

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

HAPLOTIPSKE VEZE DVA NAJČEŠĆA PODTIPA GENA HLA-B*27 U HRVATSKOJ POPULACIJI

HAPLOTYPIC ASSOCIATIONS OF THE TWO MOST COMMON HLA-B*27 ALLELES IN THE CROATIAN POPULATION

Zorana Grubić ♦ Renata Žunec ♦ Katarina Štingl ♦ Danijela Sviličić ♦ Vesna Kerhin-Brkljačić

Sažetak

Cilj ovog rada bio je analizirati produžene haplotipove dva najčešća podtipa gena HLA-B*27 (B*2702 i *2705) u hrvatskoj populaciji. Analizirana je skupina od 111 nesrodnih ispitanika pozitivnih za gen HLA-B*27, koji do početka ovog istraživanja nisu imali nikakve simptome ankilozantnog spondilitisa. Ukupan broj praćenih haplotipskih veza bio je 112 jer je jedna osoba bila homozigot za gen HLA-B*27. Podtip gena HLA-B*27 i geni na lokusu HLA-A i -DRB1 određeni su metodom PCR-SSP kod svih ispitanika. Od 7 različitih podtipova gena HLA-B*27 uočenih među našim ispitanicima, najčešći je bio alel B*2705 (61,6%) te alel B*2702 (30,4%), dok su preostali aleli (B*2701, B*2703, B*2704, B*2708 i B*2714) uočeni jedanput,

odnosno, dvaput. Najčešći gen na lokusu HLA-A bio je HLA-A*02, kako unutar haplotipskih veza alela B*2702 tako i unutar veza alela B*2705. Nije uočena razlika u zastupljenosti gena na ovom lokusu između haplotipskih veza alela B*2702 i alela B*2705. Analiza haplotipskih veza HLA-B, -DRB1 ukazala je na jaku povezanost alela B*2702 i DRB1*16 koji su se zajedno pojavili s učestalošću od 44,1%, što je statistički značajno u usporedbi s učestalošću s kojom se DRB1*16 pojavio unutar haplotipskih veza alela B*2705 (4,0%; $P < 0,00001$). Unutar skupine od 69 haplotipskih veza alela B*2705 uočena je statistički značajno povećana učestalost HLA-DRB1*01 u usporedbi sa skupinom ($N=34$) haplotipskih veza alela B*2702 (28,0% naspram 1,5%; $P < 0,00001$).

Ključne riječi

HLA-B*2702, HLA-B*2705, haplotipske veze, populacijska istraživanja

Summary

The aim of the present study was to analyze haplotypic associations of two the most common HLA-B*27 subtypes (B*2702 and *2705) in the Croatian population. One hundred and eleven unrelated HLA-B*27 positive individuals were included. None of them had any sign of ankylosing spondylitis. The total number of analyzed haplotypic associations was 112 because one individual was homozygous for HLA-B*27. HLA-B*27 alleles as well as HLA-A and DRB1 specificities were tested by PCR-SSP method. Among seven different HLA-B*27 alleles observed among our individuals, B*2705 was the most frequent (61.6%), followed by B*2702 (30.4%), while the frequency of

all other observed alleles (B*2701, B*2703, B*2704, B*2708 i B*2714) was less than 2.0%. HLA-A*02 was the most frequent specificity at HLA-A locus in both groups of haplotypic associations (B*2702 and B*2705) and no difference in distribution of HLA-A genes was observed between two groups. Analysis of HLA-B*2702 haplotypic associations showed the high frequency of DRB1*16 (44.2%) in comparison to B*2705 haplotypic associations (4.0%) with significant P value ($P < 0.00001$). HLA-DRB1*01 demonstrated significantly higher presence among 69 B*2705 haplotypic associations compared to 34 B*2702 haplotypic associations (28.0% vs. 1.5%; $P < 0.00001$).

