

Zavod za tipizaciju tkiva ♦ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku  
Klinički bolnički centar Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb

## RAZNOVRSNOST PRODUŽENIH HAPLOTIPOVA GENA HLA-B\*27 U HRVATSKOJ THE DIVERSITY OF EXTENDED GEN HAPLOTYPES HLA-B\*27 IN CROATIA

Marijana Škifić ♦ Katarina Štingl ♦ Renata Žunec ♦ Zorana Grubić

### Sažetak

U ovom radu analizirani su produženi haplotipovi gena HLA-B\*27 na uzorku od 42 obitelji iz Hrvatske. Svim ispitanicima uzeto je 2ml periferne krvi iz koje je izolirana DNA pomoću komercijalnog kita. Aleli gena HLA-B\*27 određeni su lančanom reakcijom polimerazom s početnicama specifičnim za određeni alel (PCR-SSP), a aleli mikrosatelitskih lokusa D6S2927, STR\_MICA i TNFa umnoženi su početnicama specifičnim za alele mikrosatelitskih lokusa (PCR-STR). Analizom produženih haplotipova HLA-A-B\*27-D6S2927-STR\_MICA-

TNFA-DRB1 utvrđena je najjača neravnoteža udruživanja između alela gena HLA-B\*27 i mikrosatelitskih alela D6S2927-1 i STR\_MICA-A4. Analiza je pokazala da je rijetki alel B\*2730 uvijek prisutan u produženom haplotipu: HLA-A3-B\*2730-D6S2927-1-STR\_MICA-A4-TNFA-9-DRB1\*16. Rezultati ovog rada primijenit će se u daljnjim istraživanjima povezanosti mikrosatelitskih alela i spondiloartropatija te pomoći u boljem razumijevanju vezanja peptida na molekule HLA razreda I, kao i drugih procesa koji se javljaju tijekom imunološkog odgovora.

### Ključne riječi

gen HLA-B\*27, alel B\*2730, mikrosateliti HLA, produženi haplotipovi, populacijska istraživanja, Hrvatska

### Summary

In the present study the extended haplotypes of HLA-B\*27 gene were analysed in the sample of 42 Croatian families. Peripheral blood (2ml) was collected from all the individuals and genomic DNA was extracted using a commercial kit. The HLA alleles were determined using the method PCR sequence specific primers (PCR-SSP) while the microsatellite alleles were amplified using the method PCR-STR. Analysis of HLA-A-B\*27-D6S2927-STR\_MICA-TNFA-DRB1 extended haplotypes demonstrated the strongest linkage disequi-

librium between HLA-B\*27 alleles and microsatellite alleles D6S2927-1 and STR\_MICA-A4. Analysis indicated that the rare allele B\*2730 is always present in the extended haplotype HLA-A3-B\*2730-D6S2927-1-STR\_MICA-A4-TNFA-9-DRB1\*16. The results of the present study will be applied in future studies of association between microsatellite alleles and spondyloarthropathies and contribute to a better understanding of peptide binding to HLA class I molecules, as well as other aspects of immune response.

### Key words

HLA-B\*27, allele B\*2730, microsatellites HLA, extended haplotypes, population studies, Croatia

### Uvod

Gen HLA-B27 već je gotovo 40 godina jedan od najistraživanijih gena sustava HLA, prvenstveno zbog svoje povezanosti s ankilozantnim spondilitisom (AS) i drugim spondiloartropatijama (SpA).

Učestalost gena HLA-B27 u različitim populacijama u svijetu je nejednaka, te se kreće od 0,6% (Mongolija) do 10,4% (Rusija, otok Sahalin). Iako je to jedan

od čestih gena na lokusu HLA-B među populacijama bijele rase, s malom je učestalošću prisutan u Mikroneziji, a u potpunosti je odsutan u populacijama središnje i Južne Amerike, kao i ekvatorijalne i južne Afrike (1-3).

Gen HLA-B27 pokazuje veliku raznovrsnost, te je do danas opisan 41 različiti alel ovog gena, a označavaju se od HLA-B\*2701 do HLA-B\*2742 (prema bazi poda-

doc.dr.sc. Zorana Grubić

Zavod za tipizaciju tkiva ♦ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku ♦ KBC Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb  
tel.: +385 (0)1 2367287 ♦ fax: +385 (0)1 2367337 ♦ e-mail: zgrubic@kbc-zagreb.hr

taka IMGT/HLA) (4,5). Ovi aleli se međusobno razlikuju prvenstveno po redosljedu baza u egzonima 2 i 3 koji kodiraju domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  molekule HLA-B27, dok egzon 4 koji kodira domenu  $\alpha 3$  pokazuje mali polimorfizam. Molekule HLA-B27 kodirane različitim alelima HLA-B27 vežu različite peptide, od kojih su samo neki važni u patogenezi SpA, što objašnjava činjenicu da su samo neki od alela HLA-B27 (HLA-B\*2702, B\*2704, B\*2705 i B\*2714, kao i B\*2707, uz iznimku stanovnika Cipra grčkog podrijetla) povezani s bolestima (6-8). S druge strane, aleli B\*2706 i B\*2709 imaju zaštitnu ulogu u nastanku SpA (9-11).

