

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Davor Štimac

**ISTRAŽIVANJE HAPLOTIPOVA HLA-B27 U  
BOLESNIKA SA SPONDILOARTROPATIJAMA  
U HRVATSKOJ POPULACIJI**

Diplomski rad

Zagreb, 2010.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom doc. dr. sc. Zorane Grubić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Zorani Grubić na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu ovog rada, te za savjete i pomoć tijekom analize dobivenih rezultata. Njezina stručnost i iskustvo, poticanje na samostalan rad, te pomoć pri rješavanju problema omogućili su mi postavljanje nekih osnovnih temelja za moj budući rad u znanosti. Također se želim zahvaliti i dr. sc. Katarini Štingl na podršci i pruženoj pomoći tijekom laboratorijskog istraživanja i pisanja diplomskog rada, te ostalim djelatnicima Zavoda za tipizaciju koji su na bilo koji način sudjelovali i pomogli što boljoj izradi ovog rada. Naposljetku, želim se zahvaliti svojoj obitelji, kolegama i prijateljima koji su mi uz veliku podršku, ljubav i razumijevanje omogućili da studentsko doba kvalitetno privedem kraju i krenem u nova znanstvena iskušenja.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## **ISTRAŽIVANJE HAPLOTIPOVA HLA-B27 U BOLESNIKA SA SPONDILOARTROPATIJAMA U HRVATSKOJ POPULACIJI**

Davor Štimac

Zavod za tipizaciju tkiva, KBC Zagreb, Kišpatićeva 12.

U ovom radu analizirali smo alele 5 mikrosatelita HLA (D6S248, D6S2674, D6S2811, STR\_MICA i D6S273) među HLA-B27 pozitivnim nesrodnim osobama (N=94), bolesnicima s psorijatičnim artritisom (PsA) (N=22) i bolesnicima s juvenilnim spondiloartropatijama (jSpA) (N=29). U sve testirane skupine najučestaliji aleli bili su: D6S248-291pb, D6S2674-131pb, D6S2811-98pb i STR\_MICA-A4, dok je na lokusu D6S273 najčešći alel među bolesnicima s jSpA i kontroli bio alel D6S273-4, a među bolesnicima s PsA alel D6S273-5. Analizom bolesnika s PsA utvrdili smo da je alel D6S273-3 podložan za bolest, dok aleli D6S2811-126pb, D6S273-4, kao i haplotipska veza HLA-B\*27/D6S273-4 pokazuju zaštitnu ulogu za razvoj bolesti. Među bolesnicima s jSpA otkrivena je smanjena učestalost alela D6S2674-131pb i dviju haplotipskih veza HLA-B\*27/D6S2674-131 i HLA-B\*27/D6S2811-98 što govori u prilog njihovoj zaštitnoj ulozi za razvoj bolesti, dok je za alel STR\_MICA-A9 i haplotipsku vezu HLA-B\*27/D6S248-291 utvrđena statistički značajno povišena učestalost što upućuje na zaključak da su podložni za razvoj jSpA.

(53 stranica, 15 slika, 25 tablica, 35 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Marulićev trg 20/2, Zagreb

Ključne riječi: mikrosateliti, haplotipovi HLA, gen HLA-B27, psorijatični artritis, juvenilne spondiloartropatije

Voditelj: Doc. dr. sc. Zorana Grubić  
Suvoditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić  
Ocjenjivači: Doc. dr. sc. Zorana Grubić  
Prof. dr. sc. Nada Oršolić  
Doc. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek  
Doc. dr. sc. Goran Kovačević  
Zamjena: Prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Rad prihvaćen: 10. Ožujka 2010.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **RESEARCH OF HAPLOTYPES HLA-B27 IN PATIENTS WITH SPONDYLOARTHROPATHIES IN CROATIAN POPULATION**

Davor Štimac

Tissue typing centre, KBC Zagreb, Kišpatičeva 12.

In this study we analyzed the alleles of 5 HLA microsatellites (D6S248, D6S2674, D6S2811, STR\_MICA and D6S273) among HLA-B27 positive, healthy individuals (N=94), patients with psoriatic arthritis (PsA) (N=22) and patients with juvenile spondyloarthropathies (jSpA) (N=29). The most common alleles in all tested groups were: D6S248-291pb, D6S2674-131pb, D6S2811-98pb and STR\_MICA-A4 alleles, while at the D6S273 locus, the most common allele among patients with jSpA and controls was D6S273-4 allele and among patients with PsA D6S273-5 allele. The analysis of patients with PsA determined that D6S273-3 allele is associated with an increased risk for the disease, while D6S2811-126pb and D6S273-4 alleles, as well as HLA-B\*27/D6S273-4 haplotypic association show a protective role for the development of the disease. A decreased frequency of D6S2674-131pb allele and HLA-B\*27/D6S2674-131 and HLA-B\*27/D6S2811-98 haplotypic associations was discovered among patients with jSpA which implies their protective role for the development of the disease. On the other hand, a statistically significant increase in frequency was determined for STR\_MICA-A9 allele and the HLA-B\*27/D6S248-291 haplotypic association which leads to the conclusion that they are involved in the development of jSpA.

(53 pages, 15 figures, 25 tables, 35 references, original in: Croatian)

The paper is stored in the Central Library of the Biological Department of the Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Marulićev trg 20/2, Zagreb

Key words: microsatellite, haplotype HLA, HLA-B27 gene, psoriatic arthritis, juvenile spondyloarthropathy

Supervisor: Dr. sc. Zorana Grubić, Asst. Prof.

Co-supervisor: Dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

Reviewers: Dr. sc. Zorana Grubić, Asst. Prof.

Dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Asst. Prof.

Dr. sc. Goran Kovačević, Asst. Prof.

Replacement: Dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, Prof.

Thesis accepted: March 10<sup>th</sup>, 2010

# SADRŽAJ

	Str.
<b>1. Uvod</b>	<b>1</b>
1.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti	1
1.1.1. Glavne funkcije gena sustava tkivne podudarnosti - HLA	1
1.1.2. Organizacija gena HLA i građa molekula HLA	2
1.1.3. Svojstva sustava HLA	5
1.2. Gen HLA-B*27	6
1.2.1. Povezanost gena HLA-B*27 i bolesti	10
1.3. Spondiloartropatije	13
1.3.1. Psorijatični artritis	14
1.3.2. Juvenilne spondiloartropatije	14
1.4. Kratka uzastopna ponavljanja sljedova DNA - mikrosateliti	15
1.4.1. Mikrosateliti HLA	19
1.4.2. Primjena mikrosatelita HLA	20
<b>2. Ciljevi istraživanja</b>	<b>21</b>
<b>3. Ispitanici, materijal i metode</b>	<b>22</b>
3.1. Ispitanici	22
3.1.1. Bolesnici s psorijatičnim artritismom (PsA)	22
3.1.2. Bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama (jSpA)	22
3.1.3. Kontrolna skupina	23
3.2. Materijal	23
3.3. Metode	24
3.3.1. Izolacija DNA	24
3.3.2. Određivanje alela mikrosatelitskih lokusa HLA	26
3.3.3. Elektroforeza	28
3.3.3.1. Priprema gela i ploča za elektroforezu	29
3.4. Statistička obrada podataka	31
<b>4. Rezultati</b>	<b>32</b>
4.1. Raspodjela alela na mikrosatelitskim lokusima HLA (D6S248, D6S2674, D6S2811, STR_MICA, D6S273) u skupini zdravih ispitanika, bolesnika s psorijatičnim artritismom i bolesnika s juvenilnim spondiloartropatijama u hrvatskoj populaciji	32
4.2. Analiza produženih haplotipskih veza gena HLA-B*27 u tri ispitivane skupine u hrvatskoj populaciji	38
<b>5. Rasprava</b>	<b>44</b>
<b>6. Zaključci</b>	<b>49</b>
<b>Popis literature</b>	<b>50</b>

# **1. UVOD**

## **1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE PODUDARNOSTI**

Glavni sustav tkivne podudarnosti, sustav HLA (*engl.* Human Leukocyte Antigen), otkriven je na leukocitima pedesetih godina XX stoljeća. Pojam „sustav“ uveden je nakon što se uvidjelo da na odgovarajućem mjestu kromosoma 6 ne postoji samo jedan lokus HLA već se na tom mjestu nalazi niz lokusa HLA. Sustav HLA se iz funkcijskih razloga dijeli u tri razreda: HLA razred I i HLA razred II unutar kojih se nalaze geni koji kodiraju molekule HLA koje imaju ključnu ulogu u preradi i predočavanju antigena, te HLA razred III koji sadrži gene koji nemaju središnju ulogu u imunološkoj reakciji (1). Prva aloantitijela HLA razreda I otkrili su Dausset, Miescher i Fouconnet u bolesnika koji su bolovali od leukemije, a primali su transfuzije krvi. Prvi opisani antigen, nobelovac J. Dausset nazvao je „MAC“, koji odgovara današnjem lokusu HLA-A, odnosno antigenu HLA-A2. Neovisno jedni od drugih, Payne i van Rood sa suradnicima opisuju sustav alela 4a i 4b koji je također određen na leukocitima i nazivaju ga LA1, LA2 i LA3. Genetska osnova leukocitnih antigena tada još nije bila razjašnjena, ali je utvrđeno da ta dva alelna sustava odgovaraju lokusima HLA-A i HLA-B, narednih godina otkrivaju se i drugi lokusi HLA.

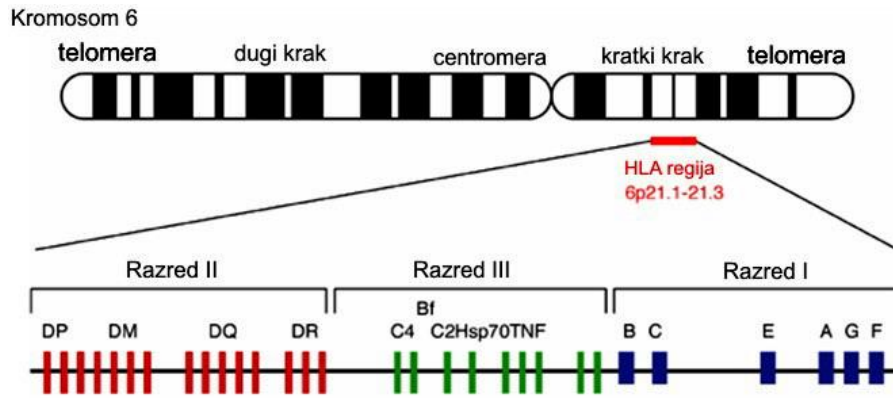
### **1.1.1. Glavne funkcije gena sustava tkivne podudarnosti - HLA**

Glavne funkcije gena sustava tkivne podudarnosti su:

- 1.) regulacija imunološkog prepoznavanja stranog antigena (imunogena)
- 2.) kontrola sinteze tkivnih antigena
- 3.) regulacija proizvodnje specifičnih antitijela
- 4.) kontrola interakcije i suradnje limfoidnih stanica tijekom imunološke reakcije upravljene protiv antigena tj. ciljne stanice
- 5.) regulacija proizvodnje komplementa i drugih medijatora imunološke reakcije

### 1.1.2. Organizacija gena HLA i građa molekula HLA

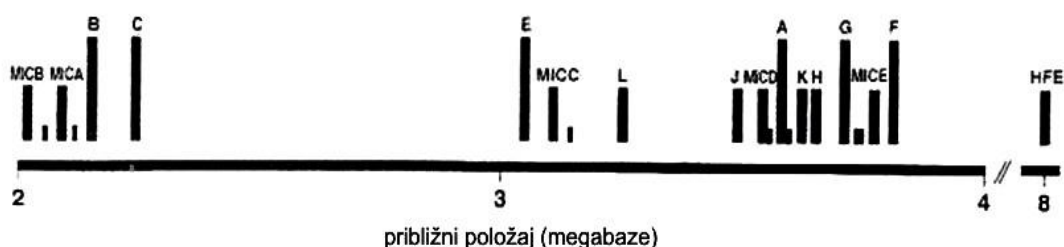
Geni HLA nalaze se na kraćem kraku kromosoma 6 (6p21.1-21.3), a obuhvaćaju približno 4 milijuna parova baza i podijeljeni su u tri regije (slika 1).



Slika 1. Genska mapa regije humanih leukocitnih antigena (HLA)

Regija HLA razreda I obuhvaća približno 2 mega baza (Mb), smještena je prema telomernom kraju kromosoma 6 i sadrži gene koji kodiraju molekule HLA razreda I. Geni razreda I (slika 2) kodiraju teške lance molekula HLA razreda I, lanac  $\alpha$ . Podjeljeni su u tri skupine: *klasični geni* HLA-A, -B, -Cw (izrazito polimorfni geni), *neklasični geni* HLA-E, -F, -G te *nefunkcionalni pseudogeni* HLA-H, -J, -K, -L, -P, -T, -U, -V, -W, -X (2).

Razlike između klasičnih i neklasičnih gena HLA razreda I očituju se u raznovrsnosti, zastupljenosti na tkivima te ulozi u transplantaciji. Geni HLA razreda I građeni su od 8 egzona (egzon za vodeći peptid, egzoni za tri ekstracelularne domene, egzon za transmembransko sidro, egzon za citoplazmatski rep i egzon za 3' netranslantiranu regiju) (3).

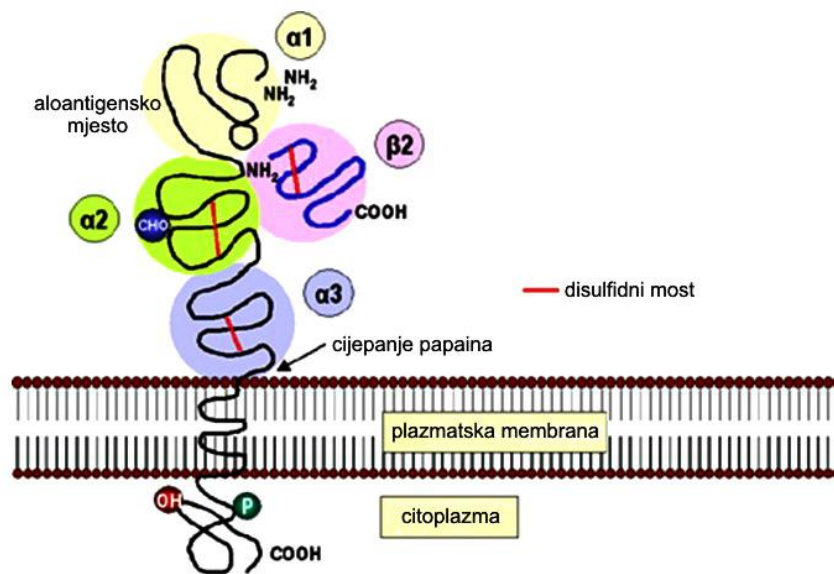


Slika 2. Genska mapa regije HLA razreda I



Molekule HLA razreda I sastoje se od dva polipeptidna lanca:  $\alpha$  lanac (45 kD) koji je usidren u membrani i  $\beta$  lanac (12 kD), tj.  $\beta_2$ -mikroglobulin, koji je topiv u vodi, a kodira ga gen na kromosomu 15.

Cijela molekula HLA razreda I može se podijeliti u četiri dijela: *dio koji veže peptid* (sastoji se od 180 aminokiselina, tvore ga  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domene koje su sastavni dio  $\alpha$  lanca, ove dvije domene zatvaraju pukotinu koja može vezati antigenski peptid veličine 9-11 aminokiselina), *dio sličan imunoglobulinu* (tvori ga  $\alpha_3$  domena, sličan je konstantnom dijelu imunoglobulina i sadrži vezno mjesto za CD8+ na citotoksičnim limfocitima T) te *transmembranski i citoplazmatski dio* (slika 3).



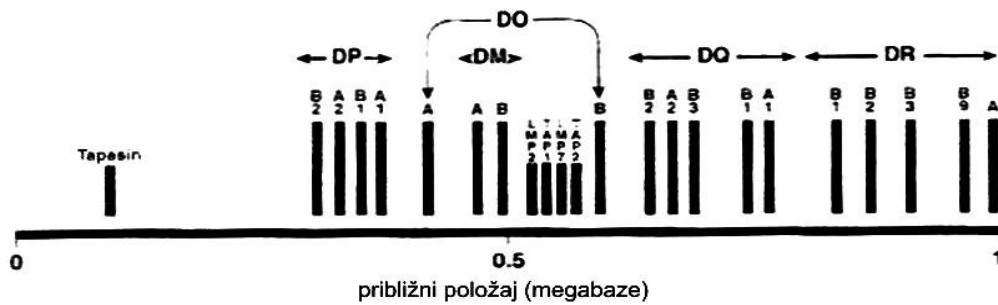
**Slika 3. Struktura molekula HLA razreda I**

Molekule HLA razreda I prezentiraju strane antigene citotoksičnim limfocitima T (CD8+), također reagiraju i s različitim NK inhibitorskim receptorima te tako štite zdrave stanice od imunoreakcije stanicama NK.

Regija HLA razreda II najbliža je centromeri kromosoma 6 (približna veličina 1Mb), tu se nalaze geni koji kodiraju molekule HLA razreda II. Molekule HLA razreda II su heterodimeri koji su građeni od  $\alpha$  i  $\beta$  lanca približno jednake veličine, a prisutne su na antigen prezentirajućim stanicama kao što su: dendritičke stanice, makrofagi te limfociti B.

