

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno – matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

Nikolina Špoljarić

**Molekularna istraživanja alela i haplotipova gena**  
**HLA-B\*44 u hrvatskoj populaciji**

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je u Kliničkoj jedinici za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod vodstvom prof.dr.sc. Zorane Grubić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

## **ZAHVALE**

Najiskrenije zahvale želim uputiti svojoj uvaženoj mentorici, prof.dr.sc. Zorani Grubić, na stručnom vodstvu, razumijevanju, predanosti i krajnjoj strpljivosti u radu sa mnom, a osobito na ukazanom povjerenju te znanju koje mi je prenijela. Također, iskreno joj zahvaljujem na susretljivosti i poklonjenom vremenu tijekom izrade ovoga rada. Nadalje, dužnost mi je zahvalu izraziti cijenjenoj mag. biol. mol. Mariji Maskalan na svim korisnim savjetima i pomoći oko izvedbe rada, kao i svim drugim zaposlenicama i zaposlenicima Zavoda za tipizaciju tkiva, bez čije podrške, brige i prijateljskoga pristupa, izrada ovoga rada ne bi bila ovako lijepo i nadasve korisno iskustvo.

Na kraju, zahvaljujem se svojim roditeljima, bratu, dečku i prijateljima koji su mi uz veliku podršku, ljubav i razumijevanje omogućili da studentsko doba kvalitetno i uspješno privedem kraju i otisnem se u nova znanstvena iskušenja.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Molekularna istraživanja alela i haplotipova gena HLA-B\*44 u hrvatskoj populaciji**

Nikolina Špoljarić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom radu analizirani su geni HLA (HLA-A, -B, -C i -DRB1) unutar 1727 nesrodnih dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica iz Hrvatskog registra krvotvornih matičnih stanica (CBMDR), kao i haplotipovi gena HLA-B\*44. Svi ispitanici testirani su metodom lančane reakcije polimerazom i početnicama specifičnim za pojedini alel ili skupinu alela (metode: PCR-SSP i PCR-SSO). Najčešći geni HLA bili su: HLA-A\*02 (31,5%), B\*35 (12,9%), C\*07 (26,1%) i DRB1\*11 (17,5%). Ukupno 316 ispitanika analizirano je za alele gena B\*44 koji je jedan od pet najčešćih gena HLA-B u CBMDR-u. Najčešći alel bio je B\*44:02 (41,4%), zatim B\*44:03 (25,7%), B\*44:27 (18,5%), B\*44:05 (14,1%), dok je B\*44:06 uočen samo kod jednog ispitanika. Analiza haplotipova pokazala je da su najčešći haplotipovi među B\*44 pozitivnim ispitanicima: HLA-A\*02:01-B\*44:02-C\*05:01-DRB1\*04:01, HLA-A\*23:01-B\*44:03-C\*04:01-DRB1\*07:01, HLA-A\*02:01-B\*44:05-C\*02:02-DRB1\*16:01 i HLA-A\*02:01-B\*44:27-C\*07:04-DRB1\*16:01. Rezultati ovog istraživanja su u skladu s rezultatima objavljenim za druge europske populacije, osim za haplotip HLA-A\*02:01-B\*44:27-C\*07:04-DRB1\*16:01 koji je po prvi put opisan u ovom radu.

(56 stranica, 27 slika, 7 tablica, 29 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: geni HLA, B\*44, haplotipovi HLA, neravnoteža udruživanja, populacijska istraživanja

Voditelj: Dr.sc. Zorana Grubić, izv. prof., KBC Zagreb

Ocjenjivači: Dr.sc. Nada Oršolić, prof., PMF Sveučilišta u Zagrebu  
Dr. sc. Petra Korać, doc., PMF Sveučilišta u Zagrebu  
Dr.sc. Božena Mitić, prof., PMF Sveučilišta u Zagrebu

Zamjena: Dr. sc. Duje Lisičić, doc., PMF Sveučilišta u Zagrebu

Rad prihvaćen: 05.02.2015.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

## **Molecular study of HLA-B\*44 alleles and haplotypes in the Croatian population**

Nikolina Špoljarić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In this study we analyzed the HLA genes (HLA-A, -B, -C and -DRB1) among 1727 unrelated voluntary hematopoietic stem cells donors from the Croatian Bone Marrow Donor Registry (CBMDR), as well as HLA-B\*44 haplotypes. All subjects were tested by polymerase chain reaction and primers specific for a particular allele or group of alleles (methods: PCR-SSP and PCR-SSO). The most common HLA genes were: HLA-A\*02 (31.5%), B\*35 (12.9%), C\*07 (26.1%) and DRB1\*11 (17.5%). Total of 316 patients were analyzed for alleles B\*44, which is one of the most common HLA-B genes in CBMDR. The most common allele was B\*44:02 (41.4%), followed by B\*44:03 (25.7%), B\*44:27 (18.5%), B\*44:05 (14.1%), while B\*44:06 was observed only in one patient. Haplotype analysis showed that the most common haplotypes among B\*44 positive subjects were: HLA-A\*02:01-B\*44:02-C\*05:01-DRB1\*04:01, HLA-A\*23:01-B\*44:03-C\*04:01-DRB1\*07:01, HLA-A\*02:01-B\*44:05-C\*02:02-DRB1\*16:01 and HLA-A\*02:01-B\*44:27-C\*07:04-DRB1\*16:01. Results of this study are consistent with the results reported for other European populations, except for the haplotype HLA-A\*02:01-B\*44:27-C\*07:04-DRB1\*16:01, which was described for the first time in the present study.

(56 pages, 27 figures, 7 tables, 29 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: HLA genes, B\*44, HLA haplotypes, linkage disequilibrium, population research

Supervisor: Dr. Zorana Grubić, Assoc. Prof., University Hospital Centre Zagreb

Reviewers: Dr. Nada Oršolić, Prof., Faculty of Science, University of Zagreb  
Dr. Petra Korać, Asst. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb  
Dr. Božena Mitić, Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Replacement: Dr. Duje Lisičić, Asst. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis accepted: 05.02.2015.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Sustav HLA.....	2
1.2. Građa gena i molekula HLA razreda I.....	4
1.3. Građa gena i molekula HLA razreda II.....	7
1.4. Obilježja sustava HLA.....	11
1.4.1. Polimorfizam gena HLA.....	12
1.5. Gen HLA-B*44.....	14
1.6. Primjena određivanja gena HLA.....	15
1.7. Nazivlje sustava HLA.....	17
<b>2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>18</b>
2.1. Hipoteza.....	19
2.2. Cilj istraživanja.....	19
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>20</b>
3.1. Materijali.....	21
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Metoda PCR-SSO.....	21
3.2.2. Metoda PCR-SSP .....	24
3.3. Statistička obrada podataka.....	25
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>26</b>
4.1. Raspodjela alelnih skupina HLA-A, -B, -C i -DRB1 u skupini nesrodnih dobrovoljnih darivatelja iz CBMDR-a (N=1727).....	27

4.2. Raspodjela alela unutar skupine darivatelja pozitivnih za gen HLA-B*44.....	30
4.2.1. Analiza alela HLA-A, -C i -DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B*44:02 .....	30
4.2.2. Analiza alela HLA-A, -C i -DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B*44:03.....	33
4.2.3. Analiza alela HLA-A, -C i -DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B*44:05.....	35
4.2.4. Analiza alela HLA-A, -C i -DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B*44:27.....	37
4.3. Analiza pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za gen HLA-B*44.....	38
4.3.1. Analiza pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B*44:02.....	39
4.3.2. Analiza pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B*44:03.....	40
4.3.3. Analiza pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B*44:05.....	41
4.3.4. Analiza pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B*44:27.....	42
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>43</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>49</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>51</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>55</b>

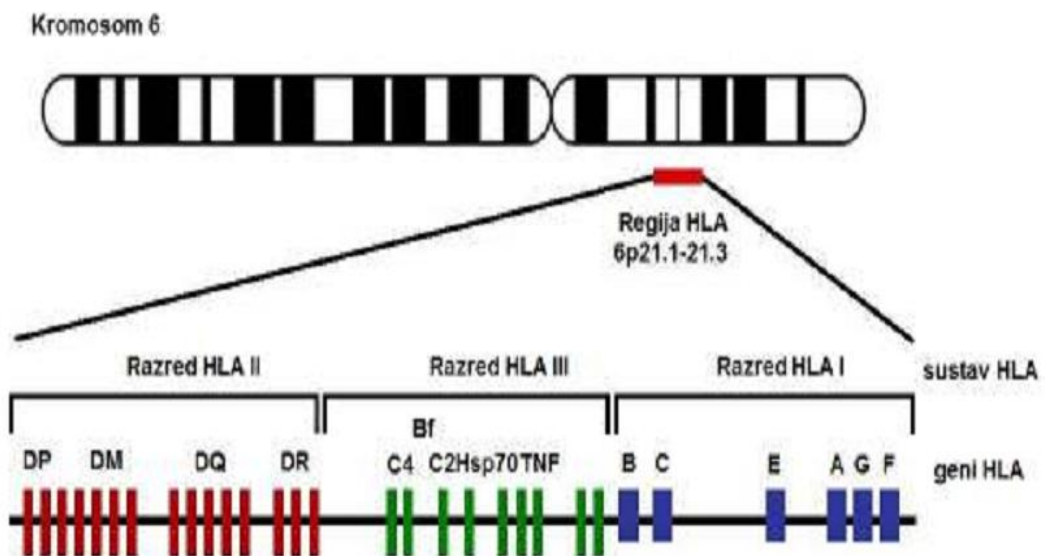
# **1. UVOD**



## 1.1. Sustav HLA

Od otkrića antigena sustava HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*, HLA) na ljudskim leukocitima, njihova fiziološka funkcija predmet je zanimanja mnogih znanstvenika. Sustav HLA naziv je za glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) u čovjeka. Sadrži veliki broj gena koji sudjeluju u imunološkoj reakciji. Središnja zadaća imunološkog sustava je razlikovanje vlastitog od tuđeg radi održavanja integriteta vlastitog organizma i pokretanja učinkovitog imunološkog odgovora na tuđe antigene. Ključnu ulogu u tim procesima imaju upravo molekule HLA, membranski proteini koji predočavaju antigene imunološki kompetentnim stanicama i ključni su za pokretanje imunološke reakcije (1, 2).

Sustav HLA nalazi se na kraćem kraku kromosoma 6, na odsječku 6p21.1-21.3 i obuhvaća otprilike 4 milijuna parova baza (slika 1) (3).



Slika 1. Smještaj regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6 (Preuzeto iz: 4)

Regija HLA gdje se nalazi sustav HLA podijeljena je u tri razreda, I, II i III. Geni smješteni najbliže centromeri pripadaju regiji HLA razreda II, distalno od centromere,

najbliže telomeri je smještena regija HLA razreda I, a u sredini se nalazi regija HLA razreda III (1).

Uloga sustava HLA je regulacija imunološkog prepoznavanja stranog antigena (imunogena), kontrola sinteze tkivnih antigena, regulacija proizvodnje specifičnih antitijela, kontrola interakcije i suradnje limfoidnih stanica tijekom imunološke reakcije upravljene protiv antigena, tj. ciljane stanice i regulacija proizvodnje komplementa i drugih medijatora imunološke reakcije (1, 5, 6).

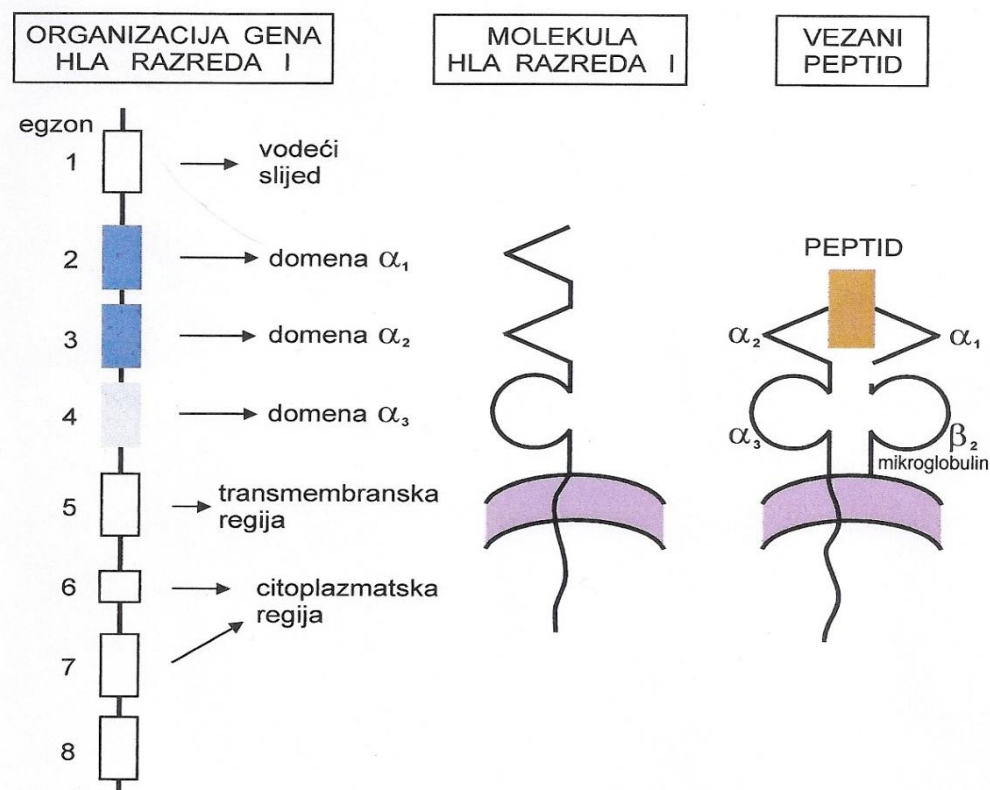
Molekule HLA imaju glavnu ulogu u sazrijevanju limfocita T u timusu. Tijekom sazrijevanja, limfociti T prolaze kroz proces pozitivne i negativne selekcije kojom se osigurava preživljavanje samo onih limfocita T koji su sposobni prepoznati i razlikovati vlastite molekule HLA, tako da strane može, a vlastite ne može vezati velikim afinitetom. Repertoar limfocitnih klonova stvara se slučajnim procesom somatske rekombinacije, a onda se stvoreni repertoar probire, pozitivno - opstankom klonova koji imaju receptore sa slabim afinitetom za vlastite antigene HLA (na timusnim epitelnim stanicama) i negativno - uklanjanjem klonova koji su specifični za vlastite antigene HLA prevelikim afinitetom, tako da bi s vlastitim antigenima HLA reagirali i ako oni nemaju umetnut tuđi antigenski peptid (1, 5).

Molekule HLA također sudjeluju u prezentaciji stranih antigena limfocitima T, koji svojim specifičnim receptorom za antigen prepoznaju kompleks dvaju antigena: prerađenoga stranog antigena i antigena tkivne podudarnosti vlastitoga organizma. Svaka molekula HLA ima samo jedno vezno mjesto za antigeni peptid. Ista molekula HLA može vezati različite antigene peptide, ali u jednom trenutku samo jedan peptid (1).

Intenzitet prepisivanja gena glavni je čimbenik koji određuje stupanj ekspresije molekula HLA na stanicama. No mnogi citokini mogu inducirati povećano prepisivanje gena i ekspresiju molekula HLA. Primjerice, limfocit T nakon podražaja, pomoću citokina sam povećava na ciljnoj stanici količinu molekula HLA koje mora prepoznati. Ekspresiju molekula HLA razreda I najviše povećavaju sve tri vrste interferona i čimbenik nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF), a mehanizam njihova djelovanja jest aktiviranje čimbenika transkripcije koji se u genu vežu za promotor. Interleukini (IL-1, IL-4) i interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) povećavaju ekspresiju molekula HLA razreda II, dok IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  smanjuju njihovu ekspresiju (1).

## 1.2. Građa gena i molekula HLA razreda I

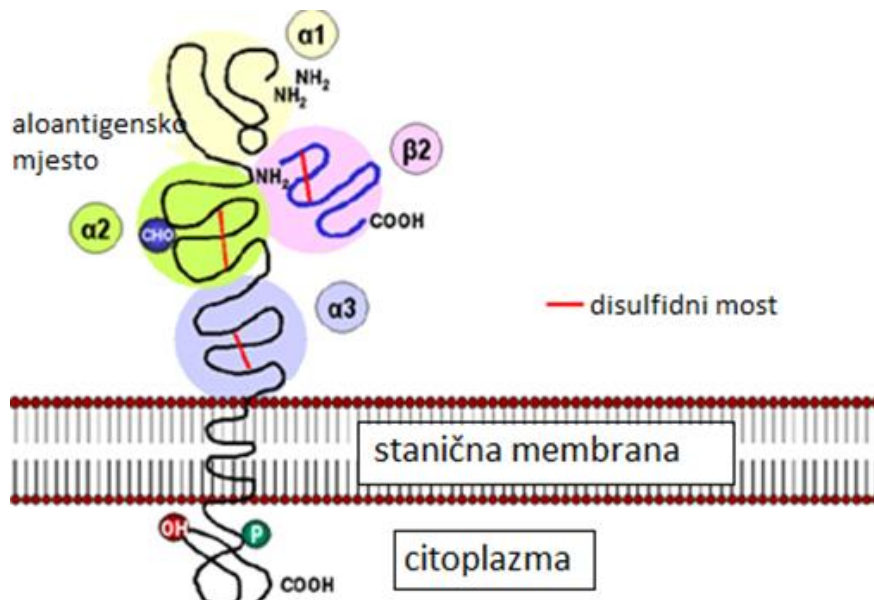
Regija HLA razreda I ima 18 gena, zauzima približno 2 megabaze DNA i geni su podijeljeni u klasične gene HLA razreda I (HLA-A, -B, -C), neklasične gene HLA razreda I (HLA -E, -F, -G) i pseudogene ili dijelove gena (12 nekodirajućih gena ili pseudogena HLA razreda I). Svaki gen HLA sastoji se od egzona i introna. Gen za teški lanac molekula HLA razreda I sastoji se od 8 egzona (kodirajuće sekvence) koji su razdvojeni različito dugim nekodirajućim sekvencama (intronima). Prvi egzon sadrži vodeći, signalni slijed baza. Njihov produkt poslije translacije usmjerava antigenski protein u citoplazmu, a pojavljuje se u sklopu gotove membranske molekule. Egzoni 2, 3 i 4 određuju slijedove aminokiselina za domene  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$  koje se nalaze izvan stanice. Egzon 5 kodira transmembranski dio peptida, dok citoplazmatski dio kodiraju dva egzona, 6 i 7. Završni dio molekule, netranslatirajući 3' kraj kodira egzon 8 (slika 2). Najpolimorfniji dio molekule kodiraju egzoni 2 i 3 (7). Upravo ovi egzoni gena HLA razreda I kodiraju podjedinice koje oblikuju pukotinu za vezanje stranog antigena u pojedinoj molekuli HLA razreda I (8).



