrimin
PAGE –	<i>Population Architecture Using Genomics and Epidemiology Consortium</i>
PheWAS –	<i>Phenome-Wide Association Studies</i>
PID –	primarne imunodeficijencije (engl. <i>Primary immunoDeficeincy</i>)
PPI –	međudjelovanje bjelančevina-bjelančevina (engl. <i>Protein-Protein Interaction</i>)
PREPARE –	<i>Platform foR European Preparedness Against (Re)emerging Epidemics</i>
<i>RSF1</i> –	<i>Human Remodeling and Spacing Factor 1</i> gen
SARS-CoV-2 –	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SNP –	polimorfizam nukleotida, od engl. <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>

TF –	čimbenik transkripcije, od engl. <i>Transcriptor Factor</i>
<i>TGIF1</i> –	TGFB-induciran čimbenik homebox 1 gen
TLR –	<i>Toll-Like Receptor</i>
WES –	sekvencioniranje egzoma (<i>Whole-Exome Sequencing</i>)
WGS –	cjelogenomsko sekvencioniranje (<i>Whole-Genome Sequencing</i>)
XLP –	X-vezana recesivna limfoproliferativna bolest
XR –	X-vezano recesivno

1. UVOD

1.1. Zarazne bolesti

Čovjek i zarazne bolesti su u međuođnosu od samih početaka postojanja. Opseg i dinamika ovog međuođnosa postaje intenzivnija promjenom uloge iz lovca-skupljača u stabilne zajednice i pojavom života u nastambama, poljoprivredom, uzgajanjem usjeva, kroćenjem životinja i stočarstvom, što je pogodovalo širenju patogenih mikroorganizama i njihovom sve većom pojavnošću (1-3).

Henry Sigerist je davne 1931. napisao da smo otkrili većinu tajni zaraznih bolesti, da su mnoge bolesti istrijebljene, a većina drugih da je pod kontrolom (4). To je uistinu bilo uvriježeno mišljenje tijekom dvadesetog stoljeća, a posebno uvođenjem antibiotika i imunizacije u terapiju i prevenciju između 1940. i 1960. Tako da je 1969. general William H. Steewart izjavio u američkom Kongresu kako je vrijeme da zatvorimo knjigu zvanu zarazne bolesti (5). Međutim, unatoč stoljeću provođenja uspješne prevencije i kontrole, smrtnost i stopa obolijevanja od zaraznih bolesti je ostala visoka, s djecom kao najrizičnijom i najranjivijom skupinom (6, 7). Već krajem dvadesetog stoljeća počinje uzlazni obrazac i pojava novih zaraznih bolesti, otkriće novih mikroorganizama, otpornost na antibiotike te objašnjenje kako zarazne bolesti mogu uzrokovati i kronične bolesti poput zaraze bakterijom *Helicobacter pylori* (7). Ovo je dovelo do naznake promjene našeg razumijevanja zaraznih bolesti, koja je počela 1992., kada je američki Institut za medicinu objavio izvješće naslova „*Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*“. U tom izvješću jasno su definirane te infekcije kao „nove, probojne ili otporne na liječenje, a čija se incidencija povećala posljednja dva desetljeća, ili za koje postoji opasnost povišenja incidencije“. Također su jasno definirani čimbenici koji dovode do toga: demografske promjene i promjene ponašanja; promjene okoliša i upotreba zemljišta; slom mjera javnog zdravstva; sposobnost prilagodbe i promjene mikroorganizma; međunarodna trgovina i putovanja; promjene u tehnologiji i industriji (8).

Moderni svijet obilježen je velikom gustoćom stanovništva u nekim dijelovima, velikom pokretljivošću te rastućim opsegom klimatskih i ekoloških promjena, koje znatno doprinose riziku pojavi novih zaraznih bolesti kao rastuće prijetnje zdravstvenoj sigurnosti u svijetu (3). Još 2018. su procjene rizika u slučaju pandemije uzrokovane visoko zaraznim i smrtonosnim virusom koji bi se prenosio kapljičnim putem sa značajkama virusa gripe iz 1918., bile globalna smrtnost od 33 milijuna ljudi u šest mjeseci (9). Već slijedeće godine, nažalost, navedena tvrdnja je na sličan način testirana u stvarnosti. Godine 2019. bolest uzrokovana korona virusom 2019 (COVID-19) koja dovodi do razvoja teškog akutnog respiratornog (distres) sindroma

(SARS-CoV-2, od engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) izazvala je pandemiju. U samo dvije godine (podaci do 6. rujna 2021.) zabilježeno je 4,57 milijuna potvrđenih smrtnih ishoda i 221 milijun potvrđenih slučajeva bolesti (10), iako su procjene da je prava brojka čak 18,2 milijuna smrti na razini cijelog svijeta (11). Povijest nam je nedvojbeno već do sada pokazala da će zarazne bolesti uvijek predstavljati izazov, ako ne i problem za zdravlje koji zahtijeva svjesnost, fleksibilnost, opsežne izvore prihoda i predanost u njihovom kontroliranju i savladavanju.

1.2. Zarazne bolesti i zdravlje

Brojni čimbenici utječu na ljudsko zdravlje, a zarazne bolesti su jedan od najsnažnijih (12) (13). Kao skupina bolesti, jasno se razlikuju od svih ostalih. Većina ih je uzrokovana jednim jedinim uzročnikom za razliku od kroničnih bolesti i onih vezanih uz životni stil koje su posljedica međudjelovanja brojnih rizičnih čimbenika. Niti jedna druga bolest nije imala toliki odraz na povijest čovječanstva kao zarazne bolesti. Velike pandemije i lokalne epidemije utjecale su na tijek ratova, razvoj civilizacija, a također su određivale sudbinu brojnih naroda i carstava. Na sreću, načini na koje se prenose su nam s vremenom postajali sve jasniji, što je dovelo do razvoja metoda intervencije. Otkrivši uzročnika možemo utjecati na kontrolu bolesti bilo općim (npr. provođenje javnozdravstvenih mjera, kemijska dezinfekcija, pranje ruku, kontrola vektora), bilo specifičnim medicinskim mjerama (npr. cijepljenje ili antimikrobno liječenje) (14). Upravo zahvaljujući prevenciji, koja je tijekom vremena postala sve učinkovitija, pojedine zarazne bolesti mogu se iskorijeniti, osobito one bez neljudskog domaćina ili velikog rezervoara. Primjeri takvih bolesti su velike boginje, koje su potpuno iskorijenjene, i poliomijelitis. Zahvaljujući izvanrednoj sposobnosti prilagodbe uzročnika (brzo umnožavanje i mutacija), preživljavale su tijekom evolucije (primjer *Mycobacterium tuberculosis*). Utjecaji kojima su zarazne bolesti stalno izložene uključuju čimbenike okoliša, antimikrobne lijekove te imunološki odgovor pojedinca. Upravo ta "borba" između imunološkog sustava i mogućnost prilagodbe patogenog uzročnika predstavlja trajan izazov. Zarazne bolesti su "naše ogledalo" jer su direktan odraz onoga što jesmo, što radimo, kako živimo, naših međuljudskih odnosa, interakcije sa životinjama i okolišem. Posljedica su našeg ponašanja i životnog stila, društvenih okupljanja, putovanja i prijevoza, spolne aktivnosti, izlaganja na poslu, u sportu i rekreacijskim aktivnostima, do onoga što jedemo i pijemo, ljubimce koje imamo, čak i način na koji negujemo bolesne u bolnicama ili drugim zdravstvenim ustanovama. Ovo jasno ocrtava da smo vezani sa zaraznim bolestima na intiman

i jedinstven način. Naš imunološki sustav, bio urođeni ili stečeni, evoluirao je od samog postanka uz izazove patogena razvijajući napredne mehanizme obrane kako bi zaštitio organizam od mikroba (12).

Međutim, unatoč činjenici da su zarazne bolesti u središtu ovog istraživanja već jako dugo vremena, još uvijek potpuno ne razumijemo njihovu patogenezu što u pojedinim slučajevima rezultira neučinkovitim liječenjem i kontrolom nekih od njih. Razlog tomu su brojni čimbenici uključujući sposobnost prilagodbe i promjenjivosti patogena, međudjelovanje domaćina i patogena, genetika domaćina kao i različiti učinci koji su posljedica međudjelovanja domaćina i patogena (12, 14). Jedna od najvećih zagonetki zaraznih bolesti upravo je njihova ogromna raznolikost u kliničkoj prezentaciji između pojedinaca tijekom infekcije, u rasponu od asimptomatske infekcije do smrtnog ishoda (15, 16). Taj ključni, dijelom zanemareni problem zaraznih bolesti dobio je na značenje početkom dvadesetog stoljeća otkrićem latentne (ne replicirajuće) i neprimjetne (replicirajuće) infekcije kod asimptomatskih pojedinaca (17). Nakon ovog otkrića, uslijedilo je slijedeće, a to je da većina infekcija uzrokuje smrt u malog broja zaraženih ljudi (18). Koji je onda to čimbenik koji zarazne bolesti pretvara u životno ugrožavajuće bolesti? Klinička slika zaraznih bolesti do kraja devetnaestog stoljeća ovisila je najviše o uzročniku i njihovoj raznolikosti, a manje o virulenciji patogena (15, 19). Epidemije ili pandemije povremeno su mijenjale broj oboljelih i smrtnih slučajeva, ali rijetko koja od zaraznih bolesti bi dovela do smrti više od jedne trećine zaražene populacije (17). Zaključak koji je uslijedio bio je da su mikrobi okidači za nastanak zarazne bolesti te su potrebni, ali ne i dovoljni za razvoj bolesti, tj. kliničke slike. Također je kao čimbenik rizika za razvoj teškog oblika zarazne bolesti definirana stečena imunodeficijencija uzrokovana bilo imunosupresivnim lijekovima (npr. u terapiji autoimunih bolesti ili nakon transplantacije), nekim заразним bolestima (npr. nakon infekcije s virusom humane imunodeficijencije ili virusom ospica), ili nekim drugim bolestima, tj. stanjima (npr. neoplazme, pothranjenost) (20). Imunodeficijencija u inače zdrava pojedinca koji je naizgled imunokompetentan, mogla bi biti posljedica kvalitativne ili kvantitativne raznolikosti patogena (mikrobiološka teorija), razlike u uvjetima prilikom obolijevanja od zarazne bolesti (ekološka teorija), ili promjenjivosti stečenog imunološkog odgovora na određeni infektivni antigen u prošlosti i sadašnjosti (imunološka teorija) (21-24). Iako postoje razne teorije kojima smo pokušali razumjeti i objasniti ovu raznolikost, jedna teorija je dovoljno široka i sveobuhvatna – genetska teorija zaraznih bolesti (19). Ova teorija definira teške oblike zaraznih bolesti djece i odraslih kao posljedicu urođenih grešaka imuniteta jednog gena tj. monogenske bolesti (25, 26). Proširenje ove teorije na

razumijevanje međudjelovanja genoma čovjeka i patogena je sljedeći korak u razumijevanju patogeneze zaraznih bolesti (15).

1.3. Je li gen isključivi krivac – genetska teorija zaraznih bolesti

Početkom pedesetih godina prošlog stoljeća smatralo se da su rijetke monogenske imunodeficijencije, tzv. primarne imunodeficijencije (PID, engl. *primary immunodeficiency*), odgovorne za osjetljivost pojedinca za brojne zarazne bolesti u skladu s hipotezom jedan gen, brojne infekcije, a težina kliničke slike ovisi o zahvaćenom genu (27). S druge pak strane, za uobičajene infekcije se smatralo da su posljedica poligenskog nasljeđivanja brojnih gena koji povećavaju osjetljivost pojedinca, većina kojih, ako ne i svi, samo skromno doprinose fenotipu u skladu s hipotezom jedna infekcija, brojni geni (28). Sraz ove dvije hipoteze započinje Ogden Bruton 1952., koji je opisao prvu PID X-vezanu recesivnu agamaglobulinemiju u nekoliko američke djece s brojnim infekcijama. Otprilike u isto vrijeme, 1954. godine, Anthony Allison je otkrio zaštitnu ulogu srpastih stanica protiv teških oblika malarije uzrokovanih *Plasmodium falciparum* u Afričkoj populaciji, sugerirajući uključenost brojnih gena u razvoj zaraznih bolesti. Teorija jedan gen, brojne infekcije s jedne strane i jedna infekcija, brojni geni s druge strane u biti su isti fenomen gledan s dva različita kraka: bolesnik i populacija. Međutim, nedavna otkrića pokazala su da uistinu geni pridonose osjetljivosti ili otpornosti na zarazne bolesti, ali na razini pojedinca ili populacije (teorija jedan gen, jedna infekcija), premošćujući na taj način dva polja i predlažući ujedinjenu teoriju humane genetike zaraznih bolesti (16). Jean-Laurent Casanova i Laurent Abel su u svom radu pokušali prikazati objedinjene teorije utemeljene na Mendelovoj genetici i na genetici složenih bolesti. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da ideja o genu koji je specifičan za patogen vrijedi za neke, ali ne i za sve pojedince i populacije, obzirom da isti gen može biti povezan s drugim infekcijama kod nekog drugog pojedinca ili populacije. Uistinu, malo je vjerojatno da je ta specifičnost za patogena strogo specifična. Uz to postoje dva jako bitna čimbenika koja moramo uzeti u obzir: virulencija patogena i dob kad je nastala infekcija. Mendelski naslijeđena sklonost vidi se kod zaraznih bolesti od kojih obolijeva samo mali dio zaraženih pojedinaca. Za razliku od obične/uobičajene/česte poligenski nasljedne sklonosti koja je vjerojatno uključena u nastanak bolesti uzrokovane dosta virulentnijim mikrobima. Što se tiče dobi, mendelske osobine se očituju prije nastupa puberteta, kada se i događa najveći broj primarnih infekcija te kada se očekuje da smrt ima veći učinak na populacijsku genetiku. (29).

1.4. Jedan gen ili više gena?

Opće poznato je da naslijeđe, tj. genetska struktura u međudjelovanju s okolišem kao mogućim okidačem dovodi do razvoja mnogih bolesti poput šećerne bolesti, ishemijske bolest srca, uključujući tako i osjetljivost za zarazne bolesti. Isto tako je već poznata činjenica da je doprinos pojedinog gena jako skroman. Međutim, znamo i da postoje nasljedne monogenske (Mendelske) bolesti koje zahvaćaju imunološki sustav na način da uzrokuju imunodeficijencije – PID. Dakle, rezultati klasičnih genetskih istraživanja polako su vodila jednom zaključku, a to je da su teški oblici zaraznih bolesti definitivno posljedica genetske sklonosti. Ovakvo mišljenje posebno je dobilo na snazi razvojem molekularne genetike kroz tri uzastopna, povremeno preklapajuća koraka. Prvo, od 1985. nadalje otkrivene su mnoge urođene bolesti imuniteta, koje su rijetke, podliježu brojnim, ponavljajućim infekcijama te slijede mendelski obrazac nasljeđivanja. Drugo, od 1996. otkriven je mali broj infekcija koje su rijetke po učestalosti i vezane su za određene obitelji, također se ponašaju kao mendelske bolesti, ali taj isti pojedinac je otporan na druge infekcije. Treće, od 2007. nadalje, sve je više sporadičnih slučajeva zaraznih bolesti koje su rijetke ili pak učestale, a koje su posljedica monogenetskih, ali ne i monogenetski urođenih grešaka imuniteta (17).

Prvobitna izvješća o urođenim greškama imuniteta u razdoblju od 1946. do 1952. postupno su vodila prema današnjem shvaćanju da teški oblici zaraznih bolesti kod ljudi mogu biti posljedica urođenih grešaka imuniteta uzrokovanih jednim genom s nepotpunom penetrantnošću (17).

1.4.1. Primarne imunodeficijencije

Primarne imunodeficijencije posljedica su genetskih poremećaja različitih sastavnica urođenog i stečenog imuniteta (30). Međunarodno udruženje imunoloških društava svrstalo je 430 do sada otkrivenih imunoloških poremećaja u devet skupina (31, 32). Zadnja, deveta skupina kao i 30 novih poremećaja gena dodani su 2014., a 2019. napravljena je posljednja klasifikacija (27, 32, 33). Iako je riječ o iznimno rijetkim bolestima, one predstavljaju temelj istraživanja kako poremećaj jednog jedinog gena utječe na imunološki odgovor i zaštitu od određenog mikroorganizma (34, 35). Već je prije spomenuta Brutonova X-vezana recesivna agamaglobulinemija čiji opis predstavlja knjiški primjer urođene bolesti imuniteta. Imunološki fenotip ovih bolesnika je potpuni nedostatak serumskih gamaglobulina, a infektološki fenotip karakteriziraju učestale i ponavljajuće invazivne pneumokokne ili infekcije uzrokovane drugim

piogenim bakterijama (36). Iako je teška kongenitalna neutropenija opisana dvije godine ranije, 1950., kod djece s teškim oblicima stafilokoknih i drugih bakterijskih infekcija te kongenitalnom neutropenijom, fenotip koji se nasljeđivao autosomno recesivno, tek je 1999. uvrštena u PID jer su je proučavali hematolozi, a ne imunolozi (37). U biti, prva ikad opisana u ljudi urođena greška imuniteta je verruciformna epidermodisplazija (*epidermodysplasia verruciformis*) davne 1946. Klinički ju obilježavaju brojne, po cijelom tijelu raspoređene bradavice uzrokovane nepoznatim virusom, a osobina se prenosi autosomno recesivnim putem. Nedostatak jasnog imunološkog ili hematološkog fenotipa razlog je zbog čega ona nije bila uvrštena u PID do 2004. godine (37, 38). Povijesno gledajući, upravo je jasan imunološki poremećaj bio ključ otkrivanja, imenovanja i klasifikacije PID (17). Uslijedili su opisi drugih imunoloških fenotipova poput nedostatka slezene iz 1956. (39), nedostatka limfocita iz 1958. (40), a potom i štitne žlijezde 1965. godine (41). Ovo je omogućilo otkrivanje poremećaja razvoja određenih podskupina limfocita poput T i B limfocita, CD4+ i CD8+ limfocita, potom i poremećaj funkcije limfocita u bolesnika s normalnim razvojem limfnog tkiva (32). Nakon otkrića neutropenije, kronične granulomatozne bolesti, uslijedila su otkrića kvalitativnih i kvantitativnih poremećaja mijeloidnih stanica kao posljedice urođene greške imuniteta. Od 1965. nadalje brojni mendelski poremećaji komplementa, iako se većina proteina komplementa sintetizira u jetrenim stanicama, uvršteni su u PID (17).

Što se pak tiče kliničkog fenotipa PID, on odgovara tipičnom fenotipu zaraznih bolesti: brojne i ponavljajuće infekcije uzrokovane virusima, bakterijama, gljivama i parazitima s često teškom kliničkom slikom ili infekcijama rijetkim mikrobima (42). Prije ere antibiotika, ove su infekcije bile gotovo neizbježno smrtonosne. Stoga je uvriježeno mišljenje kako se teški oblik zarazne bolesti kod pojedinca uzročnicima koji su rijetki (oportunistički), ponavljajuće ili brojne infekcije, odmah trebaju pobuditi sumnju kod kliničara na postojanje PID, započeti dijagnostičku obradu u potrazi za imunološkim poremećajem te istražiti obiteljsku povijest bolesti kako bi se uočio eventualno mendelski način nasljeđivanja (42).

Autoimune bolesti predstavljaju heterogenu skupinu poremećaja imunološkog sustava koje su posljedica gubitka tolerancije na sistemske ili organ specifične auto-antigene (30). Prethodno su se PID i autoimune bolesti smatrale kao dva potpuno različita poremećaja, čak potpune suprotnosti. Međutim, napretkom genetike i boljim razumijevanjem patofizioloških procesa uključujući T stanični razvoj, razvoj imunološke tolerancije, T staničnu signalizaciju, sustav komplementa i upale uvidjelo se da se te bolesti međusobno isprepleću, čak dijele neke zajedničke mehanizme (30). Najčešća PID u djece i odraslih je izolirani nedostatak IgA

imunoglobulina, a upravo ona je najviše povezana s razvojem autoimunih bolesti (43). Iako se javljaju kod djece i odraslih, ipak su značajno češće u dječjoj dobi (44).

Međutim, osim autoimunih bolesti još su tri klinička fenotipa dodana skupini urođenih grešaka imuniteta: autoinflamatorne bolesti, alergije i novotvorine/karcinomi (17). Prvi je opisan autoinflamatorni fenotip bio vjerojatno angioneurotski edem, još 1965. (45), a prvi autoimuni fenotip je vjerojatno nedostatak komplementa opisan 1972. (46). Nakon toga opisan je alergijski fenotip hiperimunoglobulinemija IgE iz 1974. (47) te prva neoplazma - ataksija teleangiektazija opisana 1964. godine (48). Mnogi tumori uzrokovani su virusima, u najmanju ruku oni kojima ide u prilog sam poremećaj imuniteta, dok je većina drugih posljedica poremećaja popravka molekule DNK (deoksiribonukleinska kiselina), što podrazumijeva i imunost i rast stanice (17).

Analiza imunoloških poremećaja s genetskog stajališta dovela je do zaključka da je genetska arhitektura kliničkih fenotipova slična genetskoj arhitekturi zaraznih bolesti: teški oblici kliničkih fenotipova uzrokovanih infekcijom, (virusom uzrokovanog) karcinomom, alergijom, autoimunom ili autoinflamatornom bolesti mogli bi biti uzrokovani rijetkim varijantama snažnog učinka na populacijskoj razini, gdje pojedinci imaju monogenske poremećaje s rijetko potpunom penetracijom. Drugim riječima, postoji genetska heterogenost, ali fiziološka homogenost (49).

Zaključak o PID bi bio da su teški oblici zaraznih bolesti uistinu posljedica postojanja genetske sklonosti, a tijek svake infekcije ovisi o genetskom nedostatku često povezanom s imunosti. Također su nam dokazale da teški oblici zaraznih bolesti mogu biti posljedica urođenih poremećaja imuniteta ne samo kod djece s brojnim, ponavljajućim i rijetkim infekcijama, već i kod djece koja preminu prilikom zaraze s nekom učestalom zaraznom bolesti (17).

1.4.2. Idiopatske i mendelske infekcije

Riječ je o maloj skupini zaraznih bolesti koje predstavljaju „most“ između dvije velike skupine bolesti: PID i monogenских infekcija. Njihova osobina je da izazivaju infekcije koje su navodno idiopatske, ali s mendelskim osobinama prenošenja, u inače zdravih pojedinaca s potpuno normalnom otpornošću na bilo koje druge uzročnike zaraznih bolesti (17). Do sada je opisano pet takvih bolesti, uključujući:

- a) Veruciformna epidermodisplazija (EV) – opisana još davne 1946. kao kožna bolest koju uzrokuju virusi, a prenosi se autosomno recesivno (AR). Godine 1978. otkriven je

uzročnik, dermatotropni virus β -humani papiloma virus (HPV) (38, 50). U svom najuobičajenom obliku očituje se kao izolirane, samo kožne lezije s početkom u drugom desetljeću života, a traje ili se ponavlja tijekom cijelog života. Ova bolest je možda prvi dokaz da nisu samo hematopoetske stanice uključene u imunološku obranu, već i nehematopoetska stanična imunost. Također je pružila prvi dokaz o onkogenom potencijalu HPV, prije nego što se uopće povezivao karcinom vrata maternice s virusnom infekcijom (50).

- b) Mendelska sklonost mikobakterijskim bolestima (MSMD, engl. *Mendelian Susceptibility to Mycobacterium Disease*) – poznata još od 1951. kada je opisana u inače zdrave djece nakon BCG cjepiva, a karakteriziraju je povećana sklonost razvoju bolesti uzrokovane slabo virulentnim sojem mikobakterije (*Bacillus Calmette-Guerin*; BCG) iz cjepiva ili *Mycobacterium tuberculosis* iz okoliša, *Candida* spp. i *Salmonella* spp. Prenosi se autosomno dominantno (AD) ili AR, ili X-vezano recesivno (XR) (51). Ovo je najdetaljnije opisana mendelska zarazna bolest. Od 1996. poznata je mutacija za ovu bolest u različitim genima koji kodiraju proteine uključene u kontrolu imunosti posredovane $\text{INF}\gamma$ (interferon γ) (52). Neki od ovih genetskih poremećaja smanjuju proizvodnju $\text{INF}\gamma$, a drugi smanjuju odgovor na navedeni citokin što rezultira poremećajem fagocitoze mononukleocita (52). Upravo ovo otkriće ima značajnu ulogu u kliničkoj primjeni: postavljanje genetske dijagnoze i savjetovanja, prevencija i liječenje bolesti (52).
- c) Invazivna dermatofitna bolest - poznata od 1957. Uzrokuje teške oblike bolesti uzrokovane dermatofitnim gljivama, a prenosi se AR (53). Iako su dermatofiti gljive koje većinom uzrokuju benigne kožne infekcije, vrlo rijetko uzrokuju invazivne oblike bolesti zahvaćajući dublje organe poput kosti, jetre ili mozga (53). Takvi oblici bolesti nisu viđeni u bolesnika s PID i brojnim infekcijama. Također ove gljive se ne vode kao oportunističke gljive (17). Svi ovi bolesnici nose mutaciju *CARD9* na oba alela tako da je ova bolest jedini primjer genetske homogenosti između pet navedenih primjera mendelskih infekcija (53).
- d) X-vezana recesivna limfoproliferativna bolest i bolesti povezane s infekcijom Epstein Barr virusom (EBV) – opisane 1974. (54). X-vezana limfoproliferativna bolest (XLP) još je jedan primjer virusne infekcije koja pogađa inače zdrave pojedince te se razvija već nakon primoinfekcije. Klinički, dovodi do nastanka hemofagocitoze ili hipogamaglobulinemije tijekom EBV infekcije, ili do nastanka B staničnog limfoma kasnije u životu (54). EBV koji uzrokuje XLP slične je virulencije kao i EBV koji

uzrokuje infekciju u općoj populaciji. Anamneza ovih bolesnika prije infekcije je bez osobitosti. Kod muških bolesnika nikakav imunološki poremećaj nije ustanovljen prije postavljanje dijagnoze i otkrivanja gena uzročnika – *SAP* (55).

- e) Kronična mukokutana kandidijaza (MCC, od engl. *MucoCutaneous Candidiasis*) – opisana je 1967. Očituje se brojnim lezijama kože i sluznica uzrokovanih gljivom *Candida albicans*, a prenosi se AR ili AD (56). Bolest je definirana trajnom ili ponavljajućom infekcijom kože, noktiju, sluznice usne šupljine, jednjaka, spolnih organa gljivom roda *Candida* kod bolesnika sa stečenim ili nasljednim nedostatkom CD4+ stanica (56).

Četiri od gore navedenih pet skupina mikroba zaraze skoro sve ljude, najčešće bez ikakvih kliničkih posljedica, a više od 90% pojedinaca u cijelom svijetu zarazi se s petim, EBV koji uzrokuje infektivnu mononukleozu, najčešće samoizlječivu bolest (57). Četiri od ovih pet navedenih bolesti također se opisuju kao oportunističke infekcije kod bolesnika koji su osjetljivi na druge infekcije, dok se invazivna dermatofitna bolesti javlja isključivo izolirano i idopatski (17).

Ove bolesti definitivno su nam dokazale da pojedinac može biti genetski osjetljiv na samo jedan mikrob tijekom cijeloga života, a da se istodobno uspješno obrani od brojnih drugih uzročnika infekcije. Doduše, do sada je definirano samo pet takvih fenotipova i iznimno su rijetki, ali su nas vodili prema slijedećem otkriću, infekcijama koje su monogene, ali ne i mendelske (17).

1.4.3. Monogeniski-uvjetovane infekcije

Kada bi se većina teških oblika zaraznih bolesti pojavljivala slijedeći mendelske načine nasljeđivanja, odavno bi već poznavali njihovo genetsko podrijetlo. Kada bi se češće pojavljivale unutar obitelji, a ne sporadično, barem bi posumnjali na njihovo postojanje i na širenje zaraze unutar istog kućanstva (26, 49). Poznato je da su pridonijele selekciji alela važnih za razvoj otpornosti, rezistencije što nam najbolje pokazuje primjer srpastih stanica čiji je oblik hemoglobina jako zastupljen u endemskim područjima *Plasmodium falciparum* (18). Smrt je njihov ekstremni fenotip koji ima snažno evolucijsko značenje, osobito ako nastupi prije ili tijekom reproduktivne dobi (58). Svi ovi dokazi doveli su do razmišljanja da bi teški oblici zaraznih bolesti u biti mogle biti monogeniski uvjetovani (26). Još uvijek mali, ali rastući broj bolesti koje su životno ugrožavajuće tijekom primoinfekcije, poput primjera invazivne piogene bakterijske bolesti, *Herpes simplex* encefalitisa ili teškog oblika influenza pneumonitisa

uzrokovane su različitim virusima, bakterijama, gljivama i parazitima, u inače zdrave djece, adolescenata i odraslih, uzrokovane su monogenским urođenim greškama imuniteta s većinom nepotpunom penetracijom (19, 49).

Tablica 1. Usporedba primarnih imunodeficijencija, mendelskih i monogenских infekcija (17)

Osobine	Primarne imunodeficijencije	Mendelske infekcije	Monogenские infekcije
Broj bolesnika	Poznat (intermedijalan)	Poznat (mali)	Nepoznat (velik?)
Slučajevi unutar obitelji	Učestali	Učestali	Rijetki (sporadnično)
Penetrantnost	Visoka ili potpuna	Visoka ili potpuna	Niska
Dob obolijevanja	Djeca >> odrasli	Djeca > odrasli	Djeca ili odrasli
Broj zaraznih čimbenika	Velik	Jedan (ili samo nekoliko)	Jedan
Broj epizoda zaraznih bolesti	Brojne (akutne ili kronične)	Mali ili veliki broj	Malen
Zarazna bolest	Često rijetka, oportunistička	Rijetke, idiopatske	Česte
Imunološki poremećaj	Prije otkrića gena	Nakon otkrića gena	Nakon otkrića gena
Tip stanica koji je uključen	Leukociti	Leukociti ili drugi tipovi stanica (npr. keratinociti i CIB1)	Leukociti ili drugi tipovi stanica (npr. kortikalni neuroni i TLR3)
Ostali klinički fenotipovi	Učestali (autoimuni, alergije, autoinflamatorne, karcinomi, dr...)	Rijetki (sindromatični oblici)	Vrlo rijetki
Primjeri	AR SCID i varijacije u RAG1	AR EV i varijacije u CIB1	AR oblik teškog influenza pneumonitisa i varijacije u IRF7
	XR agamaglobulinemija i BTK	XR EBV bolest i SAP	XR invazivna pneumokokna bolest i NEMO
	AD kongenitalna leukopenija	AD MSMD i IFNGR1	
			AD HSE i TLR3

AD, autosomno dominantno; AR, autosomno recesivno; EBV, Epstein–Barr virus; EV, epidermodysplasia verruciformis; HSE, herpes simplex encefalitis; MSMD, Mendelian susceptibility to mycobacterial disease; SCID, severe combined immunodeficiency; XR, X-vezano recesivno.