Od svih danas poznatih alela, alel HLA-B\*2705 je pokazao najveću rasprostranjenost i prevladava unutar populacija bijele rase iako je uočen i u populacijama drugih rasa (6). Porast učestalosti alela HLA-B\*2705 od juga prema sjeveru zemljine kugle vjerojatno je posljedica migracija stanovništva sa sjevera Europe prema Aziji što je dovelo do prisustva ovog alela i na južnim područjima zemljine kugle (1).

Drugi najzastupljeniji alel u bijelaca je alel HLA-B\*2702 koji prevladava među Židovima i Berberima koji naseljavaju sjever Afrike, a došli su s Bliskog Istoka (1). Budući da je među Berberima uočen još samo alel HLA-B\*2705, pretpostavlja se da je alel HLA-B\*2702 nastao iz alela HLA-B\*2705 upravo na Bliskom Istoku odakle se proširio u sjevernu Afriku, Europu i druge dijelove svijeta.

Za razliku od alela HLA-B\*2705 i B\*2702, ostali aleli gena HLA-B\*27 imaju mnogo nižu zastupljenost, a mnogi od njih pronađeni su tek u nekoliko pojedinaца u svijetu (12-15).

Učestalost gena HLA-B27 u hrvatskoj populaciji je 5,5%, a ranije provedena molekularna istraživanja pokazala su da su među 16, tada poznatih alela, najviše zastupljeni bili aleli HLA-B\*2705 i B\*2702, uz slabu zastupljenost alela HLA-B\*2704 koji je uočen u samo 2,0% osoba pozitivnih za gen HLA-B27.

Međutim, 2006. godine u hrvatskoj populaciji uočen je alel HLA-B\*2730 koji je nekoliko mjeseci prije prvi put otkriven u slovenskoj populaciji (16). Nakon provedene obiteljske analize, došlo se do zaključka da se alel HLA-B\*2730 najvjerojatnije javlja u očuvanom haplotipu (HLA-A\*03, -B\*2730, -DRB1\*16) koji je identičan haplotipu uočenom u Slovenaca. Osobe nositelji alela B\*2730 bolovale su od AS-a što navodi na pretpostavku da i ovaj alel pripada skupini podtipova gena HLA-B27 povezanih sa SpA.

U istraživanjima povezanosti pojedinih gena HLA i bolesti u posljednjih desetak godina sve se više uklju-

čuju i drugi genetski biljezi unutar regije HLA, u prvom redu mikrosateliti HLA ali i geni non-HLA (17).

Mikrosateliti (Msats) ili STR (engl. *Short Tandem Repeats*) su jedan od oblika ponavljajuće DNA. Sastoje se od ponavljajućih motiva dugih 1-6 parova baza (pb), koji se mogu ponavljati do 100 puta; još uvijek nije sasvim jasno koja je stvarna uloga mikrosatelita, kao ni evolucijski mehanizam njihovog nastanka.

Unutar regije HLA do danas je poznato više od 350 mikrosatelitskih lokusa, od toga čak 50 između lokusa HLA-B i -DRB1. Mikrosateliti HLA koriste se radi boljeg određivanja dijela regije HLA povezanog s pojedinim bolestima, ali i analize produženih haplotipova HLA što omogućuje bolje razumijevanje odabira peptida i drugih procesa koji se javljaju tijekom imunološkog odgovora. Time se nastoji što bolje objasniti povezanost regije HLA i bolesti. Neki su od Msats bili predmet istraživanja povezanosti sa SpA (reumatoidnim artritismom, AS-om, psorijatičnim artritismom) (18). Tako je npr. istraživanje provedeno među stanovnicima južne Indije pokazalo je da je produženi haplotip: HLA-B\*2705-Cw\*02-STR\_MICA(A4)-D6S2927(213pb)-D6S2811(178pb)-D6S2810(340pb) značajno povezan sa SpA (19).

Mikrosatelit D6S2927 sadrži tetranukleotidno ponavljanje CAAA, a smješten je približno 6 kilobaza (kb) od gena HLA-B i 158kb od gena MICB u smjeru centromere. Dužine njegovih 7 alela kreću se od 213pb do 233pb.

Unutar gena MIC (engl. *MHC class I chain related gene*), u egzonu 5, nalazi se mikrosatelit STR\_MICA koji je udaljen 46kb od gena HLA-B u smjeru centromere. Ovaj mikrosatelit se sastoji od trinukleotidnog ponavljajućeg slijeda (GCT), a do danas je poznato 8 njegovih alela: A4, A5, A5.1, A6, A7, A8, A9 i A10, dužine od 179pb do 197pb (20).

Regija gena TNF (engl. *Tumor Necrosis Factor*) također je bogata mikrosatelitima i do danas ih je otkriveno 6 (TNFa, TNFb, TNFc, TNFd, TNFe, TNFf). Na lokusu TNFa opisano je čak 15 alela, dužine 97pb do 125pb, dok je 7 alela otkriveno na lokusima TNFb i TNFd, a 10 alela na lokusu TNFf. Lokusi TNFc i TNFe imaju manji broj alela te su otkrivena tek dva, odnosno tri alela (21).

