

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

ANDRIJANA MENDEZ

**ANALIZA ALELNEGA POLIMORFIZMA IN
HAPLOTIPSKIH POVEZAV
GENOV HLA I. IN II. RAZREDA V SLOVENSKI
POPULACIJI**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

ANDRIJANA MENDEZ

**ANALIZA ALELNEGA POLIMORFIZMA IN
HAPLOTIPSKIH POVEZAV GENOV HLA I. IN II.
RAZREDA V SLOVENSKI POPULACIJI**

**ANALYSIS OF THE HLA CLASS I. AND II. GENES
POLYMORPHISM AND HAPLOTYPE ASSOCIATIONS
IN SLOVENIAN POPULATION**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Magistrsko naložko sem opravljala v Centru za tipizacijo tkiv, Zavoda RS za transfuzijsko medicino, pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc in dr. Blanke Vidan-Jeras.

Statistična analiza polimorfizma sistema HLA v vzorčenih skupinah je bila izvedena na antropološki enoti Oddelka za genetiko in evolucijo Univerze v Ženevi.

ZAHVALA

Iskrena hvala prof. dr. Janji Marc za pomoč, nasvete in prijazno vzpodbudo pri nastajanju magistrske naloge ter sometorici dr. Blanki Vidan-Jeras za njeno podporo ter strokovna in konstruktivna mnenja, ki so pomagala izpopolniti pričajoče delo. Hvala tudi prof. dr. Janku Kosu in doc. dr. Janezu Mravljaku za pazljivo branje in oceno mojega dela.

Zahvaljujem se dr. Stéphane Buhlerju in celotni skupini Oddelka za genetiko in evolucijo Univerze v Ženevi za njihov trud vložen v kakovostno in izčrpano statistično analizo ter koristne predloge in odlično sodelovanje v sklopu projekta HLA-NET.

Sodelavcem Centra za tipizacijo tkiv se zahvaljujem za njihovo pomoč, naklonjenost in razumevanje. Posebna zahvala gre Sendi Montanič, Ireni Kemperle in Evi Plešec, ki so mi s pozitivnim pristopom in zagnanostjo pomagale pri tipizacijah HLA.

Manuelu in najinemu Davidu Gabrielu pa hvala za ogromno mero ljubezni in potrpežljivosti

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc in somentorstvom dr. Blanke Vidan-Jeras.

Andrijana Mendez

Komisija za zagovor:

Predsednik: prof. dr. Janko Kos

Mentorica: prof. dr. Janja Marc

Somentorica: doc. dr. Blanka Vidan-Jeras

Član: doc. dr. Janez Mravljak

Datum zagovora: 19.11.2013

VSEBINA

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1. UVOD	1
1.1 Poglavitni histokompatibilnostni kompleks in sistem HLA	1
1.1.1 Geni, zgradba in funkcija molekul HLA	1
1.1.2 Nomenklatura sistema HLA	5
1.1.3 Dedovanje genov HLA	6
1.2 Metode tipizacije genov HLA	7
1.2.1 Metoda verižne reakcije s polimerazo in sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi-PCR-SSP	7
1.2.2 Metoda direktnega avtomatskega sekvenciranja z uporabo knjižnice-PCR-SBT	7
1.3 Evolucija in antropologija sistema HLA	9
1.4 Tkvivna skladnost in polimorfizem genov HLA v antropološko vzorčeni slovenski populaciji	11
1.5 Vloga in pomen polimorfizma genov HLA pri presaditvi krvotvornih matičnih celic	14
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1 Shema poteka dela	17
3.2 Preiskovanci in vzorčenje	18
3.2.1 Antropološko vzorčena slovenska populacija	18
3.2.2 Člani slovenskih družin	20
3.2.3 Nacionalni register Slovenija-Donor	20
3.2.4 Vzorec posameznikov s tipom HLA-B*44 in/ali -DRB1*14	20
3.3 Izoloacija DNA z aparatom GenoM-6	21
3.4 Določitev koncentracije in čistosti izolirane DNA	22
3.5 Priprava 2% agaroznega gela za elektroforezo	23
3.6 Tipizacija genov HLA z metodo PCR-SBT	24

3.7 Tipizacija genov HLA z metodo PCR-SSP	33
3.8 Statistična analiza in poročanje rezultatov	36
4. REZULTATI	41
 4.1 Določanje tipa HLA na ravni alelne skupine G v antropološko vzorčeni slovenski populaciji	41
 4.2 Statistična analiza polimorfizma lokusov HLA-A, -B, -C, -DRB1 in -DQB1 v antropološko vzorčeni slovenski populaciji	44
4.2.1 Pogostnost pojavljanja alelov HLA v antropološko vzorčeni slovenski populaciji	44
4.2.2 Redki aleli HLA	50
4.2.3 Pogostnost pojavljanja haplotipov HLA in vezavno neravnovesje v antropološko vzorčeni slovenski populaciji	51
4.2.4 Genetske razdalje med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in izbranimi evropskimi populacijami	54
4.2.5 Primerjava pogostnosti pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in nacionalnim registrom Slovenija-Donor	60
 4.3 Statistična analiza tipov HLA-A, -B in –DRB1 v slovenskih družinah	61
4.3.1 Pogostnost pojavljanja tipov HLA-A, -B in –DRB1 v slovenskih družinah in primerjava z antropološko vzorčeno slovensko populacijo	61
4.3.2 Pogostnost pojavljanja haplotipov HLA v slovenskih družinah	64
4.3.3 Vezavno neravnovesje dvolokusnih haplotipov HLA v slovenskih družinah	68
 4.4 Relativni delež alelov znotraj alelnih skupin HLA-B*44:02:01G in HLA-DRB1*14:01:01G ter primerjava z evropskimi populacijami	73
5. RAZPRAVA	76
 5.1 Določanje tipa HLA na ravni alelne skupine G v antropološko vzorčeni slovenski populaciji	76
 5.2 Statistična analiza polimorfizma lokusov HLA-A, -B, -C, -DRB1 in -DQB1 v antropološko vzorčeni slovenski populaciji	79
5.2.1 Pogostnost pojavljanja alelov HLA v antropološko vzorčeni slovenski populaciji	79

5.2.2 Redki aleli HLA	81
5.2.3 Pogostnost pojavljanja haplotipov HLA in vezavno neravnovesje v antropološko vzorčeni slovenski populaciji	81
5.2.4 Genetske razdalje med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in izbranimi evropskimi populacijami	83
5.2.5 Primerjava pogostnosti pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in nacionalnim registrom Slovenija-Donor	84
5.3 Statistična analiza tipov HLA-A, -B in -DRB1 v slovenskih družinah	85
5.3.1 Pogostnost pojavljanja tipov HLA, haplotipske povezave in vezavno neravnovesje v slovenskih družinah ter primerjava z antropološko vzorčeno slovensko populacijo	85
5.4 Relativni delež alelov znotraj alelnih skupin HLA-B*44:02:01G in HLA-DRB1*14:01:01G ter primerjava z evropskimi populacijami	87
6. SKLEPI	89
7. LITERATURA	92
PRILOGE A-D	99

POVZETEK

Polimorfni geni HLA kodirajo na celicah izražene molekule, katerih vloga je predstaviti imunogene peptide limfocitom T. Svetovne populacije se glede na pogostnosti pojavljanja alelov HLA razlikujejo. Namen te magistrske naloge je, s pomočjo klasičnega sekvenciranja po Sangerju in metode PCR-SSP določiti polimorfizem genov HLA-A, -B, -C, -DRB1 in -DQB1 na ravni funkcionalno ekvivalentnih alelnih skupin G, prikazati njihove pogostnosti, haplotipske povezave in določiti ničelne ter redke alele HLA v antropološko vzorčeni skupini 143-ih Slovencev. V sklopu projekta HLA-NET smo izračunali genetske razdalje med našo skupino in izbranimi evropskimi populacijami ter jo glede na pogostnosti preiskovanih tipov HLA primerjali z vzorcem 14.040 nesorodnih darovalcev krvotvornih matičnih celic iz nacionalnega registra Slovenija-Donor in z vzorcem 765 članov slovenskih družin. Nadalje smo opredelili še relativni delež izbranih alelov znotraj antropološko zanimivih skupin B*44:02:01G (306 preiskovancev) in DRB1*14:01:01G (142 preiskovancev) ter jih primerjali z drugimi evropskimi populacijami. Statistične analize smo izvedli v sklopu projekta HLA-NET s pomočjo programa GENE[RATE]. Rezultati sekvenciranja genov HLA so bili v 1544 primerih dvoumni, največkrat pri genu HLA-DRB1. Za razrešitev vseh dvoumnosti smo dodatno opravili 509 tipizacij visoke stopnje ločljivosti z metodo PCR-SSP. Alele in dvolokusne haplotipe HLA, ki smo jih najpogosteje opazili v slovenski populaciji najdemo z različno pogostostjo tudi v ostalih evropskih populacijah, največkrat kot del ancestralnih haplotipov A1-B8-DR3 in A3-B7-DR15. V antropološko vzorčeni slovenski populaciji nismo opazili ničelnih in redkih alelov HLA. Tri redke alele HLA pa smo v Centru za tipizacijo tkiv odkrili tekom rutinskega dela. Izračun genetskih razdalj je pokazal različne razdalje glede na preiskovani lokus in populacijo. Vzorca registra Slovenija-Donor in članov slovenskih družin se, v pogostnosti pojavljanja tipov HLA, nista statistično značilno razlikovala od antropološko vzorčene slovenske populacije, zato ju lahko obravnavamo kot zanjo reprezentativna. Tako relativni delež alela B*44:27 v B*44:02:01G kot DRB1*14:01 v DRB1*14:01:01G sta med večjimi znotraj preiskovanih evropskih populacij. Naši izsledki lahko pripomorejo k natančnejši antropološki opredelitvi slovenske populacije in prispevajo k bolj učinkovitemu ter hitrejšemu iskanju nesorodnih darovalcev krvotvornih matičnih celic za bolnike z boleznimi krvotvornih organov.

Ključne besede: HLA, alel, polimorfizem, sekvenciranje, slovenska populacija

ABSTRACT

Polymorphic HLA genes encode cell-surface expressed HLA molecules whose main function is to present immunogenic peptide to lymphocytes T. The frequency of HLA alleles varies across different world populations. The objective of this work is to determine an allele polymorphism of HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 genes (allele G group level) by Sanger sequence-based typing supplemented with PCR-SSP, and to demonstrate allele and haplotype frequencies, as well as presence of rare and null HLA alleles, in an anthropologicly defined sample of 143 Slovenes. As part of the HLA-NET project we calculated genetic distances between an anthropologicly defined Slovenian population and selected European populations, compared the frequencies of investigated HLA typs in Slovenian population with those in the samples of 14.040 unrelated haematopoietic stem cell donors from Slovenija-Donor National Registry and 765 Slovenian family members. Additionally we defined relative ratios of selected alleles within anthropologicly relevant B*44:02:01G (306 individuals) and DRB1*14:01:01G (142 individuals) groups and compared them with ones in other European populations. Statistical analysis was performed as part of HLA-NET project using a GENE[RATE] program. Sequencing of HLA genes generated 1544 ambiguous allele combinations, majority of which were found sequencing HLA-DRB1 gene. To resolve ambiguities 509 high-resolution PCR-SSP typings were performed. The most frequently observed alleles and two-loci HLA haplotypes in the population studied were common in all Europeans and are mostly seen as part of ancestral A1-B8-DR3 and A3-B7-DR15 haplotypes, however in different frequencies. There were no null or rare HLA alleles present, although three rare HLA alleles were found during routine HLA typing at Slovenian Tissue Typing Center. Estimation of genetic distances revealed, that these differ according to the HLA loci and the population investigated. Samples of Slovenija-Donor National Registry and Slovenian family members did not demonstrate significant differences in the investigated HLA type frequencies from an Slovenian population and, thus, could be considered as representative for it. Relative ratios of B*44:27 and DRB1*14:01 alleles within the B*44:02:01G and DRB1*14:01:01G groups, respectively, were among the highest seen in the investigated European populations. These findings may contribute to more precise anthropological definition of Slovenian population as well as facilitate more efficient and rapid unrelated haematopoietic stem cell donor search for patients with haematological diseases.