Slika 2. Shematski prikaz organizacije gena i molekule razreda I (Preuzeto iz: 9)

Geni HLA-A, -B i -C su izrazito polimorfni, a njihovi produkti prisutni su na većini stanica, ali s različitom koncentracijom. Većinom su zastupljeni na limfatičkom tkivu, na svim stanicama s jezgrom i trombocitima. Vrlo malo ovih antigena nalazimo na spermatozoidima, oocitima, stanicama posteljice, mišićima i stanicama središnjeg živčanog sustava (imunološki privilegirana tkiva). Manjak ekspresije molekula HLA razreda I na fetomaternoj barijeri omogućava preživljavanje fetusa. Uloga ovih molekula je prezentacija stranog antigena citotoksičnim limfocitima T (CD8+), a također reagiraju i s različitim NK inhibitorским receptorima te tako štite zdrave stanice od imunoreakcije stanicama NK. Molekule HLA-C su prva meta koju prepoznaju prirodno ubilačke (engl. *Natural killer*, NK) stanice. Geni HLA-E, -F i -G su nisko polimorfni, ograničena im je zastupljenost na tkivima i kodiraju molekule slične molekulama klasičnih gena HLA razreda I (1, 10).

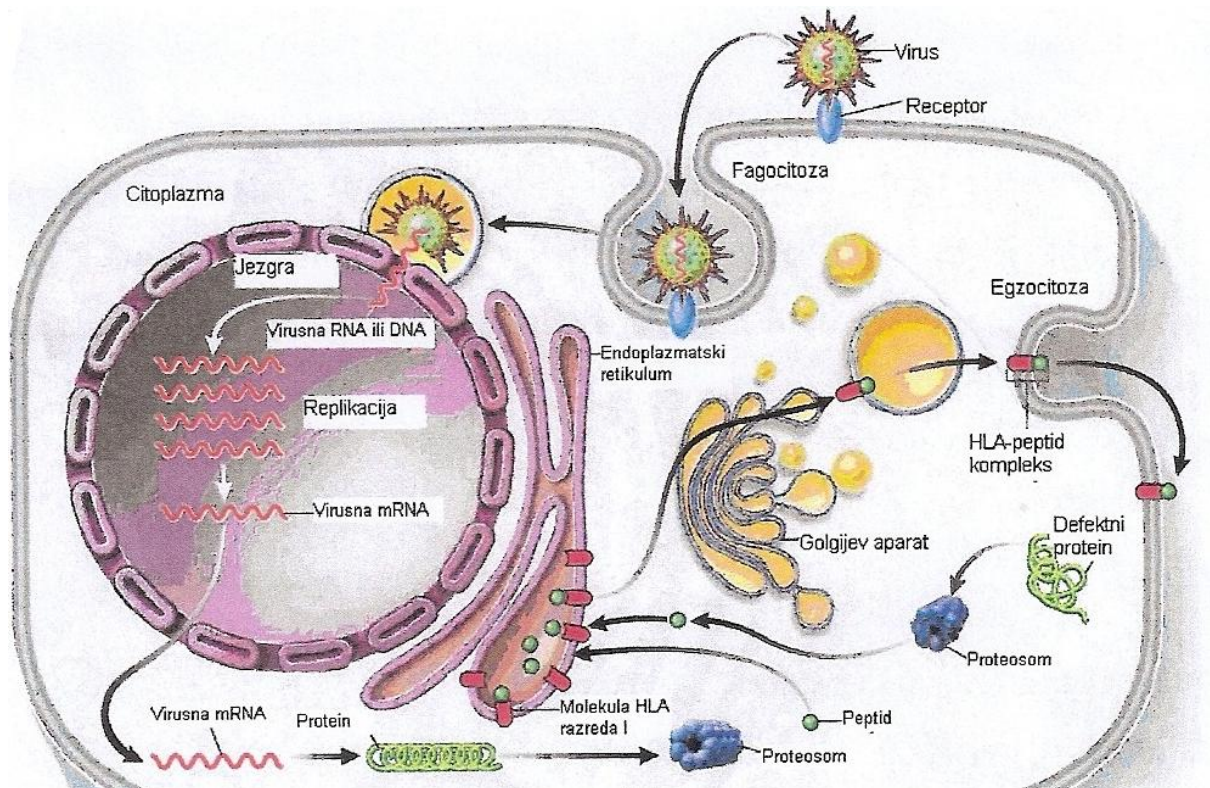
Molekule HLA razreda I su heterodimerni membranski glikoproteini, građene od dva polipeptidna lanca. Teški lanac ( $\alpha$ ) građen je od oko 350 aminokiselina (~45kD). Ima tri dijela: citoplazmatski, transmembranski i ekstracelularni s tri domene  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  (1,8). Laki lanac je  $\beta 2$  mikroglobulin (12kD), kodiran genom na kromosomu 15. Laki lanac,  $\beta 2$  mikroglobulin ima funkciju učvršćivanja molekule i ne sudjeluje u prezentaciji stranih antigena (1, 10).



**Slika 3. Shematski prikaz građevine molekule HLA razreda I (Preuzeto iz: 10)**

Domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  oblikuju pukotinu u koju se veže strani antigen. Domena  $\alpha 3$  slična je konstantnom dijelu imunoglobulina i sadrži vezno mjesto za stanični receptor citotoksičnog limfocita T (slika 3). Polimorfizam molekula HLA razreda I odnosi se prije svega na raspored aminokiselina u domenama  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  (1, 10).

Molekule HLA razreda I predočuju peptide veličine oko 9-11 aminokiselina. Strani antigen, uključujući i viruse, razgrađuje se na peptide u proteosomu. Ovi se peptidi, pomoću specifičnih prijenosnih proteina TAP1 i TAP2 (engl. *Transporter associated with antigen processing*, TAP), transportiraju kroz endoplazmatski retikulum u kojoj se sintetizira molekula HLA. Peptidi se vežu na molekulu HLA, prolaze kroz Golgijev aparat te se putem vezikula egzocitozom eksprimiraju na površinu stanice. Tako eksprimirane molekule budu prezentirane citotoksičnim limfocitima T (slika 4). Antigen specifični receptor citotoksičnog limfocita T prepoznaje antigen peptida samo u kontekstu s vlastitim antigenom HLA razreda I. Ekstracelularni dio molekule reagira s  $\alpha 3$  domenom molekule HLA razreda I, a zatim citotoksični limfociti T luče perforin i druge lizine tipa serina i citozin proteaza uzrokujući apoptozu (programirana smrt stanice). Zbog lučenja IL2 dolazi do porasta klonova aktiviranih citotoksičnih limfocita T (1, 10).

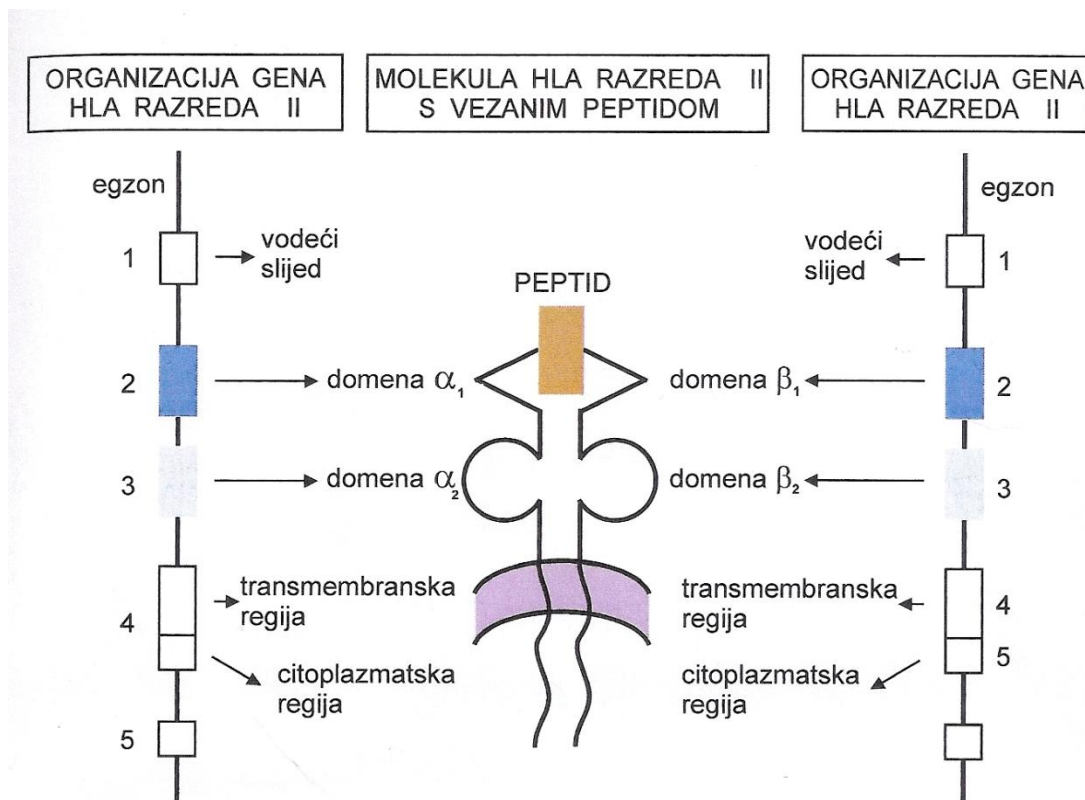


**Slika 4. Put vezanja peptida na molekulu HLA razreda I (Preuzeto iz: 11)**

### 1.3. Građa gena i molekula HLA razreda II

Regija HLA razreda II najbliža je centromeri kromosoma 6, zauzima područje veličine 800 kb, a tu se nalaze geni koji kodiraju molekule HLA razreda II koje prezentiraju strane antigene pomoćničkim limfocitima T. Molekule HLA razreda II prisutne su na antigen prezentirajućim stanicama (makrofagima, dendritičkim stanicama, B limfocitima), limfatičkom tkivu, epitelnim i endotelnim stanicama (1, 10).

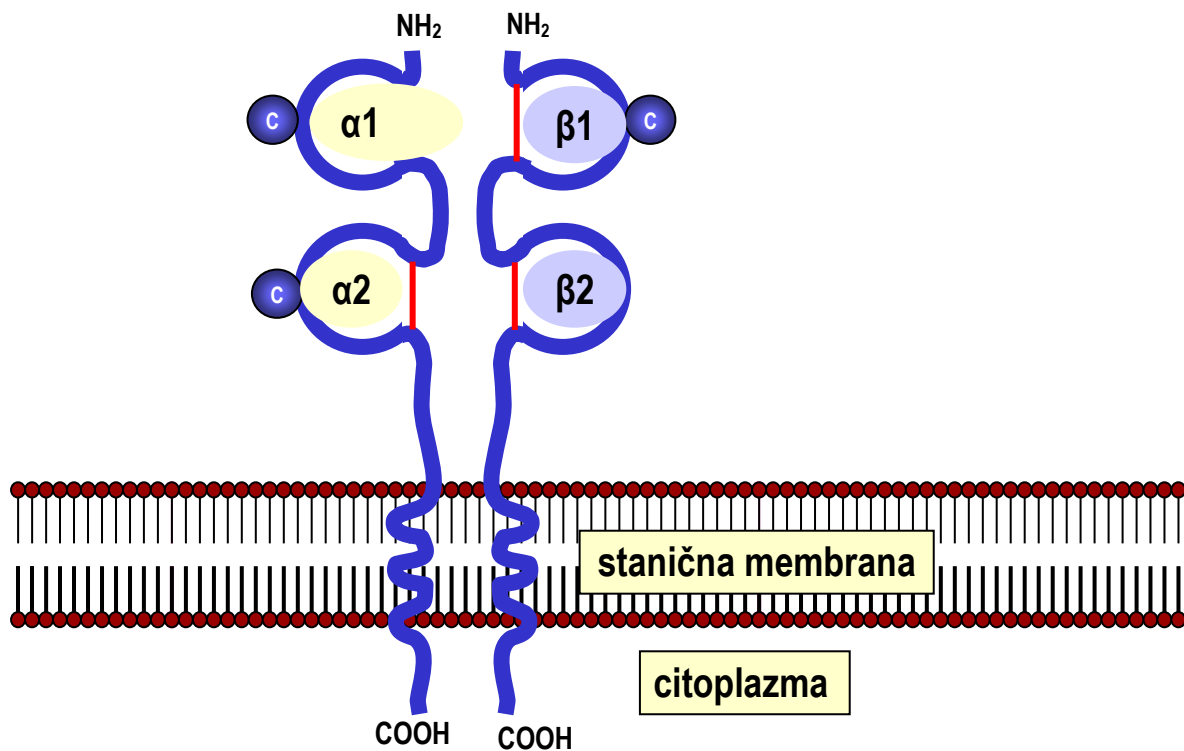
Struktura gena molekula HLA razreda II nalikuje strukturi gena molekula HLA razreda I. Lanac  $\alpha$  kodira gen građen od 5 egzona, dok lanac  $\beta$  kodira gen građen od 6 egzona. Egzon 1 kodira vodeći peptid, a egzoni 2 i 3 dvije izvanstanične domene. U genima za  $\beta$  lanac egzon 4 kodira transmembransko područje, a egzon 5 citoplazmatsko, dok u genima za  $\alpha$  lanac oba ova područja kodira egzon 4 (slika 5). Razlike među pojedinim genima, odnosno alelima HLA razreda II uglavnom se nalaze u egzonu 2 i lakog i teškog lanca, što dovodi do zaključka da egzon 2 kodira stijenke vezne pukotine (12, 13).



Slika 5. Shematski prikaz organizacije gena i molekule HLA razreda II (Preuzeto iz: 9)

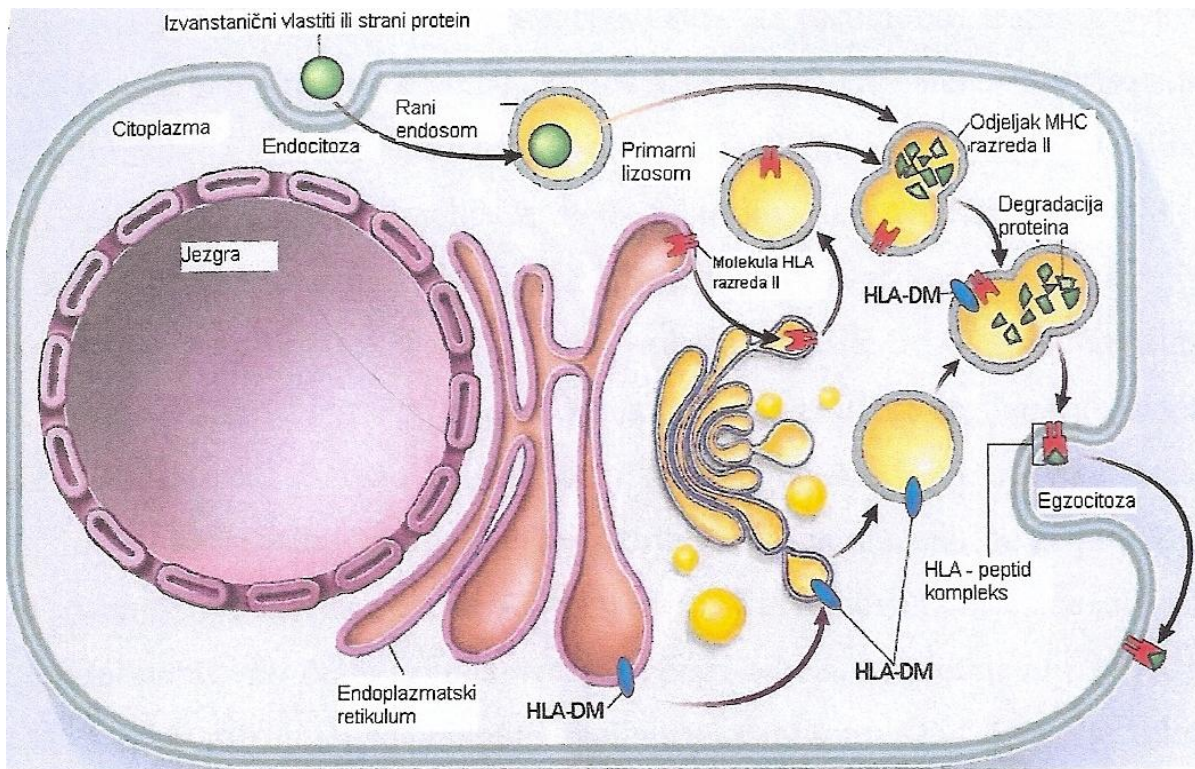
Unutar regije HLA razreda II postoji 6 subregija: HLA-DM, -DN, -DO, -DP, -DQ i -DR. Svaka podregija ima gene koji kodiraju sintezu oba lanca ( $\alpha$  i  $\beta$ ) molekule HLA razreda II. Subregije HLA-DP, -DQ i -DR sadrže osim aktivnih gena i pseudogene čija funkcija još uvijek nije poznata. Svaka od podregija sadrži po jedan funkcionalni gen A i B koji kodiraju odgovarajući  $\alpha$ , odnosno  $\beta$  proteinski lanac: HLA-DM (A, B), -DN (A), -DO (B), -DP (A1, A2, B1, B2), -DQ (A1, A2, B1, B2, B3) i -DR (A, B1-B9). Geni za lanac  $\alpha$  i  $\beta$  kodiranih molekula čine parove, pa tako postoji par gena DRA1 i DRB1, par gena DQA1 i DQB1, te par gena DPA1 i DPB1 (10).

