

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prirodoslovno- matematički fakultet**

**Biološki odsjek**

Leona Radmanić

# **Raznolikost gena HLA-DRB4 u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

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 eksperimentalne biologije, modula fiziologije i imunobiologije.

## **ZAHVALE**

Najveće i najiskrenije hvala želim uputiti svojoj mentorici, prof. dr.sc. Zorani Grubić, koja mi je svojom velikom stručnošću, strpljivošću i razumijevanjem puno pomogla u izradi ovog rada. Također, iskreno joj zahvaljujem na susretljivosti i poklonjenom vremenu tijekom rada sa mnom.

Željela bih se zahvaliti i Mariji Maskalan, mag. biol. mol. na savjetima i pomoći tijekom pisanja dipomskog rada.

Srdačno zahvaljujem i svim ostalim djelatnicima Kliničke jedinice za tipizaciju tkiva na razumijevanju, susretljivosti i vrlo ugodnoj radnoj atmosferi, bez kojih izrada ovog rada ne bi bila tako lijepo i korisno iskustvo.

Na kraju, želim se zahvaliti svojim roditeljima, bratu, baki, djedovima, dečku i prijateljima na njihovoj bezuvjetnoj podršci, ljubavi i vjeri u mene, koji su mi omogućili da studentsko doba uspješno privedem kraju.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno- matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Raznolikost gena HLA-DRB4 u Hrvatskoj**

Leona Radmanić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom istraživanju analiziran je polimorfizam gena HLA-DRB4 i haplotipova HLA-DRB1-DRB4 u Hrvatskoj među kadaveričnim davateljima organa (N=144). Svi uzorci bili su odabrani na temelju prisustva jednog od alela skupine HLA-DRB53 (aleli DRB1\*04, DRB1\*07 i DRB1\*09). Određivanje alela lokusa HLA-DRB4 provedeno je metodom lančane reakcije polimerazom i početnicama specifičnim za jedan ili više alela HLA (engl. Polymerase Chain Reaction–Sequence Specific Primers, PCR-SSP). Aleli lokusa HLA-DRB1 i -DQB1 određeni su metodom lančane reakcije polimerazom i probama specifičnim za jedan ili grupu alela HLA (engl. Polymerase Chain Reaction–Sequence Specific Oligos, PCR-SSO). Na lokusu HLA-DRB4 otkriveno je sedam različitih alela, 5 funkcionalnih alela (DRB4\*01:01:01:01, DRB4\*01:02, DRB4\*01:03, DRB4\*01:05 i DRB4\*01:08) i dva nul alela (DRB4\*01:03:01:02N i HLA-DRB4\*03:01N). Među ispitanicima pozitivnim za jedan od alela skupine HLA-DRB1\*04 nije otkrivena statistički značajna razlika u raspodjeli alela DRB4 s obzirom na prisustvo alela DQB1. U haplotipovima HLA-DRB1\*04-DQB1 najčešći prisutni alel je bio DRB4\*01:03 (86,7%). Među HLA-DRB1\*07:01 pozitivnim haplotipovima uočena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u raspodjeli alela HLA-DRB4 s obzirom na prisustvo alela HLA-DQB1. Haplotipovi: HLA-DRB1\*07:01-DQB1\*03:03 na lokusu HLA-DRB4 u 98,0% slučajeva imali su nul alel DRB4\*01:03:01:02N, dok su haplotipovi DRB1\*07:01-DQB1\*02:02 na lokusu DRB4 u 65,5% slučajeva imali prisutan alel DRB4\*01:03. Unutar skupine HLA-DRB1\*04 pozitivnih haplotipova nije uočena statistički značajna razlika u raspodjeli alela HLA-DRB4 s obzirom na prisustvo alela HLA-DQB1. Alel HLA-DRB1\*09:01 je kod svih ispitanika uočen u kombinaciji s alelima HLA-DRB4\*01:03-DQB1\*03:03.

(49 stranica, 29 slike, 6 tablica, 18 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: geni HLA-DRB4, polimorfizam, haplotipovi HLA, neravnoteža udruživanja

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

Suvoditelj: Dr.sc. Ana Galov, izv.prof., PMF Zagreb

Ocjenjivači: Dr. sc. Ana Galov, izv. prof., PMF Zagreb

Dr. sc. Petra Korać, doc., PMF Zagreb

Dr. sc. Renata Šoštarić, doc., PMF Zagreb

Zamjena: Dr.sc. Nada Oršolić, red.prof., PMF Zagreb

Rad prihvaćen: 02.02.2017.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

## **Polymorphism of HLA-DRB4 genes in Croatia**

Leona Radmanić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In this study the polymorphism of HLA-DRB4 alleles and HLA-DRB1-DRB4 haplotypes among Croatian cadaveric organ donors (N = 144) was analyzed. All samples were selected based on the presence of one of the alleles of HLA-DRB53 group (DRB1\*04, DRB1\*07, and DRB1\*09 alleles). Typing of HLA-DRB4 alleles was carried out by polymerase chain reaction sequence specific primers for one or more HLA alleles (method: PCR-SSP). HLA-DRB1 and -DQB1 alleles were determined by polymerase chain reaction sequence specific oligos for one allele or a group of HLA alleles (method: PCR-SSO). On the HLA-DRB4 locus seven different alleles were discovered; 5 functional alleles (DRB4\*01:01:01:01, DRB4\*01:02, DRB4\*01:03, DRB4\*01:05, and DRB4\*01:08) and two null alleles (DRB4\*01:03:01:02N and HLA-DRB4\*03:01N). Among individuals positive for one of the HLA-DRB1\*04 alleles no statistically significant difference was detected in the distribution of the HLA-DRB4 alleles given the presence of the DQB1 alleles. Among HLA-DRB1\*04-DQB1 haplotypes the most present was DRB4\*01:03 allele (86.7%). Among HLA-DRB1\*07:01 positive haplotypes a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in the distribution of HLA-DRB4 alleles due to the presence of different HLA-DQB1 alleles was observed. The HLA-DRB1\*07:01-DQB1\*03:03 haplotype in 98.0% of cases had the DRB4\*01:03:01:02N allele on the HLA-DRB4 locus, while DRB1\*07:01-DQB1\*02:02 haplotype on the HLA-DRB4 locus in 65.5% of cases had the DRB4\*01:03 allele (65.5%). Within the group of the HLA-DRB1\*04 positive haplotype, there was no statistically significant difference in the distribution of HLA-DRB4 alleles due to the presence of different HLA-DQB1 alleles. The HLA-DRB1\*09:01 allele was observed in combination: HLA-DRB4\*01:03-DQB1\*03:03 in all the cases.

(49 pages, 29 figures, 6 tables, 18 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: HLA-DRB4 gene, HLA haplotypes, polymorphism, linkage disequilibrium

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

Co-supervisor: Dr. Ana Galov, Assoc.Prof., University in Zagreb

Reviewers: Dr. Ana Galov, Assoc.Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Dr. Petra Korać, Asst. Prof, Faculty of Science, University of Zagreb

Dr. Renata Šoštarić, Asst. Prof, Faculty of Science, University of Zagreb

Replacement: Dr. Nada Oršolić, Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis accepted: 02.02.2017.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. OPĆENITO O SUSTAVU HLA.....	2
1.2. POLIMORFIZAM HLA.....	4
1.3. REGIJA HLA RAZREDA I.....	7
1.4. REGIJA HLA RAZREDA II.....	8
1.5. SUBREGIJA HLA-DR.....	10
1.5.1. GENI SUBREGIJE HLA-DRB.....	10
1.5.2. HAPLOTIPOVI SUBREGIJE HLA-DRB.....	13
1.6. POLIMORFIZAM GENA HLA-DRB1 HAPLOTIPSKE SKUPINE HLA-DR53.....	15
1.6.1. ALELI HLA-DRB1*04.....	16
1.6.2. ALELI HLA-DRB1*07.....	17
1.6.3. ALELI HLA-DRB1*09.....	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	20
3. MATERIJALI I METODE.....	22
3.1. MATERIJALI.....	23
3.1.1. ISPITANICI.....	23
3.2. METODE.....	23
3.2.1. IZOLACIJA DNA.....	23
3.2.2. UMNAŽANJE ALELA HLA.....	25
3.2.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	26
4. REZULTATI.....	27



4.1. RASPODJELA ISPITIVANIH UZORAKA S OBZIROM NA ALEL/GEN NA LOKUSU HLA-DRB1.....	28
4.2. RASPODJELA ALELA HLA-DRB4 MEĐU ISPITANICIMA POZITIVNIM ZA ALEL HLA-DRB1*07.....	29
4.3. RASPODJELA ALELA HLA-DRB4 MEĐU ISPITANICIMA POZITIVNIM ZA ALEL HLA-DRB1*04.....	32
5. RASPRAVA.....	37
6. ZAKLJUČAK.....	41
7. LITERATURA.....	43
8. ŽIVOTOPIS.....	46

# **1.UVOD**

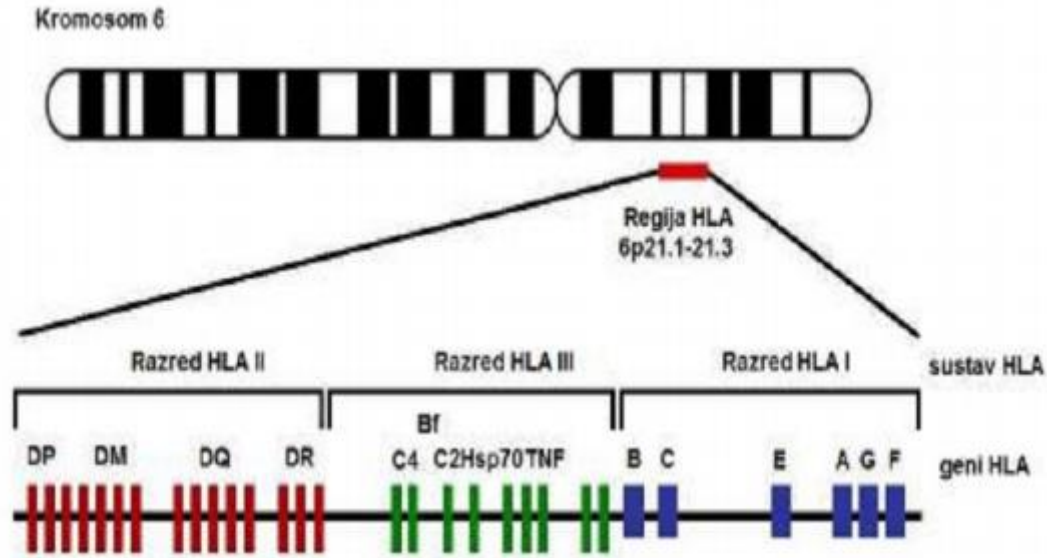
## 1.1. OPĆENITO O SUSTAVU HLA

Glavni sustav tkivne snošljivosti (*engl. Major Histocompatibility Complex; MHC*) je jedinstven genetski sustav i ima izuzetnu važnost u transplataciji tkiva i organa. Kod čovjeka se taj sustav naziva sustav HLA (*engl. Human Leucocyte Antigens*). Otkriće sustava HLA vezano je uz 1954.g., kada su u serumima politransfundiranih bolesnika otkrivena antitijela tog sustava, kasnije je otkriveno postojanje antitijela HLA i u serumima višerotkinja. Pri istraživanju sustava HLA, prva tri otkrivena lokusa, određena serološkim metodama, nazvana su lokusi HLA-A, -B i -C, a nakon toga je mapiran lokus „HLA-DR“, odnosno regija. Prvi gen otkriven unutar regije HLA-D nazvan je HLA-DR, a zatim su otkrivena još dva lokusa (HLA-DQ i -DP). Razlika u određivanju antigena/antitijela lokusa HLA-A i -B u odnosu na antigene/antitijela HLA-D je navela na pretpostavku da se radi o međusobno vrlo sličnim genima, ali ne i nužno istim.

Najvažnije obilježje sustava HLA je visok stupanj raznolikosti njegovih lokusa. Ukupno je na lokusima HLA otkriveno više od 14000 različitih alela. Geni HLA su najpolimorniji geni u ljudskom genomu, a najpolimorniji je gen HLA-B. Velik broj alela HLA je rezultat prirodne selekcije, tome u prilog govori da je nizak postotak homozigotnih osoba za alele HLA što ukazuje da postoji selektivna prednost heterozigotnih osoba. Svaka osoba ima dva alela pojedinog gena HLA, jedan naslijeđen od oca, a drugi od majke.

Sljedeće obilježje sustava HLA je genska neravnoteža udruživanja (*engl. linkage disequilibrium, LD*). To je pojava da se aleli dva ili više usko vezanih lokusa HLA javljaju u istom haplotipu HLA češće nego što bi to bilo za očekivati na temelju njihovih pojedinačnih učestalosti. Jedna od karakteristika je i križna reaktivnost (*engl. cross-reactive group*). To je pojava kada antitijela HLA reagiraju ne samo s jednim već s više antigena HLA, a javlja se uglavnom među antigenima istog lokusa HLA.

Sustav HLA je kod čovjeka smješten na kraćem kraku kromosoma 6 (6p21) i zauzima približno jednu tisućinu ljudskog genoma (3,8 cM) (slika 1) [1].