1.5. Genetska arhitektura – prirodna selekcija i genetske varijante

Unatoč jasnom napretku u našem razumijevanju zaraznih bolesti, još uvijek je nedostajala dosljedna teorija ili objašnjenje genetske arhitekture zaraznih bolesti. Hipoteza da su samo urođene greške imuniteta odgovorne za nastanak zaraznih bolesti, tj. za nasljeđivanje sklonosti ili otpornosti spram uzročnika, značajno se razlikovala između bolesti i provedenih istraživanja. Alcai i suradnici (19) u svom istraživanju navode četiri razloga zbog čega smatraju takvu tezu neutemeljenom. Prvo, zarazne bolesti se ne mogu jednostavno podijeliti na rijetke i učestale infekcije budući da postoje značajne razlike u njihovoj godišnjoj pojavnosti. Također, za svaku od bolesti treba uzeti u obzir i razlike u zemljopisnom području, ali i vremenskom, čak povijesnom razdoblju koje razmatramo. Drugo, isto tako ni bolesnike ne možemo lako svrstati kao one sklone za jednu ili više mikroba, obzirom da postoje značajne razlike u obrascu sklonosti između ta dva ekstrema. Treće, rijetke infekcije nisu baš uvijek povezane sa širokom osjetljivosti, isto kao što ni učestale infekcije nisu nužno povezane s uskom ranjivosti. Potvrda tome su rijetka djeca s jednom, životno ugrožavajućom infekcijom u razvijenim zemljama, a veliki broj djece s brojnim infekcijama u zemljama u razvoju. I konačno peto, unatoč spektakularnom napretku u proučavanju PID, većina složenih genetskih studija nije uspjela pokazati uzročnu vezu između predloženog genetičkog čimbenika rizika s biološkom funkcijom ili kliničkom primjenom (19). Izgleda da je ključni čimbenik u svemu tome dob nastanka bolesti koja onda pokazuje je li genetska sklonost monogena ili složena, bez obzira na incidenciju nastale infekcije i ukupnu otpornost bolesnika za druge zarazne bolesti (26). Drugim riječima, početak bolesti ovisi o monogenkim ili oligenskim učincima, dok kasniji stadij bolesti i prognoza vjerojatno ovise o poligenkim učincima.

Zarazne bolesti, tj. mikrobi pokreću jednu od najsnažnijih prirodnih selekcija koja djeluje na naš genom (59-63). Dapače, dosadašnja istraživanja daju naslutiti da je genetska arhitektura podložnosti zaraznim bolestima značajno različita od one za ne zarazne bolesti te predlaže prirodnu selekciju kao najznačajniju silu koja određuje ovu razliku (64). Geni koji sudjeluju u imunološkom odgovoru jedni su od najbrojnijih i najrazličitijih (65), ukazujući na evolucijske prednosti raznolikog imunološkog odgovora na širok raspon infektivnih patogena (66). Dapače, sam ishod koji slijedi nakon izlaganja potencijalno životno ugrožavajućem patogenu i različita

osjetljivost djelomično pokazuje funkcionalnu genetsku raznolikost odgovora imunološkog sustava (67). Pri prvom kontaktu s infektivnim uzročnikom ne-hematopoetske stanice (npr. epitelne stanice kože, sluznica unutrašnjih organa) odgovorne su za obranu i pokretanje imunološkog odgovora. Aktivira se određena skupina gena od kojih samo mali broj njih sudjeluje u imunološkom sustavu, tzv. urođeni imunitet. U urođenom imunitetu mijeloidne stanice imaju ključnu ulogu jer potiču stvaranje za antigen specifične limfoidne stanice kod kojih se aktivira jako velik broj gena. Sve to važno je za kontrolu invazije mikroba, kontrolu latentne infekcije i vodi stvaranju stečene imunosti. Iz toga zaključujemo kako se manji broj gena aktivira tijekom primarne infekcije u djetinjstvu pa postojanje defekta jednog gena će se lakše i prije manifestirati u ranoj životnoj dobi. Kod djece životno ugrožavajuće zarazne bolesti posljedica su nakupljanja brojnih varijanti jednog gena koji je odgovoran za imunološki odgovor tijekom primarne infekcije. Većinom je ovdje riječ o rijetkim varijantama s nepotpunom kliničkom penetracijom. Za razliku od odraslih za koje se smatra da ta zametna linija genetskih varijacija i nema neku značajnu ulogu u razvoju životno ugrožavajućih infekcija. Poligenske i monogenske varijacije pridonose mnogo složenijoj sklonosti razvoja sekundarnih pa i latentnih infekcija kod odraslih, osobito starijih (19). Sve navedeno dovelo nas je do novog pojma, genetske varijante – varijante jednog gena koja je odgovorna za razvoj teškog oblika zarane bolesti. Ono što do sada znamo o njima je da se ne nasljeđuju mendelskim načinom nasljeđivanja, iznimno su rijetke s učestalosti u populaciji manje od jedan posto, tako da je pravilnije govoriti o rizičnom genotipu. Istražujući njih svakako moramo razumjeti i dinamiku njihove prirode. U razvijenim zemljama zahvaljujući napretku medicine (higijena, cijepljenje, antimikrobni lijekovi, mjere simptomatskog liječenja) samo mali broj tih rijetkih genetskih varijanti će izraziti svoj fenotip. Za razliku od prije dva stoljeća kada je prodornost ovih varijanti bila veća jer nisu bile zamaskirane medicinom (19). Prava incidencija zaraznih bolesti, međutim, samo djelomično ovisi o dostupnim metodama prevencije. Za većinu zaraznih bolesti daleko najveću sklonosti ipak pokazuju djeca, i to što je dob mlađa, sklonost je veća. Adolescenti i mladi odrasli pokazuju najmanju sklonost koja ostaje niska i kod starijih odraslih da bi potom ponovno progresivno rasla s visokom životnom dobi. To nas vodi do zaključka da postoji skroz drugačiji mehanizam razvoja sklonosti teških oblika zaraznih bolesti kod djece i odraslih u reproduktivnoj dobi.

Nedavna pandemija COVID-19 podsjetila nas je na punu snagu i evolucijski pritisak zaraznih bolesti. Zarazne bolesti su, do ne baš tako davno, odnosile tisuće, milijune života najčešće zahvaćajući djecu. Napredak medicine i poboljšanje preventivnih mjera rezultirali su sastavljanjem cjepiva i učinkovitim antimikrobnim liječenjem koji omogućavaju sprječavanje, liječenje, a samim time i veće preživljenje doprinoseći na taj način produženju očekivanog životnog vijeka ljudi. Kao posljedica, smanjen je njihov evolucijski pritisak, ali su zadržane sve te štetne genetske varijante koje bi smrću pojedince bile izbrisane iz populacije. One su za sada "uspavane i maskirane" mjerama kontrole zaraznih bolesti i samo je pitanje vremena kad će u novoj epidemiji pokazati svoje pravo lice. Jedan od ciljeva humane genetike jest definirati te genetske varijante odgovorne za promjenjivost tijeka infekcije kod pojedinaca. Ovakav pogled na zarazne bolesti za kliničara znači nove dijagnostičke metode, bolju mogućnost prognoze bolesti i ishoda liječenja, te nove, inovativne mjere prevencije i liječenja. Upravo je to i jedan od ciljeva ovog istraživanja, vidjeti koje su to rijetke genetske varijante koje pojedinca stavljaju u povećan rizik za razvoj teškog oblika bolesti i mogućnost sastavljanja panela za procjenu cjeloživotnog rizika.

1.6. Geni kandidati i cjelogenomske studije

Mogućnost prepoznavanja pojedinaca s visokim rizikom za razvoj zaraznih bolesti jedan je od ciljeva rane preventivne intervencije (68). Sve je veći interes u raslojavanju populacija obzirom na rizik obolijevanja od zaraznih bolesti temeljem izrade genetskog profila. Do sada je naglasak bio na prevenciji s ciljem sveobuhvatnog cijepljenja djece diljem svijeta. Međutim, svjedoci smo pojave sve većeg broja novih, još uvijek skupih cjepiva što je dovelo do razmišljanja o njihovoj ciljanoj upotrebi. Genetskim profiliranjem dobio bi se odgovor na pitanje tko će imati korist od pojedinog cjepiva kao i predviđanje rizika za bolest (69). Skupni genetski rizik kroz poligenske ocjene rizika i razmatranje rijetkih varijanti velikog učinka dobivaju na snazi kao korisni klinički alati, s izvješćima, na primjer, o primjeni za denga groznicu (70).

Istraživanja osjetljivosti na zarazne bolesti nisu novost. Već ranih 1950-ih godina povezala se strukturna promjena hemoglobina (srpaste stanice) kao značajni čimbenik otpornosti na

infekciju uzročnikom malarije (71). Dvije najčešće vrste istraživanja gena odgovornih za bolest su studije gena kandidata i cjelogenomske studije povezanosti (GWAS, *engl. genome-wide association studies*).

1.6.1. Geni kandidati

Prilikom provedbe studija kandidata gena, važno je u metodološkom smislu razmotriti slijedeće: odgovarajuću gustoću markera u genu kandidatu kako bi se osigurala dovoljna osjetljivost studije da isključi genetsku regiju; uske i dosljedne fenotipske definicije; podudaranje slučajeva i kontrola te veličina i statistička snaga uzorka (67). Vjeruje se da su većina genetskih varijanti odgovornih za povećanu sklonost razvoja teških oblika zaraznih bolesti rijetke monogenske varijante (64). Veliki broj dosadašnjih studija istraživale su gene kandidate koji su prepoznati kao sudionici u urođenom ili stečenom imunitetu. Ti geni su potom povezivani s ishodima različitih zaraznih bolesti. Najviše su istraživane bolesti: infekcija virusom HIV-a, infekcije mikobakterijama (tuberkuloza i guba), malarija i lischmanioza (67). Takve studije dale su brojne pozitivne rezultate. Zanimljivo je zapažanje pojedinih studija o genima kandidatima koje su se usredotočile na proteine uključene u urođeni imunitet (prepoznavanje mikroba) i prve obrambene puteve urođenog imuniteta, naglašavajući vjerojatne selektivne pritiske koje su izvršile zarazne bolesti. Ključni geni koji reguliraju stečene imunološke odgovore (stečeni imunitet) također su se pojavili kao geni kandidati u višestrukim заразним bolestima (67). Međutim, rezultati velikih sistematskih pregleda i meta-analiza nedavno su smanjila broj svih tih gena na njih troje: *IL4*, *TLR2* i *CCL5*, kod kojih je istraživana njihova očekivana uloga u imunološkom odgovoru za upale dišnog sustava (72). Ukratko, *IL-4* važan je za usmjeravanje imunološkog odgovora prema Th1 ili Th2 limfocitima; *TLR2* je važan u procesima stvaranja urođene imunosti; *CCL2* je odgovoran za monocitnu infiltraciju i stvaranje granuloma. Osovina *IL4-TLR2-CCL2* mogla bi biti zanimljiva tema istraživanja za kliničku primjenu. Međutim, ovaj zaključak je donesen s niskom vjerodostojnosti dokaza jer kod gotovo 95% svih studija uključenih u istraživanje, postojao je visoki rizik za postojanje pristranosti ili zbunjujućih čimbenika (72). Metodološke prepreke u svim studijama ukazuju na potrebu za poboljšanjem prije primjene rezultata u kliničke svrhe.

1.6.2. Cjelogenomske studije povezanosti - GWAS

S druge strane istraživačkog kraka su cjelogenomske studije povezanosti koje su dovele do spektakularnih otkrića u genetici složenih bolesti. Prvi put pojavila se mogućnost genotipizacije milijuna SNP-ova (polimorfizam jednog nukleotida, od engl. *single nucleotide polymorphism*) tisuće pojedinaca i otkrivanje genetskih markera za uzročne varijante (73). Cjelogenomski pristup koristi studije povezanosti višestruko zahvaćenih, u ovom slučaju zaraženih, rodovnika, za identificiranje regija cijelog genoma koje se prenose s roditelja na potomstvo češće nego što bi se očekivalo neovisnim nasljeđivanjem (74). Ovakav pristup u istraživanju pokazao se izvrsnim za mnoge složene bolesti, otkrivajući brojne nove lokuse za npr. autoimune bolesti. Ne samo što pruža uvid u molekularnu patogenezu bolesti, već omogućuje razvoj novih terapijskih opcija poput panela za određivanje rizika zaraznih bolesti (69). Cilj jednog velikog, međunarodnog projekta HapMap (<http://www.hapmap.org>) je definirati te SNPove koji su međusobno povezani u alelnoj neravnoteži (engl. *linkage disequilibrium*). U fazi jedan genotipizirano je milijun SNPova u uzorcima iz Nigerije, Europe, Kine i Japana. Faza dva povećala je taj broj na 3,5 milijuna SNPova (67). Već nakon prve faze HapMap projekta sastavljeni su testovi s haplotipnim markerima za populacije, dobili smo uvid u metode optimalnog uzorkovanja, strategiju u dva koraka za provođenje cjelogenomskih studija te koji su najbolji komercijalno dostupni SNP paneli (75, 76). Rezultati su također pokazali da je potrebna veća gustoća SNPova na čipu kako bi se pokrila haplotipna raznolikost afričke populacije u odnosu na europsku, kinesku ili japansku. Razlog tome je veća raznolikost i manje LD regije u afričkoj populaciji, čimbenik koji se pokazao iznimno važnim u primjeni ove tehnologije kod provođenja asocijacijskih studija zaraznih bolesti u Africi (77).

Međutim, upravo potreba za velikim uzorkom komplicira situaciju u ispitivanju zaraznih bolesti. Unatoč visokoj prevalenciji zaraznih bolesti u zemljama u razvoju, zbog ograničenih prihoda, teže je prikupiti 2000 slučajeva tuberkuloze u Sjevernoj Africi, nego 20 000 slučajeva šećerne bolesti u zapadnoj Europi (78). Ipak, provedeno je nekoliko GWAS studija zaraznih bolesti s vrijednim rezultatima. Studija u Gani i Gambiji identificirala je gene na kromosomu 18 značajne za oboljenje od tuberkuloze te gene na kromosomu 2 važne za napredovanje bolesti uzrokovane HIV-om (79). Također je pokazala vezu između jednog od gena lambda interferona s izlučivanjem virusa hepatitisa C i odgovorom na terapiju. GWAS studija za malariju

provedena u Gambiji identificirala je AS varijantu hemoglobina kao statistički značajnu (80). Jedna od najzanimljivijih GWAS studija je svakako ona provedena u Kini vezano za gubu u kojoj je sudjelovalo 4000 bolesnika i 7000 kontrolnih slučajeva što je rezultiralo otkrivanjem pet novih gena (81). Dvije su velike prednosti cjelogenomskih studija povezanosti spram studija gena kandidata. Prvo je mogućnost provedbe istraživanja bez hipoteze (engl. *hypothesis-free study*), a drugo mogućnost otkrivanja gena koji nisu prethodno bili prepoznati u patogenezi bolesti (67, 78, 79, 82).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da učestale i rijetke genetske varijante utječu na osjetljivost za zarazne bolesti (63). Međutim, kako i dalje nemamo točan odgovor na ključno pitanje o genetskoj arhitekturi osjetljivosti za zarazne bolesti, sve se više nade polaže upravo u GWAS studije. Postoje tri predložena gledišta (69). Prva teorija predlaže da su najvažnije genetske varijacije u biti učestale varijante koje onda zbrojno doprinose za većinu genetskih varijanti. To su varijante visoke frekvencije i lako se otkriju GWAS studijama (42). Potpuno suprotno je tumačenje druge teorije koja kaže da su najvažnije genetske varijacije u biti vrlo rijetke nove mutacije s gotovo potpunom penetracijom, kao kod PID. Ovo je teorija koja se najčešće predlaže za zarazne bolesti kod djece. Ideja je potekla iz polja PID gdje su jasno dovedeni u vezu geni kandidati ili rijetke nove mutacije s povećanom obiteljskom sklonosti. Ohrabreni ovim uspjehom za rijetke fenotipove, grupa znanstvenika je predložila da bi upravo monogenska arhitektura čestih gena bila odgovorna za fenotipove učestalih zaraznih bolesti (19). Najnovija i najvjerojatnija je treća teorija koja predlaže da najvažniju ulogu imaju pojedine rijetke varijante s nepotpunom penetracijom, koje općenito gledajući, nisu nove mutacije, ali zbrojno doprinose genetskom udjelu u osjetljivost na zarazne bolesti (83).

Upravo su GWAS otkrile jaku povezanost između polimorfizma gena i osjetljivosti za razvoj uobičajenog fenotipa za zarazne bolesti poput HIV-1-a, hepatitisa B i C, denga groznice, malarije, tuberkuloze, gube, meningokokne i prionske bolesti. Također su potvrdile važnu ulogu varijacija humanog leukocitnog antigena (HLA) za razvoj osjetljivosti spram mnogih, ali ne i svih zaraznih bolesti (84, 85). Istraživanja su također opisala rastući broj rijetkih mutacija jednog jedinog gena koje su povezane s osjetljivosti za uski raspon različitih patogena u inače zdravog pojedinca. Primjeri mutacija za takvu "selektivnu" imunodeficijenciju uključuju: mutacije puta interleukin-12–interleukin-23–interferon- γ (IFN γ) i pojačanu sklonost

mikobakterijskim bolestima; mutacije puta TLR–jezgrin čimbenik- κ B s invazivnom pneumokoknom bolesti; i mutacije puta TLR3–IFN α –IFN β s *Herpes simplex* virusnim encefalitisom (63). Obje, učestale i rijetke varijante mogle bi imati preklapanja za zarazne bolesti u svom molekularnom putu. Ova ideja navela nas je na razmišljanje postoji li zajednička sklonost svim bakterijskim i svim virusnim bolestima ili su neki od tih gena specifični za bolest? Zarazne bolesti su tako različiti entiteti, pa smo si postavili pitanje je li moguće da im se dio imunološkog odgovora preklapa?

1.7. Utjecaj okoliša i međudjelovanje gena

Kako bi bolje razumjeli patogenezu bolesti kroz funkciju gena, potrebno je uključiti dodatne klase bioloških molekula iz skupine 'omika', a sve u cilju shvaćanja razvoja, napredovanja i ishoda bolesti (63, 72). Mreža sustavnih pregleda u kojima bi se uspoređivali za bolest specifični geni i putevi do gena specifičnih za bolest mogla bi biti jedan od rješenja. To bi nas moglo dovesti do otkrića skupina gena odgovornih za pojačanu osjetljivost pojedinca za fenotipsku manifestaciju zarazne bolesti, bez obzira na uzročnika (npr. pneumonija). Usporedba takvih, komplementarnih rezultata i shvaćanja, mogla bi nam omogućiti bolje shvaćanje, a samim time i primjenu u kliničkoj praksi (72).

Većina genetskih varijanti otkrivenih GWAS nalaze se u nekodirajućem dijelu genoma, intronu. Povezivanje takvih varijanti s modulacijom pojedinačnih gena ili putova je ključno za razumijevanje funkcionalne osnove takvih povezanosti, a koji mogu predstavljati potencijalne mete za lijekove. Poznavanje takve mreže značajno bi povećalo vjerojatnost otkrića "ključnog" gena za postizanje najboljeg terapijskog odgovora (86). Već sad postoje brojna istraživanja koja su pokazala genetski doprinos u razvoju novih cjepiva i lijekova. Primjer za to je lijek u terapiji infekcije virusom humane imunodeficijencije (HIV). Genetska istraživanja pokazala su da delecija gena za CCR5 koreceptor značajno smanjuje rizik infekcije HIV-om i stopu progresije bolesti (87). Nedostatak Duffy receptora na eritrocitima pruža gotovo potpunu zaštitu od malarije uzrokovane mikroorganizmom *Plasmodium vivax* te je temelj u proizvodnji cjepiva za ovu zaraznu bolest (88). Genetska istraživanja također su ukazala na ulogu manoza-vezujućeg lecitina i njegovu ulogu u povećanoj osjetljivosti na bakterijske infekcije (89).

Kada govorimo o genetskim varijantama, često zaboravljamo da one ne djeluju same. Za njihov izričaj jako je važan okolišni kontekst isto kao i interakcija s drugim genima. Primjer, pojedinac može nositi genetsku varijantu koja povećava razvoj teškog oblika ptičje gripe A nekoliko stotina puta. Međutim, ako ta ista osoba nikad ne dođe u kontakt s virusom gripe H5N1 ili je ovisan o polimorfizmu nekog drugog gena kako bi isporučio svoj potpuni učinak, onda ova prva "rizična" varijanta uopće neće imati kliničku manifestaciju, tj. važnost (67). Drugi primjer je siromaštvo koje se vezuje uz zarazne bolesti prvenstveno radi okoliša koje podrazumijeva i čimbenika domaćina koji nisu genetski (90). Primjer međudjelovanja dva gena (epistasis) najbolje je opisan kod infekcije HIV-om. Brža progresija HIV infekcije u AIDS bolesnika dokazana je samo kod pojedinaca koji uz alel HLA skupine I gena imaju još određeni receptor NK stanica (KIR) (91). Iz toga zaključujemo kako važnu ulogu u patogenezi zaraznih bolesti imaju čimbenici okoliša uključujući mikrobiološki (patogen), ali i nemikrobiološki (ekološki) te čimbenici domaćina misleći pritom na genetske (kodirani već u zametnoj liniji) i negenetske čimbenike (somaticke ili epigenetske, npr. stečeni imunitet).

Ovo je jedan od mogućih razloga zašto većina objavljenih genetičkih asocijacija nema replikacije. Uz metodološka ograničenja prethodnih studija tu je i sklonosti promatranja gena u izolaciji, a bez razmišljanja o njihovom genetičkom i okolišnim okruženju (92).

Zarazne bolesti, isto kao i brojni drugi fenotipovi, pokazuju povećanu sklonost pojavnosti unutar iste obitelji, tj. veća je frekvencija oboljelih unutar obitelji bolesnog pojedinca, nego kod pojedinaca koji nisu obiteljski vezani (67). Upravo takve studije unutar obitelji mogu nam pomoći u istraživanju količine utjecaja i okolišnih i genetskih čimbenika na razvoj osjetljivosti bolesti. Najčešće se gleda omjer prevalencije bolesti u rodbini bolesnika obzirom na prevalenciju u općoj populaciji (engl. *recurrence risk ratio*). Jako je važno točno definirati istraživani fenotip. Puno je lakše ako je on izražen kao binarna ili dihotomna osobina (npr. prisustvo ili odsutnost meningokokne septikemije), nego u obliku kvalitativnog raspona kliničkog fenotipa (npr. mjera ozbiljnosti infekcije obzirom na oblike liječenja). Upravo su se studije blizanaca pokazale najbolje za potrebe ovakvih istraživanja obzirom da blizanci dijele gene te su izloženi istim okolišnim čimbenicima. Uspoređujući rizik u genetski identičnih monozigotnih blizanaca, s rizikom dizigotnih koji dijele prosječno polovicu genetskog materijala, možemo procijeniti relativni utjecaj gena i okoliša na fenotip bolesti (67). Uistinu,

postoje studije koje su pokazale pojačanu sklonost razvoju zaraznih bolesti kod monozigotnih u odnosu na dizigotne blizance; primjeri uključuju tuberkulozu (93), sinusitis, titar protutijela specifičan za infekciju *Helicobacter pylori*, gubu, veliku genetsku sklonost razvoja akutne i kronične upale srednjeg uha (67, 94). Također, postoje istraživanja koja pokazuju povećanu podudarnost kod monozigotnih blizanaca u ishodima bolesti: status nositelja hepatitis B virusa (95), u odgovoru na cijepljenje, odgovor urođenog imunološkog na infekcijski poticaj (96). Utjecaj genetike utječe i na povećani rizik za infekciju bakterijom *H. pylori* kako je pokazala blizanačka studija koja je uspoređivala blizance odgajane zajedno i odvojeno (97). Iako, obzirom da se blizanci te braća i sestre često odgajaju zajedno, jako je teško zaključiti koliko svemu tome doprinosi genetski utjecaj, a koliki je udio zajedničkog okolišnog kojeg dijele.

1.8. Izolirane otočne populacije

Vrlo zanimljiv model za istraživanje djelovanja okoliša i genetike na pojavnost bolesti su otočne populacije. Jednaka izloženost ekstremima okolišnih čimbenika, sličan način ponašanja, smanjena genetska raznolikost, povećana stopa krvnog srodstva, rijetke migracije (odljev i priljev gena), sve to rezultira niskom okolišnom i genetskom raznolikosti zbog čega su gotovo savršene za biomedicinska i genetička istraživanja. Zbog navedenih čimbenika puno je lakše otkriti povezanost između okolišnih i genetskih rizičnih čimbenika kao i bolesti ljudi koje nije lako otkriti u velikoj populaciji (98). Drugim riječima, razlike nisu posljedica bioloških karakteristika zahvaćene populacije ili uzročnika infekcije, već su posljedica specifičnih uvjeta pod kojima se epidemija događa. Također, da bi statistička snaga bila dovoljno jaka, treba analizirati veliki uzorak DNK jer proučavamo gene s relativno malim učinkom. Snaga otkrivanja povezanosti je funkcija frekvencije alela, a otkrivanje rijetkih varijanti je slabije kada je veličina uzorka ograničena. To je još jedna prednost izoliranih otočnih populacija – ograničenost populacije i genetske strukture povećavaju vjerojatnost uspješnog mapiranja gena (99-102).

Hrvatska biobanka 10.001 Dalmatinac primjer je biobanke izolirane otočne populacije. Naglasak njenog istraživanja je na ispitivanju genetskih temelja složenih bolesti (103, 104). Do sada je uključeno malo više od 4500 ispitanika otočnih populacija (Vis, Korčula) i drugog po

veličini grada u Republici Hrvatskoj, Splita (103). Među vrlo zanimljive rezultate ovog istraživanja treba naglasiti rezultate istraživanja metaboloma, glikoma, raznih antropometrijskih pokazatelja, ali i istraživanja populacijske genetike i strukture. Tako je jedno od temeljnih istraživanja pokazalo kako je u uvjetima dovoljne razine izolacije svaka od analiziranih otočnih populacija bila dovoljno neovisna, da bi se cijeli resurs mogao smatrati meta-populacijom (105). Ova spoznaja pokazala je kako je genetska struktura svake populacije bila dovoljno posebna da ih je bilo moguće razlikovati samo na temelju genetskih podataka. Druga važna implikacije tog istraživanja bila je da je ovo resurs pogodan za istraživanje rijetkih varijanti, jer je očito u ovoj meta-populaciji bio snažan učinak osnivača (engl. *founder effect*). Ovaj učinak temelji se na početnoj populaciji ljudi koji su naselili neki do tada nenaseljen otok. Ukoliko su oni sa sobom donijeli neke rijetke varijante sa snažnim negativnim učinkom, tijekom vremena i generacija ljudi koji su živjeli u relativnoj izolaciji, učestalost rijetkih varijanti mogla je porasti i na taj način povećati šansu da ovakve varijante budu otkrivene (105). Drugi zanimljiv rad vezan uz populacijsku genetiku temeljio se na analizi cijelog genoma (engl. *whole-genome sequencing*) populacije otoka Visa, koja je bila uspoređena s povezanim istraživanjem *Generation Scotland*. Analizirana su 193 ispitanika, među kojima je pronađeno 290.577 rijetkih varijanti (106). Među tim varijantama bilo je 65% rijetkih, a 25.430 ($\approx 9\%$) bilo je novo i prethodno nekatalogizirano; većina novootkrivenih varijanti bile su pojedinačne varijante (engl. *singletons*). Po osobi je prosječno nađeno oko 115 genotipova s varijantama gubitka funkcije (LoF, engl. *lost of function*), od čega ~ 23 u homozigotnom stanju. U usporedbi s rezultatima *Generation Scotland*, zabilježeno je više potencijalno štetnih varijanti u kategorijama niske i zajedničke učestalosti, što je govorilo u prilog snažnom smanjenju veličine populacije u prošlosti otoka Visa i izraženoj genetskoj homogenosti te populacije. Najviše takvih varijanti zabilježeno je u genima uključenima u putove ksenobiotika (pretežito enzimi), uz povećanu učestalost regija homozigotnosti koje su zahvaćale molekularne signalne puteve (106).

Vrlo zanimljiv niz radova vezan je uz razumijevanje uloge N-glikana kao biomarkera vezanih uz pojavu bolesti. Među prvim istraživanjima iz ovog područja svakako treba spomenuti rad u kojem je pokazano kako su glikani vrlo zanimljiv biomarker, koji je pod zajedničkim djelovanjem okoliša i gena te kako je njihova regulacija složena (107). Uslijedili

su radovi u kojima je prikazano kako su glikani zanimljivi u prepoznavanju niza drugih bolesti i stanja, uključujući genetsku regulaciju glikana (108), cjelogenomsku analizu glikana (109), sve do vrlo složene analize mrežne topologije, koja je prikazala kako su glikani iznimno složeni (110). Jedno vrlo zanimljivo istraživanje pokazalo je kako su glikani jako dobar biomarker za praćenje razvoja i dinamike složenih bolesti. U istraživanju su analizirani bolesnici koji boluju od makularne degeneracije (111). Za razliku od dotadašnjih radova, u tom radu je makularna degeneracija bila analizirana kao rani oblik (nediferencirano nakupljanje proteina), jednostrano te konačno dvostrano zahvaćanje. Rezultati su pokazali kako su rani stadiji bolesti obilježeni porastom glikana koji se pojavljuju kao modulatori upalnog odgovora, i to najvećim dijelom kao supresori razine upale. Dvostrano pojavljivanje bolesti obilježavali su glikani koji se nalaze u vrlo izraženim stadijima upale, poput postoperativnih stanja (111). Autori su ovo objasnili na način da glikani odražavaju trenutku situaciju u organizmu te da u ranim stadijima bolesti djeluju u sastavu mehanizama koji pokušavaju regulirati imunološki odgovor. U kasnijim stadijima, kada se takvi protektivni mehanizmi iscrpe, bolest prelazi u nepovratan oblik, obilježen snažnim upalnim odgovorom i izraženim gubitkom funkcije (111).

