

# Raspodjela alela gena HLA-DRB1\*04 kod osoba s povećanim rizikom za razvoj celijakije

---

Skukan, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:664570>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

Laura Skukan

**Raspodjela alela gena HLA-DRB1\*04 kod osoba s  
povećanim rizikom za razvoj celijakije**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

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

## ZAHVALE

Prije svega željela bih se zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Zorani Grubić na brojnim znanstvenim i stručnim savjetima te velikoj pomoći i ukazanom strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem mag. biol. mol. Mariji Maskalan i svim ostalim djelatnicima Kliničke jedinice za tipizaciju tkiva na pomoći i savjetima kojima su mi uvelike olakšali izradu diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestri Roberti i prijateljima na razumijevanju, savjetima i potpori tijekom mog studiranja.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Raspodjela alela gena HLA-DRB1\*04 kod osoba s povećanim rizikom za razvoj celijakije**

Laura Skukan

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U radu je analizirana raspodjela alela gena HLA-DRB1\*04 i njihovih produženih haplotipova HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 kod osoba s povećanim rizikom za razvoj celijakije (N=2009) i kontrolnih zdravih ispitanika (N=571). Svim ispitanicima određeni su geni i aleli lokusa HLA-DRB1, -DQA1 i -DQB1 te produženi haplotipovi HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 metodom lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidnim probama specifičnih sekvenci (PCR-SSO) te metodom lančane reakcije polimerazom i početnicama specifičnih sekvenci (PCR-SSP). Najčešći alel u obje skupine bio je HLA-DRB1\*04:01 što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima. Alel HLA-DRB1\*04:50 otkriven je po prvi puta u hrvatskoj populaciji i to u rizičnoj skupini ispitanika. Usporedbom rizične i kontrolne skupine uočena je statistički značajno manja učestalost ( $P=0,0401$ ) alela HLA-DRB1\*04:02 u rizičnoj skupini (19,38%) u odnosu na kontrolu (28,57%). Usporedba raspodjele produženih haplotipova HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 pokazala je da je haplotip HLA-DRB1\*04:03~DQA1\*03:01~DQB1\*03:05 statistički značajno češći ( $P=0,0095$ ) kod zdravih ispitanika (30,00%) u odnosu na rizičnu skupinu (7,69%).

(50 stranica, 17 slika, 6 tablica, 33 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: Celijakija, aleli HLA-DRB1\*04, haplotipovi HLA

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

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

Dr. sc. Ana Previšić, doc., PMF Zagreb

Zamjena: Dr.sc. Sunčica Bosak, doc., PMF Zagreb

Rad prihvaćen: 31.01.2019.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

## **The distribution of HLA-DRB1\*04 alleles among individuals with an higher risk for developing celiac disease**

Laura Skukan

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The distribution of HLA-DRB1\*04 alleles and HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 haplotypes among individuals with risk for developing celiac disease (N=2009) and healthy controls (N=571) was investigated in the present study. Genes and alleles at HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 loci, as well as HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 extended haplotypes were determined for all individuals using polymerase chain reaction and sequence specific probes (PCR-SSO) method and polymerase chain reaction and sequence specific primers (PCR-SSP) method. The most frequent allele in both tested groups was HLA-DRB1\*04:01 which is in concordance with previous findings. The HLA-DRB1\*04:50 allele was detected for the first time in the Croatian population, more precisely, in the group of subjects with a risk for developing celiac disease. The comparison of risk and control group revealed a significantly lower frequency of HLA-DRB1\*04:02 allele in the risk group than among controls (19,4% vs. 28,6%; P=0.0401). The analysis of the allele frequency at HLA-DQA1 and -DQB1 loci in the HLA-DRB1\*04 extended haplotypes was conducted. The results of this analysis demonstrated that HLA-DRB1\*04:03~DQA1\*03:01~DQB1\*03:05 haplotype occurs significantly more frequently (P=0.0095) among healthy individuals (30,00%) than in the risk group of subjects (7,69%).

(50 pages, 17 figures, 6 tables, 33 references, original in: Croatian)

Keywords: Celiac disease, HLA-DRB1\*04 alleles, HLA haplotypes

Supervisor: Prof. Zorana Grubić, PhD, University Hospital Centre Zagreb

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

Dr. Ana Previšić, Asst. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Replacement: Dr. Sunčica Bosak, Asst. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis accepted: 31.01.2019.



# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....                                    | <b>1</b>  |
| <b>1.1. SUSTAV HLA</b> .....                            | <b>2</b>  |
| 1.1.1. Obilježja sustava HLA.....                       | 3         |
| 1.1.2. Smještaj sustava HLA .....                       | 4         |
| 1.1.3. Geni i molekule HLA razreda I .....              | 5         |
| 1.1.4. Geni i molekule HLA razreda II.....              | 7         |
| 1.1.5. Podregije sustava HLA razreda II.....            | 9         |
| 1.1.6. Gen HLA-DRB1*04.....                             | 10        |
| 1.1.7. Primjena određivanja gena sustava HLA.....       | 11        |
| 1.1.8. Mehanizmi povezanosti gena HLA i bolesti .....   | 12        |
| <b>1.2. CELIJAKIJA</b> .....                            | <b>14</b> |
| 1.2.1. Patogeneza celijakije.....                       | 15        |
| 1.2.2. Aktivacija imunološkog sustava u celijakiji..... | 16        |
| 1.2.3. Povezanost celijakije s genima HLA .....         | 17        |
| 1.2.4. Toksičnost i imunogenost glutena.....            | 19        |
| 1.2.5. Povezanost celijakije i drugih bolesti .....     | 20        |
| <b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....                       | <b>21</b> |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....                     | <b>23</b> |
| <b>3.1. MATERIJALI</b> .....                            | <b>24</b> |
| <b>3.2. METODE</b> .....                                | <b>24</b> |
| 3.2.1. Izolacija DNA.....                               | 24        |
| 3.2.2. Tipizacija gena HLA-DRB1, -DQA1 i -DQB1 .....    | 24        |
| 3.2.3. Statistička obrada .....                         | 26        |
| <b>4. REZULTATI</b> .....                               | <b>27</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.1. RASPODJELA GENOTIPOVA HLA-DRB1/DRB1 MEĐU ISPITANICIMA S POVEĆANIM RIZIKOM ZA RAZVOJ CELIJKIJE I KONTROLOM .....</b>       | <b>28</b> |
| <b>4.2. RASPODJELA HETERODIMERA HLA-DQ2 I HLA-DQ8 MEĐU ISPITANICIMA S POVEĆANIM RIZIKOM ZA RAZVOJ CELIJAKIJE I KONTROLOM.....</b> | <b>30</b> |
| <b>4.3. RASPODJELA ALELA HLA-DRB1*04 MEĐU ISPITANICIMA POZITIVNIM ZA GEN HLA-DRB1*04 .....</b>                                    | <b>32</b> |
| <b>4.4. RASPODJELA HAPLOTIPOVA HLA-DRB1~DQA1~DQB1 MEĐU ISPITANICIMA POZITIVNIH ZA GEN HLA-DRB1*04.....</b>                        | <b>34</b> |
| <b>5. RASPRAVA.....</b>   | <b>38</b> |
| <b>6. ZAKLJUČAK.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>7. LITERATURA.....</b>   | <b>46</b> |
| <b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>  | <b>49</b> |

## **1. UVOD**

## 1.1. SUSTAV HLA

Osnovna zadaća imunološkog sustava jest obrana organizma od infekcije, tumorski stanica i održavanje antigenske i genske homeostaze. Dva osnovna mehanizma imunološke obrane su nespecifična i specifična imunost. Nespecifična imunost sudjeluje u obrani organizma od većine stranih antigena dok specifična imunost obuhvaća humoralni odgovor posredovan protutijelima i staničnu imunost, posredovanu limfocitima T koji potiču proliferaciju limfocita B ili citotoksičnu aktivnost T limfocita. Kako bi došlo do aktivacije stanične imunosti, antigen prezentirajuće stanice moraju prezentirati antigen limfocitima T. Molekule koje sudjeluju u prezentaciji antigena određene su genima koji pripadaju sustavu nazvanom Glavni sustav tkivne podudarnost odnosno sustavu MHC (engl. *Major histocompatibility complex*, MHC). Kod ljudi je taj sustav nazvan sustav HLA (engl. *Human Leucocyte Antigens*, HLA) zbog toga što je prvo otkriven na leukocitima. (1)

George D. Snell prvi je počeo proučavati sustav tkivne podudarnosti kod miša. Proveo je istraživanja na tumorskim antigenima miša koje kodira gen H po čemu je sustav tkivne podudarnosti kod miša nazvan H-2 (engl. *Histocompatibility locus 2*, H2). Pokušaj presađivanja tumora između dva različita soja pokazao je da presađeni tumora ne može rasti u drugom soju. Kao glavni razlog nemogućnosti rasta naveo je otpornost primatelja na rast tumorskih antigena drugog soja. Kasnije je utvrđeno da geni lokusa H-2 kodiraju jake antigene tkivne podudarnosti te da oni imaju glavnu ulogu u odbacivanju tkivnih transplantata. Polovicom 20. stoljeća nobelovac Jean Dausset otkrio je protutijela u serumu politransfundiranih pacijenata koja su reagirala s leukocitnim antigenima donora koji nisu bili odgovarajuće krvne grupe. Istovremeno je objavljeno još nekoliko radova iste tematike na temelju kojih je Dausset zaključio da je riječ o antigenima tkivne podudarnosti koji su iznimno bitni u transplantacijskoj imunologiji. On je otkrio prvi gen sustava HLA, gen HLA-A, a kasnije je formiran čitav sustav HLA unutar kojeg su otkriveni ostali geni HLA. (2)

Glavne uloge sustava HLA su: regulacija imunološkog prepoznavanja stranih antigena, regulacija proizvodnje specifičnih protutijela, kontrola sinteze tkivnih antigena kao i regulacija proizvodnje komponenti komplementa.

### 1.1.1. Obilježja sustava HLA

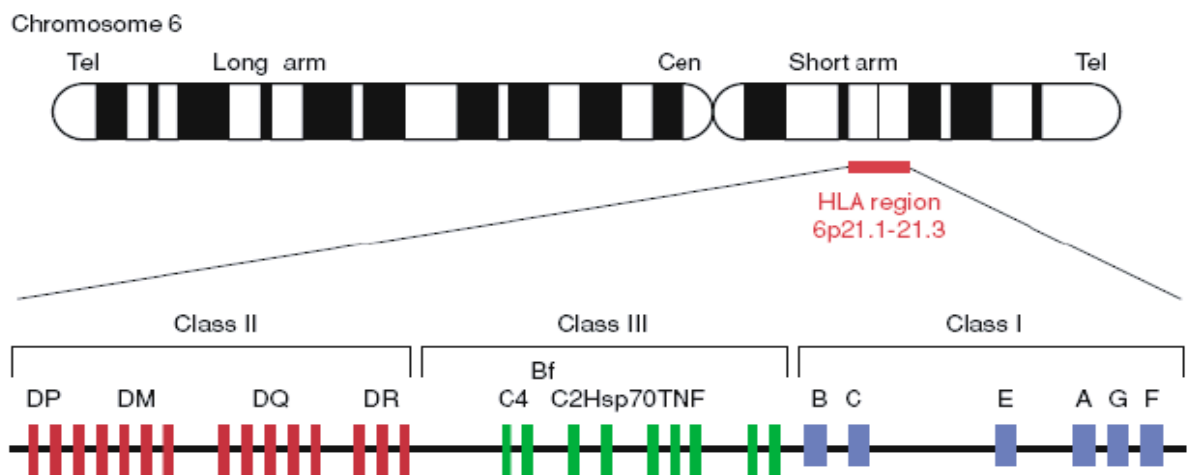
Do danas je otkriveno da postoji preko 200 gena unutar regije HLA zbog čega je poligenija jedno od glavnih obilježja ovog sustava. Osim toga, sustav HLA predstavljen je s više od 18000 različitih alela HLA što ga čini najpolimorfnijim genetskim sustavom kod čovjeka. Najpolimorfniji gen je gen HLA-B na kojem je do sad otkriveno više od 5000 različitih alela (preuzeto s <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). Izraziti polimorfizam ovog sustava ostvaruje se različitim genetskim mehanizmima kao što su rekombinacija, točkasta mutacija i genska konverzija. Geni HLA nasljeđuju se po principu pravilne segregacije što znači da osoba nasljeđuje jedan haplotip (kombinacija gena HLA na jednom kromosomu) od oca drugi od majke. Zbog kodominantne ekspresije ovih gena oba nasljeđena alela HLA ekspimirani su na površini stanica. Još jedno obilježje povezano sa sustavom HLA je genetska neravnoteža udruživanja (engl. *Linkage disequilibrium*, LD) gdje se dva ili više različitih alela usko vezanih lokusa pojavljuju češće u zajedničkom haplotipu HLA nego što bi to bilo za očekivati na temelju njihove pojedinačne učestalosti (1).

Navedena obilježja gena HLA omogućavaju ekspresiju različitih molekula na površini stanica koje sudjeluju u prezentaciji stranih antigena. Raznolikost molekula HLA ekspimiranih na površini antigen prezentirajućih stanica evolucijska je prednost zbog toga što se na taj način osigurava predočavanje velikog broja različitih stranih antigena i aktivacija imunološkog odgovora s ciljem obrane organizma.

### 1.1.2. Smještaj sustava HLA

Sustav HLA smješten je na kraćem kraju kromosoma 6 (6p21.3) i obuhvaća oko 4 milijuna parova baza. Geni HLA podijeljeni su u tri razreda, HLA razred I, II i III (Slika 1).

Regija HLA razreda I nalazi se blizu telomernog kraja, regija HLA razreda II smještena je blizu centromere kromosoma broja 6 te između regije I i II smještena je regija HLA razreda III, nazvana još i centralna regija. Unutar regije HLA razreda III nalazi se više od 50 gena od kojih ni jedan ne pripada genima HLA već neki od njih sudjeluju u imunološkim reakcijama (npr. *Tumor Necrosis Factor*, TNF, komponente komplementa C2 i C4) (1).