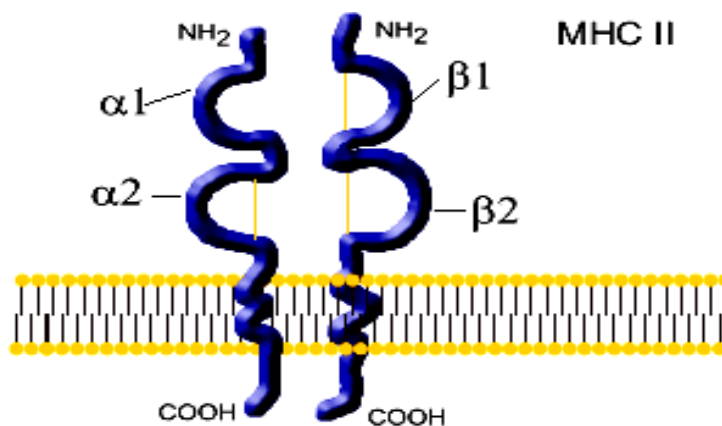
Unutar regije HLA razreda II postoje pet subregija: HLA-DM (A, B), -DN (A), -DO (B), -DP (A1, A2, B1, B2), -DQ (A1, A2, B1, B2, B3), -DR (A, B1-B9). Svaka od navedenih subregija ima gen za  $\alpha$  i gen za  $\beta$  lanac, većinom jedan uz drugi osim u slučaju HLA-DO i HLA-DN čiji su geni razdvojeni genima HLA-DM (slika 4).

Lanac  $\alpha$  kodira gen s četiri egzona (egzon za vodeći peptid, egzoni za dvije ekstracelularne domene, egzon za transmembransku domenu i egzon za citoplazmatski rep), dok  $\beta$  lanac kodira gen s pet egzona (egzon za vodeći peptid, egzoni za dvije ekstracelularne domene, egzon za transmembransku domenu i egzon za citoplazmatski rep).



Slika 4. Genska mapa regije HLA razreda II

Molekule HLA razreda II građene su od dva međusobno slična, polimorfna, nekovalentno vezana lanca  $\alpha$  (33-35 kD) i  $\beta$  (26-28 kD). Svaku molekulu HLA razreda II možemo podijeliti na četiri dijela: *dio koji veže peptid* kojeg tvore  $\alpha_1$  i  $\beta_1$  domena koje zatvaraju pravilno građenu pukotinu u koju se smješta prerađeni peptid dužine 10-30 aminokiselina, *dio sličan imunoglobulinu* kojeg tvore konzervirane domene  $\alpha_2$  i  $\beta_2$ , slične konstantnom dijelu imunoglobulina ( $\beta_2$  sadrži vezno mjesto za receptor CD4<sup>+</sup> na pomoćničkom limfocitu T-CD4<sup>+</sup>), *transmembranski* i *citoplazmatski dio* (slika 5).



Slika 5. Struktura molekula HLA razreda II

### 1.1.3. Svojstva sustava HLA

Jedna od najznačajnijih svojstva sustav HLA je *raznovrsnost*. Geni HLA su najpolimorfniji geni u ljudskom genomu, a najpolimorfniji od svih gena HLA je gen HLA-B te gen HLA-DRB1 (tablica 1). Veliki broj alela HLA rezultat je prirodne selekcije, a dokaz za to je nizak postotak osoba homozigota za alele HLA čime se ukazuje da postoji selektivna prednost heterozigotnih osoba. Velika raznovrsnost HLA osigurava raznolikost molekula HLA u cjelokupnoj populaciji, a svaka osoba ima dva alela pojedinog gena HLA (po jedan nasljeđen od svakog roditelja). Izraziti polimorfizam ostvaruje se brojnim genskim mehanizmima kao što su konverzija gena, genska rekombinacija, somatske mutacije.

Pojedina kombinacija alela gena HLA na kromosomu 6 u cis položaju, koja se nasljeđuje u bloku s roditelja na djecu, a izražava se kodominantno (obzirom na nasljeđivanje) na staničnoj membrani naziva se haplotip HLA.

**Tablica 1. Broj poznatih alela HLA na genima HLA razreda I i razreda II**

<b>HLA razred I</b>										
GENI	A	B	C	E	F	G				
ALELI	893	<b>1431</b>	569	9	21	45				
PROTEINI	681	<b>1165</b>	431	3	4	15				
NUL - ALELI	51	<b>40</b>	10	0	0	2				
<b>HLA razred I – pseudogeni</b>										
GENI	H	J	K	L	P	T	U	V	W	X
ALELI	12	9	6	5	4	0	0	3	0	0
PROTEINI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NUL - ALELI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>HLA razred II</b>										
GENI	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	DMA	DMB	DOA	DOB
ALELI	3	814	35	106	28	136	4	7	12	9
PROTEINI	2	637	26	77	16	118	4	7	3	4
NUL - ALELI	0	8	1	1	0	3	0	0	1	0

*IMGT-HLA baza podataka, European Bioinformatics Institute (EBI), listopad 2009. (2)*

Naredna svojstva sustava HLA je *genska neravnoteža udruživanja* (*engl.* linkage disequilibrium) kod koje se aleli dva ili više usko vezanih lokusa HLA javljaju u istom haplotipu češće nego što bi to bilo za očekivati na osnovi njihovih pojedinačnih genskih učestalosti. Jedna od osobina je i *križna reaktivnost* (*engl.* cross-reactive group - CREG) tj. pojava kada antiserum HLA reagira ne samo s jednim već s više antigena HLA, a javlja se uglavnom među antigenima istog lokusa.

*Segregacija gena HLA* je pravilna što znači da dijete ima 50% šansu da nasljedi 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.

Učestalost *crossingover-a* je također jedna od osobina sustava HLA. U slučaju crossingover-a dolazi do zamjene dijelova kromatida tijekom oogeneze ili spermatogeneze. Učestalost crossingover-a u sustavu HLA je niska, što govori o bliskoj povezanosti lokusa HLA (učestalost crossingover-a između lokusa HLA je 1-2%).

Molekule HLA razreda I nisu zastupljene na eritrocitima, a u maloj koncentraciji ih ima na masnim stanicama i živčanom tkivu (limfociti T i B, stanice s jezgrom u ostalim tkivima, tjelesne tekućine, kolostrum), dok molekule HLA razreda II su visoko zastupljene u limfatičkom tkivu, a slabije u mišićnom, živčanom i masnom tkivu (limfociti B, makrofagi, spermiji, endotelne i epitelne stanice) čime se ukazuje na njihovu *nepravilnu tkivnu zastupljenost*.

## **1.2. GEN HLA-B\*27**

Gen HLA-B\*27, jedan od najistraživanijih gena HLA, pripada skupini gena HLA razreda I, te tvori skupinu od, dosad otkrivenih, 58 blisko vezanih alela (tablica 2) poznatih još i kao *podtipovi* (2). Većina podtipova gena HLA-B\*27 rezultat su zamijene jedne ili više aminokiselina u egzonu 2 i 3 koji kodiraju  $\alpha_1$  i  $\alpha_3$  domenu teškog lanca. Podtipovi gena HLA-B\*27 istraženi su trima metodama: izoelektričnim fokusiranjem (IEF), metodom citotoksičnih limfocita T i i lančanom reakcijom polimeraze (*engl.* Polymerase Chain Reaction - PCR).

**Tablica 2. Aleli gena HLA-B\*27**

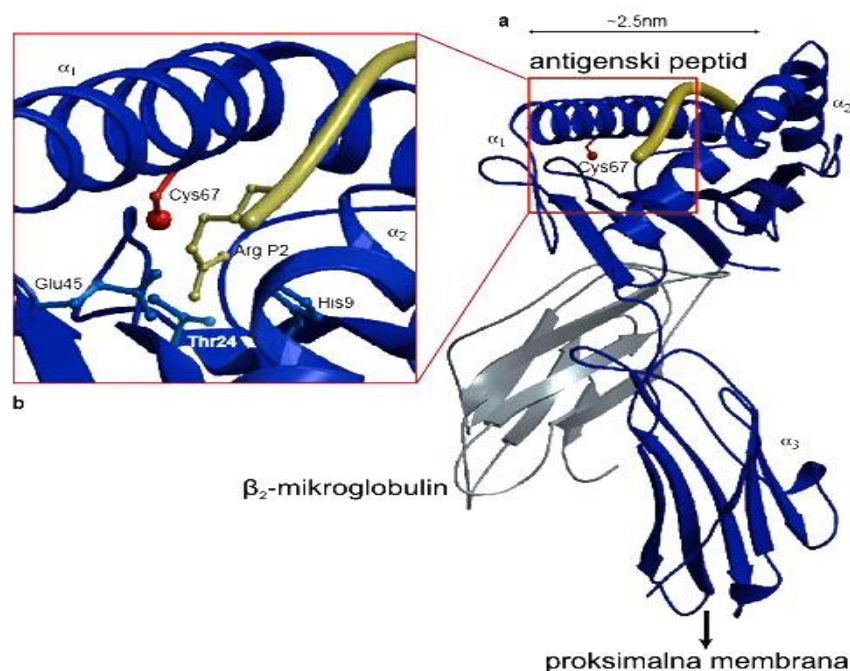
<b>ALEL HLA-B*27</b>	<b>RASPROSTRANJENOST</b>
B*2701	najrasprostranjeniji alel na području Azije
B*2702	zemlje sjeverne Europe (4-10%), Španjolska i Portugal (20%), Hrvatska (30%), sjeverna Afrika, Bliski istok (55%)
B*2703	zapadna Afrika (35%), Amerika
B*2704	Japan, Kina (50-70%), Tajland, sjeverna Indija (40%), Polinezija
B*2705	najrašireniji i najučestaliji podtip; područje Afrike i Amerike (65%), Euroazije (90-96%), Hrvatska (61%), Indija (51%).
B*2706	Kina, Tajland, Indonezija (80%)
B*2707	područje Azije i Europe
B*2708	rijedak alel u Europi (prvi uočen u Velikoj Britaniji), područje Azora, zapadne Indije
B*2709	Sardinija (Italija)
B*2710	područje Amerike
B*2711	Japan
B*2712	Španjolska, Velika Britanija
B*2713	Brazil, zapadna Indija
B*2714	Brazil, Siberija, zapadna Indija
B*2715- B*2721, B*2723 - B*2759	aleli s vrlo slabom zastupljenošću

O antigenu HLA-B27 prvi puta je bilo riječi 1970. godine na 4. Internacionalnom kongresu o histokompatibilnosti, kada je izvješteno o novoj specifičnosti HLA, a nakon toga antigen HLA-B27 postaje jedan od bolje serološki definiranih antigena HLA (4).

Molekula HLA-B27 je heterodimer, strukturno i funkcionalno slična drugim molekulama HLA razreda I u sposobnosti prezentacije peptida limfocitima T-CD8+ (5). Građena je od teškog lanca koji se sastoji od tri domene ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ), nekovalentno vezanog za topivi nepolimorfni laki lanac  $\beta_2$ -mikroglobulin (slika 6a).

Prve dvije domene teškog lanca zajedno čine dvije antiparalelne spirale koje se nalaze na površini osmerostruko nabrane ploče, koja stoji na dvjema strukturama u obliku cijevi koje potječu iz treće domene i  $\beta_2$  mikroglobulina. Unutar pukotine se veže antigenski peptid endogenih proteina ili proteina virusa i bakterija koje su napale stanicu. Novija istraživanja govore o tome da pukotina molekule HLA-B27 može vezati peptid dužine do 33 aminokiseline, međutim sam mehanizam vezanja još nije u potpunosti razjašnjen.

Peptidski antigen u kontaktu je s teškim lancem molekule HLA-B27 na nekoliko mjesta, u tzv. „džepovima“, koji su određeni pozicijama od A do H duž ploče. Svojstvo koje razlikuje molekulu HLA-B27 od većine ostalih molekula HLA razreda I su ostaci tzv. džepa B teškog lanca. U taj džep B veže se drugi ostatak antigenog peptida, a ostatak glutaminske kiseline koji ga obavija određuje da se na tu poziciju može smjestiti samo ostatak arginina iz peptida (Arg, P2) (slika 6b). Ostale aminokiseline koje su u kombinaciji jedinstvene za molekulu HLA-B27, a okružuju B džep su: His9, Thr24, Glu45 i Cys67.



**Slika 6. Struktura molekule HLA-B27**

a) vanstanična domena molekule HLA-B27. Teški  $\alpha$  lanac (domene  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ) prikazan je plavom bojom,  $\beta_2$ -mikroglobulin sivom bojom, vezani peptid žutom bojom

b) prikaz džepa molekule HLA-B27

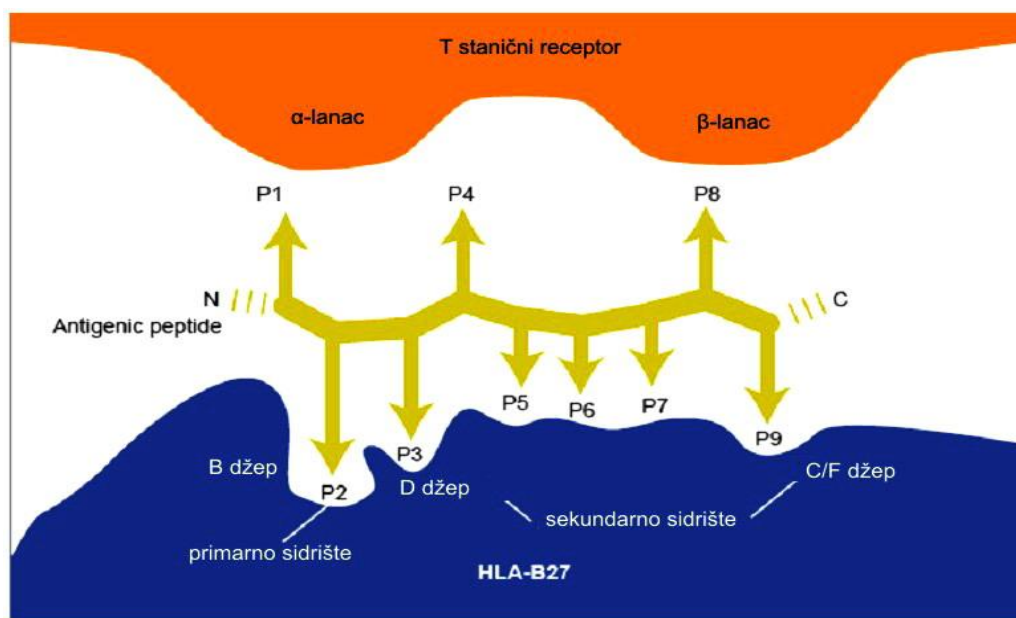
Slika je producirana koristeći programe BobScript i Raster 3D (7).

Struktura peptida u molekuli HLA-B27 pokazuje da većina antigenskih peptida ima arginin (R) na poziciji dva (6). Tablica 3 prikazuje aminokiseline u peptidima koji se vežu na molekulu HLA-B27 (konzervirane regije su označene **masnim slovima**) gdje je na poziciji P2 (džep B) vidljivo vezanje aminokiseline arginina.

**Tablica 3. Aminokiselinske sekvence peptida eluirane iz molekule HLA-B27 (4)**

HLA-B27	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
	R	<b>R</b>	I	K	E	I	V	K	<b>K</b>
	G	<b>R</b>	I	D	K	P	I	L	<b>K</b>
	R	<b>R</b>	S	K	E	I	T	V	<b>R</b>
	R	<b>R</b>	Y	Q	K	S	T	E	<b>L</b>
	A	<b>R</b>	L	F	G	I	R	A	<b>K</b>
	K	<b>K</b>	Y	Q	K	S	T	E	<b>L</b>

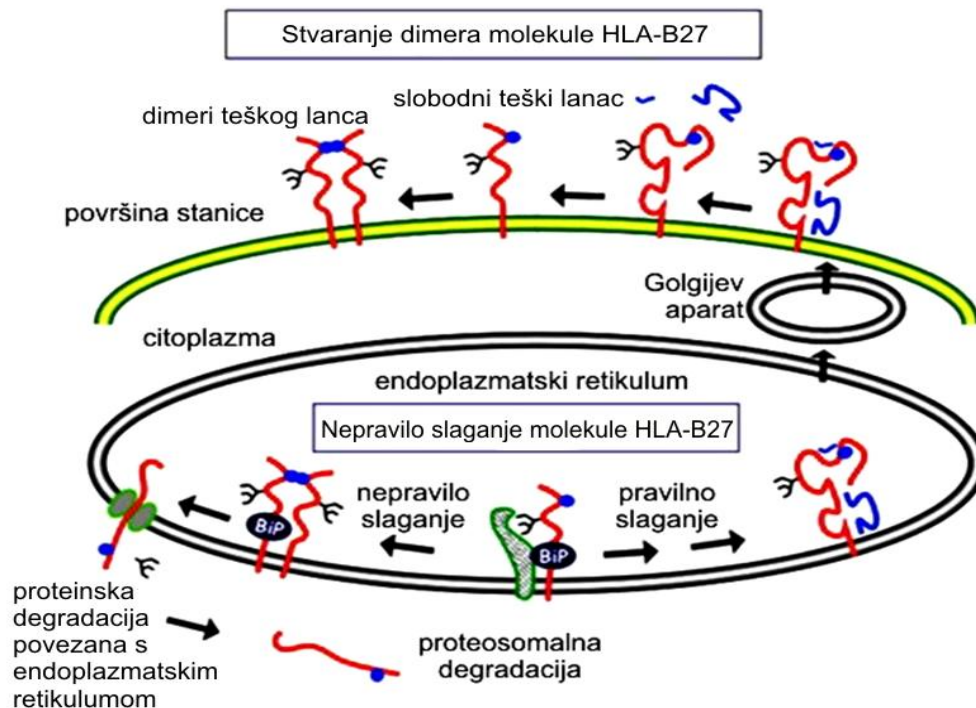
Džepovi D i F vežu „sekundarno usidrene“ bočne lance aminokiselina antigenskog peptida na trećoj i C-terminalnoj poziciji (7). U strukturi molekule HLA-B27 vidljivo je da se amino i karboksilni kraj peptida veže na sačuvani ostatak u 2 džepa (A i F) smještenim na suprotnim krajevima veznog mjesta (slika 7).