Vrlo zanimljivo istraživanje napravljeno je na temelju metabolomike i metabolomičkog otiska pojedinca (112). U ovom radu, koji je u tom trenutku bio najveći takav pokušaj analize na globalnoj razini, analizirana su 233 metabolita, uz koje je analiziran i njihova genetska podloga tj. mehanizmi genetske regulacije koji su povezani uz te metabolite. Jedna od zanimljivih spoznaja je bila kako je mjerenje metabolomskog uzorka natašte davalo drugačiji rezultat od uzoraka koji nisu bili prikupljeni na taj način, posebice u domeni lipoproteina (112). Dodatni rezultati pokazali su vrlo složene puteve regulacije metabolita uz izraženi individualizirani učinak, sugerirajući da je svaki ispitanik u izraženom opsegu poseban, unatoč nizu dijeljenih i zajedničkih sličnih metaboličkih puteva (112).

Unatoč ovako širokom opsegu, ovaj resurs do sada nije korišten za znatniji opseg istraživanja zaraznih bolesti, po uzoru na slična istraživanja koja su provedena drugdje (72, 113-117).

1.9. Personalizirana medicina i zarazne bolesti

Razvoj medicine ide u smjeru personaliziranog pristupa. Povezati podatke svakog ispitanika biobanke s njegovim "zdravstvenim kartonom" omogućavajući pristup važnim informacijama u određenom vremenu mogao bi biti prvi korak u razvoju personalizirane medicine. Svjedoci smo rastuće otpornosti na antibiotike i pomalo razočaravajućih podataka o ishodima liječenja septičnih bolesnika. Razvoj novih cjepiva i farmakogenetskih intervencija ostaju među najvažnijim ciljevima genetskih studija osjetljivosti na zarazne bolesti (67). Svjesnost da varijante male frekvencije, ali velikog/snažnog učinka mogu značajno doprinijeti genetskoj raznolikosti za osjetljivost na brojne bolesti među pojedincima, trebala bi povećati zanimanje za definiranje, rano u životu, štetnih varijanti koje su dio naslijeđa svakog pojedinca (118). Ovo čini zarazne bolesti na ljestvici istraživačkog prioriteta, imajući u vidu mobilnost moderne ljudske populacije i stalno mijenjanje prirode patogena. U konačnici, krajnji rezultat bio bi stvaranje baze znanja o zaraznim bolestima, njihovoj patogenezi, za patogen specifične, ali i zajedničke puteve koje pojedinca stavljaju u predisponirajući položaj za razvoj infekcije, razvoj teških oblika bolesti i eventualnog smrtnog ishoda.

Pandemija COVID-19 donijela je neviđenu priliku za bolje razumijevanje mehanizama bolesti. Posebno su istraživani mehanizmi TLR3-IRF7-IFNAR osi, koje uključuje niz mehanizama koji diktiraju težinu zaraze COVID-om (119). S druge strane, u COVIDu je implicirana i poligenska podloga za rizik nastanka bolesti, koja se ogledala u nizu pronađenih varijanti (120). Inicijative *COVID-19 Host Genetics Initiative* predstavlja prvu, globalno koordiniranu metaanalizu usmjerenu na razjašnjenje uloge genetike domaćina u osjetljivosti na SARS-CoV-2 i težini bolesti COVID-19. Fokus tog istraživanja bio je na tri svojstva – izrazito teški oblik kliničke slike (definirana kao potreba za korištenjem intenzivne skrbi ili respiratora), hospitalizacija (koja označava srednji oblik težine kliničke slike) te potvrđena infekcija, kao najblaži i početni oblik tog fenotipa. Prednost ovakve analiza bila je mogućnost razumijevanja dinamike zaraze, koja je mogla stati na bilo kojem od prva dva koraka ili se komplicirati i napredovati prema trećem, najtežem obliku. U konačnici je u istraživanje bilo uključeno gotovo 50,000 ispitanika, uz gotovo 2 milijuna kontrola. Analiza je pokazala 13 lokusa, koji su spadali u četiri široka mehanizma (120). Prvi od njih bio je lokus 3p21.31, u genu LZTFL1. Ovo je bio

najsnažniji signal za teške oblike bolesti, a njegova uloga do sada je bila povezivana s funkcijom epitelnih stanica dišnog sustava i odgovorom na teške oblike oštećenje pluća, a time izgledno i kao jedan od glavnih mehanizama nastanka ARDS-a u COVID-u. Drugi snažan signal dobiven je iz ABO sustava, koji je potvrđen kao važna odrednica sklonosti zaražavanju. Treći signal bio je iz interferonskih puteva, posebice OAS1/2/3 skupine, IFNAR2 i TYK2 (JAK/STAT). Konačno, zabilježen je znatan učinak DPP9, koji je do sada bio poznat kao čimbenik rizika za pojavu pneumonitisa i niza drugih intersticijskih poremećaja (120).

Ovaj rad je promijenio dinamiku istraživanja genetike zaraznih bolesti na tri načina. Prvo, pokazao je kako je moguće provesti standardizirano istraživanje i u uvjetima epidemije u kojima je postojao niz logističkih ograničenja. Drugo, stvorio je prvi set gena koji su bili povezani s rizikom za obolijevanje te konačno omogućio proširivanje fokusa i na druge bolesti (120). Međutim, isto tako je pokazao i kako je niz metodoloških ograničenja u ovakvom pristupu, poput raznolikosti fenotipa koju nije lako uskladiti u raznim studijama i istraživanjima, poput problema definicije zaražavanja, ali i opsega kliničkih simptoma zbog kojih netko može biti primljen na bolničko liječenje. Uz to, u tom radu prikazano je značenje skrivene povezanosti, obrazaca u kojima su analizirani ispitanici članovi užih porodica ili genetski slični, što može dovesti do pojave lažno pozitivnih rezultata i na taj način umanjiti vrijednost ovakvih istraživanja ako se ne kontrolira taj učinak (120).

Sve ove spoznaje jasno govore u prilog potrebi za razvojem resursa koji bi sagledavali sklonost zaraznim bolestima, i to na razini zaražavanja, srednje teških i teških oblika kliničke slike.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi

Glavni ciljevi istraživanja:

1. Provesti cjelogenomsku meta-analizu tri izolirane populacije i procjenu njihovih rizika za česte zarazne bolesti
2. Opisati rijetke genetske varijante i razumjeti kako one doprinose konačnom riziku obolijevanja od zaraznih bolesti

Sporedni ciljevi istraživanja:

Ispitivanje povezanosti gena s osobinama vezanim za infekciju s onima u prethodno provedenim cjelogenomskim analizama

2.2. Hipoteze

1. Cjelogenomska analiza je učinkovit način razumijevanja osobnog rizika za teže oblike zaraznih bolesti
2. Rijetke genetske varijante imaju važnu ulogu u nastanku zaraznih bolesti

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Ispitanici

Uzorak su u ovom istraživanju sačinjavali ispitanici projekta 10.001 Dalmatinac – Hrvatska biobanka. Ovo je najveća istraživačka biobanka u Hrvatskoj, koja predstavlja sveobuhvatni i cjeloviti izvor za istraživanje genetičkih, okolišnih i društvenih odrednica zdravlja i bolesti.

Podaci koje su korišteni u ovom istraživanju bili se vezani za pojavu bakterijskih i virusnih infekcija. Ispitanike smo podijelili u tri skupine (sub-kohorte): Korčula (N=2.833), Vis (N=1.039) i Split (N=1.012). Prve dvije su izolirane otočne populacije, a treća su ispitanici drugog najvećeg grada u Hrvatskoj. Prikupljanje podataka i uzoraka provedeno je kroz nekoliko faza počevši od 2003. do 2014., uz provedbu poštanske ankete na pod-uzorku tijekom 2016. godine.

Projekt je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, a provedeno je u skladu sa smjernicama Helsinške deklaracije. Ispitanici su obaviješteni o pojedinostima i ciljevima istraživanja, a prije samog uključenja u studiju potpisali su informirani pristanak. Obzirom da je dio istraživanja proveden u izoliranim otočnim populacijama pa je postojala opasnost lakšeg prepoznavanja pojedinaca nego u općoj populaciji, primijenjen je postrožen plan prikupljanja osobnih podataka. Glavni istraživač je jedini uključivao ispitanike u istraživanje, jedini je imao pristup prikupljenim podacima i njihovoj pohrani, a sve analize bile su provedene s anonimiziranim podacima.

3.2. Definicija ispitivanih osobina

Ukupno je bilo analizirano 14 fenotipskih svojstava. Glavni podatak u analizi bio je podatak o preboljenoj zaraznoj bolesti, i to kao broja i razlog bolničkog liječenja. Ovaj podatak dobiven je iz anamnestičkog zapisa ili zdravstvenih kartona ispitanika, a zatim je kodiran kao binarne i numeričke varijable.

Binarna grupa sadržavala je podatke o preboljenju pojedinih zaraznih bolesti poput tuberkuloze, upale pluća (pneumonije), hepatitisa ili meningitisa. Druga grupa sadržavala je skupine bolesti šireg opsega poput različitih upala dišnog sustava (uključujući tuberkulozu i upale pluća), upale probavnog sustava (uključujući hepatitis i druge gastrointestinalne bolesti), sistemske upale, bakterijske infekcije (infekcije dišnog sustava i bakterijski meningitis) i virusne infekcije (hepatitis i virusni meningitis). Ova grupa dobivena je kao zbroj pojedinih bolesti, koje su bile grupirane prema organima ili organskim sustavima koje zahvaćaju. U ovu skupinu uvršten je i podatak o apendektomiji i tonsilektomiji (Tablica 1).

Posljednja grupa predstavljala je procjenu opterećenja infekcijama, kao i još dvije osobine dodane naknadno – učestalost godišnjeg oboljenja od obične prehlade i gripe u posljednjih deset godina. Opterećenje infekcijama definirano je kao učestalost preboljenih infekcija do trenutka ispunjavanja upitnika, i izračunato za svakog ispitanika kao

Opterećenje infekcijama = (tuberkuloza *1) + (pneumonija *1) + (hepatitis *1) + (meningitis *1) + (upale dišnog sustava /isključene tuberkuloza i pneumonija/ *1) + (upale probavnog sustava /isključen hepatitis/ *1) + (sistemske upale *1) + (apendektomija *0.5) + (tonzilektomija *0.5)

S obzirom na heterogenu prirodu apendektomije i tonzilektomije, za izračun opterećenja infekcijama njihov doprinos je bio manji od ostalih bolesti. Ispitanicima koji su preboljeli istu zaraznu bolest dva ili više puta opterećenje infekcijama pomnoženo je s koeficijentom 2. Većina ispitanika imala je jednu ili nijednu zaraznu bolest, dok je mali broj njih imao dvije ili više različitih zaraznih bolesti u životu. Odgovori na pitanja vezano za preboljene obične prehlade ili gripe mogao je dobiti četiri moguća odgovora, i to nekoliko puta godišnje/svake godine tijekom posljednjih deset godina; jednom godišnje/nekoliko puta tijekom posljednjih deset godina; manje od jednom godišnje/jednom u posljednjih deset godina; nikad ili gotovo nikad/nikad; svrstali su ispitanike u tri skupine (0 do 3).

3.3. Genotipizacija i imputacija SNPova

DNA je izolirana iz leukocita venske krvi pomoću Nucleon BACC3 kita (Tepnel, Manchester, UK). Za postupak genotipizacije korišten je Illumina HumanHap300 v1 (Vis: 317 509 SNPova; *SNPs, single nucleotide polymorphisms*) i Illumina HumaHap370CNV-Quad (Korčula faza 1: 346.034 SNPova, Korčula faza 2: 719.487 SNPova; Split faza 1: 320.406 SNPova, Split faza 2: 646.888 SNPova). Postupak određivanja genotipa koji pojedinac nosi, tzv. *genotype calling* određen je koristeći GenomeStudio Software v3.0 (Vis, Korčula) ili v3.1 (Split). Svi ispitanici koji su imali stopu određivanja genotipa manju od 95% (Vis) ili 97% (Korčula, Split) bili su isključeni iz analize. Uzorci kod koji je u genomu otkriveno manje od 98% uspješno genotipiziranih markera, kojima je frekvencija rijetke varijante (engl. *minor allele frequency*, MAF) bila ispod 1% i 0.01% za markere egzoma (Korčula, Split) te značajnost Fisherovog testa Hardy-Weinberg ravnoteže (HWE) ispod 10^{-6} su smatrani kao SNPovi loše kvalitete i također su bili isključeni iz daljnje analize. Dodatno, uzorci s prevelikom autosomalnom heterozigotnosti ili nepodudaranjem spola (obzirom na genotip spolnog kromosoma) bili su također isključeni. Konačna veličina uzorka za genotipske podatke iznosila

je 960 ispitanika za Vis, 2.700 za Korčulu i 966 za Split, što je značilo ukupno 4.626 ispitanika u istraživanju.

Podatci o genotipu grupirani su u dvije faze pomoću SHAPEIT v2.r873 (121) i *duohmm* funkcije (122), potom imputirani prema referentnom panelu HRC v1.1 (123) koristeći *Sanger Imputation Service*. Posebno je provedeno rastavljanje u faze i imputacija za svaku genotipsku platformu i sub-kohortu. Isključili smo SNPove koji su imali ocjenu kvalitete imputacije (INFO) ispod 0,4 i monomorfne varijante. Za daljnju analizu preostalo je 12,468.939 SNPova za Vis, 12,383.856 SNPova za Korčulu i 11,400.586 SNPova za Split.

3.4. Statistička analiza

3.4.1. Cjelogenomska analiza povezanosti

Analiza je provedena uzevši u obzir svako istraživano svojstvo i povezanost za dob, spol, godine školovanja (raspon od 0 do 26; osnovnu školu bodovali smo od 0 do 8, srednju školu od 9 do 12, visoko i više obrazovanje više od 13 bodova), socioekonomski status (ukupni zbroj dobara koje svaki ispitanik posjeduje poput vodovoda, grijanje, telefon, kompjuter, itd... bodovano od 0 do 16), broj preboljenih različitih infekcija (kako bi pojačali sklonost pojedinca za infekcije). Godine školovanja i materijalni status su bili pretvoreni u kategoričke varijable (tri kategorije za godine školovanja i četiri kategorije za materijalni status). Podatke koji su nedostajali ubacili smo na temelju vrijednosti medijana ovisno o kohorti, dobi i spolu. Dob smo također kategorizirali u tri skupine (18-39, 40-64, ≥ 65 godina). Kako bi dodatno uzeli u obzir strukturu populacije i povezanost unutar iste, izračunat je i kinship matrix koristeći *ibs* funkciju iz GenABEL R paketa (124).

Za binarne varijable korištena je logistička regresija, a za numeričke linearna regresija. U oba slučaja modeli su izrađeni s pretpostavkom aditivnog učinka, uz reziduale izračunate *polygenic* funkcijom u programu GenABEL R (124). Sve analize povezanosti napravljene su koristeći RegScan v2.0 program (125). Zbrojna statistika (veličina učinka, standardna pogreška i *P*-vrijednosti) za svaku skupinu prilagođene su metodom genomske kontrole temeljem GRAMMAR-gamma čimbenika (126) (genomski inflacijski čimbenik lambda i nepristrana procjena koeficijenta regresije) pomoću *polygenic* funkcije paketa GenABEL R kako bi uzeli u obzir povezanost i stratifikaciju unutra populacije.

3.4.2. Meta-analiza

Prije same meta-analize, zbrojna GWAS statistika je filtrirana pomoću protokola za kontrolu kvalitete (*engl. quality control*, QC) programom EasyQC Software v9.2 (127). Isključeni su SNPovi koji nisu imali uparene alele u sve tri skupine, uz *fixed inverse-variance* meta-analizu koristeći METAL program verzija 2011-03-25 (128). Prag koji je označavao cjelogenomsku značajnost definiran je kao $3,57 \times 10^{-9}$ (standardni GWAS prag je 5×10^{-8} podijeljen s brojem analiziranih svojstava), ali tek nakon što smo napravili Bonferronijevu korekciju budući da su neke za infekciju vezane osobine bile visoko povezane (npr. respiratorne infekcije i pneumonija).

Udio varijance za svaki otkriveni SNP izračunate je prema navedenoj formuli (gdje β predstavlja β koeficijent, MAF je učestalog minor alela, *phvar* je fenotipska varijanta) (129):

$$\text{Fenotipska varijanca} = \beta^2 * ((2 * \text{MAF} * (1 - \text{MAF})) / \text{phvar})$$

Fenotipska varijanca izračunata je temeljem reziduala prilagođenih za kovarijante. Individualna varijanta za svaki SNP je dodana kako bi dobili ukupni udio fenotipske varijante objašnjene za sve otkrivene SNPove za svaku osobinu povezanu sa infekcijom, i to u zoni od 500 kb oko vodećeg SNP-a, korištenjem HaploReg v4.1 (<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) (130) i Bioconductor biomaRt R paket v2.36.1. (131, 132). Prethodno povezani SNPovi određeni su alatom PhenoScanner v1. (<http://www.phenoscaner.medschl.cam.ac.uk/>) (133), i to na način da su veze s pragom *P*-vrijednosti 0.05 uključivale i r^2 od 0.8.

3.4.3. Analiza genetskih puteva (*Pathway analysis*)

Analizu samog genetskog puta/postupka proveli smo koristeći javno dostupan alat STRING v10.5 (<https://string-db.org/>) (134). Kako bi stvorili mrežu, korištene su ove postavke: najmanja potrebna vrijednost interakcije za srednju povjerljivost od 0.4, uz pojačivače analize (funkcionalne) za Gene Ontologies (GO) i Keggove puteve također koristeći STRING v10.5 s mogućnosti *Analysis* i objavili smo najznačajniji put s FDR ispod 1% s minimumom od pet gena iz mreže. Mreže smo predočili upotrijebivši Cytoscape v3.7.2 (135) uključivši se s GeneMANIA v3.5.1. (136, 137).

4. REZULTATI

U istraživanje je bilo uključeno 4.624 ispitanika (Tablica 1). U svim ispitanim skupinama bilo je više žena (ukupno 61,79%), ali statistički značajna razdioba po spolu pokazala se jedino za Korčulu i Vis ($P=0,010$). Najveći broj ispitanika po dobi pripadao je srednjoj životnoj dobi (od 40 do 64 godine), s medijanom oko 55 godina (Tablica 1). Srednju školu završila je polovica ispitanika (50.76%), a najmanje ih je imalo visoko ili više obrazovanje (24,09%), uz značajne razlike po kohortama ($P<0,001$; Tablica 1).

Tablica 1. Demografske i fenotipske osobine ispitivane populacije

	Vis (n=960)	Korčula (n=2.698)	Split (n=966)	Ukupno (n=4.624)	<i>P</i> *
Spol, ženski; n (%)	558 (58,12)	1712 (63,45)	587 (60,77)	2857 (61,79)	0,010 ^{KV}
Dob (godina); medijan (IQR)	56 (24,00)	55 (23,00)	52 (21,00)	55 (22,25)	<0,001 KV, KS, VS
Godine školovanja; n (%)					
<i>Osnovna škola [0-8]</i>	390 (40,63)	711 (26,35)	62 (6,42)	1163 (25,15)	<0,001 KV, KS, VS
<i>Srednja škola [9-12]</i>	413 (43,02)	1461 (54,15)	473 (48,96)	2347 (50,76)	
<i>Fakultet [≥13]</i>	157 (16,35)	526 (19,50)	431 (44,62)	1114 (24,09)	
Socioekonomski status; n (%)					
<i>1 kvartila [0-8]</i>	350 (36,46)	662 (24,54)	134 (13,87)	1146 (24,78)	<0,001 KV, KS, VS
<i>2 kvartila [9-10]</i>	254 (26,46)	769 (28,50)	200 (20,70)	1223 (26,45)	
<i>3 kvartila [11-12]</i>	224 (23,33)	737 (27,32)	301 (31,16)	1262 (27,29)	
<i>4 kvartila [≥13]</i>	132 (13,75)	530 (19,64)	331 (34,27)	993 (21,48)	
Zarazne bolesti: broj; n (%)					
<i>Nijedna</i>	576 (60,00)	1677 (62,16)	622 (64,39)	2875 (62,18)	0,114
<i>Jedna</i>	293 (30,52)	752 (27,87)	277 (28,68)	1322 (28,59)	
<i>Dvije</i>	77 (8,02)	231 (8,56)	61 (6,31)	369 (7,98)	
<i>Tri</i>	11 (1,15)	33 (1,22)	6 (0,62)	50 (1,08)	
<i>Četiri</i>	3 (0,31)	5 (0,19)	NM	8 (0,17)	
Ponavljajuća pneumonija; n (%)	9 (0,94)	16 (0,59)	1 (0,10)	26 (0,56)	0,047 ^{VS}

Tablica 1. Demografske i fenotipske osobine ispitivane populacije, nastavak

	Vis (n=960)	Korčula (n=2.698)	Split (n=966)	Ukupno (n=4.624)	P*
Zarazne bolesti; n (%)					
<i>Tuberkuloza</i>	12 (1,25)	16 (0,59)	6 (0,62)	34 (0,74)	0,110
<i>Pneumonija</i>	105 (10,94)	235 (8,71)	27 (2,80)	367 (7,94)	<0,001 KS, VS
<i>Hepatitis</i>	26 (2,71)	30 (1,11)	20 (2,07)	76 (1,64)	0,002 ^{KV}
<i>Meningitis</i>	7 (0,73)	16 (0,59)	7 (0,73)	30 (0,65)	0,854
<i>Infekcije dišnog sustava</i>	161 (16,77)	535 (19,83)	111 (11,49)	807 (17,45)	<0,001 KS, VS
<i>Infekcije probavnog sustava</i>	39 (4,06)	55 (2,04)	33 (3,42)	127 (2,75)	0,002 ^{KV}
<i>Sistemske infekcije</i>	26 (2,71)	36 (1,33)	25 (2,59)	87 (1,88)	0,005 KV, KS
<i>Bakterijske infekcije</i>	186 (19,38)	571 (21,16)	134 (13,87)	891 (19,27)	<0,001 KS, VS
<i>Virusne infekcije</i>	74 (7,71)	66 (2,45)	42 (4,35)	182 (3,94)	<0,001 KV, KS, VS
<i>Apendektomija</i>	69 (7,19)	169 (6,26)	74 (7,66)	312 (6,75)	0,273
<i>Tonzilektomija</i>	168 (17,50)	491 (18,20)	160 (16,56)	819 (17,71)	0,517
Opterećenje zaraznim bolestima					
<i>0</i>	576 (60,00)	1677 (62,16)	622 (64,39)	2875 (62,18)	0,001 KS, VS
<i>0,5</i>	151 (15,73)	385 (14,27)	168 (17,39)	704 (15,22)	
<i>1</i>	149 (15,52)	388 (14,38)	116 (12,01)	653 (14,12)	
<i>1,5</i>	41 (4,27)	164 (6,08)	38 (3,93)	243 (5,25)	
<i>2</i>	26 (2,71)	48 (1,78)	19 (1,97)	93 (2,01)	
<i>2,5</i>	8 (0,83)	22 (0,81)	2 (0,21)	32 (0,69)	
<i>3</i>	8 (0,83)	7 (0,26)	1 (0,10)	16 (0,35)	
<i>3,5</i>	1 (0,11)	3 (0,11)	0	4 (0,09)	
<i>4</i>	0	4 (0,15)	0	4 (0,09)	

Tablica 1. Demografske i fenotipske osobine ispitivane populacije, nastavak

	Vis (n=960)	Korčula (n=2.698)	Split (n=966)	Ukupno (n=4.624)	P*
Učestalost prehlade					
Nekoliko puta godišnje	67 (27,46)	160 (20,75)	NM	227 (22,36)	0,274
Jednom godišnja	83 (34,01)	305 (39,56)	NM	388 (38,23)	
Manje od jednom godišnje	67 (27,46)	229 (29,70)	NM	296 (29,16)	
Nikad ili gotovo nikad	27 (11,07)	77 (9,99)	NM	104 (10,25)	
Učestalost gripe u posljednjih 10 godina					
Svake godine	9 (4,57)	16 (2,44)	NM	25 (2,93)	0,857
Nekoliko puta	48 (24,37)	178 (27,18)	NM	226 (26,53)	
Jednom	57 (28,93)	180 (27,48)	NM	237 (27,82)	
Nikad	83 (42,13)	281 (42,90)	NM	364 (42,72)	

* *post-hoc* usporedbe (K – Korčula; V – Vis; S – Split); IQR – interkvartilni raspon; NM – nije moguće izračunati.

Analiza broja preboljelih zaraznih bolesti pokazala je da više od pola ispitanika nije preboljelo niti jednu zaraznu bolest koja je zahtijevala bolničko liječenje (62,18%). Od onih koji jesu, najveći broj ih je prebolio samo jednu infekciju, a najveći broj preboljenih infekcija po ispitaniku je četiri; i tu nismo pokazali nikakvu značajnu razliku među skupinama. Za razliku od broja ponavljajućih upala pluća gdje je postojala statistički značajna razlika za kohorte Split i Vis ($P=0,047$). U Splitu je najmanji broj ispitanika imao ponavljajuće upale pluća (0,10%), a najviše ih je imalo na Visu (0,94%; Tablica 1). Zarazne bolesti uzrokovane bakterijama bile su najzastupljenije s postotkom od 19,27% u svim kohortama. Malo iza njih slijedili su slučajevi zaraznih bolesti dišnog sustava (17,45%) te upala pluća (7,94%). Rezultati su bili statistički značajni za kohorte Korčula-Split i Vis-Split ($P<0,001$).

Ispitanicima otočnih populacija naknadno je poslan još jedan upitnik koji je, između ostalog, ispitivao godišnju učestalost obične prehlade i učestalost oboljenja od gripe u posljednjih deset godina. Najveći broj ispitanika je jednom godišnje ili manje prebolio običnu prehladu, a gripu nikad ili jednom u posljednjih deset godina te nije bilo statističke razlike među skupinama (p -vrijednost 0.274 za običnu prehladu; p -vrijednost 0.857 za gripu).

Rezultati cjelogenomske meta-analize za sve tri subkohorte pokazale su 29 značajnih rezultata (na razini $P < 3,57 \times 10^{-9}$), od toga šest lokusa za hepatitis, osam za meningitis, sedam lokusa za sistemske infekcije i sedam za tuberkulozu (Tablica 2). Samo jedan lokus bio je sugestivan za pneumoniju. Od 29 otkrivenih lokusa, 19 ih je bilo smješteno unutar nekodirajućeg dijela gena – introna, a samo jedan je bio *missense* (za tuberkulozu; Slika 1 i 2).

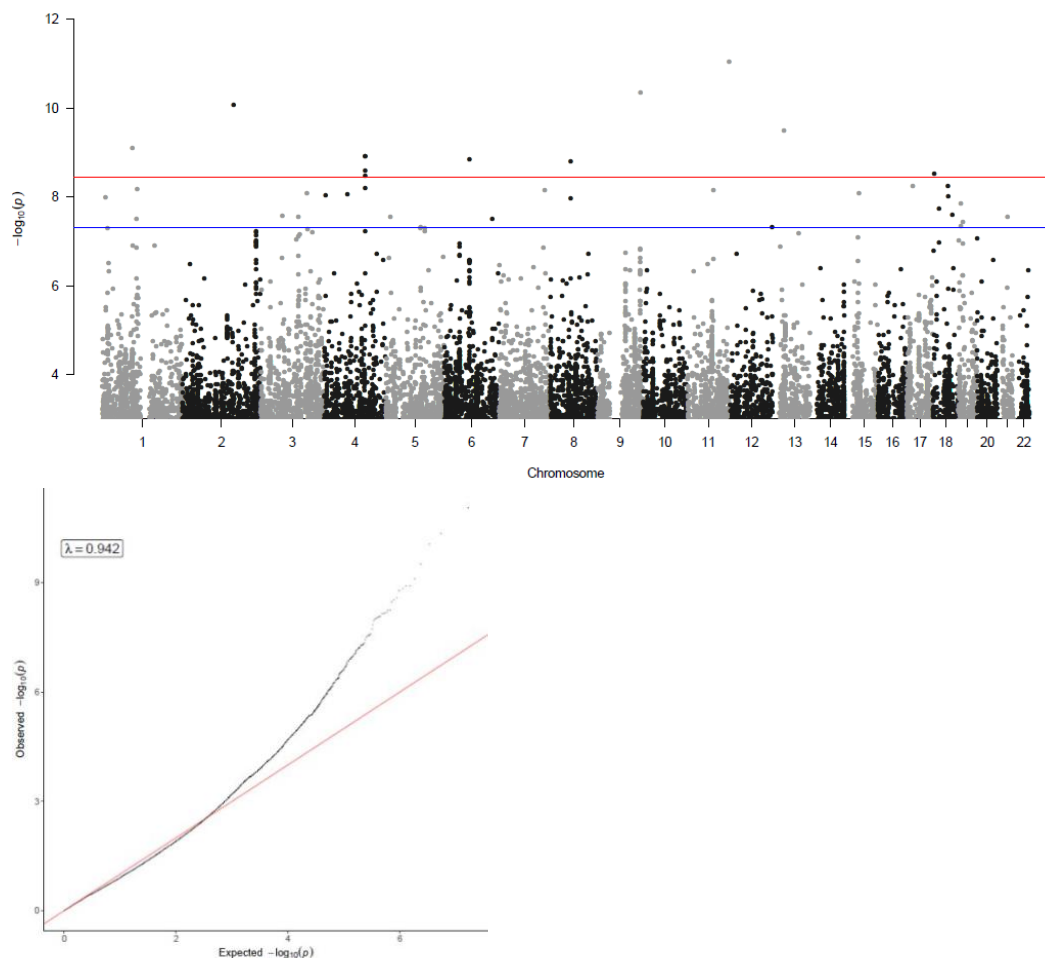
Tablica 2. Značajni rezultati GWA meta-analiza (filtrirani za vodeće SNP-ove unutar $\pm 500\text{kb}$ veličine baza, Bonferronijeva korekcija značajna $P < 3,57 \times 10^{-9}$ ili sugestivna $P < 5 \times 10^{-8}$, heterogenost $P > 0.05$, s istim smjerom učinka, varijante povezane s protein kodirajućim genima, varijante prisutne u meta-analizama za sve tri sub-kohorte [N=4,624]).