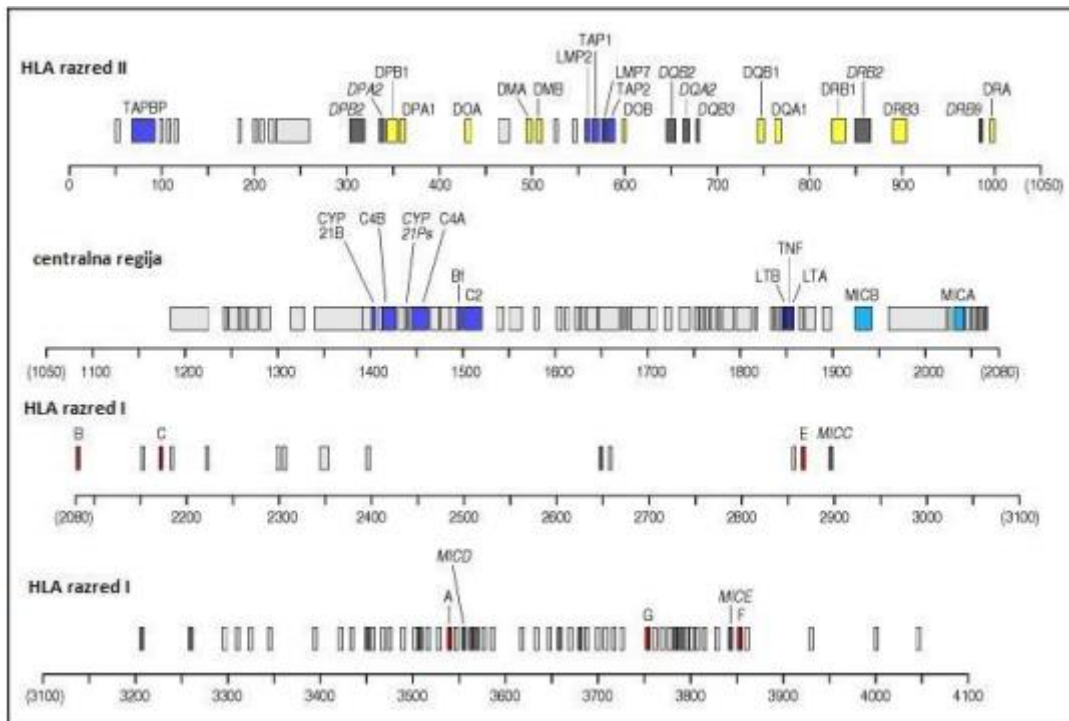


Slika 1. Smještaj regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6 (preuzeto iz [11])

Na slici 2 je prikazana mapa sustava HLA s pripadajućim genima, međutim mnogim genima unutar ove regije nije do kraja razjašnjena uloga u organizmu. Danas je moguće razlučiti četiri različite skupine gena unutar ovog odsječka kromosoma 6:

1. geni HLA razreda I
2. geni HLA razreda II
3. geni razreda III; ovi geni ne spadaju u gene sustava HLA, ali su povezani s odvijanjem nekih imunoloških reakcija u organizmu (C2, C4A, C4B, BF, HSP70, i dr.)
4. geni razreda IV; ovi geni ne spadaju u gene sustava HLA i nisu povezani s odvijanjem imunoloških reakcija u organizmu (CYP21, NOTCH3, PBX2, i dr.)

Geni HLA razreda I kodiraju glikoproteine prisutne gotovo na svim stanicama u ljudskom organizmu, dok su geni HLA razreda II zaduženi za sintezu molekula HLA razreda II koje su prisutne samo na nekim stanicama (npr. limfocitima B, monocitima, makrofagima i dr.).



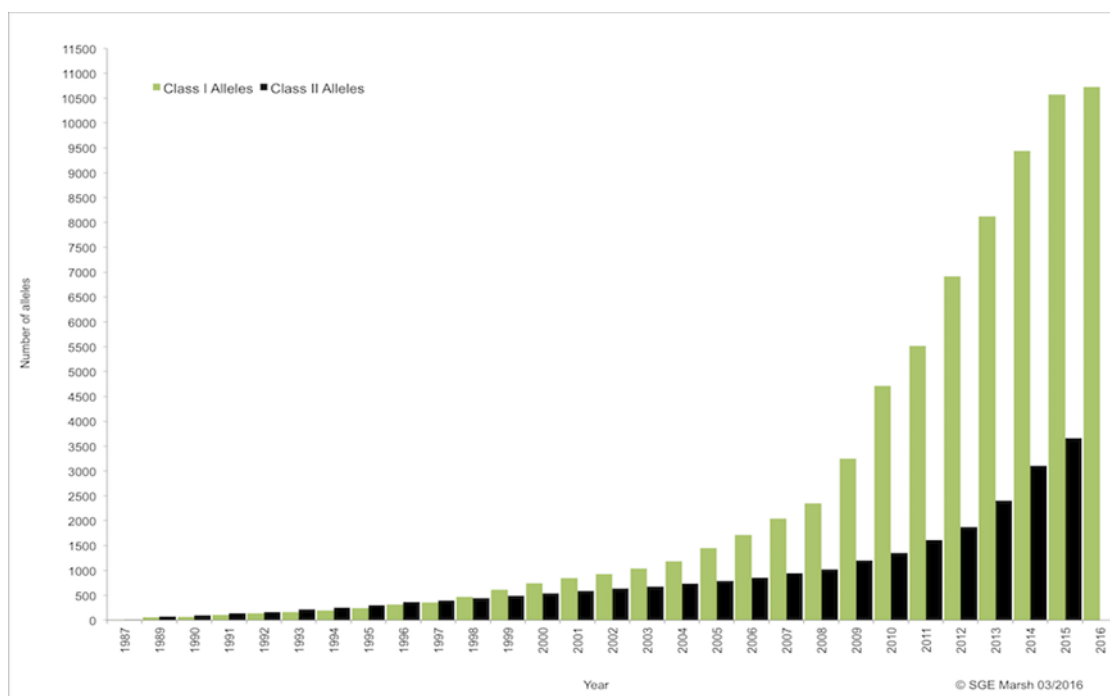
Slika 2. Mapa regije HLA (preuzeto iz [10])

Cjeloupna regija HLA može se podijeliti na 3 podregije: regija HLA razreda I, centralna regija ili regija HLA razreda III te regija HLA razreda II [4].

## 1.2. POLIMORFIZAM HLA

Pronađen je izrazito velik broj novih alela HLA nakon što su se metode serološke tipizacije upotpunile direktnim sekvenciranjem gena HLA. Broj aminokiselina u kojima se proteinski produkti različitih alela HLA međusobno razlikuju može iznositi i do 20 aminokiselinskih ostataka. Broj novootkrivenih alela HLA razreda I u posljednjih nekoliko godina pokazuje eksponencijalni rast (slika 3). Zanimljivo je da razlike u slijedovima parova baza između

različitih alela HLA nisu nasumično raspoređene uzduž čitave sekvence pojedinog gena, odnosno cijelog polipeptidnog lanca molekule HLA. Naime, razlike su uglavnom smještene u onim dijelovima gena HLA koji kodiraju domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  molekula HLA razreda I, odnosno kod gena HLA razreda II u onom dijelu odgovornom za kodiranje domena  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  molekule. Primjenom rendgenske kristalografije utvrđeno je da se od 17 aminokiselina koje su pokazivale značajan polimorfizam unutar molekule HLA-A2, čak njih 15 smjestilo unutar procjepa u molekuli koji ima ulogu veznog mjesta za strane 13 peptide. Potom se došlo do zaključka da različitost alela HLA doprinosi uočenoj sposobnosti molekula HLA da stupe u interakciju sa stranim antigenom [12].



Slika 3. Grafički prikaz broja novoimenovanih alela od 1987. do travnja 2016. (preuzeto iz [18])

Ako uzmemo u obzir broj poznatih alela HLA-A, -B i -C iz tablice 1, možemo izračunati teoretski broj kombinacija koje mogu postojati u svijetu. Množenjem brojeva 3399, 4242 i 2950 dobit ćemo  $3,25 \times 10^{10}$  mogućih različitih fenotipova HLA razreda I u općoj populaciji. Ako uzmemo u obzir lokuse gena HLA razreda II i pomnožimo s brojem alela HLA-DRB1 (1883 alela) s brojem alela gena HLA-DQA1 (69 alela) i -DQB1 (911 alela) te brojem alela gena HLA-DPB1 (644 alela) dobit ćemo  $2,85 \times 10^{14}$  različitih kombinacija HLA razreda II. Pošto se svaki pojedini haplotip sastoji od gena HLA razreda I i II, množenjem svih brojeva dobivamo broj od gotovo  $9,26 \times 10^{24}$  mogućih fenotipova HLA. Međutim, taj je broj znatno manji zbog LD-a, tako da pojedini fenotipovi HLA nisu nikad uočeni u brojim populacijama koje su do sada istraživane.

Tablica 1. Broj poznatih alela HLA do travnja 2016. (prema [15])

HLA razred I		HLA razred II		3743	
lokus	broj alela	lokus	broj alela	lokus	broj alela
A	3399	DRA	7	DRB1	1883
B	4242	DRB	2018	DRB2	1
C	2950	DQA1	69	DRB3	77
E	21	DQB1	911	DRB4	24
F	22	DPA1	43	DRB5	26
G	53	DPB1	644	DRB6	3
		DPB2	6	DRB7	2
		DMA	7	DRB8	1
		DMB	13	DRB9	1
		DOA	12		
		DOB	13		

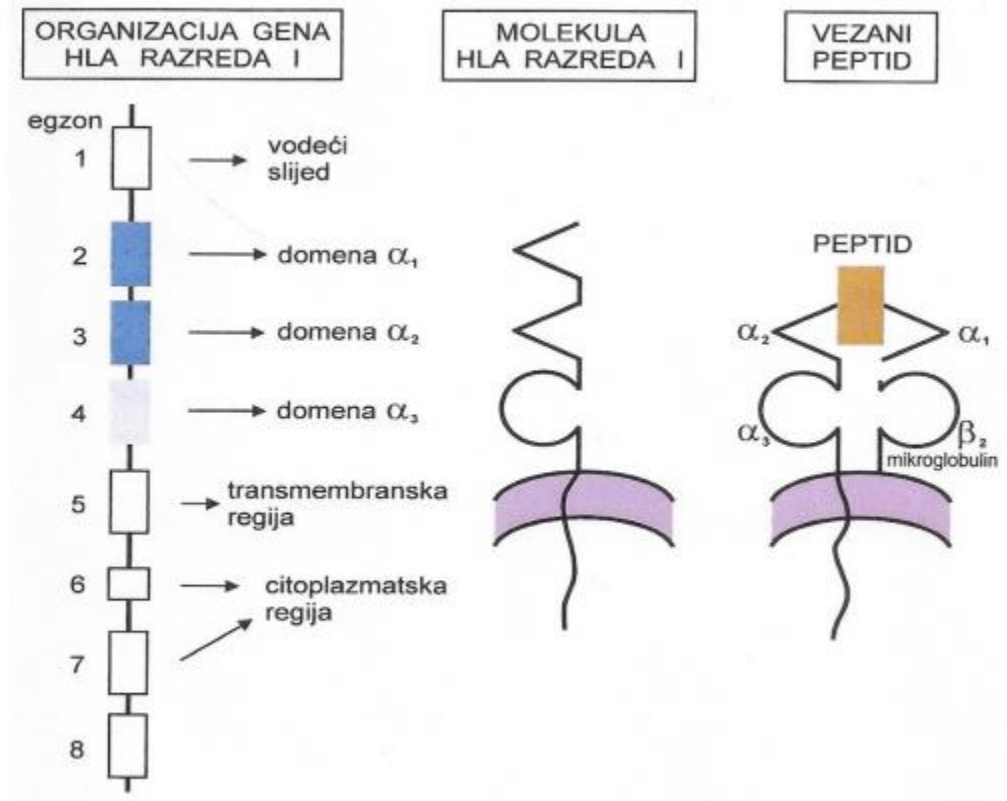
### 1.3. REGIJA HLA RAZREDA I

Regija HLA razreda I obuhvaća oko 2 mega baza (Mb), a smještena je bliže telomernom kraju kromosoma 6. Unutar ove regije smještene su 3 skupine gena: klasični geni (HLA-A, -B i -C) koje odlikuje visoka raznolikost alela, neklasični geni (HLA-E, -F i -G) koje pokazuju mali polimorfizam u usporedbi s klasičnim genima HLA razreda I te nefunkcionalni, pseugdeni (HLA-H, -J, -K, -L, -P, -T, -U, -V, -W i -X) [8].

Unutar regije HLA razreda I nalaze se i geni koji, ni strukturno, ni funkcionalno ne spadaju u gene HLA, kao što su npr. gen S, onkogen OCT3 i dr.

Gen HLA razreda I građen je 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 kodiraju za domene  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  molekule HLA razreda I koje se nalaze izvan stanice. Egzon 5 kodira transmembranski dio molekula, dok citoplazmatski dio kodiraju dva egzona, 6 i 7. Završni dio molekule, netranslatirajući 3' kraj kodiran je egzonom 8 (slika 4). Sastavni dio molekule HLA razreda I je i laki lanac ( $\beta_2$  mikroglobulin) koji nije kodiran genima HLA [8].