Ciljevi ovog rada bili su: 1. odrediti učestalost rijetkog alela HLA-B\*2730 u hrvatskoj populaciji, 2. utvrditi produžene haplotipove HLA-A-B\*27-D6S2927-STR\_MICA-TNFa-DRB1, 3. ustanoviti postoje li razlike u neravnoteži udruživanja među alelima na lokusima HLA-A, -DRB1, D6S2927, STR\_MICA i TNFa s pojedinim podtipovima gena HLA-B27 i 4. usporediti dobivene rezultate s rezultatima drugih populacija bijele rase.

## Materijal i metode

### Ispitanici

U istraživanje smo uključili članove 42 obitelji, pri čemu su iz svake obitelji bili uključeni jedan roditelj

i jedno dijete koji su bili HLA-B\*27 pozitivni. Riječ je o roditeljima bolesnika, mogućih primatelja koštane srži i članova njihove obitelji. Od ukupno 42 testirane obi-

telji, tri obitelji su bile obitelji bolesnika kojima je dijagnosticiran AS, a u kojih je otkrivena prisutnost rijetkog alela HLA-B\*2730. Od preostalih 38 obitelji 17 ih je bilo izabrano samo na temelju prisutnosti gena HLA-B27, a 16 je obitelji bilo izabrano na temelju nazočnosti gena B\*27 i gena DRB1\*16 i 5 obitelji i na temelju prisutnosti gena B\*27 i gena HLA-A3. Ukupan broj analiziranih produženih haplotipova gena HLA-B27 bio je 43 jer su unutar jedne obitelji i otac i majka bili nositelji ovog gena.

Ispitanicima su prethodno određeni geni lokusa HLA-A i HLA-B serološkom metodom, dok se za određivanje specifičnosti HLA-DRB1 koristila molekularna metoda PCR-SSP (engl. *Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers*).

Svim ispitanicima uzeto je 2ml periferne krvi s EDTA iz koje je izolirana DNA pomoću komercijalnog kita za izolaciju (NucleoSpin® Blood, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).

#### Određivanje alela gena HLA-B27

Aleli gena HLA-B27 analizirani su metodom visokog razlučivanja PCR-SSP, prema standardnom postupku komercijalnog kita za određivanje alela gena HLA-B27 (Olerup SSP HLA-B\*27, Genovision, Vienna, Austria).

#### Određivanje alela mikrosatelitskih lokusa

Analizana su 3 mikrosatelitska lokusa (D6S2927, STR\_MICA i TNFa) smještena između genskih lokusa HLA-B i -DRB1. Mikrosateliti su umnoženi pomo-

ću početnica koje su na 5' kraju bile označene fluorescentnom bojom Cy-5. Redoslijed nukleotida u početnicama bio je prema podacima iz literature (22). Reakcijska smjesa ukupnog volumena 15µl sadržavala je 50ng DNA, 2,5mM dNTPs, MgCl (različite koncentracije za svaki Msat), 5U AmpliTaq DNA polimeraze, 1,0µl PCR pufera i 10pmol svake početnice. Uvjeti umnažanja bili su kao što je navedeno u radu o neravnoteži udruživanja između mikrosatelita HLA i lokusa HLA-B (21).

#### Elektroforeza

Nakon umnažanja, PCR produkti su odvojeni elektroforezom na 6%-tnom poliakrilamidnom gelu u aparatu za automatsko sekvencioniranje ALFexpress (Amersham Pharmacia, Uppsala, Švedska). Aleli su detektirani laserom na temelju pobuđene fluorescencije, a veličina alela svakog mikrosatelita je izračunata korištenjem programa AlleleLocator Program (Amersham Pharmacia, Uppsala, Švedska), koji računa dužinu fragmenata uspoređujući je s dužinom unutrašnjeg biljega dužine. Osim toga, na svakom gelu je korišten ALFexpress sizer 200bp (Amersham Pharmacia) kao dodatni standard. U svrhu još preciznijeg određivanja dužine fragmenata, za svaki mikrosatelitski lokus korištene su i po dvije vanjske kontrole; homozigotne stanične linije s X International Histocompatibility Workshop (IHW), kojima su ranije određeni aleli na testiranim Msat lokusima. Korištene su sljedeće stanične linije: OLGA, AMALA, KAS011, VAVY i KAS 116.

### Rezultati

Određivanje alela gena HLA-B\*27 među pozitivnim osobama pokazalo je da je od 43 osobe njih 20 imalo alel B\*2702, dok ih je 15 imalo alel B\*2705. Od preostalih 6 osoba tri su bile pozitivne za alel B\*2730, a za 3 osobe nismo mogli odrediti o kojem je alelu riječ.