**Slika 7. Shematski prikaz vezanja antigena na molekulu HLA-B27 i prepoznavanje od strane T staničnog receptora. Bočni lanaci usidrenog ostatka peptida P2, P3 i P9 (C-kraj) su vezani u džep, dok bočni lanci P1, P4 i P8 koji se pružaju izvan veznog žlijeba, su kritični za T stanično prepoznavanje (7)**

Brojna istraživanja koja su dosad napravljena pokazala su da se u pukotinu molekula HLA razreda I može vezati i do 10000 različitih peptida. Takva raznolikost u vezanju peptida predstavlja važnu osobinu molekule HLA-B27.

Prilikom nepravilnog slaganja proteina nakon sinteze molekule HLA-B27 može doći do poremećaja i formiranja dimera (spajanja 2 teška lanca molekule HLA-B27 u zajedničku molekulu) što može rezultirati poticanjem razvoja nekih bolesti (slika 8).



Slika 8. Nastanak dimera HLA-B27

### 1.2.1. Povezanost gena HLA-B\*27 i bolesti

Početak sedamdesetih godina prošlog stoljeća malo se znalo o etiologiji i genetskoj podlozi koje mogu predodrediti pojavu nekih bolesti kao što su spondiloartropatije ili upalni reumatski poremećaji. Sve se promijenilo 1973. godine kada su Schlosstein i Brewerton (8) (neovisno jedan od drugog) otkrili povezanost antigena HLA-B27 s reumatskom bolešću ankilozantnim spondilitisom (AS) na temelju velike učestalosti toga antigena među oboljelima.

Naime, poznato je da osobe koje nose određeni gen HLA imaju genetsku predispoziciju za razvoj određene bolesti, dok će manji broj tih osoba zapravo i oboljeti. To ima veliku važnost u dijagnozi (nalaz određenog alela HLA pridonosi dijagnozi) kao i prognozi (poveznica bolesti s određenim alelom HLA) bolesti.



Mjera „jakosti“ povezanosti određenog antigena s pojavom neke bolesti se izražava kao omjer izgleda – OR (*engl.* „odds ration“).

Može se uočiti da gotovo sve bolesti koje su povezane s alelima HLA pripadaju grupi *autoimunih bolesti* (nastaju zbog neprimjerene imunoreakcije), a one su uvjetovane genetskom predispozicijom koja je rezultat kombinacije gena HLA i drugih gena, kao i faktora okoliša. Kod oboljelih osoba bolest se razvije kad infekcija pokrene imunološki odgovor pri čemu jedan ili više limfocita T gubi tolerantnost prema vlastitom te reagira na vlastite peptide.

Nakon otkrića povezanosti antigena HLA-B27 s AS-om započela su istraživanja povezanosti antigena HLA-B27 s ostalim spondiloartropatijama koje su obilježene bolovima u kralježnici i sakroilijakalnim zglobovima. Iako patogeni mehanizam gena HLA-B\*27 u spondiloartropatijama nije do kraja razjašnjen, postoji nekoliko teorija koje pokušavaju objasniti bit te veze (tablica 4).

**Tablica 4. Teorije povezanosti gena HLA-B\*27 sa spondiloartropatijama**

<b>Teorije povezane s imunološkom funkcijom molekula HLA</b>	<b>Teorije koje nisu povezane s imunološkom funkcijom molekula HLA</b>
<p>(1) „Artritogenična peptidna hipoteza“; prezentacija artritogeničnog peptida HLA-B27</p> <p>(2) Timusna selekcija T staničnog repertoara</p> <p>(3) Molekula HLA-B27 ima neobičnu biologiju stanice u usporedbi s drugim molekulama HLA</p> <p>(4) „Altered-self hipoteza“; kemijska promjena aminokiseline cistein na poziciji 67</p>	<p>(5) Povezanost gena HLA-B*27 s genom uzročnikom bolesti</p> <p>(6) Križna reaktivnost između antitijela usmjerena na bakterijski(e) protein(e) i molekule HLA-B27</p> <p>(7) Molekula HLA-B27 je receptor za bakterijski ligand</p> <p>(8) Interakcija molekule HLA-B27 s bakterijskim superantigenom uzrokuje nespecifičnu T staničnu stimulaciju</p> <p>(9) Peptidi vezani na molekulu HLA se prezentiraju stanicama T pomoću molekula HLA razreda II</p>

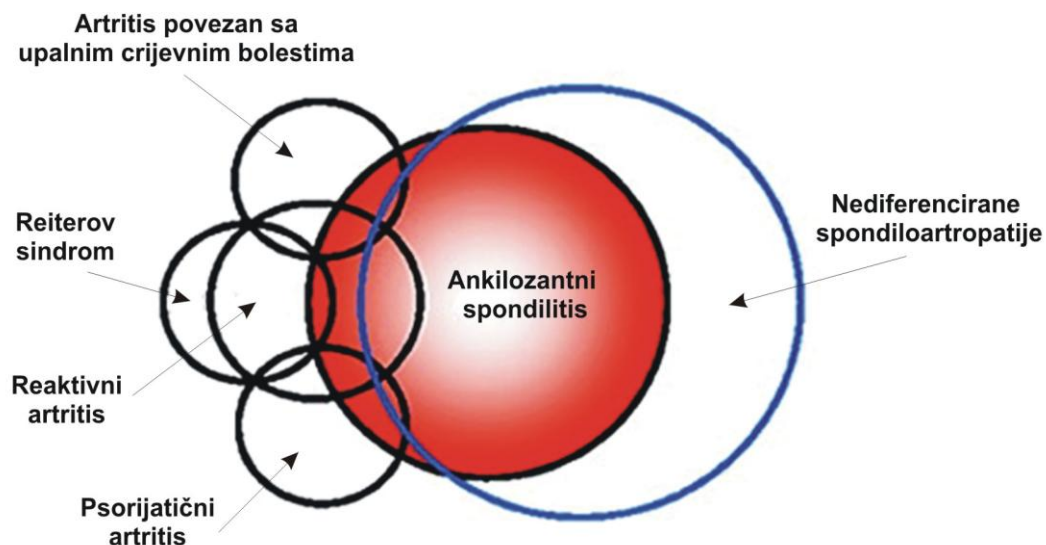
Prve četiri teorije sugeriraju da patogena uloga gena tj. molekule HLA-B27 proizlazi direktno iz njene prirodne funkcije u imunološkom sustavu (vezanje peptida i predočavanje stanicama T). Na taj način, molekula HLA-B27 može biti sposobna specifično vezati određeni artritogenični peptid, izveden iz mikroba ili proteina normalno produciranog od posebnog organizma (*engl.* self-protein), koji nije vezan za druge molekule HLA (TEORIJA 1). Budući da razvoj stanica T u timusu također ovisi o prepoznavanju HLA - peptid kompleksa, molekula HLA-B27 može imati utjecaj na razvoj repertoara stanica T (TEORIJA 2). Molekula HLA-B27 je posebna jer posjeduje nesporeni cisteinski ostatak na poziciji 67 u  $\alpha_1$  domeni. Stoga, Cys 67 u kombinaciji s ostalim ostacima vjerojatno može utjecati na molekulski sklop i funkciju molekula HLA-B27 (TEORIJA 3). Promjena cisteina (Cys67) može dovesti do imunološke stimulacije (TEORIJA 4).

Druga skupina teorija obuhvaća pet teorija od kojih jedna govori o mogućoj povezanosti molekula HLA-B27 s patološkim genom (TEORIJA 5), koja se sada smatra malo vjerojatnom budući da HLA-B27 transgenični glodavci razvijaju bolesti koje slične spondiloartritisu. Na sličan način, pokušala se objasniti i tkivna specifičnost idejom da antitijela usmjerena na bakterijske proteine mogu izazvati bolest kroz križnu reaktivnost s molekulom HLA-B27 (TEORIJA 6). Uistinu, iako se anti-HLA antitijela pronalaze kod bolesnika, kontrolirane studije ne daju nikakav dokaz da su specifične za molekulu HLA-B27. Umjesto toga, molekula HLA-B27, osim s staničnim receptorom T (TCR), može djelovati i s ligandima; molekula HLA-B27 može međusobno djelovati s bakterijskim receptorom (TEORIJA 7) ili super antigenom (TEORIJA 8). Ipak, nema izravnog dokaza za bilo koji od ovih mehanizama, a niti reaktivni super antigeni HLA razreda I nisu opisani. Završna teorija (TEORIJA 9) govori o tome da se peptidi vezani na molekulu HLA prezentiraju stanicama T-CD4<sup>+</sup> pomoću molekula HLA razreda II, te stoga mogu stimulirati autoimunitet. Proliferativni odgovori stanica T-CD4<sup>+</sup> na sintetički peptid sastavljen od zaostataka 60-72 molekule HLA-B27 detektirani su kod nekih bolesnika s ankilozantim spondilitisom. Ipak, noviji podaci istraživanja s transgeničnim miševima čini se da isključuju takav mehanizam budući da molekule HLA razreda II nisu nužne za razvoj artritisa (7).

### 1.3. SPONDILOARTROPATIJE

Spondiloartropatije su grupa poremećaja koji imaju zajednička klinička obilježja, a povezani su i s prisutnošću gena HLA-B\*27. Slična klinička obilježja te genetska podloga, sugeriraju da takvi poremećaji dijele i zajedničke patogene mehanizme. Smatra se da je uzajamno djelovanje genetike, faktora okoliša i faktora imunološkog prepoznavanja odgovorno za pojavu raznih kliničkih oblika bolesti. Infekcija nepoznatim organizmom ili izlaganje nepoznatom antigenu genetski osjetljivog bolesnika (pozitivan HLA-B27) je podloga za kliničku pojavu spondiloartropatije (9).

Spondiloartropatije uključuju: *ankilozantni spondilitis (AS)*, *Reiterov sindrom (RS)*, *reaktivni artritis (ReA)*, *artritis povezan s upalnim crijevnim bolestima (IBD)*, *psorijatični artritis (PsA)*, *juvenilne spondiloartropatije (jSpA)* i manje jasno definirane tzv. *nediferencirane spondiloartropatije (USpA)*. Slika 9 prikazuje međusobnu povezanost spondiloartropatija. Preklapanja se temelje na zajedničkim obilježjima bolesti kao što su: povezanost određenih gena HLA, klinička slika, patogeni mehanizam, utjecaj okolišnih faktora, itd.



**Slika 9. Međusobni odnos spondiloartropatija**

Smatra se, na temelju arheoloških nalaza, da su spondiloartropatije jako dugo prisutne među ljudima. Dokazi sežu sve do drevnih egipatskih mumija, a postoje i dokazi koji upućuju na to da se poremećaji slični spondiloartropatijama javljaju i u nehumanih primata, uključujući i majmune.

Zajedničke osobitosti spondiloartropatija su:

- 1.) sakroileitis s/bez povezanog spondilitisa
- 2.) upalni asimetrični artritis
- 3.) povezanost s HLA-B27
- 4.) upale oka
- 5.) odsutnost autoantitijela povezanih s drugim reumatskim bolestima.

### **1.3.1. Psorijatični artritis**

Psorijatični artritis (PsA) je skupina seronegativnih artritisa s karakterističnim promjenama na zglobovima, koji ponekad uključuje i kralježnicu. Unatoč posve različitoj kliničkoj slici, zajedničke osobine uključuju: kožne lezije psorijaze, odsutstvo reumatoidnog faktora (RF), povezanosti s genima HLA, te radiološke slike. Smatra se da oko 2% osoba u Europi i Sjevernoj Americi pati od psorijaze. Unutar populacija s psorijazom 5 do 10% osoba ima upalni oblik artritisa. Omjer muškaraca i žena s PsA je 1:1, a bolest se u najjačem obliku javlja tijekom četvrtog do šestog desetljeća života. Brojna istraživanja pokazala su da su antigeni HLA podložni za PsA: HLA-B13, -B17, -B27, -B37, -B57 (10). Osim s genima HLA uočena je povezanost i s genom MICA (*engl.* MHC class I chain A) te mikrosatelitima unutar skupine gena za nekrozu tumora (*engl.* Tumor Necrosis Factor - TNF).

U bolesnika s PsA, povezanost s genom HLA-B\*27 je manje izražena nego s AS-om ili ReA-om (11).

### **1.3.2. Juvenilne spondiloartropatije**

Juvenilne spondiloartropatije su kronična upalna bolest koja se javlja kod djece, a obilježava ih upala zglobova kralježnice i perifernih zglobova, odsutnost reumatoidnog faktora, te kliničke i radiološke promjene sakroilijakalnih zglobova. Jedna od važnijih osobina jSpA je, kao i kod odraslih, povezanost s genom HLA-B\*27, a oko 90% bolesnika s jSpA ima taj gen. Jedno od istraživanja obuhvaćalo je i skupinu od 74 hrvatske djece s jSpA i potvrđena je povezanost s genom HLA-B\*27 (12).

## 1.4. KRATKA UZASTOPNA PONAVLJANJA SLJEDOVA DNA - MIKROSATELITI

Eukariotski genom je pun ponavljajućih sljedova DNA koje su određene dužinom temeljnih ponavljajućih jedinica i broju graničnih ponavljajućih jedinica, ili ukupnom dužinom ponavljajuće regije. Takve ponavljajuće regije nazivamo satelitima DNA, a pronađene su u okolini centromera kromosoma.

Regije DNA koje sadrže ponavljajuće jedinice dužine 2-6 parova baza poznate su kao *mikrosateliti*, odnosno, jednostavne ponavljajuće sekvence (*engl.* Simple Sequence Repeat - SSR) ili kratka uzastopna ponavljanja (*engl.* Short Tandem Repeats - STR). Mikrosatelitski lokusi otkriveni su u eukariotskim genomima (eukromatinske regije) prije više od 25 godina, ali u početku njihovo postojanje nije pobuđivalo veći znanstveni interes. Manjom učestalošću se javljaju i u prokariotskim organizmima.

Nalaze se u izvangenskim i genskim regijama, i to ne samo u intronima, već i u kodirajućim regijama gena, a rijetko sadrže više od 70 ponavljajućih jedinica. U humanom genomu javljaju se u prosjeku svakih 6 kb, a mikrosatelitska DNA je slabo zastupljena jedino u područjima telomera i centromera (13). Do danas je analizirano tisuće polimorfni mikrosatelita u humanoj DNA, a smatra se da ih ima i više od milijun, ovisno o načinu priznavanja (International Human Genome Sequencing Consortium 2001.).

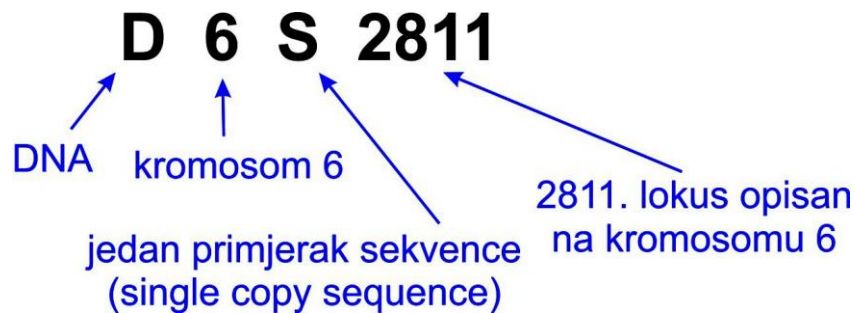
Dužina alela mikrosatelita je između 100-400 pb, što omogućuje jednostavniju amplifikaciju lančanom reakcijom polimeraze. Visok stupanj mutacija ( $10^{-3}$  do  $10^{-5}$  mutacija po mikrosatelitskom lokusu, po generaciji), visoka raznovrsnost, kodominantnost te jednostavan mendelski način nasljeđivanja, čini mikrosatelite vrlo popularnim i vrlo često primjenjivanim genetskim biljezima. Mikrosateliti se međusobno razlikuju u dužini ponavljanog slijeda, broju ponavljanja (mono-, di-, tri-, tetra i pentanukleotidna ponavljanja) te složenosti ponavljajućeg uzorka.

Mikrosatelite dijelimo u tri skupine:

- potpuni mikrosateliti (**CACACACACACACACACA**)
- sastavljeni mikrosateliti (**CACACACACAGAGAGAGAGA**)
- prekinuti mikrosateliti (**CACATTCA**C**ACATT**C**ATTCA**)

Sastavljeni i prekinuti mikrosateliti pokazuju manji stupanj raznovrsnosti od potpunih mikrosatelita.

Nazivlje mikrosatelitskih lokusa je dugi niz godina predstavljao veliki izvor problema i nesporazuma. Sve do 1997. godine nisu postojala usaglašena pravila o dodjeljivanju imena ovim lokusima te su ona bila proizvoljna. Međutim 1997. godine je međunarodno društvo za forenzičku genetiku (International Society for Forensic Genetics - ISFG) donijelo preporuke o nazivlju mikrosatelita prema kojima se pojedini lokus imenuje prema kromosomu na kojem se nalazi:



U populaciji može postojati mnogo alela na jednom lokusu, a svaki alel ima različitu dužinu. Pojedinci koji su homozigoti za lokus imat će isti broj ponavljanja na oba kromosoma, dok pojedinci koji su heterozigoti imat će različiti broj ponavljanja na svakom od kromosoma:

Homozigot = oba lanca DNA imaju 7 CT ponavljanja

...**CGTAGCCTTGCA****TCCTT**CTCTCTCTCTCTCT**ATCGGTA****CTACGTGG**...

