

# Povezanost mutacije (egzon 7- V281L) gena CYP21A2 s haplotipovima HLA u Hrvatskoj

---

Zvečić, Sabina

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:535534>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



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

Sabina Zvečić

**Povezanost mutacije (egzon 7 – V281L) gena**  
***CYP21A2* s haplotipovima HLA u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

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

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Zorani Grubić, koja je svojim znanstvenim i stručnim savjetima oblikovala ideju i pomogla mi u izradi ovoga diplomskog rada. Srdačno zahvaljujem dr.sc. Katarini Štingl i Mariji Maskalan, mag. biol. mol. koje su nesebično prenosile na mene svoje znanje, te mi svojom strpljivošću olakšale rješavanje svih problema na koje sam naišla tijekom istraživanja. Želim zahvaliti i svim ostalim djelatnicima Kliničke jedinice za tipizaciju tkiva na razumijevanju, susretljivosti i vrlo ugodnoj radnoj atmosferi.

Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima, baki, djedu i zaručniku na ljubavi i bezuvjetnoj podršci!

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Povezanost mutacije (egzon 7 – V281L) gena *CYP21A2* s haplotipovima HLA u Hrvatskoj**

Sabina Zvečić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom radu analizirana je učestalost mutacije gena *CYP21A2* u egzonu 7 (V281L) unutar skupine zdravih ispitanika pozitivnih za jedan ili kombinaciju alela (A\*33:01, B\*14:02, DRB1\*01:02, DRB1\*03:01) (N=177), kao i skupine ispitanika negativnih za navedene alele HLA (N=40). Svim ispitanicima određeno je prisustvo/odsustvo mutacije *CYP21A2* Ex7 V281L lančanom reakcijom polimerazom i početnicama specifičnim za zdravi/mutirani alel. Mutacija gena *CYP21A2* Ex7 V281L pokazala je statistički vrlo značajnu povezanost ( $p < 0,0001$ ) s alelom B\*14:02, haplotipom HLA-B\*14:02-DRB1\*01:02, haplotipom HLA-A\*33:01-B\*14:02 i haplotipom HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*01:02. Mutacija *CYP21A2* Ex7 V281L nije statistički značajno češće prisutna među ispitanicima nositeljima haplotipa HLA-B\*14:02-DRB1\*03:01 ( $p > 0,05$ ), dok ispitanici pozitivni za haplotip HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*03:01 imaju statistički značajno veću šansu da će nositi i praćenu mutaciju ( $p = 0,0040$ ).

(57 stranica, 25 slike, 13 tablica, 24 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: geni HLA, gen *CYP21A2*, B\*14:02, haplotipovi HLA, populacijska istraživanja

Voditelj: Dr.sc. Zorana Grubić, izv.prof., KBC Zagreb  
Suvoditelj: Dr.sc. Ana Galov, doc., Sveučilište u Zagrebu

Ocjenjivači: Dr.sc. Ana Galov, doc., Sveučilište u Zagrebu  
Dr.sc. Renata Šoštarić, doc., Sveučilište u Zagrebu  
Dr.sc. Martina Šeruga Musić, doc., Sveučilište u Zagrebu

Zamjena: Dr.sc. Ivančica Ternjej, izv.prof., Sveučilište u Zagrebu

Rad prihvaćen: 03.09.2015.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

## **Association of EX 7 (V281L) mutation in *CYP21A2* gene with HLA haplotypes in Croatia**

Sabina Zvečić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

This study represents the frequency analysis of the *CYP21A2* gene mutation located in the exon 7 (V281L). Analysis was performed in the group of healthy subjects who carried one or a combination of the following alleles: A\*33:01, B\*14:02, DRB1\*01:02, DRB1\*03:01 (N=177), as well as within a group of subjects who did not carry any of the above mentioned HLA alleles (N=40). The presence/absence of the *CYP21A2* Ex7 V281L mutation was determined for all subjects using the polymerase chain reaction and primers specific for wild type/mutant allele. The *CYP21A2* gene Ex7 V281L mutation has shown very significant association ( $p < 0,0001$ ) with B\*14:02 allele, HLA-B\*14:02-DRB1\*01:02 haplotype, HLA-A\*33:01-B\*14:02 haplotype and HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*01:02 haplotype. The *CYP21A2* gene Ex7 V281L mutation was not significantly more present among subjects who carried HLA-B\*14:02-DRB1\*03:01 haplotype ( $p > 0,05$ ), while the subjects positive for the HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*03:01 haplotype had a significantly higher probability of carrying the analysed mutation as well ( $p = 0,0040$ ).

(57 pages, 25 figures, 13 tables, 24 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: HLA genes, *CYP21A2* gene, B\*14:02, HLA haplotypes, population investigations

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

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

Reviewers: Dr. Ana Galov, Assoc.Prof., University in Zagreb

Dr. Renata Šoštarić, Assoc.Prof., University in Zagreb

Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc.Prof., University in Zagreb

Replacement: Dr. Ivančica Ternjej, Asst.Prof., University in Zagreb

Thesis accepted: 03.09.2015.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. SUSTAV HLA .....	2
1.1.1. OSOBINE SUSTAVA HLA .....	2
1.1.2. SMJEŠTAJ I ORGANIZACIJA SUSTAVA HLA .....	4
1.1.3. PRIMJENA ODREĐIVANJA GENA I MOLEKULA HLA .....	5
1.1.4. GENI HLA .....	6
1.1.4.1. GENI HLA RAZREDA I .....	6
1.1.4.2. GENI HLA RAZREDA II .....	7
1.1.5. MOLEKULE HLA .....	8
1.1.5.1. MOLEKULE HLA RAZREDA I .....	8
1.1.5.2. MOLEKULE HLA RAZREDA II .....	10
1.1.6. POLIMORFIZAM HLA .....	11
1.1.6.1. ALELI HLA .....	12
1.1.6.2. HAPLOTIPOVI HLA .....	17
1.2. KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA (KAH) .....	20
1.3. GEN <i>CYP21A2</i> .....	22
1.3.1. MUTACIJE GENA <i>CYP21A2</i> .....	24
1.3.2. POVEZANOST MUTACIJE GENA <i>CYP21A2</i> I SUSTAVA HLA .....	26
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	27
3. MATERIJAL I METODE .....	29
3.1. MATERIJAL .....	30

3.1.1. ISPITANICI .....	30
3.2. METODE .....	30
3.2.1. IZOLACIJA DNA.....	30
3.2.2. ODREĐIVANJE ALELA HLA-A, -B, -DRB1 METODOM PCR-SSO .....	31
3.2.3. ODREĐIVANJE ALELA HLA-A,-B I -DRB1 METODOM PCR-SSP .....	32
3.2.4. ODREĐIVANJE MUTACIJE GENA <i>CYP21A2 Ex7 V281L</i> .....	33
3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	35
4. REZULTATI.....	36
4.1. RASPODJELA MUTACIJA GENA <i>CYP21A2</i> NA EGZONU 7 V281L UNUTAR ISPITIVANE SKUPINE .....	37
4.2. USPOREDBA UČESTALOSTI ALELA HLA-A,-B,-DRB1 UNUTAR ISPITIVANE SKUPINE I CBMDR .....	42
5. RASPRAVA.....	46
6. ZAKLJUČAK .....	51
7. LITERATURA.....	53
8. ŽIVOTOPIS .....	56



## **1. UVOD**

## **1.1. SUSTAV HLA**

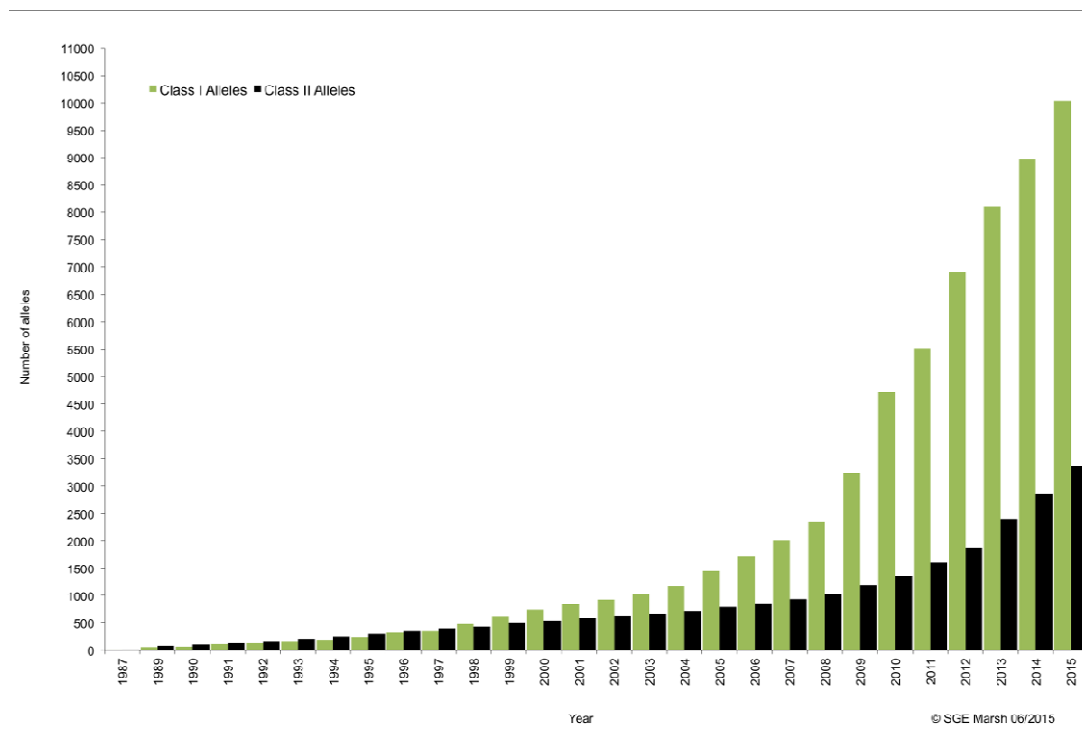
Svaka stanica u ljudskom organizmu ima mnogobrojne bjelančevine/antigene koje u drugom organizmu mogu izazvati imunološku reakciju. Među njima, kod ljudi, najznačajniji su antigeni glavnog sustava tkivne podudarnosti, odnosno antigeni HLA (*engl. Human Leukocyte Antigens*). Ključnu ulogu u zadaći imunološkog sustava, razlikovanja vlastitog od tuđeg radi pokretanja imunološkog odgovora na tuđe antigene i održavanja integriteta vlastitog organizma, imaju upravo antigeni/molekule HLA [1].

Sustav HLA otkriven je sredinom prošlog stoljeća. U potrazi za grupama bijelih krvnih stanica nobelovac J. Dausset-a dokazao je prisutnost staničnih aglutinina u serumu osoba koje su više puta primile transfuziju krvi što je uvelike koristilo pri definiciji antigena HLA. Uz Dausset-a, J. van Rood i R. Payne su 1958. godine postavili osnove na kojima je dokazano postojanje sustava HLA [2].

Mnogo godina kasnije otkrivena je prava fiziološka funkcija sustava HLA, odnosno gena i molekula HLA koje su danas ključni čimbenici u regulaciji imunološkog odgovora, te su poznati i kao tkivni i glavni transplantacijski antigeni [1].

### **1.1.1. OSOBINE SUSTAVA HLA**

Osnovne osobine sustava HLA su poligenost (sadrži preko 200 gena) i veliki polimorfizam. Sustav HLA najpolimorfniji je genetski sustav kod čovjeka s više od 12000 poznatih alela [3]. Taj broj stalno raste jer se neprestano otkrivaju novi aleli HLA (slika 1). Među genima HLA najpolimorfniji je gen HLA-B na kojem je do danas poznato preko 3000 različitih alela (tablica 1) [15]. Veliki polimorfizam gena HLA ostvaruje se brojnim genskim mehanizmima, posebice rekombinacijom (između različitih alela istog lokusa), konverzijom (zamjena pojedinih dijelova gena ulomcima drugog gena) i točkastim mutacijama (koje uzrokuju promjene pojedinih nukleotida) [1,4].



Slika 1. Broj otkrivenih alela HLA razreda I i II. od 1987. do 2015. godine (preuzeto iz [21])

Tablica 1. Broj poznatih alela HLA do 26.06.2015. godine

LOKUS	BROJ ALELA
HLA-A	3192
HLA-B	3977
HLA-C	2740
HLA-DRB1	1868
HLA-DPB1	550
HLA-DQB1	807

Prilagođeno prema [20]

Sustav HLA odlikuje i kodominantna ekspresija – po jedan haplotip HLA nasljeđuje se od svakog roditelja pri čemu se oba izražavaju kodominantno na staničnoj membrani, što je posljedica kodominacije na razini gena. Geni HLA imaju pravilnu segregaciju, tj. dijete ima 50%-tnu mogućnost da naslijedi određeni alel HLA od roditelja heterozigota na tom lokusu HLA [1,4]. Nadalje, među genima HLA dolazi do rekombinacije ili *crossing over*-a što

dovodi do nastanka novih haplotipova HLA. U slučaju *crossing over*-a dolazi do zamjene dijelova kromatida tijekom oogeneze ili spermatogeneze. Rekombinacije između gena HLA iznosi 1-2%, dakle vrlo je mala i u značajnijoj mjeri ne pridonosi genetičkoj varijabilnosti ovog genskog sustava [5]. Jedna od osobitosti sustava HLA je i visok stupanj neravnoteže udruživanja (*engl. linkage disequilibrium, LD*) zbog koje se različiti aleli dva ili više usko vezanih lokusa HLA javljaju češće u istom haplotipu HLA nego što je to očekivano na osnovu njihovih pojedinačnih učestalosti [6].

### 1.1.2. SMJEŠTAJ I ORGANIZACIJA SUSTAVA HLA

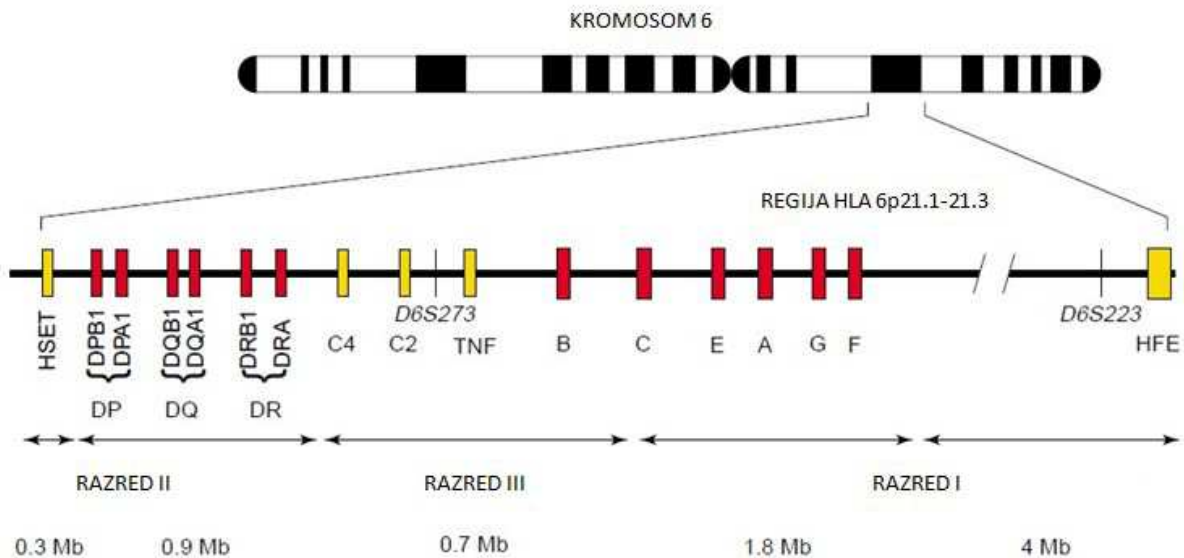
Sustav HLA obuhvaća regiju DNA od oko 4 milijuna parova baza koja je smještena na kraćem kraku kromosoma 6 (6p21.1-21.3). Cijela regija HLA podijeljena je u tri podregije: HLA razred I, HLA razred II i HLA razred III (slika 2).

Regija HLA razreda I smještena je bliže telomeri kromosoma 6 i unutar nje su smješteni klasični i neklasični geni HLA razreda I. Skupinu klasičnih gena HLA razreda I tvore geni HLA-A, -B i -C, čije produkte, molekule HLA, odlikuje velika raznovrsnost i velika tkivna zastupljenost. Geni HLA-E, -F i -G dio su skupine neklasičnih gena HLA razreda I koji, za razliku od klasičnih gena HLA razreda I, su manje polimorfni, imaju manju tkivnu rasprostranjenost svojih molekula i specifičnu funkciju [5].