U tablici 1 prikazani su produženi haplotipovi alela HLA-B\*2702. Od 20 haplotipova, koji su sadržavali alel HLA-B\*2702, šesnaest ih je na lokusu HLA-DRB1 imalo specifičnost HLA-DRB1\*16. Tih 16 haplotipova bilo je identično na svim ispitivanim lokusima

osim lokusa HLA-A gdje je najveću učestalost imao alel HLA-A2 (7 haplotipova), a slijede ga HLA-A28 (4 haplotipa) i HLA-A3 (3 haplotipa). Na svih 20 haplotipova na mikrosatelitskom lokusu D6S2927 utvrđen je alel D6S2927-1 (213pb), a na mikrosatelitu STR\_MICA alel STR\_MICA-A4 (179pb). Jedine razlike među haplotipovima alela HLA-B\*2702 uočene su na mikrosatelitskom lokusu TNFa. Naime, na lokusu TNFa na 16 je haplotipova bio prisutan alel TNFa-9 (113pb) i to među onim haplotipovima koji su na lokusu DRB1

Tablica 1. Produženi haplotipovi alela HLA-B\*2702 (N=20)  
Table 1. Extended HLA-B\*2702 haplotypes (N=20)

HLA-A	B*	Mikrosatelitski alel			HLA-DRB1*	Broj haplotipova
		D6S2927 (parova baza)	STR_MICA (parova baza)	TNFa (parova baza)		
2	2702	213	179	113	16	7
28	2702	213	179	113	16	4
3	2702	213	179	113	16	3
2	2702	213	179	115	11	1
3	2702	213	179	115	11	1
3	2702	213	179	107	13	1
1	2702	213	179	113	16	1
29	2702	213	179	115	11	1
66	2702	213	179	113	16	1

Tablica 2. Produženi haplotipovi alela HLA-B\*2705 (N=15)

Table 2. Extended HLA-B\*2705 haplotypes (N=15)

HLA-A	HLA-B*	Mikrosatelitski alel			HLA-DRB1*	Broj haplotipova
		D6S2927 (parova baza)	STR_MICA (parova baza)	TNFA (parova baza)		
2	2705	213	179	115	01	2
2	2705	213	179	115	12	2
2	2705	213	179	115	11	1
2	2705	225	179	117	04	1
2	2705	213	179	107	01	1
2	2705	213	179	107	11	1
2	2705	213	179	105	11	1
1	2705	213	179	115	11	1
3	2705	213	179	107	11	1
24	2705	213	179	105	04	1
24	2705	213	179	121	15	1
24	2705	213	179	107	08	1
32	2705	213	179	107	15	1

Tablica 3. Produženi haplotipovi alela HLA-B\*2730 (N=3)

Table 3. Extended HLA-B\*2730 haplotypes (N=3)

HLA-A	HLA-B*	Mikrosatelitski alel			HLA-DRB1*	Broj haplotipova
		D6S2927 (parova baza)	STR_MICA (parova baza)	TNFA (parova baza)		
3	2730	213	179	113	16	3

Tablica 4. Produženi haplotipovi gena HLA-B27 kojima nije određen alel (N=3)

Table 4. Extended HLA-B27 haplotypes (N=3)

HLA-A	HLA-B*	Mikrosatelitski alel			HLA-DRB1*	Broj haplotipova
		D6S2927 (parova baza)	STR_MICA (parova baza)	TNFA (parova baza)		
2	27	213	179	107	01	2
32	27	213	179	107	01	1

imali alel DRB1\*16. Od četiri preostala haplotipa, koji nisu imali specifičnost HLA-DRB1\*16, u tri je utvrđena specifičnost HLA-DRB1\*11 i oni su na lokusu TNFA imali alel TNFA-10 (115pb), dok je jedan haplotip sa specifičnošću HLA-DRB1\*13 na lokusu TNFA imao alel TNFA-6 (107pb).

Alel B\*2705 bio je uočen na 15 haplotipova te smo stoga analizirali i 15 produženih haplotipova ovog alela. Kao što se može vidjeti iz tablice 2, šest različitih specifičnosti lokusa DRB1 pojavilo se u haplotipu s alelom HLA-B\*2705. Najčešće smo na lokusu DRB1 uočili specifičnost DRB1\*11 (5 puta), a alel B\*2705 dolazio je još u kombinaciji s alelom DRB1\*01, \*04, \*08, \*12 i \*15. Međutim, ni na jednom haplotipu ovog alela gena HLA-B\*27 nije bila prisutna specifičnost DRB1\*16. Na mikrosatelitskom lokusu D6S2927 u 14 haplotipova je utvrđen isti alel, i to alel D6S2927-1 (213pb), a samo se jednom javio alel D6S2927-4 (225pb). Slična

je situacija bila i na mikrosatelitskom lokusu STR\_MICA gdje je alel STR\_MICA-A4 (179pb) otkriven na 14 haplotipova dok jedan uzorak nije testiran. Na lokusu TNFA utvrđeno je 5 različitih alela, od kojih je alel TNFA-10 (115pb) bio najčešći (40,0%).

Osim analize produženih haplotipova najčešćih alela gena HLA-B\*27, analizirali smo i produžene haplotipove rijetkog alela HLA-B\*2730 (tablica 3). Sva 3 haplotipa, koji su imali alel HLA-B\*2730, imali su iste alele na svim testiranim lokusima i to: HLA-A3, -B\*2730, -D6S2927-1, -STR\_MICA-A4, -TNFA-9, DRB1\*16.