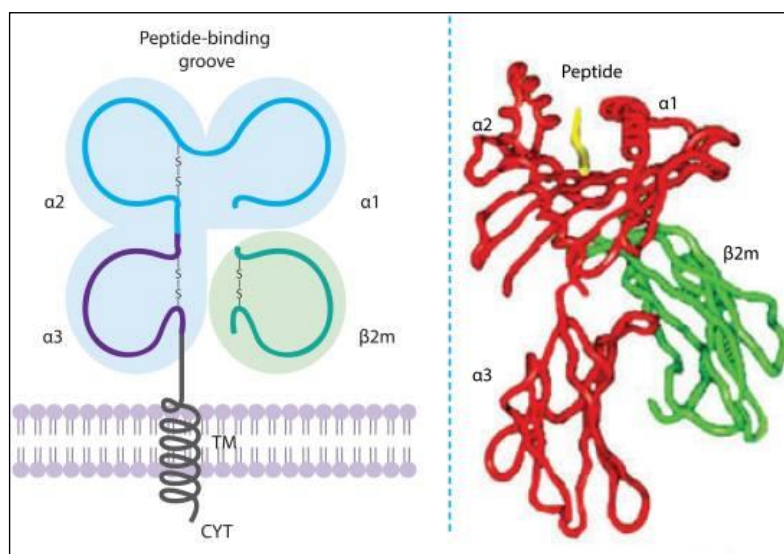


**Slika 1.** Smještaj regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6 (preuzeto iz ref. 2)

### 1.1.3. Geni i molekule HLA razreda I

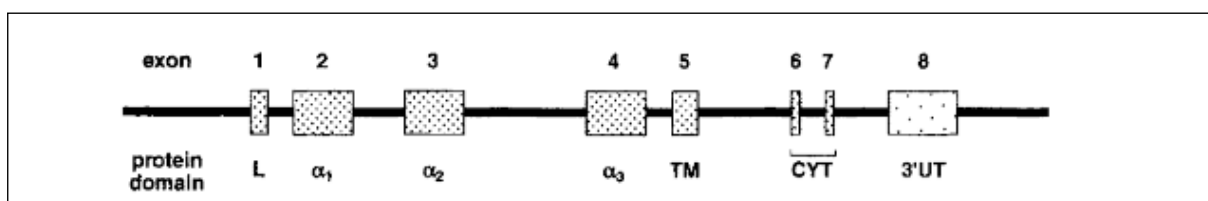
Regije HLA razreda I ima 18 gena koji su podijeljeni u tri skupine: klasični, neklasični i pseudogeni. Skupini klasičnih gena pripadaju geni HLA-A, -B i -C koji su u populaciji predstavljeni s velikim brojem alela. Za neklasične gene poznato je da imaju puno manji polimorfizam od gena klasične skupine i u njih se ubrajaju geni HLA-E, -F i -G. Skupina pseudogena obuhvaća 12 gena čija funkcija još uvijek nije u potpunosti poznata (1). Geni HLA razreda I kodiraju molekule HLA razreda I koje su eksprimirane na površini svih stanica s jezgrom i njihova glavna funkcija je prezentacija peptidnih ulomka stranih antigena na površini stanice koje prepoznaju CD8<sup>+</sup> limfociti T (1).

Molekule HLA razreda I sastoje se od dva polipeptidna lanca. Teški lanac ( $\alpha$  lanac) ima molekularnu masu 45 kD i sastoji se od tri domene ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$ ), dok laki lanac ( $\beta 2$  mikroglobulin) ima molekularnu masu 12kD, nekovalentno je vezan za lanac  $\alpha$  i jednake je građe kod svih molekula HLA razreda I (Slika 2). Lanac  $\alpha$  kodiran je genima koji se nalaze u sklopu sustava HLA, dok lanac  $\beta 2$  mikroglobulin kodiraju geni koji se nalaze na kromosomu 15. Čitava molekula HLA razreda I sastoji se od izvanstaničnog, hidrofobnog transmembranskog i hidrofilnog citoplazmatskog dijela. Domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  stvaraju pukotinu koja je građena od oko 180 aminokiselina, a može prezentirati peptidni ulomak građen od 10 aminokiselina. Domena  $\alpha 3$  evolucijski je konzervirana regija i sadrži vezno mjesto za T stanični receptor CD8<sup>+</sup> limfocita T (1).



**Slika 2.** Shematski prikaz građe molekule HLA razreda I (preuzeto iz ref. 3)

Geni HLA razreda I sastoje se od 8 kodirajućih sekvenci (egzoni) između kojih se nalaze nekodirajuće sekvence (introni). Egzon 1 kodira vodeću sekvencu molekule, egzoni 2, 3 i 4 kodiraju tri izvanstanične domene ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ), egzoni 5 i 6 hidrofobni transmembranski dio  $\alpha$  lanca te egzon 8 koji kodira netranslatirajući citoplazmatski dio molekule (Slika 3). Najveći broj razlika među pojedinim alelima HLA razreda I prisutan je u egzonima 2 i 3 zbog toga što oni kodiraju vezno mjesto peptida te se na taj način osigurava prezentacija velikog broja različitih stranih antigena stanicama imunološkog sustava (4).



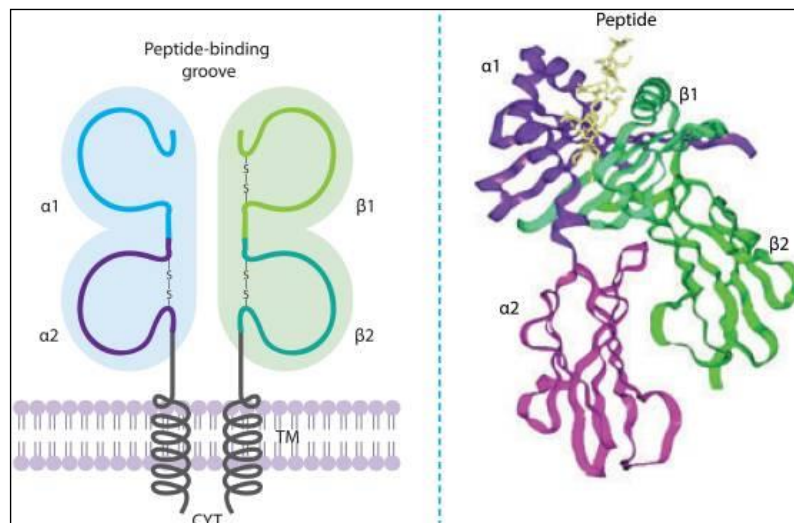
**Slika 3.** Prikaz organizacije egzona gena HLA razreda I (preuzeto iz ref. 4)



#### 1.1.4. Geni i molekule HLA razreda II

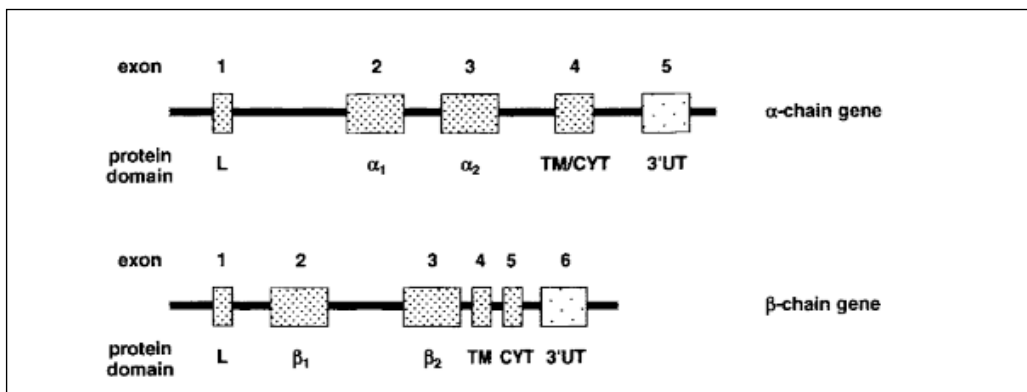
Geni regije HLA razreda II podijeljeni su na klasične (HLA-DR, -DQ, -DP) i neklasične gene (HLA-DM, -DO, -DN) koji formiraju podregije. Svaka podregija ima najmanje 2 gena, gen A i B koji kodiraju lanac  $\alpha$  odnosno lanac  $\beta$ , od koji su građene molekule HLA razreda II. Iznimka su neklasične podregije HLA-DN i -DO koje imaju samo jedan gen. Geni HLA razreda II kodiraju molekule HLA razreda II, eksprimirane na površini antigen prezentirajućih stanica kao što su limfociti B, makrofazi i dendritičke stanice, a njihova glavna uloga jest prezentacija antigena  $CD4^+$  limfocitima T (1).

Molekule HLA razreda II građene su od dva nekovalentno povezana polipeptidna lanca  $\alpha$  i  $\beta$ , molekularne mase oko 30 kD. Svaki se lanac sastoji od dvije domene,  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  koje tvore lanac  $\alpha$  i domene  $\beta 1$  i  $\beta 2$  koje tvore lanac  $\beta$  (Slika 4). Prerađeni antigen veže se u pukotinu koju tvore domene  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  čiji su krajevi otvoreni za razliku od krajeva molekule HLA razreda I zbog čega antigen prezentiran ovim razredom može imati i više od 30 aminokiselina. Domena  $\beta 2$  važna je zbog toga što sadrži vezno mjesto za stanični receptor  $CD4^+$  limfocita T. Molekule HLA razreda II sastoje se od izvanstanične, transmembranske i citoplazmatske regije (1).



**Slika 4.** Shematski prikaz građe molekule HLA razred II (preuzeto iz ref. 3)

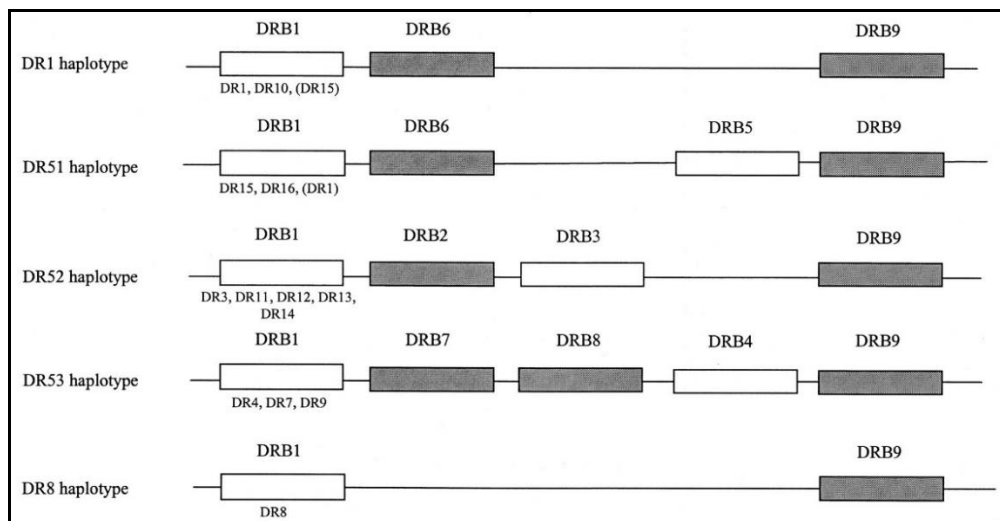
Organizacija egzona i introna gena HLA razreda II razlikuje se od organizacije gena HLA razreda I. Gen koji kodira lanac  $\alpha$  sastoji se od 5, a gen koji kodira lanac  $\beta$  od 6 egzona. Egzon 1 oba gena kodira vodeći peptid dok egzoni 2 i 3 kodiraju izvanstanični dio molekule. Egzon 4 gena koji kodira  $\beta$  lanac kodira transmembransku, a egzon 5 citoplazmatsku domenu. Kod gena koji kodira lanac  $\alpha$  egzon 4 kodira i citoplazmatsku i transmembransku domenu (Slika 5). Najveći broj razlika između gena HLA razreda II nalazi se u egzonu 2 koji kodira vezno mjesto peptidnih ulomaka (4).



**Slika 5.** Prikaz organizacije egzona gena HLA razreda II (preuzeto iz ref. 4)

### 1.1.5. Podregije sustava HLA razreda II

Podregija HLA-DR ima samo jedan gen A (HLA-DRA1) dok je broj gena B različit. Geni HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5 su funkcionalni geni, dok su geni HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 i -DRB9 pseudogeni. Gen HLA-DRB1 eksprimiran je u svakom pojedincu i najpolimorfniji je gen HLA razreda II predstavljen s preko 2500 alela (preuzeto s <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). Obzirom na raspored gena unutar regije HLA-DR moguća su pet različita haplotipa: HLA-DR1, -DR51, -DR52, -DR53 i -DR8 (Slika 6). Gen HLA-DRA1, -DRB1 kao i -DRB9 eksprimirani su u svim haplotipovima dok broj ostalih eksprimiranih gena HLA-DRB ovisi o alelu prisutnom na genu HLA-DRB1 (5).