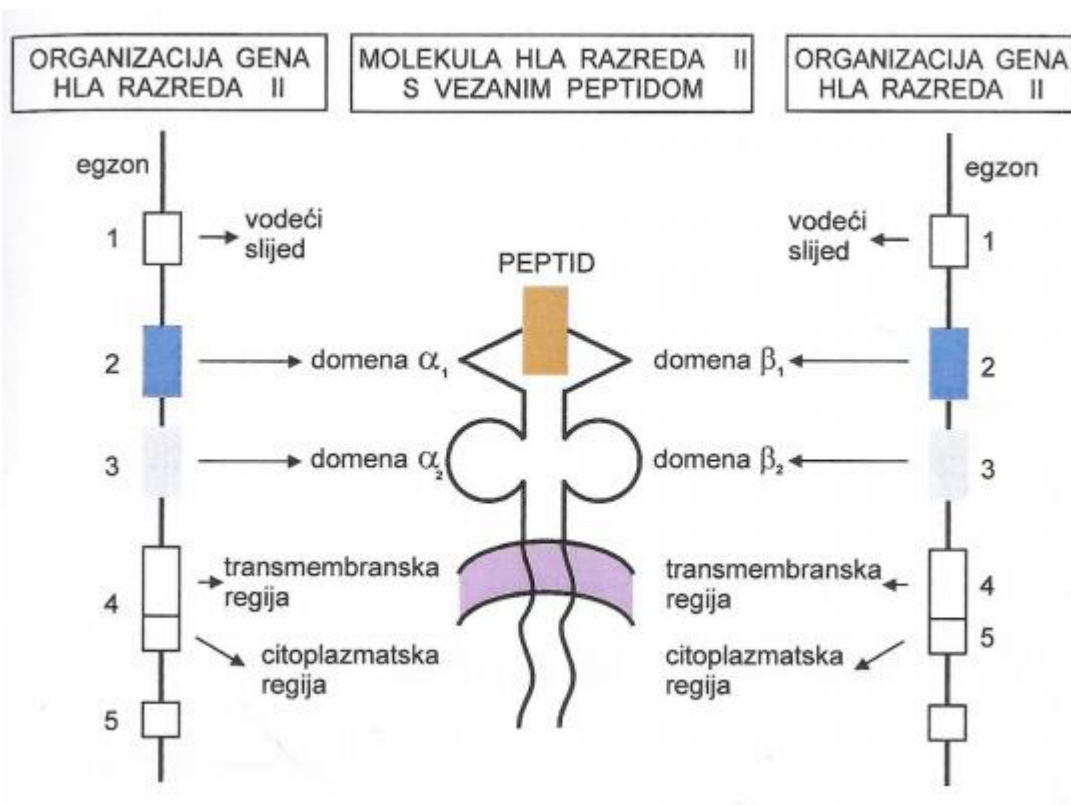




Slika 4. Shematski prikaz organizacije gena i molekule HLA razreda I (preuzeto iz [2])

#### 1.4. REGIJA HLA RAZREDA II

Unutar regije HLA razreda II koja je najbliža centromeri kromosoma 6 (oko 1Mb) nalaze se geni koji kodiraju molekule HLA razreda II. Građa gena HLA razreda II nalikuje strukturi gena HLA razreda I. Molekula HLA razreda II građena je od težeg i lakšeg lanca. Lakši lanac,  $\alpha$ , kodira gen (npr. gen HLA-DRA1) građen od 5 egzona, dok lanac  $\beta$  (teži) kodira gen (npr. gen HLA-DRB1) građen od 6 egzona. Egzon 1 kodira vodeći peptid, a egzoni 2 i 3 dvije izvanstanične domene molekule HLA razreda II. U genima za  $\beta$  lanac, koji se sastoji od 6 egzona, egzon 4 kodira transmembransko područje, a egzon 5 kodira citoplazmatsko područje, dok u genima za  $\alpha$  lanac koji se sastoji od 5 egzona, egzon 4 kodira i transmembransko i citoplazmatsko područje (slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz građe gena i molekule HLA razreda II (preuzeto iz [2])

Geni HLA razreda II podijeljeni su u 6 različitih subregija i to: HLA-DM, -DN, -DO, -DP, -DQ i -DR. Klasični geni HLA razreda II koji su odgovorni za sintezu transplatacijskih antigena obuhvaćaju tri subregije: HLA-DR, -DP i -DQ.

Subregija HLA-DM sadrži 2 gena, HLA-DMA i -DMB, koji unatoč smještaju unutar područja gena HLA razreda II, svojom građom više nalikuju genima HLA razreda I. To su vrlo stari geni koji su postojali još i prije nastanka razlika između gena HLA razreda I i II [8].

Subregije HLA-DO i -DN, za razliku od svih ostalih subregija sustava HLA razreda II sadrže samo po jedan gen (DOB i DNA) koji predstavljaju najstarije gene HLA razreda II. Za njih se zna da oba idu u transkripciju, ali njihovi proteini do sada nisu još otkriveni, odnosno nepoznata im je uloga u organizmu [8].

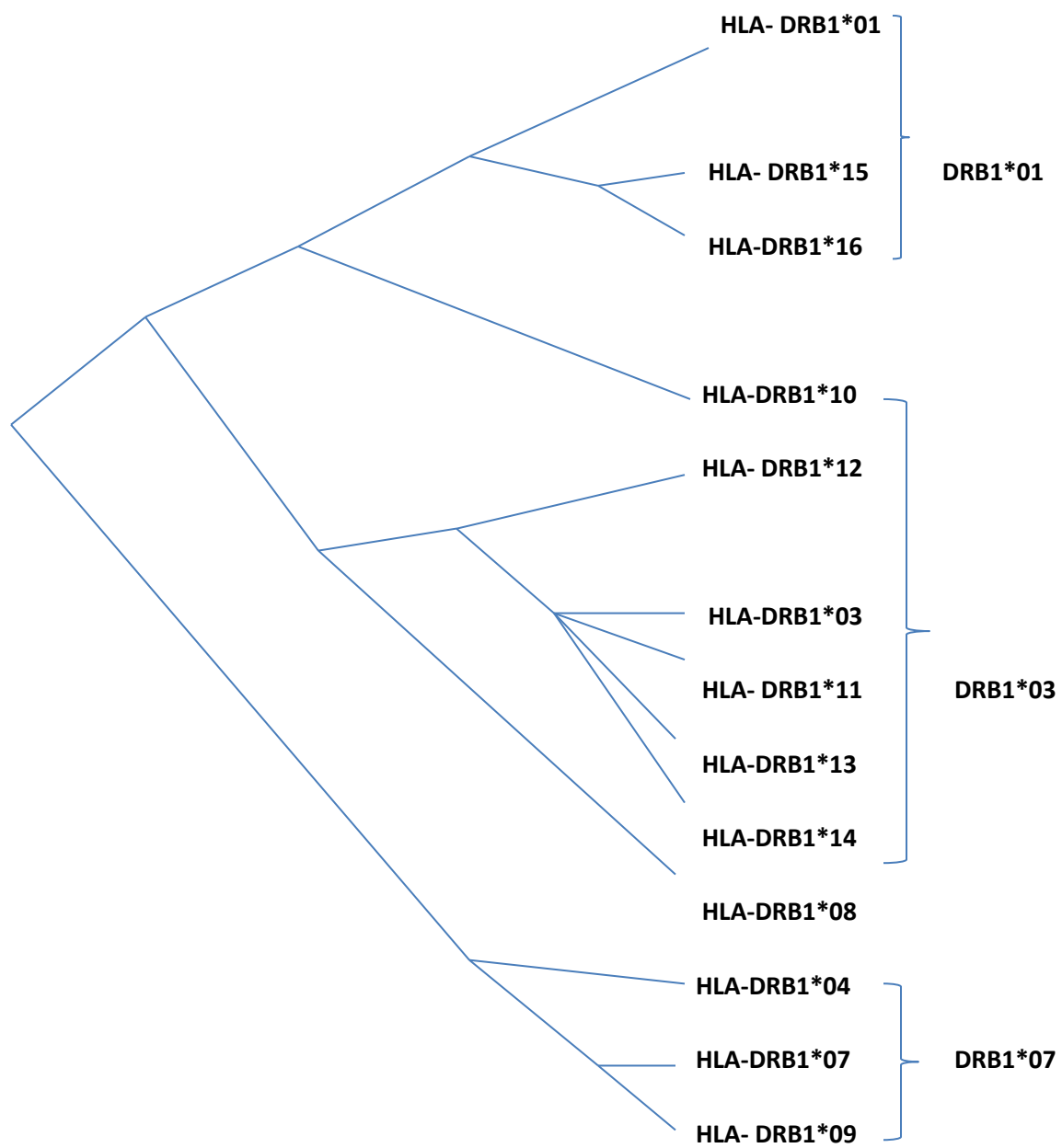
## 1.5. SUBREGIJA HLA-DR

Subregija DR sadrži samo jedan gen "A" (HLA-DRA1), dok je broj gena "B" različit, ovisno o pojedinom haplotipu HLA-DRB [8]. Poznato je 9 različitih gena HLA-DRB koji se označavaju brojevima od 1 do 9. Geni HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 i -DRB5 su aktivni geni, dok su HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 i -DRB9 nefunkcionalni geni. Svaka osoba u svom haplotipu DR ima gen HLA-DRB1, a hoće li imati još neki aktivni gen DRB (HLA-DRB3, -DRB4 ili -DRB5) ovisi o tome koji je alel prisutan na lokusu HLA-DRB1. Neki haplotipovi HLA-DRB imaju samo po jedan gen DRB, kao npr. haplotip HLA-DR8 koji ima samo gen HLA-DRB1, dok drugi imaju i čak po 5 različitih gena DRB kao npr. haplotip HLA-DR53. Unutar subregije HLA-DRB, delecije i duplikacije su mnogo češće s obzirom na subregije HLA-DP i -DQ.

### 1.5.1. GENI SUBREGIJE HLA-DRB

**GEN HLA-DRB1:** od svih gena HLA-DRB nalazi se najbliže centromeri. Većina odgovora limfocita T usmjerena je protiv produkata gena DRA1-DRB1 tj. klasičnih molekula HLA-DR. Gen DRB1 je najpolimorfiji gen HLA razreda II i do danas je poznato preko 2000 različitih alela tog gena. Danas je poznato da su se geni HLA-DRB1 razvijali u tri razvojna pravca na osnovu filogenetskih analiza 3' UT kraja gena DRB1 i njegove haplotipske raspodjele na: DRB1\*01, \*03 i \*07. Tijekom evolucije glavne grane filogenetskog stabla su se dalje razdvajale (slika 6) [8].

Iz slike 6 vidimo da je skupina DRB1\*01 sastavljena od gena/alelnih skupina/specifičnosti: DRB1\*01, DRB1\*15 i DRB1\*16 te da su oni evolucijski bliži skupini gena DRB1\*03 koja obuhvaća specifičnosti: DRB1\*03, DRB1\*11, DRB1\*12, DRB1\*13 i DRB1\*14. Treća skupina gena HLA-DRB1\*07 sastavljena je od gena DRB1\*04, DRB1\*07 i DRB1\*09.



Slika 6. Prikaz tri glavna razvojna pravca gena HLA-DRB1 (preuzeto iz [8])

**GEN DRB2:** nije funkcionalan zbog djelomičnog nedostatka egzona 2 te delecije od dvadesetak parova baza na eksonu 3 i prisutan je samo na haplotipovima HLA-DR52.

**GEN DRB3:** isto kao i gen DRB2, i gen DRB3 nalazimo samo na haplotipovima DR52. Međutim, za razliku od gena DRB2, gen DRB3 je funkcionalan i molekule koje kodira ovaj gen su prisutne na staničnim membranama istih onih stanica gdje su prisutne i molekule koje kodira gen DRB1. Međutim, za razliku od gena DRB1 ovaj gen ima puno manji broj alela.

**GEN DRB4:** nazočnost gena DRB4 dokazana je samo na haplotipovima DR53. Transkripcija ovog gena kao i gena DRB3 nekoliko je puta manja u usporedbi s genom DRB1.

**GEN DRB5:** prisutan je samo na haplotipovima DR51 te spada u skupinu funkcionalnih gena. Filogenetska analiza ukazala je na izuzetnu starost ovog gena te na temelju sekvenciranja 3' UT kraja, prevladava mišljenje da je ovo jedan od najstarijih gena unutar subregije DRB.

**GEN DRB6:** nefunkcionalan je i prisutan samo na haplotipovima DR1 i DR51, a njegova transkripcija je dokazana tehnikom lančane reakcije polimerazom (PCR). Prerano pojavljivanje "stop" kodona onemogućuje translaciju ovog gena.

**GEN DRB7:** pseudogen prisutan je samo na haplotipovima DRB53. On, kao i gen DRB6, ima prerani "stop" kodon i defektan "splice" signal. Osim toga, kod gena DRB7 pronađena je delecija 56 parova baza na 3' UT kraju kao i na alelima skupine DRB1\*04, što ukazuje na zajedničko podrijetlo ta dva gena, odnosno da je gen DRB7 nastao kao rezultat rekombinacije dvaju haplotipova DRB1\*04.

**GEN DRB8:** pseudogen prisutan na haplotipovima DR53, a zanimljivo je spomenuti da ovaj pseudogen nema ni egzon 1 ni egzon 2.