...**CGTAGCCTTGCA****TCCTT**CTCTCTCTCTCTCT**ATCGGTA****CTACGTGG**...

5' bočna regija

mikrosatelitni lokus

3' bočna regija

Heterozigot = jedan lanac DNA ima 7 ponavljanja, drugi lanac 8 ponavljanja

...**CGTAGCCTTGCA****TCCTT**CTCTCTCTCTCTCT**ATCGGTA****CTACGTGG**...

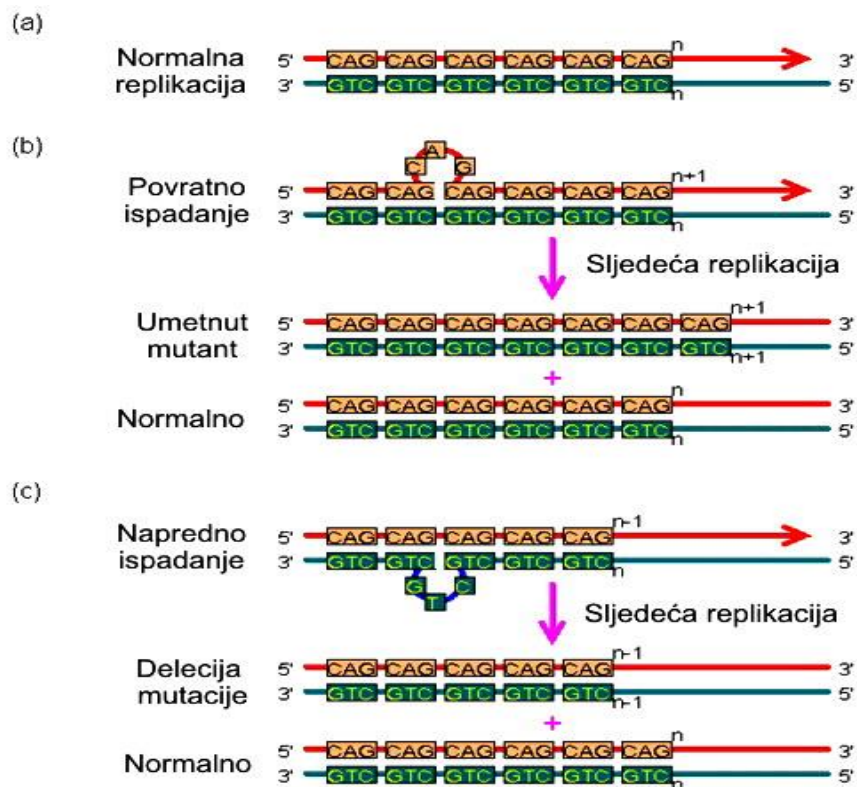
...**CGTAGCCTTGCA****TCCTT**CTCTCTCTCTCTCTCT**ATCGGTA****CTACGTGG**...

5' bočna regija

mikrosatelitni lokus

3' bočna regija

Vjeruje se da se nastanak te raznovrsnosti može objasniti *mehanizmom ispada pri udvostručenju molekule DNA* (engl. replication slippage). Radi se o procesu koji se zbiva tijekom udvostručenja DNA kada uslijed ispada dijela slijeda dolazi do pogrešnog sparivanja te je kao posljedica toga jedan ponavljajući blok izbačen ili umetnut u novonastali lanac DNA (slika 10). Obzirom da se mikrosatelitski lokusi sastoje od jednakih ponavljanja, prilikom spajanja lanca DNA koji predstavlja kalup i novonastalog lanca može doći do pogreške uslijed koje je jedan ponavljajući blok izbačen u obliku omče iz molekule. Takav blok će se isjeći tijekom popravka molekule DNA te će zbog toga novi lanac biti različite duljine u odnosu na stari. Učestalost ispada ovisi o veličini ponavljajuće jedinice (najveća je za dinukleotidna ponavljanja) i o njenom slijedu (najmanja je za ponavljanja bogata kombinacijom G-C, trinukleotidna ili tetranukleotidna).

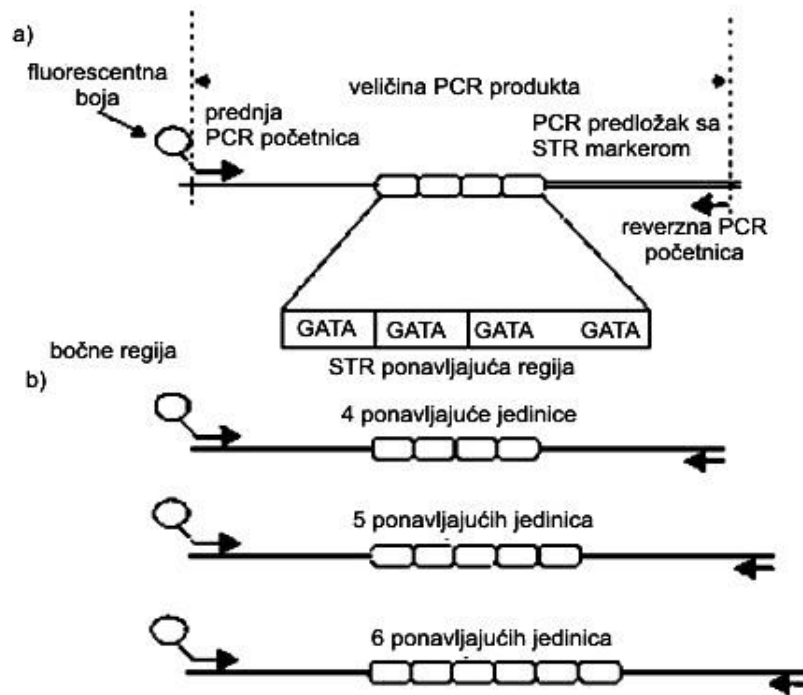


**Slika 10. Mehanizam ispada pri udvostručenju molekule DNA**

Drugi mehanizam, koji je važan za mutaciju mikrosatelita, je *neravnomjeran crossing-over tijekom mejoze*, koji također pokazuje drastične promjene u broju ponavljanja.

Zbog činjenice da se aleli mikrosatelitskih lokusa razlikuju po duljini, metode za njihovo određivanje su vrlo jednostavne i uključuju umnažanje PCR-om te elektroforezu za razdvajanje dobivenih produkata. Za analizu lokusa STR potrebno je odrediti nepromjenjive bočne regije koje okružuju to ponavljanje. Nakon omeđivanja tih regija slijedi izrada

početnica za PCR i samo umnažanje. Uporabom početnica koje su fluorescentno obilježene i specifične za jedinstvene sljedove DNA u smjeru 5' i 3' od samog mikrosatelitskog lokusa, moguće je reakcijom PCR-a dobiti veliki broj fluorescentno obilježenih kopija alela pojedinog mikrosatelitskog lokusa koje nosi određena osoba (slika 11). Obzirom da se aleli zbog razlike u broju ponavljanja osnovnog slijeda međusobno razlikuju po duljini, različitom brzinom će putovati kroz gel tijekom elektroforeze, te će se na taj način razdvojiti, a alele je tada moguće vrlo jednostavno odrediti.



**Slika 11. a) vezanje PCR početnica za jedinstvenu bočnu sekvencu koja graniči sa varijabilnom STR ponavljajućom regijom**  
**b) ukupna veličine STR alela razlikuje se po veličini umetnute ponavljajuće regije**

Jedan od problema koji se javlja pri interpretaciji rezultata nakon elektroforeze je pojava niza signala (*engl.* stutter bands), čime je teško odrediti pravi signal koji odgovara očekivanom alelu. Taj problem je naročito izražen kod dinukleotidnih ponavljanja. Obično očekivani signal je najvećeg intenziteta, no razlike u intenzitetu ostalih signala nisu dovoljne da bi se sa sigurnošću moglo zaključiti koji signal predstavlja ishodišni alel. Nastanak takvih dodatnih signala je rezultat klizanja DNA za vrijeme PCR umnažanja in vitro.

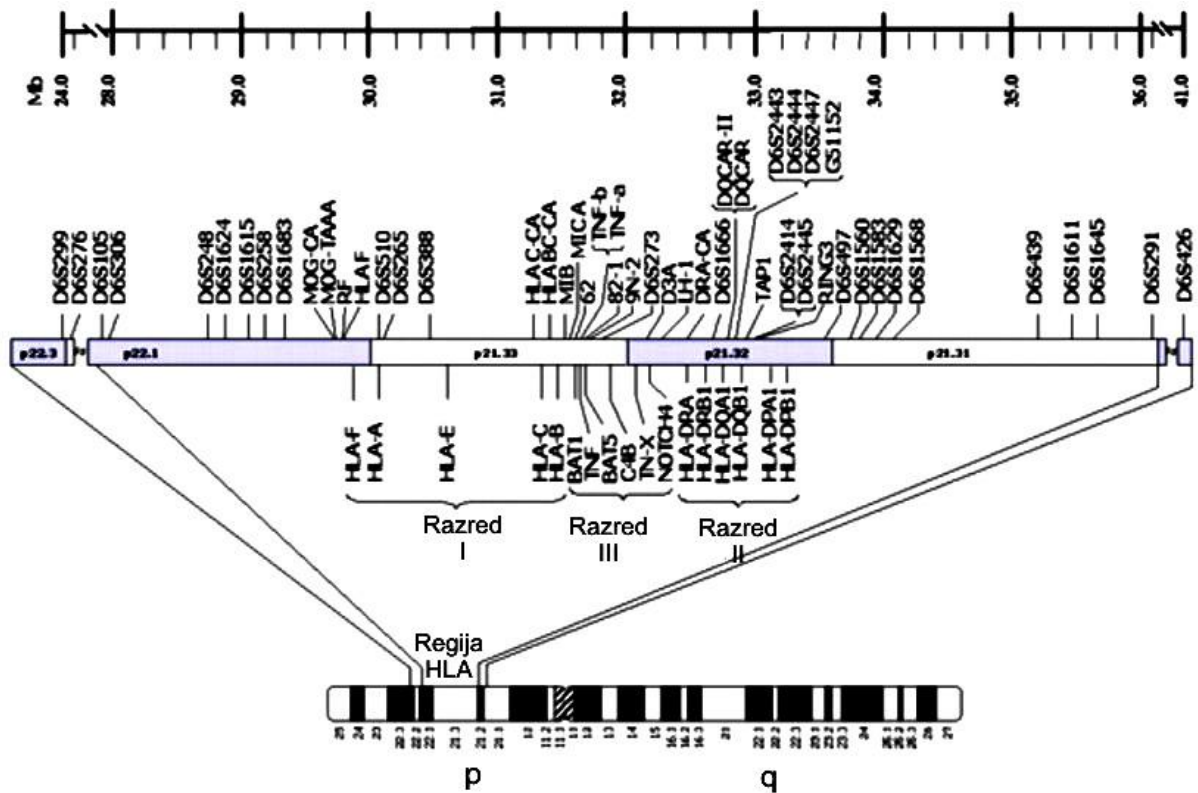


O ulozi mikrosatelita u eukariotskom genomu postoje dvije teorije. Prva teorija govori o funkcionalnoj ulozi ponavljajućih sljedova DNA, bilo neposredno u genskoj regulaciji ili kao tzv. "vruća mjesta" (*engl.* hot spots) rekombinacije. Prema toj teoriji, mikrosatelitska DNA je zadržana unutar genoma zato što svojim mutagenim potencijalom pojačava dugoročni evolucijski potencijal vrste (13). Protivnici ove teorije tvrde da su sva svojstva i funkcije koje se pripisuju ponavljajućim sljedovima DNA samo odgovor na njihovu prisutnost u genomu, tj. da su posljedica, a ne uzrok njenog nastanka i održavanja. Oni podupiru drugu hipotezu, hipotezu tzv. „sebične“ DNA (*engl.* selfish DNA) koja govori o održavanju ponavljajućih sljedova zbog sposobnosti umnažanja i širenja u genomu (14).

#### **1.4.1. Mikrosateliti HLA**

Unutar regije HLA do danas je otkriveno približno 350 mikrosatelita (slika 12). Regija HLA je jedan od najistraživanijih odsječaka humanog genoma, a posljednjih godina upravo je analiza mikrosatelita HLA najviše korištena u tu svrhu, bilo da se radi o populacijskim istraživanjima, ispitivanjima uloge gena HLA u transplantacijskoj medicini ili razjašnjenju njihove povezanosti s brojnim bolestima (15). Mikrosateliti, smješteni unutar regije HLA, su najvećim dijelom dinukleotidna ponavljanja i to u više od 60% slučajeva ponavljanja slijeda CA. Ovu skupinu mikrosatelita odlikuje visok stupanj raznovrsnosti s prosječno 9,5 alela na pojednom lokusu, srednjom vrijednošću polimorfnog informacijskog sadržaja (*engl.* Polymorphism Information Content - PIC) od 0,68 i srednjom vrijednošću razine heterozigotnosti od 0,71. Prosječna udaljenost između dva mikrosatelita unutar regije HLA iznosi 10 kb. Jedna od osobina regije HLA, kao što je već navedeno ranije, je velika neravnoteža udruživanja. Ta pojava je također razlog zbog kojih mikrosateliti HLA, obzirom na smještaj unutar regije HLA, pokazuju određene specifičnosti u odnosu na mikrosatelite non-HLA (lokusi koji nisu smješteni u regiji HLA), stoga su aleli nekih mikrosatelita sastavni dio haplotipova HLA (npr. HLA-A1-B8-DR3-MOGc146-TNFa2b3c1).

Na međusobnu povezanost mikrosatelita HLA utječe međusobna udaljenost te su stoga najjače povezani mikrosateliti unutar iste regije HLA.



Slika 12. Prikaz smještaja dijela mikrosatelita unutar regije HLA

#### 1.4.2. Primjena mikrosatelita HLA

Zbog relativne jednostavnosti određivanja alela mikrosatelita te njihove raznovrsnosti, mikrosateliti se danas koriste u raznim znanstvenim područjima: evolucijskoj i populacijskoj genetici, forenzičkoj medicini, povezanosti s raznim bolestima (hemokromatoza, reumatoidni artritis, šećerna bolest tip 1, psorijaza i druge spondiloartropatije), itd. Analiza mikrosatelita HLA u sklopu populacijskih i evolucijskih istraživanja može dati korisne informacije o filogeniji. Na primjer, istraživanje mikrosatelitskih lokusa koristi se za rasvjetljavanje evolucije velike raznovrsnosti gena HLA. Ipak, mikrosateliti smješteni unutar regije HLA našli su svoju najveću primjenu u istraživanjima povezanosti gena HLA s različitim bolestima. Ovakvom analizom moguće je dobiti čitav niz korisnih podataka: od preciznog mapiranja lokusa koji pridonosi podložnosti bolesti (hemokromatoza), određivanja ili isključivanja čimbenika unutar regija HLA za dodatnu genetsku podložnost ili zaštitu od bolesti (Bechet-ova bolest, multipla skleroza), preciznije razjašnjavanje uloge regije HLA u genetskoj podložnosti i patofiziologiji bolesti (reumatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus) (15).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Istražiti raznovrsnost pet mikrosatelita unutar regije HLA: D6S248, D6S2674, D6S2811, STR\_MICA, D6S273 u skupinama nesrodnih osoba pozitivnih za gen HLA-B\*27 (N=94).
2. Analizirati skupinu bolesnika s psorijatičnim artritismom (N=22) i juvenilnim spondiloartropatijama (N=29) za iste mikrosatelitske lokuse.
3. Usporediti učestalosti alela mikrosatelita HLA između grupa bolesnika (PsA i jSpA) s učestalošću u kontrolnoj skupini hrvatske populacije.
4. Odrediti pojedinačne haplotipove, odnosno haplotipske veze u sve tri istraživane skupine osoba pozitivnih za gen HLA-B\*27.
5. Otkriti postoje li razlike u produženim haplotipovima gena HLA-B\*27 između tri testirane skupine.
6. Usporediti dobivene rezultate s rezultatima drugih istraživanja u svijetu.

### **3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. ISPITANICI**

##### **3.1.1. Bolesnici s psorijatičnim artritisom (PsA)**

Ovo istraživanje obuhvatilo je skupinu od 58 bolesnika kojima je dijagnosticiran psorijatični artritis na Klinici za reumatologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC-Zagreb). Od 58 oboljelih, analiziralo se 22 osobe koje su bile pozitivne za gen HLA-B\*27.

Svi oboljeli imali su upalni artritis povezan sa psorijazom i nisu pokazivali druge reumatske poremećaje (tablica 5).

**Tablica 5. Osobine bolesnika s PsA**

Ukupan broj bolesnika (omjer M/Ž)	N=58 (28/30)
Bolesnici HLA-B27 pozitivni (omjer M/Ž)	N=22 (10/12)
Procjena godina (raspon godina)	52,4 (34-73)
<i>Dob početka razvoja bolesti (raspon godina):</i>	
Artritis	41,2 (23-50)
Psorijaza	33,8 (19-54)
<i>Trajanje bolesti (raspon mjeseci):</i>	
Artritis	8,7 (1-35)
Psorijaza	12,3 (1-53)

##### **3.1.2. Bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama (jSpA)**

Istraživanje je obuhvatilo i 74 bolesnika s jSpA koja su obrađena na dječjem odjelu za reumatologiju i imunologiju, Klinike za dječje bolesti Zagreb. Analiza je obuhvatila 29 osoba koja su bila pozitivna za gen HLA-B\*27 (tablica 6).