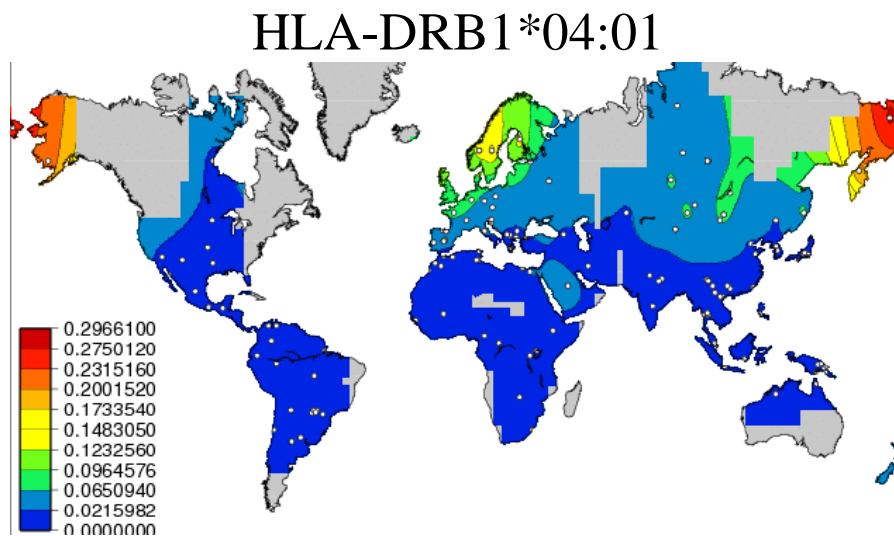
**Slika 6.** Prikaz haplotipova podregije HLA-DRB (preuzeto iz ref. 5)

Subregija HLA-DQ sastoji se od 2 gena, HLA-DQA1 i -DQB1, koji su predstavljeni u populaciji s više od 1300 alela odnosno 8 serotipova (HLA-DQ2, -DQ3, -DQ4, -DQ5, -DQ6, -DQ7, -DQ8, -DQ9) (preuzeto s <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>).

Subregija HLA-DP ima 4 gena (HLA-DPA1, -DPA2, -DPB1, -DPB2) i do danas je poznato više od 1100 alela ovih gena (preuzeto s <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). Subregija DM sastoji se od 2 gena (HLA-DMA1 i -DMB1), dok se regije HLA-DN i HLA-DO sastoje samo od jednog gena (5).

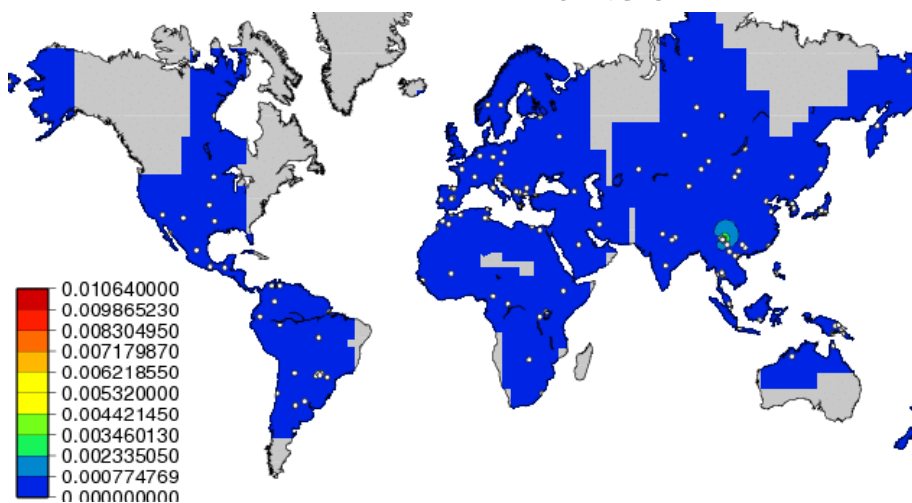
### 1.1.6. Gen HLA-DRB1\*04

Poznato je da je gen HLA-DRB1 najpolimorfniji gen HLA razreda II, a gen HLA-DRB1\*04 predstavljen je u populaciji s velikim brojem različitih alela (> 150) (preuzeto s <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). Neki aleli gena HLA-DRB1\*04 zastupljeni su s visokom frekvencijom u brojnim populacijama u svijetu kao što su npr. aleli HLA-DRB1\*04:01, DRB1\*04:02, DRB1\*04:03 (Slika 7) dok su neki karakteristični za populacije određene regije kao što je alel HLA-DRB1\*04:38 koji je uglavnom zastupljen u populacijama jugozapadne Azije (Slika 8) (preuzeto s <http://pypop.org/popdata/2008/byfreq-DRB1.php.html>). Dosadašnja istraživanja ukazuju na povezanost nekih alela ovog gena s autoimunim bolestima kao što su reumatoidni artritis (HLA-DRB1\*04:01), mutipla skleroza (HLA-DRB1\*04:02), sistemski lupus eritematosus (HLA-DRB1\*04:03). Isto tako gen HLA-DRB1\*04 povezan je s celijakijom, jer s genima subregije HLA-DQ stvara heterodimer HLA-DQ8 koji predstavlja povećan rizik za razvoj bolesti (6).



**Slika 7.** Raspodjela alela HLA-DRB1\*04:01 u svijetu (preuzeto s <http://pypop.org/popdata/2008/byfreq-DRB1.php.html>)

## HLA-DRB1\*04:38



**Slika 8.** Raspodjela alela HLA-DRB1\*04:38 u svijetu (preuzeto s <http://pypop.org/popdata/2008/byfreq-DRB1.php.html>)

### 1.1.7. Primjena određivanja gena sustava HLA

Najvažnija primjena određivanja gena HLA, odnosno tipizacije gena HLA, jest u svrhu presađivanja organa i tkiva. Naime, brojna istraživanja pokazala su da uspješnost presađivanja tkiva i organa uvelike ovisi o podudarnosti HLA između primatelja i davatelja (7). S obzirom na izrazit polimorfizam gena HLA, u mnogim slučajevima je složeno naći davatelja koji će bit podudaran s primateljem u određenom broju gena HLA s ciljem smanjivanja mogućnosti pojave transplantacijske reakcije. Poznato je da je transplantacijska reakcija imunološka reakcija na antigene HLA tansplantata koje primatelj nema i uzrokuje odbacivanje presatka (1).

Osim u transplantacijske svrhe tipizacija gena HLA provodi se i u svrhu dijagnostike određenih bolesti koje su povezane s genima sustava HLA. Veliki broj istraživanja pokazao je da se određene autoimune bolesti češće pojavljuju kod osoba koje imaju određene alele HLA (8). Međutim, prisustvo određenog alela HLA koji je povezan s određenom bolesti ne znači da će doći do razvoja bolesti jer brojni drugi genetski faktori, kao i faktori okoliša utječu na njezinu pojavu.

Geni HLA su zbog velikog polimorfizma, kao i u razlikama u njihovim učestalostima među pojedinim populacijama, našli veliku primjenu u populacijskim istraživanjima. Poznato je da su pojedini aleli HLA karakteristični za populacije određene regije (npr. alel HLA-DRB\*04:01 ima najveću zastupljenost u sjevernoj Europi i istočnoj Aziji) (preuzeto s <http://pypop.org/popdata/2008/byfreq-DRB1.php.html>). S obzirom da su geni HLA toliko polimorfni, vrlo je mala vjerojatnost da će dvije nesrodne osobe biti podudarne u genima HLA, stoga je njihova primjena važna i u sudskoj medicini; kod identifikacije odnosno u dokazivanju očinstva.

### **1.1.8. Mehanizmi povezanosti gena HLA i bolesti**

Potvrđeno je da postoji velik broj bolesti koji se češće javlja kod pojedinaca koji imaju određene alele HLA. Najveći broj bolesti povezan s genima HLA su autoimune bolesti i one su najčešće povezane s genima HLA razreda II (9). Tablica 1 prikazuje neke od autoimunih bolesti povezanih s određenim alelima sustava HLA.

Iako je dokazana povezanost gena HLA i autoimunih bolesti smatra se da samo genetski faktor tj. rizičan alel nije dovoljan da bi došlo do njezinog razvoja. Dakle osoba koja u svom genotipu ima rizičan alel HLA ili haplotip HLA (npr. HLA-DQ2 koji je povezan s celijakijom) neće nužno oboliti od nje. Naime, dokazano je da postoji određen broj ljudi koji nosi određen gen HLA ili haplotip HLA, a nikada ne razviju simptome bolesti niti samu bolest (9).

**Tablica 1.** Autoimune bolesi povezane sa sustavom HLA (preuzeo iz ref. 8)

| <b>Autoimuna bolest</b>       | <b>Alel/gen/haplotip HLA povezan s bolesti</b>   |
|-------------------------------|--|
| Celijakija                    | HLA-DQ2<br>HLA-DQ8   |
| Mijasteija gravis             | HLA-DRB1*03:01   |
| Multipla skleroza             | HLA-DRB1*15:01, DQB1*06:02   |
| Narkolepsija                  | HLA-DQB1*06:02   |
| Reumatoidni artritis          | HLA-DRB1*01:01<br>HLA-DRB1*01:02<br>HLA-DRB1*04:01<br>HLA-DRB1*04:04<br>HLA-DRB1*04:05<br>HLA-DRB1*04:08<br>HLA-DRB1*10:01<br>HLA-DRB1*14:02 |
| Sistemski lupus eritromatozus | HLA-DRB1*03:01<br>HLA-DR8<br>HLA-DR15  |
| Šećerna bolest tipa 1         | HLA-DRB1*03:01<br>HLA-DRB1*04:01<br>HLA-DRB1*04:02<br>HLA-DRB1*04:05   |

## 1.2. CELIJAKIJA

Celijakija (engl. *Celiac disease*, CD) ili glutenska enteropatija (engl. *Gluten enteropathy*, GT) je kronična upalna bolest tankog crijeva. Bolest je prvi puta opisao pedijatar Samuel Gee koji je smatrao da prehrana bogata škrobom i mlijeko uzrokuju simptome. Četrdesetih godina dvadesetog stoljeća, nizozemski pedijatar Willem Dicke u svom radu ističe kako manjak raži, zobi i pšenice u prehrani pridonosi poboljšanju simptoma bolesti, te je zaključio da je komponenta koja utječe na pojavu simptoma protein gluten. Velika prekretnica u istraživanju ove bolesti bila je primjena biopsije crijeva koja je ukazala na povezanost celijakije i lezija prisutnih na sluznici tankog crijeva pacijenata. Nekoliko godina kasnije kod oboljelih su otkrivena protutijela na derivate peptida glutena koji su dokazali da imunološki sustav sudjeluje u patogenezi bolesti. Ferguson i MacDonald 1970. godine prvi su objasnili ulogu adaptivnog imunološkog sustava u celijakiji. Zaključili su da imunološka reakcija posredovana limfocitima T uzrokuje ranije otkrivene patološke promjene na sluznici tankog crijeva već utvrđene kao jedan od simptoma celijakije (10). U 80-im godinama prošlog stoljeća istraživanja su pokazala da postoji moguća povezanosti celijakije s drugim autoimunim bolestima kao što je šećerna bolest tipa 1 i reumatoidni artritis (11). Nekoliko godina kasnije otkrivena je uloga enzima tkivne transglutaminaze i povezanost celijakije s heterodimerima HLA-DQ2 i -DQ8.

Osim celijakije postoje još dvije bolesti koje su povezane s glutenom, alergija na pšenicu i necelijakična preosjetljivost na gluten (12). No treba razlikovati celijakiju od necelijakične preosjetljivost kod koje ne postoje histološke promijene na sluznici crijeva niti povišene razine protutijela specifičnih za gluten. Dok je alergija na pšenicu imunološki odgovor (uglavnom protutijela IgE) organizma na bilo koji protein iz pšenice, a ne samo gluten kao što je to slučaj kod celijakije.

Celijakija je bolest koja nema tipične kliničke simptome već oni ovise o mnogo faktora (dob, prehrana, zdravlje, itd.). Klasični simptomi koji se uglavnom pojavljuju kod svih bolesnika su: bolovi u trbuhu, povraćanje te gubitak težine koji su rezultat smanjene apsorpcije nutrijenata u tankom crijevu. Pacijenti mogu imati i neklasične simptome zbog čega je otkrivanje celijakije u kasnijoj životnoj dobi sve češća pojava (13). Najefikasniji oblik terapije u liječenju celijakije jest dijeta bez glutena, a brojni lijekovi još uvijek su u fazi kliničkog ispitivanja zbog čega je njihova sigurnost i efikasnost upitna.



Metode koje se koriste u postavljanju dijagnoze celijakije su serološki i histološki testovi te genetske analize. Serološki testovi temelje se na detekciji protutijela na enzim tTG2 (engl. *Enzyme Transglutaminase 2*, tTG2), a histološke analize temelje se na analizi biopsije sluznice tankog crijeva. Promijene koje su vidljive na sluznici crijeva su atrofija crijevnih resica, hiperplazija kripta i smanjena duljina enterocita. Obzirom da je utvrđena povezanost heterodimera HLA-DQ2 i HLA-DQ8 s celijakijom, određivanje gena HLA jedan je od bitnih testova u postavljanju dijagnoze (13).

### 1.2.1. Patogeneza celijakije

Celijakija je bolest koja se javlja zbog netolerancije pacijenata na gluten, koji je glavni skladišni kompleks proteina u pšenici, ječmu i raži, a se sastoji od glutenina i prolamina (glijadin, hordein, sekulin). Patogeneza celijakije otkrivena je na glijadinu, prolaminu karakterističnom za pšenicu, no hordein prisutan u ječmu i sekulin u raži imaju isti učinak kao glijadin. Glijadin je polipeptid koji se sastoji od 33 aminokiseline i otporan je na razgradnju enzima u želucu i tankom crijevu. On ulazi u interakciju sa stanicama crijevnog epitela, veže se na kemokinski receptor CXCR3 koji je kod oboljelih osoba eksprimiran u većem broju. Vežanjem glijadina na CXCR3 receptor povećava se izlučivanje proteina zonulina koji utječe na propusnost čvrstih spojeva između stanica crijevnog epitela. Zonulin povećava propusnost barijere za peptide glijadina i omogućava lakši prolaz glijadina u laminu propriju. Isto tako glijadin potiče izlučivanje interleukina 15 (IL-15) iz enterocita koji povećava proliferaciju intraepitelnih limfocita (eng. *Intraepithelial Lymphocytes*, IEL). Aktivirani intraepitelni limfociti eksprimiraju transmembranski receptor NKG-2D na koji se veže ligand MIC-A. Interakcija MIC-A i NKG-2D potiče aktivaciju intraepitelnih limfocita na izlučivnje enzima koji uništavaju enterocite (14).