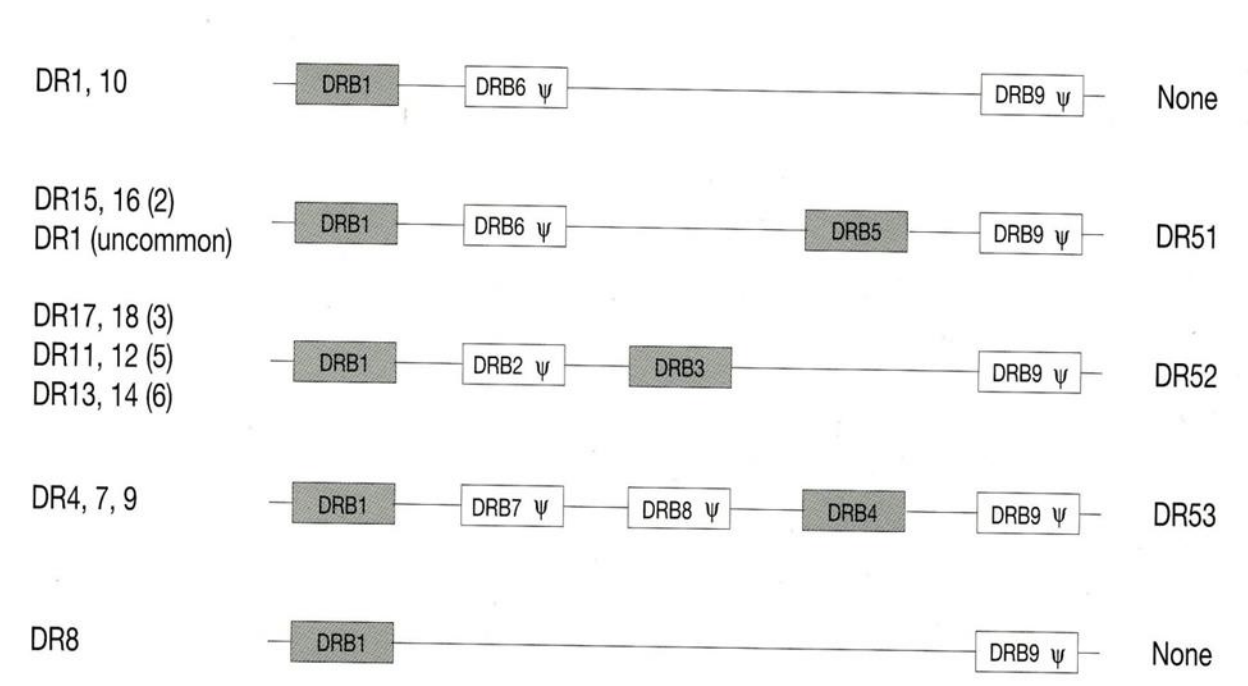
**GEN DRB9:** dokazan je na svim haplotipovima DRB.

### 1.5.2. HAPLOTIPOVI SUBREGIJE HLA-DRB

Na slici 7 vidimo da su haplotipovi HLA-DRB podijeljeni u 5 glavnih haplotipskih skupina: DR1, DR8, DR51, DR52 i DR53. Haplotip HLA je kombinacija alela na usko vezanim lokusima HLA jednog kromosoma 6 koji se nasljeđuju u bloku. Osim ovih glavnih haplotipskih skupina postoje i "usko" specifični haplotipovi, npr. skupina haplotipova DR4.

#### Specifičnosti HLA-DRB1

#### Specifičnosti HLA-DRB3/4/5



Slika 7. Organizacija haplotipskih skupina HLA-DRB (preuzeto iz [13])

**HAPLOTIPSKA SKUPINA HLA-DR1:** sadrži samo funkcionalni gen DRB1 i nefunkcionalni gen DRB6. Prisustvo gena DRB6 na ovom haplotipu ukazuje na usku povezanost ovog haplotipa s haplotipovima DR51. Isto kao i haplotipovi HLA-DRB1\*01, tako i haplotipovi HLA-DRB1\*10 imaju dva lokusa (DRB1 i DRB6) te i oni pripadaju ovoj skupini.

**HAPLOTIPSKA SKUPINA HLA-DR51:** sadrži dva funkcionalna gena (DRB1 i DRB5) i dva nefunkcionalna gena (DRB6 i DRB9). Redoslijed gena DRB u ovoj haplotipskoj skupini je DRB1-DRB6-DRB5-DRB9.

**HAPLOTIPSKA SKUPINA HLA-DR52:** u haplotipu ove skupine raspored gena je DRB1-DRB2-DRB3. Filogenetske analize ukazale su na evolucijsku povezanost gena DRB1 i DRB3 te se smatra da je gen DRB3 nastao duplikacijom gena DRB1.

**HAPLOTIPSKA SKUPINA HLA-DR8:** sekvenciranjem pojedinih haplotipova ove haplotipske skupine navelo je na zaključak da je skupina alela DRB1\*08 nastala kao rezultat delecije i potom spajanja 3' kraja gena DRB3 na 5' kraj gena DRB1. To je i razlog zbog kojeg aleli DRB1\*08, unatoč sličnim sekvencama s alelima skupine HLA-DR52, a za razliku od njih, nemaju ekspresiju molekula gena DRB3 na svojim staničnim membranama.

**HAPLOTIPSKA SKUPINA HLA-DR53:** ova skupina ima najveći broj gena DRB, njih pet (DRB1, DRB7, DRB8, DRB4 i DRB9). Gen HLA-DRB4 je funkcionalan, ali za razliku od gena HLA-DRB1 je znatno manje raznolik. Do danas je poznato 45 različitih alela ovog gena [15]. Kao što možemo vidjeti iz tablice 2 za produkte pojedinih alela DRB4 je upitna prisutnost njihovih molekula na staničnim membranama. Tri alela (DRB4\*01:03:01:02N, DRB4\*02:01N i DRB4\*03:01N) pripadaju skupini "null" alela HLA tj. nemaju ekspresiju na staničnim membranama. Ono što treba spomenuti da je polimorfizam gena HLA-DRB4 puno manje istraživan nego polimorfizam pripadajućih gena HLA-DRB1 skupine HLA-DR53.

Tablica 2. Aleli HLA-DRB4 i njihova ekspresija na staničnim membranama

alel HLA	ekspresija na staničnim membranama	serološki ekvivalent/ekspresija na staničnim membranama
DRB4*01:01	DA	DR53
DRB4*01:02	?	-
DRB4*01:03	DA	DR53
DRB4*01:03:01:02N	NE	nul alel
DRB4*01:04	?	-
DRB4*01:05	DA	DR53
DRB4*01:06	?	-
DRB4*01:07	?	-
DRB4*02:01N	NE	nul alel
DRB4*03:01N	NE	nul alel

## 1.6. POLIMORFIZAM GENA HLA-DRB1 HAPLOTIPSKE SKUPINE HLA-DR53

Geni HLA-DRB1 skupine HLA-DR53 bili su predmet brojnih istraživanja tijekom proteklih godina, kako u populacijskim istraživanjima, tako i u istraživanjima povezanosti s brojnim bolestima [5]. Naime, poznata je povezanost alela ove skupine s čitavim nizom autoimunih bolesti [5]. Autoimune bolesti koje se vezuju uz alele haplotipske skupine HLA-DR53 su celijakija, reumatoidni artritis i šećerna bolest tipa 1.



### 1.6.1. ALELI HLA-DRB1\*04

Do danas je poznato 64 alela skupine DRB1\*04 [15]. Gen DRB1\*04 ima alele od kojih su neki rasprostranjeni diljem čitavog svijeta (npr. alel DRB1\*04:01), a drugi ne (npr. alel DRB1\*04:19 je uočen samo u Meksiku). Aleli DRB1\*04:01, DRB1\*04:02, DRB1\*04:03 spadaju u česte i rasprostranjene u svijetu dok npr. DRB1\*04:18, DRB1\*04:26 i DRB1\*04:27 spadaju u rijetke. Alel DRB1\*04:01 pokazuje veću učestalost na sjeveru Europe koja opada prema jugu Europe, dok je najviše zastupljen u sjevernoistočnoj Rusiji i sjevernoj Americi s oko 30%. Alel DRB1\*04:02 pokazuje najveću učestalost u sjevernoj Africi i jugozapadnoj Aziji, no pojavljuje se i s većom učestalošću na jugu nego na sjeveru Europe. S druge strane, alel DRB1\*04:03 je također rasprostranjen diljem svijeta izuzev juga Afrike i sjevera Europe. Na slikama 8-11 prikazana je raspodjela četiri prvookrivena alela DRB1\*04 u svijetu.

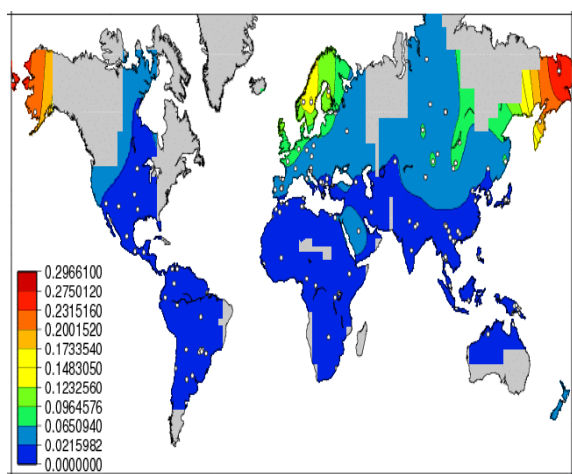


Image from Solberg et al. (2008) – see [www.pypop.org/popdata](http://www.pypop.org/popdata) for more info.

Slika 8. Raspodjela alela HLA-DRB1\*04:01 u svijetu  
(preuzeto iz [16])

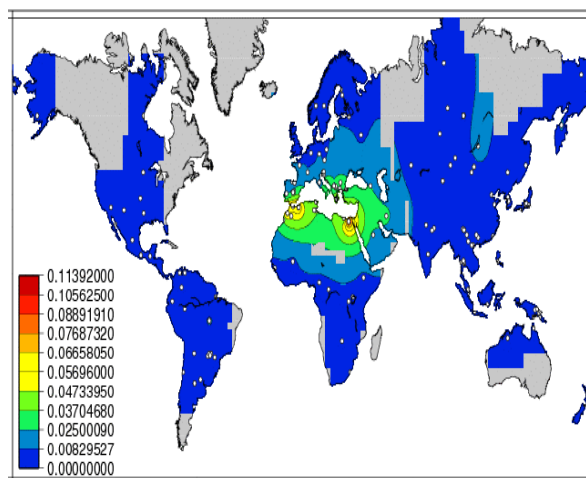


Image from Solberg et al. (2008) – see [www.pypop.org/popdata](http://www.pypop.org/popdata) for more info.

Slika 9. Raspodjela alela HLA-DRB1\*04:02 u svijetu  
(preuzeto iz [16])

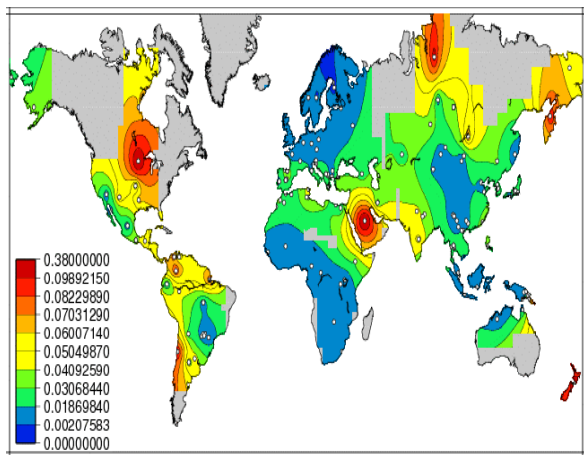


Image from Solberg et al. (2008) – see [www.pypop.org/popdata](http://www.pypop.org/popdata) for more info.

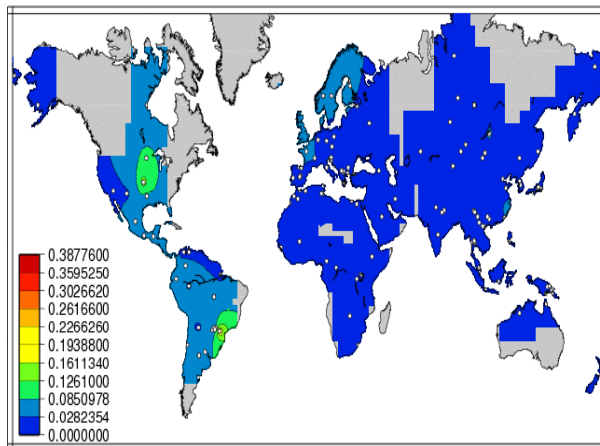


Image from Solberg et al. (2008) – see [www.pypop.org/popdata](http://www.pypop.org/popdata) for more info.

Slika 10. Raspodjela alela HLA DRB1\*04:03 u svijetu (preuzeto iz [16])

Slika 11. Raspodjela alela HLA DRB1\*04:04 u svijetu (preuzeto iz [16])

### 1.6.2. ALELI HLA-DRB1\*07

Za gen DRB1\*07 je poznato 11 različitih alela (DRB1\*07:01, DRB1\*07:03, DRB1\*07:04, DRB1\*07:05, DRB1\*07:06, DRB1\*07:07, DRB1\*07:08, DRB1\*07:09, DRB1\*07:10, DRB1\*07:11, DRB1\*07:12). Alel DRB1\*07:01 pokazuje široku rasprostranjenost diljem svijeta, dok je alel DRB1\*07:03 prisutan u jugoistočnoj Aziji, a u ostatku se svijeta pojavljuje s manjom učestalošću, kao i alel DRB1\*07:05 (slike 12-15). Alel DRB1\*07:04 pokazuje najveću učestalost na samom zapadu Europe, u Portugalu i Španjolskoj, dok za ostatak svijeta nema podataka o njegovoj prisutosti.

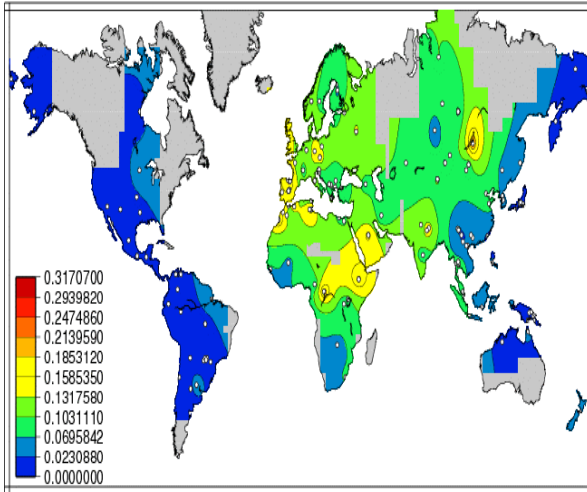


Image from Solberg et al. (2008) – see [www.pypop.org/popdata](http://www.pypop.org/popdata) for more info.