Bliže centromeri kromosoma 6 nalazi se regija HLA razreda II, obuhvaća nekoliko subregija: HLA-DM, -DN, -DO, -DP, -DQ i -DR. Subregije, tj. geni unutar njih, HLA-DR, -DQ i -DP kodiraju molekule HLA razreda II koje se na membrani specijaliziranih antigen-predočnih stanica (makrofagi, dendritičke stanice, B-limfociti) izražavaju kao antigen-predočne molekule. Geni unutar subregija HLA-DM, -DN i -DO kodiraju molekule koje se ne nalaze na staničnoj membrani i posredno su uključene u proces funkcionalnog formiranja antigen-predočnih molekula HLA razreda II. Važne su i u procesu vezanja peptidnih ulomaka s drugim molekulama HLA, te su uglavnom prisutne u citoplazmi stanice. Unutar regije HLA razreda II nalaze se i geni koji imaju važnu ulogu u konačnom ustroju molekula HLA razreda I, poput TAP1 i TAP2 (*engl. Transporters Associated antigen Processing*) proteinskih pumpi koje prenose antigenske dijelove iz citosola u endoplazmatski retikulum [1].

Između regije HLA razreda I i HLA razreda II smještena je regija HLA razreda III, odnosno centralna regija. Ona sadrži gene koji kodiraju pojedine komponente komplementa (C2, C4,

CFB), neke važne citokine poput TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  (*engl. Tumor Necrosis Factors*), proteine toplinskog šoka (*engl. Heat Shock Proteins, HSP*) kao i mnoge druge gene čiji produkti nisu direktno uključeni u procese imunološkog prepoznavanja i aktivacije stanica specifične imunosti [7]. Unutar ove regije nema niti jedan gen HLA.



Slika 2. Smještaj regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6 (prilagođeno prema [8])

### 1.1.3. PRIMJENA ODREĐIVANJA GENA I MOLEKULA HLA

Istraživanja sustava HLA provode se dugi niz godina, zbog velikog kliničkog značenja gena HLA u transplantaciji, populacijskoj genetici, forenzičkoj i sudskoj medicini (slučajevi spornog očinstva i identifikacija osoba), transfuzijskom liječenju te u dijagnostici različitih bolesti. Upravo zbog svega navedenog, sustav HLA je najistraživaniji genski sustav kod čovjeka.

Molekule HLA prvi put su otkrivene kao uzrok odbacivanja alogeničnih transplantata. Transplantacijska reakcija je oblik specifične imunosti koja je posredovana limfocitima T i u manjoj mjeri limfocitima B. Limfociti T prepoznaju strane molekule HLA razreda I i II, aktiviraju se i pokreću imunološke mehanizme koji dovode do odbacivanja alogeničnog transplantata. Preživljavanje transplantata prvenstveno ovisi o stupnju podudarnosti HLA između primatelja i davatelja. Transplantacijska reakcija usmjerena je samo prema onim antigenima HLA transplantata koje primatelj nema [9].

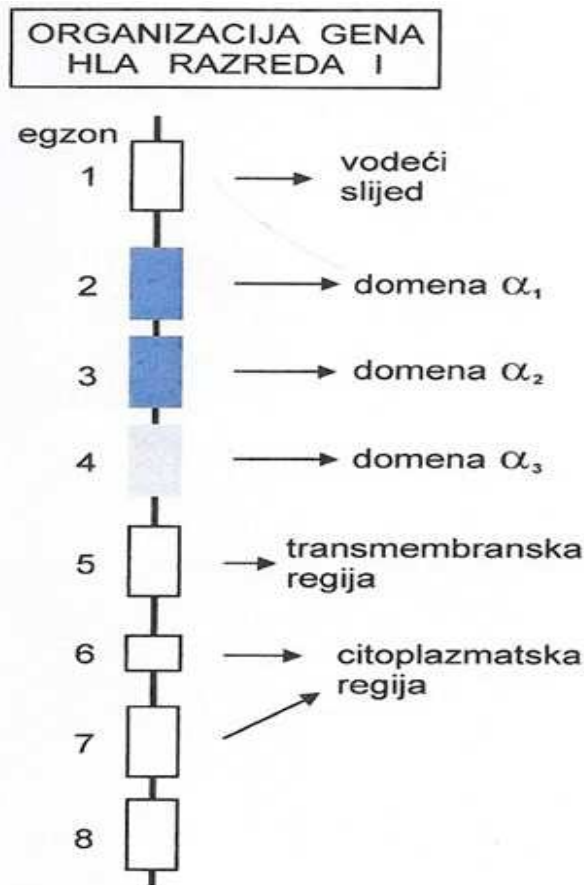
Zbog važne uloge molekula HLA u sazrijevanju limfocita T, kao i pokretanju imunološkog odgovora, istraživanja uzroka autoimunih bolesti obuhvatila su i ispitivanje njihove povezanosti s genima HLA. Kod ljudi s autoimunim bolestima uočena je povećana učestalost određenih alela HLA u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Stupanj povezanosti određenog alela HLA i pojedine bolesti izražava se relativnim rizikom koji pokazuje koliko puta je veća vjerojatnost oboljevanja osoba koje su pozitivne za određeni alel HLA, u odnosu na osobe koje nemaju taj alel. Nadalje, prisutnost određenog alela HLA nije sama po sebi uzrok bolesti, već samo jedan od faktora koji pridonosi razvoju određene bolesti [10].

Populacijska istraživanja gena HLA su vrlo bitna za dobivanje uvida u raspodjelu pojedinih alela HLA u svijetu. Među pojedinim populacijama i etničkim grupama zastupljenost alela HLA značajno se razlikuje, što čini gene HLA dobrim pokazateljem praćenja migracija i međusobnih miješanja različitih populacija. Obzirom na svoju zastupljenost u svijetu, aleli HLA mogu se podijeliti u tri skupine: aleli HLA s relativno visokom učestalošću u svim populacijama svijeta (učestalost veća od 5%), aleli HLA koji su prisutni u većini populacija, ali u pojedinim populacijama imaju nisku učestalost ili ih uopće nema (učestalost 0,1-1%) i aleli HLA koji su karakteristični samo za neke populacije ili etničke grupe (učestalost manja od 0,1%) [11].

## **1.1.4. GENI HLA**

### **1.1.4.1. GENI HLA RAZREDA I**

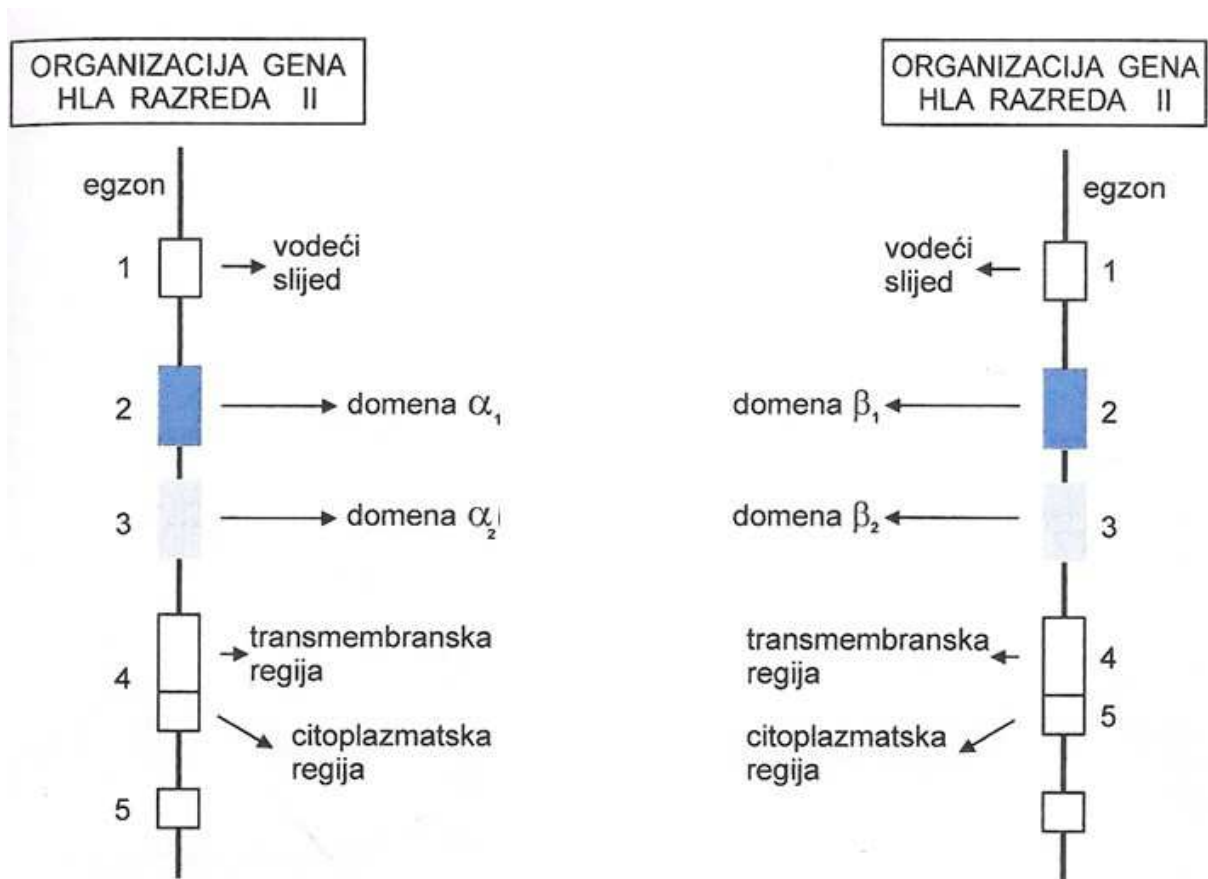
Regija HLA razreda I ima 18 gena i zauzima približno 2 Mb DNA. Svaki gen HLA sastoji se od egzona i introna. Geni za teški lanac molekula HLA razreda I sastoje se od 8 egzona (kodirajuće sekvence) koji su razdvojeni različito dugim intronima (nekodirajuće sekvence) (slika 3). Prvi egzon sadrži vodeći, signalni slijed baza čiji produkt, poslije translacije, usmjerava antigenski protein u citoplazmu, a pojavljuje se kao gotova membranska molekula. Egzoni 2, 3 i 4 određuju slijedove aminokiselina za domene  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  izvanstaničnog dijela molekule HLA razreda I. Egzon 5 kodira transmembranski dio peptida, dok egzoni 6 i 7 kodiraju citoplazmatski dio. Netranslatirajući 3' kraj, kao završni dio molekule, kodira egzon 8. Većina polimorfizama alela kod gena HLA razreda I smještena je u egzonomima 2 i 3. Upravo ovi egzoni gena HLA razreda I kodiraju polipeptidne domene koje u molekuli HLA tvore pukotinu za vezanje stranog antigena [7, 12].



Slika 3. Shematski prikaz organizacije gena HLA razreda I ( prilagođeno prema [13])

#### 1.1.4.2. GENI HLA RAZREDA II

U regiji HLA razreda II nalaze se geni koji kodiraju molekule HLA razreda II koje prezentiraju strane antigene pomoćničkim limfocitima T. Struktura gena HLA razreda II za lanac  $\alpha$  građen je od 5 egzona, a za lanac  $\beta$  građen je od 6 egzona. To je i glavna razlika između gena HLA razreda I i razreda II, jer geni HLA razreda I kodiraju samo  $\alpha$  lanac molekule HLA razreda I. Egzon 1 kodira vodeći peptid, dok egzoni 2 i 3 kodiraju dvije izvanstanične domene. Kod gena za  $\alpha$  lanac egzon 4 kodira dva dijela molekule, transmembranski i citoplazmatski dio. Gen za  $\beta$  lanac je drugačiji zato što egzon 4 kodira transmembranski dio, a egzon 5 citoplazmatski dio (slika 4). Razlike u pojedinim alelima HLA uglavnom se nalaze u egzonu 2 koji kodira dio molekule za vezanje stranih peptida [7,12].



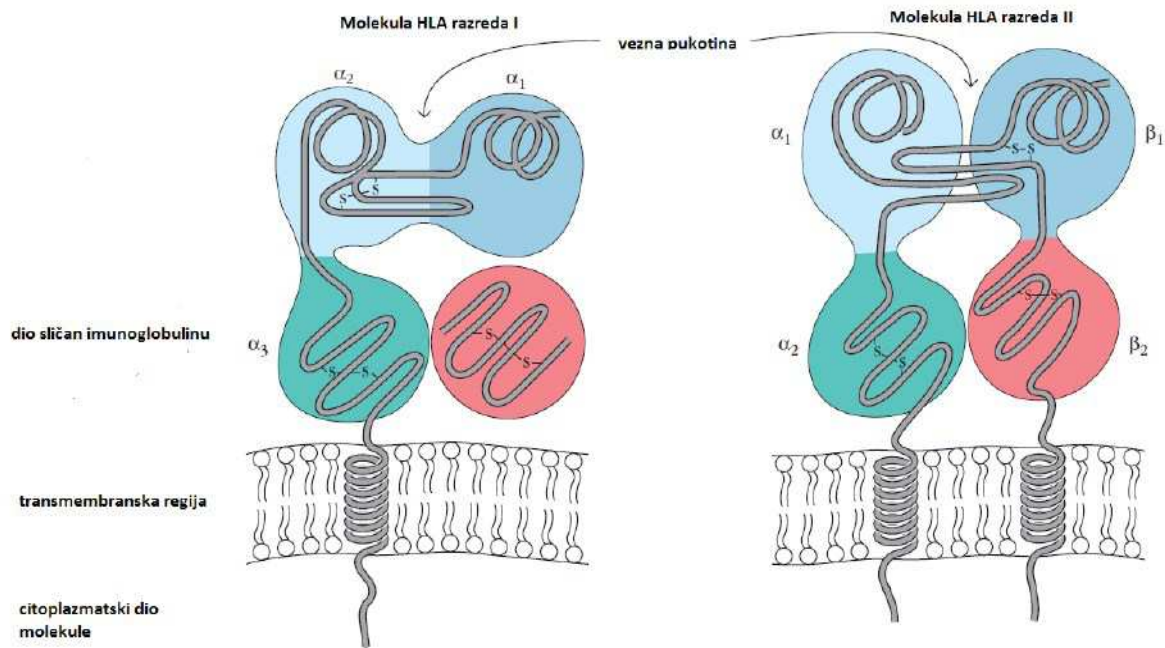
Slika 4. Shematski prikaz organizacije gena HLA razreda II (prilagođeno prema [13])

## 1.1.5. MOLEKULE HLA

### 1.1.5.1. MOLEKULE HLA RAZREDA I

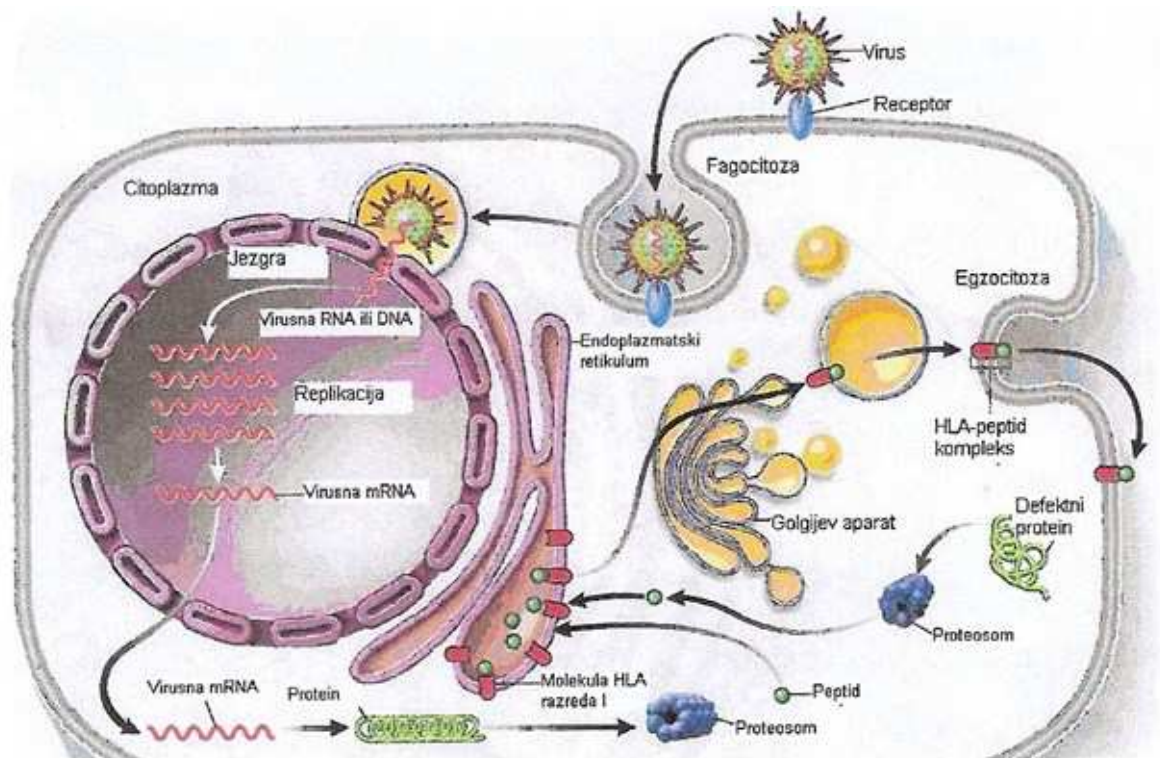
Molekule HLA razreda I prisutne su na gotovo svim stanicama s jezgrom i predočuju unutarstanične antigene, poput tumorskih i virusnih antigena, CD8+ citotoksičnim limfocitima T. Građene su od teškog glikoziliranog  $\alpha$  lanca i nekovalentno vezanog izvanstaničnog lakog lanca -  $\beta_2$  mikroglobulina. Laki lanac ne prolazi kroz staničnu membranu već se u cijelosti nalazi izvan stanice. Kodiran je genima na kromosomu 15, ima funkciju učvršćivanja molekule HLA razreda I i ne sudjeluje u prezentaciji stranih peptida citotoksičnim limfocitima T. Teški lanac molekula HLA razreda I sastoji se od tri dijela: izvanstanični dio (domene  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ), hidrofobnog transmembranskog dijela i hidrofилnog unutarstaničnog dijela (slika 5).