Key words: HLA, allele, polymorphism, sequencing, Slovenian population

SEZNAM OKRAJŠAV

A	adenin
AHPD	Analiza HLA v populacijah (angl. <i>Analysis of HLA Population Data</i>)
AFND	Podatkovna baza alelnih frekvenc genov HLA (angl. <i>Allele Frequency Net Database</i>)
AVSP	Antropološko vzorčena slovenska populacija
BMDW	Svetovni register prostovoljnih nesorodnih darovalcev krvotvornih matičnih celic (angl. <i>Bone Marrow Donors Worldwide</i>)
C	citozin
COST	Evropska medvladna shema za sodelovanje v znanosti in tehnologiji (angl. <i>European Cooperation in Science and Technology</i>)
CTT	Center za tipizacijo tkiv
ddNTP	dideoksiribonukleotidtrifosfat
dH ₂ O	deionizirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotidtrifosfat
dvDNA	dvoverižna deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilen diamino tetraacetna kislina
EFI	Evropska federacija za imunogenetiko (angl. <i>European Federation for Immunogenetics</i>)
ER	endoplazemski retikulum
NK celice	naravne celice ubijalke
G	gvanin
gLd	globalno vezavno neravnovesje (angl. <i>Global Linkage Disequilibrium</i>)
HLA	humani levkocitni antigeni (angl. <i>Human Leukocyte antigen</i>)
HLA-NET	Evropska mreža raznolikosti HLA za tkivno skladnost (angl. <i>European network of the HLA diversity for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics</i>)
HWE	Hardy-Weinbergovo ravnovesje (angl. <i>Hardy–Weinberg Equilibrium</i>)

IHWS	Mednarodna delavnica s področja tkivne skladnosti (angl. <i>International Histocompatibility Workshop</i>)
IHIWS	Mednarodna HLA in imunogenetska delavnice (angl. <i>International HLA and Immunogenetics Workshop</i>)
IMGT/HLA	Mednarodni imunogenetski informacijski sistem z zbirkо humanih levkocitnih antigenov (angl. <i>International Immunogenetics information system</i>)
KMC	krvotvorne matične celice
LD	vezavno neravnovesje (angl. <i>Linkage Disequilibrium</i>)
MDS	večdimensionalno skaliranje (angl. <i>Multidimensional scaling</i>)
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
NGS	naslednja generacija sekvenciranja (angl. <i>Next Generation Sequencing</i>)
NDKMC	nesorodni darovalec krvotornih matičnih celic
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PCR-SBT	direktno avtomatsko sekvenciranje z uporabo knjižnice (angl. <i>Polymerase chain reaction-sequence based typing</i>)
PCR-SSP	verižna reakcija s polimerazo in sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (angl. <i>Polymerase chain reaction based sequence specific priming</i>)
T	timin
TCR	T-celični receptor (angl. <i>T-cell receptor</i>)
ZTM	Zavod RS za transfuzijsko medicino

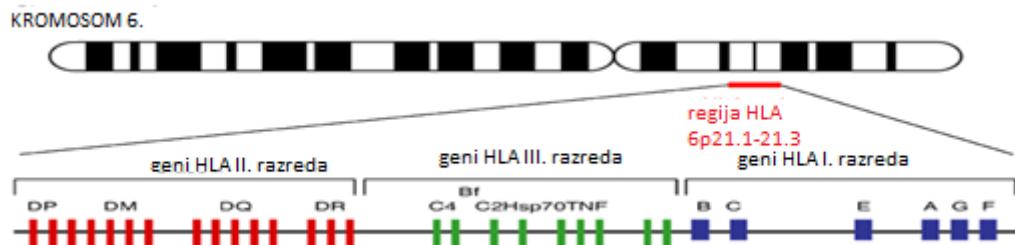
1. UVOD

1.1 Poglavitni histokompatibilnostni kompleks in sistem HLA

Poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl. *Major Histocompatibility Complex*-MHC) obsega skupine genov, mnogi med njimi kodirajo vrsto molekul, pomembnih za učinkovito delovanje imunskega sistema vseh vretenčarjev. Pri človeku vsebuje genska regija MHC več kot 200 kodirajočih genskih lokusov, kar jo uvršča med gensko najbolj informativne odseke genomske DNA. Nabor genov MHC in njihovih genskih produktov, humanih levkocitnih antigenov HLA (angl. *Human Leukocyte Antigen*), je pri človeku poznan kot sistem HLA. Le-ta je zaradi svoje vpletenenosti v imunske reakcije eden osnovnih gradnikov uspešne imunske obrambe posameznika in populacij. Izjemna številčnost genskih različic funkcionalnih genov HLA, njihovih možnih kombinacij ter ključen pomen in vloga predvsem na področjih presaditve organov, tkiv in krvotvornih matičnih celic, odpornosti in dovzetnosti za avtoimune ter infekcijske bolezni kot tudi populacijske genetike in reprodukcijske medicine, so razlogi, da je sistem HLA eden najbolj intenzivno proučevanih genskih sistemov današnjega časa.

1.1.1 Geni, zgradba in funkcija molekul HLA

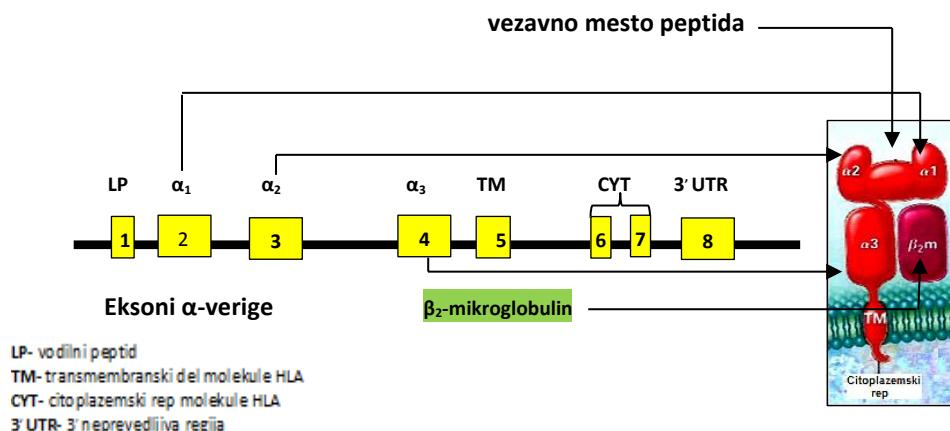
Genske zapise za molekule HLA najdemo na krajšem kraku 6. kromosoma (6p.21.31), znotraj genskega kompleksa MHC, ki pri človeku obsega približno 3,6 Mb velik odsek genomske DNA. Ocenjujejo, da približno 40% genov kompleksa MHC nosi zapis za molekule imunskega sistema (1). Genski zapis ni strnjen, saj so geni sistema HLA razporejeni na različnih pozicijah (genskih lokusih) na kromosому. Glede na položaj genov HLA se kompleks MHC razdeli v tri genske regije. Genski lokusi z geni za molekule HLA I. razreda ležijo na telomernem koncu kromosoma, medtem ko genske lokuse z geni za molekule HLA II. razreda najdemo v centromerni regiji. Osrednja genska regija ne vsebuje genov HLA, temveč zelo heterogeno skupino genov, med katerimi so geni za proteine komplementnega sistema (C2, C4), encim 21-hidroksilazo, tumor nekrotizirajoči faktor (TNF- α in TNF- β), stresne proteine in druge gene z imunskimi ter neimunskimi funkcijami (2, 3). Slika 1. prikazuje posamezne genske regije znotraj kompleksa MHC.



Slika 1: Genski zemljevid kompleksa MHC (prirejeno po literaturi 4)

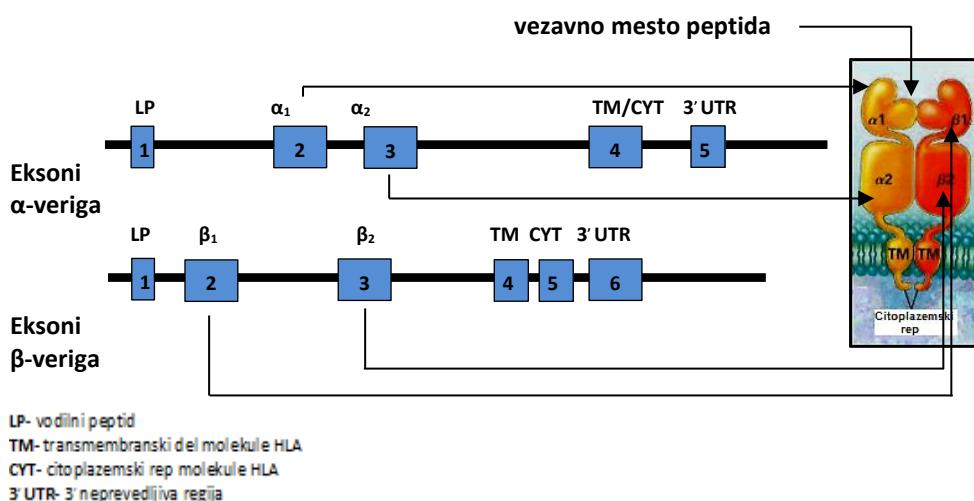
Geni HLA I. razreda se delijo na klasične (HLA-A, HLA-B, HLA-C), neklasične (HLA-E, HLA-G, HLA-F) in psevdogene (HLA-H, J, K in L). Klasični geni HLA I. razreda izkazujejo podobnost v zgradbi in funkciji ter kodirajo klasične antigene HLA I. razreda, izražene na celični membrani vseh celic z jedrom, medtem ko imajo neklasični antigeni HLA I. razreda omejene funkcije in so izraženi le na določenih vrstah celic (5).

Zgradbo in izražanje antigenov HLA I. razreda na celični membrani določajo nukleotidna zaporedja osmih eksonov, ki tvorijo gen HLA I. razreda in so shematsko prikazani na Sliki 2. Začetek prepisovanja gena v antigen HLA I. razreda omogoča vodilni peptid kodiran s prvega eksona. Antigeni HLA I. razreda so heterodimeri, sestavljeni iz težke glikozilirane polipeptidne verige α (45 kDa), ki je oblikovana v tri zunajcelične globularne domene (α_1 , α_2 , α_3) kodirane z drugega, tretjega in četrtega eksona. Globularne domene so med seboj povezane z disulfidnimi vezmi in se preko α_3 domene nekovalentno povezujejo z lahko polipeptidno verigo oz. β_2 -mikroglobulinom (12 kDa). Le-ta predstavlja četrto globularno domeno kodirano s 15. kromosoma, nujno za stabilizacijo molekule HLA. Zasidranje antigena v celično membrano omogočajo peti ekson, ki kodira transmembranski del, ter šesti in sedmi ekson z zapisoma za kratek citoplazemski rep (5).