**Tablica 6. Osobine bolesnika s jSpA**

Ukupan broj bolesnika (omjer M/Ž)	N=74 (46/28)
Bolesnici HLA-B27 pozitivni (omjer M/Ž)	N=29 (18/11)
Dob početka razvoja bolesti (raspon godina)	11,6 (3-18)
Trajanje bolesti (raspon mjeseci)	29 (2-134)

Dijagnoza bolesti se temelji na kriterijima Europske spondiloartropatijske studijske grupe (*engl.* European Spondyloarthritis Study Group - ESSG).

### **3.1.3. Kontrolna skupina**

Kontrolna skupina sastojala se od 94 zdrave osobe pozitivne za gen HLA-B\*27. Sve osobe su prethodno bile tipizirane za gene HLA razreda I (A i B) metodom PCR-SSP (*engl.* Sequence Specific Primer) tj. lančanom reakcijom polimeraze i početnica specifičnih za određenu sekvencu.

## **3.2. MATERIJAL**

Svakom ispitaniku podvrgnutom postupku tipizacije tkiva HLA i mikrosatelita unutar regije HLA uzeto je 2 ml periferne krvi s EDTA kao antikoagulansom.

### 3.3. METODE











#### 3.3.1. Izolacija DNA

Iz 200  $\mu$ l krvi ispitanika izolirana je DNA pomoću komercijalnog kita za izolaciju DNA (Nucleospin, Macherey Nagel, Düren, Njemačka), slika 13. Metoda se temelji na uporabi kolumni sa silikatnom membranom koja specifično veže molekule DNA.

<b>SADRŽAJ KOMERCIJALNOG KITA ZA IZOLACIJU DNA IZ UZORAKA KRV</b>	
Pufer B1	
Reagens B2	
Pufer B5	
Pufer BW	
Pufer BE	
Pufer B3	
Proteinazni pufer	
Proteinaza K	
Nukleospin tubice	
Nukleospin kolumne	

**Slika 13.** *Kit za izolaciju DNA iz uzorka periferne krvi*

Postupak izolacije se vrši po danom protokolu („NucleoSpin® Blood“):

<b>1 Liza uzoraka krvi</b>		<b>200 µl krv</b> <b>25 µl prot. K</b> <b>200 µl B3</b>  <b>Mix</b>  <b>70°C</b> <b>10-15 min</b>
<b>2 Regulacija vezanja DNA</b>		<b>210 µl etanol</b>
<b>3 Vežanje DNA</b>	  	<b>unos uzorka u Nucleospin kolumne</b>   <b>1 min</b> <b>11,000 x g</b>
<b>4 Ispiranje silika membrane</b>   <b>1. ispiranje</b>  <b>2. ispiranje</b>	   	<b>500 µl BW</b>  <b>600 µl B5</b>  <b>1 min</b> <b>11,000 x g</b>  <b>1 min</b> <b>11,000 x g</b>
<b>5 Sušenje silika membrane</b>	  	<b>1 min</b> <b>11,000 x g</b>
<b>6 Elucija čistog DNA uzorka</b>	  	<b>100 µl BE</b> <b>(70°C)</b>  <b>RT</b> <b>1 min</b>  <b>1 min</b> <b>11,000 x g</b>

### 3.3.2. Određivanje alela mikrosatelitskih lokusa HLA

Osnovne osobine, položaj, broj alela kao i ponavljajući slijed za pet testiranih mikrosatelita HLA prikazani su u tablici 7. Mikrosateliti su u tablici poredani po njihovom položaju duž kromosoma 6 od telomernog kraja prema centromeri.

**Tablica 7. Obilježja analiziranih mikrosatelita (D6S248, D6S2674, D6S2811, STR\_MICA, D6S273)**

MIKROSATELITI	D6S248	D6S2674	D6S2811	STR_MICA	D6S273
<b>Dužina PCR produkta (pb)</b>	261-301	131-187	98-138	179-194	124-138
<b>Položaj</b>	između regija gena HLA-A i gena HLA-F	između regija gena HLA-B i gena HLA-C	centromerno od regije gena HLA-C	centromerno od regije gena HLA-B	u blizini regije gena TNF- $\alpha$ , gena TNF- $\beta$ , te gena BAT2 i gena MSH5
<b>Broj alela</b>	21	22	14	7	7
<b>Ponavljanje DNA</b>	(CA) <sub>n</sub>	(CA) <sub>n</sub>	(CA) <sub>n</sub> AA(CA) <sub>n</sub>	(GCT) <sub>n</sub>	(GT) <sub>n</sub>

Mikrosatelitski lokusi HLA analizirani su pomoću PCR-a i specifično, fluorescentno obilježenih početnica 5' i 3'. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 10  $\mu$ l, a komponente smjese prikazane su u tablici 8.



**Tablica 8. Reakcijska smjesa PCR-a**

<b>Reakcijska smjesa PCR-a za mikrosatelite</b>	
PCR pufer (10X)	1 $\mu$ l
Glicerol	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l
Početnica 5'	0,2 $\mu$ l (c=10 pmol/ $\mu$ l)
Početnica 3'	0,2 $\mu$ l (c=10 pmol/ $\mu$ l)
Deoksiribonukleozid-trifosfat (dNTP)	0,1 $\mu$ l (c=10 mM)
Taq polimeraza	0,1 $\mu$ l (c=5 U/ $\mu$ l)

U svaku reakcijsku smjesu dodan je uzorak DNA (2  $\mu$ l) te MgCl<sub>2</sub> koncentracije 25 mM čiji volumen ovisi o testiranom mikrosatelitu. Slijed nukleotida početnica i koncentracije MgCl<sub>2</sub> za svaki pojedini mikrosatelit prikazan je u tablici 9.

**Tablica 9. Početnice 5' i 3', te koncentracije MgCl<sub>2</sub> za testirane mikrosatelite HLA**

<b>LOKUS</b>	<b>POČETNICE</b>	<b>KONCENTRACIJA MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>
<b>D6S248</b>	5' TTGCAGTGAGCCGAGATCAA 3' 3' GACAATATCAAAAAGAACTGCCAAA 5'	2,5
<b>D6S2674</b>	5' CCTGAAACTTGGGCAATGAGTC 3' 3' CCAGGCAAAAGTCAAGCATATCTG 5'	2,5
<b>D6S2811</b>	5' TGGGCAATGAGTCCTATGAC 3' 3' TGCCATTTGGCCCTAAATGC 5'	1,5
<b>STR_MICA</b>	5' CCTTACCATCTCCAGAACTGC 3' 3' CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC 5'	2
<b>D6S273</b>	5' GCAACTTTTCTGTCAATCCA 3' 3' ACCAACTTCAAATTTTCGG 5'	3

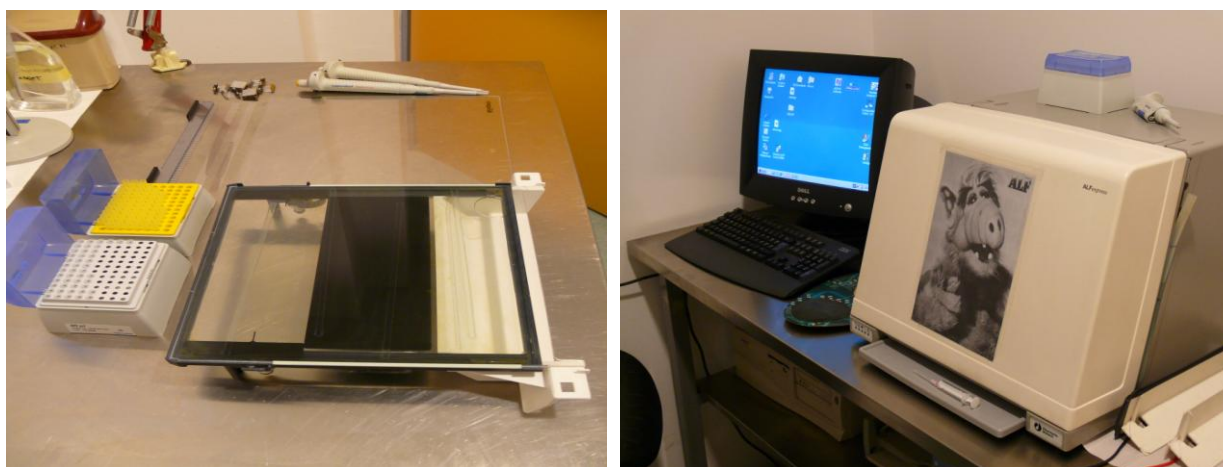
Uvjeti reakcije PCR za pojedini mikrosatelit HLA prikazani su u tablici 10.

**Tablica 10. Uvjeti reakcije PCR za umnažanje mikrosatelita HLA**

LOKUS	UVJETI REAKCIJE PCR
<b>D6S248</b> <b>D6S2674</b>	94°C – 8' 94°C – 30" ; 65°C – 30" ; 72°C – 30" → 5 ciklusa 94°C – 30" ; 60°C – 30" ; 72°C – 30" → 25 ciklusa 94°C – 30" ; 55°C – 1' ; 72°C – 2' → 5 ciklusa 72°C – 10'
<b>D6S2811</b>	95°C – 5' 94°C – 30" ; 60°C – 30" ; 72°C – 1' → 30 ciklusa 72°C – 10'
<b>STR_MICA</b>	94°C – 15" ; 55°C – 30" ; 72°C – 1' → 35 ciklusa
<b>D6S273</b>	94°C – 15" ; 59°C – 30" ; 72°C – 1' → 35 ciklusa

### 3.3.3. Elektroforeza

Umnoženi produkti metodom PCR analizirani su elektroforezom na 6%-tnom poliakrilamidnom gelu debljine 0,5 mm u automatskom sekvenceru (ALFexpress, Amersham Pharmacia, Uppsala, Švedska), slika 14.



**Slika 14. Automatski sekvencer (ALFexpress)**

### 3.3.3.1. Priprema gela i ploča za elektroforezu

**Materijal:** 10%-tna otopina amonijevog persulfata (APS), tetrametilendiamin (TEMED), gel-mix (urea, akrilamid/bisakrilamid otopina, ionski izmjenjivač, 10x TBE pufer (Tris-Borat-EDTA), destilirana voda) i destilirana voda.

#### **Postupak pripreme gela za elektroforezu:**

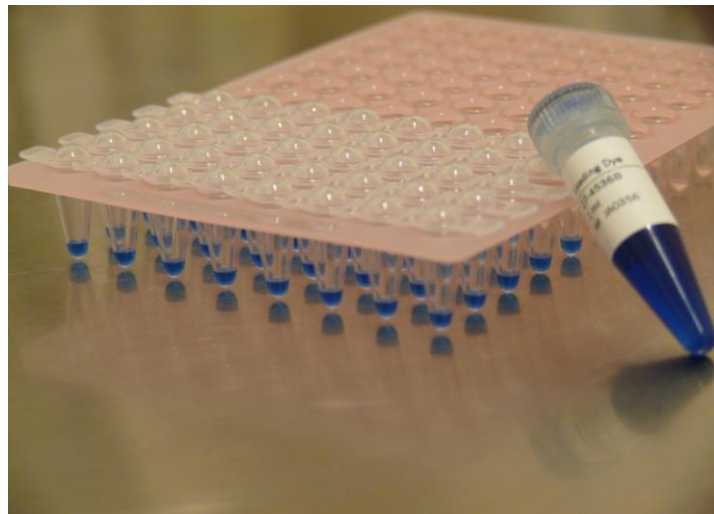
1. Smrznutu tubicu s 500  $\mu$ l APS-a ostavi se na sobnoj temperaturi da se odmrzne.
2. Gel-smjesa se prelije u plastičnu pumpicu.
3. U gel-smjesu se dodaje 500  $\mu$ l APS-a i 10  $\mu$ l TEMED-a, te pažljivo izmiješa.
4. Gel-smjesu se lagano i ravnomjerno izlijeva između ploča.
5. U slučaju da između ploča ostane mjehurić zraka, odstrani se plastičnom trakom.
6. Polimerizacija gel-smjese traje 1 h i 15 min.

#### **Postupak pripreme ploča za elektroforezu:**

1. Obje ploče se obrišu staničevinom s obje strane, prvo destiliranom vodom, zatim 96%-tnim etanolom, te ponovo destiliranom vodom. Na kraju treba ploče dobro posušiti.
2. U epruvetu od 15 ml pomiješa se 2 ml 96%-tnog etanola, 0,5 ml 10%-tne ledene octene kiseline i 7,5  $\mu$ l Bind-Silane-a. S tom otopinom obriše se vrh ploča u širini 5 cm. Premazuju se unutrašnje strane ploča, odnosno strane ploča koje će biti okrenute prema gelu.
3. Ponovno se obrišu unutrašnje strane ploča destiliranom vodom, 96%-tnim etanolom, te destiliranom vodom.
4. Postave se razmaknice (*engl.* spacer) na bočne strane termo ploče. Razmaknice se prethodno obrišu 96%-tnim etanolom.
5. Obje ploče se poklope (između su razmaknice), te se pričvrste kvačicama pri čemu se vodi računa da niti jedna kvačica ne pokrije prostor gdje će prolaziti zraka lasera tijekom elektroforeze.
6. Postavi se češalj za jažice, te pomoću libele provjeri da li su ploče u ravnini.

**NAPOMENA:** Postupci se provode u laminaru, koristeći rukavice zbog hlapljivog i otrovnog Bind-Silane-a i TEMED-a te kancerogene gel-smjese.

Produkti reakcije PCR (2  $\mu$ l) su prije elektroforeze pomiješani s puferom u koji je dodana boja (slika 15), te standardima, odnosno fragmentima DNA poznate duljine (3,5  $\mu$ l). Uz te unutarnje standarde, na svakom gelu je bio uključen i vanjski standard. Prilikom analize mikrosatelita HLA (STR\_MICA i D6S273) vanjski standardi bili su aleli testiranog mikrosatelita umnoženi iz DNA izolirane iz B staničnih linija korištenih tijekom 10. IHW-a (*engl.* International Histocompatibility Workshop), dok se za ostale mikrosatelite HLA (D6S248, D6S2674 i D6S2811) koristio standard poznate duljine od 200 pb (Amersham Pharmacia, Uppsala, Švedska).



**Slika 15. Loading Dye – pufer s bojom**

Prije elektroforeze, priređeni uzorci denaturirani su 2 min na 94 °C, a zatim stavljeni na led do trenutka nanošenja na gel (nanosi se ~ 7,5 ml uzorka). Uvjeti elektroforeze bili su: 500 min; 1200 V; 40 mA; 50 W; 50 °C. Očitavanje alela provedeno je uz pomoć lasera koji pobuđuje fluorescenciju boje vezane za fragmente DNA te fotodetektora koji očitavaju fluorescenciju u trenutku kad fragment DNA prolazi kroz lasersku zraku.

Određivanje duljine fragmenata DNA provedeno je uz pomoć računalnog programa AlleleLocator (Amersham Pharmacia) koji na temelju vremena elektroforeze standarda poznate duljine, izračunava duljinu alela analiziranog mikrosatelita.

### 3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Podaci su analizirani statističkom obradom. Učestalost za svaki lokus određen je direktnim brojanjem, a osoba je smatrana homozigotom za analizirani lokus ukoliko je na njemu određen samo jedan alel. Učestalost pojedinog alela, odnosno njegov udio među svim alelima na ispitivanom lokusu, izračunat je prema formuli:

$$f_a = \frac{2(AA) + (Aa)}{2n}$$

$f_a$  - učestalost alela  $a$

$AA$  – broj homozigotnih genotipova

$Aa$  – broj heterozigotnih genotipova

$n$  – broj osoba u ispitivanom uzorku

Za usporedbu učestalosti mikrosatelita HLA između skupine ispitanika oboljelih od PsA i jSpA koristio se  $\chi^2$  test i Fischerov egzaktni test.

Omjer izgleda (OR) se računao po Woolfovoj formuli (Woolf, 1955), a izražava se kao omjer vjerojatnosti posjedovanja svojstva u izloženoj skupini i vjerojatnosti (izgleda posjedovanja svojstva) u neizloženoj skupini.

	FAKTOR		UKUPNO
	DA	NE	
BOLESNI	a	b	a + b
ZDRAVI	c	d	c + d
UKUPNO	a + c	b + d	a + b + c + d

$$OR = \frac{a/c}{b/d} = \frac{a \times d}{b \times c}$$

Vrijednost neravnoteže udruživanja izračunata je prema formuli:

$$LD = F_{ab} - f_a f_b$$

$F_{ab}$  – frekvencija haplotipova  $ab$  lokusa A i B

$f_a$  – učestalost alela  $a$  lokusa A

$f_b$  – učestalost alela  $b$  lokusa B

Povezanost pojedinih genetskih čimbenika procjenjena 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 ALELA NA MIKROSATELITSKIM LOKUSIMA HLA (D6S248, D6S2674, D6S2811, STR\_MICA, D6S273) U SKUPINI ZDRAVIH ISPITANIKA, BOLESNIKA S PSORIJATIČNIM ARTRITISOM I BOLESNIKA S JUVENILNIM SPONDILOARTROPATIJAMA U HRVATSKOJ POPULACIJI**

Uzorke zdravih nesrodnih ispitanika, bolesnika s PsA kao i bolesnika s jSpA pozitivnih za gen HLA-B\*27, analizirali smo za raspodjelu alela na pet mikrosatelitskih lokusa HLA (D6S248, D6S2674, D6S2811, STR\_MICA, D6S273).