Slika 5. Shematski prikaz molekula HLA razreda I i HLA razreda II (prilagođeno prema [7])

Najvažniji dio molekule HLA razreda I je onaj koji veže peptid. Domene  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  zajedno zatvaraju pravilno građenu pukotinu u koju se smješta unutarstanični peptid, odnosno prerađeni tuđi antigen, i na taj način tvore kompleks koji prepoznaju T limfociti. Pukotina može prihvatiti peptid veličine od 8 do 11 aminokiselina i okružuju je upravo one aminokiseline koje se razlikuju u molekulama HLA razreda I. Peptidi se pomoću specifičnih prijenosnih proteina TAP1 i TAP2 transportiraju kroz endoplazmatski retikulum u kojem se vežu za molekulu HLA, prolaze kroz Golgijev aparat i preko vezikula egzocitozom se ekspimiraju na površinu stanice. Na taj način ekspimirane molekule budu predočene citotoksičnim limfocitima T (slika 6) [10]. Izvanstanična domena  $\alpha_3$  je dio molekule koji je sličan konstantnom dijelu imunoglobulina i sadrži vezno mjesto za molekulu CD8<sup>+</sup> na citotoksičnim limfocitima T [1].

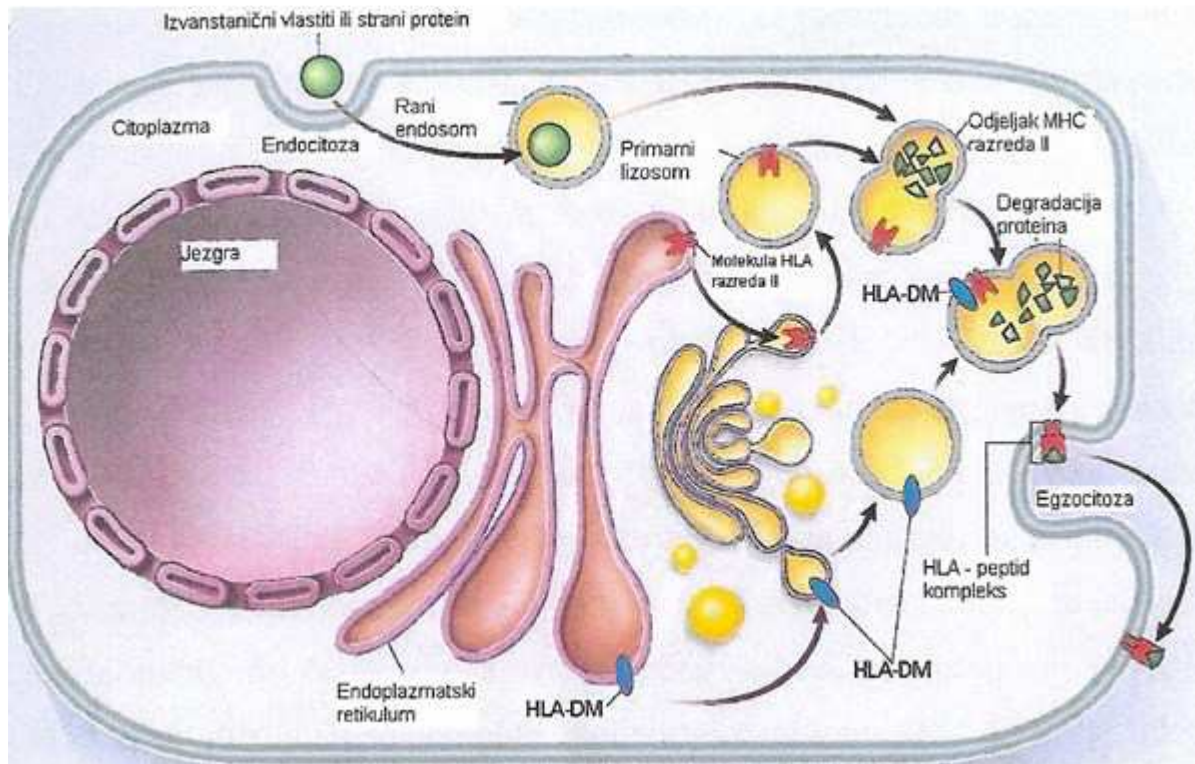


Slika 6. Vežanje peptida na molekulu HLA razreda I (prilagođeno prema [14])

### 1.1.5.2. MOLEKULE HLA RAZREDA II

Za razliku od molekula HLA razreda I, molekule HLA razreda II prisutne su samo na stanicama koje predočuju strane antigene (dendritičke stanice, makrofagi, monociti, B limfociti), CD4+ pomoćničkim T limfocitima koji potiču sintezu odgovarajućih protutijela za taj antigen [1]. Molekule HLA razreda II građene su od dva lanca, težeg ( $\alpha$ ) i lakšeg ( $\beta$ ), povezanih nekovalentnim vezama, vrlo slične građe i različitog polimorfizma. Naime, lanac  $\alpha$  puno je manje polimorfan nego lanac  $\beta$ . Svojom strukturom molekule HLA razreda II nalikuju molekulama HLA razreda I, te su također građeni od izvanstaničnog dijela, transmembranskog i unutarstaničnog dijela. Izvanstanični dio lanca čine dvije domene ( $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  ili  $\beta 1$  i  $\beta 2$ ) (slika 5). Domene  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  formiraju pukotinu koja je otvorenije i šire strukture, stoga može prihvatiti duži peptid – od 12 do 30 aminokiselina. Istovremeno sa razgradnjom stranog antigena na peptide, dolazi do sinteze molekule HLA razreda II u endoplazmatskom retikulumu. Sintetizirani se peptid transportira u fagolizosom, gdje se od molekule HLA razreda II odcjepljuje invarijantni lanac i veže antigeni peptid. Nakon toga molekula HLA razreda II s vezanim antigenim peptidom putuje prema staničnoj membrani antigen predočne

stanice i na taj se način antigen predočuje pomoćničkim limfocitima T koji prepoznavanjem kompleksa antigen–molekula HLA započinju imunološki odgovor, sekreciju kemokina, interleukina i drugih citokina (slika 7) [10]. Konstantnom dijelu imunoglobulina slične domene  $\alpha 2$  i  $\beta 2$  koje su važne za nekovalentno povezivanje lanaca molekula HLA razreda II [1,14].



Slika 7. Vežanje peptida na molekulu HLA razreda II (prilagođeno prema [14])

Najvažnije razlike između molekula HLA razreda I i molekula HLA razreda II su u prirodi peptida koje vežu i prenose na površinu stanica. Molekule HLA razreda I vežu endogene antigene koji se sintetiziraju na peptide unutar proteosoma (slika 6), dok molekule HLA razreda II vežu egzogene antigene i njihov put započinje fagocitozom (slika 7).

### 1.1.6. POLIMORFIZAM HLA

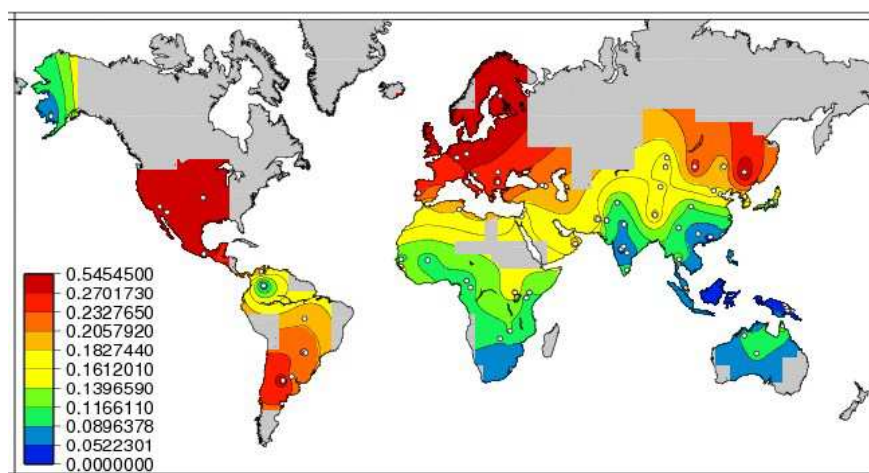
Geni HLA najpolimorfiji su geni kod čovjeka. Velik broj alela rezultat je prirodne selekcije, a upravo polimorfizam osigurava raznolikost molekula kodiranih genima HLA. Dokaz je nizak postotak osoba homozigota za alele HLA čime se ukazuje na postojanje selektivne prednosti heterozigotnih osoba. Polimorfizam HLA dokazuje se na nivou membranskih proteina i gena. Prvi pristup se temelji na primjeni antitijela specifičnih za produkt svakog

gena HLA ili primjeni staničnih testova in vitro, kao što je kultura pomiješanih limfocita, a za cilj ima pokazati prisustvo posebnih antigenskih determinanti jedne ili više membranskih molekula, produkata HLA. Drugim pristupom se utvrđuje redoslijed nukleotida pojedinih gena HLA primjenom različitih metoda molekularne biologije [1,4].

Visok stupanj polimorfizma sustava HLA može se objasniti postojanjem visoke stope mutacija unutar njega, ali i mehanizmom selekcije tijekom evolucije. Postojanje veće učestalosti mutacija unutar sustava HLA nego u drugim sustavima gena nije potvrđeno, stoga se smatra da je selekcija najvažniji čimbenik u nastanku polimorfizma HLA. Naime, zamjena samo nekoliko aminokiselina unutar vezne pukotine može dovesti do izmjene vrste veznog peptida, dokaz je da selekcija izravno putem različitih patogena (virusa, bakterija) održava raznolikost HLA [4].

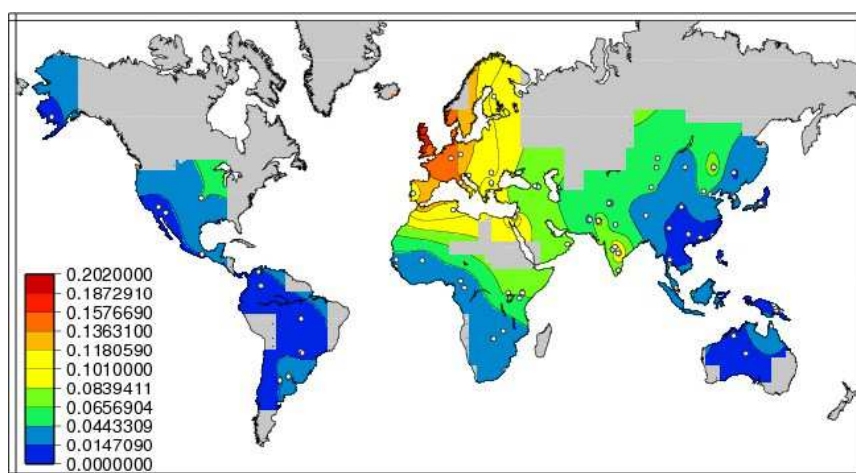
#### 1.1.6.1. ALELI HLA

Iako je broj alela HLA velik, unutar pojedine populacije javlja se znatno manji broj alela. Populacijska istraživanja provode se dugi niz godina i unatoč velikom broju na puno pitanja vezanih uz polimorfizam HLA u svijetu nema još odgovora. Međutim, ono što je neosporno da jedan od najčešćih alela na lokusu HLA-A, kako kod nas, tako i u svijetu, je alel A\*02:01 (slika 8). S druge strane alel A\*01:01 pokazuje razliku u raspodjeli između sjevera i juga Europe, dok za neke populacije nema uopće podataka o njegovoj rasprostranjenosti (slika 9). Iz slike 10 možemo vidjeti da alel A\*24:02 koji je 3. najčešći alel u našoj populaciji pokazuje rast učestalosti od sjevera prema jugu Europe [15].

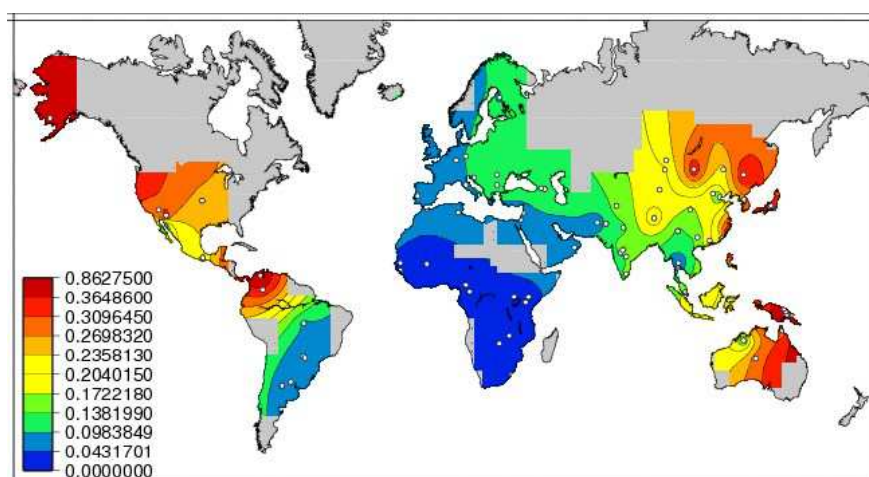


Slika 8. Raspodjela alela HLA-A\*02:01 u svijetu (preuzeto s [22])



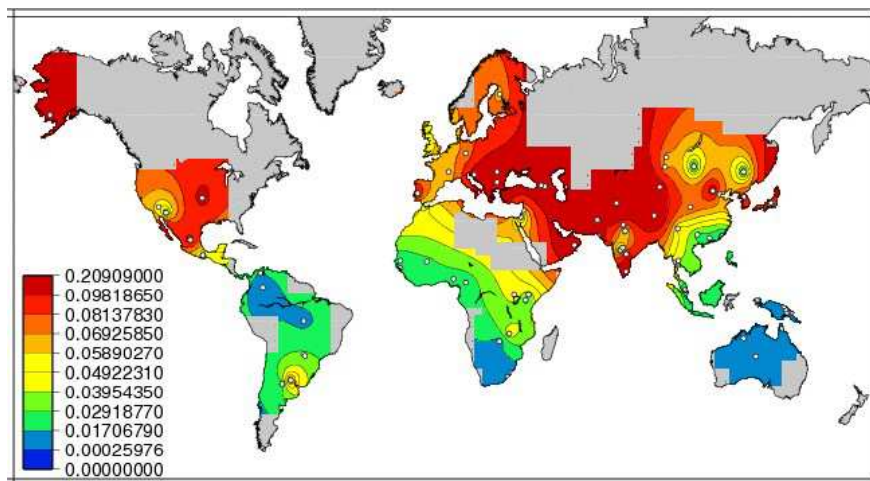


Slika 9. Raspodjela alela HLA-A\*01:01 u svijetu (preuzeto s [22])

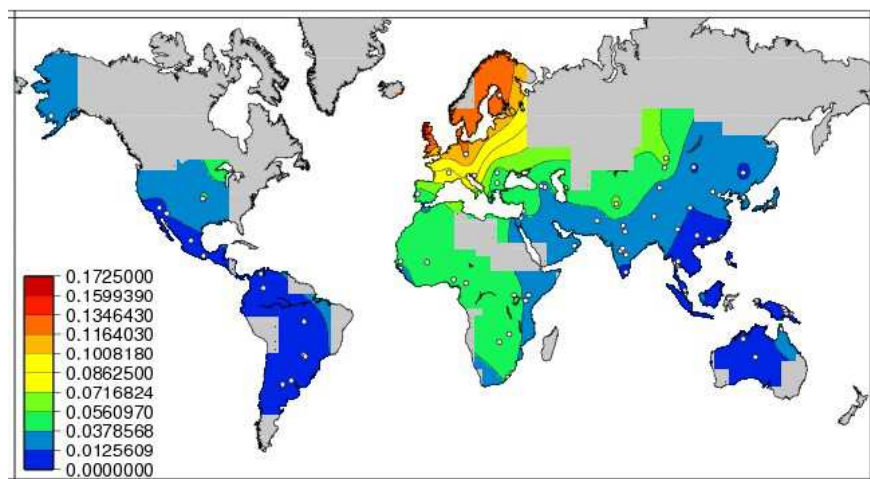


Slika 10. Raspodjela alela HLA-A\*24:02 u svijetu (preuzeto s [22])

Na lokusu B jedan od najčešćih alela u populacijama europskog porijekla je alel B\*51:01. Učestalost alela HLA-B\*51:01, uz izuzetak krajnjeg zapada (Španjolska i Portugal), povećava se prema jugoistoku Europe (slika 11). Učestalost alela B\*51:01 u našoj populaciji iznosi 11,13% [6].