Slika 12. Raspodjela alela HLA DRB1\*07:01 u svijetu  
(preuzeto iz [16])

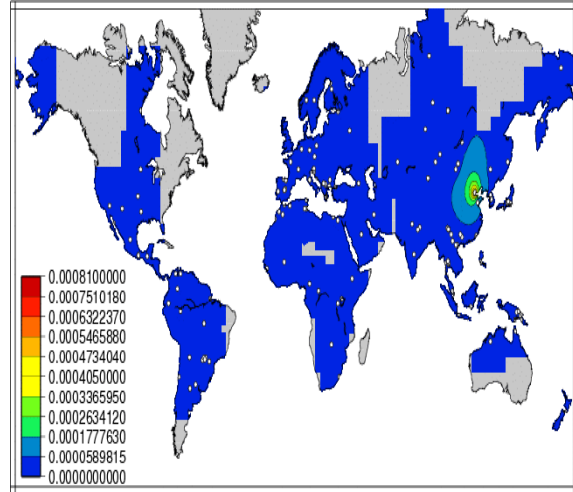


Image from Solberg et al. (2008) – see [www.pypop.org/popdata](http://www.pypop.org/popdata) for more info.

Slika 13. Raspodjela alela HLA DRB1\*07:03 u svijetu  
(preuzeto iz [16])

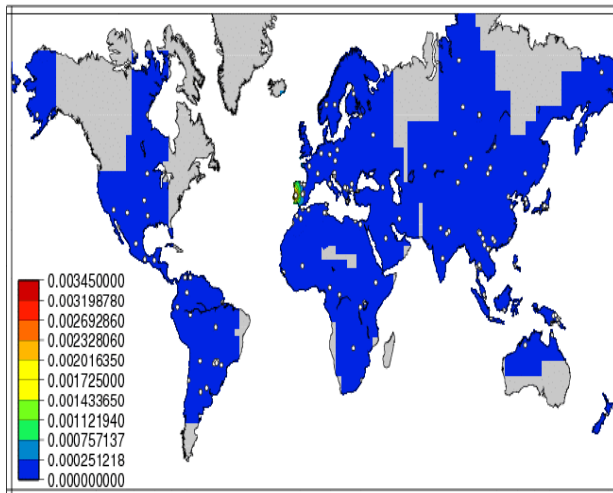


Image from Solberg et al. (2008) – see [www.pypop.org/popdata](http://www.pypop.org/popdata) for more info.

Slika 14. Raspodjela alela HLA DRB1\*07:04 u svijetu  
(preuzeto iz [16])

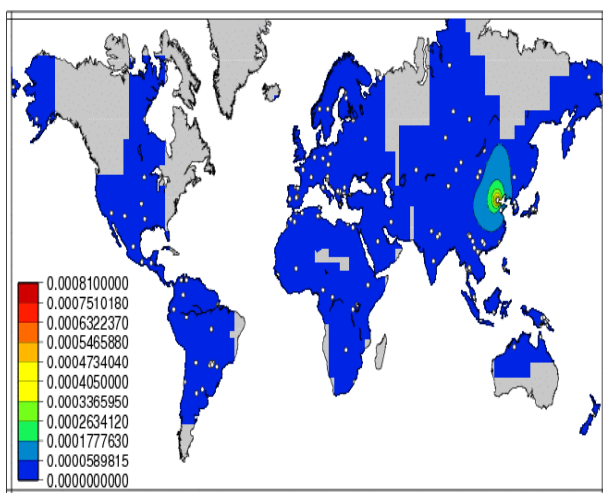
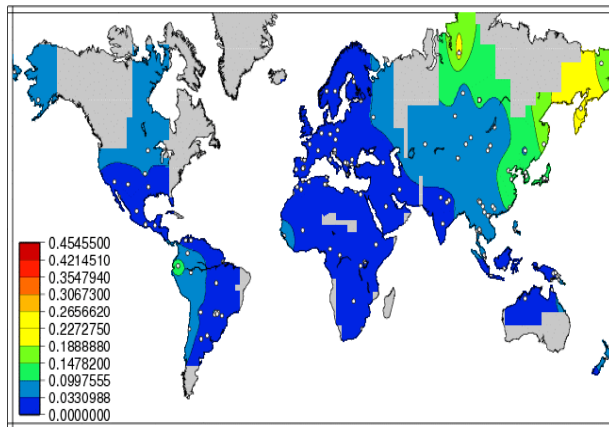


Image from Solberg et al. (2008) – see [www.pypop.org/popdata](http://www.pypop.org/popdata) for more info.

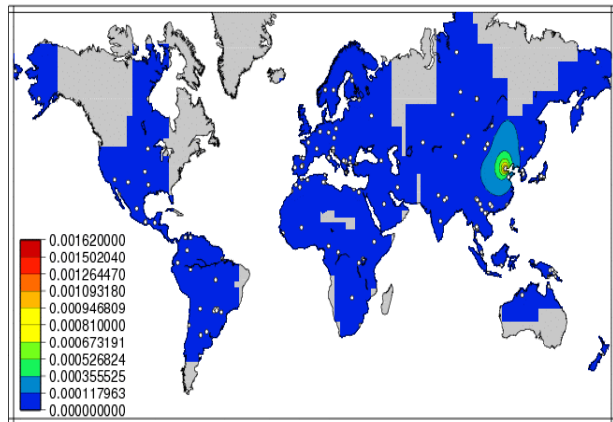
Slika 15. Raspodjela alela HLA DRB1\*07:05 u svijetu  
(preuzeto iz [16])

### 1.6.3. ALELI HLA-DRB1\*09

Gen DRB1\*09 ima 6, do danas, poznatih alela (DRB1\*09:01, DRB1\*09:02, DRB1\*09:03, DRB1\*09:04, DRB1\*09:05, DRB1\*09:06). Alel DRB1\*09:01 je najčešći, a najveću učestalost pokazuje na dalekom Istoku, dok je učestalost ovog alela u Europi mala (<2,0%).



Slika 16. Raspodjela alela HLA DRB1\*09:01 u svijetu  
(preuzeto iz [16])



Slika 17. Raspodjela alela HLA DRB1\*09:03 u svijetu  
(preuzeto iz [16])

## **2.CILJ ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Istražiti raznovrsnost alela HLA-DRB4 u Hrvatskoj.
2. Odrediti haplotipove HLA-DRB1\*07-DRB4 u istraživanom uzorku.
3. Utvrditi haplotipove HLA-DRB1\*07-DRB4-DQB1 karakteristične za našu populaciju.
4. Analizirati haplotipove HLA-DRB1\*04-DRB4 u Hrvatskoj.
5. Odrediti polimorfizam haplotipova HLA-DRB1\*04-DRB4-DQB1 u ispitivanom uzorku.
6. Istažiti raznovrsnost haplotipova HLA-DRB1\*09-DRB4-DQB1 u našoj populaciji.
7. Usporediti dobivene rezultate za hrvatsku populaciju s dostupnim podacima za druge populacije evropskog porijekla.

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

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. ISPITANICI


U svrhu istraživanja polimorfizma gena HLA-DRB4 u Hrvatskoj obuhvatili smo skupinu od 144 uzorka. Uzorci su bili odabrani na temelju prisustva gena HLA-DRB1\*04, DRB1\*07 ili DRB1\*09. Svi uzorci prethodno su testirani za gene HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1.

Od svih uzoraka imali smo po 2 ml periferne krvi s EDTA kao antikoagulansom.

### 3.2. METODE











#### 3.2.1. IZOLACIJA DNA

Iz 200 $\mu$ l krvi izolirana je DNA pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA (Nucleospin, Macherey Nagel, Düren, Njemačka), slika 18. Metoda se temelji na uporabi kolumni sa silikatnom membranom koja specifično veže molekule DNA. Postupak se temelji na inkubaciji DNA s proteinazom K, zatim precipitacije i nekoliko ispiranja (slika 19). Koncentracija izolirane DNA iznosi 30 ng/ $\mu$ l [7].

SADRŽAJ KOMERCIJALNOG SETA ZA IZOLACIJU DNA IZ PERIFERNE KRVI	
Reagens B2	
Pufer B5	
Pufer BW	
Pufer BE	
Pufer B3	
Proteinazni pufer	
Proteinaza K	
Nukleospin tubice	
Nukleospin kolumne	

Slika 18. Set za izolaciju DNA iz uzoraka periferne krvi



1 Liza uzoraka krvi		200 µl krvi 25 µl prot. K 200 µl B3  Mlx 70°C 10-15 min
2 Regulacija vezanja DNA		210 µl etanol
3 Vezanje DNA	  	unos uzorka u Nucleospin koturne  1 min 11.000 x g
4 Ispiranje silika membrane	    	500 µl BW 600 µl BS  1. ispiranje 1 min 11.000 x g 2. ispiranje 1 min 11.000 x g
5 Sušenje silika membrane	  	1 min 11.000 x g
6 Eluacija čistog DNA uzorka	  	100 µl BE (70°C)  RT 1 min 1 min 11.000 x g

Slika 19. Shematski prikaz izolacije DNA pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA

### 3.2.2. UMNAŽANJE ALELA HLA

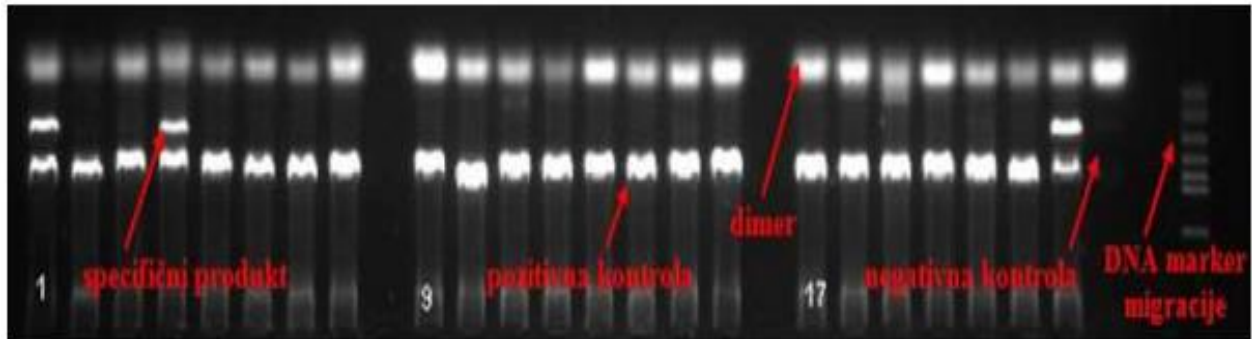
Temelj metode za umnažanje alela i gena HLA, metoda PCR-SSP (*engl. Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers*) je da se za pokretanje reakcije PCR koriste oligonukleotidne početnice koje imaju komplementaran slijed onome koji odgovara određenom alelu ili skupini alela HLA. Tipizacijski set PCR-SSP sastoji se od određenog broja reakcija za svaki pojedini lokus HLA, odnosno gen HLA. Određivanjem gena HLA metodom PCR-SSP moguće je tipizirati na razini gena ili tzv. niska rezolucija (dvije znamenke), kao npr. DRB1\*04 ili na razini alela HLA ili tzv. visoka rezolucije (četiri znamenke), kao što je npr. DRB1\*04:01. U ovom radu korišteni su komercijalni testovi OlerupSSPTM Genotyping (GenoVision Inc, West Chester, PA, SAD). Svaka PCR reakcija zasebno testira prisustvo jednog ili skupine alela HLA, a u svakoj reakciji su prisutne: dvije početnice (3' i 5'), kontrolni par početnica koje će nam pokazati da li smo u reakciju stavili sve potrebno, smjesa deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), komercijalni pufer, termostabilna Taq polimeraza i genomska DNA koncentracije 50 µg/ml. Uvjeti umnažanja u automatskom aparatu za umnažanje prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Program za umnažanje gena HLA

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

Provjera i očitavanje umnoženih produkata PCR izvodi se elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu obojenim bojom GelRed (GenoVision Inc, West Chester, PA, SAD) koristeći pufer 1xTBE. Nakon elektroforeze gel se fotografira pomoću UV G:BOX Syngene kamere s tamnom komorom. Prema veličini specifičnih produkata PCR, reakcija na gelu se označava kao

pozitivna gdje je produkt PCR prisutan ili negativna gdje je PCR produkt odsutan. Pozitivna reakcija na gelu mora sadržavati internu kontrolnu vrpcu i vrpcu specifičnog produkta PCR (slika 20). Dobiveni rezultati se potom analiziraju uz pomoć programa: Helmberg Score [7].