Osobina	SNP	Lokacija	Aleli*	OR (95% CI)	P	Gen	Tip varijante
Hepatitis	rs188290902	11:131868501	G/A	1,13 (1,09-1,16)	9,05E-12	<i>NTM</i>	intron
	rs72936092	2:159097061	A/G	1,16 (1,11-1,20)	8,68E-11	<i>CCDC148</i>	intron
	rs17077736	13:33251708	A/G	1,06 (1,04-1,08)	3,19E-10	<i>PDS5B</i>	intron
	rs34447953	1:94730687	A/C	1,12 (1,08-1,15)	7,99E-10	<i>ARHGAP29</i>	intron
	rs78111295	4:126203327	T/C	1,04 (1,03-1,06)	1,21E-09	<i>FAT4</i>	uzvodno
	rs145607180	18:3452913	T/C	1,15 (1,10-1,19)	2,97E-09	<i>TGIF1</i>	intron
Meningitis	rs13358188	5:155325029	G/A	1,10 (1,08-1,13)	8,46E-13	<i>SGCD</i>	intron
	rs17587821	1:226820605	C/T	1,06 (1,04-1,08)	4,14E-12	<i>ITPKB</i>	3'-UTR
	rs189257688	2:204544219	T/C	1,06 (1,04-1,07)	1,31E-11	<i>CD28</i>	uzvodno
	rs188530871	15:76781806	T/C	1,08 (1,06-1,10)	7,57E-11	<i>SCAPER</i>	intron
	rs61878814	11:32119462	C/T	1,05 (1,03-1,06)	1,41E-10	<i>RCN1</i>	intron
	rs116886525	11:116671391	T/C	1,09 (1,06-1,12)	2,29E-10	<i>APOA5</i>	uzvodno
	rs35608792	1:8450425	G/A	1,04 (1,03-1,05)	4,87E-10	<i>RERE</i>	intron
	rs116306652	1:181673900	T/G	1,05 (1,04-1,07)	1,46E-09	<i>CACNA1E</i>	intron
Pneumonija	rs187624194	12:7775204	C/T	1,15 (1,10-1,20)	2,15E-08	<i>APOBEC1</i>	nizvodno
Sistemska infekcija	rs146072725	11:77519509	T/C	1,13 (1,09-1,16)	7,50E-13	<i>RSF1</i>	intron
	rs142441889	20:16052044	T/G	1,13 (1,09-1,17)	1,63E-10	<i>MACROD2</i>	nizvodno
	rs76931343	5:119876729	G/A	1,14 (1,10-1,18)	3,70E-10	<i>PRR16</i>	intron
	rs58219087	19:48061409	C/T	1,20 (1,14-1,26)	7,57E-10	<i>ZNF541</i>	uzvodno
	rs138336976	2:234090697	A/G	1,10 (1,07-1,12)	1,26E-09	<i>INPP5D</i>	intron
	rs192437130	2:85840200	T/C	1,21 (1,15-1,27)	1,34E-09	<i>USP39</i>	intron
	rs6565193	16:30600260	C/T	1,05 (1,04-1,07)	2,38E-09	<i>ZNF785</i>	uzvodno

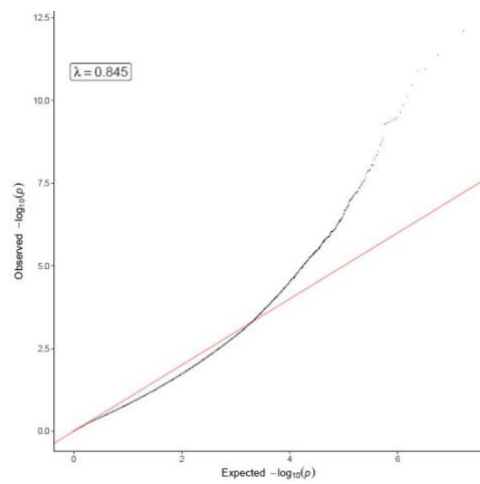
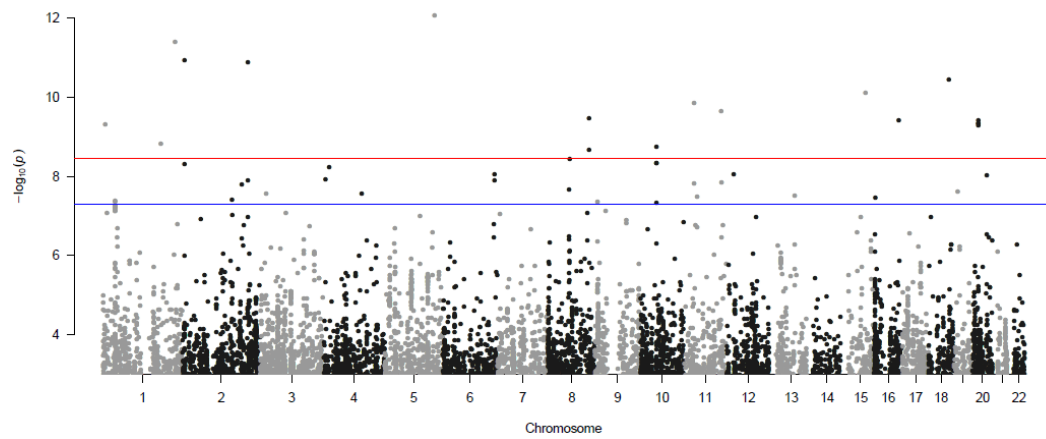
Tablica 2. Značajni rezultati GWA meta-analiza, nastavak

Osobina	SNP	Lokacija	Aleli*	OR (95% CI)	P	Gen	Tip varijante
Tuberkuloza	rs554596237	9:6953063	G/T	1,09 (1,07-1,12)	2,06E-11	<i>KDM4C</i>	intron
	rs145254894	14:24683304	A/C	1,07 (1,05-1,09)	1,17E-10	<i>MDPI</i>	missense
	rs570545343	5:65171990	A/G	1,06 (1,04-1,07)	1,24E-10	<i>NLN</i>	nizvodno
	rs117768315	12:47562000	A/G	1,06 (1,04-1,07)	1,48E-10	<i>PCED1B</i>	intron
	rs182320411	19:45821257	A/G	1,08 (1,05-1,10)	9,69E-10	<i>CKM</i>	intron
	rs140511699	8:102628803	C/A	1,07 (1,05-1,10)	2,37E-09	<i>GRHL2</i>	intron
	rs140782448	8:100743166	C/T	1,10 (1,07-1,13)	2,99E-09	<i>VPS13B</i>	intron

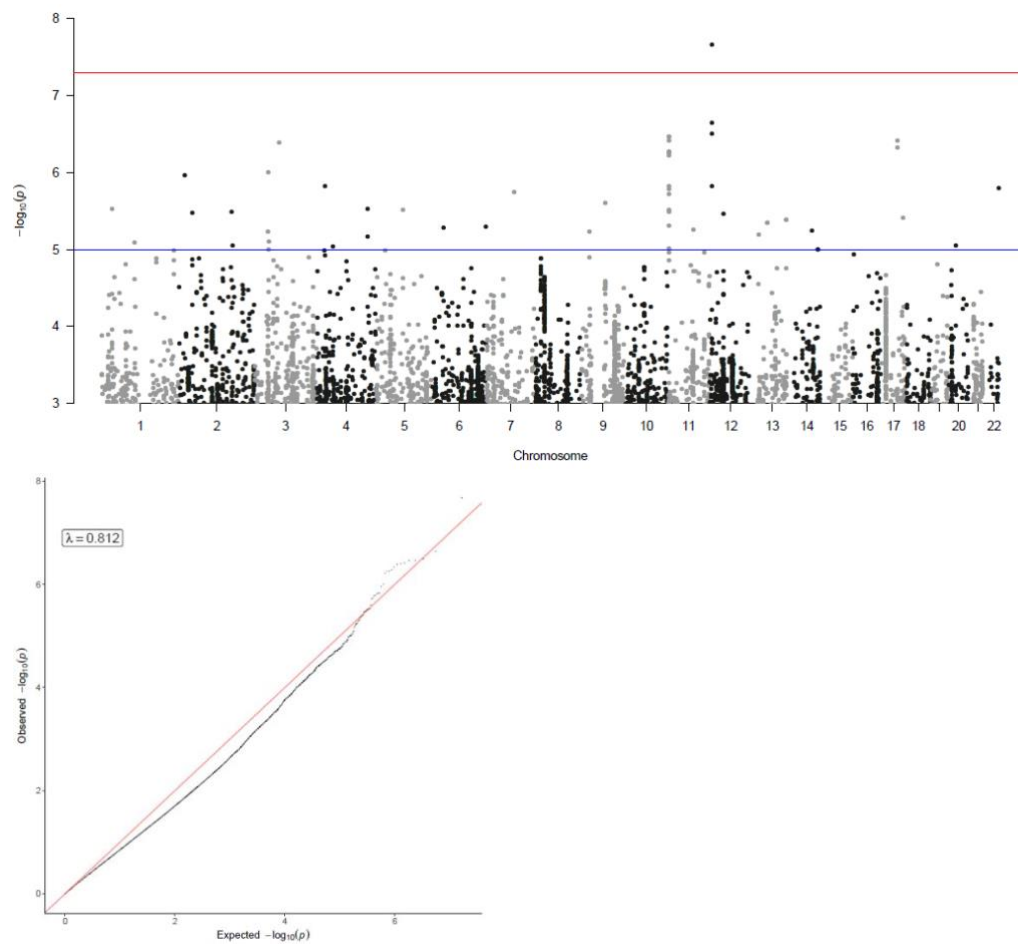
Slika 1. Manhattan i QQ grafovi za pet ispitivanih osobina/zaraznih bolesti sa značajnim rezultatima nakon provedene cjelogenomske meta-analize s varijantama prisutnim u meta-analizi za sve tri sub-kohorte [N=4 624] (crvena linija naznačena u Manhattan grafu predstavlja Bonferronijevu korekciju za cjelogenomski značajan prag od $3,57 \times 10^{-9}$, a plava linija predstavlja sugestivan prag 5×10^{-8} ; u QQ grafu λ predstavlja genomski čimbenik inflacije). Izvor autor.



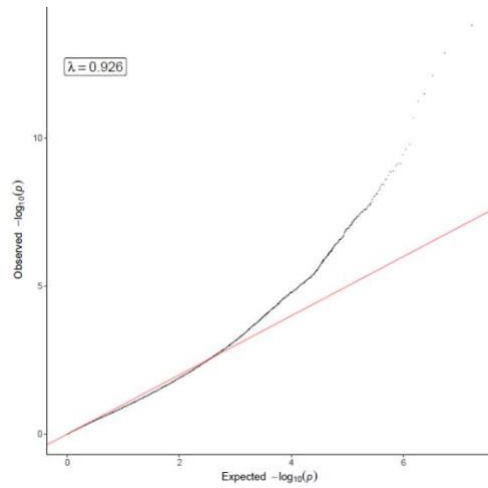
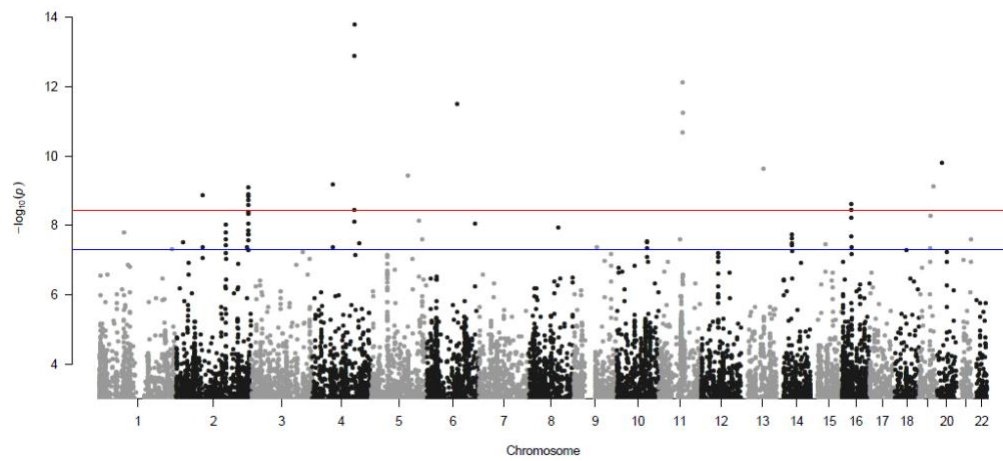
a) Hepatitis



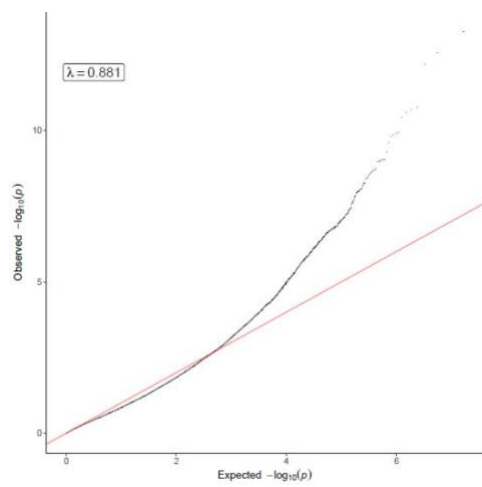
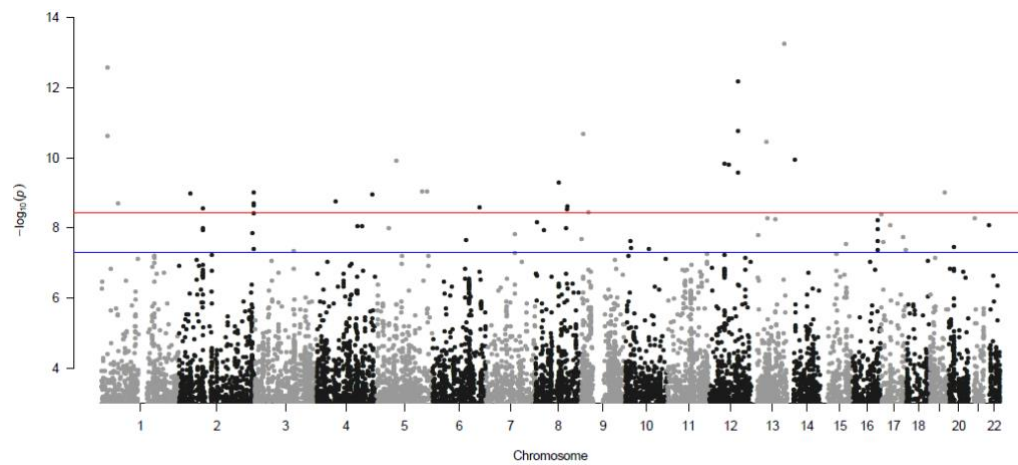
b) Meningitis



c) Pneumonija

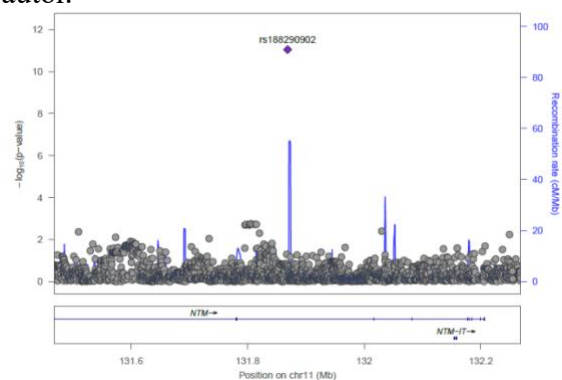


d) Sistemske infekcije

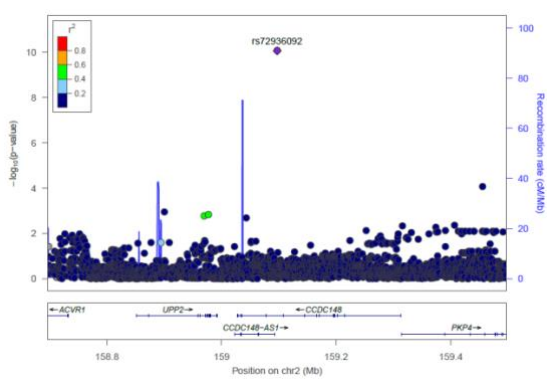


e) Tuberkuloza

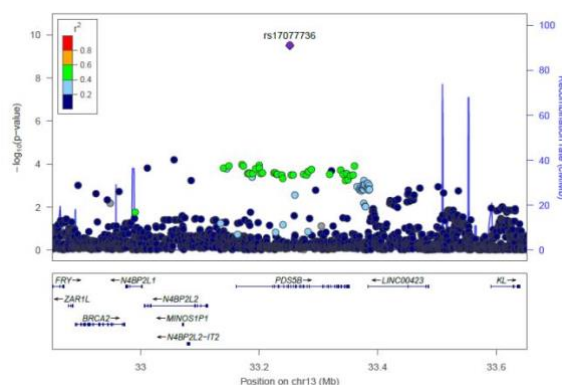
Slika 2. Regionalni LD graf značajnih lokusa povezanih sa zaraznim fenotipovima. Izvor autor.



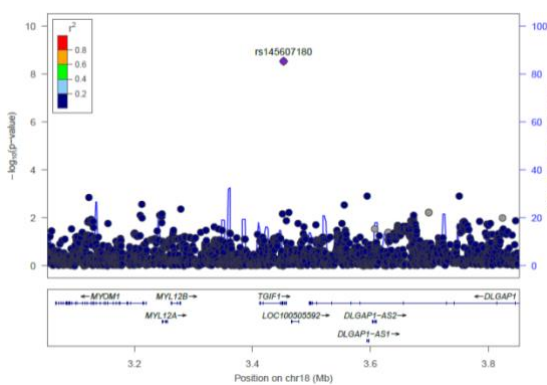
Hepatitis: rs188290902



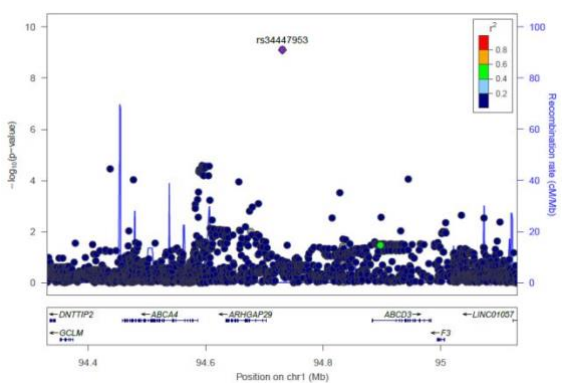
Hepatitis: rs72936092



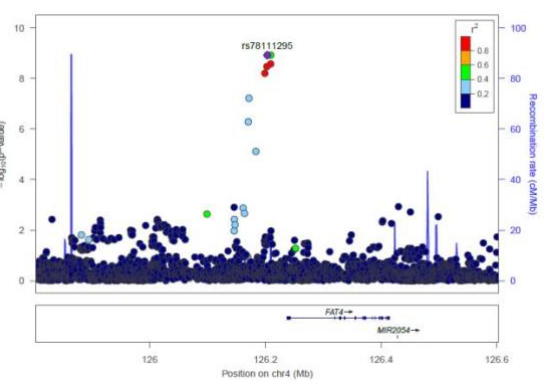
Hepatitis: rs17077736



Hepatitis: rs145607180

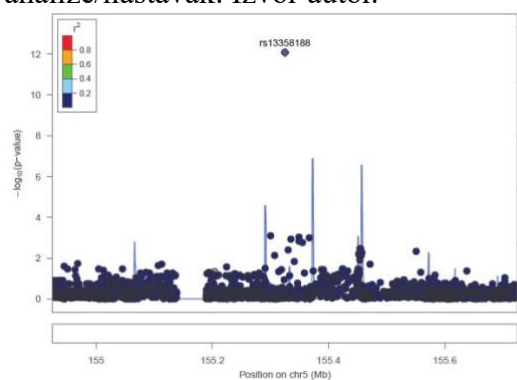


Hepatitis: rs34447953

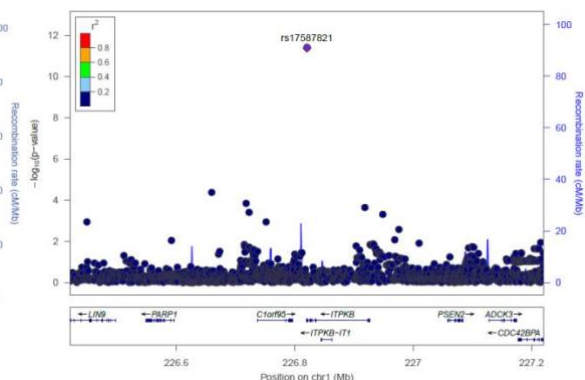


Hepatitis: rs78111295

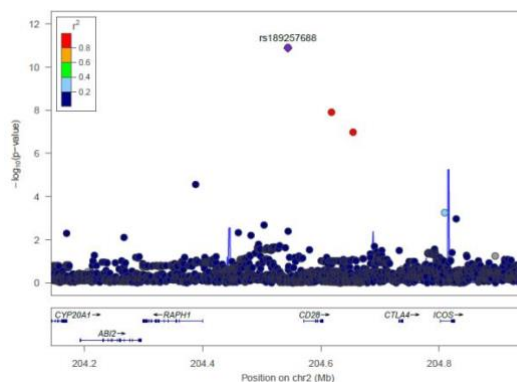
Slika 2. Regionalni LD graf značajnih lokusa povezanih s infekcijom nakon GWA meta-analize/nastavak. Izvor autor.



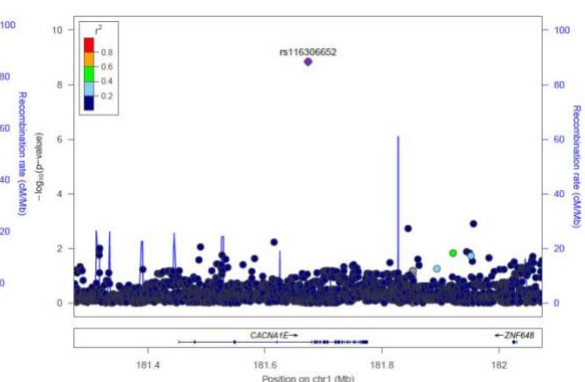
Meningitis: rs13358188



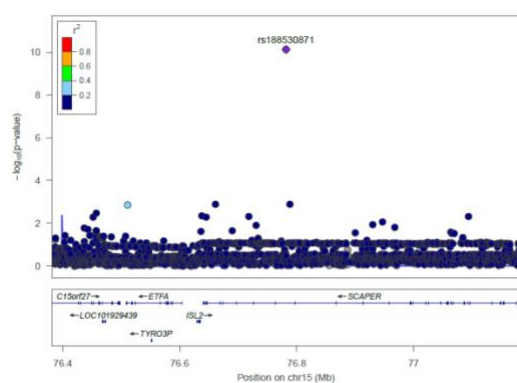
Meningitis: rs17587821



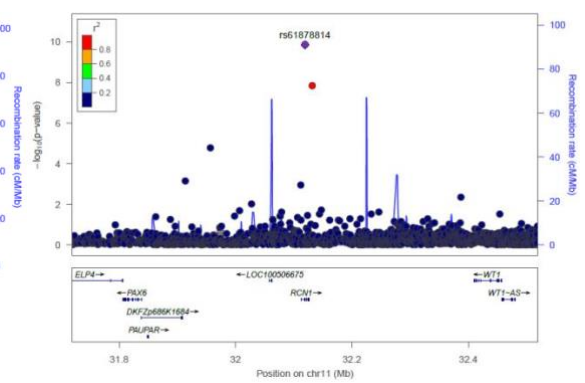
Meningitis: rs189257688



Meningitis: rs116306652

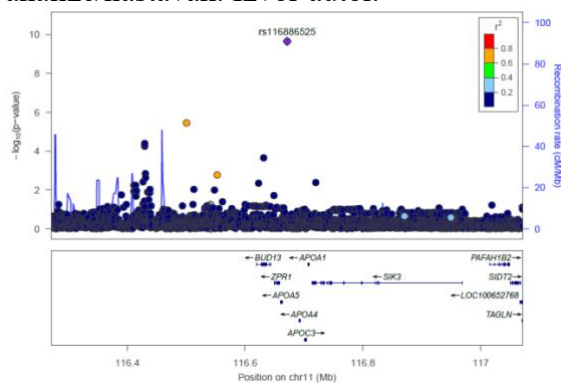


Meningitis: rs188530871

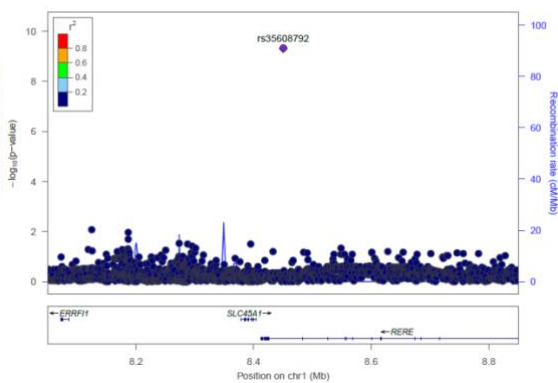


Meningitis: rs61878814

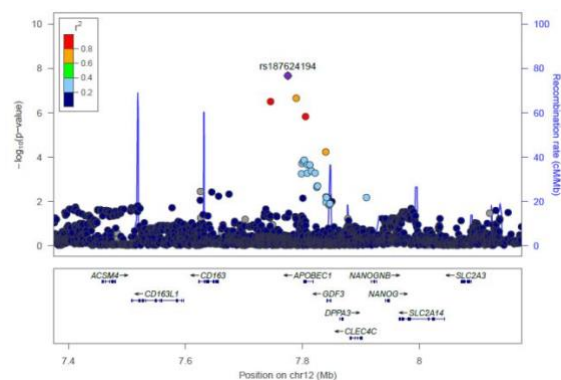
Slika 2. Regionalni LD graf značajnih lokusa povezanih s infekcijom nakon GWA meta-analize/nastavak. Izvor autor.



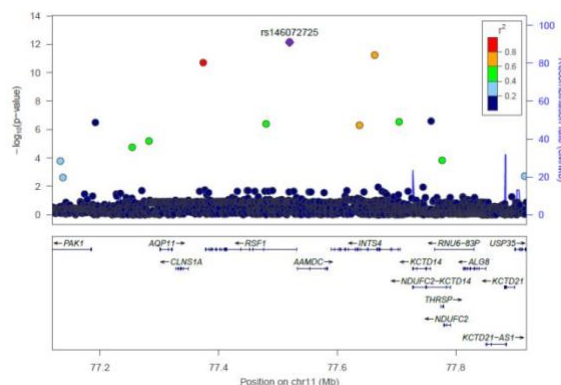
Meningitis: rs116886525



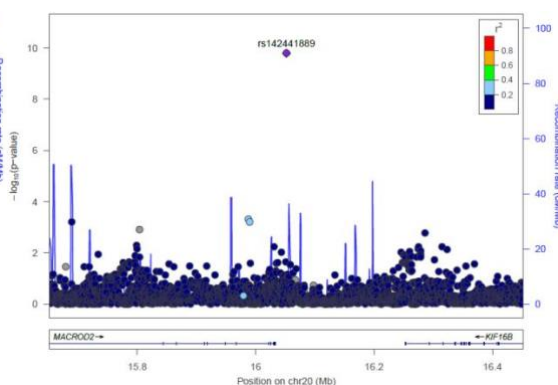
Meningitis: rs35608792



Pneumonija: rs187624194

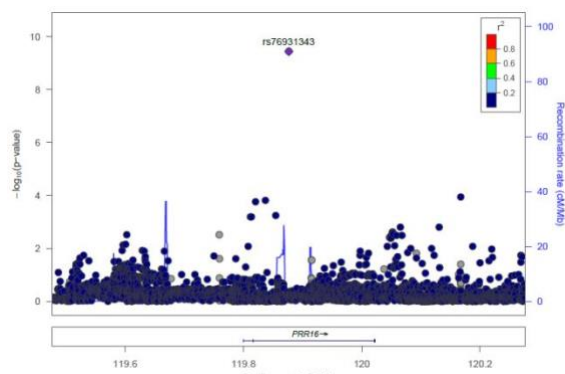


Sistemske infekcije: rs146072725

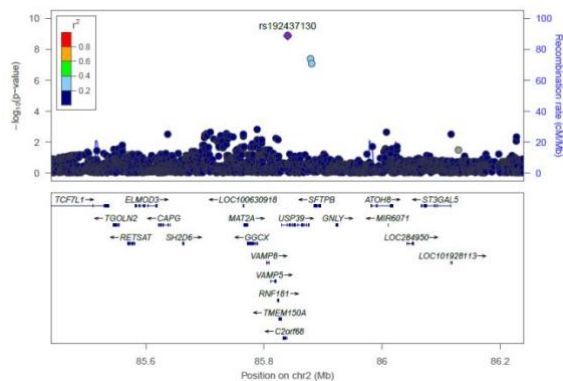


Sistemske infekcije: rs142441889

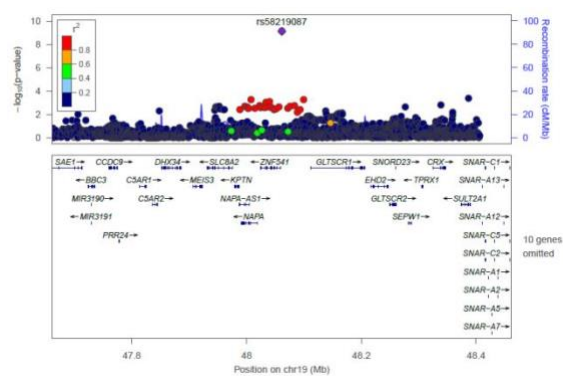
Slika 2. Regionalni LD graf značajnih lokusa povezanih s infekcijom nakon GWA meta-analize/nastavak. Izvor autor.