Enzim tkivna transglutaminaza 2 je kalcij ovisan enzim koji katalizira reakcije deaminacije glijadina i ima važnu ulogu u patogenzi CD-a. Pripada jednom od najzastupljenijih enzima u organizmu koji je aktivan samo u izvanstaničnom prostoru (11). U lamini propriji enzim tTG2 deaminira glijadin pri čemu nastaje oblik koji je jači imunogen što uzrokuje jaču aktivaciju imunološkog sustava u čovjeka.

Obzirom da je glijadin građen u velikoj mjeri od aminokiselina prolina i glutamina, on predstavlja dobar supstrat za tTG2 pri čemu nastaje kompleks tTG2/glijadin. Kompleks je prezentiran staničnim receptorom stanicama Th2 koji potiču proliferaciju B stanica u plazma stanice i stvaranje protutijela na tTG2/glijadin (14).

### 1.2.2. Aktivacija imunološkog sustava u celijakiji

Osnovna funkcija imunološkog sustava je obrana organizma od stranih antigena. U području lamine proprije nalaze se antigen prezentirajuće stanice koje prezentiraju antigene i na taj način aktiviraju imunološki sustav. Toleranciju na antigen kao što je gluten kod zdravih osoba održava transformirajući faktor rasta  $\beta$  (engl. *Transforming growth factor beta 1*, TGF- $\beta$ ) koji suprimira aktivnost T stanica dok su kod oboljelih osoba otkrivene povišene razine IL-15 koji inhibira djelovanje TGF- $\beta$  (9).

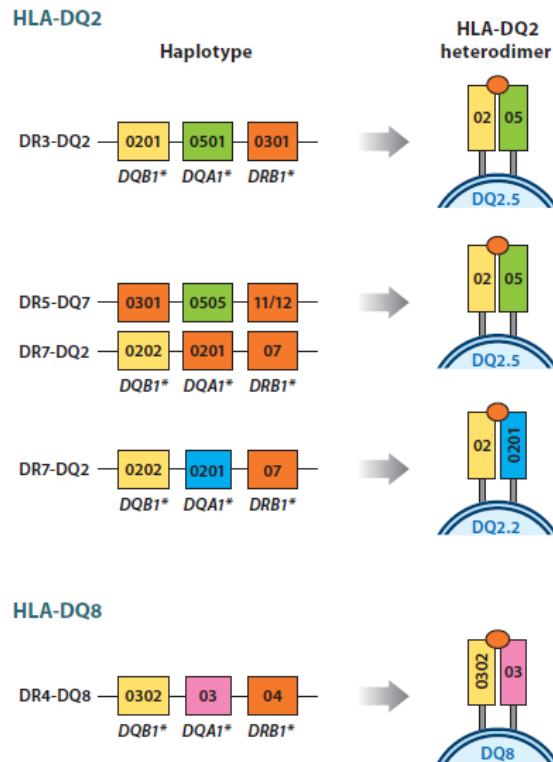
Gluten prezentiran na površini stanice prepoznaju  $CD4^+$  limfociti T koji proizvode visoke razine proupalnih citokina i matriks metaloproteinaze koje su odgovorne za degradaciju bazalne membrane što omogućava lakši prolaz glutena kroz crijevni epitel. Interferon  $\gamma$  (engl. *Interferon gamma*, IFN- $\gamma$ ), kojeg izlučuju aktivirani limfociti T, potiče diferencijaciju Th1 stanica i izlučivanje citokina koji primarno potiču aktivaciju stanične imunosti odnosno  $CD8^+$  limfocite T. Citotoksični  $CD8^+$  limfociti izlučuju enzime granzime i kaspaze koji potiču nekrozu stanica i aktivaciju apoptotičkih signala u stanicama crijevnog epitela. S druge strane limfociti T mogu potaknuti klonalnu aktivaciju limfocita B koji proliferiraju u plazma stanice i stvaraju protutijela na deaminirani glijadin (9).

Uz  $CD4^+$  limfocite, aktivaciji imunološkog sustava pridonose i intarepitelni limfociti koji se nalaze u mukozi tankog crijeva. Intraepitelni limfociti zdravih osoba na površini stanica eksprimiraju inhibitorne receptore CD94/NKG2A, dok su u celijakiji na površini stanica eksprimirani NK receptori NKG2D i CD94/NKG2C koji induciraju izlučivanje citokina (npr. IFN- $\gamma$ ) i potiču proliferaciju stanica imunološkog sustava. Upala uzrokovana pojačanom aktivnošću imunološkog sustava i peptidima glutena može potaknuti ekspresiju molekula stresa MIC-A i MIC-B (engl. *MHC class I polypeptide-related sequence*, MIC) koji su glavni ligandi za receptore NKG2D. Molekule MIC-A i MIC-B prepoznaju NKG2D receptore i potiču citotoksičnu aktivnost limfocita T koji uništavaju epitelne stanice sluznice crijeva (9).

### 1.2.3. Povezanost celijakije s genima HLA

Visoka učestalost pojave celijakije u obitelji navela je znanstvenike da istraže postoji li povezanost gena s pojavom bolesti. Nakon što je utvrđeno da su celijakija i geni HLA povezani, u početku se smatralo da antigen HLA-B8 predstavlja genetsku predispoziciju za razvoj celijakije (15). Kasnije je otkriveno da antigen HLA-B8 često dolazi u kombinaciji s antigenima HLA-DR3 i -DQ2 što je dovelo do zaključka da haplotip HLA-B8~DR3~DQ2 predstavlja rizični genetski faktor za razvoj bolesti (16). Daljnjim istraživanjima otkriveno je da molekule HLA-DQ imaju visok afinitet vezanja negativno nabijenog deaminiranog glijadina te je tako dokazano da one imaju glavnu ulogu u patogenezi celijakije (17).

Molekula HLA-DQ2 kodirana je alelnom grupom HLA-DQB1\*02 (dva najčešća alela su DQB1\*02:01 i HLA-DQB1\*02:02) i zajedno s alelima HLA-DQA1\*05:01 i -DQA1\*05:05 tvori izoforme HLA-DQ2.2 i -DQ2.5 karakteristične za celijakiju. Izoformu HLA-DQ2.5 čine aleli HLA-DQA1\*05 i -DQB1\*02 koji se mogu nalaziti na istom kromosomu tada izoforma ima cis (HLA-DQ2.5<sub>cis</sub>) ili na homolognim kromosomima kada ima trans konformaciju (HLA-DQ2.5<sub>trans</sub>). Izoformu HLA-DQ2.2 čine aleli HLA-DQA1\*02:01 i -DQB1\*02:02. Haplotip HLA-DQ2.5<sub>cis</sub> je usko vezan s alelom HLA-DRB1\*03:01, dok je kombinacija HLA-DQ2.5<sub>trans</sub> vezana uz haplotipove HLA-DRB1\*11/DRB1\*12 i -DRB1\*07 (18). Većina HLA-DQ2 negativnih bolesnika nose heterodimer HLA-DQ8 kodiran alelima HLA-DQA1\*03:01 i -DQB1\*03:02/\*03:05 koji su povezani s haplotipovima gena HLA-DRB1\*04 (Slika 9).



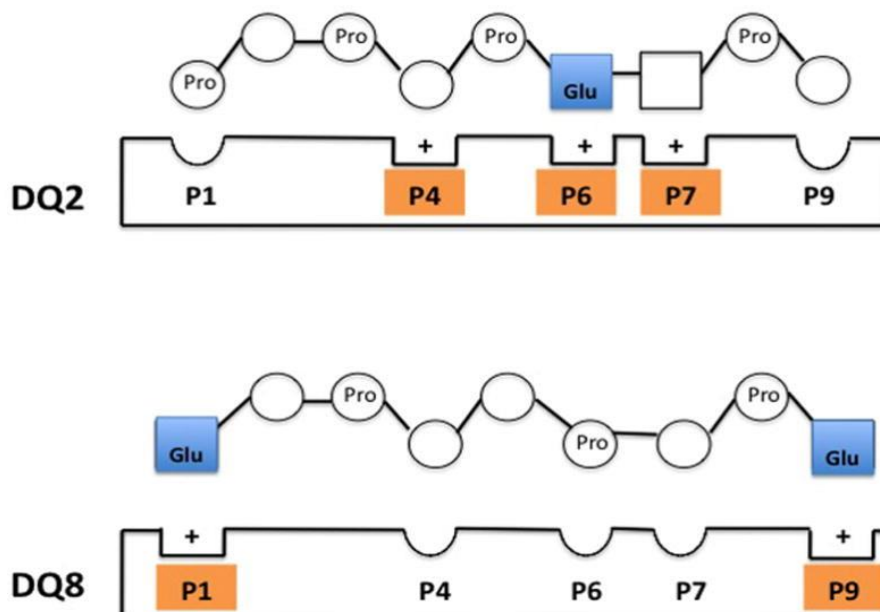
**Slika 9.** Prikaz haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 povezanih s celijakijom (preuzeto iz ref. 19)

Danas je poznato da više od 90% populacije europskog porijekla kojima je potvrđena celijakija imaju heterodimer HLA-DQ2 (DQA1\*05~DQB\*02) i/ili HLA-DQ8 (DQA1\*03~DQB1\*0302) (2). Naime, brojni radovi su pokazali da 30-40% populacije europskog porijekla nosi navedene heterodimere, no uopće ne razviju simptome bolesti (2). U slučaju da se u genotipu ne pojavljuje niti jedan od heterodimera, isključuje se mogućnost da osoba boluje od celijakije.

S toga osobe koje imaju haplotipove HLA-DQ2.5-cis (HLA-DRB1\*03~DQA1\*05:01~DQB1\*02:01), HLA-DQ2,5-trans (HLA-DRB1\*11/\*12~DQA1\*05:05~DQB1\*03:01), (HLA-DRB1\*07~DQA1\*02:01~DQB1\*02:02) te haplotip HLA-DQ8 (HLA-DRB1\*04~DQA1\*03:01~DQB1\*03:02) imaju samo genetsku predispoziciju za razvoj celijakije (17).

#### 1.2.4. Toksičnost i imunogenost glutena

Glijadin, glavni spremišni prolamin u pšenici, sastoji se od podjedinica  $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\omega$ . Reaktivni T limfociti prepoznaju sve imunogenične epitope, ali s jačim afinitetom za ona mjesta koja su deaminirana enzimom tTG2. Procesom deaminacije glijadina kojeg provodi enzim tTG2 nastaju peptidi uglavnom građeni od negativno nabijenih aminokiselina koji se vežu većim afinitetom na molekule HLA-DQ2 i -DQ8. Molekula HLA-DQ2 ima tri vezna mjesta peptida (P4, P6 i P7) dok molekula HLA-DQ8 ima dva (P1, P9) (Slika 10). Vezna mjesta na molekulama HLA-DQ2 i -DQ8 uglavnom su građena od glutamina i prolina koji pridonose zaštiti glijadinskih peptida od djelovanja proteolitičkih enzima. Do sada je otkriveno više od 30 epitopa derivata peptida od kojih se većina veže na molekulu HLA-DQ2 dok -DQ8 prepoznaje četiri epitopa. Najveći broj peptida koji nastaje procesom deaminacije na svom početnom djelu ima aminokiselinu prolin koja se veže u mjesto P1 molekule HLA-DQ2. Molekula HLA-DQ8 na veznom mjestu P1 prepoznaje glutamin koji je prisutan u manjem broju peptidnih derivata na početnom dijelu zbog čega molekula HLA-DQ2 može prezentirati veći broj različitih peptida glijadina. Upravo je peptid 33-mer jedan od najbrojnijih peptida koji nastaje procesom deaminacije iz  $\alpha$ -glijadina i ima prolin koji odgovara položaju P1 molekule HLA-DQ2 (14).



**Slika 10.** Prikaz peptidnih veznih mjesta na HLA-DQ2 i -DQ8 (preuzeto iz ref. 14)

### 1.2.5. Povezanost celijakije i drugih bolesti

Povezanost celijakije s drugim autoimunim bolestima uglavnom se temelji na povezanosti s genima HLA, odnosno prisustvu haplotipa HLA-DQ2 i/ili -DQ8. Neke bolesti koje su povezane s celijakijom su: šećerna bolesti tipa 1, reumatoidni artritis, autoimuni hepatitis, Chronova bolest, dermatitis herpetiformis, sistemski lupus eritematosus itd (20).

#### a) Celijakije i šećerna bolesti tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 (engl. *Type 1 Diabetes*, T1D) je autoimuna bolest koju karakteriziraju snižene razine inzulina ili njegov izostanak što je posljedica napada T limfocita na  $\beta$  stanice gušterače koje ga proizvode. Povezanost T1D i celijakije jest u genima sustava HLA. Potvrđeno je da određeni geni lokusa HLA-DQ predstavljaju veći rizik za razvoj T1D, odnosno da čak 90% oboljelih od T1D u odnosu na 40% ukupne populacije nosi DQ2 ili DQ8 heterodimere. Isto tako utvrđeno je da 30-50% pacijenata s T1D nosi haplotipove HLA-DR3 ili -DR4. Dakle najveći rizik za razvoj T1D imaju osobe koje nose haplotip HLA-DR3~DQ2 ili HLA-DR4~DQ8. Kako isti haplotipovi predstavljaju rizik za pojavu celijakije ove dvije autoimune bolesti nerijetko se pojavljuju zajedno kod osoba s navedenim haplotipom (3).