Slika 20. Fotografija agaroznog gela s produktima PCR

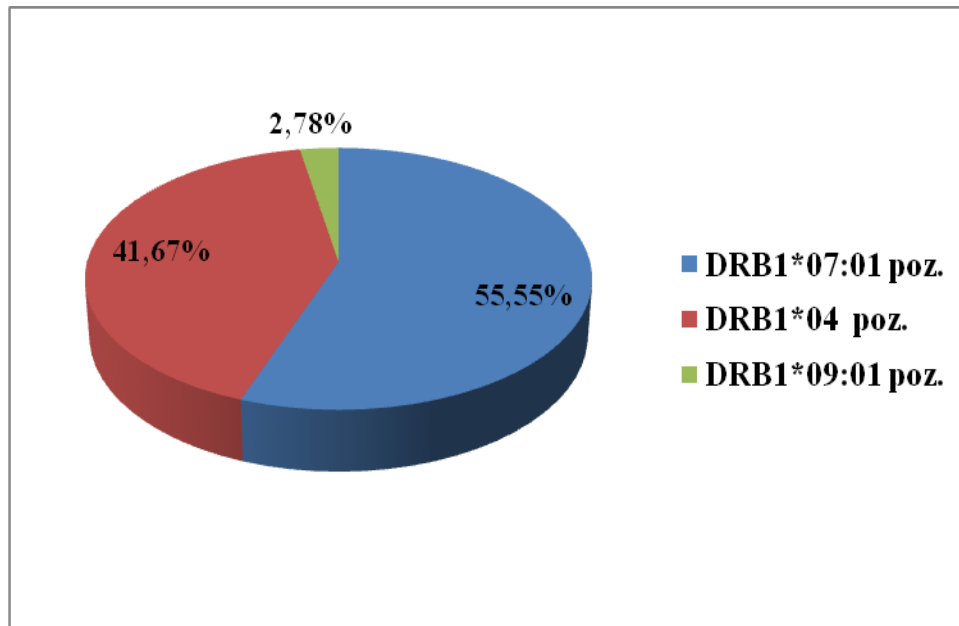
### 3.2.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Učestalost alela HLA-DRB4 određena je direktnim brojanjem. Haplotipovi HLA-DRB1-DQB1 određeni su na temelju poznatih i publiciranih podataka o neravnoteži udruživanja između alela lokusa DRB1 i DQB1. Produženi haplotipovi HLA-A-C-B-DRB1-DRB4-DQB1 određeni su na temelju prisustva pojedinih alela HLA u fenotipu testiranih uzoraka. Usporedba između pojedinih skupina izvedena je uz pomoć 2x2 tablice pri čemu je razina statističke značajnosti iznosila 0,05. U slučaju kada je broj pojedinog čimbenika bio manji od 5, koristili smo Fisher-ov test.

## **4.REZULTATI**

#### 4.1. RASPODJELA ISPITIVANIH UZORAKA S OBZIROM NA ALEL/GEN NA LOKUSU DRB1

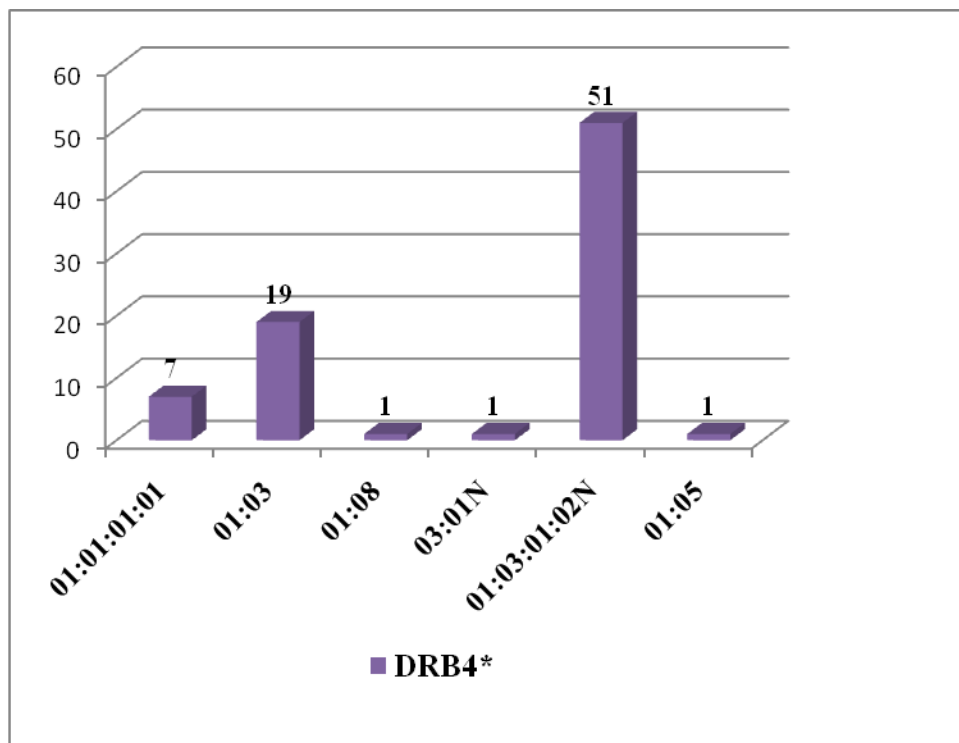
U radu smo analizirali skupinu od 144 uzorka pozitivna za gen HLA-DRB4. Gen HLA-DRB4 prisutan je u haplotipu HLA-DRB kada osoba na lokusu HLA-DRB1 ima neki od alela DRB1\*04, DRB1\*07 ili DRB1\*09. Na slici 21 prikazana je raspodjela istraživane skupine s obzirom na prisustvo gena HLA-DRB1. Najveći broj uzoraka bio je pozitivan za alel DRB1\*07:01 (80; 55,55%), skupina od 60 (41,67%) uzoraka imala je jedan od alela iz DRB1\*04, dok su samo 4 (2,78%) uzorka bila pozitivna za alel DRB1\*09:01.



Slika 21. Raspodjela ispitivanih uzoraka (N=144) s obzirom na alel/gen na lokusu DRB1

## 4.2. RASPODJELA ALELA HLA-DRB4 MEĐU ISPITANICIMA POZITIVNIM ZA ALEL HLA-DRB1\*07

Raspodjela alela HLA-DRB4 među ispitanicima pozitivnim za alel DRB1\*07:01 pokazala je sljedeće: najviše ispitanika imala je alel DRB4\*01:03:01:02N, njih 51 (63,8%), zatim slijedi alel DRB4\*01:03 kojeg je imalo 19 ispitanika tj. 23,8%, potom alel DRB4\*01:01:01:01 koji je bio prisutan kod 7 (8,80%) ispitanika, dok su aleli DRB4\*01:08, DRB4\*03:01N i DRB4\*01:05 bili uočeni kod po jednog ispitanika (slika 22).

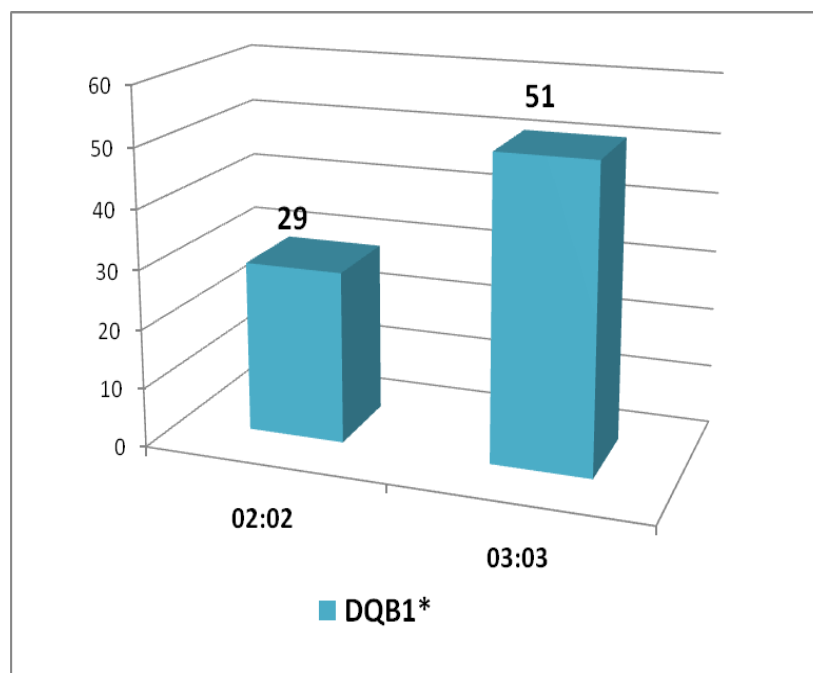


Slika 22. Raspodjela alela HLA- DRB4 među ispitanicima pozitivnim za alel HLA-DRB1\*07:01 (N=80)

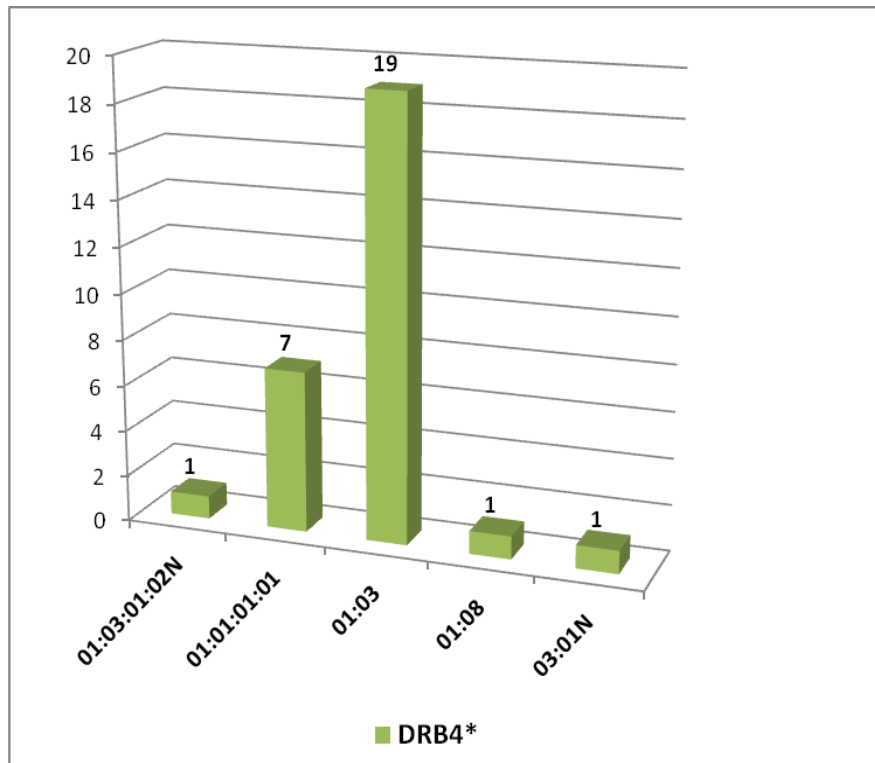
S obzirom da je alel DRB1\*07:01 u jakoj neravnoteži udruživanja s dva alela na lokusu DQB1, alelom DQB1\*02:02 i alelom DQB1\*03:03 (slika 23), našu ispitivanu skupinu podijelili smo s obzirom na prisustvo jednog od dva navedena alela DQB1. Unutar skupine od 80 uzoraka

pozitivnih za alel DRB1\*07:01, njih 29 bilo je pozitivno za alel DQB1\*02:02 (36,2%), dok ih je pozitivnih za alel DQB1\*03:03 bilo 51 (63,8%).

Analiza raspodjele alela HLA-DRB4 unutar skupine DRB1\*07:01-DQB1\*02:02 pozitivnih ispitanika pokazala je da je najviše bio prisutan alel DRB4\*01:03 (19; 65,50%), zatim slijedi alel DRB4\*01:01:01:01 (7; 24,10%), dok su kod po jednog ispitanika uočeni aleli DRB4\*01:08, \*03:01N, \*01:03:01:02N (slika 24).



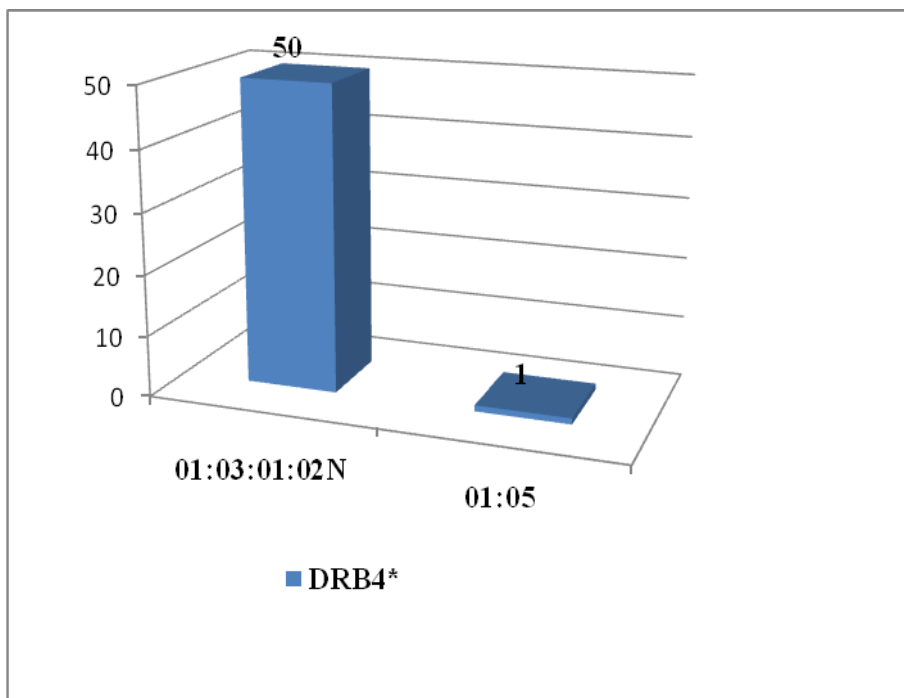
Slika 23. Raspodjela alela na lokusu HLA-DQB1 među uzorcima pozitivnim za alel HLA-DRB1\*07:01 (N=80)



Slika 24. Raspodjela alela HLA-DRB4 među ispitanicima pozitivnim za haplotip HLA- DRB1\*07:01-DQB1\*02:02 (N=29)

Raspodjela alela HLA-DRB4 među ispitanicima pozitivnim za haplotip DRB1\*07:01-DQB1\*03:03 pokazala je nazočnost alela DRB4\*01:03:01:02N te alela DRB4\*01:05. Od toga su za alel DRB4\*01:03:01:02N bila pozitivna 50 (90,04%) ispitanika, dok je alel DRB4\*01:05 imao samo jedan ispitanik (slika 25).