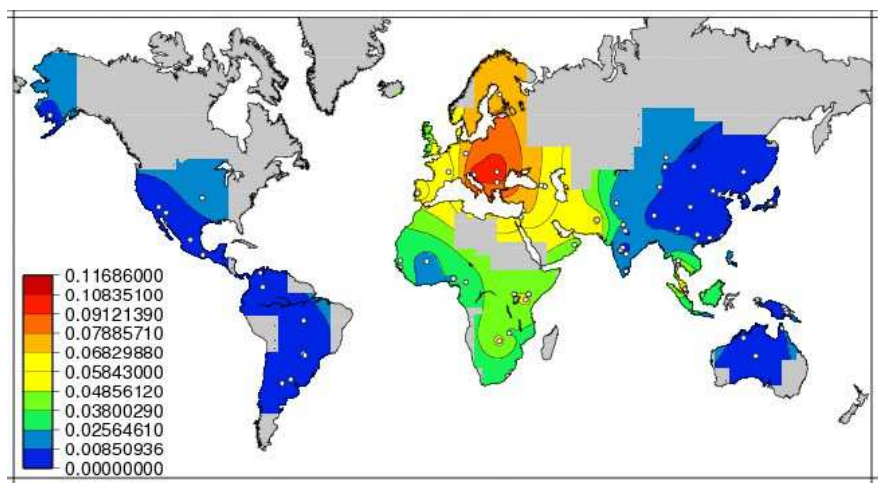


Slika 11. Raspodjela alela HLA-B\*51:01 u svijetu (preuzeto s [22])



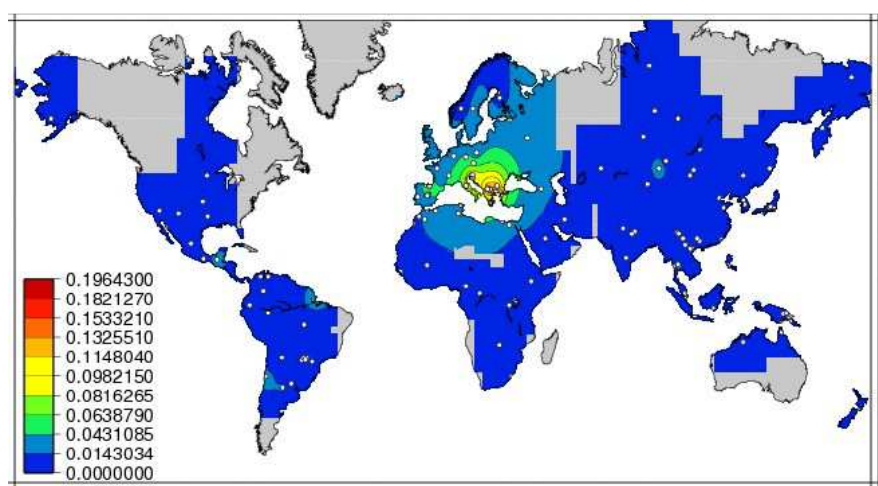
Slika 12. Raspodjela alela HLA-B\*07:02 u svijetu (preuzeto s [22])

Iz slika 12 i 13 vidimo kako i aleli HLA-B\*07:02 i B\*18:01 pokazuju regionalne razlike pri čemu se učestalost alela B\*07:02 smanjuje sa sjevera prema jugu Europe, dok se učestalost alela B\*18:01 smanjuje s područja južne prema sjevernoj Europi [15].

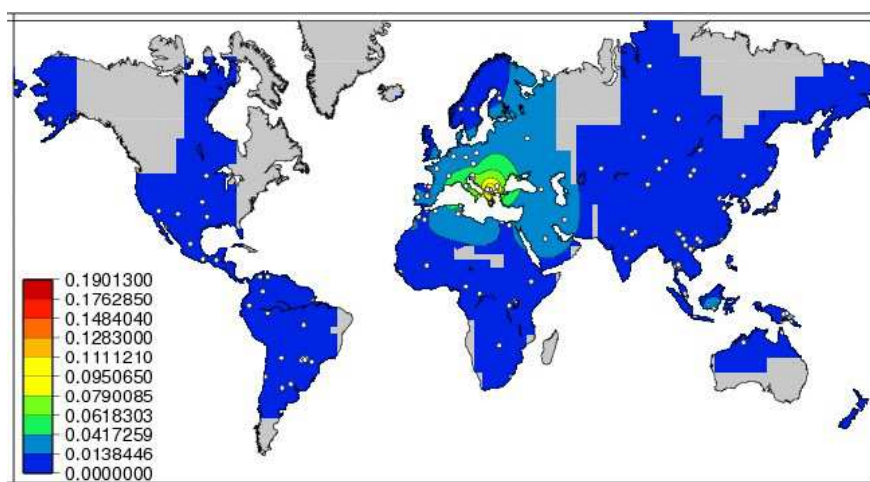


Slika 13. Raspodjela alela HLA-B\*18:01 u svijetu (preuzeto s [22])

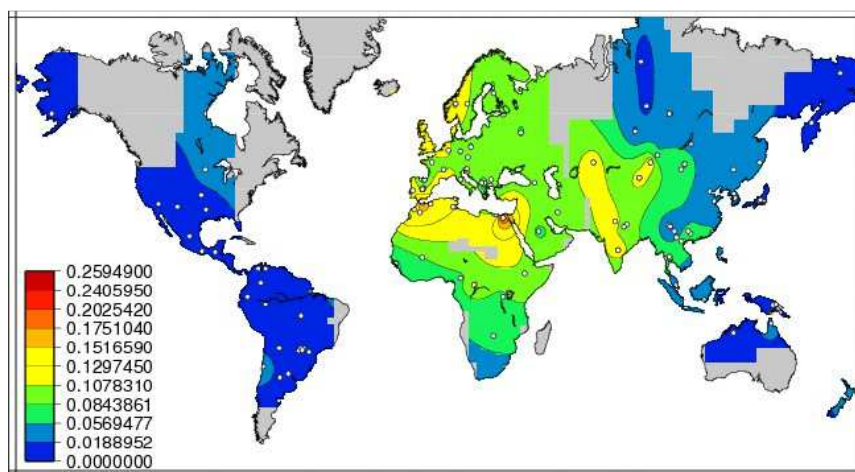
Učestalost alela DRB1\*11:04 raste od sjevera prema jugu Europe (slika 14). U našoj populaciji njegova učestalost iznosi 7,66%, što je slično učestalosti alela DRB1\*11:01 (7,88%) [6]. Alel DRB1\*16:01 ima porast učestalosti sa sjevera prema jugu Europe, te upravo područje u našoj neposrednoj geografskoj blizini pokazuje najveću učestalost alela DRB1\*16:01 u odnosu na druga istražena područja (slika 15). Široko rasprostranjeni alel na lokusu DRB1 u Europi je i alel DRB1\*03:01 čija je učestalost veća na području krajnjeg sjeverozapada Europe (slika 16).



Slika 14. Raspodjela alela HLA-DRB1\*11:04 u svijetu (preuzeto s [22])



Slika 15. Raspodjela alela HLA-DRB1\*16:01 u svijetu (preuzeto s [22])

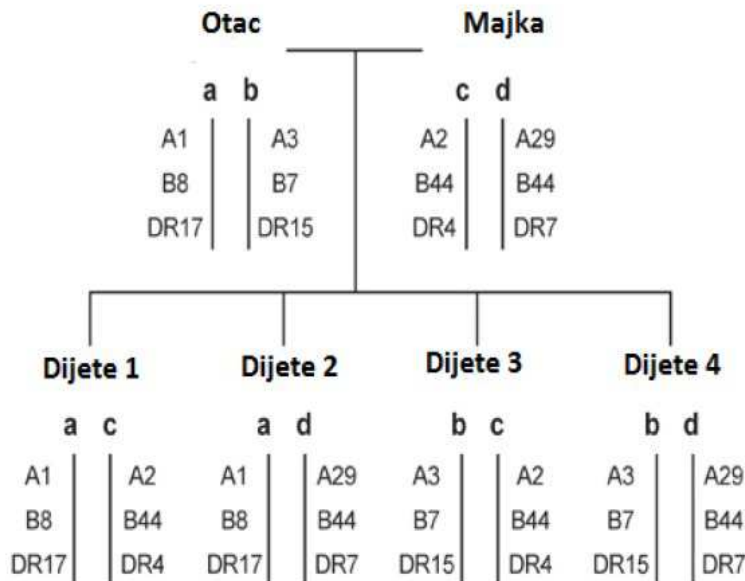


Slika 16. Raspodjela alela HLA-DRB1\*03:01 u svijetu (preuzeto s [22])



### 1.1.6.2. HAPLOTIPOVI HLA

Haplotip HLA je skupina alela različitih gena na jednom kromosomu koji su uskoro povezani i stoga se zajedno nasljeđuju [7]. Segregacija haplotipova HLA unutar obitelji može biti prikazana Mendelovim zakonom nasljeđivanja (slika 17). Dva potomka imaju 25% vjerojatnosti da će imati isti genotipski HLA, 50% vjerojatnosti da će imati haploidentičan HLA (dijeliti jedan haplotip), te 25% vjerojatnosti da neće dijeliti haplotipove HLA.



Slika 17. Primjer nasljeđivanja gena/haplotipova HLA u obitelji

Moguće slučajne kombinacije alela, iz različitih lokusa HLA, u haplotipu HLA su izrazito velike, dok su specifični haplotipovi HLA frekventniji u određenim populacijama, odnosno predstavljaju neravnoteža udruživanja [4].

U bilo kojoj populaciji, broj uočenih haplotipova predstavlja vrlo mali udio svih mogućih kombinacija haplotipova. Na primjer, alel DRB1\*03:01 (čest kod populacija europskog porijekla) u skoro 100% osoba je u kombinaciji s DQA1\*03:01-DQB1\*02:01 i mala je vjerojatnost da ćemo ga naći s drugim alelima DQ. S druge strane, alel DRB1\*03:02, prisutan među populacijama afričkog porijekla, tvori haplotip s alelima DQA1\*04:01-DQB1\*04:02. Jaka neravnoteža udruživanja između blisko povezanih lokusa poput DRB1, DQA1 i DQB1 (DQA1 i DQB1 su udaljeni samo 12 kb) može predstavljati nedostatak *crossing over*-a između lokusa ili selekciju određenih kombinacija alela. Jedno od mogućih objašnjenja za neravnotežu udruživanja između alela DQA1 i DQB1 temeljeno je na preferencijalnom sparivanju nekih  $\alpha$  i nekih  $\beta$ -lanaca. Prilikom analize stanica koje sadrže transfektirane DQA1

i DQB1 gene, dokazano je preferencijalno povezivanje u nastajanju heterodimera DQA1/DQB1. Osim preferencijalnog povezivanja  $\alpha$  i  $\beta$ -lanca, na neravnotežu udruživanja između lokusa DR i DQ mogu utjecati i drugi faktori, poput miješanja populacija [12].

Produženi haplotip: HLA-A\*01:01-B\*08:01-DRB1\*03:01 tzv. autoimuni haplotip je najčešći haplotip u populacijama europskog porijekla, odnosno europskim populacijama. I u Hrvatskoj je to najčešći haplotip s učestalošću od 4,15% (tablica 2). Veliku zastupljenost u hrvatskoj populaciji ima i haplotip: HLA-A\*03:01-B\*07:02-DRB1\*15:01 od 1,20%, koji je također najčešći i među populacijama europskog porijekla [6].

Istovremeno postoje i razlike u raspodjeli haplotipova HLA između naše i drugih europskih populacija. Haplotip: HLA-A\*02:01-B\*18:01-DRB1\*11:04 u hrvatskoj populaciji ima veliku zastupljenost (1,48%), dok u populaciji europskog porijekla nije niti unutar prvih 50 (podaci nisu prikazani). Učestalost haplotipa: HLA-A\*02:01-B\*18:01-DRB1\*11:04 veća je na jugu Europe, pa je njegova zastupljenost u našoj populaciji vrlo slična zastupljenosti u grčkoj populaciji [23]. S druge strane, haplotip: HLA-A\*02:01-B\*51:01-DRB1\*11:01 nije prisutan među prvih 10 haplotipova unutar populacije europskog porijekla jer je učestaliji na jugu Europe, dok je njegova zastupljenost u hrvatskoj populaciji 0,63% [6].

U populacijskim istraživanjima, kada nemamo članove obitelji i ne možemo pratiti nasljeđivanje gena HLA, govorimo o pretpostavljenim haplotipovima HLA.

Tablica 2. Prikaz najčešćih haplotipova HLA-A\*-B\*-DRB1\* u Hrvatskoj i Europi

POREDAK ZASTUPLJENOSTI	HAPLOTIP HLA-A*-B*-DRB1*	
	HRVATSKA <sup>1</sup>	EUROPA <sup>2</sup>
1	01:01-08:01-03:01	01:01-08:01-03:01
2	02:01-18:01-11:04	03:01-07:02-15:01
3	03:01-07:02-15:01	02:01-44:02-04:01
4	02:01-27:05-01:01	02:01-07:02-15:01
5	02:01-51:01-11:01	29:02-44:03-07:01
6	02:01-13:02-07:01	02:01-15:01-04:01
7	02:01-27:02-16:01	01:01-57:01-07:01
8	02:01-44:02-16:01	03:01-35:01-01:01
9	02:01-07:02-15:01	02:01-08:01-03:01
10	11:01-35:01-01:01	30:01-13:02-07:01

Legenda: <sup>1</sup> – prilagođeno prema [6]; <sup>2</sup> – prilagođeno prema [24]

## 1.2. KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA (KAH)

Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) je skupina nasljednih autosomno-recesivnih bolesti kod kojih je poremećena sinteza kortizola u kori nadbubrežne žlijezde.

Bolest se prvi puta spominje 1865. godine, no tek u drugoj polovici 20. stoljeća dolazi do boljeg razumijevanja prirode bolesti otkrićem uzroka bolesti – poremećena sinteza kortizola – i autosomno-recesivnog prijenosa bolesti.