#### b) Celijakija i reumatoidni artritis

Reumatidni artritis (engl. *Rheumatoid arthritis*, RA) je kronična upalna autoimuna bolest vezivnog tkiva koja primarno zahvaća zglobove. Jedna je od prvih bolesti koja je povezana s genima HLA sustava. Genetsku predispoziciju za ovu bolest imaju osobe koje u svom genotipu sadrže gene HLA-DR4 i -DR1 odnosno alele HLA-DRB1\*01:01, \*01:02, \*04:01, \*04:01, \*04:02, \*04:04, \*04:08. Navedeni aleli imaju zajedničke sekvence koje mogu vezati reumatoidni faktor, prezentirati ih CD4<sup>+</sup> limfocitima T i potaknuti proliferaciju B stanica. Zbog uske povezanosti lokusa HLA-DR i -DQ, provedena su istraživanja u kojima je otkriveno da i molekule HLA-DQ sudjeluju u prezentaciji reumatoidnog faktora. Obzirom da je gen HLA-DR4 u jakoj neravnoteži udruživanja s genom HLA-DQ8, oni tvore haplotip HLA koji je karakterističan za celijakiju. Stoga osobe s haplotipom HLA-DR4~DQ8 imaju genetsku predispoziciju za razvoj CD, kao i RA (20).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

**Ciljevi ovog istraživanja bili su:**

1. Utvrditi učestalost pojavljivanja alela gena HLA-DRB1\*04 među osobama s povećanim rizikom za razvoj celijakije.
2. Istražiti raspodjelu heterodimera HLA-DQ2 i -DQ8 među osobama s povećanim rizikom za razvoj celijakije.
3. Analizirati haplotipove HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 među ispitanicima uključenim u ovo istraživanje.
4. Rezultate raspodjele pojedinih alela HLA-DRB1\*04 i haplotipova HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 među ispitanicima s povećanim rizikom za razvoj CD usporediti s kontrolnim zdravim ispitanicima.
5. Dobivene rezultate usporediti s objavljenim rezultatima za druge populacije u Europi i svijetu.



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

### **3.1. MATERIJALI**

Istraživanje je provedeno na 2009 bolesnika s genetskom predispozicijom za razvoj celijakije i dvije kontrolne skupine od kojih jedna ima 366, dok druga ima 205 ispitanika. Ispitanici obje kontrolne skupine testirani su za gene HLA u svrhu transplantacije tkiva i organa te ne boluju od celijakije. Svim ispitanicima određeni su geni i aleli HLA-DRB1, -DQA1 i -DQB1, kao i haplotipovi HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1.

### **3.2. METODE**

#### **3.2.1. Izolacija DNA**

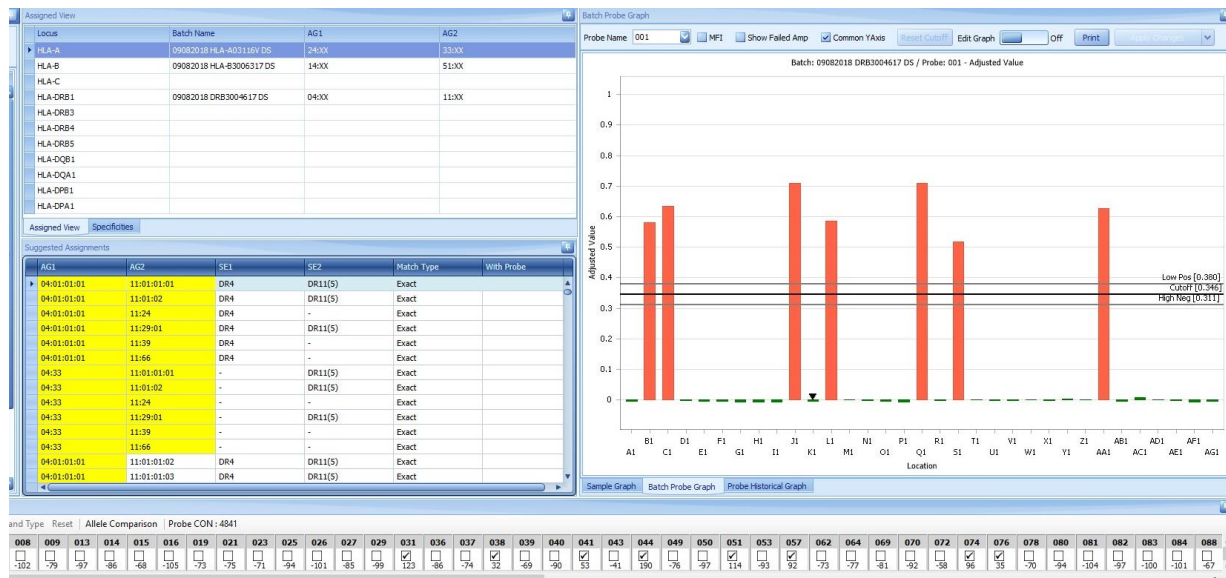
Iz uzorka periferne krvi (2 ml) svih ispitanika izolirana je DNA pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA (Nucleospin, Macherey Nagel, Duren, Njemačka). Komercijalni set sastoji se od reagensa B2, proteinaze K koja vrši lizu stanica i nekoliko pufera (B3, B5, BW, BE) koji služe za ispiranje i otapanje DNA. Metoda se temelji na specifičnom vezanju molekule DNA za silikatnu membranu koja se nalazi unutar Nucleospin tubice (28).

#### **3.2.2. Tipizacija gena HLA-DRB1, -DQA1 i -DQB1**

Za određivanje gena HLA-DRB1, -DQA1 i -DQB1 korištena je metoda lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidnih proba specifičnih sekvenci (*engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide*, PCR-SSO). Metoda se temelji na umnažanju egzona 2 istraživanih gena HLA razreda II te hibridizaciji mikrosfera na čijoj se površini nalaze oligonukleotidne probe specifične za sekvencu jednog ili više alela HLA.

Nakon izolacije DNA, metodom PCR bilo je potrebno umnožiti određenu sekvencu molekule DNA dodatkom početnice specifične za određeni gen, proces umnažanja sastoji se od tri koraka: denaturacija DNA, vezanje specifičnih početnica i sinteza novog lanca odnosno sekvence. Nakon toga slijedi hibridizacija PCR produkta, odnosno vezanje mikrosfera specifičnih za određeni gen na umnoženi produkt označen biotinom. Na kraju procesa hibridizacije u reakcijsku smjesu dodaju se pufer i streptavidin koji je konjugiran bojom fikoeritrin. Kompleks streptavidin-fikoeritrin veže se za biotin, samo na one dijelove DNA na kojima su vezane specifične probe određenih mikrosfera. Fluorescenciju, koja nastaje

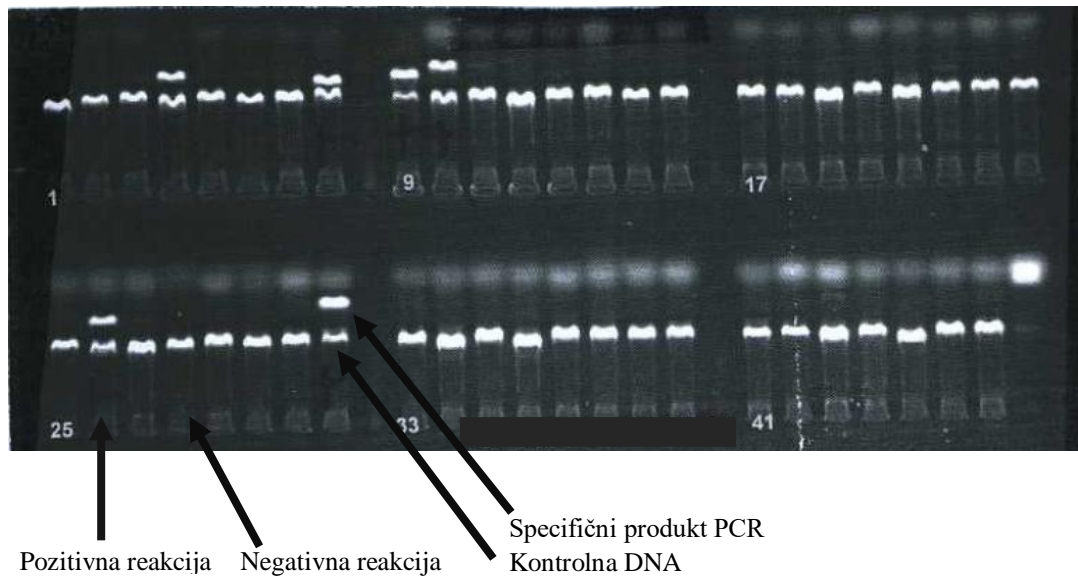
vezanjem strepavidina s fikoeritrinom na biotin, očitava Luminex aparat. Izostanak fluorescence interpretira se kao negativna reakcija što znači da se specifična proba nije vezala na umnožen produkt dok pozitivna reakcija znači da je došlo do vezanja odnosno da je određen alel prisutan kod pacijenta. Dobiveni rezultati analiziraju se na računalnom softveru „MATCH IT! DNA“ (Slika 11).



**Slika 11.** Prikaz analize rezultata gena HLA u programu „MATCH IT! DNA“. Mikrosfera 001 na uzorku K1 je negativna tj. nije došlo do hibridizacije, dok je na uzorku L1 pozitivna. U donjem lijevom kutu je rezultat tipizacije za osobu K1

Metoda lančane reakcije polimerazom i početnica specifičnih sekvenci (*engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer, PCR-SSP*) koristi se kod određivanja gena, ali i alela HLA. Naime, ovom metodom se mogu tipizirati polimorfizmi HLA visokom rezolucijom, odnosno na razini alela (4 znamenke, npr. DRB1\*04:01). Metoda se temelji na umnažanju određenih sekvenci DNA na koje se vežu specifične početnice koje umnažaju točno određeni gen ili alel. U ovom radu korišten je komercijalni set (Olerup SSP, Stockholm, Sweden) za određivanje alela HLA-DRB1\*04. Nakon umnažanja slijedi elektroforeza kako bi se analizirali dobiveni rezultati. Uzorci se nanose na 1,5% agarozni gel kojem se zbog vizualizacije dodaje boja GelRed (Slika 12). Nakon elektroforeze gel se slika pomoću kamere (UV G:BOX Syngene) i dobiveni podatci se analiziraju u računalnom programu „Helberg-StartSCORE“. Prije analize potrebno je označiti pozitivne reakcije koje

sadrže dvije vrpce, jednu kontrolnu i jednu koja označava specifični PCR produkt dok kod negativne reakcije izostaje vrpca sa specifičnim PCR produktom.



**Slika 12.** Prikaz rezultata tipizacije gena HLA-DRB1\*04 metodom PCR-SSP. U jažicama broj 4, 8, 9,10, 26 i 32 su pozitivne/specifične reakcije koje su pozitivne kada je osoba pozitivna za alel DRB1\*04:04

### 3.2.3. Statistička obrada

Učestalost alela i haplotipova HLA određena je direktnim brojanjem. U slučaju da je kod ispitanika određen samo jedan alel HLA, osoba je smatrana homozigotom što je podrazumijevalo dvostruku dozu istog alela, odnosno haplotipa HLA. Haplotipovi HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 određeni su na temelju poznatih neravnoteža udruživanja alela HLA na navedenim lokusima HLA. Za usporedbu učestalosti pojedinih alela gena HLA-DRB1\*04 i haplotipova HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 između ispitivane i kontrolne skupine korišten je računalni program „GraphPad Prism 7” (verzija 7,0) (preuzeto s <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

## **4. REZULTATI**

#### **4.1. RASPODJELA GENOTIPOVA HLA-DRB1/DRB1 MEĐU ISPITANICIMA S POVEĆANIM RIZIKOM ZA RAZVOJ CELIJAKIJE I KONTROLOM**

Analizom raspodjele genotipova HLA-DRB1 uočeno je da genotip HLA-DRB1\*03/X ima najveću zastupljenost kod osoba s povećanim rizikom za razvoj celijakije (16,82%), dok je u kontrolnim skupinama K1 i K2 bila najveća zastupljenost genotipa HLA-DRB1\*11/X (K1-18,85%, odnosno K2-18,05%). U tablici 2 prikazane su raspodjele genotipova HLA-DRB1/DRB1 u analiziranim skupinama.

Usporedba rizične skupine ispitanika s kontrolom K1 pokazala je statistički značajno povišenu učestalost za slijedeće genotipove: HLA-DRB1\*03/\*03 ( $P=0,0014$ ), HLA-DRB1\*03/\*07 ( $P=0,0446$ ), HLA-DRB1\*03/X ( $P=0,0065$ ), HLA-DRB1\*04/X ( $P=0,0231$ ), HLA-DRB1\*07/\*11 ( $P=0,0254$ ), HLA-DRB1\*11/X ( $P=0,0052$ ) i HLA-DRB1\*11/\*11 ( $P=0,0005$ ). Genotip HLA-DRB1\*07/\*07 nalazi se na granici statističke značajnosti pri čemu vrijednost  $P$  iznosi 0,0615. Niti jedan drugi genotip HLA-DRB1/DRB1 nije pokazao statistički značajnu razliku u usporedbi s kontrolnom skupinom K1.

S druge strane, genotipovi HLA-DRB1\*03/\*03 ( $P=0,0293$ ) i HLA-DRB1\*03/\*11 ( $P=0,0152$ ) bili su statistički značajno češći među osobama s povećanim rizikom za CD u odnosu na skupinu K2 dok se genotip HLA-DRB1\*11/X nalazio na granici statističke značajnosti ( $P=0,0537$ ). Također, obje kontrolne skupine imale su statistički značajno veći broj ispitanika koji su imali genotip HLA-DRB1\*X/DRB1\*X u usporedbi sa skupinom ispitanika s povećanim rizikom za CD. Oznaka „DRB1\*X“ znači da na lokusu HLA-DRB1 nije bio prisutan jedan od gena: DRB1\*03, DRB1\*04, DRB1\*07, DRB1\*11 i DRB1\*12.