Molekule HLA razreda II građene su od dva međusobno slična, polimorfna, nekovalentno vezana lanca  $\alpha$  (33-35kD) i  $\beta$  (26-28kD). Kod molekula HLA razreda II 2/3 i lakog i teškog lanca nalazi se izvan stanice, a vezna pukotina je otvorenije i šire strukture tako da vezani antigenski peptidi mogu stršati izvan pukotine. Stoga se u pukotinu molekule HLA razreda II vežu duži peptidi, od 10-30, u prosjeku od 14 aminokiselina. Ekstracelularni dio molekule ima četiri domene:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  i  $\beta 2$  (slika 6.). Dio molekule HLA razreda II koji slični konstantnom dijelu imunoglobulina čine domene  $\alpha 2$  i  $\beta 2$ , važne za nekovalentno povezivanje lanaca molekule HLA razreda II (1, 10).



Slika 6. Shematski prikaz građe molekule HLA razreda II (Preuzeto iz: 10)

Egzogeni put predočavanja stranog antigena ostvaruje se preko molekula HLA razreda II, a put započinje fagocitozom. Strani antigen ulazi u fagosom koji se spaja s lizosomom u fagolizosom, gdje dolazi do razgradnje antigena na male peptide veličine do 30 aminokiselina. Istovremeno u endoplazmatskom retikulumu počinje sinteza molekule HLA. Sintetizirana molekula transportira se u fagolizosom, gdje se od molekule HLA razreda II odcjepljuje „invarijantni“ lanac i veže antigeni peptid. Nakon toga molekula s vezanim antigenom putuje prema staničnoj membrani antigen predočne stanice (slika 7). Na taj način se antigen predočuje pomoćničkim limfocitima T koji prepoznaju kompleks antigen - molekula HLA i započinje imunološki odgovor, sekrecija kemokina, interleukina i drugih citokina (1, 10).



**Slika 7. Put vezanja peptida na molekulu HLA razreda II (Preuzeto iz: 11)**

Nepolimorfni polipeptid - „invarijantni“ lanac, ima važnu ulogu u sintezi molekule HLA razreda II jer određuje mjesto na koje će se vezati peptid. Sintetizira se u endoplazmatskom retikulumu i veže se na mjesto peptida unutar antigena HLA razreda II te na taj način sprječava vezanje endogenog peptida. U slučaju da se endogeni peptidi vežu na



molekulu HLA razreda II, tada bi obje vrste molekula HLA predočavale istu vrstu peptida, koji nastaju razgradnjom proteina (1, 10).

Regija HLA razreda III nalazi se između regije HLA razreda I i razreda II, a unutar nje se nalaze brojni geni koji sudjeluju u imunološkoj reakciji i pokazuju izrazitu strukturnu i funkcionalnu različitost (komponente komplementa, citokini). To su geni: C4A i C4B, C2 i Bf tj. geni koji kodiraju drugu i četvrtu komponentu komplementa i faktor B važan u alternativnom putu aktivacije sustava komplementa. U ovoj regiji nalaze se i geni *TNF-A* i *TNF-B* koji kodiraju citokine TNF- $\alpha$  i  $\beta$ , geni proteina "toplotnog šoka" (engl. *Heat Shock Proteins*, HSP) te mnogi drugi (1, 10).

## 1.4. Obilježja sustava HLA

Osnovna obilježja sustava HLA su poligenost (sadrži preko 200 gena) i polimorfizam.

Sustav HLA odlikuje i kodominantna ekspresija - istovremena ekspresija gena s oba kromosoma što ima za posljedicu prisutnost dva kompletna seta molekula HLA na površini stanica (jedan od oca, jedan od majke). Pojedina kombinacija alelnih oblika gena HLA na jednom kromosomu naziva se haplotip. Po jedan haplotip HLA naslijeđuje se od svakog roditelja, a dva haplotipa HLA tvore genotip HLA. Geni HLA imaju pravilnu segregaciju što znači da dijete ima 50%-tnu šansu da naslijedi određeni alel HLA od roditelja heterozigota na tom lokusu HLA. Kod pravilne segregacije, kroz generacije, jednak je broj pozitivnih i negativnih potomaka za praćeni gen HLA (14, 15).

Niska učestalost *crossingover*-a je također odlika sustava HLA, zbog male udaljenosti između lokusa HLA. Učestalost *crossingover*-a između lokusa HLA je 1-2%. U slučaju *crossingover*-a dolazi do zamjene dijelova kromatida tijekom oogeneze ili spermatogeneze. Jedna od značajnih obilježja sustava HLA je i genska neravnoteža udruživanja (engl. *Linkage Disequilibrium*, LD) zbog koje se različiti aleli dva ili više usko vezanih lokusa HLA javljaju češće u istom haplotipu HLA nego što se to očekuje s obzirom na njihovu pojedinačnu učestalost (16). Uočeno je da regije s visokom razinom neravnoteže udruživanja premošćuju lokuse koji su u potpunoj ravnoteži jedan s drugim. Tako npr. jaka neravnoteža udruživanja postoji između lokusa DQB1 i DRB1, a vrlo slaba između regija DPB1 i DQB1, što ukazuje na nazočnost velikog broja rekombinacija između ta dva lokusa HLA (17).

Jedna od osobina je i križna reaktivnost tj. križno-reaktivne skupine (engl. *Cross - Reactive Group*, CREG). To je pojava kada antiserum HLA reagira ne samo s jednim već s više antigena HLA, a javlja se uglavnom među antigenima istog lokusa (10).

### 1.4.1. Polimorfizam gena HLA

Jedno od najvažnijih obilježja sustava HLA, proizašlo iz njegove važnosti u obrani organizma, jest visok stupanj raznolikosti njegovih gena, što je utvrđeno i kod analognih sustava drugih vrsta. U svakoj do sada proučavanoj vrsti kralježnjaka postoji veliki polimorfizam gena MHC što znači da se svaki od ovih gena u vrsti javlja u više različitih, alternativnih oblika - alela. Po pojedinom lokusu broj alela kod ljudi iznosi od nekoliko stotina do tisuću (primjerice na najpolimorfnijem lokusu HLA-B do sada je otkriveno čak 6400 različitih alela), međutim danas taj broj nije konačan jer se napretkom tehnologija, istraživanjem polimorfizama otkriva svakim danom sve više ljudskih gena i njihovih različitih oblika (18).

Geni HLA najpolimorfiji su geni u ljudi, a najraznovrsniji je gen HLA-B te gen HLA-DRB1. Velik broj alela rezultat je prirodne selekcije, a upravo taj polimorfizam osigurava raznolikost molekula kodiranih genima HLA. Dokaz za to je nizak postotak osoba homozigota za alele HLA čime se ukazuje da postoji selektivna prednost heterozigotnih osoba. Izraziti polimorfizam ostvaruje se brojnim genskim mehanizmima kao što su konverzija gena (zamjena pojedinih dijelova gena ulomcima drugog gena), točkaste/somatske mutacije (koje uzrokuju promjenu pojedinih nukleotida), te rekombinacija gena (između različitih alela istog lokusa) (1, 14).

Molekularni polimorfizam temeljna je odlika imunološkog sustava. Putem specifičnih interakcija s patogenim organizmom, imunološki sustav prepoznaje i uspješno se bori s infekcijom. Značenje visokog stupnja polimorfizma sustava HLA, kao i genetski mehanizmi koji su tijekom evolucije uspjeli održati takvu raznolikost alela, predmet su brojnih imunoloških i antropoloških studija. Izrazita raznolikost molekula HLA evolucijski predstavlja prednost u borbi protiv različitih uzročnika bolesti. Na razini jedinke, više antigena HLA daje gušći repertoar klonova limfocita, što smanjuje mogućnost da neki patogeni peptid izbjegne imunološki sustav. Na razini vrste, polimorfizam čini jedinke različitimima (19).

Polimorfizam HLA dokazuje se kako na nivou membranskih proteina, tako i na nivou gena. Prvi pristup se zasniva na primjeni antitijela specifičnih za produkt svakog gena HLA

(bilo kao aloantiserum ili monoklonsko antitijelo) ili staničnih testova in vitro, kao što je kultura pomiješanih limfocita i cilj joj je pokazati prisustvo posebnih antigenskih determinanti jednog ili više membranskih molekula, produkata HLA. Drugim pristupom se primjenom različitih metoda molekularne biologije utvrđuje redoslijed nukleotida pojedinih gena HLA (1).

Visok stupanj polimorfizma sustava HLA može se objasniti postojanjem visoke stope mutacija unutar njega i/ili mehanizmom selekcije tijekom evolucije. Pretpostavka da unutar sustava HLA postoji veća učestalost mutacija nego u drugim sustavima gena nije potvrđena, štoviše utvrđeno je da je broj mutacija unutar sustava HLA manji (20). Stoga se smatra da je selekcija najvažniji čimbenik u nastanku polimorfizma sustava HLA. Naime, budući da zamjena samo nekoliko aminokiselina u području vezne pukotine može znatno izmijeniti vrstu vezanog peptida, održavanje hipervarijabilnosti u funkcionalno važnim dijelovima molekule tijekom evolucije, dokaz je da selekcija izravno putem različitih patogenih organizama (virusa, bakterija) održava raznolikost HLA (20).

## 1.5. Gen HLA-B\*44

Gen HLA-B\*44 čest je u populacijama bijele rase, ima veliki broj alela (do danas je poznato 127 različitih alela gena HLA-B\*44) koji dolaze u kombinacijama s različitim alelima na lokusu HLA-C, odnosno HLA-A i -DRB1 i tvori konzervirane, djelomično konzervirane ili nekonzervirane haplotipove (16, 21, 22). Prijašnja istraživanja pokazala su da su frekvencije podtipova tj. alela B\*44 različite unutar različitih etničkih grupa i da su ti podtipovi B\*44 u neravnoteži udruživanja s različitim alelima HLA na bliskim lokusima. Klinička važnost polimorfizma gena HLA-B\*44 je u stvaranju citotoksičnih limfocita T (CD8+) usmjerenih protiv nepodudarnih podtipova B\*44 u odbacivanju transplantata krvotvornih matičnih stanica (KMS). Zbog visoke razine polimorfizma u sustavu HLA nepodudarne transplantacije se ne mogu izbjeći za veliki broj pacijenata. U tim slučajevima gdje potpuno podudarni darivatelj nije dostupan, postoji klinička potreba da se predvidi hoće li nepodudarnost u alelima HLA potaknuti imunološki odgovor posredovan B ili T stanicama. Nepodudarnosti u molekulama HLA-B\*44:02 i HLA-B\*44:03 vode u indukciju alospecifičnih CD8+ stanica *in vitro* i *in vivo* odbacivanje transplantata krvotvornih matičnih stanica (KMS). Poznato je da se aleli HLA-B\*44:02 i HLA-B\*44:03 razlikuju samo u jednoj aminokiselini, pokazujući da čak i mala promjena u aminokiselini između molekula HLA može rezultirati imunološkim odgovorom, odnosno odbacivanjem transplantata (23). S druge strane, nepodudarnosti u molekulama HLA razreda I koje su vrlo raznolike, mogu biti tolerirane u transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica (engl. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, HSCT).

## 1.6. Primjena određivanja gena HLA

Određivanje gena HLA primjenjuje se u transplantaciji organa i tkiva, dijagnostici, populacijskim istraživanjima, sudskoj medicini (identifikacija osoba i slučajevi spornog očinstva), proučavanju migracija stanovništva, kao pomoć pri postavljanju dijagnoze nekih autoimunih bolesti te u transfuzijskom liječenju.

Sustav HLA ima veliku primjenu u medicini, osobito u transplantaciji. Molekule HLA prvi put su identificirane kao uzrok odbacivanja alogeničnih transplantata. Transplantacijska reakcija je oblik specifične imunosti posredovane prvenstveno limfocitima T, a u manjoj mjeri i limfocitima B. Limfociti T prepoznaju strane molekule HLA razreda I i II, aktiviraju se te pokreću imunološke efektorske mehanizme koji konačno dovode do odbacivanja alogeničnog transplantata (23).

Glavni jamac uspješnog presađivanja organa jest smanjenje imunogeničnosti tkiva na najmanju moguću mjeru. Preživljavanje transplantata ovisi u prvom redu o stupnju podudarnosti HLA između davatelja i primatelja. Transplantacijska reakcija usmjerena je samo prema onim antigenima presatka kojih primalac nema, jer je na one istovjetne već tolerantan zbog prirodene imunotolerancije (24).

Osim što je glavno oruđe u transplantacijama tkiva i organa, određivanje specifičnosti HLA pomaže i pri dijagnostici bolesti. Naime, zbog važne uloge molekula HLA u sazrijevanju limfocita T, kao i indukciji imunološkog odgovora, istraživanja uzroka autoimunih bolesti obuhvatila su i ispitivanja povezanosti ovih bolesti s genima sustava HLA (10).

Određivanja gena HLA u svrhu dijagnostike određenih bolesti, kod ljudi s autoimunim bolestima uočena je povećana učestalost određenih alela HLA u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Stupanj povezanosti određenog alela HLA i pojedine bolesti izražava se relativnim rizikom koji pokazuje koliko je puta veća vjerojatnost obolijevanja osoba pozitivnih za određeni alel HLA, u odnosu na osobe koje nemaju dotični alel. Smatra se da prisutnost određenog alela HLA sama po sebi nije uzrok niti jednoj bolesti, već samo faktor koji pridonosi razvoju određene bolesti (10).

Sustav HLA je zbog svoje velike raznolikosti našao primjenu i u populacijskim istraživanjima. Populacijska istraživanja gena HLA su bitan preduvjet za dobivanje uvida u raspodjelu pojedinih alela HLA u svijetu. Rasprostranjenost i zastupljenost alela HLA značajno se razlikuje među pojedinim populacijama i etničkim grupama što čini gene HLA dobrim pokazateljem praćenja migracija i međusobnih miješanja različitih populacija, te proučavanju povijesti pojedinih populacija ili izoliranih etničkih grupa. Aleli HLA, obzirom na njihovu zastupljenost u svijetu, mogu se podijeliti u tri glavne skupine: aleli HLA s relativno visokom učestalošću u svim populacijama svijeta (učestalost veća od 1%), aleli HLA prisutni u većini populacija, ali u pojedinim populacijama imaju izuzetno nisku učestalost ili ih uopće nema (učestalost 0,1-1%) i aleli HLA karakteristični samo za neke populacije ili rase (učestalost manja od 0,1%) (2).

## 1.7. Nazivlje sustava HLA

Nazivlje sustava HLA jedinstveno je u svijetu. Serološki dokazani antigeni HLA imenuju se prvo oznakom lokusa HLA-A, HLA-B, HLA-C, a zatim se navodi specifični antigen, npr. HLA-A1, koji se dokazuju jednom od molekularnih metoda (10). Kod ljudi ima mnogo alelnih oblika svakoga od tih gena pa se oni označavaju dodatnim rednim brojem. Način označavanja koji je uveden je da se uz ime gena dodaje četveroznamenkasti broj, pritom prva dva broja označavaju gen tj. specifičnost, a druga dva označavaju redni broj alela toga gena, tj. kako je koji alel otkriven. Primjerice HLA-A\*01:01 označava prvootkriveni alel skupine alela tj. gena HLA-A\*01 (tablica 1). Tako npr. HLA-A\*02:05 označava peti alel gena HLA-A\*02 (13).