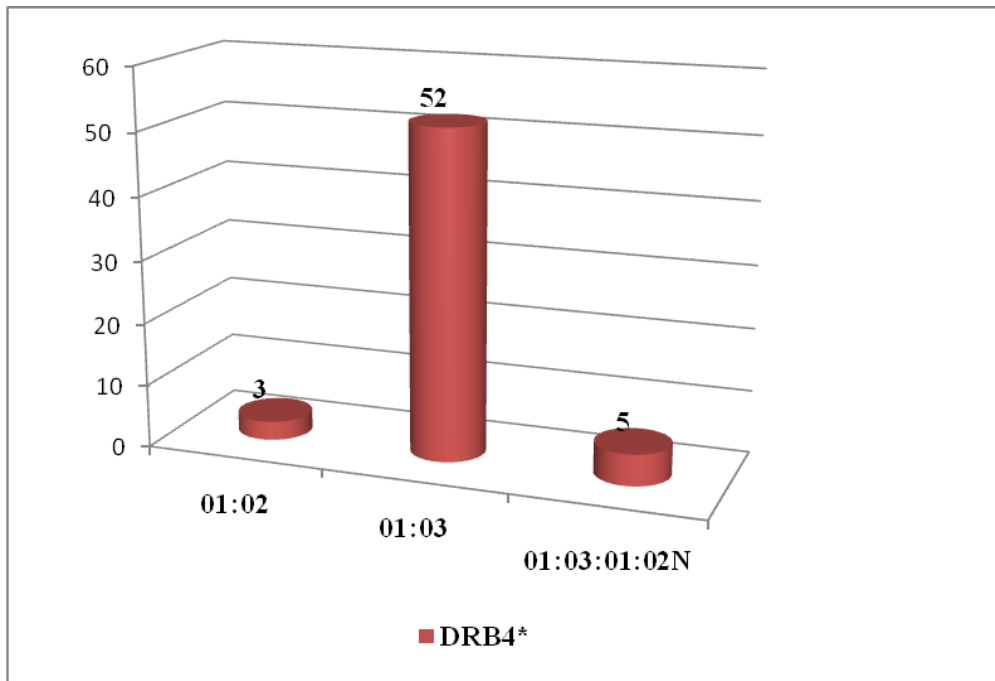




Slika 25. Raspodjela alela HLA-DRB4 među ispitanicima pozitivnim za haplotip HLA- DRB1\*07:01-DQB1\*03:03 (N=51)

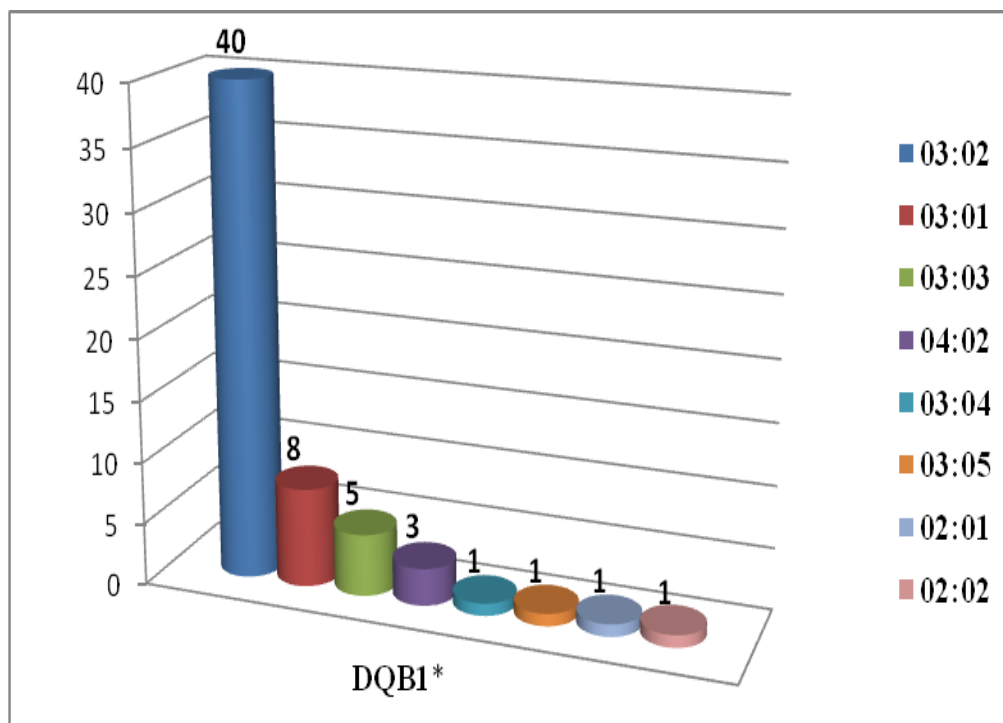
#### **4.3. RASPODJELA ALELA HLA-DRB4 MEĐU ISPITANICIMA POZITIVNIM ZA ALEL HLA-DRB1\*04**

Unutar skupine HLA-DRB1\*04 pozitivnih ispitanika testiranih za alele DRB4 uočena je sljedeća raspodjela: alel DRB4\*01:03 bio je prisutan kod 52 (86,67%) ispitanika, alel DRB4\*01:03:01:02N bio je pozitivan kod 5 (8,33%) ispitanika, dok je alel DRB4\*01:02 bio uočen samo kod 3 (5,00%) ispitanika (slika 26).



Slika 26. Raspodjela alela HLA-DRB4 među ispitanicima pozitivnim za alele HLA-DRB1\*04 (N=60)

Isto kao i alel HLA-DRB1\*07:01 i aleli skupine DRB1\*04 su u neravnoteži udruživanja s pojedinim alelima lokusa HLA-DQB1 i to: DQB1\*03:02 ili DQB1\*03:01. Unutar naše skupine DRB1\*04 pozitivnih ispitanika najviše je bio zastupljen alel DQB1\*03:02 (40 ispitanika; 66,67%), slijedio ga je alel DQB1\*03:01 koji je bio prisutan kod 8 (13,33%) osoba. Također je uočen i alel DQB1\*03:03 kod 5 (8,33%) ispitanika, a preostalih 5 alela DQB1 pokazali su malu zastupljenost među DRB1\*04 pozitivnim ispitanicima (slika 27).



Slika 27. Raspodjela alela HLA-DQB1 unutar skupine HLA-DRB1\*04 pozitivnih ispitanika (N=60)

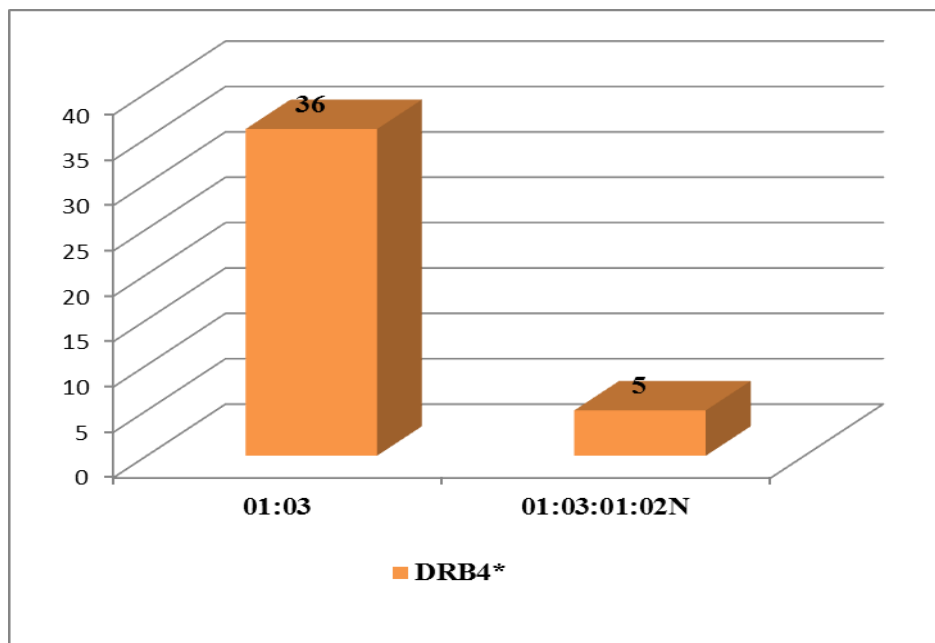
Kada smo raščlanili skupinu HLA-DRB1\*04 pozitivnih osoba s obzirom na alel na lokusu DRB1, analiza je pokazala prisustvo 9 različitih alela (tablica 3). Najveći broj ispitanika imao je alel DRB1\*04:01, njih 14 tj. 23,33%. Slijedio ga je alel DRB1\*04:02 kojeg je imalo 11 ispitanika (18,33%). Deset ispitanika (16,67%) nosilo je alel DRB1\*04:03 i alel DRB1\*04:04, a kod 6 ispitanika je uočen DRB1\*04:05. Preostali aleli DRB1\*04 bili su prisutni 5 ili manje puta.

Tablica 4. Raspodjela alela unutar skupine ispitanika pozitivnih za gen HLA-DRB1\*04 (N=60)

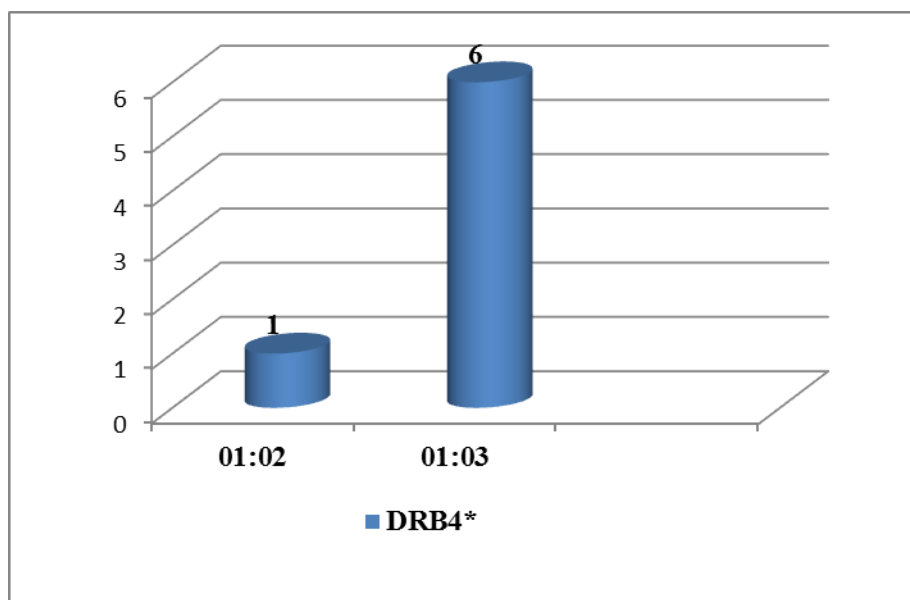
aleli	N (%)
DRB1*04:01	14 (23,3%)
DRB1*04:02	11 (18,3%)
DRB1*04:03	10 (16,7%)
DRB1*04:04	10 (16,7%)
DRB1*04:05	6 (10%)
DRB1*04:06	1 (1,7%)
DRB1*04:07	5 (8,3%)
DRB1*04:08	2 (3,3%)
DRB1*04:15	1 (1,7%)

Analiza raspodjele alela HLA-DRB4 među ispitanicima pozitivnim za haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03:02 pokazala je da visoku zastupljenost alela DRB4\*01:03 (36; 87,80%) i vrlo nisku zastupljenost alela DRB4\*01:03:01:02N (5; 12,20%), slika 28.

Drugu skupinu haplotipova gdje smo mogli analizirati alel HLA-DRB4 među osobama pozitivnim za haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03:01. Unutar ove skupine ispitanika uočili smo dva različita alela HLA-DRB4. Šest (85,71%) ispitanika imalo je alel DRB4\*01:03, dok je alel DRB4\*01:02 imao jedan ispitanik (slika 29).



Slika 28. Raspodjela alela HLA-DRB4 među ispitanicima pozitivnim za haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03:02 (N=41)



Slika 29. Raspodjela alela HLA-DRB4 među ispitanicima pozitivnim za haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03:01 (N=7)

## **5.RASPRAVA**

Uvođenje molekularnih metoda u određivanje polimorfizama HLA omogućilo je određivanje alela gena DRB3, DRB4 i DRB5. Serološkim metodama bilo je moguće odrediti samo njihovu prisutnost, ali ne i raznovrsnost [8]. Međutim, brojni radovi ukazuju na njihovu važnost u transplantaciji tkiva i organa [7].

Cilj ovog rada bio je istražiti raznovrsnost alela gena HLA-DRB4 u Hrvatskoj i usporediti dobivene rezultate s rezultatima drugih istraživanja. Time se ovim radom po prvi puta dobiva uvid u raznovrsnost alela lokusa HLA-DRB4 u našoj populaciji. Za samo istraživanje uzeta su 144 uzorka kadaveričnih davatelja organa koji su bili pozitivni za jedan od gena skupine DR53 (DRB1\*04, DRB1\*07 ili DRB1\*09) jer te osobe imaju u svom haplotipu i drugi aktivni gen DRB tj. gen HLA-DRB4.