Key words

HLA-B*2702, HLA-B*2705, haplotypic associations, population investigations

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

Uvod

Gen HLA-B*27 je zbog svoje podložnosti za brojne reumatske bolesti jedan od najistraživanijih gena sustava HLA. Povezanost s ankilozantnim spondilitisom (AS) poznata je već više od 30 godina, međutim do danas nisu u potpunosti objašnjeni mehanizmi te povezanosti (1).

Raspodjela podtipova gena HLA-B*27 u svijetu razlikuje se od populacije do populacije. Učestalost gena B*27 iznosi od 0,6% (Mongolija) do 10,4% (Rusija - otok Sahalin). To je jedan od čestih gena na lokusu HLA-B među populacijama bijele rase dok je s vrlo niskom učestalošću prisutan na Mikroneziji ili potpuno odsutan među pripadnicima populacija centralne i južne Amerike te populacijama ekvatorijalne i južne Afrike (2-4).

Kad govorimo o serološki dobro definiranom antigenu HLA-B27, treba istaknuti da nije riječ o jedinstvenoj specifičnosti tj. da unutar tog gena postoji veliki broj alela-podtipova (do danas je poznato 35 različitih alela) koji se označavaju od HLA-B*2701 do HLA-B*2736 (prema bazi podataka IMGT/HLA) (5,6).

Na temelju dosadašnjih istraživanja i podataka prevladava mišljenje da su svi ti aleli gena HLA-B*27 nastali iz najrasprostranjenijeg alela, alela HLA-B*2705 (7-9).

Populacijska istraživanja, kao i istraživanja povezanosti pojedinih alela B*27 i AS-a pokazala su da su aleli HLA-B*2702, B*2704, B*2705, B*2707, kao

i B*2714 povezani s bolešću, dok su HLA-B*2706 i B*2709 zaštitni (7,10-12). Jedna od pretpostavki kojom se pokušava objasniti zašto pojedini aleli B*27 pridonose podložnosti za bolest jest da ti aleli vežu peptide važne u patogenezi same bolesti.

Učestalost gena HLA-B*27 u Hrvatskoj je približno 5,5%, a molekularna istraživanja provedena prije nekoliko godina pokazala su da su najčešći aleli između 16 tada poznatih alela bili HLA-B*2705 i B*2702 (13,14).

Unatoč brojnim provedenim istraživanjima o raznovrsnosti alela HLA-B*27 kao i njihovoj rasprostranjenosti u svijetu, slika raspodjele podtipova ovog gena još uvijek nije potpuna. Razlog tome leži u činjenici da se neprekidno otkrivaju novi aleli gena HLA-B*27. Rasprostranjenost pojedinih alela gena HLA-B*27 nije važna samo sa stajališta podložnosti/zaštite za AS i druge spondiloartropatije, već i s antropološkog stajališta o prisutnosti rijetkih alela u različitim populacijama i rasama. Spoznaja o rasprostranjenosti rijetkih alela HLA pa tako i alela skupine HLA-B27 korisna je kao genetski biljeg u praćenju migracija populacija kao i međusobnih miješanja populacija (15).

Cilj ovog rada bio je u prvom redu novelirati sliku o rasprostranjenosti pojedinih alela gena HLA-B*27 u Hrvatskoj te analizirati haplotipske veze dva najčešća podtipa gena HLA-B*27, alela B*2702 i B*2705.

Materijal i metode

Ispitanici

Skupina od 111 nesrodnih ispitanika pozitivnih za gen HLA-B*27 u Hrvatskoj analizirana je u svrhu istraživanja raspodjele učestalosti podtipova gena HLA-B*27. Ni jedan od ispitanika nije pokazao nikakve znakove ankilozantnog spondilitisa do početka ovog istraživanja. Među ispitanicima je jedna osoba bila homozigot za gen HLA-B*27 te je stoga ukupan broj analiziranih alela bio 112.

Ispitanicima su prethodno određeni geni lokusa HLA-A i -DRB1 jednom od dvije molekularne metode: metodom PCR-SSP (engl. Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers) ili PCR-SSO (engl. Sequence Specific Oligo).