Slika 2: Shema organizacije gena in zgradbe molekule HLA I. razreda (prirejeno po literaturi 3)

Centromerno ležeča genska regija HLA II. razreda vsebuje gene HLA-DRB1, -DRA, -DQB1, -DQA1, -DPB1, -DPA1. Funkcionalni geni kodirajo na celični membrani izražene antigene HLA II. razreda. Molekula HLA II. razreda ima heterodimerno zgradbo, sestavljenou iz dveh glikoziliranih polipeptidnih verig α in β , oblikovanih v dve globularni domeni, in sicer veriga α v domeni α_1 in α_2 , ter veriga β v domeni β_1 in β_2 . Polipeptidni verigi sta kodirani z dveh različnih genov, tako v molekuli HLA-DR polipeptidno verigo α kodira gen HLA-DRA in polipeptidno verigo β gen HLA-DRB1. Enak princip sestavljanja zunajcelične strukture velja za molekuli HLA-DQ in HLA-DP (6). Geni, ki kodirajo α in β polipeptidno verigo molekul HLA II. razreda imajo podobno zgradbo. Prvi ekson je zadolžen za prepisovanje gena, drugi in tretji ekson nosita zapisa za zunajcelični globularni domeni. Zapise za transmembranske in citoplazemske dele α verig nosijo četrti eksoni, medtem ko omenjena dela β verig kodirajo četrti in peti eksoni (5). Organizacijo genov in zgradbo molekul HLA II. razreda shematsko prikazuje Slika 3.



Slika 3: Shema organizacije genov in zgradbe molekule HLA II. razreda
(prirejeno po literaturi 3)

Geni HLA I. in II. razreda so eni izmed najbolj polimorfnih genov, doslej najdenih pri vretenčarjih (7). Številne genske različice ali aleli HLA kodirajo različne molekule HLA, ki so zmožne vezave in predstavitev različnih repertoarjev peptidov, limfocitom T. Pri genih HLA I. razreda je največja stopnja polimorfizma zastopana v drugem in tretjem eksonu, ki kodirata globularni domeni α_1 in α_2 molekule HLA I. razreda, medtem ko pri genih HLA II. razreda največ polimorfizma zasledimo v drugem eksonu gena, ki kodira globularno domeno β_1 . Globularne domene oblikujejo vdolbino na vrhu molekul HLA I. in

II. razreda, ta je bistvenega pomena za biološko funkcijo molekul HLA, to je vezava peptidov, nastalih z razgradnjo proteinov patogenega izvora ter njihova predstavitev limfocitom T, kar sproži vrsto imunskih reakcij, ki vodijo v odstranitev patogena. Za uspešno obrambo pred patogeni mora normalno deluječ imunski sistem ločiti med lastnimi in tujimi peptidi, zato se potencialno avtoreaktivni limfociti T odstranijo ali inaktivirajo že v zgodnji fazi razvoja imunskega sistema. Izjemen polimorfizem molekul HLA se odraža v različnih oblikah vdolbin in zaporedju aminokislinskih ostankov v njih. Nabor tujih peptidov, ki ga posamezna molekula HLA lahko veže in predstavi, je tako odvisen od oblike vdolbine in uspešnih interakcij med tujim peptidom ter zaporedjem aminokislinskih ostankov v njej (5, 8). Zastopanost molekul HLA I. in II. razreda na različnih vrstah celic in razlika v intracelularnih mehanizmih vezave peptidov prispevata k različni funkciji obeh razredov molekul HLA in posledično razlike v imunskega odzivu na znotraj in zunajcelične patogene (9). Okužba z znotrajceličnimi patogeni aktivira proteolitične encime v proteosomih, ki razgradijo patogene proteine v peptide, ti nato s pomočjo transporterskih molekul potujejo v endoplazemski retikulum (ER), kjer se vežejo s tam nastalimi molekulami HLA I. razreda. Kompleks HLA I. razreda-peptid se preko Golgijevega aparata prenese na površino celic in predstavi T-celičnim receptorjem (TCR) na citotoksičnih limfocitih T s koreceptorjem CD8 ($CD8^+$ limfociti T), ki z izločanjem citotoksinov uničijo okužene celice. Vse celice z jedrom so morebitne tarče napada znotrajceličnih patogenov, zato na njihovi celični membrani najdemo več sto tisoč molekul HLA I. razreda (5).

Molekule HLA II. razreda najdemo le na specializiranih antigen predstavitvenih celicah, kot so makrofagi, limfociti B in dendritične celice, le-te so sposobne endocitoze in fagocitoze zunajceličnih patogenov. Tudi molekule HLA II. razreda se sintetizirajo v ER, vendar vdolbino molekule do srečanja z eksogenim peptidom zaseda invariantna veriga. Vezava invariantne verige pogojuje usmerjanje molekul HLA II. razreda v endosom, kjer molekularni šaperon HLA-DM prevzame invariantno verigo, da se v vdolbino molekule HLA II. razreda lahko veže peptid, produkt razgradnje proteinov endocitiranega ali fagocitiranega zunajceličnega patogena. Kompleks HLA II. razreda-peptid se prenese na površino celic in predstavi TCR celic pomagalk s koreceptorjem CD4 ($CD4^+$ limfociti T), te nato z izločanjem citokinov aktivirajo efektorske funkcije makrofagov in limfocitov B (5).

1.1.2 Nomenklatura sistema HLA

Naraščajoče število novoodkritih antigenov HLA je leta 1968 pod pokroviteljstvom Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) botrovalo ustanovitvi Nomenklaturne komisije, ki skrbi za standarizirano poimenovanje antigenov HLA.

Odkritje metod za tipizacijo genov HLA je v veliki meri prispevalo k strmemu naraščanju števila novoodkritih alelov HLA in zato potrebi po mesečnem dopolnjevanju seznama alelov HLA. Do julija 2013 so odkrili 9.555 alelov HLA, od tega 2.478 alelov HLA-A, 3.113 alelov HLA-B, 1.897 alelov HLA-C, 1.382 alelov HLA-DRB1 ter 426 alelov HLA-DQB1 (10).

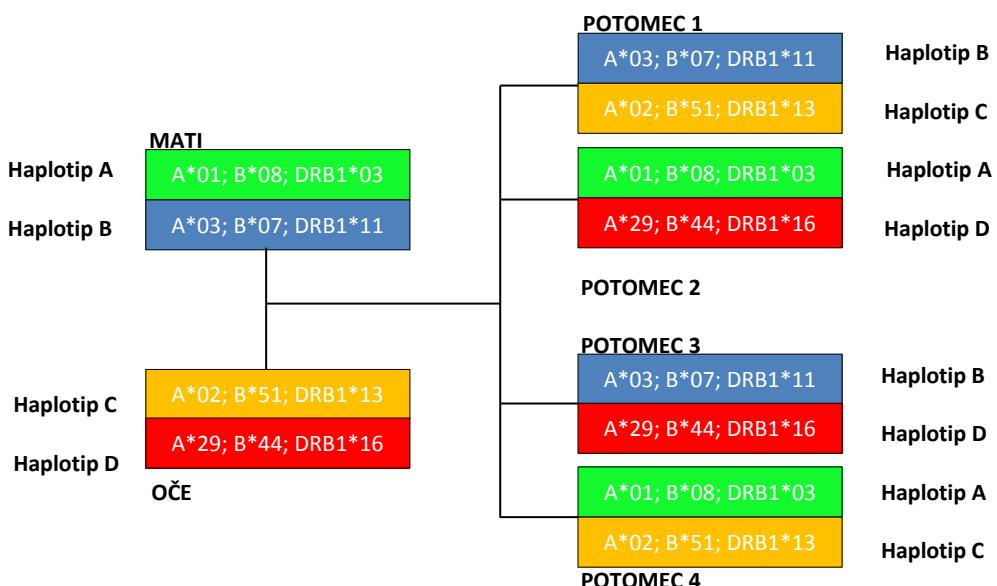
Z molekularnimi metodami določljiv alel HLA zapisujemo z največ štirimi seti številko ločenimi z dvopičji za zvezdico, ki sledi oznaki genskega lokusa oz. gena. Nomenklaturna komisija za vsak alel HLA poskuša ugotoviti tudi njegov serološki ekvivalent oz. antigensko specifičnost, določljivo s serološkimi metodami. Spremembe v vsaj enem nukleotidu zaporedja, ki kodira aminokislinsko zaporedje proteina, se odražajo v prvih dveh setih števil v imenu alela. Tihe mutacije, ki ne povzročajo sprememb aminokislinskega zaporedja, so vključene v tretji set števil imena. Imena alelov, ki se razlikujejo v intronih in 5' ali 3' neprevedljivih regijah (5', 3'UTR), se razlikujejo v četrtem setu števil. Različne stopnje in načine izražanja proteina opisujejo črke na koncu imena. V primeru, da alel HLA kodira protein, ki se ne izraža na površini celic, je na koncu imena dodana črka N za ničelni alel (10). Način in pomen nomenklaturnega poimenovanja je prikazan v Preglednici I.

Preglednica I: Načela nomenklaturnega poimenovanja sistema HLA

Nomenklatura	Pomen
HLA	regija HLA in prepona za gene HLA
HLA-A	genski lokus HLA
HLA-A*02	alelna skupina, ki kodira serološko določljiv antigen A2
HLA-C*07:03	specifičen alel HLA
HLA-DRB1*13:01:02	alel, ki se od DRB1*13:01:01 razlikuje v tiki mutaciji
HLA-DRB1*13:01:01:02	alel, ki se od DRB1*13:01:01 razlikuje v mutaciji izven kodirajoče regije
HLA-A*24:09N	alel, ki se ne izraža na celični površini (angl. <i>Null allele</i>)
HLA-A*30:14L	alel, ki kodira protein z znižanim izražanjem na celični površini (angl. <i>Low</i>)
HLA-A*24:02:01:02L	alel, ki kodira protein z znižanim izražanjem na celični površini in kjer je mutacija izven kodirajoče regije
HLA-B*44:02:01:02S	alel, ki kodira protein, ki je izražen le kot sekretorna molekula (angl. <i>Secreted</i>)
HLA-A*32:11Q	alel z mutacijo za katero je bilo pokazano, vendar ne še potrjeno, da vpliva na izražanje na celični površini (angl. <i>Questionable</i>)

1.1.3 Dedovanje genov HLA

Geni sistema HLA se dedujejo v setu, tako da potomec podeduje en set genov HLA od matere in drugi set genov HLA od očeta. Posamezen set genov HLA imenujemo haplotip in vključuje določeno kombinacijo genov HLA I. in II. razreda. Oba haplotipa skupaj tvorita posameznikov genotip. Z natančno družinsko analizo lahko v primerih, ko poznamo haplotipe matere in očeta, predvidimo potek dedovanja haplotipov HLA s staršev na potomce (11). V posamezni družini so možne štiri kombinacije haplotipov, ki dajejo štiri možne genotipe, vendar pa vsak potomec od svojih staršev podeduje le enega, kar je shematsko prikazano na Sliki 4. Glede na podedovane haplotipe HLA so si potomci znotraj dane družine lahko: popolnoma enaki, polovično enaki ali popolnoma neenaki. Verjetnost, da bosta v družini dva genotipsko enaka potomca, je 25% (8). Tipizacija genov HLA pri približno 2% potomcev odkrije rekombinanten haplotip HLA. Pogostnost pojavljanja rekombinacij med dvema genskima lokusoma HLA je odvisna od razdalje med njima, in sicer se z večanjem razdalje med genskima lokusoma veča tudi verjetnost rekombinacije (12). Značilnost genov HLA je tudi kodominantno dedovanje, kar pomeni, da se vsi produkti kodirajočih genov (antigeni HLA) izražajo na celični površini ter so določljivi s serološkimi metodami tipizacije. Osebe so lahko glede na podedovane gene HLA homozigoti ali heterozigoti. Pri prvih lahko z metodami tipizacije genov določimo dva enaka alela enega ali več genov HLA I. in/ali II. razreda, medtem ko pri heterozigotih geni HLA obih razredov nastopajo v različnih alelih.