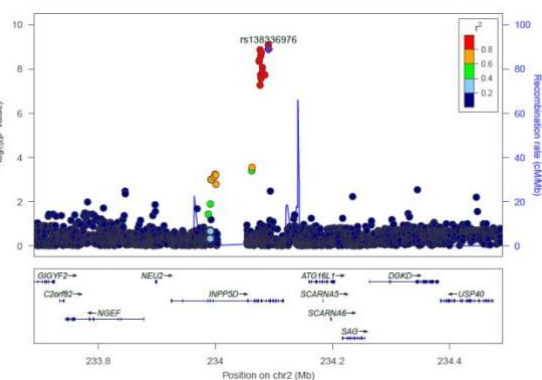
Sistemske infekcije: rs76931343



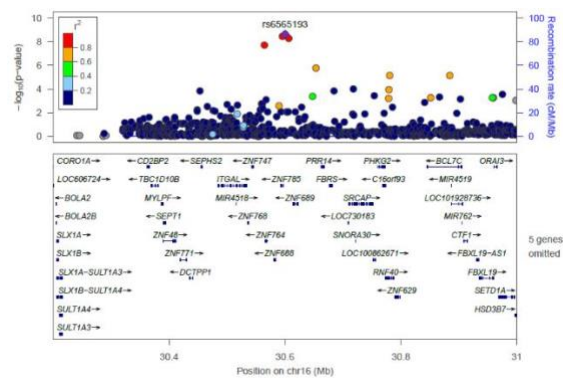
Sistemske infekcije: rs192437130



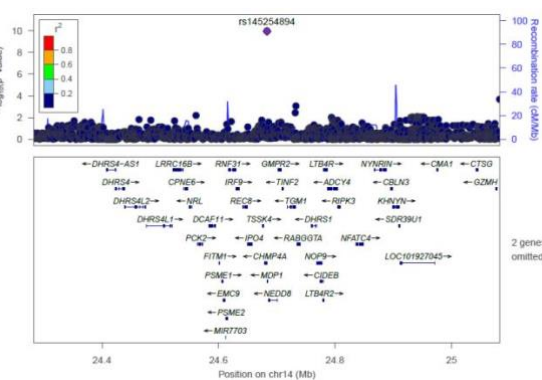
Sistemske infekcije: rs58219087



Sistemske infekcije: rs138336976

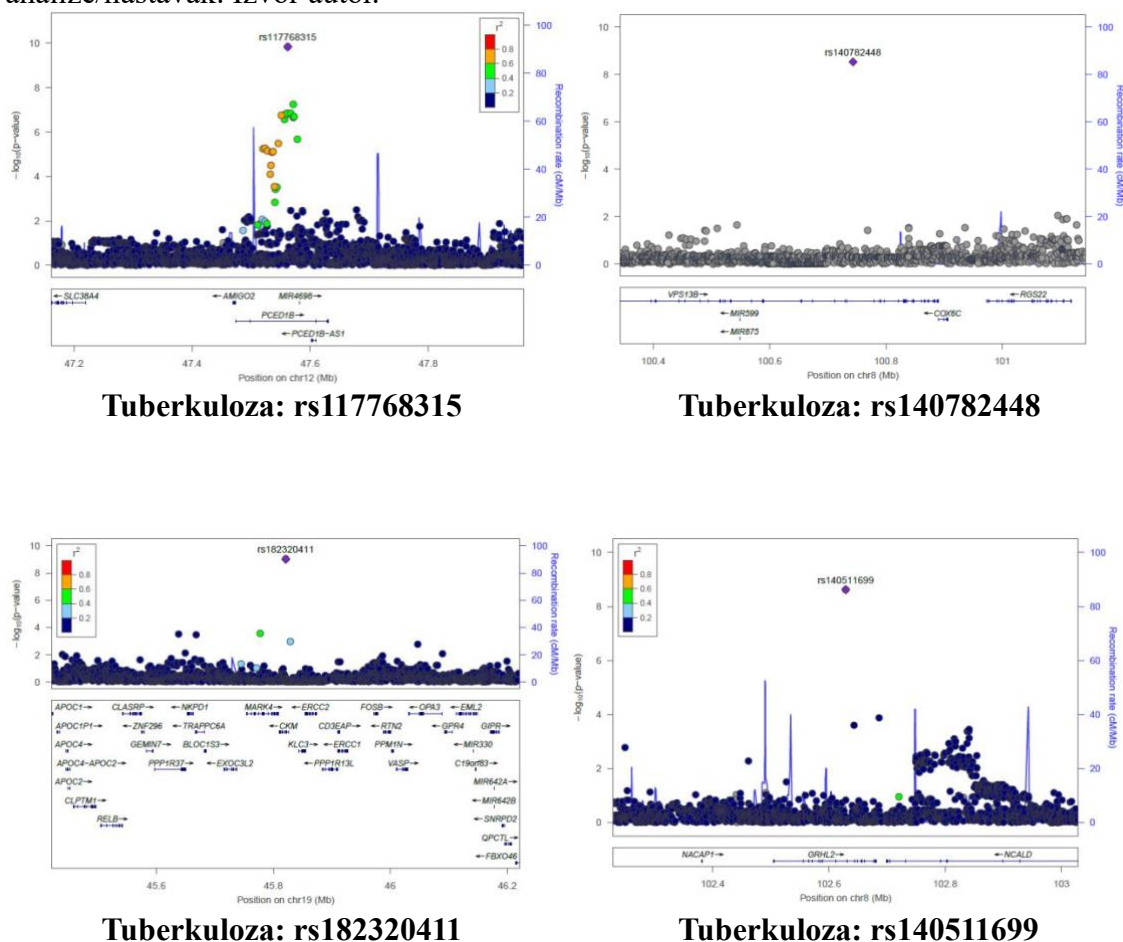


Sistemske infekcije: rs6565193

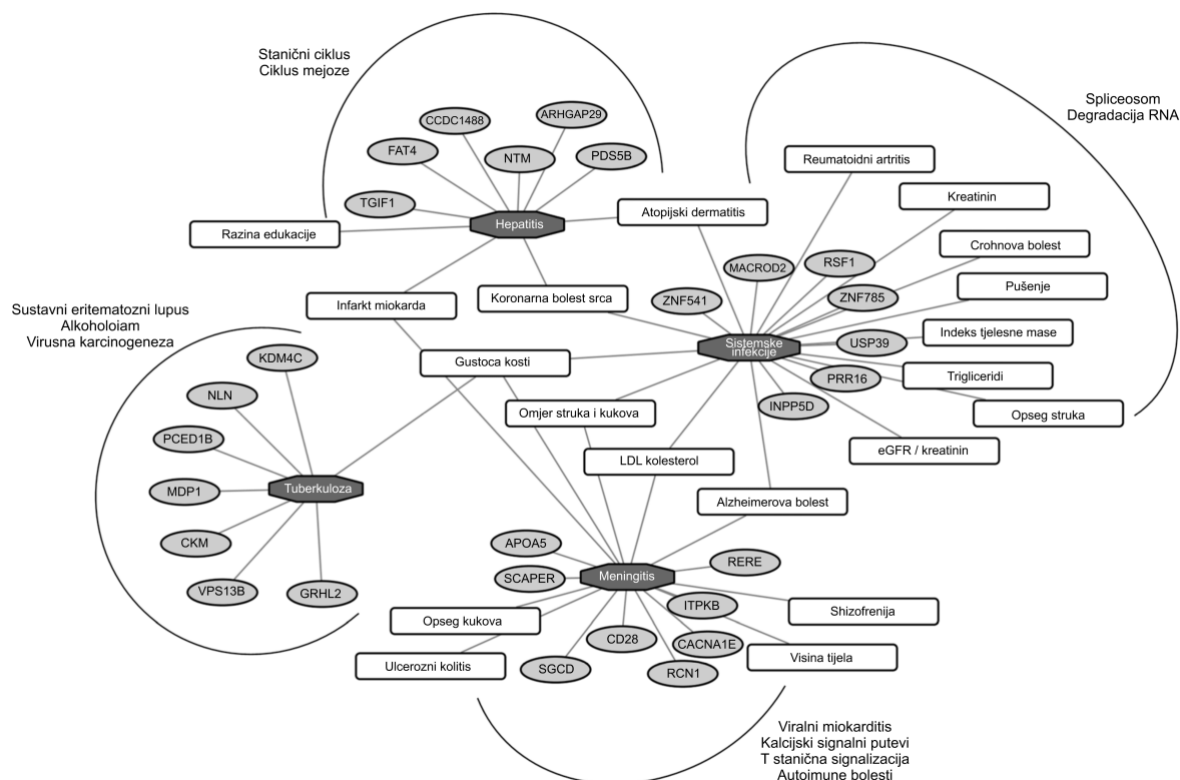


Tuberkuloza: rs145254894

Slika 2. Regionalni LD graf značajnih lokusa povezanih s infekcijom nakon GWA meta-analize/nastavak. Izvor autor.



Analiza pleiotropskih mreža lokusa iz prethodnog koraka ukazala je na niz zanimljivih rezultata, od kojih se izdvajaju povezanost hepatitisa s raznim metaboličkim bolestima i elementima staničnog ciklusa, sustavnih infekcija s regulacijom stanice i nizom bolesti koje zahvaćaju jedan ili više organskih sustava, meningitisa s drugim viralnim bolestima, regulacijom kalcija, signalim putevima i autoimunim bolestima te tuberkuloze sa sistemskim lupusom, alkoholizmom i viralnim bolestima (Slika 3).



Slika 3. Pleiotropska mreža otkrivenih lokusa (svijetlo sivi ovali) za različite zarazne bolesti/ispitivane osobine (tamno sivi osmerokuti) nakon provedene cjelogenomske meta-analize. Povezani rezultati s različitim složenim osobinama drugih objavljenih GWA studija su prikazane u zaobljenim pravokutnicima, a rezultati za KEGG-ove puteve s FDR pragom od 1% za svaku zaraznu osobinu su navedeni izvan zakrivljene linije (WHR – waist-to-hip ratio; BMI – body mass index; LDL – low density lipoprotein; eGFR – estimated glomerular filtration rate). Izvor autor.

Detaljni pregled kodiranih genotipova za 29 značajnih rezultata pokazao je da je većina slučajeva bila heterozigot za varijantu alela, dok je manji broj bio rijetki homozigoti (Tablica 4). U nekoliko situacija zabilježeno je da su kontrole bile s oba rijetka alela, a slučajevi nisu imali nijedan (npr. rs78111295[*FAT4*], rs116306652[*CACNA1E*], rs116886525[*APOA5*], rs17587821[*ITPKB*], rs117768315[*PCED1B*], rs570545343[*NLN*]). Analizirane genetske varijante objasnile su samo mali postotak varijance, od 0,058% za hepatitis do 0,113% za meningitis (Tablica 5).

Tablica 4. Broj pojedinaca s određenim genotipom na temelju njihovog statusa kontrole ili slučajeva za 29 značajnih lokusa povezanih s infekcijom nakon GWA meta-analiza (N=4 624).

Ispitivana osobina	SNP	Aleli	Genotip					
			0		1		2	
			Kont.	Sluč.	Kont.	Sluč.	Kont.	Sluč.
Hepatitis	rs145607180	C/T	4524	72	26	4	0	0
	rs17077736	G/A	4398	64	150	11	2	1
	rs188290902	A/G	4496	69	54	7	0	0
	rs34447953	C/A	4496	71	54	4	0	1
	rs72936092	G/A	4515	71	35	5	0	0
	rs78111295	C/T	4280	60	267	16	3	0
Meningitis	rs116306652	G/T	4490	24	104	6	2	0
	rs116886525	C/T	4556	26	39	4	1	0
	rs13358188	A/G	4563	26	33	4	0	0
	rs17587821	T/C	4496	24	99	6	1	0
	rs188530871	C/T	4542	26	54	4	0	0
	rs189257688	C/T	4477	24	119	5	0	1
	rs35608792	A/G	4418	22	178	8	0	0
	rs61878814	T/C	4448	24	147	4	1	2
Pneumonija	rs187624194	T/C	4198	348	61	19	0	0
Sistemske infekcije	rs138336976	G/A	4445	78	94	9	0	0
	rs142441889	G/T	4489	81	50	6	0	0
	rs146072725	C/T	4480	79	59	7	0	1
	rs192437130	C/T	4516	82	23	5	0	0
	rs58219087	T/C	4509	83	30	4	0	0
	rs6565193	T/C	4312	69	227	17	0	1
	rs76931343	A/G	4504	81	35	6	0	0
Tuberkuloza	rs117768315	G/A	4493	28	97	6	2	0
	rs140511699	A/C	4541	29	51	5	0	0
	rs140782448	T/C	4560	31	32	3	0	0
	rs145254894	C/A	4510	28	82	5	0	1
	rs182320411	G/A	4534	29	58	5	0	0
	rs554596237	T/G	4557	30	35	4	0	0
	rs570545343	G/A	4447	28	143	6	2	0

Tablica 5. Udio fenotipske varijance objašnjen pojedinačnim SNP-om i zbrojem svih identificiranih rezultata.

Fenotip	Varijanca	Oznaka SNP-a	Udio varijance – pojedinačni SNP	Udio varijance – zbroj
Hepatitis	0,015	rs188290902; rs72936092; rs17077736; rs34447953; rs78111295; rs145607180	0,012; 0,012; 0,008; 0,010; 0,006; 0,010	0,058
Meningitis	0,006	rs13358188; rs17587821; rs189257688; rs188530871; rs61878814; rs116886525; rs35608792; rs116306652	0,015; 0,015; 0,015; 0,012; 0,020; 0,015; 0,012; 0,011	0,113
Pneumonija	0,052	rs187624194	0,007	0,007
Sustavne infekcije	0,017	rs146072725; rs142441889; rs76931343; rs58219087; rs138336976; rs192437130; rs6565193	0,014; 0,010; 0,010; 0,016; 0,011; 0,017; 0,008	0,085
Tuberkuloza	0,007	rs554596237; rs145254894; rs570545343; rs117768315; rs182320411; rs140511699; rs140782448	0,013; 0,014; 0,014; 0,010; 0,018; 0,010; 0,010	0,090

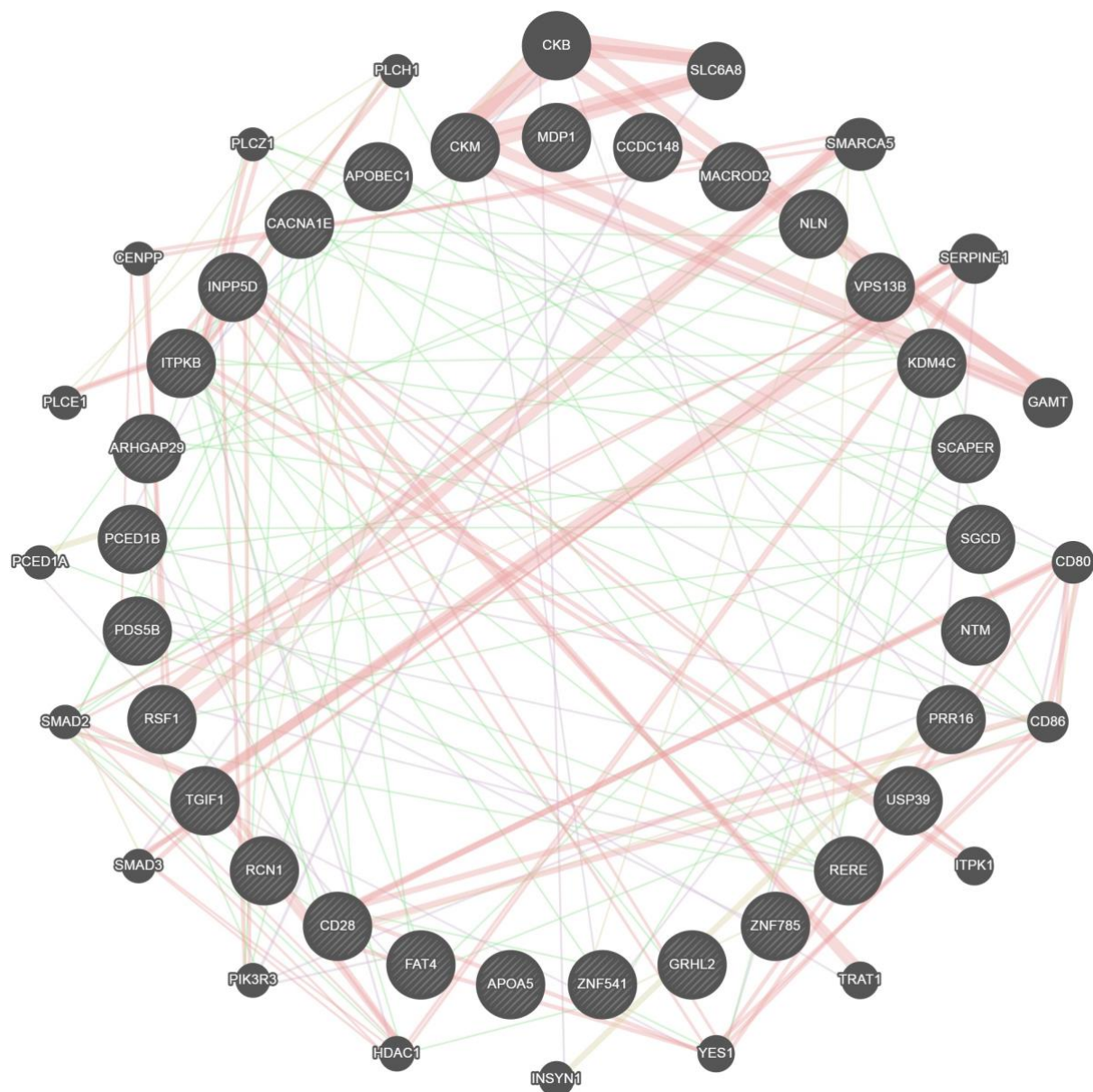
Pronađeni SNPovi pripadali su genima koji su na razne načine bili uključeni u imunološki odgovor (Tablica 6).

Tablica 6. Genska oznaka značajnih lokusa povezanih s infekcijom nakon GWA meta-analize

Ispitivana osobina	Gen	Opis
Hepatitis	CCDC148	Domena namotane zavojnice koja sadrži 148
	TGIF1	TGFB-inducirajući čimbenik homeobox 1; veže se za element koji reagira na retinoid X receptor (RXR) iz staničnog promotora proteina II (CRBP II- RXRE)
	ARHGAP29	Rho GTPaza aktivirajući protein 29; Aktivator GTPaze za tip Rho GTPaze
	PDS5B	PDS5, regulator održavanja kohezije sestrinskih kromatida u mitozu
	FAT4	FAT <i>tumor supresor homolog</i> 4; održava polaritet ravnih stanica u inhibiciji proliferacije i diferencijacije neuroprogenitorskih stanica
	NTM	Neurotrimin, imunoglobulin koji sadrži glikozil-fosfatidilinozitol (GPI) - izrastanje i adhezija dendrita
Meningitis	APOA5	Apolipoprotein A-V, apolipoprotein koji ima ulogu u regulaciji plazmatske razine triglicerida
	SCAPER	S-fazni protein povezan s ciklinom A u ER; CCNA2/CDK2 regulatorni protein koji prolazno održava CCNA2 u citoplazmi
	CD28	CD28 molekula; Uključen u aktivaciju T-stanica, indukciju stanične proliferacije i proizvodnju citokina te promicanje preživljavanja T-stanica
	CACNA1E	Kalcijevi kanali, R tip, alfa 1E podjedinica; posreduju ulasku iona kalcija u ekscitabilne stanice, također su uključeni u niz staničnih procesa ovisnih o kalciju, uključujući kontrakciju mišića, oslobađanje hormona ili neurotransmitera, ekspresiju gena i stanični ciklus
	RCN1	Retikulokalbin 1, EF-ruka domene vezanja kalcija; može regulirati aktivnosti ovisne o kalciju u lumenu endoplazmatskog retikuluma ili post-ER odjeljku
	RERE	Ponavljanja dipeptida arginin-glutaminske kiseline (RE); uloga supresora transkripcije tijekom razvoja; povezan s tonzilektomijom
	ITPKB	Inozitol-trifosfat 3-kinaza B; regulacija razine velikog broja inozitol polifosfata koji su važni u staničnoj signalizaciji. Impliciran u određivanju osjetljivosti na virus zaušnjaka
	SGCD	Sarkoglikan, delta; podkompleksa distrofin-glikoproteinskog kompleksa koji čini vezu između citoskeleta F-aktina i izvanstaničnog matriksa

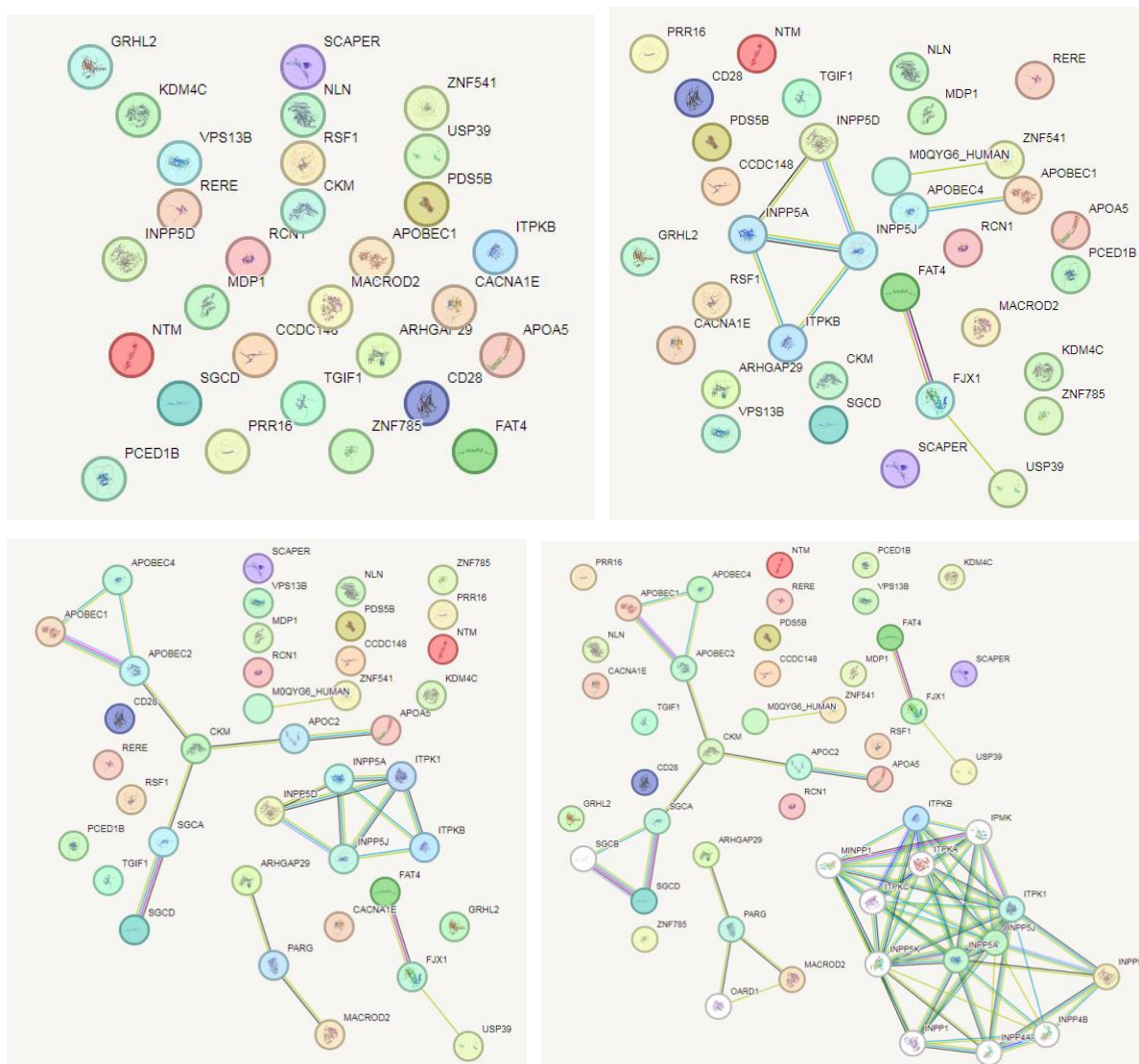
Pneumonija	APOBEC1	Enzim za uređivanje mRNA apolipoproteina B, katalitički polipeptid 1; katalitička komponenta kompleksa enzima za uređivanje mRNA apolipoproteina B
Sistemske infekcije	USP39	Ubikvitin specifična peptidaza 39; uloga u spajanju pre-mRNA kao komponenta U4/U6-U5 tri-snRNP, jednog od građevnih blokova spliceosoma
	MACROD2	MAKRO domena 2; deacetilaza uključena u uklanjanje ADP-riboze iz mono-ADP-riboziliranih proteina. Prethodne implikacije GWAS-a za infekciju virusom Epstein-Barr, mjerenja interleukina 10 i 12 i mjerenje liganda koji inducira apoptozu povezanog s TNF-om
	RSF1	Faktor pregradnje i razmaka 1; nuklearni protein koji olakšava transkripciju gena virusa hepatitisa B putem aktivatora transkripcije HBX
	INPP5D	Inozitol polifosfat-5-fosfataza; protein djeluje kao negativni regulator proliferacije i preživljavanja mijeloidnih stanica. Prethodna GWAS implikacija za broj leukocita
	ZNF785	Protein cinkovog prsta 785; može biti uključen u regulaciju transkripcije. Impliciran u definiranju bazofila i eozinofila
	PRR16	Protein bogat prolinom 16; regulator veličine stanica. Prethodne impliciran u mehanizmu odgovora na cjepivo i mjerenja citokina
	ZNF541	Protein cinkovog prsta 541; komponenta multiproteinskog kompleksa tijekom spermatogeneze
	PCED1B	domena PC-esteraza koja sadrži 1B; kodira protein koji pripada obitelji acil-esteraza sličnih GDSL/SGNH
Tuberkuloza	MDP1	Magnezij-ovisna fosfataza 1; fosfataza ovisna o magneziju koja može djelovati kao tirozin fosfataza
	CKM	Kreatin kinaza, mišić; protein kodiran ovim genom je citoplazmatski enzim uključen u energetske homeostazu i važan je serumski biljeg za infarkt miokarda
	NLN	Neurolizin (obitelj metalopeptidaze M3); hidrolizira oligopeptide kao što su neurotenzin, bradikinin i dinorfin A, vjerojatno je uključen u prekid neurotenzinergičkog signala u središnjem živčanom i probavnom sustavu
	GRHL2	Transkripcijski čimbenik važan u primarnoj neurulaciji i razvoju epitela
	KDM4C	Lizin (K)-specifična demetilaza 4C; pretvara specifične trimetilirane histonske ostatke u dimetilirani oblik koji potom regulira ekspresiju gena i odvajanje kromosoma. Prethodne implikacije GWAS-a za HIV-1 infekciju te osjetljivost na virusne i mikobakterijske infekcije
	VPS13B	protein 13 homolog B za vakuolarno razvrstavanje; transmembranski protein koji regulira transport posredovan vezikulama i razvrstavanje proteina unutar stanice. Prethodne implikacije GWAS-a u mjerenju osjetljivosti za infekcije uha u djetinjstvu

Prvi korak dodatne analize bio je razumjeti postoje li funkcionalne veze i drugi oblici povezanosti među pronađenim genima. Korištenje analize puteva pokazalo je da su svi od navedenih gena bili povezani, izravno ili neizravno (Slika 4).



Slika 4. Prikaz povezanosti pronađenih gena korištenjem baze *GeneMania*. Crvene crte označavaju funkcionalnu povezanost gena, zelene njihovo međudjelovanje, a ljubičaste zajedničko pojavljivanje pojedinih parova. Izvor autor.

Proširivanje predviđene mreže gena koji su dobiveni u prethodnom koraku analize ukazalo je na izostanak izravnih veza u prvom analitičkom koraku (Slika 5a), dok se postepenim povećavanjem mreže do trećeg koraka (Slika 5b-d) jasno ocrtavaju četiri odvojena klastera gena (Slika 5d). Ovi klasteri uključuju skupine gena uključenih u poremećaje metabolizma krvnih stanica (inozitol fosfataze; INPP5D, INPP4A, ITPKA, PLCD4), poremećaje razvoja i funkcije limfnog sustava te morfogenezu B limfocita (FAT4, FJX1, USP39), GTP-azu uključenu u određivanje krvnih grupa i rizik obolijevanje od encefalitisa (ARHGAP29, OARD1) te široku mrežu uključenu u niz poremećaja imunološkog sustava, uključujući reakcije na virusne zarazne bolesti (APOBEC2, APOBEC4, ANO5).



Slika 5. Koraci obogaćivanja *String* mreže gena koji su imali značajan rezultata u GWAS analizi, pri čemu je a) početno stanje, b) prvi korak proširivanja mreže, c) drugi korak proširivanja te d) treći korak proširivanja. Izvor autor.

Nakon identifikacije gena koji su bili povezani sa svim analiziranim zaraznim bolestima, korištena je baza OMIM kako bi se pronašle rijetke varijante i bolesti s kojima su povezani. Rezultati analize pokazali su ukupno 227 monogenских bolesti ili sindroma, od kojih je 77 (33,9%) bilo vezano uz regulaciju rada imunološkog sustava i to kao imunodeficijencije ili autoimune bolesti (Tablica 7).