Na lokusu D6S248 (tablica 11) uočili smo 22 različita alela dužine od 261 pb do 301 pb, u sve tri ispitivane skupine s najvećom učestalošću pojavljivao se alel D6S248-291 pb. U kontrolnoj skupini bio je prisutan s učestalošću od 27,2%, u bolesnika s PsA 32,5% dok je u skupini bolesnika s jSpA njegova učestalost iznosila 34,0%. Iz tablice 11 možemo vidjeti da je i alel D6S248-267 pb također bio visoko zastupljen u sve tri istraživane skupine (> 15,0%). Učestalost svih ostalih alela bila je  $\leq 10,0\%$ . Povišena učestalosti alela D6S248-285 pb (10,0%) među bolesnicima s PsA u usporedbi sa skupinom zdravih ispitanika (2,7%) i sa skupinom bolesnika s jSpA (4,0%) nije bila statistički značajna ( $P=0,0507$  i  $P=0,3830$ ). U sve testirane skupine nismo uočili slijedeće alele: D6S248-271 pb, D6S248-281 pb i D6S248-299 pb.

Analiza raspodjele alela na lokusu D6S2674 (tablica 12) pokazala je da se radi o mikrosatelitu HLA s razmjerno velikim brojem alela (ukupan broj alela je 30). Međutim, uvijek je jedan alel ovog lokusa dominantan. U sve tri istraživane skupine dominirao je alel D6S2674-131 pb, učestalost u skupini zdravih ispitanika iznosila je 42,1%, među bolesnicima s PsA bila je 47,5%, dok je zastupljenost u skupini bolesnika s jSpA iznosila 24,0% sa statistički značajnom razlikom u usporedbi s kontrolom ( $P=0,0312$ ). Zanimljivo je uočiti i da u sve tri skupine ispitanika za lokus D6S2674 postoji vrlo mala učestalost ostalih alela (< 10,0%), osim za alel D6S2674-163 pb koji je bio zastupljen s 11,9% među kontrolnim ispitanicima. Ovaj alel nije imao niti jedan bolesnik s PsA i ta razlika u zastupljenosti između ove dvije skupine nije statistički značajna ( $P=1,0000$ ). Međutim, treba reći da je unutar grupe bolesnika s PsA uočen najmanji broj ( $n=6$ ) različitih alela lokusa D6S2674.

**Tablica 11. Raspodjela alela na lokusu D6S248 u tri ispitivane skupine**

<b>D6S248</b>						
<b>Alel (pb)</b>	<b>Kontrola (N=92)</b>		<b>PsA (N=20)</b>		<b>jSpA (N=25)</b>	
	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>
<b>261</b>	3	1,63	-	-	-	-
<b>263</b>	6	3,26	2	5,00	2	4,00
<b>265</b>	1	0,54	2	5,00	-	-
<b>267</b>	36	19,57	8	20,00	8	16,00
<b>269</b>	4	2,17	-	-	-	-
<b>271</b>	-	-	-	-	-	-
<b>273</b>	9	4,89	-	-	2	4,00
<b>275</b>	-	-	-	-	2	4,00
<b>277</b>	11	5,98	4	10,00	3	6,00
<b>279</b>	2	1,09	-	-	2	4,00
<b>281</b>	-	-	-	-	-	-
<b>283</b>	-	-	2	5,00	-	-
<b>285</b>	5	2,72	4	10,00	2	4,00
<b>287</b>	10	5,43	-	-	4	8,00
<b>289</b>	4	2,17	1	2,50	1	2,00
<b>291</b>	50	27,17	13	32,50	17	34,00
<b>293</b>	10	5,43	1	2,50	1	2,00
<b>295</b>	8	4,35	-	-	-	-
<b>297</b>	4	2,17	-	-	1	2,00
<b>299</b>	-	-	-	-	-	-
<b>301</b>	-	-	-	-	1	2,00
<b>ND</b>	21	11,41	3	7,50	4	8,00
<b>SUMA</b>	<b>184</b>		<b>40</b>		<b>50</b>	

*Legenda: n – broj uočenih alela; PsA – bolesnici s psorijatičnim artritismom; jSpA – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama; ND – nedefinirani aleli*

**Tablica 12. Raspodjela alela na lokusu D6S2674 u tri ispitivane skupine**

<b>D6S2674</b>						
<b>Alel (pb)</b>	<b>Kontrola (N=88)</b>		<b>PsA (N=20)</b>		<b>jSpA (N=25)</b>	
	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>
<b>131</b>	74	42,05	19	47,50	12	24,00
<b>133</b>	2	1,14	-	-	1	2,00
<b>135</b>	-	-	-	-	2	4,00
<b>137</b>	1	0,57	3	7,50	1	2,00
<b>139</b>	2	1,14	-	-	1	2,00
<b>141</b>	3	1,70	-	-	2	4,00
<b>143</b>	5	2,84	1	2,50	2	4,00
<b>145</b>	2	1,14	-	-	1	2,00
<b>147</b>	5	2,84	1	2,50	2	4,00
<b>149</b>	3	1,70	-	-	-	-
<b>151</b>	9	5,11	-	-	2	4,00
<b>153</b>	5	2,84	-	-	3	6,00
<b>155</b>	1	0,57	-	-	-	-
<b>157</b>	4	2,27	-	-	1	2,00
<b>159</b>	3	1,70	-	-	-	-
<b>161</b>	9	5,11	-	-	1	2,00
<b>163</b>	21	11,93	-	-	4	8,00
<b>165</b>	8	4,55	1	2,50	-	-
<b>167</b>	6	3,41	-	-	1	2,00
<b>169</b>	2	1,14	-	-	1	2,00
<b>173</b>	1	0,57	-	-	-	-
<b>177</b>	-	-	-	-	1	2,00
<b>187</b>	1	0,57	-	-	-	-
<b>ND</b>	9	5,11	15	37,50	12	24,00
<b>SUMA</b>	<b>176</b>		<b>40</b>		<b>50</b>	

*Legenda: n – broj uočenih alela; PsA – bolesnici s psorijatičnim artritidom; jSpA – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama; ND – nedefinirani aleli*



Aleli koje nismo otkrili u niti jednoj od testiranih grupa su: D6S2674-171 pb, D6S2674-175 pb, D6S2674-179 pb, D6S2674-181 pb, D6S2674-183 pb i D6S2674-185 pb (nisu ni prikazani u tablici 12).

Na lokusu D6S2811 uočili smo 18 od 21 različitih, do danas poznatih alela dužine od 98 pb do 138 pb. Aleli koji nisu uočeni ovim istraživanjem ni kod jednog ispitanika u sve tri skupine su: D6S2811-102 pb, D6S2811-132 pb, D6S2811-138 pb (tablica 13).

**Tablica 13. Raspodjela alela na lokusu D6S2811 u tri ispitivane skupine**

<b>D6S2811</b>						
<b>Alel (pb)</b>	<b>Kontrola (N=93)</b>		<b>PsA (N=19)</b>		<b>jSpA (N=25)</b>	
	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>
<b>98</b>	78	41,94	18	47,37	17	34,00
<b>100</b>	2	1,08	-	-	-	-
<b>104</b>	2	1,08	-	-	2	4,00
<b>106</b>	1	0,54	-	-	-	-
<b>108</b>	9	4,84	1	2,63	4	8,00
<b>110</b>	4	2,15	1	2,63	-	-
<b>112</b>	3	1,61	1	2,63	2	4,00
<b>114</b>	4	2,15	-	-	1	2,00
<b>116</b>	9	4,84	-	-	3	6,00
<b>118</b>	4	2,15	-	-	2	4,00
<b>120</b>	6	3,23	1	2,63	-	-
<b>122</b>	1	0,54	2	5,26	-	-
<b>124</b>	2	1,08	-	-	-	-
<b>126</b>	28	15,05	2	5,26	6	12,00
<b>128</b>	11	5,91	1	2,63	5	10,00
<b>130</b>	8	4,30	2	5,26	-	-
<b>134</b>	1	0,54	-	-	-	-
<b>136</b>	1	0,54	-	-	1	2
<b>ND</b>	12	6,45	9	23,68	7	14,00
<b>SUMA</b>	<b>186</b>		<b>38</b>		<b>50</b>	

*Legenda: n – broj uočenih alela; PsA – bolesnici s psorijatičnim artritisom; jSpA – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama; ND – nedefinirani aleli*

Najčešći alel bio je alel D6S2811-98 pb i to s visokom učestalošću od 41,9% među zdravim ispitanicima, 47,4% među bolesnicima s PsA te 34,0% među bolesnicima s jSpA. Zastupljenost ostalih alela na lokusu D6S2811 bila je ujednačeno niska te varira od 1% do 15%. Smanjena učestalost alela D6S2811-126 pb u skupini bolesnika s PsA (5,3%) u usporedbi s kontrolom (15,1%) i skupinom s jSpA (12,0%) nije statistički značajna ( $P=0,0939$  i  $P=0,2320$ ).

Raspodjelu alela na lokusu STR\_MICA nismo mogli pratiti među bolesnicima s PsA iz tehničkih razloga. Iz rezultata prikazanih u tablici 14 vidljivo je da se na lokusu STR\_MICA u kontrolnoj skupini, kao i u grupi bolesnika s jSpA, najčešće pojavljivao alel STR\_MICA-A4 (39,2% odnosno 50,0%). Visoku zastupljenost u kontrolnoj skupini ispitanika pokazao je i alel STR\_MICA-A5.1 (31,7%), dok je u skupini bolesnika s jSpA njegova učestalost iznosila samo 13,8%, ta razlika u zastupljenosti je statistički značajna ( $P=0,0016$ ). S druge strane, alel STR\_MICA-A9 pokazao je povećanu učestalost u skupini bolesnika s jSpA (12,17%) u odnosu na kontrolnu skupinu (3,8%) ( $P=0,0475$ ).

**Tablica 14. Raspodjela alela na lokusu STR\_MICA u dvije ispitivane skupine**

STR_MICA				
Alel	Kontrola (N=79)		jSpA (N=29)	
	n	učestalost alela (%)	n	učestalost alela (%)
<b>4</b>	62	39,24	29	50,00
<b>5</b>	12	7,59	5	8,62
<b>5.1</b>	50	31,65	8	13,79
<b>6</b>	10	6,33	4	6,90
<b>9</b>	6	3,80	7	12,07
<b>ND</b>	18	11,39	5	8,62
<b>SUMA</b>	<b>158</b>		<b>58</b>	

Legenda: **n** – broj uočenih alela; **jSpA** – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama; **ND** – nedefinirani aleli; nomenklatura mikrosatelita STR\_MICA: **4** - 179 pb; **5** - 182 pb; **5.1** - 183 pb; **6** - 185 pb; **9** - 194 pb

Raspodjela alela na lokusu D6S273 prikazana je u tablici 15. Najčešći alel D6S273 u skupini zdravih osoba bio je alel D6S273-4 (32,1%), kao i među bolesnicima s jSpA (34,5%), dok je među bolesnicima s PsA najzastupljeniji bio alel D6S273-5 (34,2%). Smanjena zastupljenost alela D6S273-4 u skupini bolesnika s PsA u usporedbi s kontrolnom skupinom je bila statistički značajna ( $P=0,0180$ ), kao i u usporedbi sa skupinom bolesnika s jSpA ( $P=0,0247$ ). Treba istaknuti da je među bolesnicima s PsA uočena povećana učestalost alela D6S273-3 (21,1%) u usporedbi s kontrolom (4,9%) pokazala statistički značajnu razliku ( $P=0,0013$ ). Treba spomenuti i da je kod jednog bolesnika s psorijatičnim artritismom uočen alel D6S273-124 pb koji je kraći od najkraćeg poznatog alela ovog lokusa, alela D6S273-1 (126 pb).

**Tablica 15. Raspodjela alela na lokusu D6S273 u tri ispitivane skupine**

<b>D6S273</b>						
<b>Alel</b>	<b>Kontrola (N=92)</b>		<b>PsA (N=19)</b>		<b>jSpA (N=29)</b>	
	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>	<b>n</b>	<b>učestalost alela (%)</b>
<b>1</b>	3	1,63	-	-	3	5,17
<b>2</b>	3	1,63	2	5,26	-	-
<b>3</b>	9	4,89	8	21,05	7	12,07
<b>4</b>	59	32,07	6	15,79	20	34,48
<b>5</b>	50	27,17	13	34,21	18	31,03
<b>6</b>	4	2,17	1	2,63	1	1,72
<b>7</b>	8	4,35	1	2,63	2	3,45
<b>124 pb</b>	-	-	1	2,63	-	-
<b>ND</b>	48	26,09	6	15,79	7	12,07
<b>SUMA</b>	<b>184</b>		<b>38</b>		<b>58</b>	

*Legenda: n – broj uočenih alela; PsA – bolesnici s psorijatičnim artritismom; jSpA – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama; ND – nedefinirani aleli; nomenklatura mikrosatelita D6S273: 1 – 126 pb; 2 – 128 pb; 3 – 130 pb; 4 – 132 pb; 5 – 134 pb; 6 – 136 pb; 7 – 198 pb*

## 4.2. ANALIZA PRODUŽENIH HAPLOTIPSKIH VEZA GENA HLA-B\*27 U TRI ISPITIVANE SKUPINE U HRVATSKOJ POPULACIJI

Naredni cilj ovog rada bio je analizirati produžene haplotipske veze gena HLA-B\*27 u sve tri ispitivane skupine (kontrolna skupina, bolesnici s PsA i bolesnici s jSpA). Koristimo pojam haplotipska veza, a ne haplotip, jer su istraživanjem bili obuhvaćeni nesrodni pojedinci. Naime, jedino kada imamo obitelj možemo pratiti segregaciju alela mikrosatelita HLA i gena HLA, te odrediti haplotipove HLA.

Analiza haplotipske veze gena HLA-B\*27 i alela na lokusu D6S248 pokazala je najveću učestalost kombinacije HLA-B\*27/D6S248-267 (tablica 16). Ova haplotipska veza pojavila se s najvećom učestalošću u kontrolnoj skupini (31,5%) u usporedbi sa skupinom bolesnika s PsA (20,0%) i bolesnika s jSpA (12,0%) što nije statistički značajna razlika ( $P=0,4199$ , odnosno  $P=2,852$ ). S druge strane haplotipska veza HLA-B\*27/D6S248-291 pokazala je najveću učestalost među bolesnicima s jSpA (48,0%) što u usporedbi s bolesnicima s PsA nije statistički značajno različito (40,0%;  $P=0,1910$ ), ali u usporedbi sa zdravim ispitanicima (22,8%) razlika je statistički značajna ( $P=0,0258$ ).

**Tablica 16.** Učestalost haplotipskih veza HLA-B27/D6S248 u tri ispitivane skupine u hrvatskoj populaciji

Haplotipska veza <i>HLA-B/D6S248</i>	Kontrola (N=92)		PsA (N=20)		jSpA (N=25)	
	n	%	n	%	n	%
<b>B*27/D6S248-267</b>	29	31,52	4	20,00	3	12,00
<b>B*27/D6S248-291</b>	21	22,83	8	40,00	12	48,00

*Legenda: n - broj uočenih osoba pozitivnih za praćene alele; PsA – bolesnici s psorijatičnim artritisom; jSpA – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama*

Za haplotipsku vezu HLA-B\*27/D6S2674-131 iz tablice 17 je vidljivo da se pojavljuje s približno jednakom zastupljenošću u skupini zdravih ispitanika (61,4%) i skupini bolesnika s PsA (50,0%). Međutim, unutar skupine bolesnika s jSpA ova kombinacija je statistički značajno manje zastupljena nego među kontrolnim osobama (20,0%;  $P=0,0003$ ). Usporedba sa skupinom bolesnika s PsA ne pokazuje statistički značajnu razliku ( $P=0,4955$ ). S druge strane, u sve tri testirane skupine broj osoba negativnih za ovu kombinaciju alela bio je približno jednak i kretao se između 40% i 70%. Za drugu haplotipsku vezu HLA-

B\*27/D6S2674-163 vidljivo je da nije zastupljena u skupini bolesnika s PsA, dok je zastupljenost te haplotipske veze u kontrolnoj skupini 12,5%, a u skupini bolesnika s jSpA 4,0% što nije statistički značajna razlika (P= 0,2955).

**Tablica 17. Učestalost haplotipskih veza HLA-B27/D6S2674 u tri ispitivane skupine u hrvatskoj populaciji**

Haplotipska veza <i>HLA-B/D6S2674</i>	Kontrola (N=88)		PsA (N=20)		jSpA (N=25)	
	n	%	n	%	n	%
<b>B*27/D6S2674-131</b>	54	61,36	10	50,00	5	20,00
<b>B*27/D6S2674-163</b>	11	12,50	-	-	1	4,00

*Legenda: n - broj uočenih osoba pozitivnih za praćene alele; PsA – bolesnici s psorijatičnim artritisom; jSpA – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama*

U tablici 18 prikazana je raspodjela haplotipske veze HLA-B\*27/D6S2811-98 u sve tri ispitivane skupine. Visoka učestalost haplotipske veze HLA-B\*27/D6S2811-98 u kontrolnoj skupini (62,4%) u usporedbi s njenom zastupljenošću među bolesnicima s PsA (47,4%) nije bila statistički značajno različita (P=0,3379), dok je razlika u usporedbi s njenom zastupljenošću unutar skupine bolesnika s jSpA (28,0%) bila statistički značajna (P=0,0045). Haplotipska veza HLA-B\*27/D6S2811-126 nije pronađena kod bolesnika s PsA, dok kod kontrolne skupine je zastupljena s malom učestalošću (11,8%), kao i kod skupine bolesnika s jSpA (8,0%). Takva razlika nije statistički značajna (P= 0,7329).