Rezultati

Na slici 1 prikazana je raspodjela podtipova gena HLA-B*27 u skupini od 111 nesrodnih ispitanika. Ukupan broj alela bio je 112 jer je jedna osoba bila homozigot za alel B*2705. Podtip B*2705 (61,6%) i B*2702 (30,4%) bili su najzastupljeniji među našim ispitanicima dok su se preostali podtipovi gena HLA-B*27 (B*2701, B*2703, B*2704, B*2708 i B*2714) pojavili s učestalošću manjom od 2,0%.

Svim ispitanicima uzeto je 10 ml krvi s EDTA iz koje je izolirana DNA pomoću komercijalnog kita za izolaciju (Macherey-Nagel, Duren, Njemačka).

Određivanje alela gena HLA-B*27

Podtipovi gena HLA-B*27 analizirani su standardnim protokolom (Olerup SSP-HLA-B*27, Genovision, SAD) kojim se umnažaju egzon 2 i egzon 3 gena HLA-B. Naime, u tim egzonima leži najveći broj razlika između pojedinih alela HLA razreda I.

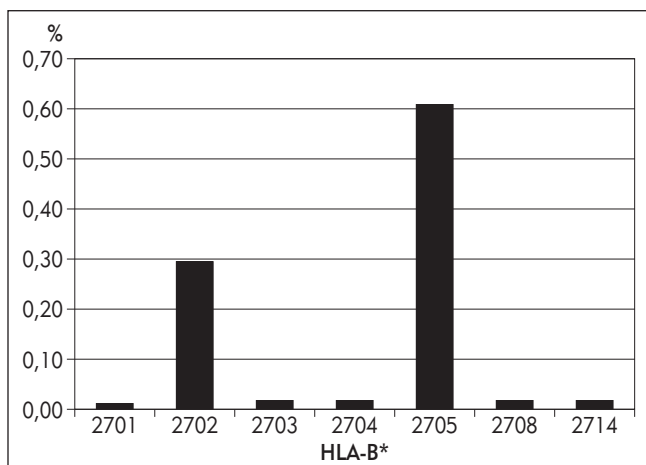
Statistička obrada

Učestalost alela gena HLA-B*27 izračunavana je direktnim brojanjem dok je povezanost između alela dva lokusa HLA izračunavana pomoću tablice 2x2 i χ^2 testa s Yatesovom korekcijom.

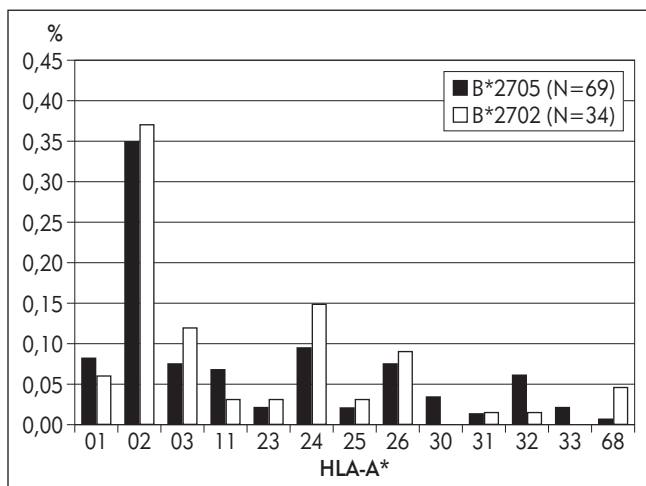
Sljedeći cilj ovog rada bio je utvrditi koji se geni lokusa HLA-A, odnosno geni lokusa HLA-DRB1 javljaju s najvećom učestalošću u haplotipskim vezama s dva najčešća podtipa u hrvatskoj populaciji B*2702 i B*2705.