Slika 4: Dedovanje genov HLA

1.2 Metode tipizacije genov HLA

Prve molekularne metode tipizacije genov HLA so se pojavile že v začetku 80. let prejšnjega stoletja. S pospešenim razvojem novih tehnik in dostopnostjo komercialno pripravljenih kitov se uporaba molekularnih metod v rutinskem delu imunogenetskih laboratoriјev nezadržno veča in nadomešča serološke metode tipizacije. Razmah uporabe molekularnih metod, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo in sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (PCR-SSP) ter direktnem avtomatskem sekvenciranju genov HLA z uporabo knjižnice (PCR-SBT) sovпадa s porastom novoodkritih alelov vseh genskih lokusov HLA.

Končni rezultat tipizacije genov HLA z metodo PCR-SSP in PCR-SBT je tip HLA, ki je lahko, glede na izbor parov sekvenčno specifičnih začetnih oligonukleotidov, po svoji izpovednosti na nizki stopnji ločljivosti (določimo celotno skupino alelov določenega gena oz. antigen HLA) ali na visoki stopnji ločljivosti (točno določen alel posameznega gena HLA).

1.2.1 Metoda verižne reakcije s polimerazo in sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi-PCR-SSP

Metoda temelji na uporabi parov kratkih sekvenčno specifičnih začetnih oligonukleotidov, s katerimi v prisotnosti termostabilnega encima Taq DNA polimeraze (iz termofilne bakterije lat. *Thermus aquaticus*) in štirih deoksiribonukleotidtrifosfatov (dNTP), pomnožujemo tarčne odseke DNA. Do pomnoževanja tarčnih odsekov DNA pride le v primerih, ko sta nukleotidni zaporedji začetnih oligonukleotidov in 3' koncov tarčnih odsekov DNA komplementarni. Reakcija pomnoževanja poteka ciklično in v natančnih termostatih (aparatih za PCR), ki jih lahko programiramo tako, da dosegajo in zagotavljajo vzdrževanje točno določenih temperatur, potrebnih za uspešen potek posameznih korakov reakcije pomnoževanja. Prisotnost pomnožkov tarčnih odsekov DNA detektiramo z elektroforezo na agaroznem gelu (12, 13).

1.2.2 Metoda direktnega avtomatskega sekvenciranja z uporabo knjižnice-PCR-SBT

Sekvenciranje genov HLA sloni na principu verižno-terminacijske metode sekvenciranja DNA, ki jo je leta 1977 razvil Frederic Sanger. Proses sekvenciranja genov HLA z metodo PCR-SBT poteka ciklično in v dveh delih. V prvem delu procesa z gensko specifičnimi

začetnimi oligonukleotidi pomnožimo preiskovani gen HLA po principu metode PCR-SSP. Pomnoženi gen HLA sestavlja polimorfni eksoni, katere želimo sekvencirati in služijo kot DNA matrica za izvedbo sekvenčne reakcije. V sekvenčni reakciji poteka prileganje parov ekson specifičnih začetnih oligonukleotidov na enoverižno DNA matrico in sinteza komplementarne verige DNA, ki jo katalizira encim Taq polimeraza z vgrajevanjem štirih dNTP-jev (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) in njihovih fluorescenčno označenih analogov 2',3'-dideoksiribonukleotidtrifosfatov (ddNTP). Ko Taq polimeraza naključno vgradi fluorescenčno označen A, C, G ali T ddNTP, se sinteza verige DNA selektivno prekine, saj ddNTP-jem manjka hidroksilna skupina na 3' koncu in zato tvorba fosfodiesterske vezi z naslednjim nukleotidom ni možna. Sintetizirani fragmenti DNA so zato različnih dolžin in glede na ddNTP, ki je končal sintezo verige DNA, emitirajo svetlobo značilne valovne dolžine (12, 14, 15).

V drugem delu procesa sočasno potekata kapilarna elektroforeza različno dolgih sintetiziranih enoverižnih fragmentov DNA na posebnem polimeru ter laserska detekcija pozicije in emitirane valovne dolžine svetlobe enoverižnega fragmenta DNA. Rezultat je sekvencia podana v obliki elektroferograma.

Z računalniškim programom dobijeno sekvenco primerjamo s knjižnico znanih sekvenc alelov določenega gena HLA, ki so vsebovane v podatkovni bazi-IMGT/HLA (16). Pomankljivost sekvenciranja genov HLA je pomnoževanje in sekvenciranje obeh alelov istega gena hkrati, zato pogosto ni mogoče ugotoviti, kateri od obeh alelov prispeva določen nukleotid v dobavljeni sekvenci. V primeru alelne heterozigotnosti imajo lahko različne kombinacije alelov istega gena identično sekvenco, zato takrat govorimo o dvoumnih rezultatih ali dvoumnostih (angl. *ambiguities*), primer katerih prikazuje Slika 5

	5 55 5
	5 56 6
	8 90 1
B*07:02:01	TGGAGGGCGAGTCGTGGAG
B*07:24	TGGAGGGCCTGTGCGTGGAG
B*35:03	TGGAGGGCCTGTGCGTGGAG
B*35:33	TGGAGGGCGAGTCGTGGAG

Slika 5: Dvoujni rezultati pri sekvenciranju genov HLA

Vzrok za dvoujni rezultat so lahko tudi nukleotidne razlike v področjih oz. eksonih, ki jih z rutinskim sekvenciranjem ne zajamemo, posledično ločba med različnimi kombinacijami alelov, ki se razlikujejo izven analiziranih eksonov, ni možna. Tretji tip dvoumnih

rezultatov se pojavi, kadar del sekvence določenega alela ni znan (17). Razreševanje dvoumnih rezultatov zahteva dodatne tipizacije z metodo PCR-SSP na visoki stopnji ločljivosti ali dodatno sekveniranje tistih odsekov DNA, v katerih se aleli med seboj razlikujejo.

1.3 Evolucija in antropologija sistema HLA

Sistem HLA modernega človeka je rezultat miljonov let evolucije, tekom katere so različni molekularni mehanizmi ob sočasnih pritiskih okolja in migracijah populacij prispevali k razvoju prilagodljivega in učinkovitega načina obrambe pred patogenimi organizmi in s tem k ohranitvi vrste.

Izvor anatomskega modernega mislečega človeka opredeljuje več hipotez, največ zagovornikov ima tako imenovana hipoteza o »pohodu iz Afrike«, po kateri se je prvi anatomsko moderen misleči človek (lat. *Homo sapiens*), v prisotnosti močnih selekcijskih pritiskov, razvil iz arhaičnega mislečega človeka (lat. *Homo heidelbergensis*) v Afriki pred približno 200.000 leti (18, 19). Selitev majhnih populacij modernega mislečega človeka v V. Azijo in nato naprej v Evropo se je odražala v postopnem nadomeščanju tam živečih zgodnješih oblik človeškega razvoja, in sicer arhaičnega mislečega človeka, neandertalca (lat. *Homo neanderthalensis*) ter glede na najnovejše raziskave tudi Denisova homininov (19, 20). Tipizacije genov HLA modernih Evropejcev v sklopu antropoloških študij so pokazale, da je več kot polovica tipiziranih alelov HLA neandertalskega in/ali denisovanskega izvora, kar govorí v prid izmenjave genske snovi med obstoječimi prebivalci Evrazije. (21, 22). Posledice velikih migracij so še danes vidne v profilih HLA večine domorodnih populacij, saj le-te izkazujejo visoko stopnjo podobnosti s profili HLA njihovih prednikov, ki so začeli s poseljevanjem določenega geografskega področja (19).

Migracija populacije v novo okolje pomeni soočanje z novimi izzivi, ki med drugim zahtevajo tudi prilagoditev imunskega sistema novonastalim življenjskim razmeram, predvsem v smislu razvoja učinkovite zaščite pred spektrom novih patogenov in ogrožajočimi epidemijami infekcijskih bolezni (23, 24). Uravnotežena naravna selekcija z nenaključnimi molekularnimi mehanizmi, zmožnimi vzdrževanja visoke stopnje polimorfizma, je danes uveljavljen model evolucije sistema HLA. O polimorfizmu govorimo, kadar najdemo v populaciji vsaj dva genotipa, od katerih nobeden ni redek oz. ima pogostnost pojavljanja vsaj 1% (25). Seleksijski pritiski so namreč narekovali razvoj multiplih in polimorfnih genov HLA, ki so na funkcionalni ravni zmožni predstaviti čim večji

spekter tujih peptidov limfocitom T in populacijam zagotoviti močan imunski odziv ter s tem večjo možnost za njihovo preživetje. Dodatno prednost posameznikom v selektivnem okolju zagotavlja heterozigotnost v genih HLA. Heterozigoti posedujejo več različnih molekul HLA, s čimer se dodatno poveča nabor imunogenih peptidov, ki jih lahko predstavijo imunskemu sistemu, kar v evolucijskem smislu predstavlja prednost pred homozigoti (24).

K odkritju razsežnosti polimorfizma genov HLA so v veliki meri pripomogle molekularne metode tipizacije genov HLA na visoki stopnji ločljivosti (PCR-SSP, PCR-SBT). Omenjene metode so omogočile identifikacijo molekularnih mehanizmov in njihovega načina ter področja delovanja znotraj sistema HLA. Med pomembnejše molekularne mehanizme, ki so prispevali k oblikovanju polimorfnega sistema, uvrščamo: podvajanje genov, alelno in gensko premeščanje, delecije, insercije, rekombinacije in točkovne mutacije (5, 19). Populacijske študije izkazujejo, da polimorfizem ni naključno razporejen, temveč so variacije nakopičene v tistih eksonih genov HLA, ki kodirajo funkcijalne dele molekul HLA. Stopnja polimorfizma je v genskih področjih, ki niso neposredno vpletena v funkcijo molekule HLA, znantno nižja ter se z oddaljevanjem od klasičnih genskih lokusov HLA še dodatno zmanjšuje. Vpliv selekcijskih pritiskov na evolucijo sistema HLA, kot ga poznamo danes, se odraža tudi v vezavnem neravnovesju (angl. *Linkage Disequilibrium-LD*) med aleli genskih lokusov HLA (24). Pri LD gre za pojav, kjer se aleli različnih genskih lokusov HLA na istem kromosomu povezujejo v kombinacije (haplotipe) bolj ali manj pogosto, kot bi to lahko pričakovali od naključne tvorbe haplotipov, odvisne le od pogostnosti pojavljanja posameznih alelov v populaciji (12, 26).