Kod bolesnika s KAH-om poremećaj zahvaća enzime koji sudjeluju u steroidogenezi, a u najvećem broju slučajeva se radi o poremećenoj funkciji enzima 21-OH. Dijagnostički najvažniji biokemijski poremećaj kod bolesnika s KAH-om, koji se javlja zbog manjka 21-OH, je povišena koncentracija 17-OHP. Manjak 21-OH dovodi i do smanjene sinteze kortizola, koji mehanizmom negativne povratne sprege povećava sekreciju ACTH iz hipofize. Aldosteron se sintetizira u 100 do 1000 puta manjim koncentracijama od kortizola i njegova sinteza ovisi o koncentracijama kalija. S druge strane može uzrokovati pojačanu sekreciju adrenalnih steroida, u čijoj sintezi niti ne sudjeluje. Sama klinička slika bolesti ovisi o stupnju oštećenja enzimske funkcije [16].

Prema kliničkoj slici razlikuju se tri oblika KAH-a:

1. pojava gubitka soli (*engl. Salt Wasting – SWKAH*)
2. jednostavna virilizirajuća forma (*engl. Simple Virilising – SVKAH*)
3. neklasični oblik (*engl. Non-Classic CAH – NKKAH*)

U klasične oblike bolesti spadaju *SWKAH* i *SVKAH*.

Već intrauterino se kod djevojčica s klasičnim oblikom bolesti javlja virilizacija vanjskih spolnih organa (hipertrofije klitorisa, fuzije labije, rostralna migracija otvora uretre i vagine sa formiranjem urogenitalnog sinusa i jednog zajedničkog otvora koji se može nalaziti na perineumu, korijenu ili vrhu periformnog klitorisa). Dječaci s klasičnim oblikom KAH-a nemaju po porodu vidljive znakove bolesti. Stoga se dijagnoza postavlja tek nakon razvoja adrenalne krize, te zbog neadekvatnog liječenja često i kod dječaka dolazi do povećanja spolnih organa (penisa, ali bez povećanja volumena testisa). Kod dječaka i djevojčica koji su neadekvatno liječeni dolazi do preuranjene pubične i aksilarne dlakavosti, stvaranja akni i ubrzanog rasta koje je praćeno ubrzanim koštanim dozrijevanjem [16].

Reproduktivni problemi kod žena s KAH-om počinju se javljati u adolescentnoj dobi. Kod nedovoljno liječenih djevojčica menarha kasni u odnosu na zdrave vršnjakinje, te često imaju kliničku sliku policističnih jajnika. Nadalje, razvoj dojki je potisnut kod žena s KAH-om i uglavnom je potaknut kombinacijom učinaka nastalih zbog pretjeranog lučenja androgena i smanjenog lučenja kortizola. Učestalost spontanih pobačaja je nešto veća, ali uz adekvatnu terapiju učestalost je bitno manja (23,6% bez terapije; 6,5% uz primjenu terapije).

Kod muškaraca s KAH-om rjeđe se javlja umanjena spolna funkcija. Kod adekvatno liječenih muških bolesnika fertilitet je očuvan iako se ponekad javlja smanjen broj spermija, ali postoji sklonost nastanku tumora testisa. [16,18].

### 1.3. GEN *CYP21A2*

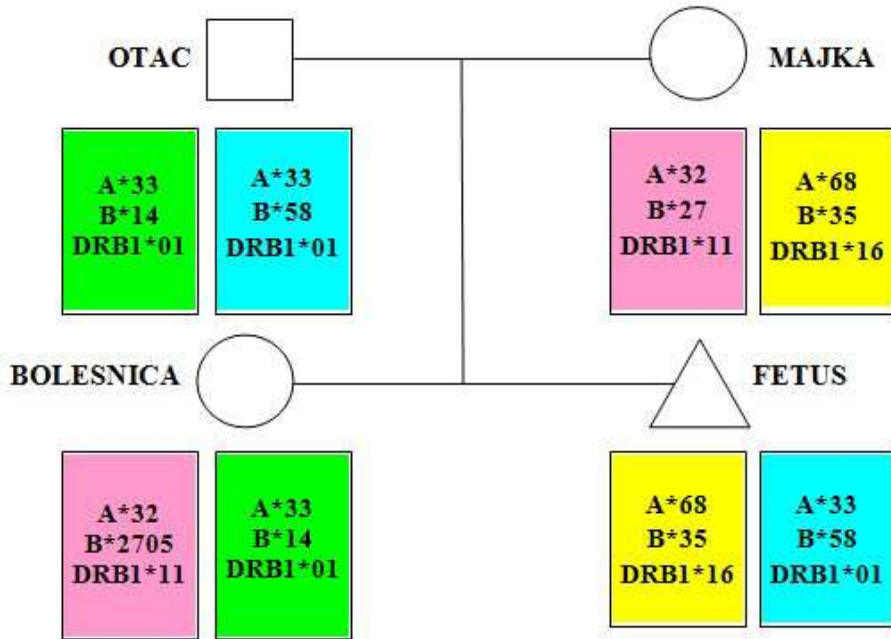
Gen *CYP21A2* kodira enzim 21-hidroksilazu (21-OH) i smješten je na kraćem kraku 6. kromosoma – 6.p21.3, u centralnoj regiji HLA. U blizini funkcionalnog gena *CYP21A2* nalazi se nefunkcionalni pseudogen *CYP21A1P* i u velikoj su mjeri homologni. Oba se sastoje od 10 egzona (podudaraju se u 98% nukleotidnih sekvenci) i 9 introna (podudaraju se u 96% nukleotidnih sekvenci). Primarni faktor za regulaciju ekspresije *CYP21* gena u adrenalnom korteksu je ACTH (*engl. Adrenocorticotropic hormone*). Otkrićem gena *CYP21A2* otkrivene su i njegove mutacije koje su povezane s nasljednom autosomno-recesivnom bolesti – kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) [16, 17]. Sve do otkrića gena *CYP21A2* upravo su geni HLA bili važan čimbenik u prenatalnoj dijagnostici unutar obitelji bolesnika s KAH-om.

Na slici 18 prikazano je nasljeđivanje gena HLA unutar obitelji bolesnice s NKKAH-om kojoj su određivani aleli HLA u svrhu prenatalne dijagnostike. Iz slike se vidi da je fetus (određivanjem gena HLA iz amnijske tekućine) naslijedio različite haplotipove HLA od oca i majke u usporedbi s bolesnicom. Na temelju samo gena HLA možemo reći da će fetus biti zdravi homozigot jer ne dijeli niti jedan haplotip s bolesnicom. Analizom mutacija gena *CYP21A2* Ex7 V281L potvrđen je prethodni nalaz, tj. fetus nema niti jednu od mutacija koje je bolesnica naslijedila od svojih roditelja.

A)

Obitelj: XXXXX

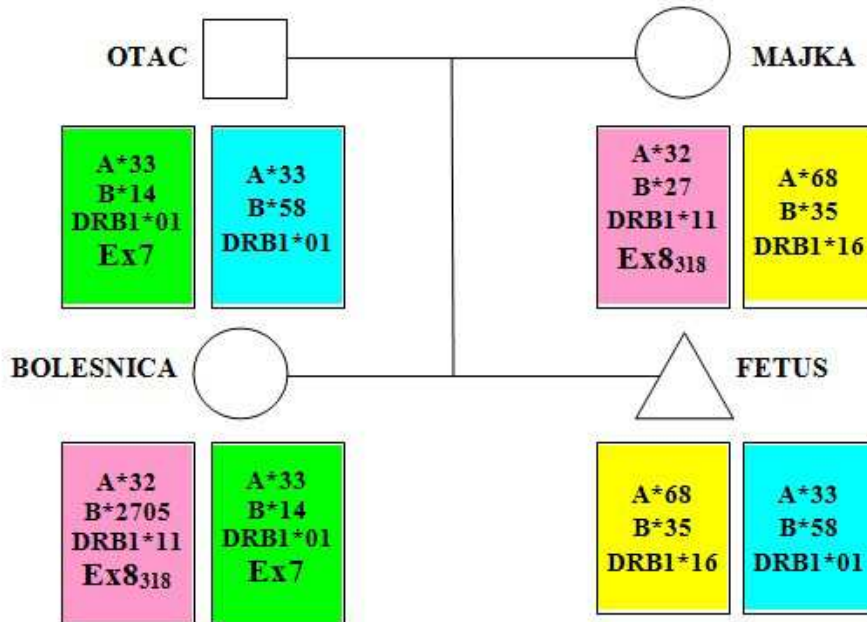
Dijagnoza: NKKAH



B)

Obitelj: XXXXX

Dijagnoza: NKKAH



Slika 18. Primjer nasljeđivanja alela HLA i mutacija gena *CYP21A2* u obitelji

Legenda: A) nasljeđivanje alela HLA unutar obitelji bolesnice s NKKAH-om; B) nasljeđivanje alela HLA i mutacije gena *CPY21A2*

### 1.3.1. MUTACIJE GENA *CYP21A2*

Najveći broj mutacija koje za posljedicu imaju manjak 21-OH nastaju kao rezultat rekombinacije između aktivnog gena *CYP21A2* i pseudogena *CYP21A1P*. Do danas je opisano više od 150 različitih mutacija gena *CYP21A2* (tablica 3). Približno 20% mutacija predstavljaju delecije odsječka DNA koje obuhvaćaju područje između egzona 3 i egzona 8 gena *CYP21A2* (slika 19) ili delecije gena *CYP21A1P/CYP21A2*. S druge strane 70-75% poremećaja u sintezi enzima 21-OH posljedica je unošenja mutacija iz pseudogena *CYP21A1P* genskom konverzijom [16].

Obzirom na pretpostavljenu razinu enzimske aktivnosti mutacije možemo podijeliti na:

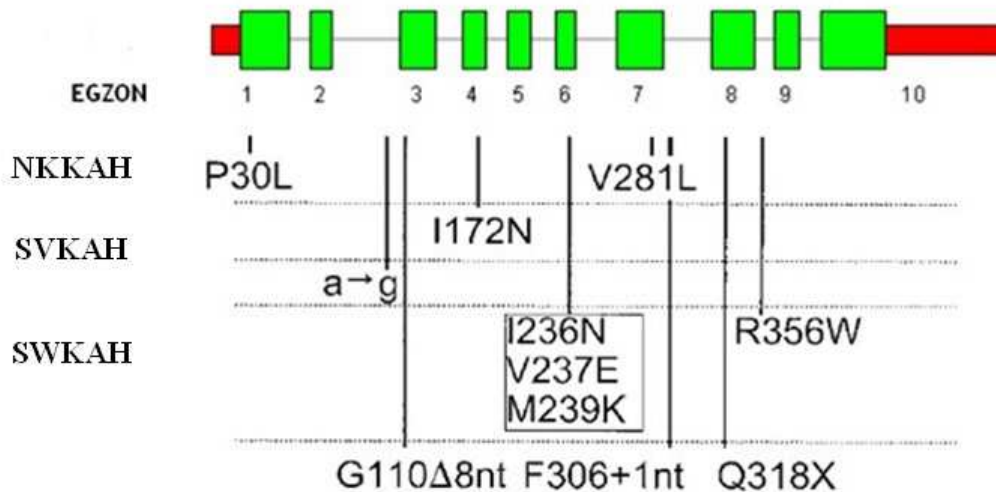
1. teške – potpuna blokada enzimske aktivnosti
2. umjereno teške – održano 1-2% enzimske aktivnosti
3. blage – očuvano 20-60% normalne enzimske aktivnosti



Tablica 3. Najčešće mutacije gena *CYP21*

EGZON/INTRON	TIP MUTACIJE	MUTACIJA	FENOTIP	STUPANJ DEFEKTA ENZIMA (% ENZIMSKE AKTIVNOSTI)
<b>1. NEKLASIČNE MUTACIJE</b>				
Egzon 1	promjena ak	P30L	NK	blagi stupanj (30-60%)
Egzon 7	promjena ak	V281L	NK	blagi stupanj (20-50%)
Egzon 8	promjena ak	R339H	NK	blagi stupanj (20-50%)
Egzon 10	promjena ak	P453S	NK	blagi stupanj (20-50%)
<b>2. KLASIČNE MUTACIJE</b>				
Delecija	delecija 30kb	-	SW	teški stupanj (0%)
Intron 2	neppravilno istjecanje int 2	656 A/C – G	SW; SV	teški stupanj (?)
Egzon 3	delecija 8pb	G110 Δ8nt	SW	teški stupanj (0%)
Egzon 4	promjena ak	I172N	SV	teški stupanj (1%)
Egzon 6	skupina mutacija	I236N, V237E, M239K	SW	teški stupanj (0%)
Egzon 8	uvođenje stop kodona	Q318X	SW	teški stupanj (0%)
Egzon 8	promjena ak	R356W	SW; SV	teški stupanj (0%)
Egzon 10	promjena ak	R483P	SW	teški stupanj (1-2%)

*Legenda: ak-aminokiselina; NK – neklasični oblik KAH-a; SW – klasični oblik KAH-a – s gubitkom soli; SV – klasični oblik KAH-a – bez gubitka soli*



Slika 19. Organizacija gena *CYP21* i položaj najčešćih mutacija

Poremećena funkcija enzima 21-OH s jedne strane može uzrokovati pojačanu sekreciju adrenalnih steroida u čijoj sintezi ne sudjeluje ovaj enzim, dok s druge strane mogu dovesti do nakupljanja hormonskih preteča čija je daljnja pretvorba zbog poremećene funkcije enzima onemogućena, u prvom redu 17-hidroksiprogesterona (17-OHP).

Osobe oboljele od neklasične kongenitalne adrenalne hiperplazije (NKKAH) mogu biti nosioci dvije blage mutacije ili su složeni heterozigoti s jednom blagom mutacijom i jednom teškom ili umjereno teškom mutacijom [16,17].

### 1.3.2. POVEZANOST MUTACIJE GENA *CYP21A2* I SUSTAVA HLA

Dosadašnja istraživanja pokazala su da postoji povezanost pojedinih mutacija gena *CYP21A2* i specifičnih antigena/gena HLA, a braća i sestre oboljeli od KAH-a gotovo se uvijek podudaraju u genima HLA. U pojedinim etničkim skupinama postoji povezanost pojedinih gena HLA i kliničkog oblika bolesti, na primjer SWKAH kod sjevernoeuropskih bolesnika povezan je s haplotipom HLA-A3-B47-DR7, dok je kod bolesnika s SVKAH-om povećana učestalost alela HLA-B5 i -B14. Tako je istraživanje provedeno 2014. godine među bolesnicima s NKKAH-om u Hrvatskoj pokazalo da je mutacija Ex7 V281L povezana s haplotipom HLA-B14, -DR1 [16].

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi ovog rada bili su:

1. Ispitati učestalost mutacije gena *CYP21A2* Ex7 V281L unutar skupine zdravih ispitanika.
2. Odrediti povezanost mutacije gena *CYP21A2* Ex7 V281L s alelom B\*14:02.
3. Istražiti povezanost mutacije gena *CYP21A2* Ex7 V281L s haplotipom B\*14:02-DRB1\*01:02 i B\*14:02-DRB1\*03:01.
4. Istražiti povezanost mutacije gena *CYP21A2* Ex7 V281L s haplotipom A\*33:01-B\*14:02.
5. Istražiti povezanost mutacije gena *CYP21A2* Ex7 V281L s haplotipom A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*01:02 i A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*03:01.
6. Usporediti dobivene rezultate s dostupnim podacima za druge populacije u svijetu.

### **3. MATERIJAL I METODE**

## **3.1. MATERIJAL**

### **3.1.1. ISPITANICI**

Istraživanjem je obuhvaćeno 217 nesrodnih zdravih ispitanika (120 muškaraca i 97 žena) kojima su određeni aleli HLA-A, -B i -DRB1. Ukupan broj alela bio je 434. Dio ispitanika nije odabran nasumce već na temelju prisustva samog alela HLA-B\*14:02 ili u kombinaciji s alelima HLA-A\*33:01 i DRB1\*01:02, odnosno prisustvo ova dva alela bez alela B\*14:02.

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. IZOLACIJA DNA**

Pomoću komercijalnog kompleta za izolaciju (NucleoSpin®, Macherey-Nagel GmbH&Co., Düren, Njemačka) iz svih uzoraka krvi bolesnika izolirana je DNA.

Komercijalni komplet za izolaciju sastoji se od: pufera B1, reagensa B2, pufera B5, BW, BE i B3, proteinaze K te NucleoSpin epruvete i kolone. Ova metoda izolacije zasniva se na specifičnom vezanju molekule DNA na silikatnu membranu unutar Nucleospin kolumne (slika 20).