Analiza gena lokusa HLA-A između dvije skupine haplotipskih veza nije pokazala razlike. Od 13 različitih gena na lokusu HLA-A u obje se skupine haplotip-

Slika 1. Raspodjela alela HLA-B*27 u skupini nesrodnih ispitanika pozitivnih za HLA-B*27 u hrvatskoj populaciji (N=112)
 Figure 1. The distribution of HLA-B*27 alleles among HLA-B*27 positive Croatian individuals (N=112)



Slika 2. Raspodjela gena na lokusu HLA-A u haplotipskim vezama gena HLA-B*27 u hrvatskoj populaciji
 Figure 2. The distribution of HLA-A genes in HLA-B*27 haplotypic associations in the Croatian population

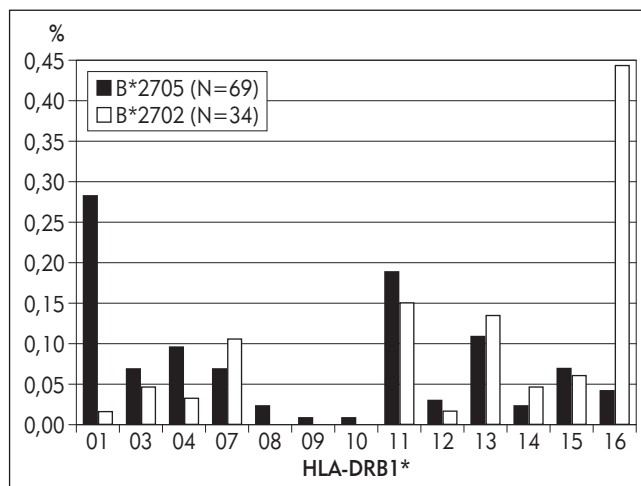


skih veza najčešće javljao gen HLA-A*02 (slika 2).

Provedena analiza na uzorku od 112 haplotipskih veza pokazala je razlike između dvije skupine haplotipskih veza s obzirom na raspodjelu gena na lokusu HLA-DRB1 (slika 3).

U sklopu 34 haplotipske veze podtipa B*2702, gen DRB1*16 bio je najzastupljeniji (44,18%). Učestalost gena DRB1*16 među haplotipskim vezama podtipa B*2705 bila je izrazito mala (4,00%), što se statistički znatno razlikuje ($P < 0,00001$) u usporedbi s haplotipskim vezama podtipa B*2702. Istovremeno je unutar skupine od 69 haplotipskih veza alela B*2705 uočena povećana učestalost HLA-DRB1*01 u usporedbi s haplotipskim vezama alela B*2702 (28,0% naspram 1,5%; $P < 0,00001$). Razlika u prisutnosti gena DRB1*04 između dvije haplotipske skupine nije bila statistički znatna.

Slika 3. Raspodjela gena lokusa HLA-DRB1 u haplotipskim vezama gena HLA-B*27 u hrvatskoj populaciji
 Figure 3. The distribution of HLA-DRB1 genes in HLA-B*27 haplotypic associations in the Croatian population



Rasprava

Dobro je poznata činjenica da se aleli gena HLA-B*27 međusobno razlikuju u jednoj ili više aminokiselina i to uglavnom na pozicijama unutar egzona 2 i egzona 3. Mnogobrojna istraživanja provedena širom svijeta ustanovila su da se zastupljenost pojedinih alela gena HLA-B*27 razlikuje od populacije do populacije, što je rezultat podrijetla tih populacija, odnosno nastanka pojedinih podtipova (2,3). Rezultati ovog rada dali su novu sliku o zastupljenosti podtipova gena HLA-B*27 u hrvatskoj populaciji i predstavljaju nastavak prethodnog istraživanja o raznovrsnosti podtipova gena HLA-B*27 u našoj populaciji kojim je otkriveno da je podtip B*2705 dominantan alel kao i među pripadnicima drugih populacija bijele rase (2,16).