**Tablica 1. Imenovanje HLA gena i alela**

<b>Nomenklatura</b>	<b>Značenje</b>
HLA	sustav HLA
<i>HLA-B</i>	oznaka određenog lokusa (B)
<i>HLA-B*13</i>	grupa alela HLA-B*13 koja odgovara serološkoj specifičnosti/antigenu HLA-B13
<i>HLA-B*13:02</i>	alel B*13:02
<i>HLA-B*13:02:02</i>	sinonim za alel koji se razlikuje u mutaciji od alela <i>B*13:02:01</i>
<i>HLA-B*13:02:01:02</i>	alel koji sadrži mutaciju izvan kodirane regije <i>B*13:01:01</i>
<i>HLA-A*24:09N</i>	„Nul alel“, alel koji nema ekspresiju na staničnoj membrani
<i>HLA-A*30:14L</i>	alel čija je ekspresija značajno smanjena na površini stanice
<i>HLA-B*44:02:01:02S</i>	aleli koji su eksprimirani na „skrivenim stanicama“
<i>HLA-A*32:11Q</i>	alel čija mutacija ima značajan učinak na ekspresiju antigena na površini stanice



## **2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA**

## **2.1. Hipoteza**

Različiti aleli HLA-B\*44 tvore različite produžene haplotipove HLA.

## **2.2. Cilj istraživanja**

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Analizirati gene HLA-A, -B, -C i -DRB1 među ispitanicima iz Hrvatskog registra dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica (CBMDR).
2. Istražiti raspodjelu alela HLA-B\*44 u ispitivanom uzorku.
3. Odrediti haplotipove alela HLA-B\*44 (HLA-A -B\*44, HLA-B\*44 -C i HLA-B\*44 -DRB1) među ispitanicima.
4. Odrediti produžene haplotipove: HLA-A, -B\*44, -C, -DRB1 u CBMDR-u.
5. Odrediti neravnotežu udruživanja između alela HLA-B\*44 i alela susjednih lokusa HLA.
6. Usporediti dobivene rezultate s podacima za druge europske populacije.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Materijali**

Svim ispitanicima određeni su geni HLA-A, -B, -C i -DRB1, a zatim je dio ispitanika pozitivnih za gen HLA-B\*44 uključen u daljnja testiranja i određeni su im aleli B\*44. Prva skupina ispitanika obuhvatila je 1727 darivatelja iz CBMDR-a. Druga skupina ispitanika uključila je 316 darivatelja iz CBMDR-a koji su bili pozitivni za gen HLA-B\*44.

Ispitanici su porijeklom iz svih krajeva Hrvatske i predstavljaju reprezentativni uzorak naše populacije.

### **3.2. Metode**

Ispitanicima se uzimalo 2 ml periferne krvi iz koje je izolirana DNA pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA (Nucleospin, Macherey Nagel, Düren, Njemačka). Komercijalni set za izolaciju sastoji se od: pufera B1, reagensa B2, pufera B5, BW, BE i B3, proteinaze K te Nukleospin epruvete i kolone. Ova metoda izolacije zasniva se na specifičnom vezanju molekula DNA na silikatnu membranu unutar Nukleospin kolone.

Za određivanje gena HLA korištene su dvije metode: PCR-SSO (engl. *PCR-Sequence Specific Oligonucleotides*) i PCR-SSP (engl. *PCR-Sequence Specific Primers*).

#### **3.2.1. Metoda PCR-SSO**

Metoda korištena za određivanje gena HLA je metoda PCR-SSO pomoću setova: Gen-Probe Lifecodes typing kits (Gen-Probe Inc, Stamford, USA) i Luminex aparata (Luminex Corporation, Austin, Tx, USA). Metoda se temelji na suspenziji mikrosfera (polistirenske kuglice veličine 5,6 mikrona) ispunjenih crvenim i infracrvenim fluorokromom, na površini kojih se nalaze vezane oligonukleotidne sekvence (engl. *Sequence-Specific Oligonucleotides*, SSO). Testovi se izvode u pločicama s 96 bazenčića. Primjenom ove metode omogućena je

tipizacija niske/srednje rezolucije do 100 različitih alela u jednom uzorku. Metoda se sastoji od umnažanja reakcijom PCR egzona 2 i 3 za određivanje alela HLA razreda I i egzona 2 za određivanje alela HLA razreda II. Nakon umnažanja slijedi hibridizacija biotinom označenih produkata umnažanja na specifične oligonukleotidne probe (SSO) koje su vezane na površini mikrosfera.

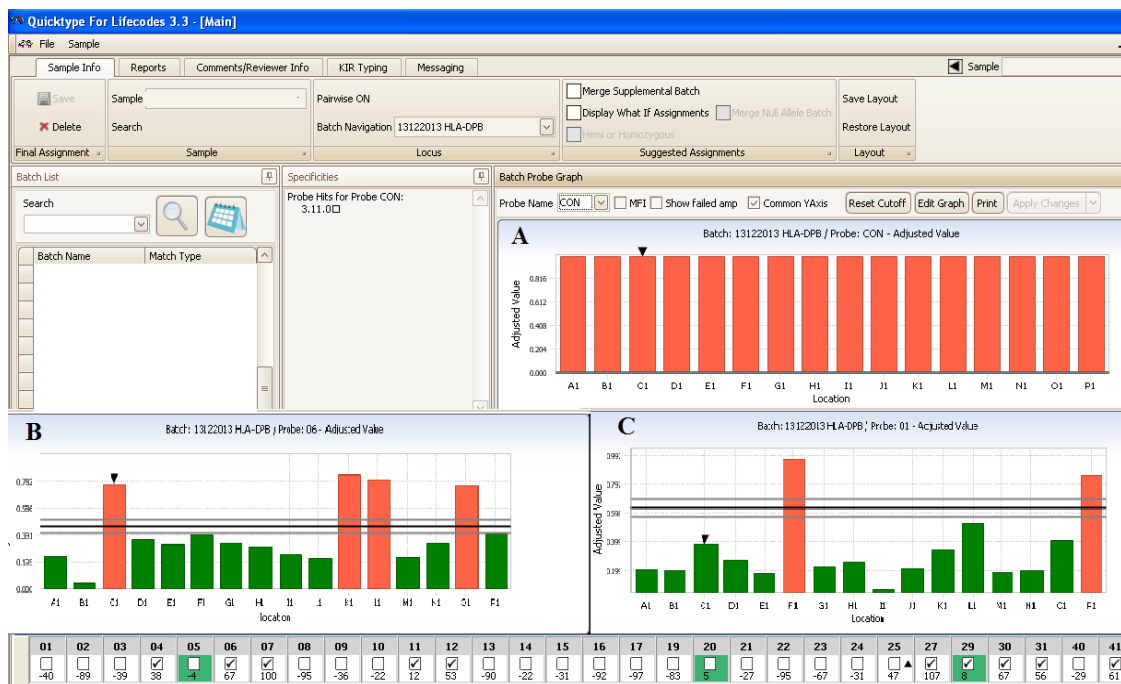
Preporučena koncentracija DNA za navedeni test bila je 150-200 ng/μl. Umnažanje DNA se izvodi prema protokolu proizvođača testova (Tepnel - Lifecodes: PCR), a produkt umnažanja su dvostruke i jednostruke molekule DNA koje nakon denaturacije sudjeluju u hibridizacijskoj reakciji. Ukupni volumen jedne reakcije PCR iznosi 54,5 μl (15 μl Lifecodes Master Mix, 19 μl Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 0,5 μl polimeraze Taq i 20 μl uzorka DNA. Uvjeti reakcije PCR prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2. Program za amplifikaciju DNA**

Korak	Temperatura	Vrijeme inkubacije	Broj ciklusa
1	95°C	5 min	1
2	95°C	30 sec	8
	60°C	45 sec	
3	72°C	45 sec	32
	95°C	30 sec	
	63°C	45 sec	
4	72°C	45 sec	1
	72°C	15 min	
5	4°C	∞	1

U procesu hibridizacije, specifično umnoženi slijedovi DNA inkubiraju se sa suspenzijom mikrosfera koje imaju pojedinačno jedinstvenu fluorescenciju i na površini vezane specifične SSO probe. Ukupni volumen jedne hibridizacijske reakcije iznosi 20 μl (5

$\mu\text{l}$  PCR produkta i  $15 \mu\text{l}$  otopine mikrosfera). Hibridizacija se odvija 45 minuta (prema protokolu Tepnel Lifecodes: hibridizacija). Odmah po završetku, hibridizacijskoj reakciji dodaje se  $170 \mu\text{l}$  pripremljene otopine fluorescentne boje za obilježavanje ( $170 \mu\text{l}$  pufera za razrjeđenje i  $0,85 \mu\text{l}$  streptavidina, SA-PE (R-fikoeritrin konjugirani streptavidin)). Streptavidin se veže na biotinizirane dijelove DNA PCR produkta koji su nakon hibridizacije specifično vezani s probama na određenim mikrosferama. Luminex aparat detektira fluorescenciju pomoću dva lasera i razlikuje kombinaciju proba s pozitivnim signalom na osnovu njihove vezanosti s mikrosferama te kvantificira relativnu količinu amplifikata koji je hibridiziran sa svakom pojedinom mikrosferom. Analiza pozitivnih i negativnih rezultata hibridizacije i određivanje gena HLA svakog pojedinog ispitanika provodi se u aparatu Luminex analitičkim programom Quicktype for Lifecodes (verzija 3.3). Izračunavanjem vrijednosti očitane fluorescencije za svaku od mikrosfera, prisutnost gena HLA označava se kao "pozitivna" mikrosfera, odnosno "negativna" mikrosfera ako gen HLA nije prisutan (slika 8).



**Slika 8. Analiza rezultata u programu Quicktype For Lifecodes.** Proba CON (A) je kontrolna proba i mora biti pozitivna za svih 16 uzoraka. Na uzorku C1 mikrosfera 06 je pozitivna (B), a mikrosfera 01 je negativna (C).

### 3.2.2. Metoda PCR-SSP

Određivanjem gena HLA metodom PCR-SSP omogućena je tipizacija visoke rezolucije (4 znamenke), a korišteni su komercijalni *OlerupSSP<sup>TM</sup> Genotyping* testovi (GenoVision Inc, West Chester, PA, US). Metoda se bazira na lančanoj reakciji polimerazom (PCR-u) i specifičnim početnicama za određeni alel ili skupinu alela.

OlerupSSP<sup>TM</sup> Genotyping test sastoji se od 23+1 reakcije (reakcija 24 je negativna kontrola) za lokuse HLA-A, -C i -DRB1, dok se za lokus HLA-B test sastoji od 47+1 reakcije. Preporučena koncentracija DNA za ovaj test je 30 ng/μl. Umnažanje DNA radilo se prema protokolu proizvođača testova (Olerup - PCR: SSP). Ukupni volumen reakcije PCR iznosio je 10 μl (4.9 μl H<sub>2</sub>O, 0.1 μl polimeraze Taq koncentracije 5U/μl (Applied Biosystems), 3 μl reakcijskog pufera i 2 μl uzorka DNA). Uvjeti reakcije PCR prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3. Program za amplifikaciju DNA**

Korak	Temperatura	Vrijeme inkubacije	Broj ciklusa
1	96°C	2 min	1
2	96°C	15 sec	10
	65°C	1 min	
3	96°C	10 sec	20
	61°C	50 sec	
	72°C	30 sec	

Provjera umnoženih PCR produkata izvršena je elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu obojenim bojom GelRed (GenoVision Inc, West Chester, PA, US) koristeći 1xTBE pufer. Dokumentacija gela rađena je pomoću UV G:BOX Syngene kamere s tamnom komorom. Prema veličini specifičnih produkata PCR, reakcija na gelu se označava kao

pozitivna (PCR produkt prisutan) ili negativna (PCR produkt odsutan). Pozitivna reakcija na gelu mora sadržavati internu kontrolnu vrpcu i vrpcu specifičnog PCR produkta. Prema specifičnosti reakcija koje su određene kao pozitivne određuje se genotip HLA ispitanika (slika 9). Dobiveni rezultati analizirani su uz pomoć programa: Helmberg Score.



**Slika 9. Fotografija agaroznog gela s PCR produktima**

### **3.3. Statistička obrada podataka**

Učestalosti gena i alela HLA određene su za svaki lokus deskriptivnom statistikom. Povezanost pojedinih kliničkih i genetskih čimbenika procijenjena je uz pomoć 2x2 tablica pri čemu je razina statističke značajnosti bila 0,05. U slučaju kada je broj pojedinog čimbenika bio manji od 5, koristio se Fisher-ov test.

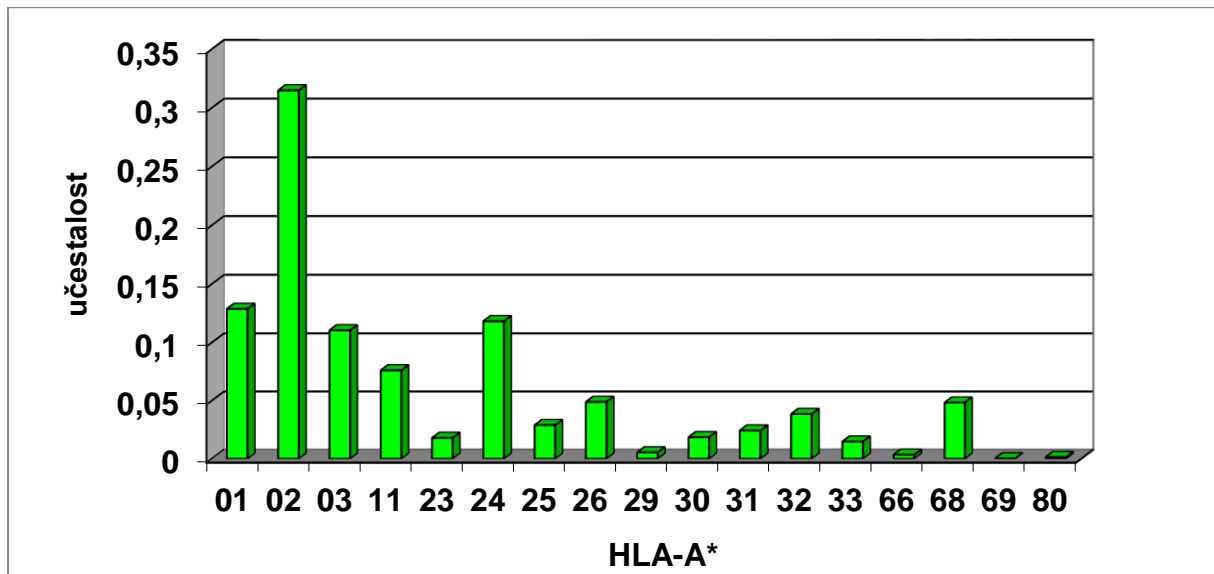


## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Raspodjela alelnih skupina HLA-A, -B, -C i -DRB1 u skupini nesrodnih dobrovoljnih darivatelja iz CBMDR-a (N=1727)

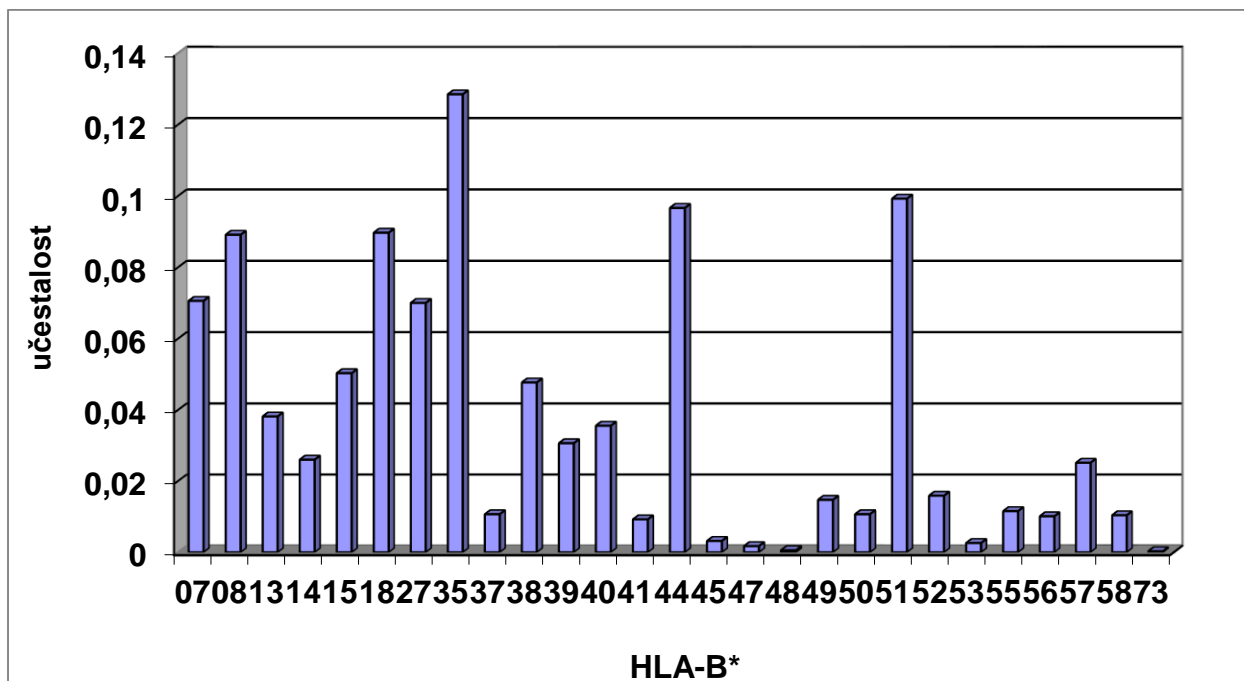
Analiza učestalosti HLA-A, -B, -C i -DRB1 provedena je na uzorku od 1727 nesrodnih dobrovoljnih darivatelja iz CBMDR-a (slike 10a, 10b, 10c i 10d). Najveći broj alelnih skupina uočen je na lokusu HLA-B (N=27), a najmanji na lokusu HLA-DRB1 (N=13).