U našem istraživanju postajala su i 3 haplotipa gena HLA-B\*27 kojima nije bio određen alel zbog nedovoljne količine uzorka. Osim razlika na lokusu HLA-A, gdje se na 2 haplotipa javila specifičnost HLA-A2, a na jednom HLA-A32, na svim ostalim lokusima na ova 3 haplotipa našli smo iste alele: HLA-B\*27, -D6S2927-1, -STR\_MICA-A4, -TNFA-6, -DRB1\*01 (tablica 4).

## Rasprava

Povezanost gena HLA-B\*27 i AS-a, odnosno drugih SpA, poznata je već gotovo 40 godina. Upravo ta

je povezanost razlog za brojna istraživanja gena HLA-B\*27. Poznato je na temelju dosadašnjih rezultata istra-

živanja da nisu svi aleli gena HLA-B\*27 podložni za razvoj bolesti, te se smatra da je veza gena HLA-B\*27 i SpA starija od nastanka pojedinih alela (1,2).

Otkriće novog alela HLA-B\*2730 među stanovnicima Hrvatske navelo nas je na istraživanje produženih haplotipova tog alela te usporedbu s produženim haplotipovima drugih, mnogo češćih alela gena HLA-B\*27 prisutnih u našoj populaciji.

Tijekom istraživanja prikupili smo skupinu obitelji u kojima su jedan ili oba roditelja bili pozitivni za gen HLA-B\*27 te 3 obitelji u kojima smo dokazali postojanje alela HLA-B\*2730. Analiza produženih haplotipova uključila je, osim klasičnih gena HLA (lokusi HLA-A i -DRB1), i mikrosatelitske lokuse smještene u regiji između lokusa HLA-B i -DRB1. Naime, analiza haplotipova bi mogla omogućiti bolje razumijevanje odabira peptida, kao i drugih procesa koji se javljaju tijekom imunološkog odgovora.

Određivanjem alela gena HLA-B\*27 među pozitivnim osobama utvrdili smo najveću učestalost alela B\*2702 (20 osoba), dok je 15 osoba imalo alel B\*2705, što nije u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja provedenih u hrvatskoj populaciji u kojima je najveću učestalost pokazao alel B\*2705. Ovakvo neslaganje s ranije objavljenim rezultatima je posljedica toga što naš uzorak nije bio nasumično odabran, već smo u njega uključili i 16 obitelji izabranih na temelju nazočnosti gena B\*27 i gena DRB1\*16. Budući da smo u našem istraživanju primijetili da se gen HLA-DRB1\*16 pojavljivao isključivo u haplotipu s alelom HLA-B\*2702, a ni jednom se nije pojavio u haplotipu s alelom HLA-B\*2705, očito je da iznenađujuće velika učestalost alela B\*2702 proizlazi iz našeg načina odabira ispitanika.

Nakon što je tijekom rutinskog rada u Zavodu za tipizaciju u tri obitelji utvrđen haplotip HLA-A3-B\*2730-DRB1\*16, pretpostavili smo mogućnost da će se u haplotipu s genom HLA-B\*27 koji sadrži i alele HLA-A3 i HLA-DRB1\*16 uvijek pojaviti rijetki alel HLA-B\*2730. Ta se pretpostavka pokazala donekle točnom nakon što je analizom utvrđeno i nekoliko haplotipova koji su imali alel B\*2702, tj. haplotip HLA-A3-B\*2702-DRB1\*16.

Istraživanje je nadalje usmjereno na analizu produženih haplotipova HLA-A-B\*27-D6S2927-STR\_MICA-TNFa-DRB1. Kao što se i moglo očekivati zbog male udaljenosti između lokusa, najjača neravnoteža udruživanja utvrđena je između alela lokusa HLA-B i alela mikrosatelitskih lokusa D6S2927 i STR\_MICA. Tako se, u pravilu, bez obzira na alele gena HLA-B\*27 i -DRB1 prisutne na određenom haplotipu, na lokusu D6S2927 javljao alel D6S2927-1 (213pb), a na lokusu STR\_MICA alel STR\_MICA-A4 (179pb). Takva pravilnost, međutim, nije uočena na mikrosatelitskom lokusu TNFa, gdje su se pojavljivali različiti aleli. Ipak, je na lokusu

TNFa na najvećem broju produženih haplotipova alela HLA-B\*2702 (80,0 %) pronađen alel TNFa-9 (113pb) što je rezultat neravnoteže udruživanja tog alela s alelom HLA-DRB1\*16, dok se ni u jednom haplotipu alela HLA-B\*2705 nije pojavio alel TNFa-9 (113pb).