V prid burni molekularni evoluciji sistema HLA pričajo tudi številni psevdogeni in nekodirajoči geni, katerih biološki namen ni znan, so pa najverjetneje posledica mutacij tokom nastajanja sistema HLA iz enega samega ancestralnega gena (5).

Populacijske študije so pokazale razlike v porazdelitvi in pogostnosti pojavljanja alelov HLA med svetovnimi populacijami, tako lahko v različnih populacijah najdemo alele in haplotipe HLA, ki so za populacije na danih geografskih področjih značilni (27). Uspešna prilagoditev namreč vključuje nastanek prednostnih alelov in alelnih kombinacij HLA, ki v specifičnih razmerah povečajo verjetnost preživetja določene populacije. Danes tako poznamo značilno afriške, azijske, ameriške, avstralske ter evropske alele HLA. Pomembno visoko korelacijo med gensko variabilnostjo in geografijo je potrdila tudi obsežna populacijska študija, v kateri so skupini 23.500 posameznikov iz 200 svetovnih

populacij tipizirali sedem lokusov HLA (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DQA1, -DPB1) in izsledke med seboj primerjali (28). Čeprav je v svetovnem merilu število alelov HLA izjemno veliko, je število množično razširjenih alelov majhno. Alel HLA-A*02:01 je primer alela, najdenega v vseh doslej preiskovanih populacijah, medtem ko so podtipe tega alela našli v manjšem obsegu in le v populacijah na specifičnih geografskih področjih (19). V svetovnem merilu redke alele HLA pogosteje zasledimo v manjših in izoliranih populacijah, kot so domorodne populacije Srednje in Južne Amerike. Repertoar alelov v omenjenih populacijah je posledica molekularnih mehanizmov, ki so originalne alele azijskih prednikov spremenili v nove alele, bolj ugodne za preživetje v specifičnih okoljih Južne in Srednje Amerike. Znano je tudi, da so manjše in izolirane populacije bolj dovzetne za naključno izgubo določenih alelov ali genetski zdrs (19). Populacije so skozi evolucijo bolj ali manj konstantno podvržene različnim dogodkom, kot so: migracije, mutacije, nenaključno razmnoževanje, pojav prednostnih alelov, ki vplivajo na profil HLA, vendar pa prevelika razsežnost teh dogodkov v zelo kratkem času in v omejeno majhni populaciji pogosto privede do odmika od Hardy-Weinbergovega ravnovesja (HWE), ki predstavlja stanje idealne diploidne Mendlove populacije, v kateri se pogostnosti pojavljanja alelov in genov HLA skozi generacije ne spreminjajo in so zgolj rezultat naključnega kombiniranja gamet. HWE se zato uporablja kot matematični model za testiranje omenjenih evolucijskih vplivov na populacijo (26).

Na profil HLA populacij poleg naravne selekcije, narekovane s patogeni, vplivajo tudi mehanizmi reproduktivne selekcije. V prid reproduktivne selekcije govorijo številne raziskave, ki potrjujejo pomen različnosti v genih HLA pri izbiri ustreznega partnerja za reprodukcijo, s čimer se ohranja heterozigotnost vrste (29).

1.4 Tkivna skladnost in polimorfizem genov HLA v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

V Centru za tipizacijo tkiv (CTT), ki deluje v sklopu Zavoda RS za transfuzijsko medicino (ZTM) in je od leta 2000 dalje akreditiran s strani Evropske federacije za imunogenetiko (EFI), smo s prvimi analizami polimorfizma HLA v slovenski populaciji začeli že leta 1982. Pogostnost pojavljanja posameznih antigenov HLA I. razreda so bile takrat izračunane na podlagi seroloških tipizacij genskih lokusov HLA-A in HLA-B. Za najpogostejši antigen se je izkazal HLA-A2, kar je v skladu z veliko razširjenostjo tega

antigena v vseh svetovnih populacijah (30). Obširnejša analiza se je nadaljevala leta 1992, ko smo na osnovi specifičnih antropoloških kriterijev začeli z zbiranjem novega vzorca slovenske populacije in uvedbo molekularnih metod tipizacije genov, najprej na nizki in nato visoki stopnji ločljivosti. Sodelovanje v projektu populacijske genetike pod okriljem 12. Mednarodne delavnice s področja tkivne skladnosti-IHWS (angl. *International Histocompatibility Workshop*) je pripomoglo k razširitvi molekularnih metod tipizacije tudi na lokuse HLA-A, B, C, DQB1, DQA1, DPA1 in DPB1 ter promotorski regiji genov DQA1 in DQB1 (31). Izследki primerjav genskih pogostnosti pojavljanja genov HLA II. razreda antropološko vzorčene slovenske populacije z drugimi svetovnimi populacijami so pri Slovencih pokazali značilno pogosteje pojavljanje alela HLA-DPB1*04:01 kot v ostalih proučevanih populacijah, hkrati pa so opazili koncentrično padanje pogostnosti pojavljanja tega alela z geografsko oddaljenostjo od področja slovenske populacije (9). Izmenjava reagentov za molekularno tipizacijo genov HLA in delovnih izkušenj med udeleženci mednarodne delavnice je omogočila tipizacijo lokusov HLA-A, B, C z molekularno metodo ARMS (angl. *Amplification of Refractory Mutation System*) ter določitev alelov v populacijah zelo razširjene alelne skupine HLA-A*02 na naključno in v skladu z antropološkimi zahtevami izbranem vzorcu 100 nesorodnih Slovencev. Izračun genskih pogostnosti pojavljanja HLA I. razreda je pokazal največjo pogostnost pojavljanja tipa C*07, ki mu sledita A*02 in B*07, medtem ko so tipe A*34, A*43 in C*14 v antropološko vzorčeni slovenske populaciji opazili le po enkrat. Med 17 aleli HLA-A*02, ki jih je bilo možno določiti z metodo ARMS, se najpogečeje pojavlja alel A*02:01, z znatno manjšo pogostostjo pojavljanja pa smo v vzorcu slovenske populacije določili tudi alela A*02:05 in A*02:06 (9). Statistična analiza je zajela tudi izračune pogostnosti pojavljanja dvolokusnih in trilokusnih haplotipov ter vrednosti jakosti vezavnega neravnovesja med posameznimi geni v najdenih haplotipih. Med dvolokusnimi haplotipi HLA-A-B se najpogečeje pojavi A*03-B*07, sledita mu A*01-B*08 in A*02-B*44. Vsi trije haplotipi so pogosti tudi v drugih evropskih populacijah, in sicer je prvi haplotip najverjetneje vikingškega ali keltskega, drugi germanskega in tretji keltskega izvora (12). Najvišjo frekvenco med haplotipi HLA-A-C ima A*03-C*07 in med haplotipi HLA-B-C, B*07-C*07. Za najpogostejši trilokusni haplotip pri Slovencih se je izkazal A*03-B*07-C*07, sledi mu A*02-B*44-C*05, oba se z visoko pogostostjo pojavljata v zahodnoevropskih populacijah, medtem ko se tretji najpogostejši haplotip A*11-B*35-C*04 z večjo pogostostjo pojavlja pri Indijcih in Pakistancih (9).

Cilj aktivnega sodelovanja slovenske skupine za populacijsko genetiko v antropološki skupini 12. IHWS ni bila le pridobitev in vnos kakovostnih rezultatov analize polimorfizma HLA pri Slovencih v svetovno podatkovno bazo, temveč tudi razjasnitev izvora Slovencev in njihova umestitev med ostale evropske populacije. Slovenija je bila, zaradi svoje specifične geografske lege, že od nekdaj izpostavljena številnim migracijam različnih populacij, ki so na to področje s seboj prinašale novo kulturo, jezik in običaje, kar je najverjetnejši razlog obstoja številnih mnenj o morebitnem izvoru Slovencev. Deljena mnenja glede izvora Slovencev so bila povod za analizo polimorfizma HLA v slovenski populaciji in izračun genetskih razdalj med slovensko populacijo ter geografsko, zgodovinsko in lingvistično sorodnimi populacijami, ki bi lahko razkrile izvor Slovencev. Najkrajša genetska razdalja glede na gene HLA je bila izračunana med slovensko in nemško populacijo. Majhne genetske razdalje so bile izračunane tudi med slovensko in ostalimi populacijami zahodne in srednje Evrope (italijanska, angleška, avstrijska, češka), medtem ko so bile genetske razdalje s slovaško, ukrainško in uralsko populacijo mnogo večje. Rezultati nakazujejo na visoko stopnjo genetske sorodnosti med slovensko in nemško populacijo ter vpliv migracij Germanov na ozemlje Slovenije ter verjetnejši izvor Slovencev s področja, ki ga danes zavzemajo Češka in Nemčija kot pa z ozemlja današnje Ukrajine (9). Center za tipizacijo tkiv od leta 2009 sodeluje pri projektu na področju biomedicine BM0803-HLA-NET: Evropska mreža raznolikosti HLA za tkivno skladnost, ki ga v okviru evropske medvladne sheme za sodelovanje v znanosti in tehnologiji-COST (angl. *European Cooperation in Science and Technology*), vodi prof. Alicia Sanchez-Mazas iz Antropološke enote Oddelka za genetiko in evolucijo, Univerze v Ženevi. Prof. Alicia Sanchez-Mazas predseduje upravnemu odboru, ki ga sestavlja skupina strokovnjakov s področja imunogenetike, bioinformatike in antropologije HLA. Namen sodelovanja strokovnjakov in laboratorijev pri projektu HLA-NET je učinkovita izmenjava visoko kakovostnih podatkov o polimorfizmu HLA v populacijah in nacionalnih registrih krvotvornih matičnih celic, sprejetje konsenza v procesih vzorčenja, tipizacije genov HLA, klinične interpretacije, statistične obdelave in objave podatkov ter etičnosti v posameznih delovnih procesih (32, 33).

V projekt HLA-NET je bilo vključenih 21 laboratorijev držav članic in nečlanic Evropske Unije (EU), katerih cilj je bil opredelitev polimorfizma genov HLA na visoki stopnji ločljivosti v matični populaciji in/ali nacionalnih registrih darovalcev krvotvornih matičnih celic, primerjava z drugimi sodelujočimi populacijami in/ali registri ter implementacija

pridobljenih ugotovitev na tista področja javnega zdravstva, kjer je polimorfizem sistema HLA bistvenega pomena (32). Izredno veliko število podatkov zahteva kompleksno in natančno statistično analizo, v ta namen so bioinformatiki projekta HLA-NET razvili računalniški program GENE[RATE], le-ta omogoča obdelavo dvoumnih rezultatov, ki se pogosto pojavljajo pri tipizacijah genov HLA na visoki stopnji ločljivosti (34, 35).

Napredek in dosežki projekta HLA-NET so bili predstavljeni v okviru antropološke komponente 16. Mednarodne HLA in imunogenetske delavnice-IHIWS (angl. *International HLA and Immunogenetics Workshop*) v Angliji -Liverpool maj/junij 2012.

Končni rezultati analize polimorfizma genov HLA v okviru projekta HLA-NET obetajo največjo korist na področjih transplantacijske medicine, epidemiologije in humane molekularne evolucije (32, 36).