Na lokusu HLA-A utvrđeno je da je gen HLA-A\*02 najčešći (31,5%), dok je učestalost veća od 10% uočena za gene: HLA-A\*01 (12,9%), HLA-A\*03 (11,1%) i HLA-A\*24 (11,8%). Najmanju učestalost pokazao je gen HLA-A\*69, koji je zamijećen kod samo jednog ispitanika.



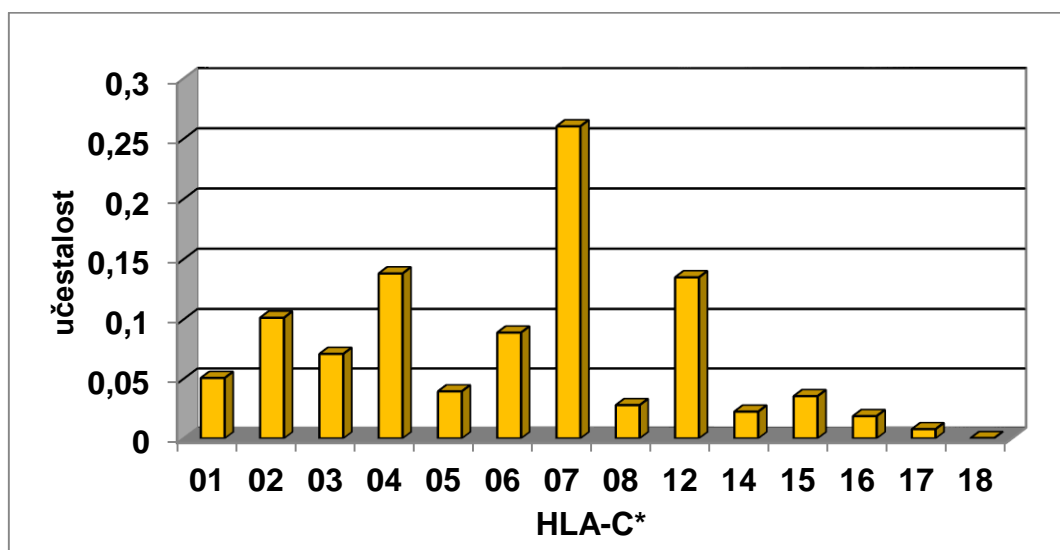
Slika 10a. Raspodjela gena HLA-A među nesrodnim darivateljima iz CBMDR-a (N=1727)

Na lokusu HLA-B najveću učestalost pokazao je gen HLA-B\*35 (12,9%), a slijedili su: HLA-B\*08 (9,0%), HLA-B\*18 (9,0%), HLA-B\*44 (9,7%) i HLA-B\*51 (9,9%). S druge strane, samo jedan darivatelj imao je gen HLA-B\*73.



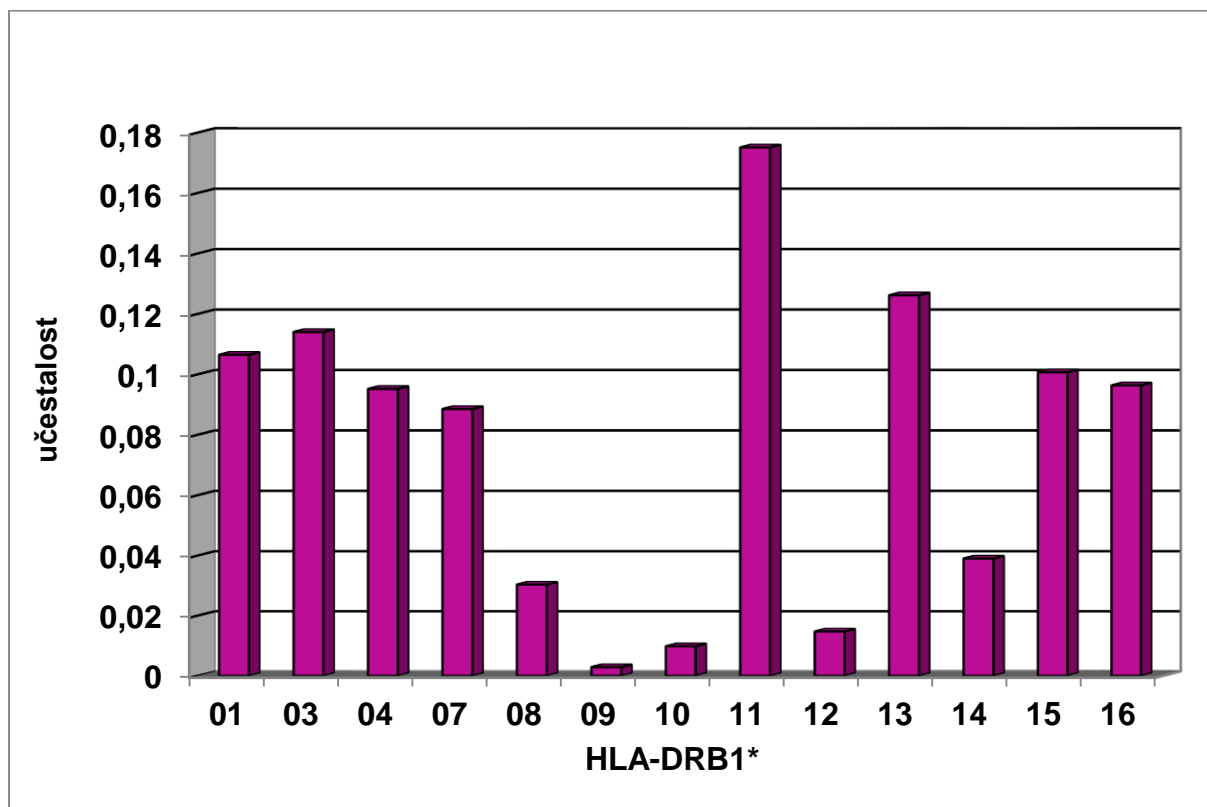
**Slika 10b. Raspodjela gena HLA-B među nesrodnim darivateljima iz CBMDR-a (N=1727)**

Analiza raspodjele gena na lokusu HLA-C pokazala je najvišu zastupljenost gena HLA-C\*07 (26,1%). Učestalost veću od 10% pokazali su slijedeći geni: HLA-C\*02 (10,2%), HLA-C\*04 (13,8%) i HLA-C\*12 (13,5%).



**Slika 10c. Raspodjela gena HLA-C među nesrodnim darivateljima iz CBMDR-a (N=1727)**

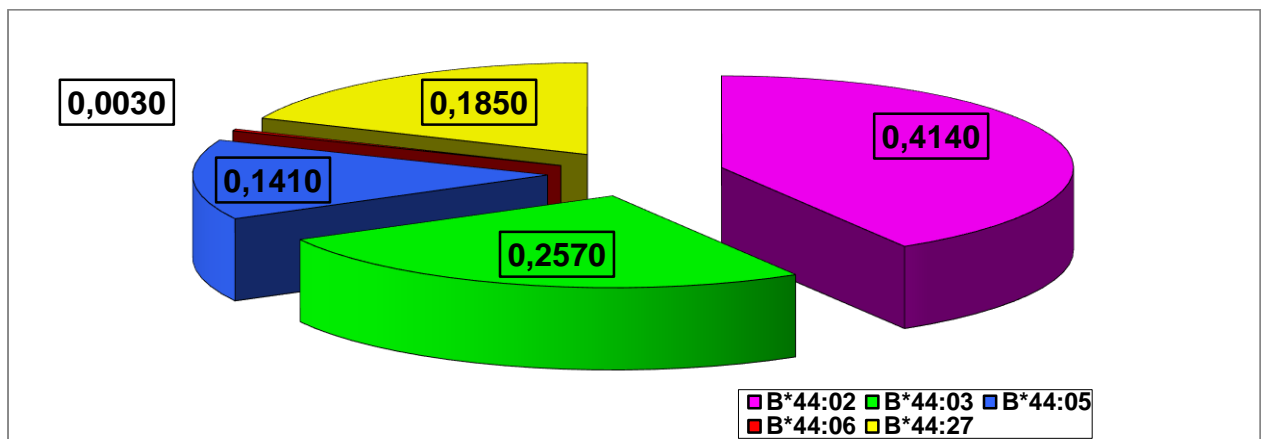
Među 13 različitih gena na lokusu HLA-DRB1, najveću frekvenciju pokazao je gen HLA-DRB1\*11 (17,5%). Geni: HLA-DRB1\*01 (10,7%), HLA-DRB1\*03 (11,4%), HLA-DRB1\*13 (12,6%) i HLA-DRB1\*15 (10,1%) su bili zastupljeni s više od 10%, a gen HLA-DRB1\*09 je zamijećen samo kod 0,3% ispitanika.



Slika 10d. Raspodjela gena HLA-DRB1 među nesrodnim darivateljima iz CBMDR-a (N=1727)

## 4.2. Raspodjela alela unutar skupine darivatelja pozitivnih za gen HLA-B\*44

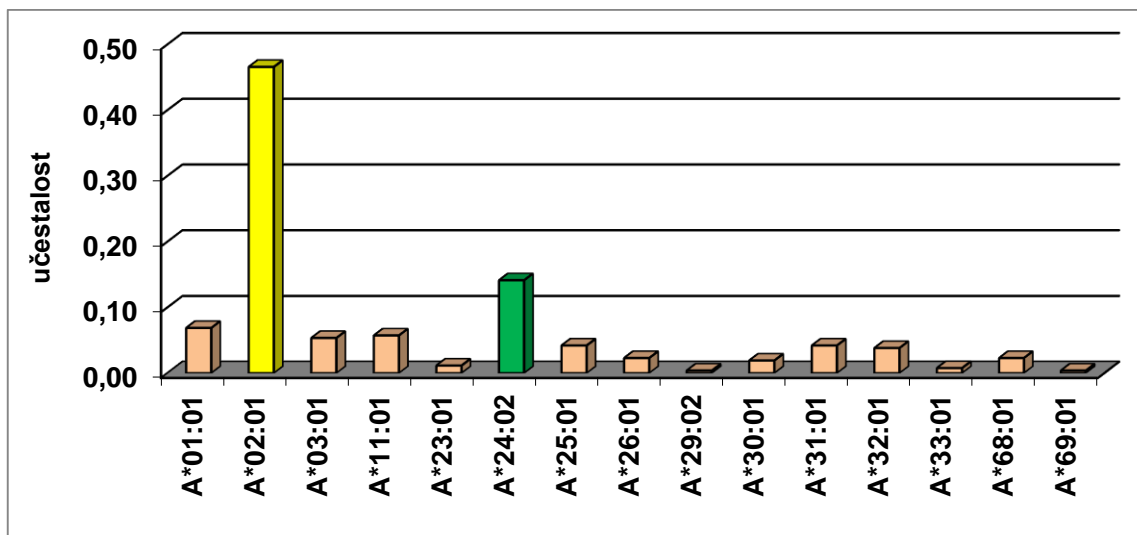
Jedan od najčešćih gena u ispitivanom uzorku bio je gen HLA-B\*44 (9,7%). 334 ispitanika bilo je pozitivno za ovaj gen od kojih smo njih 316 (jednoznačno odabranih) analizirali za pojedine podtipove (alele) gena HLA-B\*44, kao i za alele drugih lokusa (HLA-A, -C i -DRB1). Od toga su tri osobe bile homozigoti, što znači da je ukupan broj analiziranih gena bio 319. Najčešći uočeni alel bio je HLA-B\*44:02 s učestalošću od 41,4%, slijedili su aleli B\*44:03 (25,7%), alel B\*44:27 (18,5%), zatim alel B\*44:05 (14,1%), a najmanje zastupljen je bio B\*44:06 koji je utvrđen samo jedan put (slika 11).



Slika 11. Raspodjela alela HLA-B\*44 unutar skupine dobrovoljnih nesrodnih darivatelja pozitivnih za gen HLA-B\*44 (N=319)

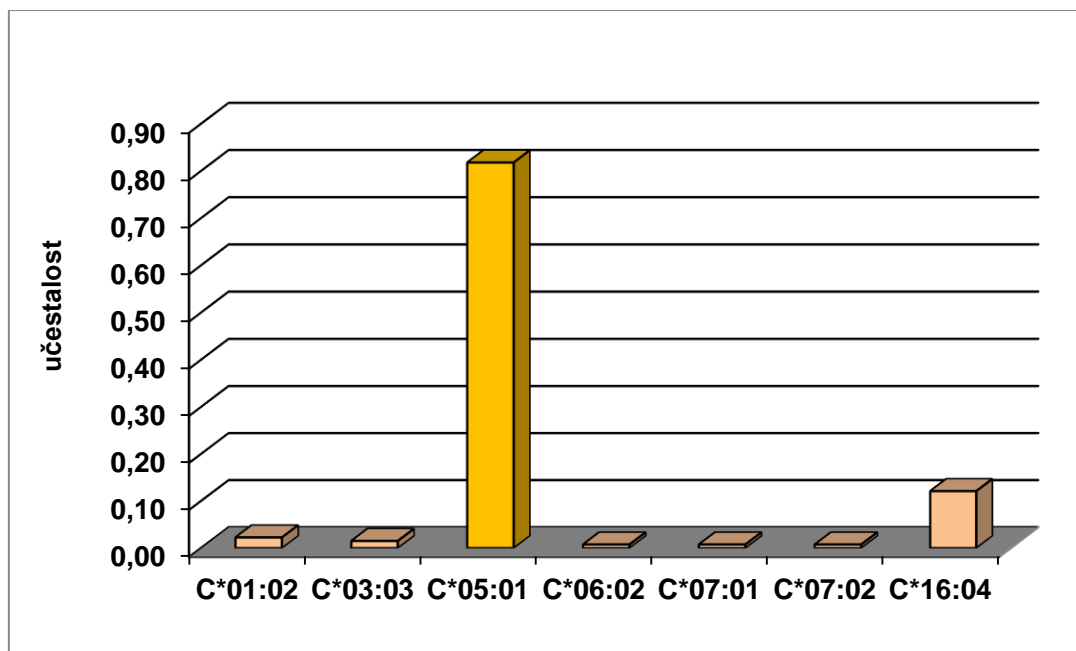
### 4.2.1. Analiza alela HLA-A, -C i -DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:02

Na lokusu HLA-A unutar skupine ispitanika pozitivnih za alel B\*44:02 uočeno je da je najčešći alel bio A\*02:01 (46,6%), slijedio je alel A\*24:02 s učestalošću od 14,1%. Najmanju učestalost (0,4%) pokazali su aleli: A\*29:02 i A\*69:01 (slika 12).



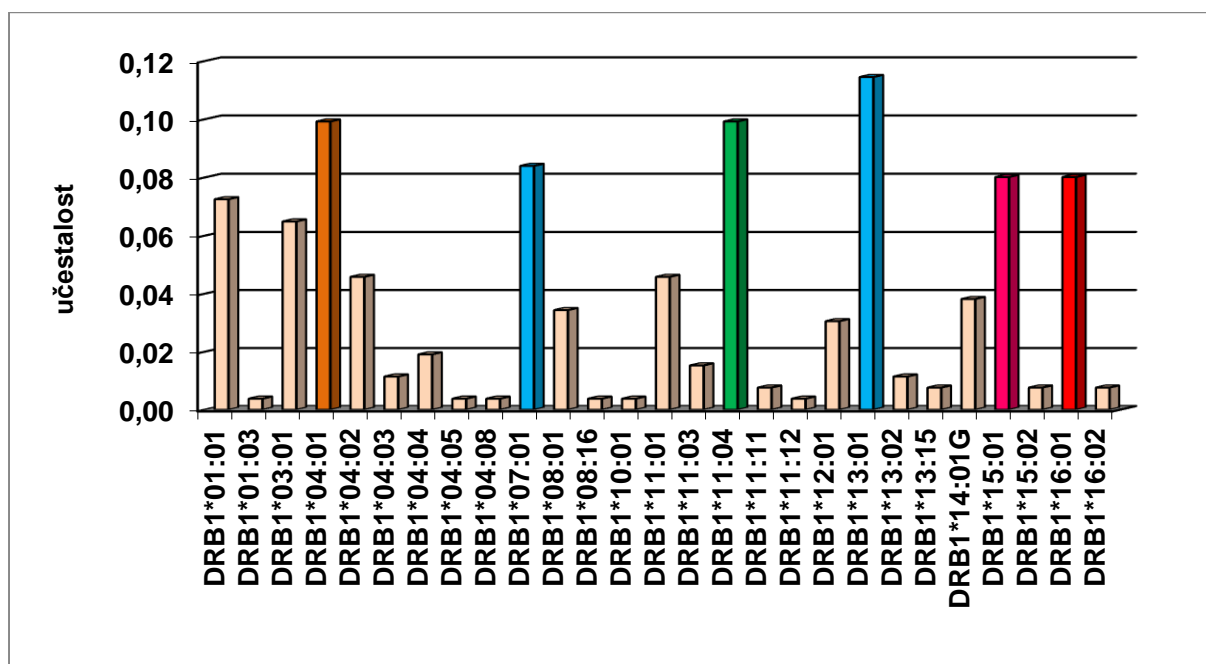
**Slika 12. Raspodjela alela HLA-A unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel B\*44:02 (N=262)**

Na slici 13 prikazana je raspodjela alela lokusa HLA\*C unutar skupine od 132 ispitanika pozitivna za alel B\*44:02. Najčešći alel bio je C\*05:01 s učestalošću od 81,8%. Drugi po zastupljenosti bio je alel C\*16:04 koji je uočen 16 puta (12,1%), dok je preostalih alela lokusa HLA-C pokazalo učestalost manju od 3,0%.