U ovom radu analizirana je skupina od 144 ispitanika pozitivna za gen HLA-DRB4, od kojih je njih 80 imalo alel HLA-DRB1\*07:01, šezdeset ispitanika je imalo jedan od alela skupine DRB1\*04, a četiri ispitanika bila su pozitivna za alel HLA-DRB1\*09:01. Alel HLA-DRB1\*07:01 je jedan od najčešćih alela lokusa HLA-DRB1 u hrvatskoj populaciji (9,78%) [16]. S obzirom na snažni LD s alelima lokusa DQB1, haplotipovi alela HLA-DRB1\*07:01 dijele se na haplotipove HLA-DRB1\*07:01-DQB1\*02:02 i HLA-DRB1\*07:01-DQB1\*03:03. U populacijama europskog porijekla češći je haplotip HLA-DRB1\*07:01-DQB1\*02:02 [4, 8, 17] što je slučaj i Hrvatskoj [8]. Analiza raspodjele alela HLA-DRB4 među osobama s haplotipom HLA-DRB1\*07:01-DQB1\*02:02 pokazala je da je u 65,5% haplotipova bio prisutan alel HLA-DRB4\*01:03. Naš rezultat je u skladu s podacima za druge populacije u Evropi i svijetu [6, 14]. Nasuprot tome, među ispitanicima s haplotipom HLA-DRB1\*07:01-DQB1\*03:03 na lokusu HLA-DRB4 dominantan (98,0%) je bio nul alel HLA-DRB4\*01:03:01:02N. Naš rezultat je u skladu s istraživanjem provedenim u Češkoj [3]. Poznato je da nukleotidna sekvenca alela HLA-DRB4\*01:03:02:01N ima supstituciju u akceptorskom mjestu spoja na 3' kraju introna 1, mjenjajući dinukleotid AG u AA, dok je nukleotidna sekvenca svih egzona i ostalih spojeva identična alelima HLA-DRB4 koji imaju ekspresiju na staničnim membranama [6]. Osim ovog nul alela, na lokusu HLA-DRB4 postoje još 2 nul alela (DRB4\*02:01N i DRB4\*03:01N) od kojih smo u našem radu uočili nul alel HLA-DRB4\*03:01N i to samo kod jednog ispitanika.

Aleli skupine HLA-DRB1\*04 pokazuju jaki LD s dva alela lokusa HLA-DQB1 i to alelima: HLA-DQB1\*03:02 i HLA-DQB1\*03:01 [6]. U našem radu otkrili smo još 6 različitih alela lokusa DQB1 u kombinaciji s alelima DRB1\*04 (slika 27). Osim alela skupine HLA-DQB1\*03, kod tri ispitanika jedan od alela HLA-DRB1\*04 pojavio se u neobičnoj kombinaciji s alelom HLA-DQB1\*04:02. Alel HLA-DQB1\*04:02 je u jakom LD s alelima skupine DRB1\*08 te su ovi haplotipovi nastali kao rezultat rekombinacije haplotipa HLA-DRB1\*08 s haplotipom HLA-DRB1\*04 između lokusa HLA-DRB1 i -DQB1. Analiza podtipova gena HLA-DRB1\*04 pokazala je da tri uzorka koji su na lokusu HLA-DQB1 su imali alel HLA-DQB1\*04:02, a u dva slučaja je bila riječ o alelu HLA-DRB1\*04:04, dok je jedan uzorak bio HLA-DRB1\*04:06 (tablica 5). Svi ispitanici s alelom HLA-DQB1\*04:02 na lokusu HLA-DRB4 imali su alel DRB4\*01:03.

Tablica 5. Prikaz tri ispitanika pozitivna za haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*04:02

HLA-DRB1*	HLA-DRB4*	HLA-DQB1*
04:04	01:03	04:02
04:06	01:03	04:02
04:04	01:03	04:02

Raspodjela alela HLA-DRB4 među ispitanicima pozitivnim za alele skupine HLA-DRB1\*04 pokazala je da je najviše (86,7%) bio zastupljen alel DRB4\*01:03 što je također u skladu s radovima drugih autora [14]. Zanimljivo je istaknuti da smo unutar ove skupine ispitanika našli i 5 ispitanika s nul alelom HLA-DRB4\*01:03:01:02N, kod četiri ispitanika nul alel DRB4\*01:03:01:02N pojavio se u kombinaciji s alelom HLA-DRB1\*04:02, dok je jedan ispitanik imao alel HLA-DRB1\*04:03 (tablica 6). Naši rezultati su u skladu s istraživanjem provedenim u Austriji gdje je također uočen neuobičajen haplotip: HLA-DRB1\*04:02-DRB4\*01:03:01:02N-DQB1\*03:02 [6].



Tablica 6. Prikaz pet ispitanika pozitivnih za haplotip HLA-DRB1\*04-DRB4\*01:03:01:02N

HLA-DRB1*	HLA-DRB4*	HLA-DQB1*
04:02	01:03:01:02N	03:02
04:02	01:03:01:02N	03:02
04:02	01:03:01:02N	03:02
04:02	01:03:01:02N	03:02
04:03	01:03:01:02N	03:02

Unutar skupine ispitanika pozitivnih za haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03:02 uočili smo prisutnost nul alela HLA-DRB4\*01:03:01:02N u svih pet ispitanika (100%) što je u skladu s podacima za druge populacije [9].

Zadnja analizirana skupina osoba s genom HLA-DRB4 bila je ona s alelom HLA-DRB4\*09:01 kojeg je imalo samo četiri ispitanika, što je u skladu sa zastupljenošću tog alela u Hrvatskoj [16]. Učestalost ovog alela je i u Europi izrazito mala, tj. manja od 2,0% [16]. Raspodjela alela HLA-DRB4 među ispitanicima pozitivnim za alel HLA-DRB1\*09:01, odnosno haplotip HLA-DRB1\*09:01-DQB1\*03:03 pokazala je da je uvijek na lokusu HLA-DRB4 bio prisutan alel DRB4\*01:03.

U zaključku možemo reći da je ovo istraživanje pokazalo sličnosti, ali i razlike u raspodjeli alela gena HLA-DRB4 između hrvatske i drugih populacija evropskog porijekla (za koje postoje dostupni podaci). Ovo će istraživanje također služiti kao osnova za daljnja populacijska istraživanja raznovrsnost gena HLA u Hrvatskoj, ali isto tako i u transplataciji tkiva i organa, kao i u istraživanjima povezanosti gena HLA i bolesti.

## **6. ZAKLJUČAK**

1. Na lokusu HLA-DRB4 u Hrvatskoj uočili smo sedam različitih alela HLA-DRB4: pet funkcionalna alela (DRB4\*01:01:01:01, DRB4\*01:02, DRB4\*01:03, DRB4\*01:05 i DRB4\*01:08) i dva nul alela (DRB4\*01:03:01:02N i HLA-DRB4\*03:01N).
2. U haplotipovima HLA-DRB1\*07:01 uočena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u raspodjeli alela HLA-DRB4 s obzirom na prisustvo alela HLA-DQB1 u Hrvatskoj.
3. U haplotipu: HLA-DRB1\*07:01-DQB1\*03:03 na lokusu HLA-DRB4 u 98,0% ispitanika bio je prisutan nul alel HLA-DRB4\*01:03:01:02N.
4. U haplotipu: DRB1\*07:01-DQB1\*02:02 na lokusu HLA-DRB4 najčešći alel bio je DRB4\*01:03 (65,50%).
5. Unutar skupine HLA-DRB1\*04 pozitivnih haplotipova uočili smo tri različita alela: HLA-DRB4: DRB4\*01:03 (86,7%), DRB4\*01:03:01:02N (8,33%) i DRB4\*01:02 (5,0%).
6. Nije uočena statistički značajna razlika u raspodjeli alela HLA-DRB4 s obzirom na prisustvo alela lokusa HLA-DQB1 u haplotipovima HLA-DRB1\*04.
7. Alel HLA-DRB1\*09:01 je kod svih ispitanika uočen u kombinaciji s alelima HLA-DRB4\*01:03-DQB1\*03:03.
8. Raspodjela alela HLA-DRB4 u našoj populaciji u skladu je s malobrojnim podacima za druge populacije evropskog porijekla.

## **7.LITERATURA**

1. Andreis I., Batinić D., Čulo F. i sur. (2004): Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb.

2. Balog V. (2010): Povezanost kromosomske regije 6p21 i dječje astme u populaciji Hrvatske. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
3. Bendukidze N., Ivašková E., Zahlavová L., Slavcev A., Kupková L., Sajdlová H., Day S., Dunn P.J.J. (2003): Identification of HLA Alleles with Low or No Cell Surface Expression in the Czech Population. *Folia Biologica (Praha)* 49, 227-229.
4. Bodmer W.F. (1987): The HLA system: structure and function. *Journal of Clinical Pathology*, 40 (9): 948-958.
5. Brkljačić-Kerhin V., Grubić Z. (2006): Glavni sistem tkivne snošljivosti u ljudi. U: Grgičević D. i sur. *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*, Zagreb, Medicinska naklada, 1. izdanje: 254-258.
6. Gassner C., Ellemunter H., Zahn R., Albert E.D., Blasczyk R., Schönitzer D. (1999): Unusual association of the DRb4 null allele, DRB4\*01030102N, with HLA DRB1\*0402 in a sample of the Austrian patients. *Tissue Antigens* 54, 307-309
7. 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.
8. Grubić Z. (1997): Raspodjela gena razreda II sustava HLA u hrvatskoj populaciji- molekularna istraživanja. Doktorska disertacija, Zagreb
9. Grubic Z., Stingl K., Zunec R. (2012): Heterogeneity of HLA-DRB1\*04 alleles and haplotypes in the Croatian population. *Tissue Antigens*, 80, 219-223.
10. Janeway C.A., Travers P, Walport M., Shlomchik M.J. (2005). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science, pp. 55–75.

11. Mehra N.K., Kaur G. (2003): MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. *Expert Rev Mol Med*, 5 (7): 1-17.
12. Parham P., Lomen C.E., Lawlor D.A., Ways J.P., Holmes N., Coppin H.L., Salter R.D., Wan A.M., Ennis P.D. (1988): Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. *Peer Reviewed Journal*, 85(11), 4005-4009.
13. Rodey Glenn (2007): Serological cross-reactivity—HLA-A locus 1 CREG 2 CREG 36 1 80 3 11 30 29 26 43 66 34. MD, De Novo, Inc., Durango, CO USA
14. Voorter C.E.M., Lardy N.M., van den Berg-Loonen E.M. (2000): Presence of the DRB4\*0103102N null allele in different DRB1\*04-positive individuals. *Tissue Antigens*, 55, 37-43.
15. <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>
16. <http://www.pypop.org/>
17. <http://www.allelefreqencies.net/>
18. [http://hla.alleles.org/inc/images/graph\\_hires.png](http://hla.alleles.org/inc/images/graph_hires.png) (svibanj 2016.)

## **8. ŽIVOTOPIS**

## **Osnovni osobni podaci**

Datum i mjesto rođenja: 01.08.1992., Čakovec, Republika Hrvatska

## **Obrazovanje**

- rujan 1999.- lipanj 2007. - Osnovna škola Kotoriba
- rujan 2002.- lipanj 2007. – Osnovna umjetnička škola „ Miroslav Magdalenić“ Čakovec
- rujan 2007.- lipanj 2011. - Opća gimnazija Čakovec
- rujan 2011.- rujan 2014. - Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
  - Prediplomski studij biologije; naslov završnog rada: Mikroflora i zdravlje; mentor: prof.dr.sc. Nada Oršolić

## **Akadska postignuća**

- član Udruge studenata biologije (BIUS); rad na projektima:
  1. Analiza vode u špilji Veternica na prisustvo koliformnih bakterija i fekalnih enterokoka kao pokazatelja onečišćenja
  2. Pojavnost i karakterizacija sojeva virusa šarke šljive (Plum pox virus, PPV) u vrstama roda Prunus na Cresu i Lošinju
  3. Udio  $\beta$ -hemolitičkih streptokoka u općoj populaciji
  4. Bioraznolikost fitopatogenih gljiva iz reda Pucciniales (hrđe) u Grabovači
- dobitnica dvije specijalne Rektorove nagrade za projekte: Noć biologija 2013. i Grabovača 2014.
- certifikat Goethe Instituta: Deutsche Sprachdiplom Goethe Certificate C1
- znanstvena prezentacija na sportsko-znanstveno manifestaciji „Primatijada 2015“ pod naslovom „Testiranje osjetila i propriorepcija“
- znanstvena prezentacija na sportsko-znanstveno manifestaciji „Primatijada 2016“ pod naslovom "Mythbusters: tumor edition"
- studentski predstavnik u Vijeću biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
- studentski predstavnik prirodnih znanosti u Vijeću prirodoslovlja
- Erasmus Intership: stručna praksa: Beč (02.11.2016.-31.01.2017.) - Medizinische Universität Wien



## **Osobne vještine**

- hrvatski (materinski), engleski (C1), njemački (C1)
- timski rad, upornost, komunikativnost, organizacijske sposobnosti, želja i volja za učenjem
- IT vještine (Microsoft Office: Word, Excel, PowerPoint, Outlook, Explorer, R studio), upravljanje programom za citiranje radova (Mendeley)
- stolni tenis, glazbena škola (sviranje klavira), škola stranih jezika (njemački i engleski), zbor