Daljnji je cilj bila analiza haplotipova koji su sadržavali rijetki alel HLA-B\*2730, koji je prvi put otkriven u slovenskoj populaciji (16), a potom je utvrđen i u članova 3 hrvatske obitelji. Naime, htjeli smo vidjeti postoji li razlika u alelima testiranih mikrosatelita između produženog haplotipa ovog rijetkog alela i alela B\*2702 i B\*2705. Unatoč malom uzorku, naši su rezultati ukazali na očuvanost produženog haplotipa alela HLA-B\*2730 (HLA-A3-B\*2730-D6S2927-1-STR\_MICA-A4-TNFa-9-DRB1\*16). Riječ je o istim alelima mikrosatelitskih lokusa koji dolaze u kombinaciji i s alelom HLA-B\*2702, što je u skladu i s pretpostavljenom evolucijom alela HLA-B\*2730. Naime, smatra se da je alel B\*2730 nastao genskom konverzijom u kojoj je alel HLA-B\*2702 primio egzon 3 od nekog od alela lokusa HLA-B (uključujući većinu alela gena HLA-B\*44) koji imaju takav egzon 3. Sličan postanak ima i alel B\*2719 čiji je egzon 3 identičan onom alela B\*2730, ali mu je egzon 2 kao u alela B\*2705. Postoje čak teorije da je alel B\*2730 nastao konverzijom alela B\*2702 i alela B\*2719, međutim to je manje vjerojatno s obzirom na zastupljenost alela B\*2719 u svijetu. Usporedba sekvenci najpolimorfnijih dijelova egzona 2 i 3 različitih alela gena HLA-B\*27 te alela B\*4402 prikazana je na slici.

Dosadašnji rezultati istraživanja o rasprostranjenosti alela B\*2730 navode nas na pretpostavku da je ovaj alel možda nastao na prostorima jugoistočne Europe (Kosovo) od kuda se proširio u Hrvatsku i Sloveniju. U prilog tome ide činjenica da je obitelj iz Slovenije u koje je prvi put otkriven ovaj alel kosovskog podrijetla, kao i prva obitelj u kojoj je u Hrvatskoj otkriven alel B\*2730. Međutim, druge dvije obitelji su hrvatskog podrijetla i žive na prostorima Hrvatske (Istra i Zagorje) najmanje 4 generacije. Druga mogućnost je da je alel B\*2730 nastao na Bliskom Istoku i da se od tuda proširio u druge krajeve. Za konačan zaključak o podrijetlu alela B\*2730 neophodno je provesti populacijska istraživanja o njegovoj prisutnosti u prvom redu na Bliskom Istoku, ali i drugim dijelovima svijeta. Znanje o rasprostranjenosti alela B\*2730 može biti korisno ne samo u daljnjim istraživanjima podložnosti, odnosno zaštite od AS-a i drugih SpA, već i u antropološkim istraživanjima gdje se ovakvi rijetki aleli koriste kao genetski biljezi u praćenju migracija populacija, kao i međusobnog miješanja populacija.

Naš uzorak sadržavao je i 3 identična haplotipa kojima nije određen alel gena HLA-B\*27. Riječ je o haplotipu: HLA-B\*27-D6S2927-1(213pb)-STR\_MICA-

Slika. Usporedba nukleotidnih slijedova koji kodiraju egzone 2 i 3 alela HLA-B\*2702, B\*2705, B\*2719, B\*2730 i B\*4402  
 Figure. Nucleotide sequence alignments of exons 2 and 3 of HLA-B\*2702, B\*2705, B\*2719, B\*2730 and B\*4402