Zastupljenost alela B*2702 također je u skladu s prethodnim istraživanjem. Taj je alel prisutan samo među populacijama bijele rase i dominantan je na Sred-

njem istoku (Židovi) te među Berberima na sjeveru Afrike (2,17). Na temelju dosadašnjih rezultata pretpostavlja se da je alel B*2702 nastao iz alela B*2705 mehanizmom genske konverzije upravo unutar populacija Srednjeg istoka iz kojih se proširio u populacije sjeverne Afrike te među druge stanovnike Bliskog istoka (2). U ovom istraživanju također smo otkrili neke od slabo zastupljenih alela gena HLA-B*27. Jedan od takvih alela je alel B*2701 koji spada u skupinu rijetkih alela i do sada je uočen u Turskoj i na Tajvanu (2,18). Analize redosljeda nukleotida ovog alela pokazale su da se on razlikuje od alela B*2705 u domeni $\alpha 1$ i to na pozicijama 74, 77 i 81. Zanimljivo je spomenuti da smo našli i alel B*2703 koji je najčešći od svih podtipova gena HLA-B*27 u Zapadnoj Africi (19,20). On se pak od alela B*2705 razlikuje samo u jednoj aminokiselini i to na poziciji 59 u domeni $\alpha 1$. Nasuprot tomu, uočena učestalost alela B*2704

među našim ispitanicima slična je onoj među Židovima, a znatno je manja nego među stanovnicima Kine, Indonezije, Indije ili Polinezije (21,22). Pretpostavka je da je ovaj alel, unatoč razlikama u sve tri domene teškog lanca ($\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$) u odnosu na alel B*2705, također nastao iz alela B*2705 (7). Posljednja dva alela, alel B*2708 i B*2714 otkrivena su samo kod po jednog našeg ispitanika i do sada nisu uočena u Hrvatskoj. Alel B*2708 zastupljen je među drugim populacijama Evrope, ali isto tako i među stanovnicima Azora, Indije i Venezuele (pleme Zulian) s učestalošću vrlo sličnom kao kod nas. Alel B*2708 se razlikuje od alela B*2705 na 4 pozicije (77, 80, 82 i 83) u domeni $\alpha 1$ (21-25). Potrebno je istaknuti da za alel B*2714 nema podataka o njegovoj prisutnosti među pripadnicima evropskih populacija. Naime, alel B*2714 je prvi put uočen u Sjevernoj Americi, a nešto kasnije među stanovnicima Sibira (slavenskog podrijetla) i Indije. O njegovom nastanku prevladava mišljenje

da je također nastao od alela B*2705 i to mutacijama u domeni $\alpha 2$ na pozicijama 95, 97 i 103 (24).

Analize haplotipskih veza dva najčešća alela gena HLA-B*27 (B*2702 i B*2705) pokazale su vrlo jaku neravnotežu udruživanja (engl. linkage disequilibrium - LD) između alela B*2702 i DRB1*16 u hrvatskoj populaciji. Rezultati istraživanja upućuju da se kod osoba koje imaju haplotip HLA-B*27, -DRB1*16 može s vrlo velikom sigurnošću pretpostaviti da će imati alel B*2702. Nasuprot tome, ako osoba pozitivna za gen HLA-B*27 ima na lokusu HLA-DRB1 gen DRB1*01, vrlo vjerojatno ima alel B*2705.

Naposlijetku, možemo reći da je za donošenje bilo kakvog konačnog zaključka o neravnoteži udruživanja između najčešćih podtipova gena HLA-B*27 i gena na lokusu HLA-DRB1 potrebno proširiti istraživanje kako brojem nesrodnih osoba pozitivnih za gen B*27, tako i unutar obitelji pozitivnih za gen HLA-B*27.