**Tablica 2.** Raspodjela genotipova HLA-DRB1 među ispitanicima s povećanim rizikom za razvoj celijakije (N=2009) i kontrolnim skupinama (K1=366 i K2=205)

| GENOTIP<br>HLA-<br>DRB1*/DRB1* | CD (N=2009) |       | K1 (N=366) |       | K2 (N=205) |       | P1     | P2     |
|--------------------------------|-------------|-------|------------|-------|------------|-------|--------|--------|
|                                | N           | (%)   | N          | (%)   | N          | (%)   |        |        |
| 03/03                          | 77          | 3,83  | 3          | 0,82  | 2          | 0,98  | 0,0014 | 0,0293 |
| 03/04                          | 69          | 3,43  | 10         | 2,73  | 4          | 1,95  | 0,6339 | 0,3100 |
| 03/07                          | 90          | 4,48  | 8          | 2,19  | 7          | 3,41  | 0,0446 | 0,5921 |
| 03/11                          | 118         | 5,87  | 14         | 3,83  | 4          | 1,95  | 0,1360 | 0,0152 |
| 03/12                          | 6           | 0,45  | 1          | 0,27  | -          | -     | 1,0000 | 1,0000 |
| 03/X                           | 338         | 16,82 | 41         | 11,20 | 29         | 14,15 | 0,0065 | 0,3749 |
| 04/04                          | 16          | 0,80  | 5          | 1,36  | 2          | 0,98  | 0,3551 | 0,6800 |
| 04/07                          | 32          | 1,59  | 8          | 2,19  | 5          | 2,44  | 0,3812 | 0,3830 |
| 04/11                          | 48          | 2,39  | 8          | 2,19  | 3          | 1,46  | 1,0000 | 0,6221 |
| 04/12                          | 4           | 0,20  | 1          | 0,27  | -          | -     | 0,5672 | 1,0000 |
| 04/X                           | 171         | 8,51  | 45         | 12,29 | 21         | 10,24 | 0,0231 | 0,4333 |
| 07/07                          | 21          | 1,05  | -          | -     | 3          | 1,46  | 0,0615 | 0,4821 |
| 07/11                          | 96          | 4,78  | 8          | 2,19  | 6          | 2,93  | 0,0254 | 0,2934 |
| 07/12                          | 5           | 0,25  | -          | -     | -          | -     | 1,0000 | 1,0000 |
| 07/X                           | 154         | 7,67  | 31         | 8,47  | 19         | 9,27  | 0,5961 | 0,4121 |
| 11/11                          | 37          | 1,84  | 19         | 5,19  | 7          | 3,41  | 0,0005 | 0,1194 |
| 11/12                          | 14          | 0,70  | -          | -     | -          | -     | 0,1466 | 0,6326 |
| 11/X                           | 263         | 13,09 | 69         | 18,85 | 37         | 18,05 | 0,0052 | 0,0537 |
| 12/12                          | 1           | 0,05  | -          | -     | -          | -     | 1,0000 | 1,0000 |
| 12/X                           | 32          | 1,59  | 5          | 1,37  | 3          | 1,46  | 1,0000 | 1,0000 |
| X/X                            | 417         | 20,76 | 90         | 24,60 | 53         | 25,85 | 0,0417 | 0,0451 |

n - broj pozitivnih ispitanika; % - učestalost genotipa HLA-DRB1; CD – ispitanici s povećanim rizikom za razvoj celijakije; K1 - kontrolna skupina 1; K2 - kontrolna skupina 2; P1 - usporedba "skupine CD" s kontrolnom skupinom K1; P2 - usporedba "skupine CD" s kontrolnom skupinom K2; X - gen HLA-DRB1 koji nije DRB1\*03, DRB1\*04, DRB1\*07, DRB1\*11 i DRB1\*12.

#### 4.2. RASPODJELA HETERODIMERA HLA-DQ2 I HLA-DQ8 MEĐU ISPITANICIMA S POVEĆANIM RIZIKOM ZA RAZVOJ CELIJAKIJE I KONTROLOM

Sljedeća analiza obuhvatila je usporedbu raspodjele heterodimera HLA-DQ povezanih s genetskom predispozicijom za razvoj CD među osobama s povećanim rizikom za razvoj CD i zdravim ispitanicima. U tablici 3 prikazana je raspodjela heterodimera HLA-DQ, podložnih za razvoj CD, s obzirom jesu li ispitanici homozigoti ili heterozigoti za navedene heterodimere HLA-DQ. Analizom raspodjele uočeno je da je najveći broj ispitanika u "skupini CD" bio pozitivan za heterodimer HLA-DQ2 u cis položaju (27,48%) kao i u skupini K1 (17,48%) i K2 (19,51%). Usporedba rizične skupine ispitanika s K1 pokazala je statistički značajne razlike za povećane učestalosti heterodimera HLA-DQ2cis (P=0,0001) i HLA-DQ2trans (P=0,0141).

**Tablica 3.** Raspodjela heterodimera HLA-DQ2 i HLA-DQ8 među ispitanicima s genetskom predispozicijom za razvoj celijakije

| Heterodimer HLA | CD<br>(N=2009) |       | K1<br>(N=366) |       | K2<br>(N=205) |       | P1     | P2     |
|-----------------|----------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|--------|--------|
|                 | n              | (%)   | n             | (%)   | n             | (%)   |        |        |
| DQ2cis/DQ2cis   | 77             | 3,83  | 5             | 1,37  | 3             | 1,46  | 0,0182 | 0,1121 |
| DQ2cis/DQ8      | 67             | 3,33  | 10            | 2,73  | 4             | 1,95  | 0,6327 | 0,4031 |
| DQ8/DQ8         | 10             | 0,50  | 4             | 1,09  | 1             | 0,49  | 0,2524 | 1,0000 |
| DQ2cis          | 552            | 27,48 | 64            | 17,48 | 40            | 19,51 | 0,0001 | 0,0130 |
| DQ2trans        | 101            | 5,03  | 8             | 2,19  | 6             | 2,93  | 0,0141 | 0,2305 |
| DQ8             | 224            | 11,15 | 51            | 13,93 | 23            | 11,22 | 0,1311 | 1,0000 |

n - broj pozitivnih ispitanika; % - učestalost heterodimera HLA-DQ; CD – ispitanici s povećanim rizikom za razvoj celijakije; K1 - kontrolna skupina 1; K2 - kontrolna skupina 2; P1 - usporedba "skupine CD" s kontrolnom skupinom K1; P2 - usporedba "skupine CD" s kontrolnom skupinom K2



Usporedba skupine bolesnika s povećanim rizikom za razvoj celijakije i skupine K2 pokazala je da je samo heterodimer HLA-DQ2cis statistički značajno učestaliji kod ispitanika u odnosu na skupinu K2 ( $P=0,0130$ ).

Genotip HLA-DQ2cis/DQ2cis bio je statistički značajno češće prisutan kod rizične skupine nego kod kontrolnih ispitanika iz skupine K1 ( $P=0,0182$ ), dok u usporedbi s K2 nije nađena statistički značajna razlika.

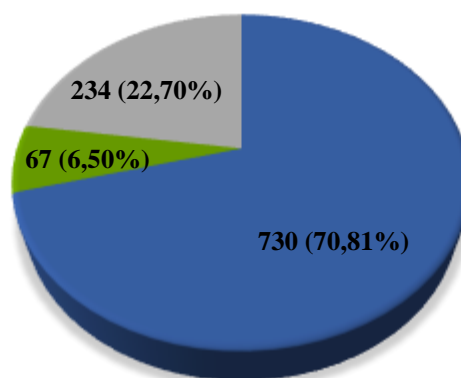
Kada smo analizirali samo ispitanike, iz sve tri skupine, pozitivne za jedan ili oba heterodimera HLA-DQ povezana s podložnošću za celijakiju uočili smo neke razlike u raspodjeli pojedinih heterodimera (Slika 13a, 13b i 13c). Statistički značajna razlika uočena je za povišeno prisustvo heterodimera HLA-DQ2 među osobama s povećanim rizikom za razvoj CD samo u odnosu na kontrolu K1 (70,81% naspram 54,23%;  $P=0,0001$ ). S druge strane, heterodimer HLA-DQ8 bio je statistički značajno manje prisutan unutar „CD skupine“ u usporedbi s kontrolom K1 (22,70% naspram 38,73%;  $P=0,0001$ ). Usporedba rizične skupine i kontrole K2 nije pokazala nikakve statistički značajne razlike.

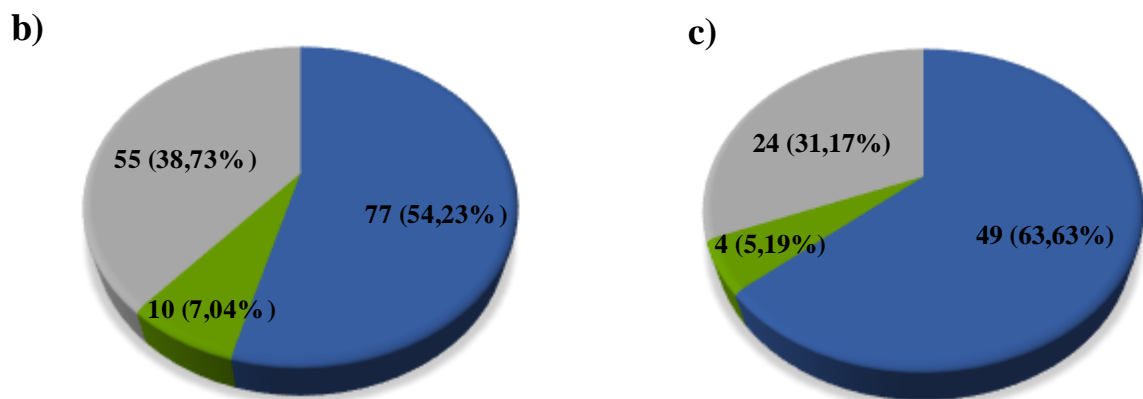
■ HLA-DQ2 pozitivni

■ HLA-DQ2/DQ8 pozitivni

■ HLA-DQ8 pozitivni

a)





**Slika 13.** Raspodjela heterodimera HLA-DQ2 i -DQ8 među osobama pozitivnim za jedan ili oba podložna heterodimera

- a) ispitanici s povećanim rizikom za razvoj celijakije (N=1031)
- b) ispitanici iz kontrole K1 (N=142)
- c) ispitanici iz kontrole K2 (N=77)

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

Raspodjele alela gena HLA-DRB1\*04 među ispitanicima s povećanim rizikom za razvoj CD i kontrole prikazana je u tablici 4. U ovoj analizi obje kontrolne skupine su zbrojene kako bi ukupan broj osoba pozitivnih za alele HLA-DRB1\*04 bio iznad 100. Naime, u istraživanjima polimorfizama gena HLA preporuka je da broj testiranih osoba bude minimalno 100 zbog velikog broja alela HLA. U rizičnoj skupini u kojoj je 256 osoba pozitivno za alel HLA-DRB1\*04 pronađeno je 9 različitih alela dok je u kontrolnoj skupini od 119 ispitanika otkriveno 8 različitih alela gena HLA-DRB1\*04.

**Tablica 4.** Raspodjela alela HLA-DRB1\*04 u skupini ispitanika s povećanim rizikom za razvoj celijakije (N=356) i kontroli (N=119)

| HLA-DRB1*04 | CD (N=356) |       | K (N=119) |       | P      |
|-------------|------------|-------|-----------|-------|--------|
|             | n          | (%)   | n         | (%)   |        |
| 04:01       | 102        | 28,65 | 40        | 33,61 | 0,3548 |
| 04:02       | 69         | 19,38 | 34        | 28,57 | 0,0401 |
| 04:03       | 39         | 10,96 | 20        | 16,80 | 0,1083 |
| 04:04       | 35         | 9,83  | 17        | 14,29 | 0,1786 |
| 04:05       | 6          | 1,69  | 2         | 1,68  | 1,0000 |
| 04:07       | 9          | 2,53  | 4         | 3,36  | 1,0000 |
| 04:08       | 4          | 1,12  | 1         | 0,84  | 0,3917 |
| 04:15       | -          | -     | 1         | 0,84  | 0,7453 |
| 04:50       | 1          | 0,28  | -         | -     | -      |
| 04          | 91         | 25,56 | -         | -     | -      |

n - broj pozitivnih ispitanika; % - učestalost alela HLA-DRB1\*04; CD – ispitanici s povećanim rizikom za razvoj celijakije; K - kontrolna skupina; P - usporedba "skupine CD" s kontrolom.

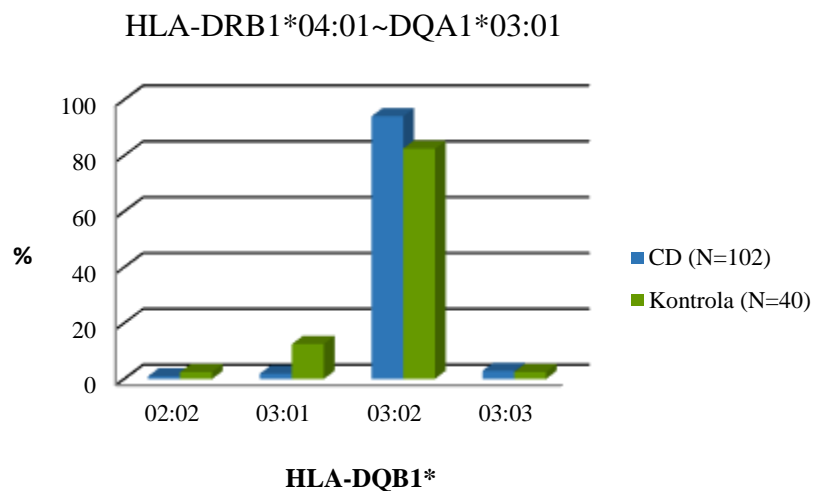
Analiza raspodjele alela gena HLA-DRB1\*04 pokazala je u rizičnoj skupini najveću zastupljenost alela HLA-DRB1\*04:01 (28,65%), kao i u kontrolnoj skupini (33,61%). U tablici 4 prikazana je raspodjela alela HLA-DRB1\*04 kojom je utvrđena statistički značajno manja učestalost ( $P < 0,05$ ) alela HLA-DRB1\*04:02 kod ispitanika s povećanim rizikom za razvoj CD u odnosu na zdrave ispitanike ( $P = 0,0401$ ) dok zastupljenost ostalih alela gena HLA-DRB1\*04 nije pokazala statistički značajne razlike između dvije skupine.

Za 91 bolesnika s povećanim rizikom za razvoj CD nije bilo moguće odrediti o kojem je alelu gena DRB1\*04 riječ.