**Tablica 18. Učestalost haplotipskih veza HLA-B27/D6S2811 u tri ispitivane skupine u hrvatskoj populaciji**

Haplotipska veza <i>HLA-B/D6S2811</i>	Kontrola (N=93)		PsA (N=19)		jSpA (N=25)	
	n	%	n	%	n	%
<b>B*27/D6S2811-98</b>	58	62,36	9	47,37	7	28,00
<b>B*27/D6S2811-126</b>	11	11,83	-	-	2	8,00

*Legenda: n - broj uočenih osoba pozitivnih za praćene alele; PsA – bolesnici s psorijatičnim artritisom; jSpA – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama*

Analiza haplotipske veze HLA-B/STR\_MICA pokazala je da se gen HLA-B\*27 najčešće javlja u kombinaciji s alelom STR\_MICA-A4 (tablica 19). S obzirom da bolesnici s PsA nisu bili testirani za alele mikrosatelita STR\_MICA, nisu mogli biti analizirani za ove haplotipske veze. Haplotipska veza HLA-B\*27/STR\_MICA-A4 pokazala je učestalost od 54,4% u kontrolnoj skupini, odnosno 38,0% u skupini bolesnika s jSpA, a razlika ne pokazuje statističku značajnost ( $P=0,1927$ ). Haplotipska veza HLA-B\*27/STR\_MICA-A5.1 bila je podjednako zastupljena i u kontroli (26,6%) i u skupini bolesnika s jSpA (27,6%).

**Tablica 19. Učestalost haplotipskih veza HLA-B27/STR\_MICA u kontrolnoj skupini i skupini bolesnika s jSpA u hrvatskoj populaciji**

Haplotipska veza <i>HLA-B/STR_MICA</i>	Kontrola (N=79)		jSpA (N=29)	
	n	%	n	%
<b>B*27/STR_MICA-A4</b>	43	54,43	11	37,93
<b>B*27/STR_MICA-A5.1</b>	21	26,58	8	27,59

*Legenda: n - broj uočenih osoba pozitivnih za praćene alele; jSpA – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama*

U slučaju haplotipske veze HLA-B/D6S273 najveća učestalost je uočena za kombinaciju HLA-B\*27/D6S273-4 (tablica 20). Haplotipska veza HLA-B\*27/D6S273-4 je bila zastupljena s 40,2% u kontrolnoj skupini, s 34,5% među bolesnicima s jSpA, te 10,5% među bolesnicima s PsA. Usporedba učestalosti ove haplotipske veze između bolesnika s PsA i kontrole statistički je značajno različita ( $P=0,0164$ ). Haplotipska veza HLA-B\*27/D6S273-5 uočena je također kod sve tri ispitivane skupine, s učestalošću od 25,0% u kontrolnoj skupini, 36,8% u skupini bolesnika s PsA i 27,6% u skupini bolesnika s jSpA. Usporedba obje skupine bolesnika s kontrolnom skupinom ne pokazuje statistički značajnu razliku ( $P=0,4387$ , odnosno  $P=0,9727$ ).

Produžena haplotipska veza HLA-B\*27/D6S248-267/D6S2674-131 pojavljuje se s približno jednakom zastupljenošću (tablica 21) unutar kontrolne skupine (22,3%) i skupine bolesnika s PsA (18,2%), dok je ta zastupljenost nešto manja kod bolesnika s jSpA (6,9%), a razlike nisu statistički značajne ( $P=0,7801$ , odnosno  $P=0,0993$ ).

**Tablica 20. Učestalost haplotipskih veza HLA-B27/D6S273 u tri ispitivane skupine u hrvatskoj populaciji**

Haplotipska veza	Kontrola (N=92)		PsA (N=19)		jSpA (N=29)	
	n	%	n	%	n	%
<b>HLA-B/D6S273</b>						
<b>B*27/D6S273-4</b>	37	40,21	2	10,53	10	34,48
<b>B*27/D6S273-5</b>	23	25,00	7	36,84	8	27,59

Legenda: **n** - broj uočenih osoba pozitivnih za praćene alele; **PsA** – bolesnici s psorijatičnim artritisom; **jSpA** – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama

Za produženu haplotipsku vezu HLA-B\*27/D6S248-291/D6S2674-131 vidljivo je da se unutar kontrolne skupine kao i skupine bolesnika s PsA pojavljuje s manjom zastupljenošću (<11,0%) također bez statističke značajnosti (P=0,6874), dok u skupini bolesnika s jSpA nije pronađena niti jedna haplotipska veza.

**Tablica 21. Analiza produženih haplotipskih veza HLA-B\*27/D6S248/D6S2674 u tri ispitivane skupine u hrvatskoj populaciji**

Haplotipska veza	Kontrola (N=94)		PsA (N=22)		jSpA (N=29)	
	n	%	n	%	n	%
<b>HLA-B*27/D6S248/D6S2674</b>						
<b>B*27/D6S248-267/D6S2674-131</b>	21	22,34	4	18,18	2	6,90
<b>B*27/D6S248-291/D6S2674-131</b>	10	10,64	1	4,55	-	-

Legenda: **n** - broj uočenih osoba pozitivnih za praćene alele; **PsA** – bolesnici s psorijatičnim artritisom; **jSpA** – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama

Analiza produžene haplotipske veze gena HLA-B\*27 i alela na lokusima D6S248, D6S2674 i D6S2811 (tablica 22) pokazala je najveću učestalost kombinacije HLA-B\*27/D6S248-267/D6S2674-131/D6S2811-98 u kontrolnoj skupini (21,3%) u usporedbi sa skupinom bolesnika s PsA (18,2%) i bolesnika s jSpA (6,9%) što ne pokazuje statistički značajnu razliku (P=1,0000, odnosno P=0,0985). Produžena haplotipska veza HLA-B\*27/D6S248-291/D6S2674-131/D6S2811-98 zastupljena je samo kod 10,6% osoba kontrolne skupine i 4,6% osoba oboljelih od PsA, razlika nije statistički značajna (P= 0,6874).

**Tablica 22. Analiza produženih haplotipskih veza HLA-B\*27/D6S248/D6S2674/D6S2811 u tri ispitivane skupine u hrvatskoj populaciji**

Haplotipska veza <i>HLA-B*27/D6S248/D6S2674/D6S2811</i>	Kontrola (N=94)		PsA (N=22)		jSpA (N=29)	
	n	%	n	%	n	%
<b>B*27/D6S248-267/D6S2674-131/D6S2811-98</b>	20	21,28	4	18,18	2	6,90
<b>B*27/D6S248-291/D6S2674-131/D6S2811-98</b>	10	10,64	1	4,55	-	-

*Legenda: n - broj uočenih osoba pozitivnih za praćene alele; PsA – bolesnici s psorijatičnim artritisom; jSpA – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama*

Za produženu haplotipsku vezu HLA-B\*27/D6S248-267/D6S2674-131/D6S2811-98/STR\_MICA-A4 iz tablice 23 je vidljivo da se s najvećom učestalošću pojavljuje u kontrolnoj skupini (12,8%), dok se ostale kombinacije produžene haplotipske veze unutar iste skupine ispitanika pojavljuju s puno manjom učestalošću (3-6%) što nije statistički značajno ( $P=0,5160$ ). Analiza produžene haplotipske veze u skupini bolesnika s jSpA pokazuje da od četiri moguće kombinacije pojavljuje samo HLA-B\*27/D6S248-267/D6S2674-131/D6S2811-98/STR\_MICA-A4 s zastupljenošću od 6,9%. Kao što je već prethodno navedeno, obzirom da bolesnici s PsA nisu bili testirani za alele mikrosatelita STR\_MICA, nisu se mogle odrediti produžene haplotipske veze koja uključuje i lokus STR\_MICA za tu skupinu ispitanika.

**Tablica 23. Analiza produženih haplotipskih veza HLA-B\*27/D6S248/D6S2674/D6S2811/STR\_MICA u kontrolnoj skupini i skupini bolesnika s jSpA u Hrvatskoj**

Haplotipska veza <i>HLA-B*27/D6S248/D6S2674/D6S2811/STR_MICA</i>	Kontrola (N=94)		jSpA (N=29)	
	n	%	n	%
<b>B*27/D6S248-267/D6S2674-131/D6S2811-98/STR_MICA-A4</b>	12	12,77	2	6,90
<b>B*27/D6S248-291/D6S2674-131/D6S2811-98/STR_MICA-A4</b>	4	4,26	-	-
<b>B*27/D6S248-267/D6S2674-131/D6S2811-98/STR_MICA-A5.1</b>	3	3,20	-	-
<b>B*27/D6S248-291/D6S2674-131/D6S2811-98/STR_MICA-A5.1</b>	5	5,32	-	-

*Legenda: n - broj uočenih osoba pozitivnih za praćene alele; jSpA – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama*



Kod produženih haplotipskih veza koje obuhvaćaju sve testirane lokuse HLA, može se uočiti vrlo mala zastupljenost unutar sve tri ispitivane skupine (tablica 24). Produžena haplotipska veza B\*27/D6S248-267/D6S2674-131/D6S2811-98/STR\_MICA-A4/D6S273-4 javlja se u 6,4% zdravih i 3,5% bolesnika s jSpA ( $P > 0,05$ ).

**Tablica 24. Analiza produženih haplotipskih veza HLA-B\*27/D6S248/D6S2674/D6S2811/STR\_MICA/D6S273 u kontrolnoj skupini i skupini bolesnika s jSpA u hrvatskoj populaciji**

Haplotipska veza <i>HLA-B*27/D6S248/D6S2674/D6S2811/STR_MICA/D6S273</i>	Kontrola (N=94)		jSpA (N=29)	
	n	%	n	%
<b>B*27/D6S248-267/D6S2674-131/D6S2811-98/STR_MICA-A4/D6S273-4</b>	6	6,38	1	3,45
<b>B*27/D6S248-291/D6S2674-131/D6S2811-98/STR_MICA-A4/D6S273-4</b>	4	4,26	-	-
<b>B*27/D6S248-267/D6S2674-131/D6S2811-98/STR_MICA-A5.1/D6S273-4</b>	3	3,20	-	-

*Legenda: n - broj uočenih osoba pozitivnih za praćene alele; jSpA – bolesnici s juvenilnim spondiloartropatijama*

Tablica 25 prikazuje analizu produženih haplotipskih veza skupine bolesnika s PsA između gena HLA-B\*27 i alela na lokusu D6S248, D6S2674, D6S2811 i D6S273. Samo jedan bolesnik s PsA imao je produženu haplotipsku vezu HLA-B\*27/D6S248-267/D6S2674-131/D6S2811-98/D6S273-4, a usporedba s kontrolom (11,7%) ne pokazuje statistički značajnu razliku ( $P = 0,4582$ ).

**Tablica 25. Analiza produženih haplotipskih veza HLA-B\*27/D6S248/D6S2674/D6S2811/D6S273 u kontrolnoj skupini i skupini bolesnika s PsA u hrvatskoj populaciji**

Haplotipska veza <i>HLA-B*27/D6S248/D6S2674/D6S2811/D6S273</i>	Kontrola (N=94)		PsA (N=22)	
	n	%	n	%
<b>B*27/D6S248-267/D6S2674-131/D6S2811-98/D6S273-4</b>	11	11,70	1	4,55
<b>B*27/D6S248-291/D6S2674-131/D6S2811-98/D6S273-4</b>	6	6,38	-	-

*Legenda: n - broj uočenih osoba pozitivnih za praćene alele; PsA – bolesnici s psorijatičnim artritismom*

## **5. RASPRAVA**

Cilj ovog rada bio je istražiti raznovrsnost produženih haplotipova gena HLA-B\*27 među bolesnicima sa spondiloartropatijama, točnije među bolesnicima s psorijatičnim artritisom i juvenilnim spondiloartropatijama u Hrvatskoj, usporediti dobivene rezultate s rezultatima za zdrave kontrolne ispitanike, kao i usporediti dobivene rezultate s rezultatima iz literature.

Mikrosatelitski lokusi HLA uključeni u ovo istraživanje bili su: D6S248, D6S2674, D6S2811, STR\_MICA i D6S273, a naglasak je stavljen na utvrđivanje odnosa između mikrosatelita u blizini lokusa HLA-B. Drugim riječima, uz pomoć analize mikrosatelita koji su smješteni unutar regije HLA, pokušalo se utvrditi postoje li još neki dijelovi regije HLA, osim samog lokusa HLA-B i samog gena HLA-B\*27, koji igraju ulogu u etiopatogenezi spondiloartropatija. Naime, opće je poznato da prisutnost alela HLA-B\*27 povećava rizik da se kod nositelja tog alela bolest i pojavi.

Od analiziranih mikrosatelita HLA koji se nalaze se u nesporednoj blizini lokusa HLA-B prvi istraživani lokus bio je D6S248, koji je smješten između gena HLA-A i gena HLA-F. Od 22 različita alela dužine od 261 pb do 301 pb, najveću učestalost pokazao je alel D6S248-291 pb kod sve tri ispitivane skupine što ukazuje da taj alel nije različit među bolesnicima i zdravim osobama, tj. da nije podložan ni za psorijatični artritis ni juvenile spondiloartropatije. Među našim ispitanicima aleli: D6S248-271 pb, D6S248-281 pb i D6S248-299 pb nisu bili uočeni niti u jednoj od tri skupine ispitanika.

Sljedeći analizirani lokus D6S2674 smješten je između regije gena HLA-B i gena HLA-Cw, riječ je o mikrosatelitu HLA s razmjerno velikim brojem alela. U sve tri istraživane skupine dominirao je alel D6S2674-131 pb, s najvećom učestalošću kod osoba oboljelih od PsA, dok je ta učestalost kod osoba s jSpA manja za 20%, što je statistički značajna razlika i na temelju toga možemo pretpostaviti kako se radi o zaštitnom alelu za jSpA. Međutim, s obzirom na mali uzorak ispitanika s PsA i jSpA za donošenje konačnog zaključka potrebno je povećati bolesničke skupine.

Nažalost, podatke o raznovrsnosti mikrosatelita D6S248 i D6S2674 koji su dobiveni za hrvatsku populaciju, a povezani su s PsA i jSpA nije bilo moguće usporediti s rezultatima istraživanja drugih populacija. Radi se o mikrosatelitima koji su bili uglavnom uključeni u istraživanja povezanosti s razvojem nekih drugih bolesti, kao što je hemokromatoza. Naime, istraživanje provedeno u Australiji koje se temeljilo na analizi haplotipova povezanih s

hemokromatozom, pokazalo je da je najzastupljeniji alel na lokusu D6S248 kod oboljelih i zdravih ispitanika bio alel D6S248-287 pb. Međutim, u usporedbi te dvije skupine ispitanika uočeno je da kod osoba s hemokromatozom postoji statistički značajno povećanje učestalosti tog alela u odnosu na zdrave ispitanike, što govori u prilog teoriji da su ti aleli podložni za razvoj hemokromatoze (31).

Centromerno od gena HLA-Cw, nalazi se treći lokus analiziran u ovom radu, lokus D6S2811, na kojem smo uočili 18 od 21 različitih, do danas poznatih, alela. Najveću učestalost, kod sve tri testirane skupine, pokazao je alel D6S2811-98 pb. Smanjena učestalost alela D6S2811-126 pb u skupini bolesnika s PsA (5,3%) u usporedbi sa skupinom zdravih ispitanika (15,1%) nije statistički značajna, što upućuje na zaključak da je riječ o zaštitnom alelu za nastanak PsA. Međutim, za konačan zaključak neophodno je povećati bolesničku skupinu.

Istraživanje raznovrsnosti alela na lokusu STR\_MICA, smještenom 40 kb centromerno od regije gena HLA-B pokazalo je statistički značajnu razliku u zastupljenosti alela STR\_MICA-A5.1 i alela STR\_MICA-A9 između bolesnika s jSpA i zdravih ispitanika. Učestalost alela STR\_MICA-A5.1 je kod osoba s jSpA bila dvostruko manja nego u kontroli te možemo pretpostaviti da se radi o alelu koji je zaštićen za razvoj jSpA. S druge strane, za alel STR\_MICA-A9 uočena je povećana učestalost u odnosu na kontrolnu skupinu što ide u prilog pretpostavci o njegovoj povezanosti s jSpA, kao što je i podložan za razvoj PsA (32). Alel STR\_MICA-A5.1 jedan je od najčešćih alela lokusa STR\_MICA među dosad analiziranim populacijama bijele rase. Usporedbe radi, učestalost toga alela među zdravim ispitanicima u hrvatskoj populaciji (HLA-B27 pozitivnim osobama) iznosi 31,7% i drugi je po učestalosti iza alela STR\_MICA-A4. S druge strane, kod HLA-B27 pozitivnih osoba u Kini ta učestalost doseže čak do 80,2% (33). U obje ispitivane skupine, najveću učestalost, ali bez statističke značajnosti pokazivao je alel STR\_MICA-A4, za kojeg se na temelju prijašnjih istraživanja dokazala povezanost s genom HLA-B\*27, neovisno o podtipu samog gena HLA-B\*27 (19), što ukazuje na postojanje jake neravnoteže udruživanja između gena HLA-B\*27 i alela STR\_MICA-A4. Rezultati sličnog istraživanja, koje je provedeno na uzorku hrvatske populacije od 31 HLA-B27 pozitivne djece s SpA, govore u prilog našim rezultatima. Naime, autori su također pokazali visoku učestalost alela STR\_MICA-A4 kod oboljelih s jSpA i zdrave kontrole (12). Među našim ispitanicima uočili smo sve dosad opisane alele osim dva nedavno otkrivena i vrlo rijetka alela: STR\_MICA-A7 i STR\_MICA-A10.