Literatura

1. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A27. *Lancet* 1973;1:904-907.
2. 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. *Hum Immunol* 2001; 62:1042-1050.
3. Khan MA. Prevalence of HLA-B27 in world populations. In: Lopez-Larrea C, ed. *HLA-B27 in the development of spondyloarthropathies*. Austin, TX: Landes, Springer. 1997:1-16.
4. Gonzalez-Roces S, Alvarez MV, Gonzalez S, Dieye A, Makni H, Woodfield L, Housan L, Konenkov V, Abbadi MC, Grunnet N, Coto E, Lopez-Larrea C. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1997;49: 116-123.
5. 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.
6. 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.
7. Ramos M, Lopez de Castro. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 2002;60:191-205.
8. Reveille JD. Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology* 2006;3:601-609.
9. Grubić Z. Gen HLA-B27: polimorfizam, evolucija, raspodjela i povezanost sa spondiloartropatijama. *Reumatizam* 2006;53:5-10.
10. Akkoc N, Khan MA. HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *APLAR J Rheumatol* 2005;8:146-153.
11. Lopez-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK, Chiewsilp P, Isarangkura D, Kanga U. et al. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis: evidence for new associations. *Tissue Antigens* 1995;45:169-176.
12. Paladini F, Taccari E, Fiorillo MT, Cauli A, Passiu G, Mathieu A. et al. Distribution of HLA-B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies. *Arthritis & Rheumatism* 2005;52:3319-3321.
13. Grubić Z., Žunec R., Čečuk-Jeličić E., Kerhin-Brkljačić V, Kaštelan A. Polymorphism of HLA-A, B, DRB1, DQA1 and DQB1 haplotypes in the Croatian population. *Eur J Immunogenet* 2000;27:47-51.
14. Grubić Z, Kerhin-Brkljačić V, Perić P, Čečuk-Jeličić E, Žunec R, Kaštelan A. HLA-B27 subtypes in Croatian patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 2001;30:51-52.
15. Kempenich JH, Setterholm M., Maiers M. Haplotype associations of 90 rare alleles from the National Marrow Donor Program. *Tissue Antigens* 2006;67: 284-289.
16. Armas JB, Gonzalez S, Martinez-Borra J, Laranjeira F, Ribeiro E, Correia J, Ferreira ML, Toste M, Lopez-Vazquez A, Lopez-Larrea C. Susceptibility to ankylosing spondylitis is independent of the Bw4 and Bw6 epitope. *Tissue Antigens* 1999;53:237-243.
17. Boisgerault F, Tieng V, Stolzenberg MC, Dulphey N, Khalil I, Tamouza R, Charron D, Toubert A. Differences in endogenous peptides presented by HLA-

B*2705 and B*2703 allelic variants implications for susceptibility to spondylarthropathies. *J Clin Invest* 1996; 98:2764-2770.

18. Birinci A, Bilgici A, Kuru O, Durupinar B. HLA-B27 polymorphism in Turkish patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2006;26:285-287.

19. Hill AVS, Allsopp CEM, Kwiatkowski D, Anstey NM, Greenwood BM, McMichael AJ. HLA-B27 and an African B27 subtype. *Lancet* 1991;337:640-642.

20. Rognana D, Krebs S, Kuonena O, Lamasb JR, López de Castro JA, Folkersa G. Fine specificity of antigen binding to two class I major histocompatibility proteins (B*2705 and B*2703) differing in a single amino acid residue. *J Computer-Aided Molec Design* 1997;11:463-478.

21. Cipriani A, Rivera S, Hassanhi M, Marquez G, Hernandez R, Villalobos C, Monti M. HLA-B27 Subtypes Determination in Patients With Ankylosing Spondylitis From Zulia, Venezuela. *Human Immunology* 2003;64:745-749.

22. Khan MA, Mathieu A, Sorrentino R, Akkoc N. The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes. *Autoimmun Rev* 2007;6:183-189.

23. Gonzalez S, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Blanco-Gelaz MA, Rodrigo L, Sanchez del Rio J, Lopez-Vazquez A, Torre-Alonso JC, Lopez-Larrea C. High variability of HLA-B27 alleles in ankylosing spondylitis and related spondyloarthropathies in the population of Northern Spain. *Human Immunology* 2002;63:673-676.

24. Shankarkumar U, Ghosh K, Mohanty D. Novel HLA B*2714 and B*2708 allele associations in seronegative spondylarthritis patients and haemophilia patients with chronic synovitis in India. *Tissue Antigens* 2003;62:175-178.

25. 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.