**Slika 13. Raspodjela alela HLA-C unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel B\*44:02 (N=132)**

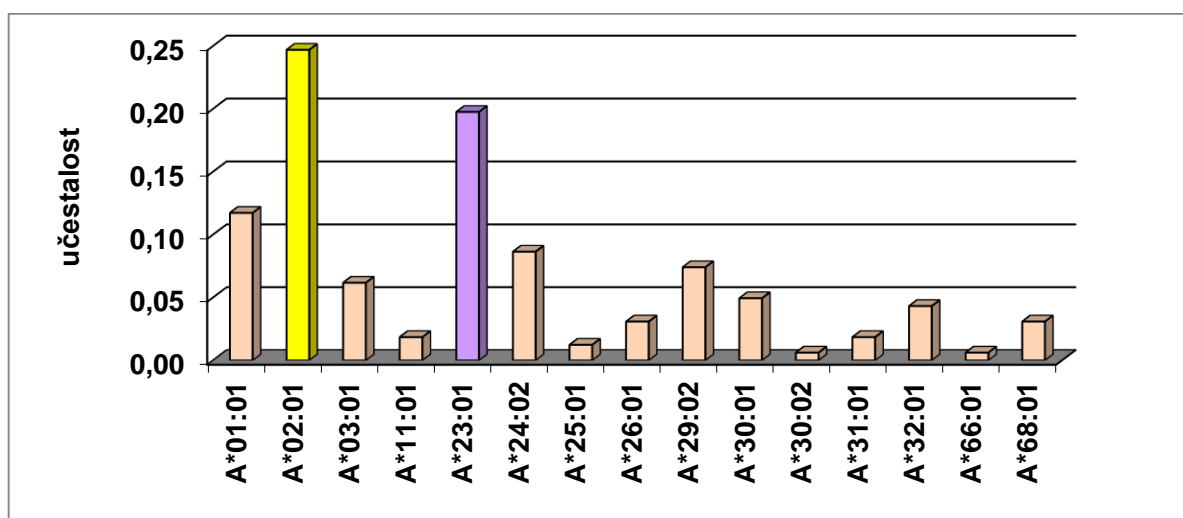
Na lokusu DRB1 najveću učestalost pokazao je alel DRB1\*13:01 (11,5%), osim toga uočena je i visoka zastupljenost alela DRB1\*04:01 (9,9%), DRB1\*11:04 (9,9%), DRB1\*07:01 (8,4%), DRB1\*15:01 (8,0%) i DRB1\*16:01 (8,0%) (slika 14).



Slika 14. Raspodjela alela HLA-DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel B\*44:02 (N=262)

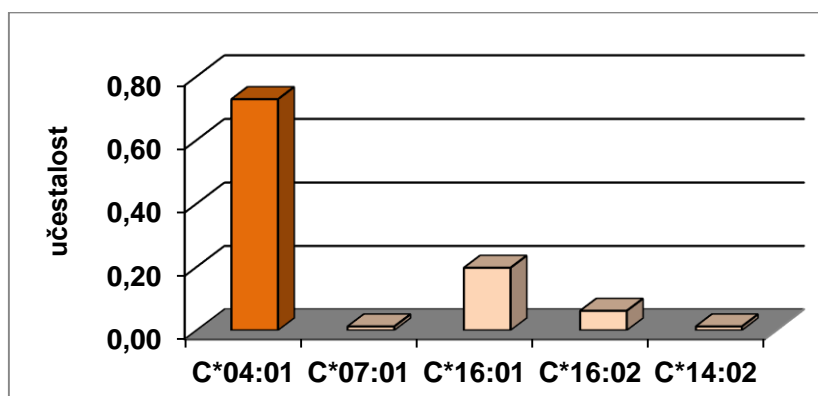
#### 4.2.2. Analiza alela HLA-A, -C i -DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:03

Unutar analizirane skupine ispitanika pozitivnih za alel B\*44:03 (N=162) njih 40 (24,7%) bilo je pozitivno za alel A\*02:01, dok je alel A\*23:01 uočen kod 32 (19,8%) nesrodna darivatelja (slika 15).



Slika 15. Raspodjela alela HLA-A unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel B\*44:03 (N=162)

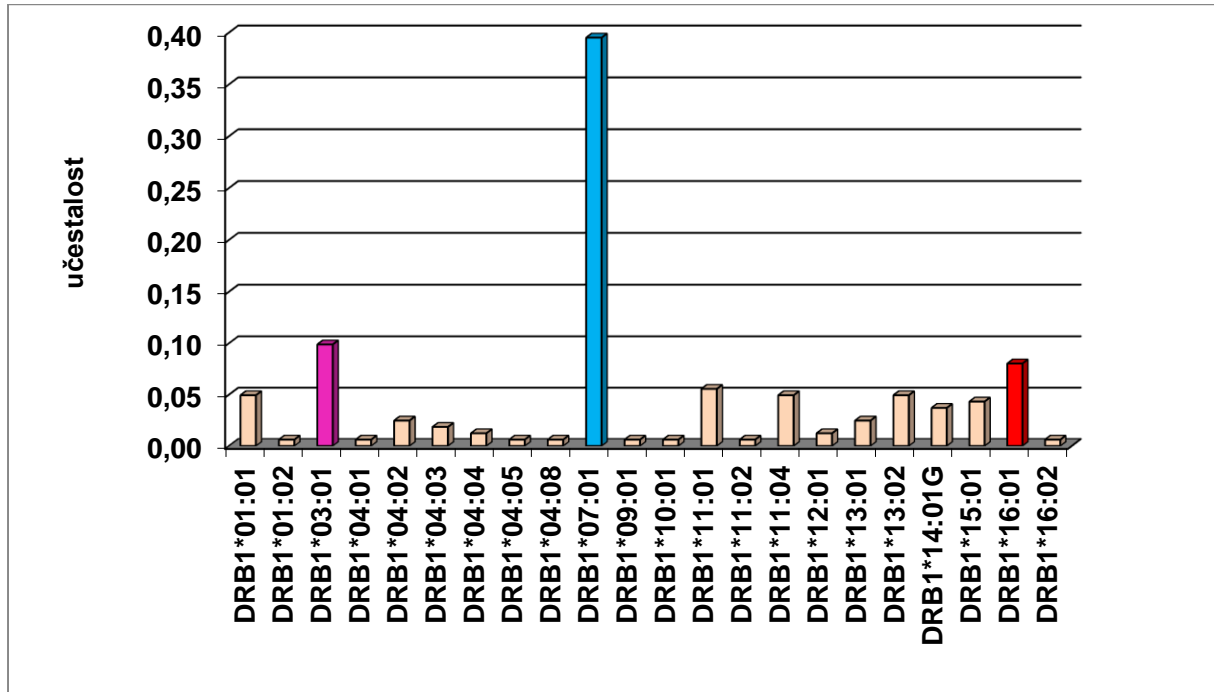
Analiza alela na lokusu HLA-C provedena je na uzorku od 82 ispitanika pozitivna za alel B\*44:03 (slika 16). Najveću zastupljenost pokazao je alel C\*04:01 (72,8%).



Slika 16. Raspodjela alela HLA-C unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel B\*44:03 (N=82)



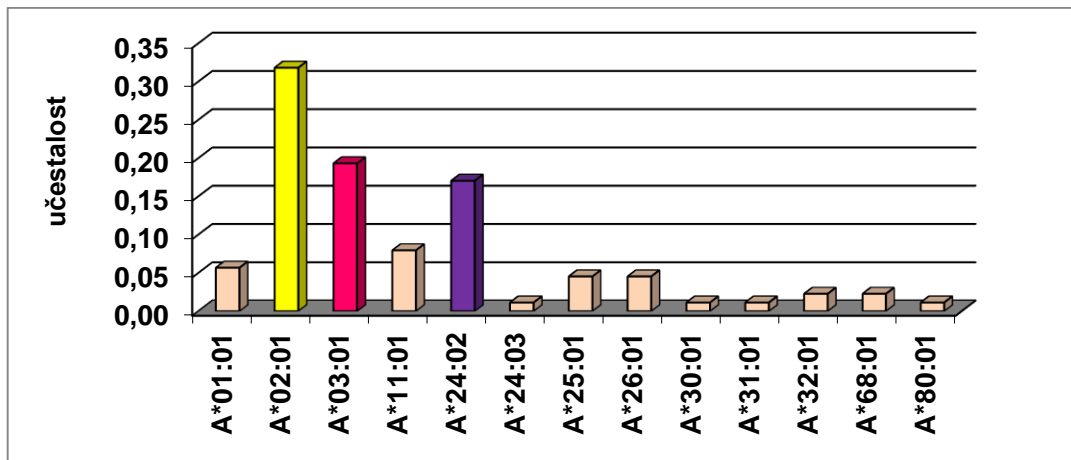
Na lokusu DRB1 najveću frekvenciju pokazao je alel DRB1\*07:01 s učestalošću od 39,5%. Dva alela: DRB1\*03:01 i 16:01 pokazali su učestalost veću od 5,0%, dok su preostali aleli na lokusu DRB1 bili zastupljeni manje od 10 puta (slika 17).



Slika 17. Raspodjela alela HLA-DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel B\*44:03 (N=162)

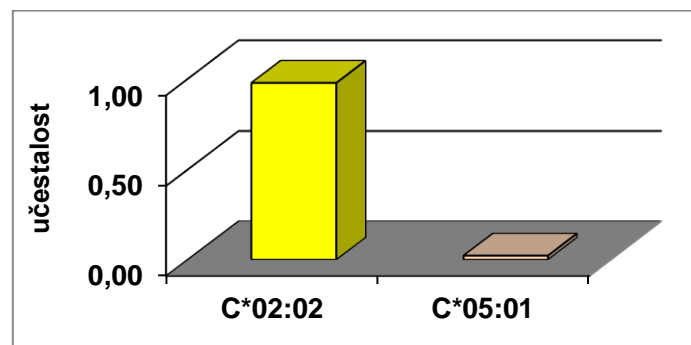
### 4.2.3. Analiza alela HLA-A, -C i -DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:05

Istraživanje raspodjele alela na lokusu HLA-A unutar skupine od 88 darivatelja pozitivnih za alel B\*44:05 pokazalo je da je alel A\*02:01 (31,8%) bio najčešći, slijedio je alel A\*03:01 (19,3%) te alel A\*24:02 (17,1%). Preostalih 10 alela lokusa HLA-A bili su zastupljeni od 1,1% do 8,0% (slika 18).



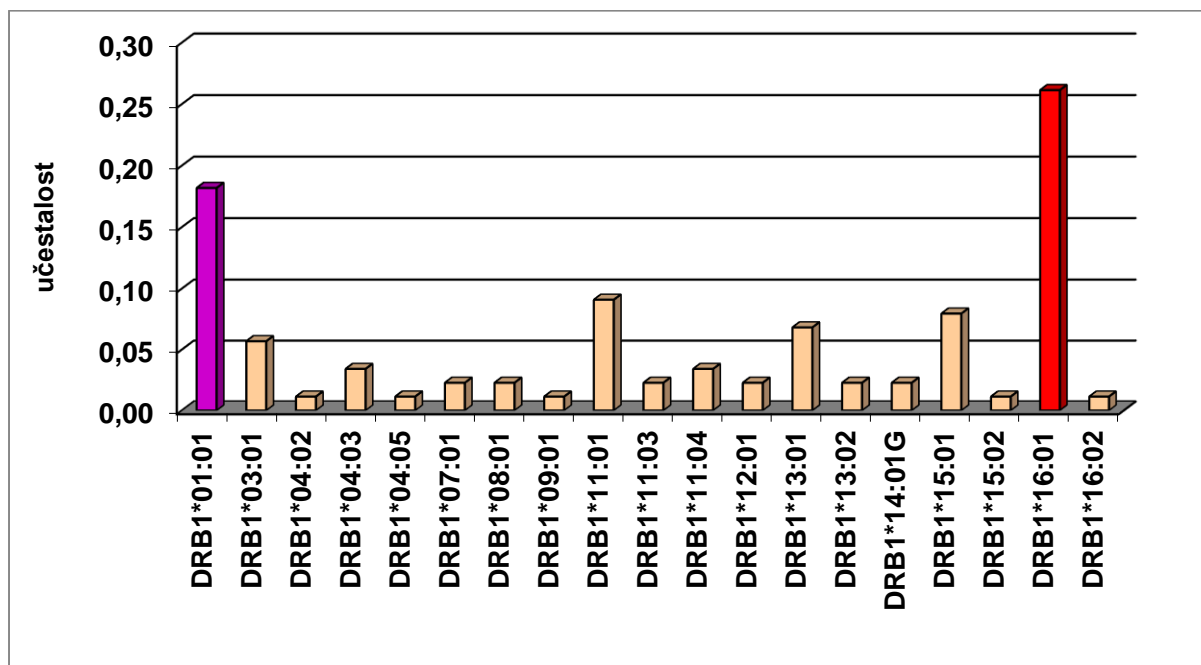
Slika 18. Raspodjela alela HLA-A unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel B\*44:05 (N=88)

Analiza raspodjele alela HLA-C među 45 ispitanika pozitivnih za alel B\*44:05 pokazala je da je 44 ispitanika bilo pozitivno za alel C\*02:02 (97,8%), dok je samo jedan ispitanik imao alel C\*05:01 (slika 19).



Slika 19. Raspodjela alela HLA-C unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel B\*44:05 (N=45)

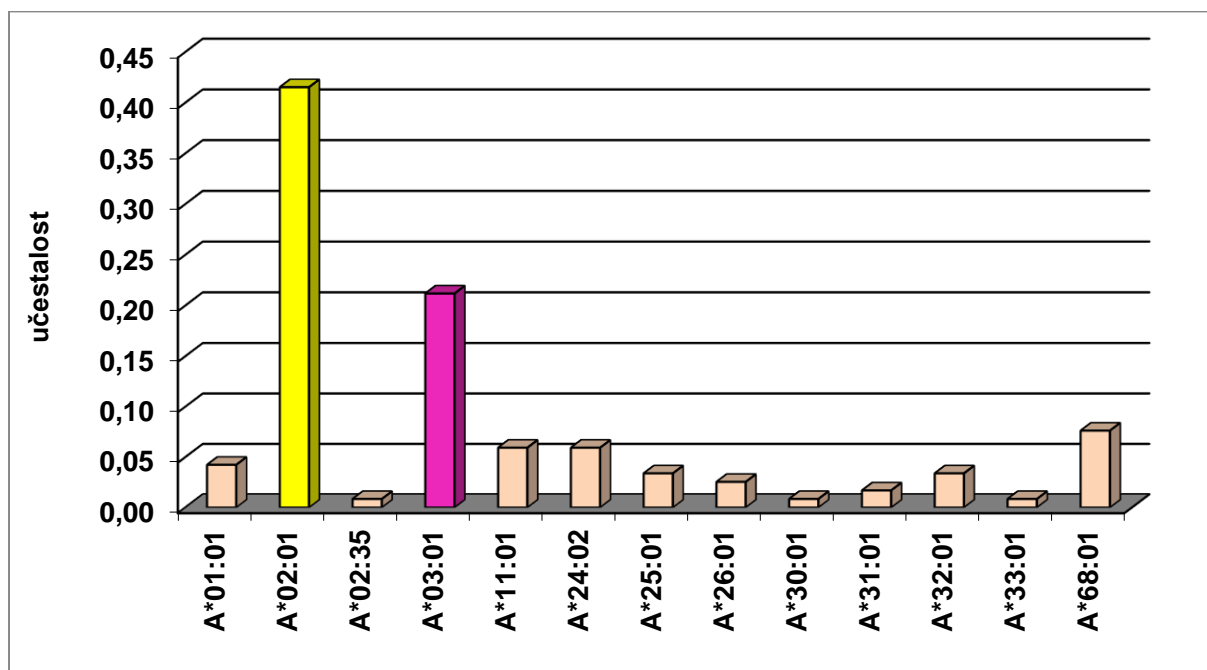
Unutar ove skupine darivatelja na lokusu DRB1 najveću učestalost pokazao je alel DRB1\*16:01 (26,1%) te alel DRB1\*01:01 (18,2%). Samo su još četiri alela: DRB1\*11:01 (9,1%), DRB1\*15:01 (8,0%), DRB1\*13:01 (6,8%) i DRB1\*03:01 (5,7%) uočena s učestalostima većim od 5,0% (slika 20).