Tablica 7. Sažetak OMIM zapisa kojim su analizirani svi geni koji su bili statistički značajni u GWAS analizi; prikaz samo 77 od 227 zapisa

OMIM oznaka	Vodeći gen	Fenotip
600315	TNFRSF4	Imunodeficijencija 16
153390	LCK	Imunodeficijencija 22
123860	CTPS1	Imunodeficijencija 24
602943	RORC	Imunodeficijencija 42
605554	CD244	Sklonost reumatoidnom artritisu
609424	RC3H1	Sindrom deregulacije i sistemske hiperinflamacije
124092	IL10	Zaštita od bolesti presatka protiv primatelja
124092	IL10	Sklonost HIV-1
124092	IL10	Progresija reumatoidnog artritisa
186910	CD8A	Imunodeficijencija 116
600555	STAT1	Imunodeficijencija 31A, mikobakterioza
600555	STAT1	Imunodeficijencija 31B, bakterijske i virusne infekcije
600555	STAT1	Imunodeficijencija 31C, mukokutana kandidijaza
609755	CELIAC3	Sklonost celijakiji, 3
118190	HSPD1	Hipomijelinizacijska leukodistrofija 4
186760	CD28	Imunodeficijencija 123 s HPV-povezanom verukozom
123890	CTLA4	Imunološka deregulacija s autoimunitetom
604558	ICOS	Zajednička varijabilna imunodeficijencija 1
146929	CXCR1	Spor napredak prema AIDS-u
600244	PDCD1	Multisistemska autoimuna bolest, tip 4
601470	CX3CR1	Brz napredak do AIDS-a nakon infekcije HIV-1
601267	CCR2	Sklonost/otpornost na HIV infekciju
601373	CCR5	Otpornost na virus hepatitisa C
601373	CCR5	Sklonost/otpornost na HIV infekciju
601373	CCR5	Sklonost infekciji virusom Zapadnog Nila
604491	CBLB	Multisistemska autoimuna bolest, tip 3
164011	NFKB1	Zajednička varijabilna imunodeficijencija 12
603029	TLR3	Otpornost na infekciju HIV-1
603029	TLR3	Imunodeficijencija 83, sklonost virusnim infekcijama
602731	FYB1	Trombocitopenija 3
604190	SLC22A4	Sklonost reumatoidnom artritisu
147683	IL13	Sklonost alergijskom rinitisu
147683	IL13	Sklonost astmi
142840	HLA-C	Sklonost HIV-1 viremiji

142840	HLA-C	Sklonost psorijazi 1
601022	NFKBIL1	Sklonost reumatoidnom artritisu
606000	BTNL2	Sklonost sarkoidozi, 2
608815	EFHC1	Sklonost juvenilnoj apsans epilepsiji, 1
608815	EFHC1	Sklonost juvenilnoj miokloničkoj epilepsiji, 1
607210	CARD11	Ekspanzija B-stanica s NF-κB i anergijom T-stanica
607210	CARD11	Imunodeficijencija 11A
607210	CARD11	Imunodeficijencija 11B s atopijskim dermatitisom
147620	IL6	Sistemska juvenilni reumatoidni artritis
605402	CD274	Multisistemska autoimuna bolest, tip 5
605921	STIM1	Imunodeficijencija 10
186830	CD3E	Imunodeficijencija 18
186830	CD3E	Imunodeficijencija 18, varijanta SCID
605257	AICDA	Imunodeficijencija s hiper-IgM, tip 2
147570	IFNG	Brz napredak prema AIDS-u
147570	IFNG	Odgovor na terapiju hepatitisa C
147570	IFNG	Zaštita od tuberkuloze
601896	TRAF3	Imunodeficijencija 132
601896	TRAF3	Imunodeficijencija 132B
600005	CIITA	Sklonost reumatoidnom artritisu
600005	CIITA	Manjak MHC klase II 1
602354	LAT	Imunodeficijencija 52
605956	NOD2	Upalna bolest crijeva 1, Crohnova bolest
610859	CARMIL2	Imunodeficijencija 58
611184	PIZO1	Limfna malformacija 6
601395	CCL3L1	Sklonost HIV/AIDS-u
613113	NF1	Juvenilna mijelomonocitna leukemija
158105	CCL2	Otpornost na HIV-1
601156	CCL11	Sklonost astmi
601156	CCL11	Otpornost na HIV-1
187011	CCL5	Usporena progresija bolesti HIV-1
187011	CCL5	Brza progresija bolesti HIV-1
182283	CCL3	Otpornost na HIV infekciju
604895	TBX21	Imunodeficijencija 88
604895	TBX21	Sklonost aspirinom induciranoj astmi
604895	TBX21	Astma i nosni polipi
604672	CD209	Zaštita od denga groznice
604672	CD209	Sklonost HIV-1
604672	CD209	Sklonost Mycobacterium tuberculosis
613437	FCHO1	Imunodeficijencija 76
604758	RELB	Imunodeficijencija 53
605717	ICOSLG	Imunodeficijencija 119
300365	TLR7	Imunodeficijencija 74, povezana s COVID-19, X-vezana

Analiza obogaćenih genetskih puteva ukazala je na 18 statistički značajnih rezultata, koji su se održali i nakon primjene korekcije na broj testiranja (FDR). Ovi putevi analizirani su u dvije baze, GO i KEGG (Tablica 8). Putanje vezane uz hepatitis pokazale su vezu sa staničnim ciklusom, kao i oni za meningitis, dok su sustavne infekcije više rezultata pokazale za RNA metabolizam; pri tome je pronađen i vrlo zanimljiv rezultat, veza alkoholizma i tuberkuloze (Tablica 8).

Tablica 8. Funkcionalna obogaćenja značajnih lokusa nakon GWA metaanalize (GO/KEGG)

Ishod	Baza	Opis puta	Broj gena	FDR
Hepatitis	GO: biološki proces	Kohezija kromatida	10	2,69E-19
Hepatitis	GO: biološki proces	Segregacija kromosoma	14	7,11E-19
Hepatitis	GO: biološki proces	Regulacija mitoze	14	2,01E-15
Hepatitis	GO: biološki proces	Segregacija kromosoma	10	2,29E-15
Hepatitis	GO: biološki proces	Regulacija mitoze	14	1,87E-14
Hepatitis	GO: biološki proces	Regulacija mitoze	14	5,73E-14
Hepatitis	KEGG	Stanični ciklus	8	4,86E-10
Hepatitis	KEGG	Mejoza	7	6,67E-09
Meningitis	GO: biološki proces	Regulacija rada stanice	12	8,64E-10
Meningitis	GO: biološki proces	Međustanična regulacija	17	4,87E-07
Meningitis	KEGG	Virusni miokarditis	7	2,22E-10
Meningitis	KEGG	Kalcijski kanal	6	1,61E-05
Sustavne infekcije	GO: biološki proces	RNA splicing	18	1,24E-22
Sustavne infekcije	GO: biološki proces	mRNA obrada	18	1,49E-21
Sustavne infekcije	KEGG	Spliceosome	19	1,07E-34
Sustavne infekcije	KEGG	RNA razgradnja	8	4,24E-12
Tuberkuloza	KEGG	Sustavni eritematozni lupus	13	9,37E-22
Tuberkuloza	KEGG	Alkoholizam	13	8,09E-20

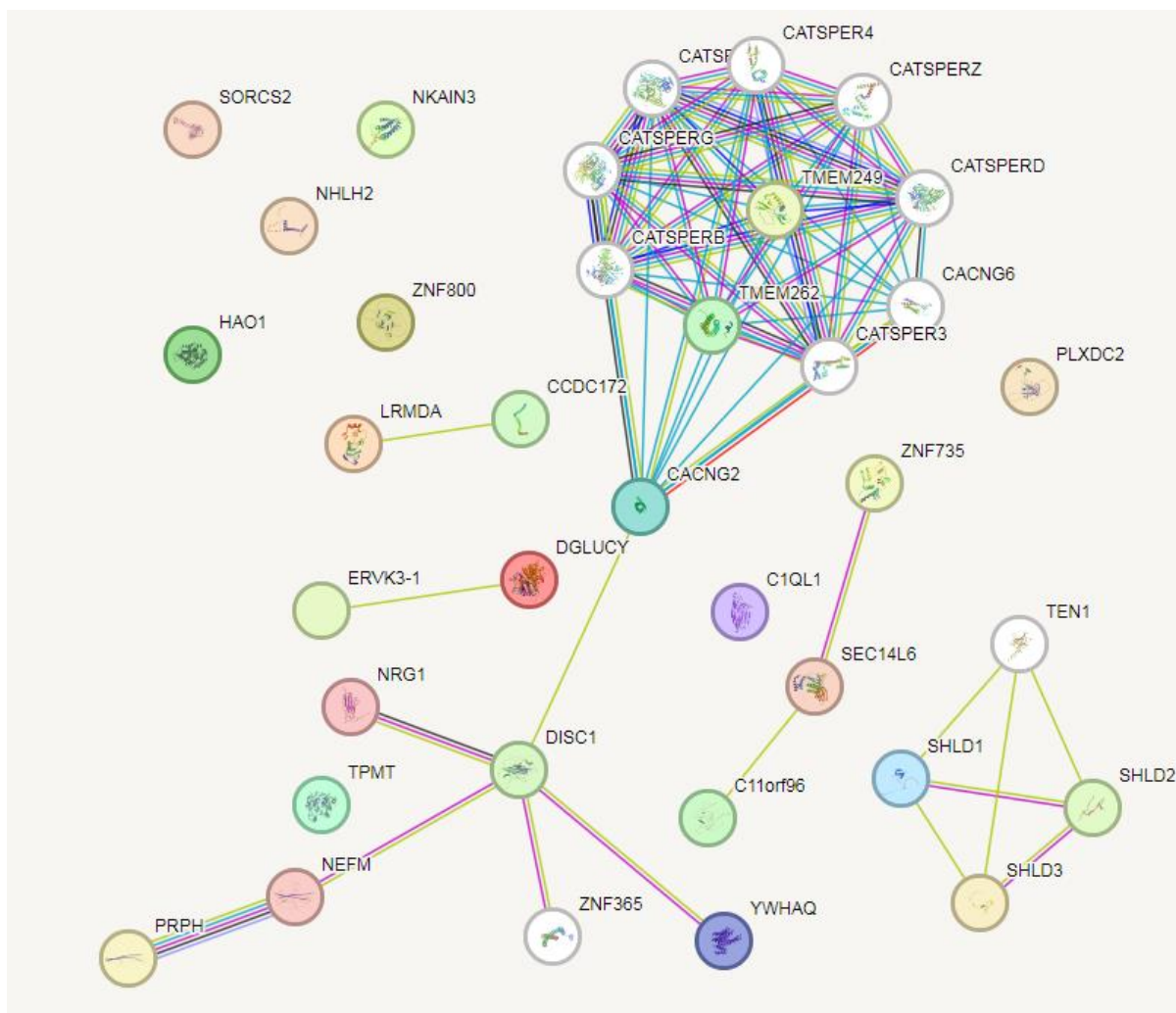
Analiza usmjerena na učestalost prehlade i samoprocijenjene gripe provedena je na pod-uzorku ispitanika, bez postizanja statistički značajnih rezultata (najbliži rezultati bili su granično neznačajni, a prikazani su u Tablici 9).

Tablica 9. Prikaz najznačajnijih rezultata GWAS analize učestalosti prehlade i samoprocijenjenih epizoda gripe

Fenotip	SNP	Gen	OR (95% CI)	P	Varijanta
Prehlada	rs34120090	C14orf159	0,67 (0,51-0,82)	5,09E-07	intron
Prehlada	rs72811464	C10orf11	0,32 (0,00-0,77)	5,62E-07	intron
Prehlada	rs77745981	ZNF800	1,35 (1,23-1,47)	6,25E-07	intron
Prehlada	rs1351361	NKAIN3	0,79 (0,69-0,89)	2,11E-06	intron
Prehlada	rs2235247	HAO1	0,71 (0,57-0,85)	2,39E-06	intron
Prehlada	rs12215418	TPMT	0,69 (0,54-0,85)	2,87E-06	intron
Prehlada	rs141486896	CACNG2	0,59 (0,36-0,81)	3,29E-06	intron
Prehlada	rs1756957	PDX1-AS1	1,21 (1,13-1,28)	4,36E-06	intron
Prehlada	rs112219086	C20orf196	0,63 (0,44-0,83)	4,89E-06	intron
Gripa*	rs114363831	YWHAQ	1,83 (1,60-2,06)	2,11E-07	intron
Gripa*	rs7225162	C1QL1	1,25 (1,16-1,33)	2,58E-07	nizvodno
Gripa*	rs112040172	NRG1	2,17 (1,85-2,48)	1,88E-06	intron
Gripa*	rs10097219	NEFM	0,76 (0,65-0,88)	2,36E-06	nizvodno
Gripa*	rs75426385	SEC14L6	0,64 (0,45-0,82)	2,49E-06	intron
Gripa*	rs12504682	SORCS2	0,80 (0,71-0,89)	2,68E-06	intron
Gripa*	rs2153905	NHLH2	1,21 (1,13-1,29)	2,89E-06	uzvodno
Gripa*	rs10827935	PLXDC2	1,27 (1,17-1,37)	3,39E-06	intron

*samoprocijenjeni slučajevi

Korištenje baze *String* pokazalo je snažno izražen klaster u trećem koraku obogaćivanja, koji je bio uključen u regulaciju neuroinflamatornih stanja te funkcije trepetljika na humanim stanicama (DISC1, CATSPER obitelj; Slika 6).



Slika 6. Treći korak obogaćivanja genetskih mreža za učestalost prehlade i gripe, na temelju baze *String*. Izvor autor.

S obzirom na manjak prilike za replikaciju rezultata u drugom uzorku, u zadnjem koraku analize provedena je provjera dobivenih rezultata, usporedbom s rezultatima drugih objavljenih istraživanja. Na temelju pregleda literature, pronađeno je šest rezultata koji su u originalnim istraživanjima zadovoljavali razinu statističke značajnosti za otkrivanje varijante, dok su u ovom istraživanju zadovoljavali razinu značajnosti za replikaciju rezultata. Na taj način dobivena je potvrda za ulogu CCL2 (otprije poznat kao element imunološkog odgovora na zarazne bolesti), dva elementa MHC/HLA sustava te UBE2L3, ubikvitinski motiv uključen u regulaciju MHC kompleksa (Tablica 10).

Tablica 10. Prikaz rezultata iz objavljenih istraživanja, koji su bili replicirani u ovom istraživanju

PMID	SNP	Gen	Prethodni ishod	Fenotip u ovom istraživanju	<i>P</i>
26524966	rs1024611	CCL2	Tuberkuloza	Bakterijske infekcije	0,029
20694014	rs4331426	intergenski	Tuberkuloza	Upala pluća	0,023
22306650	rs2057178	3'WT1	Tuberkuloza	Sustavne infekcije, tuberkuloza	0,008; 0,018
25297839	rs77349273	HCP5	Herpes zoster	Učestalost gripe	0,027
23326239	rs2854275	HLA-DQB1	EBNA-1 protutijelo	Apendektomija, bakterijske infekcije, respiratorne infekcije	0,024; 0,003; 0,006
24162738	rs4821116	UBE2L3	Kronični hepatitis B	Virusne infekcije	0,048

5. RASPRAVA

Rezultati ovog rada ukazali su na postojanje 29 genetskih varijanti koje su bile statistički značajno povezane s rizikom obolijevanje od zaraznih bolesti. Pri tome se niti jedna teorija o arhitekturi sklonosti zaražavanju nije prikazala kao prevladavajuća, jer se u većini slučajeva radilo o rijetkim genetskim varijantama iz nekog oblika patogenetskog mehanizma koji je zasigurno poligenetske prirode. Sumarno gledano, ideja o razasutim primarnim imunodeficijencijama je u tome možda najizglednija, jer se temelji na pojavi vrlo raznolikog opsega i velikog broja monogenetskih ili rijetkih varijanti, koje se mogu zbog nasumičnih mutacija pojavljivati na svim mjestima u genomu. Njihova pojava unutar puteva koji reguliraju rad imunološkog sustava može dovesti do problema, koji se onda ocrtavaju nepovoljnim kliničkih ishoda vezanim uz zaražavanje i zarazne bolesti, koju neki prethodni radovi nazivaju „nesretnim kombinacijama“ (15, 138).

Najveći broj od 29 prepoznatih genetskih varijanti povezanih s infekcijom bile su rijetke varijante smještene u nekodirajućem dijelu gena, intronu. Ovaj nalaz ukazuje na tri moguća objašnjenja. Prvo je da još uvijek ne razumijemo strukturu i ulogu introna te da bi se neki oblik informacije mogao nalaziti i u intronima. Drugi uključuje mogućnost da iako su u intronima, da bi ove sekvence DNA mogle nekako biti uključene u mehanizam rada pojedinog gena. U tu svrhu trebalo bi provesti replikaciju, tj. testirati ulogu tih gena u drugom neovisnom istraživanju i vidjeti jesu li ti geni i njihovi egzoni na neki način povezani s rizikom zaražavanja ili obolijevanja. Treće moguće objašnjenje je da su ovi rezultati možda lažno pozitivni. I u tu svrhu bi bilo potrebno provesti replikacijsku analizu, kako bi se u neovisnom istraživanju, idealno dovoljne statističke snage, moglo definitivno odgovoriti na ovu hipotezu i rezultat ovog istraživanja.

Od značajnih rezultata, njih šest je bilo za hepatitis, osam za meningitis, sedam asocijacija za sistemske infekcije i sedam za tuberkulozu, a samo jedna je bila sugestivna za pneumoniju. Većina otkrivenih varijanti, njih 19 od 29, se nalazi u intronu. Intron, kao ne kodirajući dio gena, do sada nije bio u fokusu istraživanja obzirom da je konvencionalna genetika najviše isticala važnost kodirajućeg dijela gena, egzona. Međutim, ulaskom GWAS studija u znanstvena istraživanja mišljenje se postupno mijenja te introni dobivaju sve više na važnosti. Otprilike 90% svi otkrivenih SNP-ova povezanih s određenim fenotipom putem GWAS istraživanja su smješteni upravo u nekodirajućim regijama gena (139, 140). Prethodna istraživanja pokazala su njihovu ulogu u kardiovaskularnim, ali i u drugim složenim bolestima poput šećerne bolesti tip 2 ili debljini (141). Pretraživanjem literature, do sada je opisano samo nekoliko ne kodirajućih kandidata kao vjerojatnih uzročnih varijanti povezanih s Mendelskim bolestima i poremećajima (142, 143). Iako su bila velika očekivanja od metoda

sekvencioniranja genoma - NGS (engl. *next generation sequencing*) u svrhu otkrivanja promjena unutar različitih dijelova genoma, ali ni one do sada nisu poboljšale naše razumijevanje varijanata koje su u ne kodirajućim dijelovima i njihovu funkciju (144). Ti funkcionalni nekodirajući dijelovi, poput promotora, pojačivača, introna, miRNK-ne i 5'/3' UTR, obuhvaćaju 85% ljudskog genoma i sadrže veliki dio kandidata uzročnih varijanti (141, 145). Prethodne GWAS studije pokazale su da su upravo te varijante u nekodirajućim dijelovima povezane s bolestima, a djeluju tako što utječu i mijenjaju funkcionalne elemente DNA molekule povezane s regulacijom ekspresije gena. Osim toga, imaju značajnu stopu nasljednosti stoga su kategorizirane kao značajne odrednice razvoja osjetljivosti za bolest (146).

Drugi važni zaključak ovog istraživanja je podatak kako su otkriveni geni uključeni ne samo u odgovor imunološkog sustava, već imaju ulogu i izvan tog sustava. Tako naprimjer geni koji su povezani s razvojem hepatitisa također imaju svoju ulogu u patogenezi različitih bolesti jetre. Primjer za to je *TGIF1* gen (TGFB-induciran čimbenik homebox 1), čija je ekspresija pojačana u bolesnika koji su zaraženi hepatitis C virusom (HCV), (147, 148) a smanjena u bolesnika s fibrozom jetre (149). Drugi primjer je istraživanje bolesnika s hepatocelularnim karcinomom uzrokovanog hepatitis B virusom (HBV) koje je pokazalo da gen *FAT4* (FAT atipični kadherin 4) može djelovati kao tumor supresor gen koji je inaktivan u slučajevima hepatocelularnog karcinoma, ali i u različitim drugim karcinomima (150). Gen *ARHGAP29* bio je povezan s hepatitisom, iako su prethodne studije povezale ovaj gen s karcinomom želuca, vjerojatno putem njegovog Rho GTP-aza aktivatora (151). Iako se rezultat mora uzeti sa zadržkom, uistinu postoji studija provedena u Kini koja je povezala hepatitis i karcinom želuca (152). Najzanimljivije otkriće je gen *NTM* (neurotrimin) koji se pokazao kao gen potreban da se hepada virus integrira u genom domaćina svega sat vremena nakon infekcije (153).

Sve je više istraživanja koje povezuju neke neurodegenerativne bolesti i neurološke poremećaje kao što su na primjer Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, multipla skleroza, amiotrofna lateralna skleroza te poremećaji iz spektra autizma, s virusnim i bakterijskim infekcijama kao rizičnim čimbenicima (154-156). Nekoliko gena za meningitis iz ovog istraživanja također su pokazala snažnu povezanost s neurodegenerativnim bolestima. Apolipoproteini su već do sada dovedeni u vezu s raznolikim zaraznim bolestima. Tako su na primjer *APOA1* i *APOE* u nekim prethodnim istraživanjima povezani s meningitisom (157, 158), kao i s raznim bakterijskim i virusnim infekcijama (158-160). Tako nas nije iznenadila činjenica da je meningitis u ovom istraživanju također bio povezan s jednim od apolipoproteina, *APOA5*. Kombinacija gena *APOA1-APOC3-APOA4* povezana je s rizikom za oboljenje od

Alzheimerove bolesti (161) pokazujući još jednom njihovu ulogu u patologiji neuroloških bolesti.

Još jedan gen *CACNA1E*, zajedno s brojnim drugim genima koji kodiraju podjedinice za kanale kalcijevih iona, već su od prije poznati u patologiji neuropsihijatrijskih poremećaja poput shizofrenije, autizma i bipolarnog poremećaja (162), a također su povezani s kortikalnim lezijama bolesnika s *mijastenijom gravis* (163). Uspoređujući naše rezultate s onima u prethodnom provedenim GWAS studijama isti lokusi povezani su s Alzheimerovom bolesti i shizofrenijom (Tablica S5). Dodatno, povezali smo meningitis s dva gena za koja dobro znamo funkciju u imunološkom sustavu, tj. njegovom odgovoru. Riječ je o genu *CD28* koji je dio imunološkog sustava odgovoran za aktivaciju T-stanica, indukciju stanične proliferacije i proizvodnju citokina te preživljavanje T-stanica. Nekoliko istraživanja in vitro i na životinjama pokazala su da njegov nedostatak kod miševa dovodi do razvoja eksperimentalnog autoimunog meningitisa (164), a njegova blokada poboljšava eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (165). Još jedan gen s dobro poznatom ulogom u imunološkom odgovoru je *ITPKB* (inozitol-trifosfat 3-kinaza B). Istraživanja na životinjama pokazala su njegovu značajnu ulogu u diferencijaciji funkcije perifernih T-limfocita (166, 167). Kad smo proveli funkcionalnu analizu obogaćenja funkcije lokusa otkrivenog u našem istraživanju, a koji je povezan s meningitisom, također je pokazao snažnu asocijaciju s mrežom imunološkog odgovora i putovima signalizacije T-limfocita.

U ovom istraživanju još smo otkrili i nekoliko gena koji bi mogli doprinijeti osjetljivosti na sistemske infekcije, od kojih većina ima jasnu ulogu u odgovoru imunološkog sustava. Interakcija gena *RSF1* (od engl. *human remodeling and spacing factor 1*) s genom *SP100* važna je u odgovoru imunološkog sustava na unutarstanične patogene (168). Također, jedno istraživanje je pokazalo da interakcija proteina pX HBV-a s *RSF1* dovodi do povećanja transkripcije HBV (169), predlažući da bi ovaj gen imao vrlo važnu ulogu u životnom ciklusu virusa čija je ekspresija regulirana na razini transkripcije. Uloga *MACROD2* (od engl. *MACRO domain containing 2*) se može objasniti u njegovom međudjelovanju s *ARTD10* kojeg potiču upalni i imunogeni stimulusi, a on sam potiče signalni put NK- $\kappa\beta$ kako bi pojačao upalu, prirodni imunološki odgovor, stanično preživljenje i proliferaciju (170).

Što se tiče rezultata vezanih za tuberkulozu, pronašli smo značajnu vezu između nje i gena *KDM4C*, jedne lizin demetilaze koja je značajna u patogenezi karcinoma pluća ne-malih stanica (171). Otkrili smo još jedan gen povezan s tuberkulozom, gen *MDPI* koji je magnezij ovisna fosfataza 1 s predloženom ulogom za karcinom pluća (172). Sve navedeno moglo bi biti dio malo većeg puta koji objašnjava i povezuje tuberkulozu i karcinogenezu, a uključuje

osovinu *CCL7-CCL2-CCR2* za koju se zna da ima ulogu u imunološkom odgovoru i regulaciji tumora, te *WT1* gen koji je predložen kao gen za osjetljivost razvoja tuberkuloze (72). Stavljajući naše rezultate u kontekst KEGG-ovih puteva, jasno se uočava veza između virusa i karcinogeneze (Tablica S4).

Većina značajnih varijanti koje smo otkrili u našem istraživanju su u biti rijetke varijante. Otkrivanje tih rijetkih genetskih varijanti kod pojedinca, moglo bi pomoći u individualiziranom predviđanju rizika za zarazne bolesti. Kao što smo već pisali u uvodu, napretkom medicine, ali i boljim higijenskim uvjetima života, te prevenciji, misleći pritom najviše na cijepljenje i kontrolu izvora infekcije, te štetne varijante jednostavno se nisu ispoljile, ostale su zamaskirane. Vremenom su se nakupljale i zadržane su u populaciji, tj. nisu nestale. Možemo pretpostaviti da će epidemije novim, ali i nekim već poznatim uzročnicima u budućnosti koristiti te slične, ako ne i iste patogenetske mehanizme za razvoj osjetljivosti na uzročnika zarazne bolesti. Stoga bi otkrivanje tih rijetkih genetskih varijanti sa značajnim kliničkim učinkom bile itekako vrijedne u predviđanju koliki je zapravo rizik pojedinca prilikom infekcije određenim patogenom (19).

PAGE konzorcij (od engl. *Population Architecture Using Genomics and Epidemiology Consortium*) je već proveo GWAS studiju koja je pokazala da je različita veličina učinka ispitivanog lokusa u različitim populacijama, ističući na taj način važnost strukture populacije prilikom planiranja i provođenja istraživanja (173).

Budućnost personalizirane medicinu zaraznih bolesti zasiguro će uključivati bolje razumijevanje genomske složenosti regija poput MHC, KIR i regiji imunoglobulina teškog lanca (63). Stoga je jedan od važnih poruka za buduća istraživanja da se ovi kompleksi ne zanemaruju, nego da ih se sagleda u okruženju, kako bi se mogli dobiti najbolji mogući rezultati istraživanja.

Još je jedan razlog zašto svako, pa i ovo GWAS istraživanje treba replikaciju u neovisnim populacijama, a to je visoka stopa lažno negativnih nalaza GWAS studija. Do sada nema prijavljenih GWAS za zarazne bolesti, ali nekoliko njih je u tijeku. Jedna od njih je studija pod pokroviteljstvom konsorcijuma *Wellcome Trust Case-Control Consortium*. U studiju je uključeno 2000 slučajeva i 3000 kontrolnih ispitanika, a u fokusu istraživanja je osam složenih bolesti, uključujući tuberkulozu i malariju. Strategija istraživanja se sastoji od dvije faze za te dvije važne zarazne bolesti. U prvoj fazi čip (panel) od 750 000 SNP-ova će se upotrijebiti za genotipizaciju 1000 slučajeva i 1000 kontrola, a pozitivna područja s *p* vrijednosti 0.1 će se ispitivati u drugom koraku s najmanje 1000 novih slučajeva i 1000 kontrola. Ovo je jedan od najvećih do sada provedenih projekata za otkrivanje genetskih varijacija koje ljude predisponira

za razvoj složenih bolesti. Cilj je otkriti genetske putokaze koji će znanstvenicima omogućiti bolje razumijevanje najrizičnijih skupina ljudi kao i omogućiti najučinkovitije liječenje (67).

Ovakva istraživanja mogu u nekim slučajevima rezultirati lažno pozitivnim rezultatima prilikom otkrivanja novih SNP-ova, problem koji nije tako lako odvojiti u studijama koje provode brojne statističke usporedbe. Ali isto tako je sve jasnije da mnoge složene bolesti pokazuju genetsku heterogenost s različitim genetskim odrednicama za istu bolest u različitim etničkim grupama. Na primjer, mutacije gena na lokusu *NOD2/CARD15* kod bjelaca su važne odrednice osjetljivosti za upalne bolesti crijeva, dok su one, tako prigodno, odsutne u Azijskoj populaciji (174, 175).

Proširenje ovog pristupa omogućuje drugačiji oblik analize, nazvan *phenome-wide association studies* (PheWAS). PheWAS predstavlja u biti obrnutu ideju GWAS, tako što traži povezanost brojnih fenotipova sa specifičnim SNP-om. Baš kao i GWAS, PheWAS su pokazale da određene genetičke varijacije mogu biti povezane s brojnim stanjima i osobinama (63, 176, 177).

Osim malog uzorka koji je najveće ograničenje ovog istraživanja, drugo veliko ograničenje je nedovoljno detaljno opisivanje istraživanih osobina. Naime, svi odgovori u ovom istraživanju vezano za kliničke preglede i hospitalizaciju dobiveni su iz upitnika kojeg je ispunjavao sam ispitanik. Dakle, rezultati su značajno ovisili o samom pamćenju ispitanika. Značajan korak naprijed bila bi upotreba elektronskih medicinskih kartona s točnim dijagnozama i izoliranim uzročnicima koji bi bili povezani s biobankama. Na taj način biobanke bi bile jako dobro povezane s kliničkim bilješkama o svakom pojedincu pa bi i sama harmonizacija protokola, opisivanje bolesnika i upotreba odgovarajuće metode analize podataka bila lakša i točnija (72). Mogući korak u tom smjeru bilo bi trajno skupljanje uzoraka i podataka opservacijskim studijama. Primjer jedne takve studije je FP7 *European union Funded Platform foR European Preparedness Against (Re)emerging Epidemics* (PREPARE, <http://www.prepare-europe.eu/>). Dodatno, mehanizmi koji su opisani su moguće specifični za populaciju tako da imaju malu ulogu u općoj populaciji. Svejedno, možda bi nakon replikacije u nekoj drugoj populaciji pomogli prilikom razumijevanja kolika je uloga čimbenika domaćina u patogenezi zaraznih bolesti te moguće terapijske mete u međudjelovanju domaćina i patogena. Obzirom na porast otpornosti na antibiotike, pad farmaceutskog entuzijazma za sintezu novih antibiotika i razočaravajuće rezultate liječenja septičkih bolesnika, razvoj novih cjepiva i farmakogenetskih intervencija i dalje predstavljaju najvažnije ciljeve genetskih istraživanja osjetljivosti zaraznih bolesti.

Posljednjih dvadeset godina GWAS su pokazale kako većina ako ne i sve fenotipske osobine i bolesti podliježu genetskoj komponenti koja utječe na njihov tijek, razvoj osjetljivosti i osobine, te su napravile asocijacije tih fenotipova s točno određenim lokusima gena. Od 2002. objavljeno je više od 4000 GWAS-a rezultirajući sa skoro 150 000 marker varijanti povezanih sa stotinama osobina (178). Međutim, iako su se GWAS činile kao jako dobro rješenje problema, kombinirajući podatke epidemioloških istraživanja i tehnika molekularne genetičke analize, doprinos učestalih i rijetkih genetskih varijanti u razumijevanju osjetljivosti pojedinca i populacije na zarazne bolesti još uvijek je nepoznat. Nemogućnost otkrivanja bioloških mehanizama svakog fenotipa posljedica je dva komplicirajuća čimbenika. Prvi je nemogućnost raščlanjivanja signala marker varijante od ostalih varijanata s kojima se nalazi u jakoj povezanosti, LD. Više od 95% varijanata koje su u jakom LD ($R^2 > 0,8$) smještene su izvan ne kodirajućeg dijela DNK molekule i mogu se locirati do 500 kb udaljenosti. Tako da svaka od njih može biti ona prava, uzročna varijanta (179). Drugi čimbenik je što te uzročne varijante koje se nalaze u ne kodirajućim dijelovima mogu biti jako specifične za vrstu stanice, kontekst i samu bolest (180). Kao što smo već prije naveli, ti nekodirajući dijelovi DNA molekule sadrže u biti regulatorne lokuse, pojačivače i promotore, koji vežu proteine čimbenika transkripcije (TF, od engl. *transcriptor factor*) i na taj način nadziru ekspresiju samog gena (142). Koji će promotor i pojačivač biti korišteni, ovisi o vrsti stanice, koja usput budi rečeno ima otprilike 1600 ljudskih TF-a, i njihovoj epigenetski reguliranoj dostupnosti za svaki lokus (181). Varijante djeluju upravo tako što ometaju vezanje bilo kojeg od tih TF-a rezultirajući promjenom aktivnosti promotora ili pojačivača, a to pak utječe na ekspresiju gena i stanične puteve. Na taj način vrsta stanice, tkiva, bolesti ili određeni mikro okoliš utječu koja varijanta, TF, geni ili putevi su uključeni. Sve ovo otežava shvaćanje koliki je doprinos GWAS-om otkrivenog lokusa te interpretaciju i primjenu GWAS rezultata. Kako bi riješile ovaj problem, razvijaju se brojne metode finog mapiranja upravo s ciljem otkrivanja značajnih varijanti i gena te tumačenje njihovog biološkog utjecaja na bolest ili osobinu (179, 182).