1 <b>Liza uzoraka</b>	 200 µL krvi 25 µL Pro.K 200 µL B3  Mix   70 °C, 10–15 min
2 <b>Regulacija vezanja DHA</b>	210 µL etanola
3 <b>Vezanje DHA</b>	 Unos uzorka na kolumne   11,000 x g, 1 min
4 <b>Ispiranje silika membrane</b>	 500 µL BW 600 µL B5
<b>Prvo pranje</b>	 11,000 x g, 1 min
<b>Drugo pranje</b>	 11,000 x g, 1 min
5 <b>Sušenje membrane</b>	 11,000 x g, 1 min
6 <b>Ispiranje čistog DHA uzorka</b>	 100 µL BE, (70 °C)  RT, 1 min   11,000 x g, 1 min

Slika 20. Shematski prikaz postupka izolacije DNA

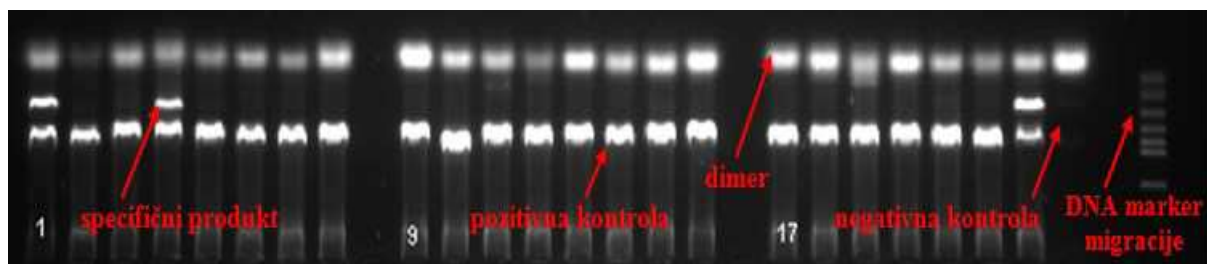
### 3.2.2. ODREĐIVANJE ALELA HLA-A, -B, -DRB1 METODOM PCR-SSO

Metoda PCR-SSO (*engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotides*) temelji se na umnožavanju specifičnog dijela DNA pomoću biotinom obilježenih dimera koji se tijekom hibridizacije inkubiraju s mikrosferama (polistirenske kuglice veličine 5,6 mikrona čija je unutrašnjost ispunjena crvenim ili infracrvenim fluorokromom) koje na površini imaju vezane oligonukleotidne sekvence. Po završetku hibridizacije reakcijskoj smjesi dodaje se fluorescentna boja SAPE (*engl. Streptavidin Phycoerythrin*) koja se veže za biotinom označeni dio DNA koji je nakon hibridizacije specifično vezan s probama na određenim mikrosferama.

Očitavanje rezultata izvodi se pomoću Luminex aparata (The Luminex® LABScan™ 100) koji detektira fluorescenciju pomoću dva lasera i na taj način s visokom točnošću očitava koje su se probe vezale na naš uzorak DNA, odnosno o kojem se alelnom obliku gena HLA radi. Analiza pozitivnih i negativnih rezultata hibridizacije i određivanje gena HLA svakog ispitanika provodi se analitičkim programom Quicktype For Lifecodes (IMMUCOR®).

### 3.2.3. ODREĐIVANJE ALELA HLA-A,-B I -DRB1 METODOM PCR-SSP

Metoda PCR-SSP (*engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*) temelji se na umnožavanju određene sekvence DNA upotrebom dimera specifičnih za jedan ili više alela HLA. Ovisno o lokusu, odnosno genu HLA koji se testira, komercijalni setovi imaju različiti broj reakcijskih smjesa koje se razlikuju samo prema paru specifičnih početnica koje sadržavaju. Osim specifičnih početnica svaka reakcijska smjesa sadrži i kontrolne početnice koje se vežu za sekvencu gena za hormon rasta te umnažaju fragment određene veličine koji služi kao pozitivna kontrola. Unutar seta je uključena i jedna reakcijska smjesa koja služi kao negativna kontrola. Specifične početnice se vežu za one sekvence DNA s kojima su u potpunosti komplementarne, zato nastali amplifikoni predstavljaju specifično umnožene alele pojedinog lokusa HLA. Nakon umnažanja, PCR produkti se provjeravaju elektroforezom na agaroznom gelu u kombinaciji s bojom te se na temelju veličine fragmenata DNA razdvajaju. Svaka se reakcija prema veličini PCR produkata označava kao pozitivna (vidljiv PCR produkt i pozitivna kontrola) ili kao negativna (vidljiva samo pozitivna kontrola). (slika 21).



Slika 21. Rezultati tipizacije HLA-DRB1 metodom PCR-SSP

*Legenda: Uzorci 1, 4 i 23 predstavljaju pozitivne reakcije sa specifično umnoženim PCR produktom, dok ostale reakcije predstavljaju negativne reakcije gdje je vidljiva samo vrpca koja označava pozitivnu kontrolu*



### 3.2.4. ODREĐIVANJE MUTACIJE GENA *CYP21A2 Ex7 V281L*

Metodom PCR-SSP određivana je i mutacija gena *CYP21A2* u egzonu 7 (*Ex7 V281L*). Za svaku osobu postavljene su dvije PCR reakcije, za zdravi/normalni i bolesni/mutirani alel.

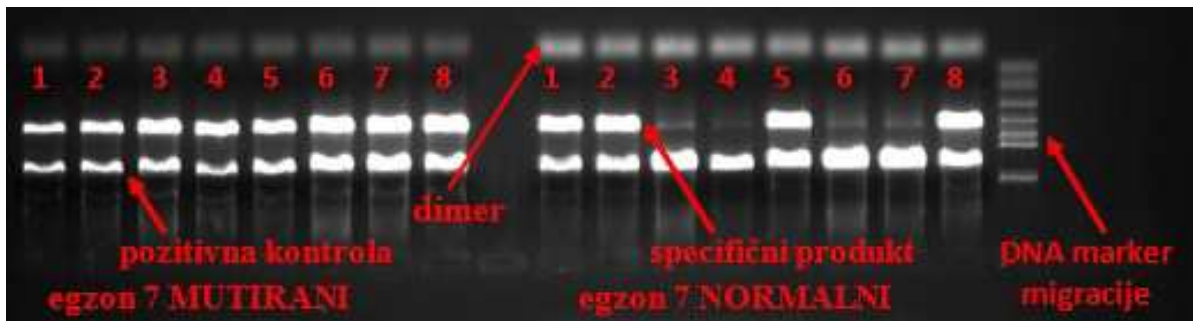
U epruvetu od 200 $\mu$ l odpipetirali smo po jednom uzorku 9,2 $\mu$ l Aqua p.i., te zatim dodali 1,5 $\mu$ l 10xPCR pufera, 0,6 $\mu$ l početnica 5', 0,6 $\mu$ l početnica 3', 0,3 $\mu$ l kontrolnih 3' početnica, 1,2 $\mu$ l dNTP (deoksinukleotid trifosfat) i 0,075  $\mu$ l Taq polimeraze (HotStarTaq<sup>®</sup>). U pripremljenu mješavinu dodano je 2 $\mu$ l DNA ispitanika. Osim umnažanja uzoraka ispitanika, umnažali smo i kontrolnu DNA (ima mutaciju gena *CYP21A2 Ex7 V281L*) kako bi bili sigurni da se cijeli postupak umnažanja odvija u odgovarajućim uvjetima. Mješavina se kratko centrifugira i nakon toga stavlja u aparat za automatsko umnažanje (Mastercycler Gradient Eppendorf, GeneAmp PCR System 2700 Applied Biosystems) na odgovarajući program (tablica 4).

Tablica 4. Program za određivanje mutacije gena *CYP21A2 Ex7 V281L*

KORAK	TEMPERATURA	VRIJEME INKUBACIJE	BROJ CIKLUSA
1	95°C	10 min	1
2	95 °C	45 sec	28
	70 °C	1,5 min	
	72 °C	2,5 min	
3	95 °C	45 sec	6
	66 °C	45 sec	
	72 °C	2,5 min	
4	95 °C	45 sec	1
	66 °C	1 min	
	72 °C	10 min	

Umnožene produkte PCR smo prije provjere na gelu pomiješali s 3 $\mu$ l boje. Uzorke smo zatim pipetom nanosili u jažice na 1,5%-tnom agaroznom gelu obojanog bojom GelRed (GenoVision Inc, West Chester, PA, US). U zadnju jažicu smo dodali 10 $\mu$ l DNA markera migracije. Elektroforeza se odvija u uvjetima 280V/390mA/20min pri čemu DNA putuje kroz agarozni gel i dolazi do razdvajanja pojedinih odsječaka DNA. Teži, odnosno duži odsječci DNA putuju sporije kroz gel te se zato nalaze bliže jažicama, dok lakši, odnosno kraći odsječci DNA putuju brže i na gelu se nalaze dalje od jažica. Nakon elektroforeze gel se fotografira pomoću UV G:BOX Syngene kamere.

Za svakog se ispitanika nanosio uzorak na gel za normalni i mutirani alel gena *CYP21A2* Ex7 V281L. Reakcija je pozitivna za mutirani alel ako je vidljiva vrpca za pozitivnu kontrolu i specifični PCR produkt, te isto tako i za normalni alel. Ako u uzorku u kojem je testiran normalni alel izostane vrpca koja predstavlja specifični PCR produkt znači da osoba nema normalni alel, odnosno da je homozigot za mutirani alel. Ako u uzorku u kojem je testiran mutirani alel izostane vrpca koja predstavlja specifični PCR produkt znači da osoba nema mutirani alel, odnosno da osoba ne nosi mutaciju Ex7 V281L (slika 22).



Slika 22. Prikaz rezultata određivanja mutacije gena *CYP21A2* na agaroznom gelu

*Legenda: uzorci 1, 2, 5 i 8 su heterozigoti za mutaciju gena CYP21A2 (imaju jedan mutirani i jedan normalni alel), a uzorci 3, 4, 6 i 7 su homozigoti za mutaciju gena CYP21A2 (imaju dva mutirana alela)*

### 3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

S obzirom da su osobe bile nesrodne, nismo segregacijom mogli odrediti njihove prave haplotipove HLA (HLA-A\*33:01-B\*14:02, odnosno A\*33:01-B\*14:01-DRB1\*01:02 ili A\*33:01-B\*14:01-DRB1\*03:01) već smo u slučaju da je osoba u svom fenotipu imala alele A\*33:01 ili B\*14:01 smatrali da oni tvore haplotip A\*33:01-B\*14:01 zbog neravnoteže udruživanja koji je dokazan u brojnim populacijskim istraživanjima [12]. Isti je slučaj i s haplotipovima osoba koje su imale alele A\*33:01-B\*14:01-DRB1\*01:02, odnosno A\*33:01-B\*14:01-DRB1\*03:01, te smo i za njih zaključili da nose taj haplotip.

Učestalost alela, haplotipova HLA i mutacija gena *CYP21A2* Ex7 V281L određena je izravnim brojanjem, razlike između pojedinih čimbenika utvrđene su upotrebom  $\chi^2$  testa i omjerom izgleda (*engl. Odds ratio, OR*). U slučaju kada je broj bio manji od 5, korišten je Fisher-ov test. U slučaju da je vrijednost p bila manja od 0,05 usporedba dva čimbenika smatrana je statistički značajnom. Omjerom izgleda vidimo je li vjerojatnost nastupanja određenog događaja ili ishoda jednaka kod obje ispitivane skupine. Omjer izgleda izračunavan je prema formuli:

$$\text{Omjer izgleda} = \frac{PG_1 / (1-PG_1)}{PG_2 / (1-PG_2)}$$

Gdje  $PG_1$  predstavlja izgleda za ispitivani događaj u Skupini 1, a  $PG_2$  predstavlja izgleda za ispitivani događaj Skupine 2 [19].

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. RASPODJELA MUTACIJA GENA *CYP21A2* NA EGZONU 7 V281L UNUTAR ISPITIVANE SKUPINE

Među bolesnicima oboljelim od KAH-a u Hrvatskoj utvrđena je povezanost mutacije gena *CYP21A2* Ex7 V281L s alelom B\*14:02, odnosno haplotipom HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*01:02. Alel B\*14:02 javlja se i u kombinaciji s alelom DRB1\*03:01 tvoreći haplotip HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*03:01. Iz tog razloga analizirali smo skupinu zdravih ispitanika pozitivnih samo za alel B\*14:02 ili u kombinaciji s drugim alelima (A\*33:01, DRB1\*01:02, DRB1\*03:01), kao i skupinu ispitanika koji nisu bili pozitivni za navedene alele HLA, za prisustvo mutacije gena *CYP21A2* Ex7 V281L.

Ispitivana skupina brojala je 217 ispitanika, od toga njih 177 imalo je jedan ili više prije navedenih alela HLA, dok je njih 40 (18,43%) bilo negativno i za B\*14:02 i za alel A\*33:01, DRB1\*01:02 i DRB1\*03:01 (tablica 5).

Tablica 5. Raspodjela bolesnika s obzirom na prisustvo alela A\*33:01, B\*14:02, DRB1\*01:02 i DRB1\*03:01

ALEL(I) HLA	ISPITANICI n (%)
B*14:02	37 (17,05)
A*33:01	2 (0,92)
DRB1*01:02	0
DRB1*03:01	4 (1,84)
A*33:01-B*14:02	18 (8,29)
B*14:02-DRB1*01:02	24 (11,06)
B*14:02-DRB1*03:01	10 (4,61)
A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02	52 (23,96)
A*33:01-B*14:02-DRB1*03:01	30 (13,82)
A*X-B*X-DRB1*X	40 (18,43)
UKUPNO	217

*Legenda:* X – ispitanici negativni za alele: A\*33:01, B\*14:02 i DRB1\*01:02; n – broj ispitanika

Iz tablice 5 je vidljivo da nismo imali niti jednog ispitanika koji je bio pozitivan samo za alel DRB1\*01:02, kao i mali broj osoba pozitivnih samo za alel A\*33:01, odnosno samo za alel DRB1\*03:01.

Raspodjela mutacija gena *CYP21A2* u Ex7 V281L unutar ispitivane skupine prikazana je u tablici 6. Od 217 ispitanika mutacija gena *CYP21A2* Ex7 V281L nađena je kod ukupno 132 ispitanika, odnosno ukupan broj pronađenih mutacija iznosio je 135, budući su tri ispitanika bili homozigoti za ovu mutaciju.

Analiza ispitanika pozitivnih samo za alel A\*33:01 (n=2) pokazala je da niti jedan nije imao mutaciju Ex7 V281L. Od trideset sedam ispitanika koji su imali samo alel B\*14:02 (bez A\*33:01, odnosno alela DRB1\*01:02 ili DRB1\*03:01) njih 15 (40,54%) nosilo je mutaciju Ex7 V281L. Među četiri osobe koje su imale samo alel DRB1\*03:01, samo jedan ispitanik nosio je mutaciju Ex7 V281L.

Kod osamnaest ispitanika koji su imali kombinaciju alela, tj. haplotip HLA-A\*33:01-B\*14:02 njih 14 (77,78%) je nosilo mutaciju Ex7 V281L, dok kod njih 4 (22,23%) mutacija nije nađena. S druge strane, haplotip HLA-B\*14:02-DRB1\*01:02 (bez A\*33:01) uočen je kod 24 ispitanika i svi su imali mutaciju Ex7 V281L. Istovremeno među ispitanicima pozitivnim za haplotip HLA-B\*14:02-DRB1\*03:01 (n=10), njih dvoje bilo je pozitivno za istraživanu mutaciju gena *CYP21A2*.

Haplotip HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*01:02 prisutan je bio kod 52 ispitanika, od kojih je njih 47 (90,38%) imalo i mutaciju Ex7 V281L, dok kod samo 5 ispitanika (9,62%) mutacija nije pronađena. U skupini ispitanika s haplotipom HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*03:01 (n=30) njih 26 (86,67%) bilo je pozitivno za mutaciju Ex7 V281L.

Od četrdeset ispitanika bez niti jednog od prije navedenih alela HLA samo njih 3 (7,50%) nosilo je mutaciju Ex7 V281L. Iz rezultata prikazanih u tablici 7 vidimo da im je zajednički alel bio samo jedan alel na lokusu HLA-B, alel B\*14:01.