Slika 20. Raspodjela alela HLA-DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel B\*44:05 (N=88)

#### 4.2.4. Analiza alela HLA-A, -C i -DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:27

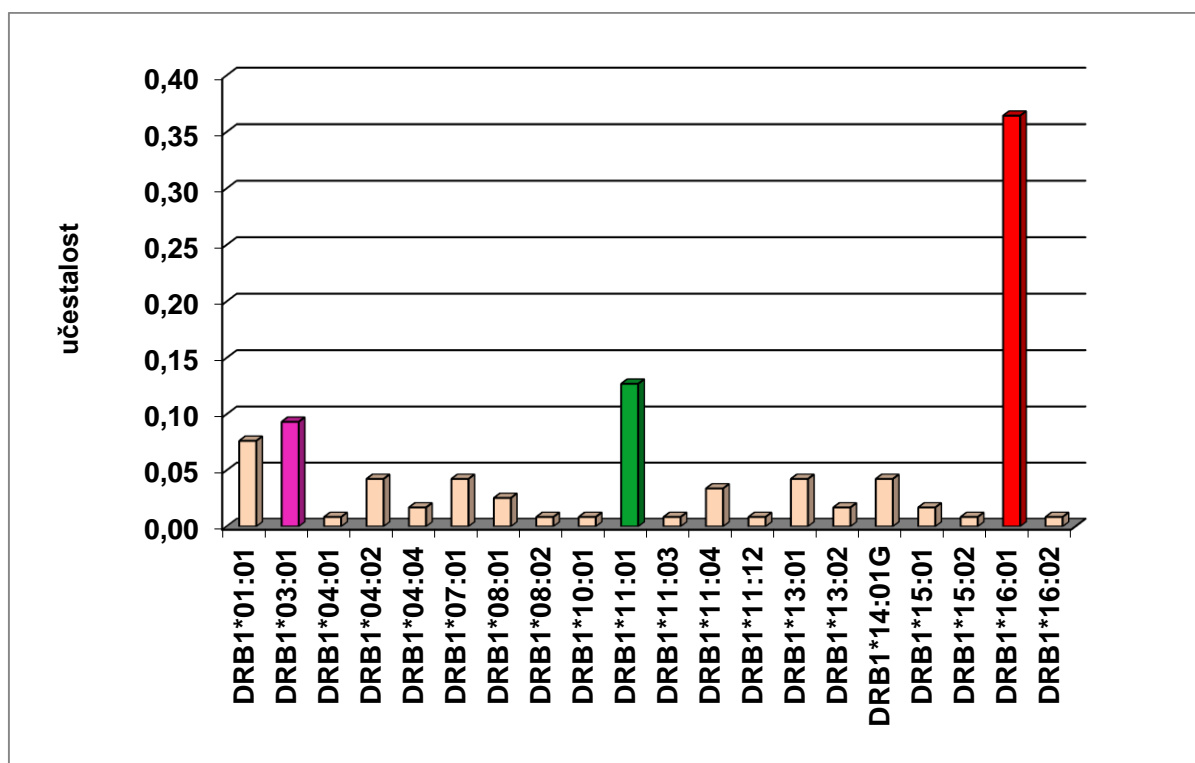
Među ispitanicima pozitivnim za alel B\*44:27 (N=118) njih 49 (41,5%) bilo je pozitivno za alel A\*02:01, a 25 (21,2%) je bilo pozitivno za alel A\*03:01 (slika 21).



Slika 21. Raspodjela alela HLA-A unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel B\*44:27 (N=118)

Analiza alela lokusa HLA-C unutar ove skupine pokazala je da su svi darivatelji bili pozitivni za alel C\*07:04.

Na lokusu HLA-DRB1 najveću učestalost pokazao je alel DRB1\*16:01 (36,4%). Visoku učestalost pokazali su i aleli: DRB1\*03:01 (9,3%) i DRB1\*11:01 (12,7%) (slika 22).



Slika 22. Raspodjela alela HLA-DRB1 unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel B\*44:27 (N=118)

### 4.3. Analiza pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za gen HLA-B\*44

Daljnja analiza obuhvatila je istraživanje pretpostavljenih haplotipova alela B\*44. Naime, govorimo o pretpostavljenim haplotipovima jer bi prave haplotipove mogli napraviti samo obiteljskim analizama kad bi dedukcijom odredili što svaki ispitanik ima na praćenim lokusima HLA.

### 4.3.1. Analiza pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:02

Analiza pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:02 prikazana je u tablici 4, prikazani su samo haplotipovi uočeni dva i više puta. Od 12 prikazanih haplotipova, najčešći je bio: HLA-A\*02:01-B\*44:02-C\*05:01-DRB1\*04:01 koji je bio prisutan kod 18 ispitanika, dok su sve ostale kombinacije pokazale zastupljenost manju od 10%.

**Tablica 4. Prikaz haplotipova HLA-A-B\*44:02-C-DRB1 uočenih dva i više puta među darivateljima pozitivnim za alel HLA-B\*44:02 (N=131)**

HAPLOTIP	n	%
A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*04:01	18	13,74
A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*07:01	12	9,16
A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*11:04	11	8,40
A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*13:01	10	7,63
A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*15:01	11	8,40
A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*16:01	9	6,87
A*24:02-B*44:02-C*05:01-DRB1*04:01	4	3,05
A*24:02-B*44:02-C*05:01-DRB1*07:01	9	6,87
A*24:02-B*44:02-C*05:01-DRB1*11:04	2	1,53
A*24:02-B*44:02-C*05:01-DRB1*13:01	4	3,05
A*24:02-B*44:02-C*05:01-DRB1*15:01	2	1,53
A*24:02-B*44:02-C*05:01-DRB1*16:01	3	2,29

*Legenda: n- broj ispitanika pozitivnih za sve alele u haplotipu; %-postotak se odnosi na ispitanike pozitivne za alel B\*44:02*

### 4.3.2. Analiza pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:03

Haplotipovi unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:03 prikazani su u tablici 5. Najčešći je bio haplotip: HLA-A\*23:01-B\*44:03-C\*04:01-DRB1\*07:01 s učestalošću od 25,93%, slijedio je haplotip: HLA-A\*02:01-B\*44:03-C\*04:01-DRB1\*07:01 koji je uočen kod 17 ispitanika (20,99%), dok su sve ostale kombinacije bile manje zastupljene.

**Tablica 5. Prikaz haplotipova HLA-A-B\*44:03-C-DRB1 uočenih četiri i više puta među darivateljima pozitivnim za alel HLA-B\*44:03 (N=81)**

HAPLOTIP	n	%
A*02:01-B*44:03-C*04:01-DRB1*03:01	4	4,94
A*02:01-B*44:03-C*04:01-DRB1*07:01	17	20,99
A*02:01-B*44:03-C*04:01-DRB1*16:01	6	7,41
A*23:01-B*44:03-C*04:01-DRB1*03:01	6	7,41
A*23:01-B*44:03-C*04:01-DRB1*07:01	21	25,93
A*23:01-B*44:03-C*04:01-DRB1*16:01	6	7,41

*Legenda: n- broj ispitanika pozitivnih za sve alele u haplotipu; %-postotak se odnosi na ispitanike pozitivne za alel B\*44:03*

### 4.3.3. Analiza pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:05

Najčešći pretpostavljeni haplotipovi unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:05 prikazani su u tablici 6. Najveću učestalost, među 6 prikazanih haplotipova pokazao je haplotip: HLA-A\*02:01-B\*44:05-C\*02:02-DRB1\*16:01 kojeg je imalo 11 od 44 ispitanika (25,0%). Uočena je i visoka učestalost haplotipa: HLA-A\*03:01-B\*44:05-C\*02:02-DRB1\*16:01 koji je bio prisutan kod 9 ispitanika (20,5%).

**Tablica 6. Prikaz haplotipova HLA-A-B\*44:05-C-DRB1 uočenih tri i više puta među darivateljima pozitivnim za alel HLA-B\*44:05 (N=44)**

HAPLOTIP	n	%
A*02:01-B*44:05-C*02:02-DRB1*01:01	6	13,64
A*02:01-B*44:05-C*02:02-DRB1*16:01	11	25
A*03:01-B*44:05-C*02:02-DRB1*01:01	5	11,36
A*03:01-B*44:05-C*02:02-DRB1*16:01	9	20,45
A*24:02-B*44:05-C*02:02-DRB1*01:01	8	18,18
A*24:02-B*44:05-C*02:02-DRB1*16:01	3	6,82

*Legenda: n- broj ispitanika pozitivnih za sve alele u haplotipu; %-postotak se odnosi na ispitanike pozitivne za alel B\*44:05*



#### 4.3.4. Analiza pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:27

Raspodjela pretpostavljenih haplotipova unutar skupine darivatelja pozitivnih za alel HLA-B\*44:27 prikazana je u tablici 7. Unutar skupine od 59 ispitanika pozitivnih za alel HLA-B\*44:27 6 haplotipova bilo je prisutno 3 i više puta. Haplotip: HLA-A\*02:01-B\*44:27-C\*07:04-DRB1\*16:01 uočen je kod više od polovice ispitanika (30 ispitanika, 50,9%).

**Tablica 7. Prikaz haplotipova HLA-A-B\*44:27-C-DRB1 uočenih tri i više puta među darivateljima pozitivnim za alel HLA-B\*44:27 (N=59)**

<b>HAPLOTIP</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
A*02:01-B*44:27-C*07:04-DRB1*03:01	5	8,47
A*02:01-B*44:27-C*07:04-DRB1*11:01	7	11,86
A*02:01-B*44:27-C*07:04-DRB1*16:01	30	50,85
A*03:01-B*44:27-C*07:04-DRB1*03:01	5	8,47
A*03:01-B*44:27-C*07:04-DRB1*11:01	3	5,08
A*03:01-B*44:27-C*07:04-DRB1*16:01	16	27,12

*Legenda: n- broj ispitanika pozitivnih za sve alele u haplotipu; %-postotak se odnosi na ispitanike pozitivne za alel B\*44:27*

## **5. RASPRAVA**

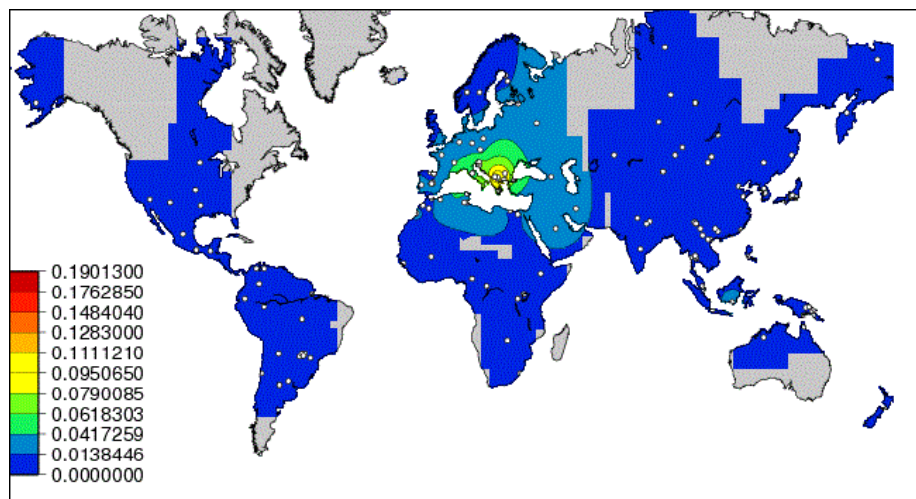
U ovom radu istraživana je raspodjela alelnih skupina/gena HLA-A, -B, -C i -DRB1 u uzorku od 1727 nesrodna dobrovoljna darivatelja iz Hrvatskog registra dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica (CBMDR).

Analiza raspodjele gena HLA-A pokazala je da je između 17 različitih gena ovog lokusa gen HLA-A\*02 bio najčešći (31,5%), a slijedili su geni HLA-A\*01 (12,9%), HLA-A\*03 (11,1%) i HLA-A\*24 (11,8%). Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjima provedenim u drugim populacijama u Europi (22). Naime, u europskim populacijama gen HLA-A\*02 je najčešći i njegova učestalost se kreće od 25%-40% (25).

Na lokusu HLA-B otkriven je najveći broj alelnih skupina (N=27) od kojih je s učestalošću od 12,9% najčešći bio gen HLA-B\*35. Međutim, on nije bio jednako učestao kao gen HLA-A\*02 na lokusu HLA-A. Usporedba rezultata s podacima iz literature za druge europske populacije nije pokazala značajna odstupanja (25) i uklapa se u sliku raspodjele tih gena u Europi. Naime, za neke od gena HLA-B poznato je da im se učestalost mijenja od sjevera prema jugu. Tako je gen HLA-B\*08 češći u Velikoj Britaniji (12%) nego na primjer u Grčkoj (4%) (25). S druge strane, učestalost gena HLA-B\*51 pokazuje pad od juga prema sjeveru Europe pa mu je učestalost u Bugarskoj čak 20,9%, na Kosovu 15,8%, a među stanovnicima Švedske oko 5%, odnosno među stanovnicima Irske samo 2,8% (25).

Uspoređujući rezultate raspodjele gena HLA-C u našem uzorku s podacima za druge populacije iz baze podataka (25) nisu uočene razlike jer je unutar većine europskih populacija gen HLA-C\*07 najčešći.

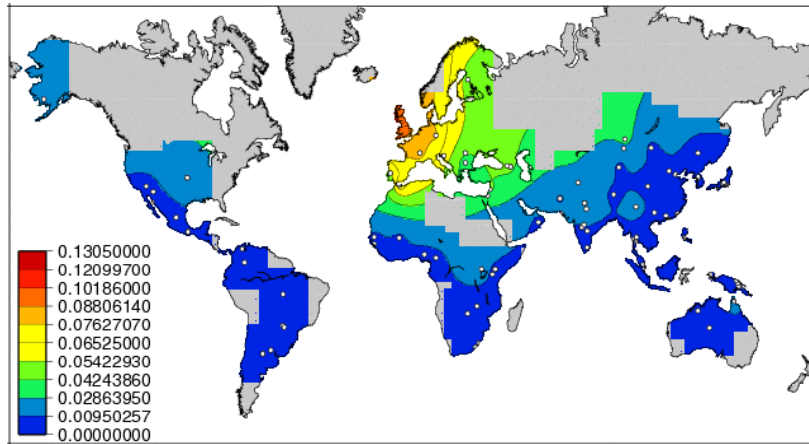
Lokus koji je pokazao najmanji polimorfizam bio je HLA-DRB1 s 13 različitih gena, od kojih je najzastupljeniji u našoj populaciji bio gen HLA-DRB1\*11 (17,5%). Ovaj rezultat je u skladu s raspodjelom tog gena u Europi jer je i za njega uočen rast učestalosti od sjevera prema jugu (Švedska  $\approx$  7%; Velika Britanija  $\approx$  5%; Irska  $\approx$  4%; Austrija  $\approx$  14%; sjeverna Italija  $\approx$  25%; BiH  $\approx$  15%; Grčka  $\approx$  28%; Albanija  $\approx$  25%) (25). Zanimljivo je spomenuti da gen HLA-DRB1\*16 koji je s učestalošću od 10,1% prisutan u našoj populaciji, značajno više prisutan nego kod stanovnika Francuske, Nizozemske, Švedske, Švicarske i Velike Britanije (25). Iz slike 23 na kojoj je prikazana raspodjela tog gena u svijetu vidljivo je da je upravo područje u našem neposrednom geografskom susjedstvu, područje s najvećom učestalošću u svijetu i upravo se ta regija smatra mjestom od kuda se gen počeo širiti.



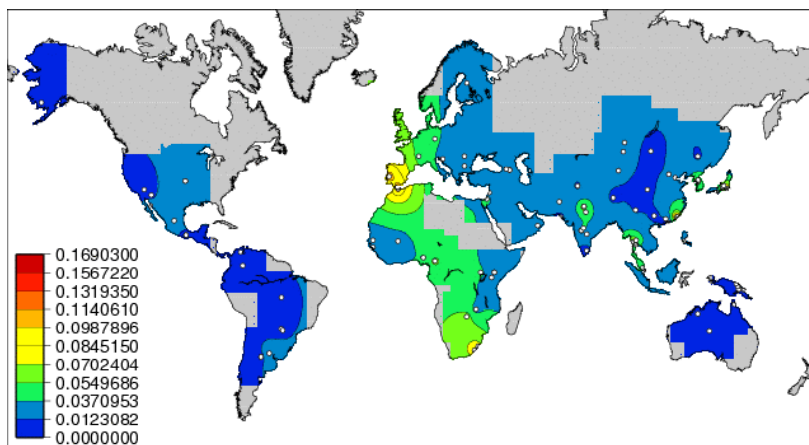
**Slika 23. Raspodjela gena HLA-DRB1\*16 u svijetu (Preuzeto s: 28)**

Drugi cilj ovog rada bio je analizirati gen HLA-B\*44 koji je pokazao učestalost od 9,7% u uzorku nesrodnih darivatelja iz CBMDR-a. Ovaj gen je zanimljiv ne samo zbog svoje zastupljenosti u populacijama Europe već i zbog toga što različiti aleli ovog gena dolaze u haplotipu s različitim alelima na lokusu HLA-C što na primjer nije slučaj s genom HLA-B\*35 čiji aleli/podtipovi pokazuju snažnu neravnotežu udruživanja s genom HLA-C\*04. Do danas je poznato preko 100 različitih alela gena HLA-B\*44 (B\*44:02-B\*44:127) stoga je jedan od ciljeva bio istražiti raspodjelu alela gena HLA-B\*44 u našoj populaciji.