1.5 Vloga in pomen polimorfizma genov HLA pri presaditvi krvotvornih matičnih celic

Presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC) je danes uveljavljen način zdravljenja številnih bolezni krvotvornih organov, predvsem različnih vrst levkemij. Uspeh alogenične presaditve KMC je odvisen tudi od stopnje tkivne skladnosti med bolnikom in darovalcem KMC. Ujemanje v genih HLA bolnika in darovalca KMC oziroma njuna tkivna skladnost v veliki meri zmanjšuje pojav zapletov po presaditvi in izboljšujejo preživetje presadka. Večje kot je ujemanje v genih HLA, boljši bo izid presaditve. Darovalec KMC je lahko v genih HLA skladen sorodnik bolnika, največkrat so to njegovi najožji sorodniki (sestre ali bratje). Pogosto bolniku znotraj družine ne uspemo najti primerenega darovalca, takrat se aktivira proces iskanja v genih HLA skladnega darovalca v registrih prostovoljnih nesorodnih darovalcev KMC (NDKMC). V Sloveniji v sklopu Centra za tipizacijo tkiv deluje register prostovoljnih NDKMC – nacionalni register Slovenija-Donor, ustanovljen leta 1991 (37, 38, 39). V nacionalni register Slovenija-Donor je bilo do marca 2013 vpisanih 16.662 NDKMC, starih od 18-55 let. Nacionalni register Slovenija-Donor je od leta 1992 polnopravni član svetovnega registra prostovoljnih NDKMC (angl. *Bone Marrow Donors Worldwide-BMDW*), ki vključuje darovalce mednarodnih registrov in trenutno šteje več kot 21 miljonov NDKMC, od tega 15.531 slovenskih prostovoljnih NDKMC z znanim tipom HLA (40, 41). Največjo učinkovitost alogenične nesorodne presaditve KMC so opazili pri bolnikih, ki so se z NDKMC ujemali v 10 od 10 možnih

alelov HLA-A, B, C, DRB1 in DQB1, zato je za zagotavljanje primerne stopnje ujemanja potrebno izvesti tipizacije genov HLA na visoki stopnji ločljivosti (40, 42). Zaradi izjemnega alelnega polimorfizma genov HLA in številčnosti možnih alelnih kombinacij je verjetnost, da bomo našli v ključnih genih HLA popolnoma skladnega NDKMC, majhna. Ker ima vsaka populacija zanjo značilen alelni polimorfizem genov HLA, se verjetnost pridobitve ustreznega NDKMC še dodatno zmanjšuje z zmanjševanjem velikosti registra NDKMC ter v primerih zelo heterogenih populacij oz. kadar je bolnik pripadnik specifične populacije, rase ali etnične skupine s svojevrstnim profilom HLA. Oviro pri pridobitvi ustreznega NDKMC predstavljajo tudi redki aleli in nenavadne oz. nepričakovane haplotipske povezave genov HLA. Alel HLA se opredeli kot redek, če je bil v svetovnem merilu in pri nesorodnih posameznikih opažen največ trikrat ter je bilo njegovo nukleotidno zaporedje potrjeno z ustrezno metodo tipizacije (43, 44). Z razvojem metod in strategij za tipizacijo genov HLA ter možnostjo tipiziranja zelo velikega števila posameznikov predvsem iz registrov NDKMC, so lahko odkrili veliko število dotej neznanih alelov HLA (novih alelov HLA), nekateri aleli pa so se izkazali za manj redke, kot so sprva pričakovali. Primera slednjih sta tudi alela B*44:27 in DRB1*14:54. Omenjena alela se od domnevno pogostejših različic B*44:02:01 in DRB1*14:01:01 ne razlikujeta v funkcionalnih in s tem klinično pomembnih eksonih ter se pojavljata kot dvoumen rezultat sekvenciranja, ki v skladu s trenutno veljavnimi smernicami ne zahteva razreševanja z dodatnimi tipizacijami, zato se lahko uporabi zapis B*44:02:01G in DRB1*14:01:01G, kjer oznako G označuje alelno skupino, znotraj katere so aleli, ki se med seboj ne razlikujejo v funkcionalno pomembnem eksonu/ih (45). Sekvenciranje dodatnih eksonov in doslednejše razreševanje dvoumnih rezultatov sekvenciranja je pokazalo, da v številnih populacijah pogostnost pojavljanja alelov B*44:27 in DRB1*14:54 ni zanemarljiva oz. je v primeru DRB1*14:54 primerljiva ali celo večja od DRB1*14:01:01 ter v primeru B*44:27 večja od pričakovane (46, 47, 48). Kljub temu, da ostaja klinični pomen nefunkcionalnih razlik med aleli neznan, je poznavanje pogostnosti pojavljanja in porazdelitve alelov HLA ter njihovih haplotipskih povezav v določeni populaciji, kot tudi registrnih prostovoljnih NDKMC, pomemben dejavnik pri optimizaciji načrtovanja dela registra, predvsem v smislu večanja števila NDKMC in pomena množične tipizacije genov HLA NDKMC na visoki stopnji ločljivosti ter večanju učinkovitosti iskanja in napovedovanja verjetnosti pridobitve tkivno čimborj skladnega NDKMC v registru z omejenim številom NDKMC in profilom genov HLA (49).

2. NAMEN DELA

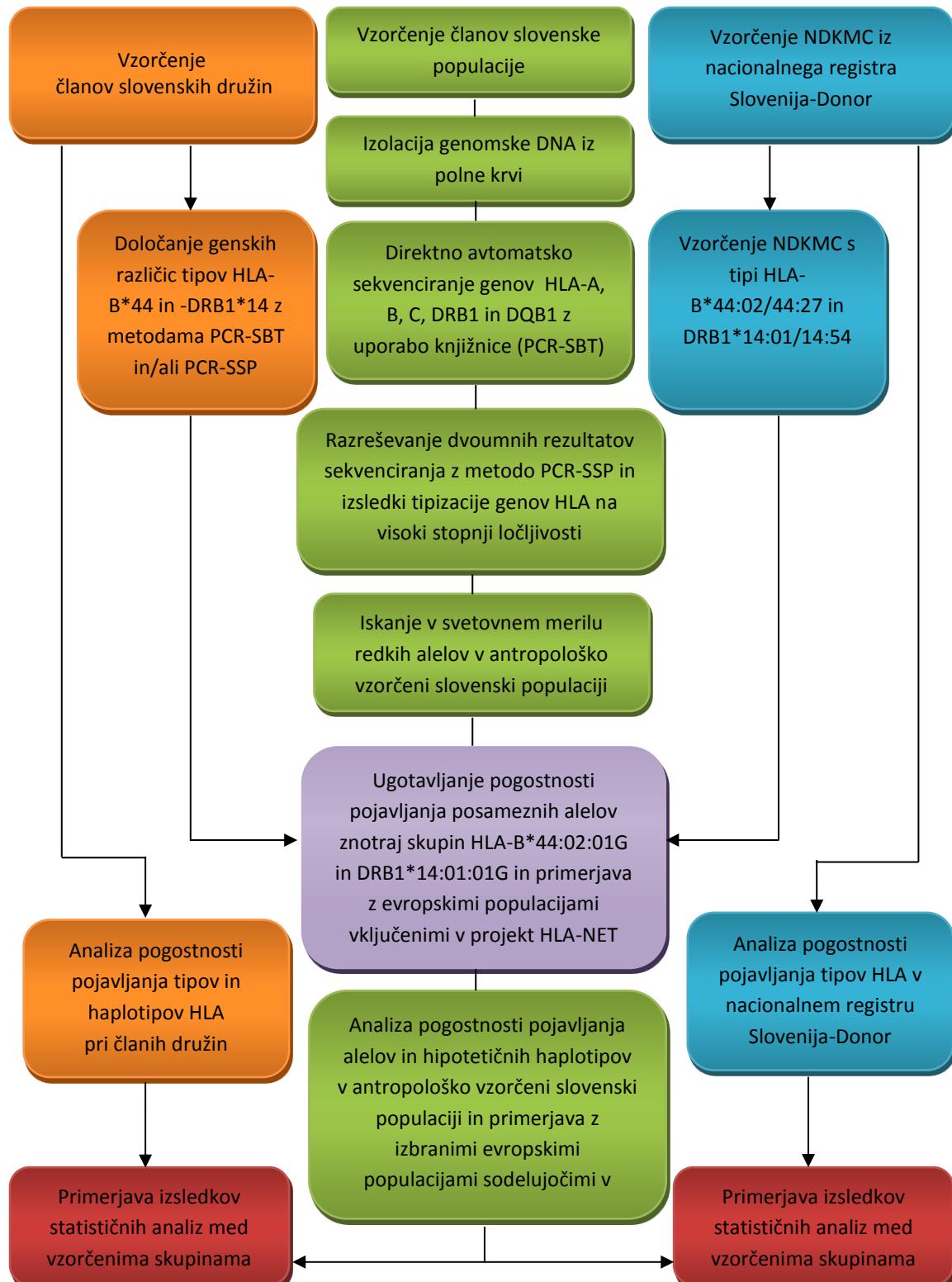
Poznavanje alelnega polimorfizma genov HLA v določeni populaciji je pomembno in uporabno genetsko orodje tako v antropoloških študijah, transplantacijski medicini kot tudi študijah bolezni, ki so v močni povezavi z geni HLA. Na področju histokompatibilnosti in presaditve tkiv, organov ter krvotvornih matičnih celic nam vpogled v alelni polimorfizem genov HLA v matični populaciji olajša načrtovanje in iskanje, na nivoju genov HLA, primernega darovalca. Razvoj molekularnih metod, kot sta PCR-SBT in PCR-SSP, in sodelovanje pri projektu HLA-NET, sta nam omogočila analizo in opredelitev stopnje alelnega polimorfizma genov HLA v antropološko vzorčeni slovenski populaciji.

Namen tega dela je:

1. S pomočjo klasične Sangerjeve metode sekvenciranja (PCR-SBT) in njene kombinacije z metodo PCR-SSP določiti polimorfizem genov HLA-A, -B, -C, -DRB1 in -DQB1 v antropološko vzorčeni slovenski populaciji na ravni alelnih skupin G.
2. Prikaz pogostnosti pojavljanja posameznih alelov in haplotipskih povezav HLA ter opredelitev na svetovni ravni redkih alelov HLA v antropološko vzorčeni slovenski populaciji.
3. Oceniti genetske razdalje med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in izbranimi evropskimi populacijami vključenimi v projekt HLA-NET ter antropološko vzorčeno slovensko populacijo, v pogostnostih pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1, primerjati z nacionalnim registrom Slovenija- Donor in vzorcem članov slovenskih družin, katerih tip HLA je bil določen v namen iskanja sorodnega darovalca krvotvornih matičnih celic znotraj družine.
4. Ugotovljanje relativnih deležev posameznih alelov znotraj alelnih skupin HLA-B*44:02:01G in HLA-DRB1*14:01:01G ter primerjava z drugimi evropskimi populacijami vključenimi v projekt HLA-NET.

3. METODE IN MATERIALI

3.1 Shema poteka dela



Slika 6: Shematski prikaz posameznih korakov dela

3.2 Preiskovanci in vzorčenje

3.2.1 Antropološko vzorčena slovenska populacija

Vzorčenje slovenske populacije je potekalo na Centru za tipizacijo tkiv (ZTM) vse od leta 1992 dalje. Od preiskovancev smo pridobili soglasje k sodelovanju v populacijski študiji in se ob tem zavezali k upoštevanju določil Oviedske konvencije in njenih dodatnih protokolov. Soglasje k analizi genskih lokusov HLA v raziskovalne namene je podala tudi Komisija za medicinsko etiko (Ministrstvo RS za zdravje). Preiskovanci so se v vprašalniku za sodelovanje v populacijski študiji izrekli za Slovence. Prav tako so kot slovensko opredelili tudi poreklo in narodnost svojih staršev in starih staršev (Slika 7).