Tablica 6. Raspodjela mutacija gena *CYP21A2* Ex7 V281L unutar ispitivane skupine (N=217)

ALEL ILI HAPLOTIP HLA	n	MUT Ex7 V281L poz		MUT Ex7 V281L neg	
		n	%	n	%
samo A*33:01	2	0	-	2	100,00
samo B*14:02	37	15	40,54	22	59,46
samo DRB1*01:02	0	0	-	0	-
samo DRB1*03:01	4	1	25,00	3	75,00
A*33:01-B*14:02	18	14	77,78	4	22,23
B*14:02-DRB1*01:02	24	24	100,00	0	-
B*14:02-DRB1*03:01	10	2	20,00	8	80,00
A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02	52	47	90,38	5	9,62
A*33:01-B*14:02-DRB1*03:01	30	26	86,67	4	13,33
A*X-B*X-DRB1*X A*X-B*X-DRB1*X	40	3	7,50	37	92,50

*Legenda: X – ispitanici negativni za alele: A\*33:01, B\*14:02 i DRB1\*01:02; n – broj ispitanika*

Tablica 7. Tipizacija HLA ispitanika negativnih za alele A\*33:01, B\*14:02, DRB1\*01:02 i DRB1\*03:01 a pozitivnih za mutaciju gena *CYP21A2* Ex7 V281L

ISPITANICI	HLA-A*	HLA-A*	HLA-B*	HLA-B*	HLA-DRB1*	HLA-DRB1*
1	30:04	32:01	14:01	38:01	04:04	15:01
2	66:01	66:01	14:01	15:01	01:01	07:01
3	30:04	30:04	14:01	37:01	15:01	15:01

Broj ispitanika B\*14:02 pozitivnih i nositelja mutacije Ex7 V281L je statistički značajno veći ( $p=0,0015$ ) nego broj ispitanika B\*14:02 negativnih s mutacijom (tablica 8). Među ispitanicima pozitivnim za kombinaciju alela A\*33:01-B\*14:02 našli smo statistički značajno više ( $p<0,0001$ ) mutacija Ex7 V281L u usporedbi s osobama koje nisu imale tu kombinaciju alela HLA. Kada smo usporedili prisutnost mutacije Ex7 V281L među ispitanicima nositeljima kombinacije B\*14:02-DRB1\*01:02 i onima koji nisu imali tu kombinaciju alela našli smo statistički vrlo značajnu razliku ( $p<0,0001$ ). Istovremeno, broj ispitanika s kombinacijom B\*14:02-DRB1\*03:01 i mutacijom je statistički vrlo značajno veći ( $p<0,0001$ ) nego onih ispitanika bez te kombinacije alela HLA ali s mutacijom Ex7 V281L. I na kraju, analiza prisustva mutacije među osobama nositeljima cijelog haplotipa HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*01:02 i onima koji nisu imali taj haplotip statistički je vrlo značajna u korist onih koji su imali taj haplotip. I za drugi haplotip HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*03:01 našli smo povezanost s mutacijom, ali s nešto manjom statističkom značajnošću ( $p=0,0040$ ).



Tablica 8. Usporedba prisustva mutacija gena *CYP21A2* Ex7 V281L među ispitanicima pozitivnim za jedan od alela A\*33:01, B\*14:02, DRB1\*01:02 ili DRB1\*03:01 ili njihovu kombinaciju

				OR	95% CI	p
<b>B*14:02 poz</b>		<b>B*14:02 neg</b>		7,16	2,12-24,19	0,0015
<b>MUT</b>	<b>N</b>	<b>MUT</b>	<b>N</b>			
15	22	4	42			
<b>A*33:01 poz</b>		<b>A*33:01 neg</b>		0,31	0,01-6,60	NS
<b>MUT</b>	<b>N</b>	<b>MUT</b>	<b>N</b>			
0	2	45	70			
<b>DRB1*03:01poz</b>		<b>DRB1*03:01 neg</b>		0,23	0,02-2,22	NS
<b>MUT</b>	<b>N</b>	<b>MUT</b>	<b>N</b>			
1	3	103	70			
<b>A*33:01-B*14:02 poz</b>		<b>A*33:01-B*14:02 neg</b>		36,75	8,10-166,72	<0,0001
<b>MUT</b>	<b>N</b>	<b>MUT</b>	<b>N</b>			
14	4	4	42			
<b>B*14:02-DRB1*01:02 poz</b>		<b>B*14:02-DRB1*01:02 neg</b>		462,78	23,89-8964,63	<0,0001
<b>MUT</b>	<b>N</b>	<b>MUT</b>	<b>N</b>			
24	0	4	42			
<b>B*14:02-DRB1*03:01 poz</b>		<b>B*14:02-DRB1*03:01 neg</b>		3,25	0,47-22,72	NS
<b>MUT</b>	<b>N</b>	<b>MUT</b>	<b>N</b>			
2	8	3	39			
<b>A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02 poz</b>		<b>A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02 neg</b>		8,85	3,35-23,37	<0,0001
<b>MUT</b>	<b>N</b>	<b>MUT</b>	<b>N</b>			
47	5	85	80			
<b>A*33:01-B*14:02-DRB1*03:01 poz</b>		<b>A*33:01-B*14:02-DRB1*03:01 neg</b>		4,97	1,67-14,80	0,0040
<b>MUT</b>	<b>N</b>	<b>MUT</b>	<b>N</b>			
26	4	106	81			

Legenda: MUT – prisutna mutacija Ex7 V281L; N – bez mutacije Ex7 V281L; OR – Odds Ratio; 95% CI – intervali pouzdanosti ; p – razina statističke značajnosti; NS – nije statistički značajno

U tablici 9 uspoređeni su ispitanici pozitivni za alel B\*14:02 i mutaciju Ex7 V821L s ispitanicima pozitivnim za druge kombinacije alela HLA povezanih s mutacijom kako bi utvrdili koja je povezanost najjača. Iz tablice 9 je vidljivo da je statistički najjača povezanost s haplotipom HLA- A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*01:02.

Tablica 9. Usporedba jačine povezanosti alela B\*14:02 i mutacije Ex7 V821L s povezanošću s drugim kombinacijama alela HLA i mutacijom Ex7 V821L

HLA	OR	95% CI	p
B*14:02/A*33:01-B*14:02	0,19	0,05-0,71	0,0130
B*14:02/B*14:02-DRB1*01:02	0,01	0,0008-0,25	0,0036
B*14:02/B*14:02-DRB1*03:01	2,73	0,51-14,67	NS
B*14:02/A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02	0,07	0,02-0,22	<0,0001
B*14:02/A*33:01-B*14:02-DRB1*03:01	0,10	0,03-0,36	0,0004

*Legenda: OR – Odds Ratio; 95% CI – intervali pouzdanosti ; p – razina statističke značajnost; NS – nije statistički značajno*

#### **4.2. USPOREDBA UČESTALOSTI ALELA HLA-A,-B,-DRB1 UNUTAR ISPITIVANE SKUPINE I CBMDR**

Usporedba učestalosti alela lokusa HLA-A kod ispitanika uključenih u istraživanje i podataka za CBMDR prikazana je u tablici 10. Najveću zastupljenost pokazao je alel A\*02:01 (24,24%) što je u skladu s podacima za CBMDR (29,16%). Aleli: A\*01:01, A\*03:01, A\*24:02 pokazali su učestalost veću od 10%, dok su svi preostali aleli lokusa HLA-A imali učestalost manju od 10%.

Uočena razlika u zastupljenosti alela A\*30:02 (3,03%) unutar ispitivane skupine i u usporedbi s učestalošću u CBMDR-u (0,21%), te razlika za alel A\*68:02 nije statistički značajna, a i vjerojatno je rezultat izbacivanja alela A\*33:01 iz analize. Naime, za ovaj alel lokusa HLA-A nismo računali zastupljenost jer jedan od kriterija odabira naših ispitanika je bilo njegovo prisustvo.

Tablica 10. Usporedba učestalosti alela HLA-A unutar ispitivane skupine (N=165)<sup>1</sup> i CBMDR-u (N=4000)<sup>2</sup>

HLA-A*	ISPITIVANA SKUPINA (N=165)		CBMDR <sup>3</sup> (N=4000)	
	n	F	n	F
01:01	37	0,1121	995	0,1244
02:01	80	0,2424	2330	0,2916
02:02	3	0,0090	3	0,0004
02:05	2	0,0061	63	0,0079
02:06	2	0,0061	13	0,0016
02:34	1	0,0030	2	0,0002
03:01	52	0,1575	947	0,1184
03:02	1	0,0030	41	0,0051
11:01	17	0,0515	553	0,0691
23:01	1	0,0030	198	0,0248
24:02	34	0,1030	878	0,1098
25:01	12	0,0363	250	0,0313
26:01	14	0,0424	380	0,0475
30:01	3	0,0090	105	0,0131
30:02	10	0,0303	17	0,0021
30:04	13	0,0394	15	0,0019
31:01	8	0,0242	185	0,0231
32:01	15	0,0454	314	0,0393
34:02	1	0,0030	3	0,0004
66:01	2	0,0060	30	0,0038
68:01	8	0,0242	321	0,0401
68:02	14	0,0424	48	0,0060

Legenda: <sup>1</sup> za izračun učestalosti alela HLA-A iz ukupnog broja isključen je alel A\*33:01 s obzirom da je jedan od kriterija uključivanja uzoraka u istraživanje bilo prisustvo ovog alela; <sup>2</sup> preuzeto iz [6]; <sup>3</sup> engl. Croatian Bone Marrow Donor Registry; n – broj uočenih alela; F – učestalost alela

U tablici 11 prikazana je usporedba učestalosti alela HLA-B unutar naše ispitivane skupine i CBMDR-a. Na lokusu HLA-B najčešći alel bio je B\*51:01 (8,59%), kao i među ispitanicima u CBMDR-u. Samo je još pet alela lokusa HLA-B (B\*18:01, B\*08:01, B\*35:01, B\*44:02g i B\*35:03) uočeno s učestalošću većom od 5,00%, što je u skladu s podacima za CBMDR. Nisu nađene statistički značajne razlike između ove dvije skupine. Naime, nađena razlika u zastupljenosti za alele: B\*15:01, B\*27:05 i B\*14:01 je vjerojatno rezultat izostanka alela B\*14:02 u analizama. Objašnjenje za to je isto kao i za alel A\*33:01.

Tablica 11. Usporedba učestalosti alela HLA-B unutar ispitivane skupine (N=129)<sup>1</sup> i unutar CBMDR-u (N=4000)<sup>2</sup>

HLA-B*	ISPITIVANA SKUPINA (N=129)		CBMDR <sup>#</sup> (N=4000)	
	n	F	n	F
07:02	13	0,0508	545	0,0681
07:05	1	0,0039	18	0,0022
08:01	18	0,0703	622	0,0778
13:02	5	0,0195	301	0,0376
14:01	22	0,0859	27	0,0034
15:01	16	0,0625	311	0,0389
15:09	1	0,0039	2	0,0002
15:10	1	0,0039	7	0,0009
15:17	2	0,0078	34	0,0042
15:24	1	0,0039	3	0,0004
18:01	20	0,0781	653	0,0816
27:05	21	0,0820	318	0,0398
27:14	1	0,0039	4	0,0005
35:01	15	0,0586	489	0,0611
35:02	4	0,0156	101	0,0126
35:03	17	0,0664	465	0,0581
37:01	3	0,0117	75	0,0094
38:01	10	0,0391	351	0,0439
39:01	1	0,0039	205	0,0256
40:01	5	0,0195	111	0,0139
40:02	4	0,0156	182	0,0228
44:02g	17	0,0664	471	0,0589
44:05	3	0,0117	65	0,0081
48:01	1	0,0039	11	0,0014
49:01	4	0,0156	154	0,0193
50:01	2	0,0078	117	0,0146
51:01	22	0,0859	890	0,1113
51:08	1	0,0039	10	0,0013
52:01	6	0,0234	117	0,0146
53:01	3	0,0117	54	0,0068
55:01	4	0,0156	100	0,0125
56:01	3	0,0117	79	0,0099
57:01	5	0,0195	201	0,0251
58:01	4	0,0156	84	0,0105

Legenda: <sup>1</sup> za izračun učestalosti alela HLA-B iz ukupnog broja isključen je alel B\*14:02 s obzirom da je jedan od kriterija uključivanja uzoraka u istraživanje bilo prisustvo ovog alela; <sup>2</sup> preuzeto iz [6]; <sup>3</sup> engl. Croatian Bone Marrow Donor Registry; n – broj uočenih alela; F – učestalost alela

Tablica 12 prikazuje raspodjelu alela lokusa HLA-DRB1 među ispitanicima uključenim u ovo istraživanje i onima iz CBMDR-a. Najčešći alel među našim ispitanicima bio je alel DRB1\*01:01 (9,80%), slijedili su ga aleli DRB1\*07:01 (6,54%) i DRB1\*16:01 (8,17%) što je u skladu s podacima za CBMDR.

Tablica 12. Usporedba učestalosti alela HLA-DRB1 unutar ispitivane skupine (N=147)<sup>1</sup> i unutar CBMDR-u (N=4000)<sup>2</sup>

HLA-DRB1*	ISPITIVANA SKUPINA (N=147)		CBMDR <sup>#</sup> (N=4000)	
	n	F	n	F
01:01	30	0,0979	782	0,0979
04:01	5	0,0163	236	0,0296
04:02	7	0,0229	203	0,0255
04:03	7	0,0229	125	0,0157
04:04	14	0,0458	116	0,0146
04:05	5	0,0163	29	0,0036
04:07	2	0,0065	27	0,0027
04:08	1	0,0033	25	0,0031
04:15	1	0,0033	3	0,0004
07:01	20	0,0654	782	0,0979
08:01	7	0,0229	235	0,0294
10:01	4	0,0131	83	0,0104
11:01	34	0,1111	630	0,0788
11:02	1	0,0033	14	0,0018
11:03	15	0,0490	70	0,0088
11:04	16	0,0523	612	0,0766
11:06	2	0,0065	1	0,0001
12:01	2	0,0065	123	0,0154
13:01	21	0,0686	515	0,0644
13:02	17	0,0556	353	0,0441
13:03	10	0,0327	72	0,0090
13:05	2	0,0065	23	0,0029
14:01g	8	0,0261	296	0,0370
14:04	1	0,0033	12	0,0015
15:01	29	0,0948	697	0,0871
15:02	5	0,0163	100	0,0125
15:03	1	0,0033	4	0,0005
16:01	25	0,0817	753	0,0941
16:02	2	0,0065	81	0,0101

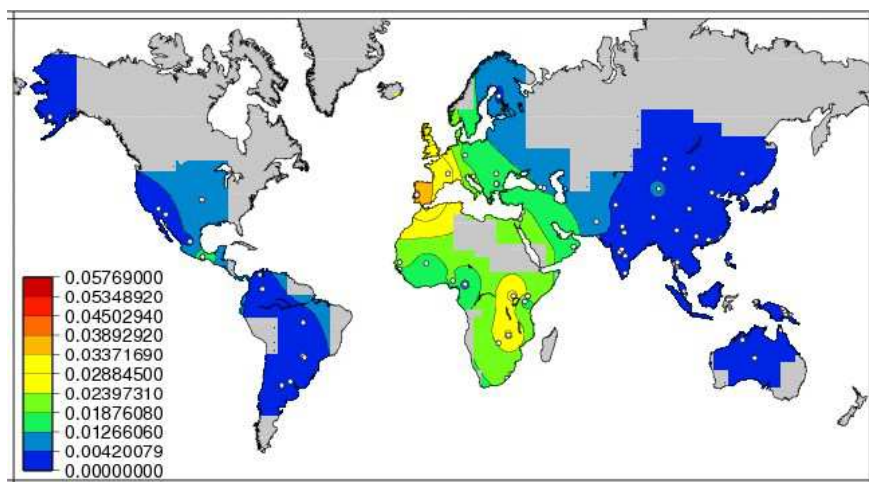
Legenda: <sup>1</sup> za izračun učestalosti alela HLA-DRB1 iz ukupnog broja isključeni su aleli DRB1\*01:02 i DRB1\*03:01 s obzirom da je jedan od kriterija uključivanja uzoraka u istraživanje bilo prisustvo ovih alela; <sup>2</sup> preuzeto iz [6]; <sup>3</sup> engl. Croatian Bone Marrow Donor Registry; n – broj uočenih alela; F – učestalost alela

## **5. RASPRAVA**

Poznato je da je NKKAH najblaži oblik kongenitalne adrenalne hiperplazije, autosomno-recesivne bolesti, kojoj je jedno od obilježja velika raznolikost kliničke slike. Usprkos visokoj učestalosti, osobito u nekim populacijama, bolest još uvijek vrlo često ostaje neprepoznata, osobito među muškarcima [16].