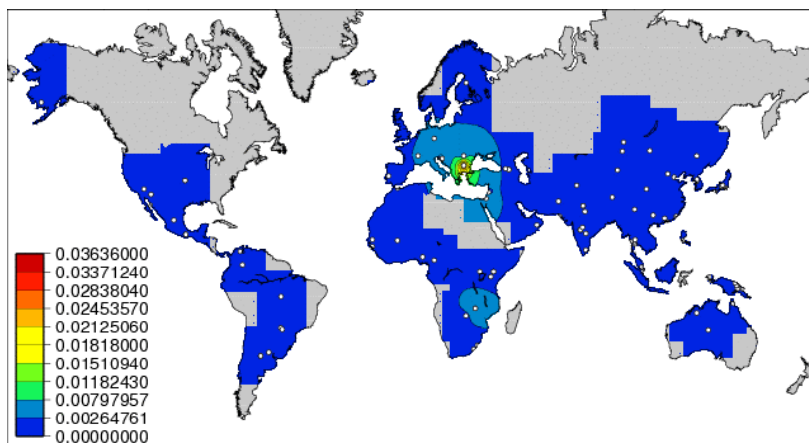
Skupina od 316 ispitanika pozitivnih za gen HLA-B\*44 dalje je testirana za sve do danas poznate alele ovog gena. Najčešći alel bio je HLA-B\*44:02 što je u skladu s podacima za druge europske populacije, odnosno pokazuje pad od sjevera prema jugu Europe (slika 24). S druge strane alel B\*44:03 koji je kod nas bio drugi po zastupljenosti pokazuje rast od istoka prema zapadu Europe (slika 25). Za treći naš najčešći alel, alel B\*44:05 smatra se da je nastao na jugu Europe od kuda se širio prema sjeveru (slika 26). Zanimljivo je spomenuti istraživanje koje je obuhvatilo tri europske populacije (Slovenija, Nizozemska, Švicarska) i koje je također potvrdilo da su aleli B\*44:02 i B\*44:03 najčešći, dok je zastupljenost alela B\*44:04 i B\*44:05 vrlo niska, a alele B\*44:06 i B\*44:07 nisu utvrdili (22). Među našim ispitanicima bila je samo jedna osoba s alelom B\*44:06, dok B\*44:07 nije imao niti jedan ispitanik. S druge strane, istraživanje provedeno u Koreji pokazalo je da je u njihovoj populaciji dominantan alel bio B\*44:03, a alel B\*44:02 je bio znatno manje zastupljen (šest puta manje) (26).



**Slika 24. Raspodjela alela HLA-B\*44:02 u svijetu (Preuzeto s: 28)**



**Slika 25. Raspodjela alela HLA-B\*44:03 u svijetu (Preuzeto s: 28)**



**Slika 26. Raspodjela alela HLA-B\*44:05 u svijetu (Preuzeto s: 28)**

O raspodjeli alela B\*44:27 u svijetu nema podataka jer je dugi niz godina ovaj alel bio „skriven“ iza alela B\*44:02. Naime, razlika između ova dva alela je u egzonu 4 na kodonu 199 gdje se dogodila promjena nukleotida T u nukleotid C (kodon GTC u kodon GCC), a na razini proteina promjena aminokiseline valin u aminokiselinu alanin (slika 27). Istraživanje koje je obuhvatilo veći broj europskih populacija s ciljem da utvrdi učestalost alela B\*44:27 pokazalo je da je ovaj alel prisutan kod slovenske populacije s frekvencijom od 25,5% i bugarske populacije s frekvencijom od 37%, a zastupljenost mu je bila vrlo niska u populacijama Francuske i Švicarske (0,02-1%), dok nije uopće uočen kod populacije Grčke i Italije (27). Učestalost od 18,5% utvrđena među našim B\*44 pozitivnim ispitanicima je nešto manja nego kod slovenske populacije. Navedeno istraživanje je jedno od brojnih najnovijih istraživanja koja se bave proučavanjem polimorfizma u egzonu 4 (za gene HLA razreda I), odnosno u egzonu 3 (za gene HLA razreda II) koja doprinose rasvijetljavanju nastanka i raspodjele pojedinih alela HLA.

AA Codon	105	110	115	120	125
B*44:02:01:01	GAC GTG GGG CCG GAC GGG CGC CTC CTC CGC GGG TAT GAC CAG GAC GCC TAC GAC GGC AAG GAT TAC ATC GCC CTG				
B*44:27:01	---	---	---	---	---
AA Codon	130	135	140	145	150
B*44:02:01:01	AAC GAG GAC CTG AGC TCC TGG ACC GCG GCG GAC ACC GCG GCT CAG ATC ACC CAG CGC AAG TGG GAG GCG GCC CGT				
B*44:27:01	---	---	---	---	---
AA Codon	155	160	165	170	175
B*44:02:01:01	CTG CCG GAG CAG GAC AGA GCC TAC CTG GAG GGC CTG TCC GTG GAG TCG CTC CGC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG				
B*44:27:01	---	---	---	---	---
AA Codon	180	185	190	195	200
B*44:02:01:01	GAG ACC CTG CAG CGC GCG G AC CCC CCA AAG ACA CAT GTG ACC CAC CAC CCC ATC TCT GAC CAT GAG CTC ACC CTG				
B*44:27:01	---	---	---	---	-C-
AA Codon	205	210	215	220	225
B*44:02:01:01	AGG TGC TGG GCC CTG GGC TTC TAC CCT GCG GAG ATC ACA CTG ACC TGG CAG CCG GAT GGC GAG GAC CAA ACT CAG				
B*44:27:01	---	---	---	---	---
AA Codon	230	235	240	245	250
B*44:02:01:01	GAC ACC GAG CTT GTG GAG ACC AGA CCA GCA GGA GAT AGA ACC TTC CAG AAG TGG GCA GCT GTG GTG GTG CCT TCT				
B*44:27:01	---	---	---	---	---
AA Codon	255	260	265	270	275
B*44:02:01:01	GGA GAA GAG CAG AGA TAC ACA TGC CAT GTA CAG CAT GAG GGG CTG CCG AAG CCC CTC ACC CTG AGA TGG G AC CCG				
B*44:27:01	---	---	---	---	- ** **
AA Codon	280	285	290	295	300
B*44:02:01:01	TCT TCC CAG TCC ACC GTC CCC ATC GTG GGC ATT GTT GCT GGC CTG GCT GTC CTA GCA GTT GTG GTC ATC GGA GCT				
B*44:27:01	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
AA Codon	305	310	315	320	325
B*44:02:01:01	GTG GTC GCT GCT GTG ATG TGT AGG AGG AAG AGC TCA G GT GGA AAA GGA GGG AGC TAC TCT CAG GCT GCG T GC AGC				
B*44:27:01	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
AA Codon	330	335			

**Slika 27. Usporedba slijeda nukleotida između alela B\*44:02 i alela B\*44:27**

(Preuzeto s: 29)

Neravnoteža udruživanja je također jedno od obilježja gena HLA te je stoga važan čimbenik pri traženju nesrodnog darivatelja u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica. Poznato je da bolesnici s neuobičajenim haplotipom HLA unutar kojeg aleli nisu u neravnoteži udruživanja imaju manju vjerojatnost pronaći podudarnog darivatelja (16). Što su lokusi HLA bliži to je neravnoteža udruživanja jača, stoga je izrazito jaka između alela lokusa HLA-B i HLA-C. S obzirom da su u većini registara (uključujući i CBMDR) u svijetu darivatelji tipizirani za gene lokusa HLA-A, -B i -DRB1, za neke alele HLA-B (tu pripadaju i aleli gena HLA-B\*44) ne postoji jedinstvena neravnoteža udruživanja samo s jednim alelom na lokusu HLA-C.

Rezultati ovog rada o LD-u alela B\*44 s alelima lokusa HLA-A, -C i -DRB1 pokazali su jaki LD alela B\*44:02 s alelima A\*02:01 i C\*05:01, dok je na lokusu DRB1 više alela (DRB1\*13:01, DRB1\*04:01 i DRB1\*11:04) bilo u neravnoteži udruživanja. Alel B\*44:03 je pokazao najjači LD s alelom A\*23:01, C\*04:01 te alelom DRB1\*07:01. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima provedenim u drugim populacijama (25). Alel B\*44:05 nije pokazao jaki LD sa niti jednim od uočenih alela lokusa HLA-A, dok je na lokusu HLA-C s alelom C\*02:02 bio u jakoj neravnoteži udruživanja, kao i s alelom DRB1\*16:01. Zanimljivo je spomenuti da i alel B\*44:27 pokazuje jaku neravnotežu udruživanja s alelom DRB1\*16:01, a ne s nekim od alela DRB1 koji su u LD-u s alelom B\*44:02. Za alel B\*44:27 je važno istaknuti da je uvijek bio prisutan u kombinaciji s alelom C\*07:04. Dobiveni rezultati bi mogli biti od velike koristi u daljnjem poboljšanju postupka traženja nesrodnog podudarnog darivatelja, kada na temelju HLA tipizacije lokusa HLA-C možemo prekinuti ili nastaviti tipizaciju potencijalnoga darivatelja za našeg bolesnika.

Analiza haplotipova među našim ispitanicima pokazala je da je haplotip HLA-A\*02:01-B\*44:02-C\*05:01-DRB1\*04:01 bio najčešći unutar skupine B\*44:02. Rezultat je u skladu s podacima za druge europske populacije za koje su dostupni podaci (Njemačka, Velika Britanija, Irska) (25). I haplotip: HLA-A\*23:01-B\*44:03-C\*04:01-DRB1\*07:01 koji je bio najčešće uočeni haplotip unutar podskupine B\*44:03 je prisutan i među drugim populacijama (Njemačka, Italija, Poljska). Najčešći haplotip (HLA-A\*02:01-B\*44:05-C\*02:02-DRB1\*16:01) iz podskupine B\*44:05 također spada u haplotipove prisutne širom Europe (25). Za razliku od prethodnih haplotipova, za haplotip: HLA-A\*02:01-B\*44:27-C\*07:04-DRB1\*16:01 nema populacijskih podataka iz prije navedenih razloga te je ovo istraživanje jedno od prvih istraživanja koje govori o njegovoj učestalosti.

## **6. ZAKLJUČAK**



1. Među ispitanicima iz CBMDR-a najčešći geni HLA su: HLA-A\*02 (31,5%), B\*35 (12,9%), C\*07 (26,1%) i DRB1\*11 (17,5%).
2. Analizom raspodjele alela HLA-B\*44 unutar skupine dobrovoljnih nesrodnih darivatelja pozitivnih za ovaj gen uočeno je 5 različitih podtipova: B\*44:02 (41,4%), B\*44:03 (25,7%), B\*44:27 (18,5%), B\*44:05 (14,1%) i B\*44:06 (0,3%).
3. Haplotipske analize alela B\*44:02 pokazale su udruživanje: na lokusu HLA-A s alelima A\*02:01 i A\*24:02, na lokusu HLA-C s alelima C\*05:01 i C\*16:04 te na lokusu HLA-DRB1 s alelima DRB1\*13:01, DRB1\*04:01 i DRB1\*11:04.
4. Analize haplotipova alela B\*44:03 pokazale su slijedeće najčešće kombinacije: na lokusu HLA-A s alelom A\*02:01 i A\*23:01, na lokusu HLA-C s alelom C\*04:01, a na lokusu HLA-DRB1 s alelom DRB1\*07:01.
5. Najučestaliji haplotipovi alela B\*44:05 su s alelima: A\*02:01, A\*03:01, A\*24:02, C\*02:02, DRB1\*16:01 i DRB1\*01:01.
6. Alel HLA-B\*44:27 najčešće je tvorio haplotipove s alelima: A\*02:01, A\*03:01, C\*07:04 i DRB1\*16:01.
7. Četiri najčešća haplotipa bila su: HLA-A\*02:01-B\*44:02-C\*05:01-DRB1\*04:01, HLA-A\*23:01-B\*44:03-C\*04:01-DRB1\*07:01, HLA-A\*02:01-B\*44:05-C\*02:02-DRB1\*16:01 i HLA-A\*02:01-B\*44:27-C\*07:04-DRB1\*16:01.
8. Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa sličnim populacijskim istraživanjima provedenim u drugim europskim populacijama.

## **7. LITERATURA**

1. Andreis I., Batinić D., Čulo F. i sur. (2004): *Imunologija*. Medicinska naklada, Zagreb.
2. Corzi D., Salazar M., Granja C.B. i sur. (1995): Advances in HLA genetics. *Exp Clin Immunogenet*, 12 (3): 156-170.
3. Volpi E.V., Chevret E., Jones T. i sur. (2000): Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci*, 113 (9): 1565-1576.
4. Mehra N.K., Kaur G. (2003): MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. *Expert Rev Mol Med*, 5 (7): 1-17
5. Thorsby E. (2009): A short history of HLA. *Tissue antigens*, 74 (2): 101-116.
6. Dausset J. (1980): The challenge of the early days of human histocompatibility. *Immunogenetics*, 10 (1): 1-5.
7. Trowsdale J., Raquoussis J., Campbell R.D. (1991): Map of the human MHC. *Immunol Today*, 12 (12): 443-446.
8. Kuby J. (1997): Major histocompatibility complex. U: Kuby J. (ur.) *Immunology*. Freeman W.H. and Company, New York, str. 223-248.
9. Balog V. (2010): Povezanost kromosomske regije 6p21 i dječje astme u populaciji Hrvatske. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
10. Janeway C.A., Travers P., Walport M. i sur. (2005): *Immunobiology – The immune system in health and disease*. Garland Publishing, New York, str. 88-91, 183-214, 379-382.
11. Klein J., Sato A. (2000): The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*, 343 (10): 702-709.
12. Chicz R.M., Urban R.G., Lane W.S., i sur. (1992): Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogenous in size. *Nature*, 358 (6389): 764-768.
13. Marsh S.G., Bodmer J.G., Albert E.D. i sur. (2001): Nomenclature for factors of the HLA system, 2001. *Tissue Antigens*, 57 (1): 236-283.
14. Choo S.Y. (2007): The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J*, 48 (1): 11-23.
15. Gruen J.R., Weissman S.M. (1997): Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood*, 90 (11): 4252-65.

16. Grubic Z., Burek Kamenaric M., Mikulic M. i sur. (2014): HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *International Journal of Immunogenetics*, 41 (3): 211-221.
17. Begovich A.B., McClure G.R., Suraj V.C. i sur. (1992): Polymorphism, recombination and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunol*, 148 (1): 249-258.
18. Vina M.A.F., Hollenbach J.A., Lyke K.E. i sur. (2012): Tracking human migrations by the analysis of the distribution of HLA alleles, lineages and haplotypes in closed and open populations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367 (1590): 820-829.
19. Hill A.V., Yates S.N., Allsopp C.E. i sur. (1994): Human leukocyte antigens and natural selection by malaria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 346 (1317): 379-385.
20. Carcassi C., Giorda R., Trucco M. i sur. (1992): A novel HLA-DR4 haplotype generated by a rare recombinational event between DRB1 and DQA1 loci. *Immunogenetics*, 36 (5): 338-340.
21. Mattiuz P.L., Di Paolo E., Fossombroni V. i sur. (1997): HLA-B44 subtypes and the chance of finding HLA compatible donor/recipient pairs for bone marrow transplantation: a haplotype study of 303 Italian families. *Tissue Antigens*, 50 (6): 602-609.
22. Vidan-Jeras B., Breur-Vriesendorp B., Bohinjec M. i sur. (1997): HLA-B44 allele frequencies and haplotypic associations in three European populations. *Eur J Immunogenet*, 24 (5): 335-343.
23. Geneugelijk K., Thus K.A., Spierings E. (2014): Predicting Alloreactivity in Transplantation. *Journal of Immunology Research* 2014.
24. Petersdorf E.W. (2006): Immunogenomics of unrelated hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol*, 18 (5): 559-564.
25. Gonzalez-Galarza F.F., Christmas S., Middleton D. i sur. (2011): Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Research*, 39 (Database issue): D913-919.

26. Song E.Y., Whang D.H., Hur M. i sur. (2001): HLA-B\*44 Allele Frequencies and Haplotypic Associations in Koreans. *Human Immunology*, 62 (10): 1142-1147.
27. Vidan-Jeras B., Buhler S., Dubois V. i sur. (2014): Resolution of HLA-B\*44:02:01G, -DRB1\*14:01:01G and -DQB1\*03:01:01G reveals a high allelic variability among 12 European populations. *Tissue Antigens*, 84 (5): 459-64.
28. <http://www.pypop.org/popdata/index.html>
29. IMGT/HLA Database. [www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla) (Accessed on 1 July 2013)

## **8. ŽIVOTOPIS**

## **Osnovni osobni podaci**

Datum i mjesto rođenja: 14.04.1988., Zagreb, Republika Hrvatska

## **Obrazovanje**

srpanj 2007. - rujan 2012. Prvostupnik Molekularne Biologije

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek

Naslov završnog rada: Matične stanice raka

rujan 2003. - srpanj 2007. Srednjoškolsko obrazovanje

IV. Gimnazija, program Jezična gimnazija

## **Akadska postignuća**

- sudjelovanje u provedbi i organizaciji manifestacije 'Noć biologije' s ciljem promocije znanosti i biologije (ožujak 2013.)

- dobitnica Rektorove nagrade u suradnji s kolegicama L.Langer i A.Stojanović, s temom Regulacija transkripcije gena *MGAT3* u malignim tumorima porijekla epitelnih stanica (lipanj 2014.)

## **Osobne vještine**

- hrvatski (materinski), engleski (C1), njemački (A2)

- timski rad, upornost, komunikativnost, kreativnost, organizacijske sposobnosti

- IT vještine (Microsoft Office: Word, Excel, PowerPoint, Outlook, Explorer), upravljanje programom za citiranje radova (Mendeley)

- klizanje, plivanje, sinkronizirano plivanje, standardni i latinsko-američki plesovi, yoga, glazbena škola (flauta), zbor