#### 4.4. RASPODJELA HAPLOTIPOVA HLA-DRB1~DQA1~DQB1 MEĐU ISPITANICIMA POZITIVNIH ZA GEN HLA-DRB1\*04

##### A) Raspodjela haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 među ispitanicima pozitivnih za alel HLA-DRB1\*04:01

Haplotipovi HLA-DRB1~DQA1~DQB1 među ispitanicima s povećanim rizikom za razvoj CD i kontrolom istraženi su na ukupno 142 osobe pozitivne za alel HLA-DRB1\*04:01. U obje proučavane skupine haplotip HLA-DRB1\*04:01~DQA1\*03:01~DQB1\*03:02 bio je najčešći (CD - 94,12%, odnosno K - 82,5%). Na slici 14 prikazana je usporedba raspodjele samo za alele HLA-DQB1 između rizične i kontrolne skupine jer su svi ispitanici bili pozitivni za alel HLA-DQA1\*03:01.



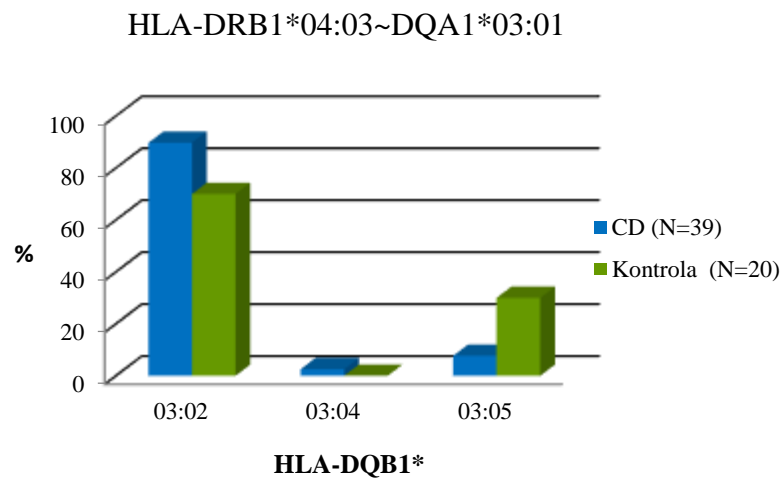
**Slika 14.** Prikaz raspodjele haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 među ispitanicima pozitivnih za alel HLA-DRB1\*04:01

##### B) Raspodjela haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 među ispitanicima pozitivnih za alel HLA-DRB1\*04:02

Kod svih ispitanika pozitivnih za alel HLA-DRB1\*04:02 uočen je samo haplotip HLA-DRB1\*04:02~DQA1\*03:01~DQB1\*03:02.

### C) Raspodjela haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 među ispitanicima pozitivnih za alel HLA-DRB1\*04:03

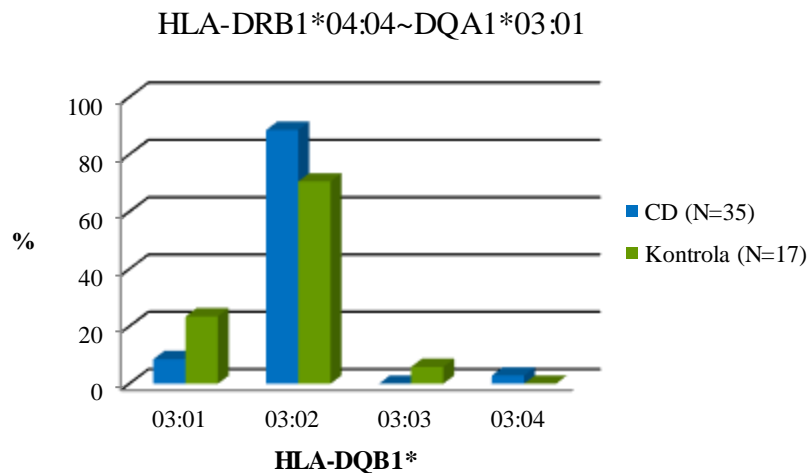
Raspodjela alela gena HLA-DQB1 među ispitanicima pozitivnih za alel HLA-DRB1\*04:03 pokazala je da je haplotip HLA-DRB1\*04:03~DQA1\*03:01~DQB1\*03:02 imao najveću učestalost u obje promatrane skupine (CD - 89,74%, odnosno K - 70,00%). Smanjena zastupljenost HLA-DRB1\*04:03~DQA1\*03:01~DQB1\*03:05 kod rizične skupine u odnosu na kontrolu je statistički značajna ( $P=0,0095$ ) (Slika 15).



**Slika 15.** Prikaz raspodjele haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 među ispitanicima pozitivnih za alel HLA-DRB1\*04:03

### D) Raspodjela haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 među ispitanicima pozitivnih za alel HLA-DRB1\*04:04

Raspodjela haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 među ispitanicima i kontrolnim osobama, prikazana na slici 16, pokazala je da je najzastupljeniji haplotip u obje skupine bio haplotip HLA-DRB1\*04:04~DQA1\*03:01~DQB1\*03:02 (CD-88,57%, odnosno K-70,59%). Statistički značajna razlika u zastupljenosti haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 između skupina nije utvrđena.



**Slika 16.** Prikaz raspodjele haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 među ispitanicima pozitivnih za alel HLA-DRB1\*04:04

**E) Raspodjela haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 među ispitanicima pozitivnih za ostale alele gena HLA-DRB1\*04**

S obzirom na mali broj osoba pozitivnih za alele DRB1\*04:05, DRB1\*04:07, DRB1\*04:08, DRB1\*04:15 i DRB1\*04:50 raspodjelu njihovih haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 prikazali smo u zajedničkoj tablici 5.

**Tablica 5.** Raspodjela haplotipova HLA-DRB1~DQA1~DQB1 među ispitanicima pozitivnih za preostale alele HLA-DRB1\*04

| HLA-DRB1* | HLA-DQA1* | HLA-DQB1* | CD    |   | K     |       |   |       |
|-----------|-----------|-----------|-------|---|-------|-------|---|-------|
|           |           |           | n     | % | n     | %     |   |       |
| 04:05     | 03:01     | 02:02     | (N=6) | 1 | 16,67 | (N=2) | 1 | 50,00 |
|           |           | 03:01     |       | - | -     |       | 1 | 50,00 |
|           |           | 03:02     |       | 4 | 66,66 |       | - | -     |
|           |           | 03:03     |       | 1 | 16,67 |       | - | -     |
| 04:07     | 03:01     | 03:01     | (N=9) | 3 | 33,33 | (N=4) | 4 | 100   |
|           |           | 03:02     |       | 3 | 33,33 |       | - | -     |
|           |           | 03:03     |       | 3 | 33,33 |       | - | -     |
|           | 03:01     | 03:02     | (N=4) | 1 | 25,00 | (N=1) | 1 | 100   |
|           |           | 03:04     |       | 3 | 75,00 |       | - | -     |
| 04:15     | 03:01     | 03:02     | -     | - | -     | (N=1) | 1 | 100   |
| 04:50     | 03:01     | 03:02     | (N=1) | 1 | 100   | -     | - | -     |

n - broj pozitivnih ispitanika; N – ukupan broj ispitanika pozitivan za određeni haplotip HLA-DRB1\*04~DQA1\*03:01~DQB1; % - učestalost alela HLA-DRB1\*04; CD – ispitanici s povećanim rizikom za razvoj celijakije; K - kontrolna skupina; P - usporedba "skupine CD" s kontrolom.

## **5. RASPRAVA**



Celijakija, autoimuna bolest, zastupljena je s različitom učestalošću u svijetu, prevalencija same bolesti značajno je porasla u posljednjih tridesetak godina. Brojna istraživanja utvrdila su povezanost gena HLA s celijakijom, te su ukazala na važnost njihovog određivanja kao jedne od nezaobilaznih pretraga u dokazivanju, odnosno isključivanju prisustva bolesti. Unatoč potvrđenoj povezanosti CD s heterodimerima HLA-DQ2 i -DQ8 koji predstavljaju povećan rizik oboljenja od celijakije, u istraživanjima se pojavljuje i vrlo mali broj oboljelih koji nemaju navedene heterodimere HLA-DQ. S druge strane veliki broj osoba ima rizične heterodimere HLA-DQ no nikada ne razviju bolest. Stoga se nameće potreba za daljnjim istraživanjima kako bi se otkrilo postoje li uz faktore okoliša, dosad poznate gene HLA i drugi genetski faktori (unutar regije HLA, ali i druge genske regije) koji utječu na pojavu i razvoj bolesti (21).

Heterodimer HLA-DQ8 (DQA1\*03:01~DQB1\*03:02) u jakoj je neravnoteži udruživanja s alelima gena HLA-DRB1\*04 i s njima tvori produženi haplotip HLA-DRB1\*04~DQA1\*03:01~DQB1\*03:02, istovremeno aleli HLA-DRB1\*04 mogu tvoriti haplotip i s kombinacijom alela DQA1\*03:01~DQB1\*03:01 (HLA-DQ7), odnosno puno rjeđe s nekim drugim alelima lokusa HLA-DQA1 i HLA-DQB1 (2, 22).

U ovom radu prvo je analizirano prisustvo rizičnih heterodimera HLA-DQ te je ispitanicima s povećanim rizikom za razvoj CD uočena povećana učestalost heterodimera HLA-DQ2, ali ne i heterodimera HLA-DQ8. Moguće objašnjenje za to je činjenica da u analizu nisu bili uključeni samo bolesnici s CD već i ispitanici koji su testirani pod sumnjom da imaju celijakiju.

Od ukupnog broja ispitanika rizične skupine njih 51,32% bili su nositelji heterodimera HLA-DQ2 i/ili -DQ8 dok je u kontroli njihov broj bio manji (K1 - 38,80% odnosno K2 – 37,56%). Smanjena učestalost heterodimera HLA-DQ povezanih s CD među našim ispitanicima s povećanim rizikom za celijakiju u odnosu na rezultate dosadašnjih istraživanja provedenih u Hrvatskoj (79,1%) posljedica je heterogenosti naše istraživane skupine. Odnosno činjenica da su pacijenti tipizirani za gene HLA testirani pod sumnjom da imaju celijakiju, što ne znači da su svi ispitanici imali potvrđenu dijagnozu celijakije (23). Isto tako učestalost heterodimera HLA-DQ2 prema rezultatima ovog rada niža je u odnosu na rezultate istraživanja u drugim populacijama Europe posebice u odnosu na populacije sjeverne Europe (Engleska: 88% i Skandinavske države: 92-96%) gdje je općenito uočeno da je zastupljenost heterodimera HLA-DQ2 viša nego na jugu Europe (Italija: 84%) (23). Heterodimer HLA-DQ8 prisutan je u 14,98% pacijenata s povećanim rizikom za razvoj celijakije što je nešto

niže u odnosu na dosadašnja istraživanja provedena u hrvatskoj populaciji (20,9%), a slično podacima za populacije Slovačke (11,1%) i Italije (12,7%) (24). S druge strane, prema istraživanjima frekvencije rizičnih heterodimera HLA-DQ u ostalim populacijama u svijetu uočeno je da je heterodimer HLA-DQ2 zastupljeniji, no odnos zastupljenosti heterodimera HLA-DQ2 i -DQ8 razlikuje se pojedinim regijama. Veća frekvencija heterodimera HLA-DQ2 i manja heterodimera HLA-DQ8 opisana je u SAD-u (HLA-DQ2 - 82%, odnosno HLA-DQ8 - 16%) i Brazilu (HLA-DQ2 - 75%, odnosno HLA-DQ8 - 17%) dok je najveća zastupljenost heterodimera HLA-DQ8 uočena u Argentini (43%) i Iranu (49%) (25, 26).

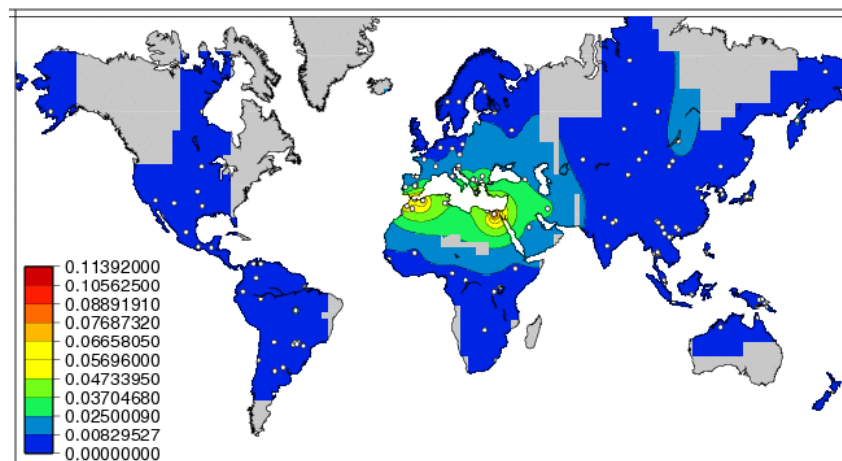
U daljnjim ispitivanjima, u radu je analizirana mogućnost pojave povećane učestalost pojedinih alela gena HLA-DRB1\*04, odnosno njihovih produženih haplotipova HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 kod osoba s povećanim rizikom za razvoj celijakije u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Tom analizom mogao bi se dobiti odgovor na pitanje predstavljaju li neki od alela HLA-DRB1\*04 veći rizik za razvoj celijakije od ostalih alela HLA-DRB1\*04. Naime, do danas je poznato više od 150 različitih alela DRB1\*04 i njihova zastupljenost u svijetu razlikuje se od populacije do populacije (preuzeto s <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). Treba istaknuti da od tog velikog broja alela gena HLA-DRB1\*04 tek je mali broj prisutan u velikom broju populacija (npr. DRB1\*04:01-DRB1\*04:08), dok brojni drugi spadaju u kategoriju rijetkih (npr. DRB1\*04:40, DRB1\*04:64), odnosno vrlo rijetkih alela (npr. DRB1\*04:189, DRB1\*04:190), jer su do danas uočeni jednom, odnosno manje od tri puta (preuzeto s <http://www.allelefrequencies.net/>).