 <p>Center za tipizacijo tkiv Center je od 1. 2000 akreditiran pri Evropski federaciji za imunogenetiko Zavod RS za transfuzijsko medicino Štajnerjeva 6, SI - 1000 Ljubljana, Slovenija Tel: +386-1-2302313; Preko ZTM: +386-1-54382 Fax: +386-1-4312304, +386-1-4327018</p>
<p>Spoštovani!</p> <p>V Centru za tipizacijo tkiv od 1.1982 preiskujemo pogostnost pojavljanja antigenov in genov glavnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) pri Slovencih. Kontinuirane populacijske študije vzporedno z naraščajočim znanjem o genih MHC širijo poznavanje značilnosti slovenske populacije. Z njimi podpiramo svojo rutinsko dejavnost, ki obsega testiranje tkivne skladnosti pred presaditvami organov in tkiv, s končnim ciljem bolniku najiti glede na tkivno skladnost čim bolj ustreznega darovalca. Leta 1998 je Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravstvo RS ocenila, da so naše populacijske študije etično neoporečne. Pri tem smo se zavezali, da bomo primoč varovali koristi in varnost darovalcev vzorcev, da bomo skrbno varovali osebne podatke in spoštovali načelo zavestne in svobodne privolitve. Pri svojem delu se ravnamo po določilih Oviedske konvencije in dodatnih protokolov tej.</p> <p>Upoštevajoč te obveznosti Vas prosimo, da izpolnite naslednji vprašalnik:</p>
<p>VPRASALNIK ZA OSEBE, KI SO PRIPRAVLJENE SODELOVATI V POPULACIJSKI ŠTUDIJI</p> <p>1. IME IN PRIIMEK: _____ EMŠO: _____ IME POPULACIJE: _____ SPOL: M Ž ROJSTNI DATUM: _____ ROJSTNI KRAJ: _____ REGIJA: _____ DRŽAVA: _____</p> <p>2. NASLOV STALNEGA BIVALIŠČA: _____</p> <p>3. STARŠI: ROJSTNI DATUM OČETA: _____ ROJSTNI DATUM MATERE: _____ ROJSTNI KRAJ OČETA: _____ ROJSTNI KRAJ MATERE: _____</p>

Nadaljevanje Slike 7.:

**Center za tipizacijo tkiv**
Center je od leta 2000 akreditiran pri Evropski federaciji za imunogenetiko
Zavod RS za transfuzijsko medicino
Šlajmerjeva 6, SI - 1000 Ljubljana, Slovenija
Tel: +386-1-2302313; Preko ZTM: +386-1-54382
Fax: +386-1-4312304, +386-1-4327018

4. STARI STARŠI:
ROJSTNI KRAJI MATERINIH STARŠEV: _____
ROJSTNI KRAJI OČETOVIH STARŠEV: _____

5. JEZIK (ki ga govorijo doma):
OSEBA: _____
STARŠI: _____
STARI STARŠI PO OCETU: _____
STARI STARŠI PO MATERI: _____

6. ETNIČNA SKUPINA:
OSEBA: _____
STARŠI: _____
STARI STARŠI PO OCETU: _____
STARI STARŠI PO MATERI: _____

7. RELIGIJA (neobvezno): tradicionalna religija družine

Datum: _____ Podpis: _____

Za sodelovanje se Vam najlepše zahvaljujemo v svojem imenu in v imenu bolnikov, ki čakajo na presaditev organov in tkiv.

*Za Center za tipizacijo tkiv:
Dr. Blanka Vidan-Jeras, mag.farm.,spec
Vodja odseka za tipizacijo HLA in drugih dejavnikov v tkivne skladnosti*

Slika 7.: Vprašalnik za osebe pripravljene sodelovati v populacijski študiji

Antropološko definiran vzorec slovenske populacije je leta 2012 štel 143 naključno izbranih nesorodnih preiskovancev. Preiskovancem smo odvzeli vzorec polne krvi za izolacijo genomske DNA in tipizacijo lokusov HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 z metodama PCR-SBT in PCR-SSP. Vzorce polne krvi za izolacijo DNA smo zbirali od leta 1992 dalje. Tipizacije z metodama PCR-SBT in PCR-SSP so bile izvedene med leti 2009 in 2011. Z rezultati določitve alelnega polimorfizma omenjenih genov HLA smo sodelovali pri projektu na področju biomedicine BM0803-HLA-NET.

3.2.2 Člani slovenskih družin

V vzorec članov slovenskih družin smo vključili bolnike in/ali njihove družinske člane, katerih tipe HLA-A, -B in -DRB1 na nizki stopnji ločljivosti ter haplotipe HLA smo določili v okviru rutinskega dela na Centru za tipizacijo tkiv za namen iskanja darovalca KMC znotraj družine, in sicer v obdobju od začetka leta 1998 do vključno decembra 2012. Haplotipe vzorčenih preiskovancev smo potrdili in jasno opredelili z družinsko analizo. Znotraj posamezne družine smo vzorčili le tiste preiskovance, ki so se med seboj razlikovali v podedovanih haplotipih HLA. V študijo smo vključili 765 preiskovancev iz 485 družin. Pri vzorčenju in analizi smo upoštevali načelo anonimnosti in varovanja osebnih podatkov.

3.2.3 Nacionalni register Slovenija-Donor

V vzorec smo vključili tipe HLA 14.040 naključno izbranih posameznikov, ki so od leta 1992 do oktobra 2012 postali člani nacionalnega registra prostovoljnih nesorodnih darovalcev KMC Slovenija-Donor. Njihovi tipi HLA-A, -B in -DRB1 so bili v CTT določeni na nizki stopnji ločljivosti z metodama PCR-SSP in obratnim PCR-SSO. Pri vzorčenju in analizi smo upoštevali načelo anonimnosti in varovanja osebnih podatkov.

3.2.4 Vzorec posameznikov s tipom HLA-B*44 in/ali -DRB1*14

V vzorec smo vključili člane antropološko vzorčene slovenske populacije, člane slovenskih družin in nacionalnega registra Slovenija-Donor s tipom HLA-B*44 in/ali -DRB1*14.

Tip HLA-B*44 in -DRB1*14 članov antropološko vzorčene slovenske populacije smo določili na visoki stopnji ločljivosti s kombinacijo metod PCR-SBT in PCR-SSP.

Članom slovenskih družin s tipom HLA na nizki stopnji ločljivosti smo z metodo PCR-SBT in/ali PCR-SSP določili genske različice tipa HLA- B*44 in/ali -DRB1*14.

Prostovoljnim NDKMC, vključenim v vzorec, smo tip HLA- B*44 in/ali -DRB1*14 določili z metodo PCR-SSP visoke stopnje ločljivosti za namene rutinskega dela v CTT. Pri vzorčenju in analizi smo upoštevali načelo anonimnosti in varovanja osebnih podatkov.

3.3. Izolacija DNA z aparatom GenoM-6

Princip:

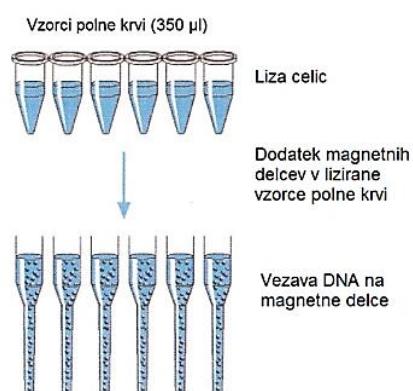
Aparat GenoM-6 je namenjen avtomatski izolaciji (1-6) vzorcev genomske DNA iz 350 µl polne krvi. Izolacija poteka v zaprtem sistemu in temelji na tehnologiji magnetnih delcev ter uporabi komercialno pripravljenih kartuš, ki vsebujejo ustrezone volumne reagentov v predpisanim zaporedju.

Materiali:

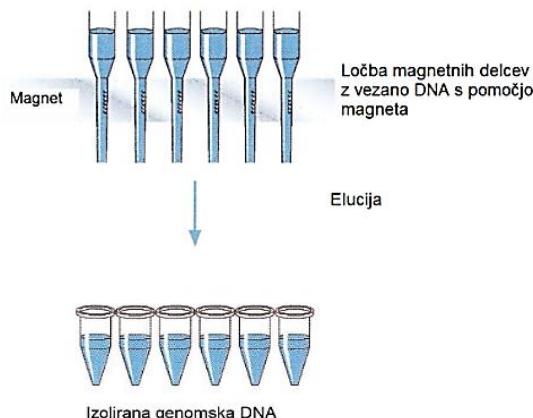
- aparat GenoM-6 (Qiagen)
- komplet reagentov za izolacijo GenoPrep 350 B (Qiagen)
- pipete in sterilni nastavki
- centrifuga

Postopek:

V prisotnosti raztopine kaotropnih soli pride do lize celic v polni krvi in vezave sproščene DNA na silikatno površino magnetnih delcev. V aparatu vgrajeni močni magneti omogočijo ločbo magnetnih delcev z vezano DNA od lizata, čemur sledi spiranje s puferom za odstranjevanje proteinskih nečistot in nato elucija DNA v pufer (Slika 8). Pred merjenjem koncentracije DNA je potrebno epruveto z eluirano DNA centrifugirati, da se magnetni delci vsedejo na dno, saj le-ti motijo pravilno določitev koncentracije DNA.



Nadaljevanje Slike 8.:



Slika 8: Shematski prikaz izolacije genomske DNA z aparatom GenoM-6.

(prirejeno po literaturi 50)

3.4 Določitev koncentracije in čistosti izolirane DNA

Princip:

Kvalitetna DNA primerne koncentracije in čistosti je pogoj za uspešno tipizacijo genov HLA. Koncentracijo in čistost izolirane DNA določimo s pomočjo spektrofotometra tako, da merimo absorbcojo svetlobe v določenem področju UV spektra. Nukleinske kisline imajo maksimum absorbcoje pri 260 nm, proteini, ki ostanejo prisotni kot nečistoče po končani izolaciji DNA, pa pri 280 nm. Iz razmerja absorbanc pri 260 nm in 280 nm lahko sklepamo na onesnaženost izolirane DNA s proteinimi. Zaželjeno je razmerje (R) med 1,6 in 1,9. Koncentracijo dvoverižne DNA (dvDNA) izračunamo iz enačbe, ki opisuje Beer-Lambertov zakon. Ta pravi, da je delež absorbirane svetlobe linearna funkcija koncentracije in dolžine poti svetlobnega žarka skozi raztopino (Enačba 1).

Enačba 1:

Beer-Lambertov zakon

$$A = e \times c \times l$$

e= molarni ekstinkcijski koeficinet ($\mu\text{l}/\text{ng}$); $e(\text{dvDNA})=0,020 \mu\text{l}/\text{ng}$

c= koncentracija raztopine DNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$)

l= dolžina žarka skozi raztopino oz. dolžina kivete (cm)

A= absorbanca vzorca

Po dogovoru velja, da je koncentracija enaka $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$, če je absorbanca dvDNA pri 260 nm enaka 1,0. Program spektrofotometra z vrednostjo $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ in vnešenim faktorjem redčitve pomnoži izmerjeno absorbenco nukleinskih kislin ter izračuna koncentracijo dvDNA kot je to prikazano v Enačbi 2.