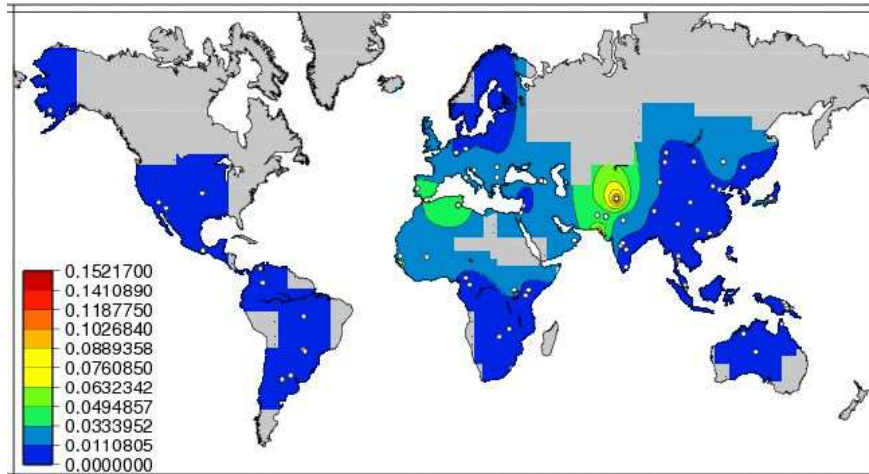
Istraživanje unutar skupine bolesnika s NKKAH-om u Hrvatskoj, provedeno prošle godine, otkrilo je da veliki broj bolesnika nosi mutaciju gena *CYP21A2* u egzonu 7 (V281L). Ova mutacija je rasprostranjena diljem svijeta među bolesnicima s NKKAH-om i spada u jednu od osam mutacija gena *CYP21A2* koje se rutinski određuju u mnogim laboratorijima koje se bave genetikom KAH-a. Prethodno istraživanje pokazalo je visoku statistički značajnu povezanost ( $p < 0,0001$ ) mutacije Ex7 V281L s HLA-B14 među bolesnicima s NKKAH-om [16].

Gen HLA-B\*14 ima preko 30 različitih alela, od kojih su aleli B\*14:01 i B\*14:02 dva najčešća u populacijama europskog porijekla [15]. Od ova dva alela, B\*14:02 je češći, kako u Europi, tako i u našoj populaciji [6]. Iz slika 22 vidimo kako se alel HLA-B\*14:02 širio s afričkog kontinenta prema jugu Europe, odnosno kako se preko Španjolske, Francuske proširio do srednje i jugoistočne Europe. Vidljivo je iz slike 23 kako je zastupljenost alela B\*14:02 najveća na afričkom kontinentu. Učestalost ovog alela u našoj populaciji (2,12%) odgovara učestalostima u susjednim populacijama, za koje postoje dostupni podaci [6,15].



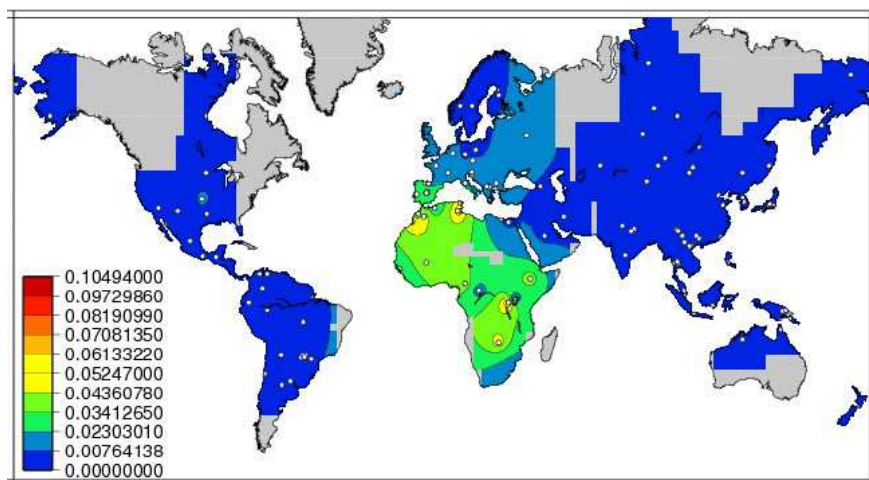
Slika 23. Raspodjela alela HLA-B\*14:02 u svijetu (preuzeto s [22])

Dosadašnja populacijska istraživanja provedena širom svijeta pokazala su da je alel B\*14:02 u neravnoteži udruživanja s alelom A\*33:01, čija raspodjela u svijetu djelomično prati raspodjelu alela B\*14:02 (slika 24). Naime, smatra se da je alel A\*33:01 nastao na indijskom potkontinentu odakle se raširio na Bliski istok i onda dalje u Europu [15]. Njegova učestalost u Hrvatskoj iznosi 2,05% [6].



Slika 24. Raspodjela alela HLA-A\*33:01 u svijetu (preuzeto s [22])

Također postoje brojni radovi o formiranju zajedničkog haplotipa između alela A\*33:01, B\*14:02 s alelom DRB1\*01:02 [12] koji ima veliku vrijednost LD-a. Alel DRB1\*01:02 ne spada u česte alele u hrvatskoj populaciji (1,35%), ali treba istaknuti da je vrlo teško naći u našoj populaciji osobe koje nose alel DRB1\*01:02, a da istovremeno nemaju i alel B\*14:02. Kao što se vidi na slici 25, najveća učestalost alela DRB1\*01:02 je u Africi, dok mu je učestalost među populacijama europskog porijekla puno manja.



Slika 25. Raspodjela alela HLA-DRB1\*01:02 u svijetu (preuzeto s [22])



Aleli A\*33:01 i B\*14:02 također tvore i haplotip s alelom DRB1\*03:01 koji nema tako visoku vrijednost LD-a. U tablici 13 prikazana je raspodjela ta dva haplotipa alela B\*14:02 u različitim populacijama [24].

Tablica 13. Učestalost haplotipova HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*01:02 i A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*03:01

HAPLOTIP HLA	POPULACIJA	UČESTALOST (%)
A*33:01-B*14:02-DRB1*01:02	Tunis	4,00
	Armenija	3,00
	DKMS – (Španjolci)	1,13
	DKMS – (Turci)	0,92
	DKMS – (Talijani)	0,82
	DKMS – (Grci)	0,74
	DKMS – (Rumunji)	0,61
	DKMS – (BiH)	0,58
	<b>HRVATSKA</b>	<b>0,51</b>
	DKMS – (Francuzi)	0,50
	DKMS – (Austrijanci)	0,41
	DKMS – (Kinezi)	0,23
	DKMS – (Britanci)	0,10
A*33:01-B*14:02-DRB1*03:01	DKMS – (BiH)	0,77
	DKMS – (Španjolci)	0,33
	<b>HRVATSKA</b>	<b>0,31</b>
	DKMS – (Austrijanci)	0,29
	DKMS – (Talijani)	0,22
	DKMS – (Rumunji)	0,20
	DKMS – (Britanci)	0,14
	DKMS – (Grci)	0,08
	DKMS – (Francuzi)	0,05
	DKMS – (Turci)	0,05

Legenda: DKMS - German Bone Marrow Donor Center

Zbog svega navedenog, cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti učestalost mutacije gena *CYP21A2* u egzonu 7 V281L među zdravim osobama koje imaju jedan od alela (A\*33:01, B\*14:02, DRB1\*01:02, DRB1\*03:01) ili neku od kombinacija ovih alela.

Ovo istraživanje obuhvatilo je skupinu od 217 ispitanika, od kojih je 177 (81,57%) u svom haplotipu sadržavalo alel B\*14:02 za koji smo smatrali da je povezan s mutacijom Ex7 V281L. Kod 128 (71,75%) B\*14:02 pozitivnih osoba pronađena je mutacija gena *CYP21A2* (Ex7 V281L), dok su sve osobe s kombinacijom alela B\*14:02-DRB1\*01:02 nosile istraživanu mutaciju. To je u skladu s rezultatima istraživanja među bolesnicima s NKKAH-om u hrvatskoj populaciji [16]. Praćena mutacija uočena je među 77,78% ispitanika pozitivnih za kombinaciju alela A\*33:01-B\*14:02, što je više nego u istraživanju koje je provela Krnić (73,53%) u Hrvatskoj, kao i u istraživanjima provedenim u Francuskoj (33,30%, odnosno 41,20%) [16]. S obzirom da nismo uočili povezanost A\*33:01 s mutacijom Ex7 V281L, kao i činjenicu da nismo imali niti jednu osobu koja bi bila DRB1\*01:02 pozitivna, pretpostavka je da je ova mutacija prvenstveno povezana s alelom B\*14:02, a druge povezanosti su rezultat LD tih alela na lokusu HLA-A i -DRB1 s alelom B\*14:02.

Analiza ispitanika pozitivnih za haplotip HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*01:02 u usporedbi s B\*14:02 pozitivnim ispitanicima pokazala je vrlo visoku statističku značajnost ( $p < 0,0001$ ) što govori o povezanosti haplotipa HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*01:02 i mutacije u egzonu 7, te se slaže i s istraživanjem iz 2014. godine [16].

Haplotip HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*03:01 je također povezan s mutacijom Ex7 V281L među našim ispitanicima pozitivnim za ovaj haplotip (86,67%), što je više nego u istraživanju koje je provela Krnić (14,29%) [16]. Usporedbom ispitanika pozitivnih za ovaj haplotip i mutaciju Ex7 V281L i ispitanika pozitivnih za alel B\*14:02 i mutaciju Ex7 V281L, dokazana je visoka statistička povezanost ( $p < 0,0004$ ).

Od 40 ispitanika koji nisu imali niti jedan od testiranih alela HLA (A\*33:01, B\*14:02, DRB1\*01:02, DRB1\*03:01) samo je njih 7,50% nosilo mutaciju Ex7 V281L. Zajednički alel toj trojici ispitanika bio je alel B\*14:01, koji je u našoj populaciji šest puta (0,34%) manje zastupljen nego alel B\*14:02 (2,12%) [6]. S obzirom da smo u ovom istraživanju imali 23 osobe koje su bile pozitivne za alel B\*14:01, a samo njih troje (13,04%) je imalo mutaciju, ne možemo govoriti o povezanosti ovog alela s mutacijom Ex7 V281L.

## **6. ZAKLJUČAK**

1. Unutar skupine od 217 zdravih ispitanika (koji su odabrani na temelju prisutnosti/odsutnosti alela HLA-A\*33:01, B\*14:02, DRB1\*01:02, DRB1\*03:01), mutacija gena *CYP21A2* Ex7 V281L otkrivena je kod 132 (60,83%) ispitanika, od kojih su 3 ispitanika bili homozigoti za istraživanu mutaciju.
2. Mutacija gena *CYP21A2* Ex7 V281L uočena je kod 71,75% ispitanika pozitivnih za alel B\*14:02 te je pokazala statistički značajnu povezanost s tim alelom ( $p < 0,0001$ ) u hrvatskoj populaciji.
3. Za haplotip HLA-B\*14:02-DRB1\*01:02 dokazana je statistički značajna povezanost ( $p < 0,0001$ ) s mutacijom gena *CYP21A2* Ex7 V281L, dok povezanost s haplotipom HLA-B\*14:02-DRB1\*03:01 nije uočena ( $p > 0,05$ ).
4. Mutacija gena *CYP21A2* Ex7 V281L je statistički značajno češće prisutna ( $p < 0,0001$ ) među ispitanicima s haplotipom HLA-A\*33:01-B\*14:02 nego među osobama koje ne nose taj haplotip.
5. Analiza povezanosti haplotipova HLA-A-B-DRB1 i mutacije gena *CYP21A2* Ex7 V281L pokazala je statistički značajnu povezanost s haplotipom HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*01:02 ( $p < 0,0001$ ) i haplotipom HLA-A\*33:01-B\*14:02-DRB1\*03:01 ( $p = 0,0040$ ).
6. Dobiveni rezultati su u skladu s podacima za druge populacije u svijetu.

## **7. LITERATURA**

1. Andreis I., Batinić D., Čulo F. i sur. (2004): Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb.
2. Bodmer W. F. (1987): The HLA system: structure and function. *Journal of Clinical Pathology*, 40 (9): 948-958.
3. Brkljačić-Kerhin V, Grubić Z. (2006): Glavni sistem tkivne snošljivosti u ljudi. U: Grgičević D. i sur. *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*, Zagreb, Medicinska naklada, 1. izdanje: 254-258.
4. Choo S. Y. (2007): The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal*, 48 (1): 11-23.
5. Mehra N. K. (2010): *The HLA Complex in Biology and Medicine: A Resource Book*. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi.
6. Grubic Z., Burek Kamenaric M., Mikulic M. i sur. (2014): HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *International Journal of Immunogenetics*, 41 (3): 211-221.
7. Kindt T. J., Osborne B. A., Goldsby R. A. (2006): *Kuby Immunology*. Freeman, W. H. & Company, New York.
8. Undlien D. E., Lie B. A., Thorsby E. (2001): HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends in Genetics*, 17 (2): 93-100.
9. Geneugelijk K., Thus K. A., Spierings E. (2014): Predicting Alloreactivity in Transplantation. *Journal of Immunology Research*, (1): 2-7.
10. Janeway C. A., Travers P., Walport M. i sur. (2005): *Immunobiology – The immune system in health and disease*. Garland Publishing, New York.
11. Corsi D., Salazar M., Granja C. B. i sur. (1995): Advances in HLA genetics. *Experimental and Clinical Immunogenetics*, 12 (3): 156-170.
12. Browning M, McMichael A. (1996): *HLA and MHC genes, molecules and function*. BIOS Scientific Publishers Limited.
13. Balog V. (2010): *Povezanost kromosomske regije 6p21 i dječje astme u populaciji Hrvatske*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

14. Klein J., Sato A. (2000): The HLA system. First of two parts. The New England Journal of Medicine, 343 (10): 702-709.
15. Nunes J. M., Buhler S., Roessli D., Sanchez-Mazas A. (2014): The *HLA-net GENE[RATE]* pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas. Tissue Antigens, 83 (5): 307-323.
16. Krnić N. (2014): Kliničke, biokemijske i molekularne karakteristike bolesnika s neklasičnom kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom zbog manjka 21-hidroksilaze. Doktorska disertacija, Središnja medicinska knjižnica, Sveučilište u Zagrebu.
17. Concolino P., Mello E., Minucci A. i sur. (2009): A new *CYP21A1P/CYP21A2* chimeric gene identified in an Italian woman suffering from classical congenital adrenal hyperplasia form. BMC Medical Genetics, 22 (10): 1-3.
18. White C. P., Speiser W. P. (2000): Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. North Shore University Hospital and New York University School of Medicine, New York, Endocrine Reviews, 21 (3): 245-291.
19. McHugh M. L. (2009): Omjer izgleda: uporaba i tumačenje. Biochemia Medica, 19 (2): 120-126.
20. <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html> (08.07.2015.)
21. [http://hla.alleles.org/inc/images/graph\\_hires.png](http://hla.alleles.org/inc/images/graph_hires.png) (08.07.2015.)
22. [www.pypop.org](http://www.pypop.org) (15.07.2015.)
23. [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) (16.07.2015.)
24. [www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net) (23.07.2015.)

## **8. ŽIVOTOPIS**



Rođena sam 07. lipnja 1989. u Našicama. Osnovnu školu Josipa Jurja Strossmayera u Đurđenovcu završila sam 2004. godine. Iste godine upisala sam srednju Medicinsku školu Osijek u Osijeku, koju sam završila 2008. godine. Po završetku srednje škole odradila sam pripravnički staž za medicinsku sestru u Kliničkom bolničkom centru Osijek u trajanju od jedne godine.

Preddiplomski studij Biologije pri Odjelu za biologiju Sveučilišta u Osijeku upisala sam 2009. godine, a 2013. stekla sam zvanje prvostupnika biologije. Iste godine upisala sam diplomski studij Eksperimentalne biologije (modul: Fiziologija i imunobiologija) na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala sam 18. rujna 2015. godine obranivši rad: „Povezanost mutacije (egzon 7 – V281L) gena *CYP21A2* s haplotipovima HLA u Hrvatskoj“, pod mentorstvom prof.dr.sc. Zorane Grubić.