Gen HLA-DRB1\*04 u hrvatskoj populaciji zastupljen je s učestalošću od 9,58% (27). Kao što možemo vidjeti u rizičnoj skupini, 16,92% ispitanika imalo je gen HLA-DRB1\*04 dok je u skupini K1 ukupno 21,04% ispitanika bilo pozitivno za gen HLA-DRB1\*04, a u skupini K2 njih 17,07% (Tablica 2). Usporedba kontrolnih skupina s rizičnom za prisustvo genotipa HLA-DRB1/DRB1 u kojem je prisutan gen DRB1\*04, pokazala je statistički značajno manju zastupljenost genotipa HLA-DRB1\*04/X u rizičnoj u odnosu na kontrolnu skupinu K1 ( $P=0,0231$ ), ali ne i u odnosu na K2.

Unutar rizične skupine, kao i među kontrolnim ispitanicima, najzastupljeniji alel bio je HLA-DRB1\*04:01 (9) što je u skladu s rezultatima dosadašnjih istraživanja provedenih u hrvatskoj populaciji, kao i u brojnim drugim populacijama u Europi (27). Alel DRB1\*04:02 bio je na drugom mjestu po učestalosti u obje skupine, što također odgovara objavljenim rezultatima za hrvatsku populaciju (27, 29). Međutim, statistički značajna razlika ( $P=0,0401$ )

ukazuje da bi ovaj alel mogao biti zaštićen za razvoj CD, jer mu je učestalost manja među osobama s povećanim rizikom za razvoj CD u usporedbi s kontrolnim ispitanicima. Zanimljivo je spomenuti da učestalost ovog alela pada od juga prema sjeveru Europe, jer je područje s najvećim prisustvom alela DRB1\*04:02 Bliski Istok od kuda se širio u druge dijelove svijeta (Slika 17). Istovremeno nužno je spomenuto da je alel DRB1\*04:02 predstavlja povećan rizik za razvoj šećerne bolesti tip 1 (3), te je neophodno rezultat ovog rada potvrditi među bolesnicima koji imaju potvrđenu dijagnozu CD, ali i provesti istraživanja ovog tipa u drugim populacijama u svijetu. Tako bi se rezultati ovog istraživanja mogli usporediti s drugim radovima te utvrditi je li potencijalna zaštitna uloga alela DRB1\*04:02 za razvoj CD karakteristična samo za našu populaciju ili je zajednička i drugim populacijama u svijetu.

## HLA-DRB1\*04:02



**Slika 17.** Raspodjela alela HLA-DRB1\*04:02 u svijetu (preuzeto s <http://pypop.org/popdata/2008/byfreq-DRB1.php.html>)

Među ispitanicima s povećanim rizikom za razvoj CD otkriven je i jedan ispitanik nositelj alela HLA-DRB1\*04:50, koji je po prvi put uočen u Hrvatskoj. O učestalosti ovog alela u svijetu nema literaturnih podataka iako spada u skupinu čestih alela HLA što znači da je do danas uočen više od tri puta (preuzeto s <http://www.allelefreqencies.net/>). Naime, o njegovoj nazočnosti izvjestili su autori iz Njemačke i SAD-a (<http://www.allelefreqencies.net/>). U međuvremenu su otkrivena još dva ispitanika kojima je prilikom testiranja za prisustvo rizičnih heterodimera HLA-DQ otkriven alel DRB1\*04:50

(neobjavljeno). Važno je reći da ove tri osobe nisu iz iste obitelji što navodi na zaključak da alel HLA-DRB1\*04:50 ne spada u grupu rijetkih alela u Hrvatskoj. Usporedbom tipizacija navedenih ispitanika možemo pretpostaviti da je produženi haplotip ovog alela: HLA-A\*02:01~C\*12:03~B\*18:01~DRB1\*04:50~DQA1\*03:01~DQB1\*03:02 (Tablica 6).

**Tablica 6.** Pretpostavljeni produženi haplotipi HLA-A~C~B~DRB1~DQB1~DQA1 kod tri ispitanika pozitivna za alel HLA-DRB1\*04:50

| Broj ispitanika | HLA-A* | HLA-B* | HLA-C* | HLA-DRB1* | HLA-DQB1* | HLA-DQA1* |
|-----------------|--------|--------|--------|-----------|-----------|-----------|
| 1               | 02:01  | 08:01  | 07:01  | 07:01     | 03:03     | 02:01     |
|                 | 02:01  | 18:01  | 12:03  | 04:50     | 03:02     | 03:01     |
| 2               | 25:01  | 13:02  | 06:02  | 07:01     | 02:02     | 02:01     |
|                 | 02:01  | 18:01  | 12:03  | 04:50     | 03:02     | 03:01     |
| 3               | 02:01  | 38:01  | 12:03  | 03:01     | 02:01     | 05:01     |
|                 | 02:01  | 18:01  | 12:03  | 04:50     | 03:02     | 03:01     |

Naredni cilj ovog rada bio je ispitati raspodjelu haplotipova HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 među ispitanicima i kontrolom. Svi ispitanici, rizične i kontrolne skupine, u navedenom haplotipu bili su pozitivni za gen HLA-DQA1\*03:01 dok su se haplotipovi razlikovali s obzirom na alel na lokusu HLA-DQB1. Bez obzira na alel koji je bio prisutan na lokusu HLA-DRB1\*04 najzastupljeniji alel lokusa HLA-DQ u rizičnoj, ali i kontrolnoj skupini bio je alel HLA-DQB1\*03:02 što je bilo i za očekivati zbog toga što on s alelima HLA-DRB1\*04~DQA1\*03:01 tvori heterodimer HLA-DQ8. Zastupljenost alela HLA-DQB1\*03:02 u haplotipu HLA-DRB1\*04~DQA1\*03:01 kontrolne skupine neznatno je niža što je isto tako u skladu s provedenim istraživanjem u kojem se ističe da je alela HLA-DQB1\*03:02 dominantan u navedenom haplotipu (8). Važno je istaknuti da je haplotip HLA-DRB1\*04:03~DQA1\*03:01~DQB1\*03:05 statistički značajno češći kod zdravih ispitanika u odnosu na rizičnu skupinu. S obzirom da HLA-DQA1\*03:01~DQB1\*03:05 također tvori heterodimer HLA-DQ8 može se pretpostaviti da ovakav heterodimer HLA-DQ8 ima zaštitnu ulogu za razvoj CD. No, ovaj rezultat nužno je potvrditi na puno većem broju ispitanika (pravih bolesnika s CD i zdravih osoba) pozitivnih za alel DRB1\*04:03, jer je u ovom radu ukupan broj osoba s ovim alelom bio 59 (rizični ispitanici - 39, kontrola - 20).

Na temelju svega iznesenog u ovom radu nameće se prepostavka da postoje razlike u raspodjeli alela gena HLA-DRB1\*04 i njihovih produženih haplotipova HLA-DRB1\*04~DQA1~DQB1 između promatrane skupine i zdravih ispitanika. Međutim, za bilo kakav konačan zaključak potrebna su dodatna istraživanja kako bi se dobilo više informacija o raspodjeli alela odnosno haplotipova na većem broju bolesnika s potvrđenom celijakijom.

## **6. ZAKLJUČAK**

1. Usporedba rizične i kontrolne skupine za prisustvo genotipa HLA-DRB1/DRB1 u kojem je prisutan gen DRB1\*04 pokazala je statistički značajno manju zastupljenost genotipa HLA-DRB1\*04/X u rizičnoj skupini u odnosu na kontrolu.
2. Najčešći alel gena HLA-DRB1\*04 bio je HLA-DRB1\*04:01 (CD-28,65%, odnosno K-33,61%).
3. Među ispitanicima pozitivnim za gen HLA-DRB1\*04, uočena je statistički manja zastupljenost alela HLA-DRB1\*04:02 (19,38% naspram 28,57%;  $P=0,0401$ ) u rizičnoj skupini u odnosu na kontrolu.
4. Nije utvrđena statistički značajna razlika za zastupljenost heterodimera HLA-DQ8 između rizične i zdrave kontrolne skupine.
5. Haplotip HLA-DRB1\*04:03~DQA1\*03:01~DQB1\*03:05 je statistički značajno ( $P=0,0095$ ) češći kod zdravih ispitanika (30,00%) u odnosu na rizičnu skupinu (7,69%).
6. Po prvi put je dokazano prisustvo alela HLA-DRB1\*04:50 u hrvatskoj populaciji.

## **7. LITERATURA**



1. Andreis I., Batinić D., Čulo F. i sur. (2010): *Imunologija*. Medicinska naklada, Zagreb.
2. Alshiekh S., Zhao L. P., Lernmark A. i sur. (2017): Different DRB1\*03:01-DQB1\*02:01 haplotypes confer different risk for celiac disease. *HLA*. **90**: 95-101.
3. Camarca M. E., Mozzillo E., Nugnes R. (2012): Celiac disease in type 1 diabetes mellitus. *Ital J Pediatr*. **38**: 1-10.
4. Marsh S., Parham P., Barber L. (2000): *The HLA FactsBook*. Academic Press, London.
5. Kotsch K., Blasczyk R. (2000): The Noncoding Regions of HLA-DRB Uncover Interlineage Recombinations as a Mechanism of HLA Diversification. *J Immunol*. **165**: 5664-5670.
6. Matzaraki V., Kumar V., Wijmenga C. (2017): The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biology* **18**: 76.
7. Sung C. (2007): *The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications*. *Yonsei Med J*. **48**: 11–23.
8. Gough S. C., Simmond M. J. (2007): The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. *Curr Genomics* **8**: 453–465.
9. Kupfer S. and Jabri B. (2012): Celiac Disease Pathophysiology. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. **22**: 1-4.
10. Guandalini S. (2007): A Brief History of Celiac Disease. *Impact*. **7**: 1-4.
11. Barker J., Liu E. (2009): Celiac Disease: Pathophysiology, Clinical Manifestations and Associated Autoimmune Conditions. *Adv Pediatr*. **55**: 349–365.
12. Taylor A., Lebowitz B., Snyder C., Green P. (2015): *Celiac Disease*. Seattle (WA). **74**: 101-116.
13. Parzanese I., Qehajaj D., Patrino F. i sur., (2017): Celiac disease: From pathophysiology to treatment. *World J Gastrointest Pathophysiol*. **8**: 27-38.
14. De Re V., Magris R., Cannizzaro R. (2017): New Insights into the Pathogenesis of Celiac Disease. *Front Med*. **4**: 137.
15. Losowsky M. (2008): A history of coeliac disease. *Dig Dis*. **26**: 112-20.
16. Tighe M. R., Hall M. A., Barbado M. i sur. (1992): HLA class II alleles associated with celiac disease susceptibility in a southern European population. *Cytometry*. **40**: 90-7.
17. Tollefsen S., Arentz-Hansen H., Fleckenstein B. (2006): HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J Clin Invest*. **116**: 2226–2236.
18. Karell, K., Louka, A. S., Moodie i sur. (2003): HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European genetics cluster on celiac disease. *Human Immunology*. **64**: 469–477.
19. Abadie V., Sollid L. M., Jabri B. (2011): Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annual review of immunology* **29**: 493-525.

20. Lauret E., Rodrigo L. (2013): Celiac Disease and Autoimmune-Associated Conditions. *Biomed Res Int.* **2013**: 1-17.
21. Sinčić M. B., Čizmarević S. N., Licul V. i sur. (2016): HLA-DQA1 and HLADQB1 genes in celiac disease. *Medicina fluminensis* **52**: 87-94.
22. Megiorni F., Pizzuti A. (2012): HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci.* **19**: 88.
23. Wroblova K., Kolorz M., Pav I. i sur. (2014): Frequencies of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 haplotypes in Czech and Slovak coeliac patients and the healthy population. *Acta Biochim Pol.* **61**: 191-3.
24. Sharma A., Liu X., Hadley D. (2016): Identification of Non-HLA Genes Associated with Celiac Disease and Country-Specific Differences in a Large, International Pediatric Cohort. *PloS One.* **11**.
25. Khosravi A., Mansouri M., Rostami-Nejad M. i sur. (2016): The likelihood ratio and frequency of DQ2/DQ8 haplotypes in Iranian patients with celiac disease. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* **9**: 18–24.
26. Castro-Antunes M., Crovella S., Brandão L. A. i sur. (2011): Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil. *Clinics (Sao Paulo).* **66**: 227-31.
27. Sanchez-Mazas A., Nunes J. M., Middleton D., Sauter J., Buhler S., McCabe A., Hofmann J., Baier D. M., Schmidt A. H., Nicoloso G., Andreani M., Grubic Z., Tiercy J. M., Fleischhauer K. (2017): Common and well-documented HLA alleles over all of Europe and within European sub-regions: A catalogue from the European Federation for Immunogenetics. *HLA* **89**: 104-113.
28. Grubic Z., Maskalan M., Radmanic L., Stingl Jankovic K., Burek Kamenaric M., Zunec R. (2017): The distribution of the DRB4\*01:03:01:02N null allele in HLA-DRB1~DQB1 haplotypes in the Croatian population. *HLA* **91**: 23.
29. Grubic Z., Stingl K., Zunec R. (2012): Heterogeneity of HLA-DRB1\*04 alleles and haplotypes in the Croatian population. *Tissue Antigens.* **80**: 219-23.

Internetski izvori:

<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>

<http://pypop.org/popdata/2008/byfreq-DRB1.php.html>

<http://www.allelefreqencies.net/>

<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>

## **8. ŽIVOTOPIS**

## **Osnovni osobni podaci**

Datum i mjesto rođenja: 26.08.1994., Zagreb, Republika Hrvatska

## **Obrazovanje**

- rujan 2013.- rujan 2016. - Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Preddiplomski studij biologije
- rujan 2009.- lipanj 2013. – VII opća gimnazija, Zagreb

## **Akadska postignuća**

- sudjelovanje u provedbi i organizaciji manifestacije 'Noć biologije' s ciljem promocije znanosti i biologije (travanj 2014.)

## **Osobne vještine**

- engleski (B2), njemački (B2)
- IT vještine (Microsoft Office: Word, Excel, PowerPoint)