Analizom mikrosatelita D6S273 uočili smo različitu zastupljenost pojedinih alela među ispitivanim skupinama. Mikrosatelit je smješten 96 kb telomerno od regije HSP70β2,

blizu gena TNF- $\alpha$  i gena TNF- $\beta$ , te gena BAT2 i gena MSH5. Aleli D6S273-4 i D6S273-5 pokazivali su najveću zastupljenost među bolesnicima s jSpA, dok su među bolesnicima s PsA najzastupljeniji bili aleli D6S273-5 i D6S273-3. Detaljnijom analizom skupine oboljelih od PsA uočena je smanjena zastupljenost alela D6S273-4 u usporedbi sa zdravim ispitanicima koja je statistički značajna te možemo govoriti o zaštitnoj ulozi tog alela, što znači da ne utječe na razvoj PsA. Također, unutar skupine bolesnika s PsA uočeno je da alel D6S273-3 ima povećanu učestalost u odnosu na kontrolu i za taj alel možemo reći da je rizičan faktor za bolest tj. njegova prisutnost kod HLA-B27 pozitivnih osoba povisuje rizik oboljenja. Istraživanje provedeno na skupini bolesnika s jSpA iz Hrvatske govori o povećanoj učestalosti alela D6S273-4 (134 pb) u grupi oboljelih od jSpA u odnosu na zdravu kontrolu (bez obzira jesu li B27 pozitivni), ali bez statističke značajnosti. To je u skladu s rezultatom ovog istraživanja (12). Općenito, kod usporedbe učestalosti alela mikrosatelita D6S273 (D6S273-3, D6S273-4 i D6S273-5) između hrvatske populacije i drugih europskih populacija (Italija, Nizozemska) nisu uočene statistički značajnije razlike, izuzev za alel D6S273-2 koji je u hrvatskoj populaciji zastupljen s 10,1%, a među Nizozemcima njegova učestalost iznosi 5,5%, što je statistički značajna razlika ( $P < 0,01$ ) (34). Zanimljivo je spomenuti da za alel D6S273-1 u ovom radu utvrđeno je da ne utječe na razvoj bolesti PsA i jSpA, ali je zato istraživanjem provedenim u Kini utvrđeno da je podložan za razvoj reumatoidnog artritisa (RA), jedne od bolesti koja također pripada skupini spondiloartropatija (12).

Sljedeći cilj istraživanja bio je odrediti i analizirati haplotipske veze u sve tri ispitivane skupine HLA-B27 pozitivnih osoba, te otkriti postoje li razlike u produženim haplotipovima gena HLA-B\*27 između skupina.

Analizirajući haplotipsku vezu gena HLA-B\*27 i alela na lokusu D6S248 uočena je dominacija haplotipske veze HLA-B\*27/D6S248-291 kod osoba oboljelih od PsA i osoba oboljelih od jSpA. Statistički značajno povećana učestalost te haplotipske veze među bolesnicima s jSpA u odnosu na zdravu kontrolu ( $P = 0,0258$ ) navodi na pretpostavku da je ta haplotipska veza podložna za razvoj jSpA, tj. rizik od oboljevanja je mnogo veći s takvom kombinacijom alela.

Analiza haplotipskih veza HLA-B\*27/D6S2674-131 i HLA-B\*27/D6S2811-98 u osoba s jSpA ukazuje da se radi o haplotipskim vezama koje vjerojatno imaju zaštitnu ulogu u nastanku same bolesti. Međutim, treba opet naglasiti da je za donošenje konačnog zaključka neophodno povećati skupinu bolesnika s jSpA.

Za haplotipsku vezu lokusa STR\_MICA uočeno je da se gen HLA-B\*27 najčešće javljao u kombinaciji s alelom STR\_MICA-A4, što možemo usporediti i s drugim

istraživanjima u svijetu, gdje je takva haplotipska veza povezana sa spondiloartropatijama (35). Nasuprot tome iz naših rezultata vidljivo je da je ta veza najčešća među bolesnicima s jSpA, ali da je u usporedbi s kontrolom manje zastupljena, tako da ne možemo govoriti o njenoj ulozi u podložnosti za jSpA. Naime, naši rezultati prije navode na pretpostavku da niti jedna kombinacija alela HLA-B\*27/STR\_MICA nije direktno podložna za jSpA, već je povećana učestalost pojedinih kombinacija rezultat neravnoteže udruživanja alela ova dva lokusa.

Usporedba haplotipskih veza između alela na lokusu D6S273 i HLA-B\*27 pokazala je da kod osoba s PsA postoji znatno manja zastupljenost haplotipske veze HLA-B\*27/D6S273-4 u odnosu na zdrave ispitanike, što ukazuje na to da ta haplotipska veza ne utječe na razvoj PsA. Kada bi uzeli u obzir i učestalost alela D6S273-4 koji je prethodno bio analiziran, vidjeli bi da se radi o alelu koji je zaštitni i možemo zaključiti da niti alel, niti njegova haplotipska veza, nisu povezani s PsA. U istraživanju u kojem su bili uključeni bolesnici s jSpA, bez obzira jesu li ili nisu pozitivni za gen HLA-B\*27, uočena je povećana učestalost alela D6S273-4 u odnosu na zdrave ispitanike. Međutim, analiza haplotipskih veza HLA-B\*27/D6S273-4 pokazala je da je učestalost alela D6S273-4 rezultat neravnoteže udruživanja s genom HLA-B\*27 i da taj alel ne predstavlja neovisan alel podložan za razvoj jSpA (12).

Nakon analize učestalosti pojedinih haplotipskih veza dva lokusa, slijedila je analiza produženih haplotipskih veza kako bi mogli odrediti postoje li produženi haplotipovi specifični za dvije istraživane bolesti.

Za produžene haplotipske kombinacije tri lokusa (HLA-B\*27/D6S248/D6S2674), veze HLA-B\*27/D6S248-267/D6S2674-131 i HLA-B\*27/D6S248-291/D6S2674-131 pokazalo se da nisu povezane ni s PsA ni s jSpA jer nije uočena razlika u učestalosti između bolesničkih skupina i kontrole. Iako haplotipska veza HLA-B\*27/D6S248-291 pokazuje podložnost u razvoju jSpA, u ovom slučaju kod analize produžene haplotipske veze ta se podložnost gubi što bi moglo navesti na pretpostavku da je regija između lokusa HLA-B i mikrosatelita D6S248 ta koja je odgovorna za podložnost za spondiloartropatije. Daljnje analize produženih haplotipskih veza s četiri, pet i šest lokusa (HLA-B\*27/D6S248/D6S2674/2811/STR\_MICA/D6S273) također ne pokazuju značajnu razliku u učestalosti kod bolesnika u usporedbi s kontrolom, a kako ni haplotipske veze HLA-B\*27/D6S2811-98, HLA-B\*27/STR\_MICA-A4 i HLA-B\*27/D6S273-4 ne pokazuju podložnost za razvoj PsA ili jSpA, ne možemo govoriti o specifičnom utjecaju tih produženih haplotipskih veza na bolesti. S druge strane, istraživanje provedeno među Indijancima otkrilo je visoku povezanost produženog haplotipa HLA-B\*27/HLA-Cw\*02/STR\_MICA-

A4/C1\_4\_1-213/D6S2811-178/MIB-340 s jSpA (35), što se može djelomično usporediti s našim istraživanjem obzirom na analizu drugih lokusa gdje je uočljivo da se u oba slučaja kod bolesnika s jSpA u produženoj haplotipskoj kombinaciji javlja povezanost lokusa HLA-B\*27 s lokusom STR\_MICA-A4.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Istraživanje raspodjele alela na četiri mikrosatelitska lokusa HLA (D6S248, D6S2674, D6S2811, STR\_MICA) među B27 pozitivnim bolesnicima s PsA, jSpA i zdravim osobama pokazalo je da su najučestaliji aleli u sve tri skupine: D6S248-291 pb, D6S2674-131 pb, D6S2811-98 pb i STR\_MICA-A4.
2. Na lokusu D6S273 najčešći alel u skupini bolesnika s jSpA i kontroli bio je D6S273-4, a u skupini bolesnika s PsA alel D6S273-5.
3. Za alele D6S2811-126 pb i D6S273-4 zbog smanjene učestalosti među bolesnicima s PsA možemo pretpostaviti da se radi o zaštitnim alelima, odnosno alelima koji ne utječu na razvoj bolesti.
4. Alel D6S273-3 pokazivao je, statistički značajno, povišenu učestalost ( $P=0,0013$ ) među bolesnicima s PsA što govori o njegovoj podložnosti za razvoj bolesti.
5. Među bolesnicima s jSpA otkrivena je smanjena učestalost alela D6S2674-131 pb ( $P=0,0312$ ), dok je alel STR\_MICA-A9 statistički značajno povišen ( $P=0,0475$ ) među bolesnicima s jSpA
6. Analizom haplotipskih veza: HLA-B\*27/D6S248-267, HLA-B\*27/D6S248-291, HLA-B\*27/D6S2674-131, HLA-B\*27/D6S2674-163, HLA-B\*27/D6S2811-98, HLA-B\*27/D6S2811-126 i HLA-B\*27/D6S273-5 nije uočena niti jedna koja pokazuje podložnost za razvoj bolesti PsA.
7. Učestalost haplotipske veze HLA-B\*27/D6S273-4 je statistički značajno smanjena ( $P=0,0164$ ) kod PsA bolesnika u odnosu na kontrolu, što ukazuje o njenoj zaštitnoj ulozi u nastanku PsA.
8. Haplotipska veza HLA-B\*27/D6S248-291 pokazala je najveću učestalost među bolesnicima s jSpA ( $P=0,0258$ ) te možemo zaključiti da utječe na razvoj jSpA.

## **POPIS LITERATURE**

1. Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Marušić M., Taradi M., Višnjic D. (2004): **Imunologija**. Šesto izdanje, Medicinska naklada, Zagreb.
2. European Bioinformatics Institute (EBI) [<http://www.ebi.ac.uk/>]. Hinxton, UK.
3. Marshi G. E. S., Parham P., Barber D. L. (2000): **The HLA Factsbook**. Factsbook Series, AP, San Diego.
4. Larrea-Lopez C. (1997): **HLA-B27 in the development of spondyloarthropathies**. Medical Intelligence Unit, R. G. Landes Company, Georgetown, Texas, USA.
5. Boyle L. H., Gaston Hill J. S. (2003): **Breaking the rules: the unconventional recognition of HLA-B27 by CD4+ T lymphocytes as an insight into the pathogenesis of the spondyloarthropathies**. *Rheumatology* **42**: 404–412.
6. Dakwar E., Reddy J., Vale L. F., Uribe S. J. (2008): **A review of the pathogenesis of ankylosing spondylitis**. *Neurosurgical Focus* **24**: E2.
7. Bowness P., Zaccai N., Bird L., Jones Y. E. (1999): **HLA-B27 and disease pathogenesis: new structural and functional insights**. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **16**: 1-10.
8. Weisman H. M., Reveille D. J., Van der Heijde D. (2006): **Ankylosing spondylitis and the spondyloarthropathies: A Companion to Rheumatology**. Edition 3, Mosby/Elsevier Health Sciences, St Louis.
9. Rajesh K. K., Lawrence H. B. (2004): **Spondyloarthropathies**. *American Family Physician* **69**: 2853-2860.
10. Grubić Z., Perić P., Čečuk-Jeličić E., Žunec R., Štingl K., Čurković B., Kerhin-Brkljačić V. (2004): **The MICA-A4 triplet repeats polymorphism in the transmembrane region confers additional risk for development of psoriatic in the Croatian population**. *European Journal of Immunogenetics* **31**: 93-98.
11. Gran J. T., Husby G. (1995): **HLA-B27 and spondyloarthropathy: value for early diagnosis?** *Journal of Medical Genetics* **32**: 497-501.



12. Harjaček M., Margetić T., Kerhin-Brkljačić V., Martinez N., Grubić Z. (2008): **HLA-B\*27/HLA-B\*07 in combination with D6S273-134 allele is associated with increased susceptibility to juvenile spondyloarthropathies.** *Clinical and Experimental Rheumatology* **26**: 498-504.
13. Koreth J., Leary O. J., McGee J. (1996): **Microsatellites and PCR genomics.** *Journal of Pathology* **178**: 239-248.
14. Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. (1994): **The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes.** *Nature* **371**: 215-220.
15. Li Y-C., Korol B. A., Fahima T., Nevo E. (2004): **Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution.** *Molecular Biology and Evolution* **21**: 991-1007.
16. Austen F. K., Frank M. M, Atkinson P. J., Cantor H. (2001): **Samter's immunologic diseases.** Edition 6, Vol. 2, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.
17. Rose R. N., Mackay I. R. (2006): **The autoimmune diseases.** Edition 4, Academic Press, London, UK.
18. Foissac A., Salhi M., Cambon-Thomsen A. (2000): **Microsatellites in the HLA region: 1999 update.** *Tissue Antigens* **55**: 477-509.
19. Cascino I., Paladini F., Belfiore F., Cauli A., Angelini C., Fiorillo M. T., Mathieu A., Sorrentino R. (2007): **Identification of previously unrecognized predisposing factors for ankylosing spondylitis from analysis of HLA-B27 extended haplotypes in Sardinia.** *Arthritis and Rheumatism* **56**: 2640-2651.
20. Sonkar G. K., Usha, Singh S. (2008): **Is HLA-B27 a useful test in the diagnosis of juvenile spondyloarthropathies?** *Singapore Medical Journal* **49**: 795.
21. Williams T. M. (2001): **Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory.** *Journal of Molecular Diagnostics* **3**: 98-104.
22. Hülsmeier M., Hillig R. C., Volz A., Rhül M., Schröder W., Saenger W., Ziegler A., Uchanska-Ziegler B. (2002): **HLA-B27 subtypes differentially associated with disease exhibit subtle structural alterations.** *Journal of Biological Chemistry* **277**: 47844-47853.
23. Vlašić-Tanasković J., Sertić J. (2004): **Dinamične mutacije u humanom genomu: Pregled bolesti slijeda tripleta.** *Biochemia Medica* **14**: 101-108.

24. Huber C. L., Moritz F., Gay S. (2007): **Spondylarthritides and related entities: Enteses and hypotheses**. *Arthritis and Rheumatism* **56**: 4-8.
25. Porcher R., Said-Nahal R., D'Agostino M-A., Miceli-Richard C., Dougados M., Breban M. (2005): **Two major spondylarthropathy phenotypes are distinguished by pattern analysis in multiplex families**. *Arthritis and Rheumatism* **53**: 263–271.
26. Tsuchiya N., Shiota M., Moriyama S., Ogawa A., Komatsu-Wakui M., Mitsui H., Geraghty E. D., Tokunaga K. (1998): **MICA allele typing of HLA-B27 positive Japanese patients with seronegative spondylarthropathies and healthy individuals: Differential linkage disequilibrium with HLA-B27 subtypes**. *Arthritis and Rheumatism* **41**: 68-73.
27. Braun J., Bollow M., Remlinger G., Eggens U., Rudwaleit M., Distler A., Sieper J. (1998): **Prevalence of Spondylarthropathies in HLA-B27 Positive and Negative Blood Donors**. *Arthritis and Rheumatism* **41**: 58-67.
28. Li Y-C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. (2002): **Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review**. *Molecular Ecology* **11**: 2453-2465.
29. Pazmany L., Rowland-Jones S., Huet S., Hill A., Sutton J., Murray R., Brooks J., McMichael A. (1992): **Genetic modulation of antigen presentation by HLA-B27 molecules**. *Journal of Experimental Medicine* **175**: 361-369.
30. Jin P., Wang E. (2003): **Polymorphism in clinical immunology – From HLA typing to immunogenetic profiling**. *Journal of Translational Medicine* **1**.
31. Jazwinska E. C., Pyper W. R., Burt M. J., Francis J. L., Goldwurm S., Webb S. I., Lee S. C., Halliday J. W., Powell L. W. (1995): **Haplotype analysis in Australian hemochromatosis patients: Evidence for a predominant ancestral haplotype exclusively associated with hemochromatosis**. *The American Journal of Human Genetics* **56**: 428-433.
32. Martinez-Borra J., Gonzalez S., Santos-Juanes J., Sanchez del Rio J., Torre-Alonso J. C., Lopez-Vazques A., Blanco-Gelaz M. A., Lopez-Larrea C. (2003): **Psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis share a 100kb susceptibility region telomeric to HLA-C**. *Rheumatology* **42**: 1089-1092.

33. Fang M., Chen R., Cai Q., Duan S., Lv K., Cheng N., Sun S. (2007): **Association of HLA genes with ankylosing spondilitis in Han population of eastern China.** Scandinavian Journal of Immunology **65**: 559-566.
34. Grubić Z., Moghaddam P. H., Giphart M. J., Žunec R., Čečuk-Jeličić E., Kaštelan A. (1999): **Distribution of alleles at two microsatellite loci (D6S273 and TNFa) in Croatian population.** Collegium Antropologicum **23**: 87-90.
35. Thomas R., Philip J., Banerjee M. (2006): **Association of an extended haplotype of HLA class I alleles and their flanking microsatellites with spondyloarthropathies in south Indian patients.** Human Immunology **67**: 318-323.