Velika se očekivanja također polažu u metode sekvencioniranja slijedeće generacije (NGS, od engl. *next generation sequencing*), cjelogenomsko sekvencioniranje (WGS, od engl. *whole-genome sequencing*) i sekvencioniranje egzona (WES, od engl. *whole-exome sequencing*) koje bi mogle ustanoviti genetsku arhitekturu zaraznih bolesti (63).

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog rada ukazali su na postojanje 29 genetskih varijanti koje su bile statistički značajno povezane s rizikom obolijevanje od zaraznih bolesti. Pri tome se niti jedna teorija o arhitekturi sklonosti zaražavanju nije prikazala kao prevladavajuća, a najizglednija bi mogla biti ideja o razasutim primarnim imunodeficijencijama. Brojne monogenske ili rijetke varijante raznolikog opsega mogle bi se zbog nasumičnih mutacija pojavljivati na svim mjestima u genomu. Ukoliko se pojave unutar puteva koji reguliraju rad imunološkog sustava, mogle bi rezultirati nepovoljnim kliničkim ishodima vezanim uz zaražavanje i zarazne bolesti. Većinom je riječ o rijetkim varijantama smještenim u nekodirajućem dijelu gena – intronu.

Svi otkriveni geni imaju ulogu u imunološkom sustavu, bilo u odgovornu na infekciju ili imaju neku ulogu unutar stanice, a važna je za razvoj osjetljivosti na infekciju. Međutim, isti geni imaju i brojne uloge izvan imunološkog sustava. Otkrivanje tih rijetkih genetskih varijanti kod pojedinca, moglo bi pomoći u individualiziranom predviđanju rizika za zarazne bolesti. Iako je broj slučajeva mali, provođenje GWAS studije u biobanci pokazao se kao dobar izvor za genetska istraživanja razvoja osjetljivosti na zarazne bolesti.

Ipak, rezultati ovog istraživanja dobiveni su na temelju malog uzorka za svaku od istraživanih zaraznih bolesti unutar jako heterogene populacije stoga svakako zahtijevaju replikaciju u neovisnim populacijama. Drugo veliko ograničenje je nedovoljno detaljno opisivanje istraživanih osobina jer su svi odgovori u ovom istraživanju dobiveni iz upitnika kojeg je ispunjavao sam ispitanik ili su se temeljili na povijesnim podacima o korištenju bolničkog sustava u raznim trenucima u prošlosti, što izravno umanjuje usporedivost podataka. Upotreba elektronskih medicinskih kartona s točnim dijagnozama i izoliranim uzročnicima povezanih s biobankama bio bi korak k riješenju tog problema. Također, opisali smo mehanizme koji su vjerojatno specifični za populaciju tako da je potrebna replikacija u nekoj drugoj populaciji kako bi shvatili ulogu čimbenika domaćina i patogenezu zaraznih bolesti. Zbog svega navedenog moguće je da je ovo istraživanje samo početni stadij nekog većeg, multietničnog istraživanja koje će procijenjivati učinke ovih i nekih drugih rijetkih genetskih varijanti kroz prizmu rizika za razvoj teškog oblika zarazne bolesti.

7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Uvod. Unatoč stoljeću provođenja uspješne prevencije i kontrole, smrtnost te stopa oboljenja od zaraznih bolesti je i dalje visoka, s djecom kao najrizičnijom i najranjivijom skupinom. "Borba" između imunološkog sustava i mogućnost prilagodbe patogenog uzročnika predstavlja trajan izazov. U posljednje vrijeme najviše se istražuje genetski profil domaćina i patogena, mehanizma koji se smatra najodgovornijim za različitu prezentaciju kliničke slike i ishoda liječenja. Zarazne bolesti pokreću jednu od najsnažnijih prirodnih selekcija koja djeluje na naš genom i koja ostaje upisana u njemu kao genetske varijante. Istraživanje tih rijetkih genetskih varijanti bez hipoteze moguće je kroz cjelogenomske studije povezanosti (GWAS, *engl. genome-wide association studies*).

Metode. U ovom istraživanju proveli smo cjelogenomsku studiju povezanosti na 4.624 ispitanika iz biobaze 10.001 Dalmatinac. Ukupno smo analizirali 14 osobina vezanih za infekciju: tuberkuloza, pneumonije, hepatitis, meningitis, različite upale dišnog i probavnog sustava, sistemske upale, bakterijske i virusne infekcije. Također smo uključili podatak o apendektomiji i tonzilektomiji, procjenu opterećenja infekcijama te učestalost godišnjeg oboljenja od obične prehlade i gripe u posljednjih deset godina kod dijela ispitanika.

Rezultati. Iako je za neke slučajeve veličina uzorka bila mala, dobili smo 29 značajnih asocijacija: šest lokusa za hepatitis, osam za meningitis, sedam za sistemske infekcije, sedam za tuberkulozu te jedan za pneumoniju. Većina su rijetke intronske varijante. Svi otkriveni geni imaju ulogu u imunološkom sustavu, bilo u odgovornu na infekciju ili imaju neku ulogu unutar stanice, a važna je za razvoj osjetljivosti na infekciju. Također smo uočili kako ti isti geni imaju i brojne uloge izvan imunološkog sustava. Identificirali smo nekoliko proteina potrebnih za određene procese životnog ciklusa određenog patogena.

Zaključak. Jedan od ciljeva humane genetike jest definirati te genetske varijante odgovorne za promjenjivost tijeka infekcije kod pojedinaca. Genetskim profiliranjem dobio bi se odgovor na pitanje tko će imati korist od pojedinog cjepiva kao i predviđanje rizika za bolest. Sastavljanjem panela rijetkih genetskih varijanti mogli bi predvidjeti cjeloživotni rizik za osjetljivost na zarazne bolesti za svakog pojedinca.

8. LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Zarazne bolesti i dalje uzrokuju mnogo obolijevanja i smrti. Ne reagiraju svi ljudi jednako: neki se lako oporave, a drugi razviju teži oblik bolesti. Dio tih razlika ima genetsku podlogu. Analiza DNA napravljena je na 4.624 odrasle osobe iz istraživanja „10.001 Dalmatinac“ za 14 obilježja povezanih s infekcijama (npr. tuberkuloza, upala pluća, meningitis, hepatitis, infekcije dišnog i probavnog sustava). Pronađeno je 29 genetskih signala povezanih s ispitivanim obilježjima infekcija. Većina ovih promjena nalazi se u nekodirajućim dijelovima DNA, koji djeluju-upravljaju radom obližnjih gena; jedna promjena mijenjala je bjelančevinu i bila je povezana s tuberkulozom. Mnogi uočeni geni sudjeluju u imunološkom odgovoru i obrani organizma. Rezultati potvrđuju da naši geni sudjeluju u određivanju osjetljivosti na infekcije. U budućnosti bi takva saznanja mogla pomoći u prevenciji (npr. ciljano cijepljenje ili pomnije praćenje osoba s većim rizikom) te u razvoju lijekova usmjeravanjem na važne biološke putove u zaraznim bolestima.

9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

Genetic part in the risk of acquiring infectious disease: the role of rare genetic variants

Short summary in English

Background. Infectious disease morbidity and mortality is still very high with children being the most vulnerable ones despite of a century of successful prevention and control. This perpetuate “fight” between immune system and pathogens’ ability to adopt presents a constant challenge. It is the genetic profile of the host and pathogen that is considered the most responsible for clinical presentation and treatment outcome. Infectious diseases are one of the strongest natural selection forces on our genome that stay written as genetic variants. Genome-wide association studies (GWAS) are a type of hypothesis free studies that have these genetic variants in focus.

Methods. We have conducted a GWAS on 4,624 participants from “10,001” Dalmatian biobank analysing 14 infection related traits: tuberculosis, pneumonia, hepatitis, meningitis, respiratory and gastrointestinal tract infections, systemic, bacterial and viral infections. We also included information on appendectomy and tonsillectomy, infectious load as well as annual common cold and influenza frequency in the past 10 years only for a part of the participants.

Results. The study resulted with 29 significant associations: six locuses for hepatitis, eight for meningitis, seven for systemic infections and tuberculosis, and one was suggestive for pneumonia. Most of the them are rare variants located in the non-coding part of the gene, intron. All of the identified genes have their role in the immune system, whether it is a response to infection or the cells’ infection susceptibility development. We also noticed that all these genes have numerous roles outside immune system. We even identified several proteins needed for certain pathogens’ life cycle. Although the number of cases was small in some instances, biobanks can be a good source of information for genetic and GWAS research in infectious diseases susceptibility.

Conclusions. One of the goals in human genetics is to define genetic variants responsible for the course and outcomes of infections in humans. Genetic profiling could provide the information who would benefit from a certain vaccine as well as predict the risk for disease. By composing rare genetic variants panels we could predict individuals’ life-long susceptibility to major infectious diseases.

10. LAIČKI SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

Genetic part in the risk of acquiring infectious disease: the role of rare genetic variants

Lay summary in English

Infectious diseases continue to cause a great deal of illness and death. People do not respond in the same way: some recover easily, while others develop more severe disease. Part of these differences has a genetic basis. DNA analysis was performed in 4,624 adults from the “10,001 Dalmatians” study for 14 infection-related traits (e.g., tuberculosis, pneumonia, meningitis, hepatitis, respiratory and gastrointestinal infections). 29 genetic signals associated with the infection traits were found. Most of these variants are located in non-coding regions of DNA, which regulate the activity of nearby genes; one variant altered a protein and was associated with tuberculosis. Many of the implicated genes are involved in the immune response and the body’s defenses. The results confirm that our genes help determine susceptibility to infections. In the future, such knowledge could aid prevention (e.g., targeted vaccination or closer monitoring of people at higher risk) and the development of new therapies by pointing to key biological pathways in infectious diseases.

11. LITERATURA

1. Morens DM, Fauci AS. Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. *Cell*. 2020;183(3):837.
2. Mesquita JR. Emerging and Re-Emerging Diseases: Novel Challenges in Today's World or More of the Same? *Animals (Basel)*. 2021;11(8).
3. Vignier N, Bouchaud O. Travel, Migration and Emerging Infectious Diseases. *EJIFCC*. 2018;29(3):175-9.
4. Sigerist HE. The great doctors; a biographical history of medicine. 3rd ed: New York, Dover Publications; 1971.
5. Garrett L. In: J. M. Mann DJMT, and T. W. Netter, editor. *AIDS in the World*. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1992. p. 825 - 39.
6. Black RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*. 2003;361(9376):2226-34.
7. Standing up to infectious disease. *Nat Microbiol*. 2019;4(1):1.
8. In: Lederberg J, Shope RE, Oaks SC, Jr., editors. *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. Washington (DC)1992.
9. Bernasconi V, Kristiansen PA, Whelan M, Roman RG, Bettis A, Yimer SA, et al. Developing vaccines against epidemic-prone emerging infectious diseases. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2020;63(1):65-73.
10. Chen Y, Xu Z, Wang P, Li XM, Shuai ZW, Ye DQ, et al. New-onset autoimmune phenomena post-COVID-19 vaccination. *Immunology*. 2022;165(4):386-401.
11. Collaborators C-EM. Estimating excess mortality due to the COVID-19 pandemic: a systematic analysis of COVID-19-related mortality, 2020-21. *Lancet*. 2022;399(10334):1513-36.
12. Fauci AS, Morens DM. The perpetual challenge of infectious diseases. *N Engl J Med*. 2012;366(5):454-61.
13. Fumagalli M, Sironi M, Pozzoli U, Ferrer-Admetlla A, Pattini L, Nielsen R. Signatures of environmental genetic adaptation pinpoint pathogens as the main selective pressure through human evolution. *PLoS Genet*. 2011;7(11):e1002355.
14. Karlsson EK, Kwiatkowski DP, Sabeti PC. Natural selection and infectious disease in human populations. *Nat Rev Genet*. 2014;15(6):379-93.
15. Casanova JL, Abel L. The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2013;14:215-43.
16. Casanova JL, Abel L. Human genetics of infectious diseases: a unified theory. *EMBO J*. 2007;26(4):915-22.

17. Casanova JL, Abel L. Lethal Infectious Diseases as Inborn Errors of Immunity: Toward a Synthesis of the Germ and Genetic Theories. *Annu Rev Pathol.* 2021;16:23-50.
18. Casanova JL. Human genetic basis of interindividual variability in the course of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(51):E7118-27.
19. Alcais A, Quintana-Murci L, Thaler DS, Schurr E, Abel L, Casanova JL. Life-threatening infectious diseases of childhood: single-gene inborn errors of immunity? *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1214:18-33.
20. Koo S, Marty FM, Baden LR. Infectious complications associated with immunomodulating biologic agents. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2011;25(1):117-38.
21. Naniche D, Oldstone MB. Generalized immunosuppression: how viruses undermine the immune response. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(10):1399-407.
22. Petrova VN, Sawatsky B, Han AX, Laksono BM, Walz L, Parker E, et al. Incomplete genetic reconstitution of B cell pools contributes to prolonged immunosuppression after measles. *Sci Immunol.* 2019;4(41).
23. Bourke CD, Berkley JA, Prendergast AJ. Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. *Trends Immunol.* 2016;37(6):386-98.
24. Yaguchi T, Kawakami Y. Cancer-induced heterogeneous immunosuppressive tumor microenvironments and their personalized modulation. *Int Immunol.* 2016;28(8):393-9.
25. Borghesi A, Marzollo A, Michev A, Fellay J. Susceptibility to infection in early life: a growing role for human genetics. *Hum Genet.* 2020;139(6-7):733-43.
26. Casanova JL. Severe infectious diseases of childhood as monogenic inborn errors of immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(51):E7128-37.
27. Notarangelo L, Casanova JL, Conley ME, Chapel H, Fischer A, Puck J, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest, 2005. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(4):883-96.
28. Hill AV. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet.* 2006;40:469-86.
29. Wright A, Charlesworth B, Rudan I, Carothers A, Campbell H. A polygenic basis for late-onset disease. *Trends Genet.* 2003;19(2):97-106.

30. Schmidt RE, Grimbacher B, Witte T. Autoimmunity and primary immunodeficiency: two sides of the same coin? *Nat Rev Rheumatol.* 2017;14(1):7-18.
31. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Ailal F, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, et al. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol.* 2018;38(1):129-43.
32. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2020;40(1):24-64.
33. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol.* 2014;5:162.
34. Casanova JL, Abel L. Inborn errors of immunity to infection: the rule rather than the exception. *J Exp Med.* 2005;202(2):197-201.
35. Casanova JL, Fieschi C, Bustamante J, Reichenbach J, Remus N, von Bernuth H, et al. From idiopathic infectious diseases to novel primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(2):426-30.
36. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics.* 1952;9(6):722-8.
37. Buckley RH. Conversations with Founders of the Field of Human Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol.* 2020;40(1):1-8.
38. Lutz W. [About verruciform epidermodysplasia]. *Dermatologica.* 1946;92(1):30-43.
39. Myerson RM, Koelle WA. Congenital absence of the spleen in an adult; report of a case associated with recurrent Waterhouse-Friderichsen syndrome. *N Engl J Med.* 1956;254(24):1131-2.
40. Hitzig WH, Biro Z, Bosch H, Huser HJ. [Agammaglobulinemia & alymphocytosis with atrophy of lymphatic tissue]. *Helv Paediatr Acta.* 1958;13(6):551-85.
41. Kirkpatrick JA, Jr., DiGeorge AM. Congenital absence of the thymus. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 1968;103(1):32-7.
42. Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science.* 2007;317(5838):617-9.
43. Azizi G, Abolhassani H, Asgardoost MH, Alinia T, Yazdani R, Mohammadi J, et al. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: epidemiology, pathophysiology and management. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017;13(2):101-15.

44. Amaya-Urbe L, Rojas M, Azizi G, Anaya JM, Gershwin ME. Primary immunodeficiency and autoimmunity: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2019;99:52-72.
45. Rosen FS, Pensky J, Donaldson V, Charache P. Hereditary Angioneurotic Edema: Two Genetic Variants. *Science.* 1965;148(3672):957-8.
46. Agnello V, De Bracco MM, Kunkel HG. Hereditary C2 deficiency with some manifestations of systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1972;108(3):837-40.
47. Hill HR, Quie PG. Raised serum-IgE levels and defective neutrophil chemotaxis in three children with eczema and recurrent bacterial infections. *Lancet.* 1974;1(7850):183-7.
48. Peterson RD, Kelly WD, Good RA. Ataxia-Telangiectasia. Its Association with a Defective Thymus, Immunological-Deficiency Disease, and Malignancy. *Lancet.* 1964;1(7344):1189-93.
49. Casanova JL, Abel L. The human genetic determinism of life-threatening infectious diseases: genetic heterogeneity and physiological homogeneity? *Hum Genet.* 2020;139(6-7):681-94.
50. Orth G. Host defenses against human papillomaviruses: lessons from epidermodysplasia verruciformis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;321:59-83.
51. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:581-620.
52. Bustamante J. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: recent discoveries. *Hum Genet.* 2020;139(6-7):993-1000.
53. Li J, Vinh DC, Casanova JL, Puel A. Inborn errors of immunity underlying fungal diseases in otherwise healthy individuals. *Curr Opin Microbiol.* 2017;40:46-57.
54. Purtilo DT, DeFlorio D, Jr., Hutt LM, Bhawan J, Yang JP, Otto R, et al. Variable phenotypic expression of an X-linked recessive lymphoproliferative syndrome. *N Engl J Med.* 1977;297(20):1077-80.
55. Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature.* 1998;395(6701):462-9.
56. Canales L, Middlemas RO, 3rd, Louro JM, South MA. Immunological observations in chronic mucocutaneous candidiasis. *Lancet.* 1969;2(7620):567-71.

57. Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, Pintus G, Abou-Saleh H, Nasrallah GK. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol.* 2018;8:211.
58. Brodin P, Jojic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJ, Furman D, et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell.* 2015;160(1-2):37-47.
59. Frodsham AJ, Hill AV. Genetics of infectious diseases. *Hum Mol Genet.* 2004;13 Spec No 2:R187-94.
60. Walsh EC, Sabeti P, Hutcheson HB, Fry B, Schaffner SF, de Bakker PI, et al. Searching for signals of evolutionary selection in 168 genes related to immune function. *Hum Genet.* 2006;119(1-2):92-102.
61. Tishkoff SA, Dietzsch E, Speed W, Pakstis AJ, Kidd JR, Cheung K, et al. Global patterns of linkage disequilibrium at the CD4 locus and modern human origins. *Science.* 1996;271(5254):1380-7.
62. Sabeti PC, Reich DE, Higgins JM, Levine HZ, Richter DJ, Schaffner SF, et al. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature.* 2002;419(6909):832-7.
63. Kwok AJ, Mentzer A, Knight JC. Host genetics and infectious disease: new tools, insights and translational opportunities. *Nat Rev Genet.* 2021;22(3):137-53.
64. Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13(3):175-88.
65. Murphy PM. Molecular mimicry and the generation of host defense protein diversity. *Cell.* 1993;72(6):823-6.
66. Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR, Potts WK. The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol.* 1997;17(2):179-224.
67. Burgner D, Jamieson SE, Blackwell JM. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis.* 2006;6(10):653-63.
68. Torkamani A, Wineinger NE, Topol EJ. The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nat Rev Genet.* 2018;19(9):581-90.
69. Hill AV. Evolution, revolution and heresy in the genetics of infectious disease susceptibility. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012;367(1590):840-9.
70. Pare G, Neupane B, Eskandarian S, Harris E, Halstead S, Gresh L, et al. Genetic risk for dengue hemorrhagic fever and dengue fever in multiple ancestries. *EBioMedicine.* 2020;51:102584.

71. Allison AC. Population genetics of abnormal human haemoglobins. *Acta Genet Stat Med.* 1956;6(3):431-4.
72. Patarcic I, Gelemanovic A, Kirin M, Kolcic I, Theodoratou E, Baillie KJ, et al. The role of host genetic factors in respiratory tract infectious diseases: systematic review, meta-analyses and field synopsis. *Sci Rep.* 2015;5:16119.
73. Wellcome Trust Case Control C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447(7145):661-78.
74. Dawn Teare M, Barrett JH. Genetic linkage studies. *Lancet.* 2005;366(9490):1036-44.
75. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2006;38(2):209-13.
76. Stankovich J, Cox CJ, Tan RB, Montgomery DS, Huxtable SJ, Rubio JP, et al. On the utility of data from the International HapMap Project for Australian association studies. *Hum Genet.* 2006;119(1-2):220-2.
77. de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet.* 2005;37(11):1217-23.
78. Thye T, Vannberg FO, Wong SH, Owusu-Dabo E, Osei I, Gyapong J, et al. Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nat Genet.* 2010;42(9):739-41.
79. Chimusa ER, Zaitlen N, Daya M, Moller M, van Helden PD, Mulder NJ, et al. Genome-wide association study of ancestry-specific TB risk in the South African Coloured population. *Hum Mol Genet.* 2014;23(3):796-809.
80. Jallow M, Teo YY, Small KS, Rockett KA, Deloukas P, Clark TG, et al. Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. *Nat Genet.* 2009;41(6):657-65.
81. Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med.* 2009;361(27):2609-18.
82. Thye T, Owusu-Dabo E, Vannberg FO, van Crevel R, Curtis J, Sahiratmadja E, et al. Common variants at 11p13 are associated with susceptibility to tuberculosis. *Nat Genet.* 2012;44(3):257-9.
83. Gorlov IP, Gorlova OY, Frazier ML, Spitz MR, Amos CI. Evolutionary evidence of the effect of rare variants on disease etiology. *Clin Genet.* 2011;79(3):199-206.

84. Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(5):325-39.
85. Karnes JH, Bastarache L, Shaffer CM, Gaudieri S, Xu Y, Glazer AM, et al. Phenome-wide scanning identifies multiple diseases and disease severity phenotypes associated with HLA variants. *Sci Transl Med.* 2017;9(389).
86. Fang H, Consortium U-D, De Wolf H, Knezevic B, Burnham KL, Osgood J, et al. A genetics-led approach defines the drug target landscape of 30 immune-related traits. *Nat Genet.* 2019;51(7):1082-91.
87. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med.* 1996;2(11):1240-3.
88. Arevalo-Herrera M, Castellanos A, Yazdani SS, Shakri AR, Chitnis CE, Dominik R, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant vaccine based on the receptor-binding domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in *Aotus* monkeys. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(5 Suppl):25-31.
89. Petersen KA, Matthiesen F, Agger T, Kongerslev L, Thiel S, Cornelissen K, et al. Phase I safety, tolerability, and pharmacokinetic study of recombinant human mannan-binding lectin. *J Clin Immunol.* 2006;26(5):465-75.
90. Marmot M. Social determinants of health inequalities. *Lancet.* 2005;365(9464):1099-104.
91. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet.* 2002;31(4):429-34.
92. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med.* 2002;4(2):45-61.
93. Comstock GW. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Respir Dis.* 1978;117(4):621-4.
94. Rovers M, Haggard M, Gannon M, Koeppen-Schomerus G, Plomin R. Heritability of symptom domains in otitis media: a longitudinal study of 1,373 twin pairs. *Am J Epidemiol.* 2002;155(10):958-64.
95. Lin TM, Chen CJ, Wu MM, Yang CS, Chen JS, Lin CC, et al. Hepatitis B virus markers in Chinese twins. *Anticancer Res.* 1989;9(3):737-41.

96. de Craen AJ, Posthuma D, Remarque EJ, van den Biggelaar AH, Westendorp RG, Boomsma DI. Heritability estimates of innate immunity: an extended twin study. *Genes Immun.* 2005;6(2):167-70.
97. Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med.* 1994;120(12):982-6.
98. Navarro P, Vitart V, Hayward C, Tenesa A, Zgaga L, Juricic D, et al. Genetic comparison of a Croatian isolate and CEPH European founders. *Genet Epidemiol.* 2010;34(2):140-5.
99. Peloso GM, Auer PL, Bis JC, Voorman A, Morrison AC, Stitzel NO, et al. Association of low-frequency and rare coding-sequence variants with blood lipids and coronary heart disease in 56,000 whites and blacks. *Am J Hum Genet.* 2014;94(2):223-32.
100. Pattaro C, Kottgen A, Teumer A, Garnaas M, Boger CA, Fuchsberger C, et al. Genome-wide association and functional follow-up reveals new loci for kidney function. *PLoS Genet.* 2012;8(3):e1002584.
101. Okada Y, Sim X, Go MJ, Wu JY, Gu D, Takeuchi F, et al. Meta-analysis identifies multiple loci associated with kidney function-related traits in east Asian populations. *Nat Genet.* 2012;44(8):904-9.
102. Tian C, Hromatka BS, Kiefer AK, Eriksson N, Noble SM, Tung JY, et al. Genome-wide association and HLA region fine-mapping studies identify susceptibility loci for multiple common infections. *Nat Commun.* 2017;8(1):599.
103. Rudan I, Marusic A, Jankovic S, Rotim K, Boban M, Lauc G, et al. "10001 Dalmatians:" Croatia launches its national biobank. *Croat Med J.* 2009;50(1):4-6.
104. Rudan I, Campbell H, Rudan P. Genetic epidemiological studies of eastern Adriatic Island isolates, Croatia: objective and strategies. *Coll Antropol.* 1999;23(2):531-46.
105. Vitart V, Biloglav Z, Hayward C, Janicijevic B, Smolej-Narancic N, Barac L, et al. 3000 years of solitude: extreme differentiation in the island isolates of Dalmatia, Croatia. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(4):478-87.
106. Jeroncic A, Memari Y, Ritchie GR, Hendricks AE, Kolb-Kokocinski A, Matchan A, et al. Whole-exome sequencing in an isolated population from the Dalmatian island of Vis. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(10):1479-87.

107. Knezevic A, Polasek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, et al. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *J Proteome Res.* 2009;8(2):694-701.
108. Landini A, Trbojevic-Akmacic I, Navarro P, Tsepilov YA, Sharapov SZ, Vuckovic F, et al. Genetic regulation of post-translational modification of two distinct proteins. *Nat Commun.* 2022;13(1):1586.
109. Shen X, Klaric L, Sharapov S, Mangino M, Ning Z, Wu D, et al. Multivariate discovery and replication of five novel loci associated with Immunoglobulin G N-glycosylation. *Nat Commun.* 2017;8(1):447.
110. Benedetti E, Pucic-Bakovic M, Keser T, Wahl A, Hassinen A, Yang JY, et al. Network inference from glycoproteomics data reveals new reactions in the IgG glycosylation pathway. *Nat Commun.* 2017;8(1):1483.
111. Bucan I, Skunca Herman J, Jeroncic Tomic I, Gornik O, Vatauvuk Z, Bucan K, et al. N-Glycosylation Patterns across the Age-Related Macular Degeneration Spectrum. *Molecules.* 2022;27(6).
112. Karjalainen MK, Karthikeyan S, Oliver-Williams C, Sliz E, Allara E, Fung WT, et al. Genome-wide characterization of circulating metabolic biomarkers. *Nature.* 2024;628(8006):130-8.
113. Kleinstein SE, Shea PR, Allen AS, Koelle DM, Wald A, Goldstein DB. Genome-wide association study (GWAS) of human host factors influencing viral severity of herpes simplex virus type 2 (HSV-2). *Genes Immun.* 2019;20(2):112-20.
114. Bhattacharyya C, Majumder PP, Pandit B. An exome wide association study of pulmonary tuberculosis patients and their asymptomatic household contacts. *Infect Genet Evol.* 2019;71:76-81.
115. Moreau K, Clemenceau A, Le Moing V, Messika-Zeitoun D, Andersen PS, Bruun NE, et al. Human Genetic Susceptibility to Native Valve Staphylococcus aureus Endocarditis in Patients With S. aureus Bacteremia: Genome-Wide Association Study. *Front Microbiol.* 2018;9:640.
116. Lees JA, Ferwerda B, Kremer PHC, Wheeler NE, Seron MV, Croucher NJ, et al. Joint sequencing of human and pathogen genomes reveals the genetics of pneumococcal meningitis. *Nat Commun.* 2019;10(1):2176.
117. Omae Y, Toyo-Oka L, Yanai H, Nedsuwan S, Wattanapokayakit S, Satproedprai N, et al. Pathogen lineage-based genome-wide association study identified CD53 as susceptible locus in tuberculosis. *J Hum Genet.* 2017;62(12):1015-22.

118. McClellan J, King MC. Genetic heterogeneity in human disease. *Cell*. 2010;141(2):210-7.
119. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020;370(6515).
120. Initiative C-HG. Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature*. 2021;600(7889):472-7.
121. Delaneau O, Zagury JF, Marchini J. Improved whole-chromosome phasing for disease and population genetic studies. *Nat Methods*. 2013;10(1):5-6.
122. O'Connell J, Gurdasani D, Delaneau O, Pirastu N, Ulivi S, Cocca M, et al. A general approach for haplotype phasing across the full spectrum of relatedness. *PLoS Genet*. 2014;10(4):e1004234.
123. McCarthy S, Das S, Kretzschmar W, Delaneau O, Wood AR, Teumer A, et al. A reference panel of 64,976 haplotypes for genotype imputation. *Nat Genet*. 2016;48(10):1279-83.
124. Aulchenko YS, Ripke S, Isaacs A, van Duijn CM. GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics*. 2007;23(10):1294-6.
125. Haller T, Kals M, Esko T, Magi R, Fischer K. RegScan: a GWAS tool for quick estimation of allele effects on continuous traits and their combinations. *Brief Bioinform*. 2015;16(1):39-44.
126. Svishcheva GR, Axenovich TI, Belonogova NM, van Duijn CM, Aulchenko YS. Rapid variance components-based method for whole-genome association analysis. *Nat Genet*. 2012;44(10):1166-70.
127. Winkler TW, Day FR, Croteau-Chonka DC, Wood AR, Locke AE, Magi R, et al. Quality control and conduct of genome-wide association meta-analyses. *Nat Protoc*. 2014;9(5):1192-212.
128. Willer CJ, Li Y, Abecasis GR. METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics*. 2010;26(17):2190-1.
129. Tin A, Marten J, Halperin Kuhns VL, Li Y, Wuttke M, Kirsten H, et al. Target genes, variants, tissues and transcriptional pathways influencing human serum urate levels. *Nat Genet*. 2019;51(10):1459-74.
130. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D930-4.