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
B*2702	ATGCGGGTCA	CGGCGCCCGG	AACCTCCTC	CTGCTGCTCT	GGGGGCGAGT	GGCCCTGACC	GAGACCTGGG	CTG GCTCCCA	CTCCATGAGG	TATTTCCACA
B*270502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----- -----	-----	-----
B*2719	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*** -----	-----	-----
B*2730	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*** -----	-----	-----
B*44020101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C -----	-----	-----T-----
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
B*2702	CCTCCGTGTC	CCGGCCCGGC	CGCGGGGAGC	CCCCTTCAT	CACCGTGGGC	TACGTGGACG	ACACGCTGTT	CGTGAGGTTT	GACAGCGACG	CCGCGAGTCC
B*270502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*2719	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*2730	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*44020101	--G--A--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--A-----
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
B*2702	GAGAGAGGAG	CCGCGGGCGC	CGTGGATAGA	GCAGGAGGGG	CCGGAGTATT	GGGACCGGGA	GACACAGATC	TGCAAGGCCA	AGGCACAGAC	TGACCGAGAG
B*270502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*2719	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*2730	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*44020101	---GA---	-----	-A-----	-----	-----	-----	-----	-C---A---	-CA-----	-T-----
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
B*2702	AACCTGCGGA	TCGCGCTCCG	CTACTACAAC	CAGAGCGAGG	CCG GGTCTCA	CACCTCCAG	AATATGTATG	GCTGCGACGT	GGGCGCGAC	GGGCGCCTCC
B*270502	G-----	C-CT---	-----	-----	--- ---	-----	-----	-----	-----	-----
B*2719	G-----	C-CT---	-----	-----	--- ---	--T-A---	-GG---C-	-----	-----	-----
B*2730	-----	-----	-----	-----	--- ---	--T-A---	-GG---C-	-----	-----	-----
B*44020101	-----C-	C-----	-----	-----	--- ---	--T-A---	-GG---C-	-----	-----	-----
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
B*2702	TCCGCGGGTA	CCACCAGGAC	GCCTACGACG	GCAAGGATTA	CATCGCCCTG	AACGAGGACC	TGAGCTCCTG	GACCGCCGCG	GACACGGCGG	CTCAGATCAC
B*270502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*2719	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*2730	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*44020101	-----	TG-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G---	-----C---	-----
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
B*2702	CCAGCGCAAG	TGGGAGGCGG	CCCCTGTGGC	GGAGCAGCTG	AGAGCCTACC	TGGAGGGCGA	GTGCGTGGAG	TGGCTCCGCA	GATACTGGA	GAACGGGAAG
B*270502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*2719	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*2730	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*44020101	-----	-----	-----	-----GAC	-----	-----CT	-----	-C-----	-----	-----
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
B*2702	GAGACGCTGC	AGCGCGCGG A	CCCCCAAAG	ACACACGTGA	CCCACCACC	CATCTCTGAC	CATGAGGCCA	CCCTGAGGTG	CTGGGCCCTG	GGCTTCTACC
B*270502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*2719	-----	----- *	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
B*2730	-----	----- *	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
B*44020101	-----	-----	-----T-----	-----	-----	-----	-----	-----T--	-----	-----
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
B*2702	CTGCGGAGAT	CACACTGACC	TGGCAGCGGG	ATGGCGAGGA	CCAAACTCAG	GACACTGAGC	TTGTGGAGAC	CAGACCAGCA	GGAGATAGAA	CCTTCCAGAA
B*270502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*2719	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
B*2730	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
B*44020101	-----	-----	-----	-----	-----	-----C---	-----	-----	-----	-----
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
B*2702	GTGGGCAGCT	GTGTTGGTGC	CTTCTGGAGA	AGAGCAGAGA	TACACATGCC	ATGTACAGCA	TGAGGGGCTG	CCGAAGCCCC	TCACCTTGGG	ATGGG AGCCG
B*270502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----- -----
B*2719	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	***** *****
B*2730	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	***** *****
B*44020101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----- -----
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
B*2702	TCTTCCAGT	CCACCGTCC	CATCGTGGGC	ATTGTTGCTG	GCCTGGCTGT	CCTAGCAGTT	GTGGTCATCG	GAGCTGTGGT	CGTGTCTGTG	ATGTGTAGGA
B*270502	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B*2719	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
B*2730	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
B*44020101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	
B*2702	GGAAGAGCTC	AG GTGGAAAA	GGAGGGGAGCT	ACTCTCAGGC	TGCGT GCAGC	GACAGTGCCC	AGGGCTCTGA	TGTGTCTCTC	ACAGCTTGA	
B*270502	-----	-- -----	-----	-----	----- -----	-----	-----	-----	-----	
B*2719	*****	** *****	*****	*****	***** *****	*****	*****	*****	*****	
B*2730	*****	** *****	*****	*****	***** *****	*****	*****	*****	*****	
B*44020101	-----	-- -----	-----	-----	----- -----	-----	-----	-----	-----	

Identični nukleotidi označeni su crticama

A4(179pb)-TNFa-6(107pb)-DRB1\*01. Budući da ovaj haplotip ne sadrži alele DRB1\*16 i TNFa-9 (113pb), možemo pretpostaviti da ne sadrži ni alel HLA-B\*2702.

Na kraju, treba istaknuti da su mikrosatelitski biljezi i istraživanja produženih haplotipova HLA danas

snažno oruđe koje omogućuje bolje definiranje evolucije, podrijetla i migracija različitih populacija, kao i usporedbu različitih populacija. Spoznaje do kojih smo došli u ovom istraživanju, o mogućnosti definiranja alela gena HLA-B\*27 na temelju analize produženih haplotipo-

va koji sadrže mikrosatelitski lokus TNFa, mogu imati daljnju primjenu u razjašnjavanju uloge pojedinih alela gena HLA-B\*27, i njemu susjednih mikrosatelita u pojavi spondiloartropatija te ukazati na peptide koji su važni u patogenezi ovih bolesti. U buduća istraživanja

trebalo bi uključiti osobe oboljele od spondiloartropatija koje su pozitivne i negativne za gen HLA-B\*27, kako bi se analizom njihovih produženih haplotipova utvrdio onaj produženi haplotip na temelju kojeg bi se mogao predvidjeti razvoj bolesti.