131. Durinck S, Moreau Y, Kasprzyk A, Davis S, De Moor B, Brazma A, et al. BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Bioinformatics*. 2005;21(16):3439-40.
132. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc*. 2009;4(8):1184-91.
133. Staley JR, Blackshaw J, Kamat MA, Ellis S, Surendran P, Sun BB, et al. PhenoScanner: a database of human genotype-phenotype associations. *Bioinformatics*. 2016;32(20):3207-9.
134. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D447-52.
135. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13(11):2498-504.
136. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Kazi F, Wright G, Donaldson SL, et al. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics*. 2010;26(22):2927-8.
137. Rosenberg NA, Huang L, Jewett EM, Szpiech ZA, Jankovic I, Boehnke M. Genome-wide association studies in diverse populations. *Nat Rev Genet*. 2010;11(5):356-66.
138. Picard C, Casanova JL, Abel L. Mendelian traits that confer predisposition or resistance to specific infections in humans. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(4):383-90.
139. Hrdlickova B, de Almeida RC, Borek Z, Withoff S. Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(10):1910-22.
140. Edwards SL, Beesley J, French JD, Dunning AM. Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function. *Am J Hum Genet*. 2013;93(5):779-97.
141. Heshmatzad K, Naderi N, Maleki M, Abbasi S, Ghasemi S, Ashrafi N, et al. Role of non-coding variants in cardiovascular disease. *J Cell Mol Med*. 2023;27(12):1621-36.
142. Haberle V, Stark A. Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(10):621-37.
143. Davidson AE, Liskova P, Evans CJ, Dudakova L, Noskova L, Pontikos N, et al. Autosomal-Dominant Corneal Endothelial Dystrophies CHED1 and PPCD1 Are

- Allelic Disorders Caused by Non-coding Mutations in the Promoter of OVOL2. *Am J Hum Genet.* 2016;98(1):75-89.
144. Hartman P, Beckman K, Silverstein K, Yohe S, Schomaker M, Henzler C, et al. Next generation sequencing for clinical diagnostics: Five year experience of an academic laboratory. *Mol Genet Metab Rep.* 2019;19:100464.
 145. Sakharkar MK, Chow VT, Kanguane P. Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol.* 2004;4(4):387-93.
 146. Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M, Lathrop M. Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat Rev Genet.* 2009;10(3):184-94.
 147. Honda M, Yamashita T, Yamashita T, Arai K, Sakai Y, Sakai A, et al. Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2013;13:191.
 148. Ramachandran S, Ilias Basha H, Sarma NJ, Lin Y, Crippin JS, Chapman WC, et al. Hepatitis C virus induced miR200c down modulates FAP-1, a negative regulator of Src signaling and promotes hepatic fibrosis. *PLoS One.* 2013;8(8):e70744.
 149. Dawood RM, El-Meguid MA, Ibrahim MK, Bader El Din NG, Barakat A, El-Wakeel K, et al. Dysregulation of fibrosis related genes in HCV induced liver disease. *Gene.* 2018;664:58-69.
 150. Shi JY, Xing Q, Duan M, Wang ZC, Yang LX, Zhao YJ, et al. Inferring the progression of multifocal liver cancer from spatial and temporal genomic heterogeneity. *Oncotarget.* 2016;7(3):2867-77.
 151. Qiao Y, Chen J, Lim YB, Finch-Edmondson ML, Seshachalam VP, Qin L, et al. YAP Regulates Actin Dynamics through ARHGAP29 and Promotes Metastasis. *Cell Rep.* 2017;19(8):1495-502.
 152. Wei XL, Qiu MZ, Jin Y, Huang YX, Wang RY, Chen WW, et al. Hepatitis B virus infection is associated with gastric cancer in China: an endemic area of both diseases. *Br J Cancer.* 2015;112(7):1283-90.
 153. Chauhan R, Churchill ND, Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Initial sites of hepadnavirus integration into host genome in human hepatocytes and in the woodchuck model of hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma. *Oncogenesis.* 2017;6(4):e317.
 154. Starakis I, Panos G, Koutras A, Mazokopakis EE. Pathogens and chronic or long-term neurologic disorders. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2011;11(1):40-52.

155. Karim S, Mirza Z, Kamal MA, Abuzenadah AM, Azhar EI, Al-Qahtani MH, et al. The role of viruses in neurodegenerative and neurobehavioral diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(7):1213-23.
156. Alam MZ, Alam Q, Kamal MA, Jiman-Fatani AA, Azhar EI, Khan MA, et al. Infectious Agents and Neurodegenerative Diseases: Exploring the Links. *Curr Top Med Chem*. 2017;17(12):1390-9.
157. Song H, Seishima M, Saito K, Maeda S, Takemura M, Noma A, et al. Apo A-I and apo E concentrations in cerebrospinal fluids of patients with acute meningitis. *Ann Clin Biochem*. 1998;35 (Pt 3):408-14.
158. Wang C, Wang Y, Wang A, Fu P, Yang Y. The diagnostic value of apolipoprotein E in pediatric patients with invasive bacterial infections. *Clin Biochem*. 2012;45(3):215-8.
159. Yao X, Gordon EM, Figueroa DM, Barochia AV, Levine SJ. Emerging Roles of Apolipoprotein E and Apolipoprotein A-I in the Pathogenesis and Treatment of Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55(2):159-69.
160. Li L, Thompson PA, Kitchens RL. Infection induces a positive acute phase apolipoprotein E response from a negative acute phase gene: role of hepatic LDL receptors. *J Lipid Res*. 2008;49(8):1782-93.
161. Lin Q, Cao Y, Gao J. Decreased expression of the APOA1-APOC3-APOA4 gene cluster is associated with risk of Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:5421-31.
162. Heyes S, Pratt WS, Rees E, Dahimene S, Ferron L, Owen MJ, et al. Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders. *Prog Neurobiol*. 2015;134:36-54.
163. Fischer MT, Wimmer I, Hoftberger R, Gerlach S, Haider L, Zrzavy T, et al. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain*. 2013;136(Pt 6):1799-815.
164. Perrin PJ, Lavi E, Rumbley CA, Zekavat SA, Phillips SM. Experimental autoimmune meningitis: a novel neurological disease in CD28-deficient mice. *Clin Immunol*. 1999;91(1):41-9.
165. Perrin PJ, June CH, Maldonado JH, Ratts RB, Racke MK. Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1999;163(3):1704-10.

166. Pouillon V, Marechal Y, Fripiat C, Erneux C, Schurmans S. Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B (Itpkb) controls survival, proliferation and cytokine production in mouse peripheral T cells. *Adv Biol Regul.* 2013;53(1):39-50.
167. Westernberg L, Conche C, Huang YH, Rigaud S, Deng Y, Siegemund S, et al. Non-canonical antagonism of PI3K by the kinase Itpkb delays thymocyte beta-selection and renders it Notch-dependent. *Elife.* 2016;5.
168. Cai L, Wang Y, Wang JF, Chou KC. Identification of proteins interacting with human SP110 during the process of viral infections. *Med Chem.* 2011;7(2):121-6.
169. Shamay M, Barak O, Doitsh G, Ben-Dor I, Shaul Y. Hepatitis B virus pX interacts with HBXAP, a PHD finger protein to coactivate transcription. *J Biol Chem.* 2002;277(12):9982-8.
170. Khong JJ, Burdon KP, Lu Y, Leonardos L, Laurie KJ, Walsh JP, et al. Association of Polymorphisms in MACRO Domain Containing 2 With Thyroid-Associated Orbitopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(7):3129-37.
171. Soini Y, Kosma VM, Pirinen R. KDM4A, KDM4B and KDM4C in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(10):12922-8.
172. Zhu J, Deng L, Chen B, Huang W, Lin X, Chen G, et al. Magnesium-dependent Phosphatase (MDP) 1 is a Potential Suppressor of Gastric Cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2019;19(10):817-27.
173. Wojcik GL, Graff M, Nishimura KK, Tao R, Haessler J, Gignoux CR, et al. Genetic analyses of diverse populations improves discovery for complex traits. *Nature.* 2019;570(7762):514-8.
174. Russell RK, Satsangi J, Wilson DC. More pediatric NOD2/CARD data. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(7):1401; author reply 2.
175. Russell RK, Wilson DC, Satsangi J. Unravelling the complex genetics of inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child.* 2004;89(7):598-603.
176. Polasek O. Future of biobanks - bigger, longer, and more dimensional. *Croat Med J.* 2013;54(5):496-500.
177. Bastarache L, Denny JC, Roden DM. Phenome-Wide Association Studies. *JAMA.* 2022;327(1):75-6.
178. Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, Malangone C, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1005-D12.

179. Broekema RV, Bakker OB, Jonkers IH. A practical view of fine-mapping and gene prioritization in the post-genome-wide association era. *Open Biol.* 2020;10(1):190221.
180. Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, Boyd M, et al. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature.* 2014;507(7493):455-61.
181. Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, et al. The Human Transcription Factors. *Cell.* 2018;175(2):598-9.
182. Tak YG, Farnham PJ. Making sense of GWAS: using epigenomics and genome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8:57.

12. ŽIVOTOPIS

Tatjana Čatipović Ardalić, dr. med.

Zavod za intenzivnu pedijatriju s postintenzivnom skrbi

Klinika za dječje bolesti

Klinički bolnički centar Split

Spinčićeva 1, 21000 Split, Hrvatska

Telefon: 00385 (0) 21 556 – 686

Mobitel: 00385 (0) 91 131 1279

e-mail: tatjana.ardalic13@gmail.com, tatjana.catipovic-ar@kbsplit.hr

Osobni podaci

Datum rođenja: 7. rujna 1980.

Mjesto rođenja: Split, Republika Hrvatska

Edukacija

1.1.2017. – 10.2.2020. Uža specijalizacija iz područja pedijatrijske hitne i intenzivne medicine.

2012. – 2013. Poslijediplomski stručni studij – "Pedijatrija", Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

1.1.2010. – 5.9.2016. Specijalizacija iz Pedijatrije

2010. – 2013. Poslijediplomski znanstveni studij "Klinička medicina utemeljena na dokazima", Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

1999. – 2005. Studij Medicine, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

Radno iskustvo

Od 5.9.2016. Zavod za intenzivnu pedijatriju s postintenzivnom skrbi, Klinika za dječje bolesti, KBC Split

1.12.2010. – 5.9.2016. Specijalizant pedijatrije, Klinika za dječje bolesti, KBC Split

24.6.2007. – 30.11.2010. Zavod za hitnu medicinu Splitsko – dalmatinske županije

4.2006. – 4.2007. Pripravnički staž, Zavod za hitnu medicinu Splitsko – dalmatinske županije

Stručno usavršavanje

- 2025. Indianapolis, USA. Pediatric cardiology and critical care medicine, Indiana University Health – Riley Children's hospital. Edukacija iz područja hitne i intenzivne pedijatrijske i neonatalne medicine.
- 2025. Split, Hrvatska. Kontinuirano nadomještanje bubrežne funkcije u intenzivnoj jedinici – CRRT akademija.
- 2024. Rome, Italy. VOLT – 6th LAUNCH Congress Vital Monitoring & Ultrasound
- 2023. Sveti Martin na Muri, Hrvatska. Nutricija u pedijatriji. Edukacija o prehrani djece.
- 2022. Zagreb, Hrvatska. WINFOCUS World Congress, (WF WC 2022). The Pocus One-world Workshop. Edukacija iz ultrazvuka srca u hitnim stanjima.
- 2019. Napoli, Italia. European Respiratory Society Skills course, Paediatric bronchoscopy; Edukacija iz pedijatrijske bronhoskopije.
- 2019. Ljubljana, Slovenia. Univerzitetni klinični centar v Ljubljani, Klinički oddelek za otroško kirurgiju in intenzivno terapijo (KOOKIT); Edukacija iz područja pedijatrijske intenzivne medicine.
- 2019. Graz, Austria. Universitätsklinikum Graz, Gemeinsame Einrichtung für pädiatrische Intensivmedizin; Edukacija iz područja kontinuiranog bubrežnog nadomjesnog liječenja u djece.
- 2018. Traunstein, Austria. Workshop in neonatal ventilation. Edukacija iz neonatalne ventilacije.
- 2014. Split i Rijeka, Hrvatska. Advances in treating a patient with acute renal injury in the intensive care units. Edukacija iz liječenja akutne bubrežne ozljede.

- 2013. Split, Hrvatska, “Aiming to increase the awareness about ionizing radiation risk and the need to protect patients”. Edukacija o štetnosti zračenja.
- 2012. Split, Hrvatska. Workshop for Editors, Publishing integrity in the digital age. Edukacija za urednike znanstvenih časopisa.
- 2012. Split, Hrvatska. “Genetičko svjetovanje u praksi” u organizaciji EuroMediterranean University Center of Ronzano, Bologna, Italy.
- 2012. Vienna, Austria. Scientific congress of the European resuscitation council.
- 2011. Salzburg, Austria. American Austrian Foundation & Children's Hospital of Philadelphia (CHOP). Edukacija iz pedijatrijske hitne medicine.
- 2011. Split, Hrvatska. The second international Signa Vitae Conference in Pediatric/Neonatal Intensive care and anesthesiology.
- Od 2011. Split, Hrvatska. Hrvatska proljetna pedijatrijska škola, redoviti polaznik.
- 2010. Maribor, Slovenija. First CPR Summit. Edukacija o kardiopulmonalnoj reanimaciji.
- 2010. Zagreb, Hrvatska. Winfocus Ultrasound life support USLS BL1P Course. Edukacija iz područja ultrazvuka u primarnoj, hitnoj i intenzivnoj medicine
- 2010. Split, Hrvatska. Drugi hrvatski Cochrane simpozij. Edukacija iz pisanja preglednih članaka.
- 2010. Rijeka, Hrvatska. Advanced Pediatric and Adult Life Support, full instructor. Položen ispit za instruktura naprednog održavanja života djece i odraslih.
- 2009. Zadar, Hrvatska. Generic Instructor Course, ALSG European Resuscitation Council. Edukacija za instruktore naprednog održavanja života.
- 2008. Zagreb, Hrvatska, Advance Life Support Group; Tečaj: Advanced Pediatric Life Support
- 2007. Split, Hrvatska, Advance Life Support. Tečaj naprednog održavanja života odraslih.

Sudjelovanje u kliničkim i znanstvenim projektima

- 2025. Znanstveni projekt „Probudi heroja“ u organizaciji Sekcije za Kliničke vještine Medicinskog fakulteta u Splitu. Edukacija nastavnika i učenika osnovnih škole osnovnim mjerama održavanja života. Voditelj projekta prof. dr. sc. Julije Meštrović.

- 2020. – 2021. Pediatric Viral Infection and Respiratory Illness Universal Study [pVIRUS]: COVID19 Registry – Mayo Clinic - ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04323787
- 2009. – 2013. Znanstveni projekt „Djeca s posebnim zdravstvenim potrebama“ pod pokroviteljstvom Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta. Voditelj projekta prof. dr. sc. Julije Meštrović
- 2010. Znanstveni projekt „Živi bili“, pod pokroviteljstvom Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta. Voditelj projekta prof. dr. sc. Drago Rakić

Nastavna djelatnost

- Od 2020. Suradničko zvanje asistenta - područje biomedicine i zdravstva, polje kliničke medicinske znanosti, grana pedijatrija pri Katedri za pedijatriju Medicinskog fakulteta Split.
- Od 2016. Suradničko zvanje naslovnog asistenta - područje biomedicine i zdravstva, polje temeljne medicinske znanosti, pri Katedri za kliničke vještine Medicinskog fakulteta Split.

Sudjelovanje u nastavi

I. Dodiplomska nastava

- Sudjelovanje u nastavi na kolegijima Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Splitu:

Pedijatrija (studij Medicine)

Pediatrics (studij Medicine na engleskom)

Pedijatrija (studij Dentalne medicine)

Kliničke vještine I i II (studij Medicine)

Clinical Skills I i II (studij Medicine na engleskom jeziku)

- Sudjelovanje u nastavi na kolegiju Odjela zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu: Anesteziologija, reanimatologija i intenzivno liječenje (Smjer Sestrinstvo i Primaljstvo)

II. Poslijediplomska nastava

- Medicinski fakultet u Splitu; Specijalistički studij Pedijatrija, akademska godina 2023./24. – nastava na kolegijima Neonatologija, Hitna i intenzivna medicina, Metabolizam i Pulmologija.
- Medicinski fakultet u Splitu; Specijalistički studij Pedijatrija, akademska godina 2020./21. – nastava na kolegijima Neonatologija i Hitna i intenzivna medicina te izborni predmet: Hipotonija, mišićna slabost - kako prepoznati, kako dijagnosticirati, kako liječiti.
- Od 2020. Tajnica specijalističkog poslijediplomskog studija Pedijatrija, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu.

III. Poslijediplomski tečajevi trajne edukacije

- 2025. Aktivni sudionik 16. kongresa Hrvatskog pedijatrijskog društva, Šibenik, Hrvatska
- 2025. Aktivni sudionik „Adriatic life support weekend“, Split, Hrvatska
- 2025. Aktivni sudionik poslijediplomski tečaj I. kategorije „Prevenција i (ne)farmakološki postupci u ublažavanju perioperacijske anksioznosti i boli u djece: individualizirani pristup temeljen na razvojnoj dobi i zrelosti djeteta“
- 2025. Aktivni sudionik Simpozij "Kardiološki bolesnik u neonatologiji i intenzivnoj medicini". Sv.Martin na Muri, Hrvatska.
- 2024. Predavanje „Glasno i opasno“ – Filozofski fakultet Sveučilišta u Splitu
- 2023. Aktivni sudionik „From influenza infection to lung transplantation: a case report“, ESPNIC, the European Society for Paediatric and Neonatal Critical Care, congress in Athens, Greece.
- 2023. Aktivni sudionik „Frandsip in May“ – edukacija studenata o oživljavanju, Split, Hrvatska
- 2022. Aktivni sudionik „Gljivične infekcije u kritično bolesne djece“, 29. Simpozij intenzivne medicine s međunarodnim sudjelovanjem; Sekcija za pedijatrijsku i

neonatalnu intenzivnu i urgentnu medicinu Hrvatskog pedijatrijskog društva, Brijuni, Hrvatska.

- 2022. Aktivni sudionik „AKI as a rare complication of vasculitis presented as hypertensive toxic-metabolic encephalopathy“ 5th Congress of Mediterranean Kidney Society (MKS), Dubrovnik, Croatia.
- 2021. Aktivni sudionik „Liječenje i prevencija gljivičnih respiracijskih infekcija u kritično bolesne djece“, XXXIII. SIMPOZIJ Hrvatskog društva za pedijatrijsku pulmologiju. Infekcije dišnih puteva u djece i prevencija, Slavonski Brod, Hrvatska.
- 2020. Aktivni sudionik „Zastoj srca i temeljni postupci oživljavanja srca“. HPPŠ, Hrvatska proljetna pedijatrijska škola, Split, Hrvatska.
- 2019. Aktivni sudionik „Practical knowledge for students“, Split, Hrvatska
- 2018. Aktivni sudionik poslijediplomski tečaj “Pulmološke bolesti i komorbiditeti”, Komiza, Hrvatska
- 2015. Aktivni sudionik „The First Congress of EURYP A organized by European Young Paediatricians’ Association, Istanbul, Turska
- 2013. Aktivni sudionik “Dubrovnik summer school of emergency medicine”, Dubrovnik, Hrvatska
- 2013. Aktivni sudionik poslijediplomski tečaj I. kategorije “Prevencija i liječenje infekcija dišnog sustava”, Komiza, Hrvatska
- 2012. Predavanja telemedicina "Defibrilacija u dječjoj dobi" i "Reanimacija u djece" – Hrvatski Zavod za telemedicinu
- 2012. Aktivni sudionik „Poremećaji srčanog ritma“. Prvi kongres hitne medicine s međunarodnim sudjelovanjem, Trogir, Hrvatska
- 2009. Predavanje „Hitne alergijske bolesti u svakodnevnoj praksi“ - poslijediplomskog tečaja I. kategorije „Hitna stanja u alergologiji“.
- Od 2008. puni instruktor na tečajevima naprednog održavanja djece i odraslih, Hrvatska i Slovenija; od 2022. koordinatorica tečaja Advanced pediatric life support.

Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima

- Gelemanović A, Čatipović Ardalić T, Pribisalić A, Hayward C, Kolčić I, Polašek O. Genome-Wide Meta-Analysis Identifies Multiple Novel Rare Variants to Predict

Common Human Infectious Diseases Risk. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 10;24(8):7006. doi: 10.3390/ijms24087006. PMID: 37108169; PMCID: PMC10138356.

- Kovačević T, Polić B, Markić J, Ardalić Čatipović T, Bucat M, Mikulić S, Žuvan L, Pogorelić Z, Despot R, Žitko V, Meštrović J, Lozić B, Jerončić A. Epidemiology and Treatment Outcomes in Neonates with Esophageal Atresia: A 30-Year Population-Based Study. *Healthcare (Basel).* 2025 Feb 14;13(4):418. doi: 10.3390/healthcare13040418. PMID: 39997293; PMCID: PMC11855674.
- Bulić M, Meštrović J, Brdar I, Čatipović T, Milas H, Jelaska I. Biology Teachers - Educators of Basic Resuscitation Procedures in Schools. *Educatio biologiae [Internet].* 2024;(10):76-82.
- Bjornstad EC, Cutter G, Guru P, Menon S, Aldana I, House S, M Tofil N, St Hill CA, Tarabichi Y, Banner-Goodspeed VM, Christie AB, Mohan SK, Sanghavi D, Mosier JM, Vadgaonkar G, Walkey AJ, Kashyap R, Kumar VK, Bansal V, Boman K, Sharma M, Bogojevic M, Deo N, Retford L, Gajic O, Gist KM; SCCM Discovery VIRUS Investigators Group. SCCM Discovery VIRUS Investigators Group: Jean-Baptiste Mesland, Pierre Henin, Hélène Petre, Isabelle Buelens, Anne-Catherine Gerard, Philippe Clevenbergh, Rolando Claire-Del Granado, Jose A. Mercado, Esdenka Vega-Terrazas, Maria F. Iturricha-Caceres, Dragana Markotić, Ivana Bošnjak, Oscar Y. Gavidia, Felipe Pachon, Yeimy A. Sanchez, Danijel Knežević, Tanja Kovacevic, Josko Markic, Tatjana Catipovic Ardalic, Branka Polic, Ivo Ivić, Dominko Carev, Robert Glavinic, Mohamed El Kassas, Mohamed Badr, Ahmed Tawheed, Ahmed Tawheed, Hend Yahia, et al. SARS-CoV-2 infection increases risk of acute kidney injury in a bimodal age distribution. *BMC Nephrol.* 2022 Feb 11;23(1):63. doi: 10.1186/s12882-022-02681-2. PMID: 35144572; PMCID: PMC8831033.
- Kovačević, T., Tudor, D., Sučić, A., Polić, B., Čatipović Ardalić, T., Pivac, I., & Markić, J. 2024 Apr 27. Paediatric Burns: a Thirteen-year Single-centre Retrospective Study in Croatia. *Central European Journal of Paediatrics.*
- Jeličić Kadić A, Radošević T, Žitko V, Despot R, Pogorelić Z, Llorente Muñoz CM, Runjić E, Kovačević T, Čatipović Ardalić T, Polić B, Markić J. Percutaneous Endoscopic Gastrostomy Tubes Can Be Considered Safe in Children: A Single-Center 11-Year Retrospective Analysis. *Medicina (Kaunas).* 2021 Nov 12;57(11):1236.
- Gabelica M, Tafrā R, Krnić Martinić M, Kontić M, Markić J, Kovačević T, Čulo Čagalj I, Ninčević Ž. Feather foreign body caused periparotid and peritonsillar abscess

in a 9-month- old girl. *Auris Nasus Larynx*. 2021 Oct;48(5):1023-1025. doi: 10.1016/j.anl.2020.05.021. Epub 2020 Jun 11.

- Markić J, Polić B, Kovačević T, Rogulj M, Čatipović Ardalić T. Pediatric Pneumococcal Hemolytic Uremic Syndrome Treated with Sequence Tandem Therapeutic Plasma Exchange and Continuous Venovenous Hemodiafiltration: A Case Report. *Journal of child science*. 2020;10:221-223.
- Burčul I, Arambašić N, Polić B, Kovačević T, Bartulović I, Čatipović Ardalić T, Markić J. Characteristics of Children with Diabetic Ketoacidosis Treated in Pediatric Intensive Care Unit: Two Center Cross-Sectional Study in Croatia. *Medicina-Lithuania*. 2019;55 7:362, 8 doi:10.3390/medicina55070362
- Polić B, Markić J, Kovačević T, Čatipović Ardalić T, Meštrović J. Prehrana novorođenčeta nakon operacijskog zahvata. *Gynaecologia et perinatologia* 2019;28 (Suppl. 2):62-67.
- Polić B, Markić J, Kovačević T, Čatipović Ardalić T, Meštrović J. Kasna nedonoščad. *Paediatr Croat*. 2018;62(Suppl .1):32-38.
- Meštrović J, Polić B, Markić J, Kovačević T, Skelin Glavaš A, Čatipović Ardalić T. Djeca s kroničnim bolestima liječena u Zavodu za intenzivnu pedijatriju KBC Split. 13. kongres Hrvatskog pedijatrijskog društva, Šibenik 11-14.10.2018. *Paediatr Croat*. 2018;62(Suppl. 2):185.
- Meštrović J, Polić B, Markić J, Kovačević T, Čatipović Ardalić T, Skelin Glavaš A. Djeca s ozljedama liječena u Zavodu za intenzivnu pedijatriju KBC Split. 13. kongres Hrvatskog pedijatrijskog društva, Šibenik 11-14.10.2018. *Paediatr Croat*. 2018; 62(Suppl. 2):186.
- Meštrović J, Polić B, Markić J, Meštrović M, Kardum G, Gunjača G, Matas A, Čatipović T, Radonić M. Clinical scoring systems in predicted health-related quality of life of children with injuries. *Coll Antropol* 2013;2:373-7.
- Meštrović J, Milunović P, Skelin A, Čarija R, Čatipović T, Meštrović M, Mujkić A. Djeca s ozljedama liječena u bolničkim ambulantama hitnog prijma. *Liječnički vjesnik: glasilo Hrvatskoga liječničkog zbora*, 134 (2012), 11-12; 305-30.
- Meštrović J, Čatipović T, Polić B, Markić J, Kardum G. Standardizirani omjer smrtnosti skupina bolenika liječenih u jedinici intenzivnog liječenja djece. *Infektološki glasnik* (13312840)29(2009),3;121-24.

- Meštrović J, Ćatipović T, Kardum G, Polić B, Stričević L, Šustić A. Usporedba bodovnih sustava predviđanja smrtnosti u jedinici intenzivnog liječenja djece. Pedijatrija danas. 2007; 3:66-73.

Poglavlja u knjigama

- Basic life support, foreign body airway obstruction and tracheostomy obstruction. Julije Meštrović, Tatjana Ćatipović Ardalić. In: Mestrovic J et al, editors. Pediatric emergencies. Medicnska naklada; Zagreb, 2025.
- Cardiac arrest. Milivoj Novak, Tatjana Ćatipović Ardalić. In: Mestrovic J et al, editors. Pediatric emergencies. Medicnska naklada; Zagreb, 2025.
- Electrolyte imbalance. Tanja Kovačević, Tatjana Ćatipović Ardalić. In: Mestrovic J et al, editors. Pediatric emergencies. Medicnska naklada; Zagreb, 2025.
- Poisoning. Milivoj Novak, Slobodan Galić, Tatjana Ćatipović Ardalić. In: Mestrovic J et al, editors. Pediatric emergencies. Medicnska naklada; Zagreb, 2025.
- Temeljni postupci oživljavanja, gušenje stranim tijelom, začepljenje traheostome. Julije Meštrović, Tatjana Ćatipović Ardalić. U: Meštrović J, urednik. Hitna stanja u pedijatriji. Medicnska naklada; Zagreb, 2020.
- Zastoj srca. Milivoj Novak, Tatjana Ćatipović Ardalić. U: Meštrović J, urednik. Hitna stanja u pedijatriji. Medicnska naklada; Zagreb, 2020.
- Otrovanja. Milivoj Novak, Slobodan Galić, Tatjana Ćatipović Ardalić. U: Meštrović J, urednik. Hitna stanja u pedijatriji. Medicnska naklada; Zagreb, 2020.
- Respiratorne komplikacije kronično bolesne djece u jedinici intenzivnog liječenja. Ćatipović Ardalić T, Polić B, Markić J, Kovačević T, Meštrović J. U: Pavlov N, Perić I, ed. Pulmološke bolesti i komorbiditeti. Split: Sveučilište u Splitu Medicinski fakultet, 2018. str. 26-133.
- Prijevodi poglavlja Merck Manuals Pedijatrija, 2023.
 - Poglavlje 327. Nasljedni metabolički poremećaji
- Prijevodi poglavlja Merck Manuals Pedijatrija, 2019.
 - Poglavlje 308. Bolesti uha, grla i nosa kod djece.
 - Poglavlje 309. Endokrini poremećaji kod djece
 - Poglavlje 319. Juvenilni idiopatski artritis
 - Poglavlje 332. Načela medikamentoznog liječenja djece

- 2006. - 2018. Tajnica potom pomoćnica glavnog urednika časopisa *Signa Vitae*

Nagrade i počasti

- 2012. Vienna, Austria. Scientific congress of the European resuscitation council; dodijeljena Peter Baskett Bursary.
- 2011. Salzburg, Austria. American Austrian Foundation & Children's Hospital of Philadelphia (CHOP); nagrada za najbolju prezentaciju.
- World Competition in Emergency Medicine Rallye Rejviz, 27th – 30th May 2010. Kouty nad Desnou, Czech Republic; osvojeno prvo mjesto.
- 3. International Competition in Emergency medicine, 25th – 27th September 2009. Rogla, Slovenija; osvojeno treće mjesto.
- Participant on the 6th International Emergency Team Contest, Zagreb 31st May 2008 and Šibenik 01th – 02nd June 2008; osvojeno drugo i treće mjesto.
- Dekanova nagrada za izvrsna postignuća tijekom studiranja, ožujak 2006.
- Rektorova nagrada za akademsku godinu 2001/2002.