### Zaključak

Analizom produženih haplotipova utvrdili smo najjaču neravnotežu udruživanja između alela lokusa HLA-B i alela mikrosatelitskih lokusa D6S2927 i STR\_MICA budući da na svim haplotipovima gena HLA-B\*27, bez obzira na alel gena HLA-B\*27, na mikrosatelitskom lokusu D6S2927 uočen alel D6S2927-1 (213pb), a na lokusu STR\_MICA alel STR\_MICA-A4 (179pb). Na lokusu TNFa na najvećem broju produženih haplotipova alela HLA-B\*2702 (80,0%) pronađen je alel TNFa-9

(113pb) što je rezultat neravnoteže udruživanja tog alela s alelom HLA-DRB1\*16, dok se u niti jednom haplotipu alela HLA-B\*2705 nisu pojavili aleli TNFa-9 (113pb) i HLA-DRB1\*16. Nije uočena razlika između produženih haplotipova alela B\*2702 i B\*2730 što govori u prilog nastanku alela B\*2730 od alela B\*2702. Produženi haplotip rijetkog alela HLA-B\*2730 u sve je 3 obitelji bio isti (HLA-A3-B\*2730-D6S2927-1-STR\_MICA-A4-TNFA-9-DRB1\*16), što ukazuje na njegovu očuvanost.

### Literatura

1. Blanco-Gelaz MA, Lopez-Vazquez A, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. Genetic variability, molecular evolution, and geographic diversity of HLA-B27. *Human Immunology* 2001;62:1042-1050.
2. Khan MA. Prevalence of HLA-B27 in world populations. U: Lopez-Larrea C, ur. *HLA-B27 in the development of spondyloarthropathies*. Austin, TX: Landes, Springer. 1998:1-16.
3. Gonzalez-Roces S, Alvarez MV, Gonzalez S. i sur. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1997;49:116-123.
4. Witter K, Albert T, Volgger A, Zahn R, Scholz S. Routine HLA sequence-specific-oligonucleotide typing and confirming sequence-based typing of a prospective bone marrow donor identified a novel B\*27 allele, HLA-B\*2734. *Tissue Antigens* 2006;68:527-28.
5. Li Z, Zou HY, Shao CP, Tang S, Wang DM. Identification of a novel HLA-B\*56 allele, B\*5618 and an extension of B\*2736 by sequence-based typing. *Tissue Antigens* 2007;69:365-366.
6. Ramos M, Lopez de Castro JA. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 2002;60:191-205.
7. Reveille JD. Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2006;3:601-609.
8. Varnavidou-Nicolaidou A, Karpasitou K, Georgiou D. i sur. HLA-B27 in the Greek Cypriot population: Distribution of subtypes in patients with ankylosing spondylitis and other HLA-B27 related diseases. The possible protective role of B\*2707. *Human Immunology* 2004;65:1451-1454.
9. Akkoc N, Khan MA. HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *APLAR J Rheumatol* 2005;8:146-153.
10. Lopez-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK. i sur. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis: evidence for new associations. *Tissue Antigens* 1995;45:169-176.
11. Paladini F, Taccari E, Fiorillo MT. i sur. Distribution of HLA-B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies. *Arthritis & Rheumatism* 2005;52:3319-3321.
12. Armas JB, Gonazalez S, Martinez-Borra J. i sur. Susceptibility to ankylosing spondylitis is independent of the Bw4 and Bw6 epitope. *Tissue Antigens* 1999;53:237-243.
13. Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Gomez-Casado E. i sur. Relatedness among Basques, Portuguese, Spaniards, and Algerians studied by HLA allelic frequencies and haplotypes. *Immunogenetics* 1997;47:37-43.
14. Garcia-Fernandez S, Gonzalez S, Mina Blanco A, Martinez-Borra J, Blanco-Gelaz M, Lopez-Vazquez A, Lopez-Larrea C. New insights regarding HLA-B27 diversity in Asian population. *Tissue Antigens* 2001;58:259-262.
15. Voorter CEM, Swelsen WTN, van der Berg-Loonen EM. B\*27 in molecular diagnostics: Impact of new alleles and polymorphism outside exons 2 and 3. *Tissue Antigens* 2002;60:25-35.
16. Vidan-Jeras B, Kunilo S, Fae I, Kandus A, Fischer GF. A novel HLA-B\*2730 allele found in a Slovene patient affected with IgA nephropathy. *International Journal of Immunogenetics* 2006;33:371-373.
17. Grubić Z, Štingl K, Čečuk-Jeličić E, Žunec R, Kerhin-Brkljačić V. Application of HLA microsatellite loci. *Periodicum biologorum* 2004;106:255-258.
18. Foissac A, Cambon-Thomsen A. Microsatellites in the HLA region: 1998 update. *Tissue Antigens* 1998;52:318-352.
19. Thomas R, Philip J, Banerjee M. Association of an extended haplotype of HLA class I alleles and their flan-

king microsatellites with spondyloarthropathies in South Indian patients. *Human Immunology* 2006;67:318-323.

20. Rueda B, Pascual M, Lopez-Nevot MA, Gonzalez E, Martin J. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GTC repeats. *Tissue Antigens* 2002;60:526-528.

21. Grubić Z, Štingl K, Žunec R, Car H, Čečuk-Jeličić E, Brkljačić-Kerhin V. Linkage disequilibrium

between human leucocyte antigen-B and closely linked microsatellites in the Croatian population. *Tissue Antigens* 2007;69:86-94.

22. Gourraud PA, Mano S, Barnetche T, Carrington M, Inoko H, Cambon-Thomsen A. Integration of microsatellite characteristics in the MHC region: a literature and sequence based analysis. *Tissue Antigens* 2004;64:543-555.