Enačba 2:

$$\text{konzentracija dvDNA} = A(260 \text{ nm}) \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{faktor redčitve}$$

Material:

- UV spektrofotometer
- centrifuga
- pipete in sterilni nastavki
- deionizirana voda (dH_2O)

Postopek:

V kiveto smo do oznake dodali dH_2O in umerili spektrofotometer na ničelno točko. Izolirano DNA smo za kratek čas centrifugirali, da so se magnetni delci vsedli na dno in jo $10 \times$ redčili z dH_2O ($10 \mu\text{l} \text{ dH}_2\text{O} + 90 \mu\text{l}$ izolirane DNA) ter prenesli v čisto in suho kiveto in postavili v spektrofotometer. Odčitali smo absorbanci pri 260 nm in 280 nm, razmerje med absorbancama (R) ter koncentracijo izolirane dvDNA.

3.5 Priprava 2% agaroznega gela za elektroforezo

Princip:

Z elektroforezo na agaroznem gelu smo ločevali negativno nabite produkte PCR (fragmente DNA) v električnem polju. Pri konstantnih pogojih dela (ustrezen pufer, koncentracija agaroze in jakost električnega polja) je hitrost potovanja produktov PCR odvisna od njihove dolžine. Dolžina produkta PCR je prenosorazmerna njegovi molekulski masi ter je enaka vsoti dolžin obih začetnih oligonukleotidov in dolžine pomnoženega tarčnega odseka DNA. Nižja kot je molekulska masa produkta PCR hitreje bo potoval skozi agarozni gel.

Materiali:

- tehnicka
- agarozna
- pufer 10XTBE in 0,5XTBE
- deionizirana voda (dH_2O)

- mikrovalovna pečica
- nosilec za gel in glavnički za pripravo žepkov v gelu
- fluorescenčno barvilo GelRed ali etidijevbromid (Olerup)

Postopek:

Za pripravo 2% agaroznega gela smo v časo zatehtali 6,4 g agaroze, dodali 16 ml pufra 10XTBE in 304 ml dH₂O ter mešanico segreli v mikrovalovni pečici (7 minut, P = 600W). Ko se je raztopina ohladila na približno 50-60 °C, smo dodali dve kapljici fluorescenčnega barvila GelRed ali eno kapljico barvila etidijev bromid, dobro premešali ter zmes vlili v nosilec za gel z vpetimi glavnički in počakali, da se gel strdi. Tako pripravljen gel smo prenesli v kadičko za elektroforezo s pufrom 0,5XTBE, ki smo ga predhodno pripravili z redčenjem pufra 10XTBE z dH₂O.

3.6 Tipizacija genov HLA z metodo PCR-SBT

Princip:

Osnovni princip je opisan v podoglavlju uvoda (1.2.2)

Sekvencirali smo polimorfne eksone, in sicer drugi, tretji in četrti ekson genov HLA-A, B, C, drugi ekson gena HLA-DRB1 ter drugi in tretji ekson gena HLA-DQB1. Eksone sekvenciramo v obeh smereh (angl. *F-forward in R-reverse*) po protokolu proizvajalca kompletov reagentov za sekvenciranje genov HLA .

Material:

- izolirana genomska DNA znane koncentracije
- epruvetke za PCR
- nosilec in vpenjalec za epruvetke za PCR
- pipete in sterilni nastavki
- aparat za PCR
- nanašalni pufer (Thermoscientific)
- označevalec velikosti produktov PCR (Thermoscientific, dolžine: 50, 200, 400, 850, 1500 bp)
- kadička za elektroforezo
- usmernik električnega toka
- 2% agarozni gel
- mikrotiterska ploščica
- mikrotiterska ploščica (96 vdolbinic) za izvedbo sekvenčne reakcije in pokrovčki

- absolutni etanol
- sterilizirana deionizirana voda (dH₂O)
- stresalnik
- centrifuga za mikrotiterske ploščice (96 vdolbinic)
- gumijast pokrov odporen na visoke temperature za mikrotitersko ploščico (96 vdolbinic)
- Hi-Di formamid (Applied Biosystems)
- 10 X pufer z EDTA (Applied Biosystems)
- polimer POP-7 (Applied Biosystems)
- avtomatski fluorescenčni sekvenator ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- plastični nosilec in pokrov za mikrotitersko ploščico (96 vdolbinic)
- računalniški program za analizo nukleotidne sekvence Sequence Analyzer
- računalniški program za analizo alelov HLA -Assign-SBT (Conexio Genomics)
- knjižnica alelov HLA-IMGT/HLA tekoča verzija prenešena v program Assign-SBT s spletni strani proizvajalca Conexio Genomics
- komplet reagentov za sekvenciranje AlleleSEQR HLA-A (Celera)
- komplet reagentov za sekvenciranje AlleleSEQR HLA-B (Celera)
- komplet reagentov za sekvenciranje AlleleSEQR HLA-C plus (Celera)
- komplet reagentov za sekvenciranje AlleleSEQR HLA-DRB1 (Celera)
- komplet reagentov za sekvenciranje AlleleSEQR HLA-DQB1 (Celera)

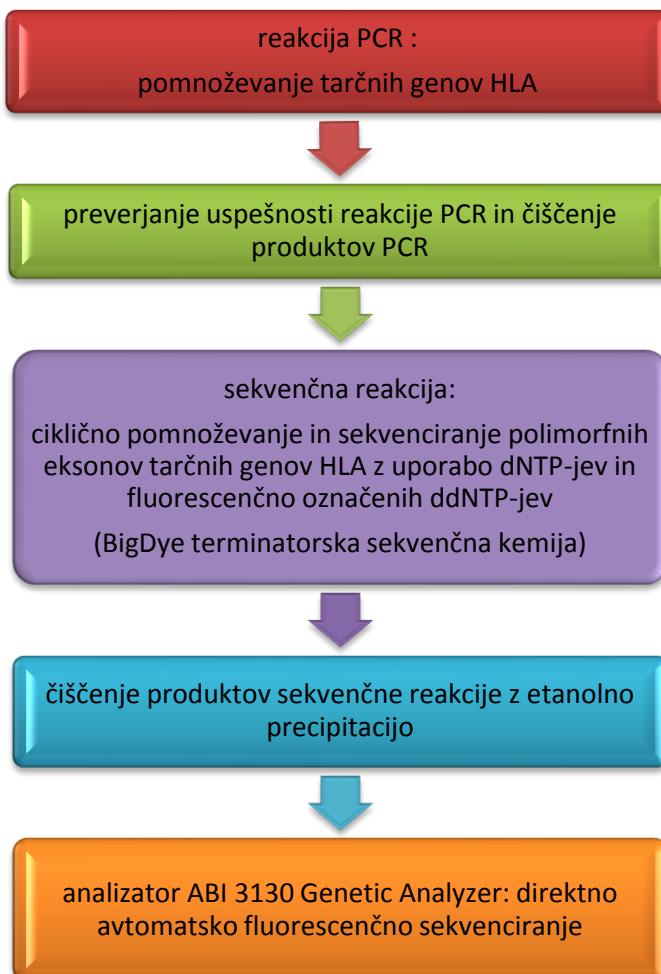
Vsebina kompleta reagentov za sekvenciranje genov HLA je prikazana v Preglednici II.

Preglednica II: Vsebina kompletov reagentov za sekvenciranje genov HLA

Splošni reagenti:	- AmpliTaq Gold DNA polimeraza - reagent za čiščenje produktov PCR (ExoSap) - kontrolna DNA (20 µg/mL) - pufer NaOAc/EDTA
Za gen specifična mešanica za PCR:	- za gen specifični začetni oligonukleotidi - dNTP-ji - MgCl ₂ v pufru TRIS
Za ekson specifična mešanica za sekvenciranje:	- BigDye Terminator sekvenčna mešanica z ekson specifičnimi začetnimi oligonukleotidi

Postopek:

Posamezne korake sekvenciranja genov HLA prikazuje Slika 9.



Slika 9 : Shematski prikaz korakov procesa sekvenciranja tarčnih genov HLA

Pri določanju tipa HLA z metodo PCR-SBT smo izbrali strategijo zaporednega sekvenciranja genov HLA, tako smo posameznikom vključenim v vzorec slovenske populacije najprej sekvencirali gen HLA-A in nato enega za drugim še ostale gene HLA.

Pomnoževanje tarčnih genov HLA z reakcijo PCR:

Navodila, ki sledijo, so napisana za pomnoževanje genov HLA I. in II. razreda v enem vzorcu genomske DNA.

A. Pomnoževanje genov HLA I. razreda

V nosilec smo vpeli eno epruvetko za PCR za pomnoževanje gena HLA I. razreda (HLA-A, B ali C) in eno epruvetko za negativno kontrolo ter dodali 16 µl ustrezne mešanice PCR (glede na gen, ki smo ga želeli pomnožiti), 4 µl preiskovane genomske DNA (priporočene koncentracije so od 40-80 ng/µl) ter 0,3 µl AmpliTaqGold DNA polimeraze.

V epruvetko za negativno kontrolo smo dodali enake količine vseh zgoraj omenjenih reagentov, le da smo namesto genomske DNA dodali sterilizirano dH₂O.

B. Pomnoževanje genov HLA II. razreda

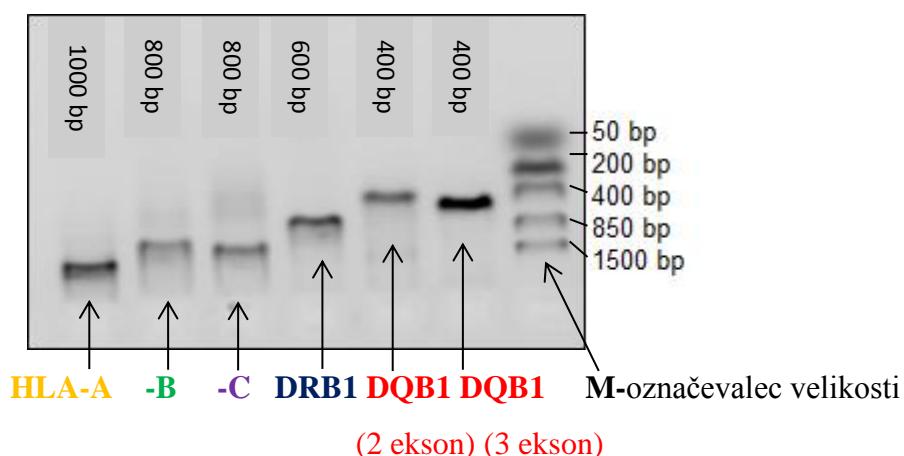
Za pomnoževanje genov HLA II. razreda smo v nosilec vpeli eno epruvetko za pomnoževanje gena HLA-DRB1 ter v primeru pomnoževanja gena HLA-DQB1 dve epruvetki za PCR. V epruvetko namenjeno pomnoževanju gena HLA-DRB1 smo dodali 8 µl ustrezne mešanice PCR, 2 µl preiskovane genomske DNA (priporočene koncentracije so od 40-80 ng/µl) in 0,1 µl AmpliTaqGold polimeraze. Postopek pomnoževanja gena HLA-DQB1 je enak, le da drugi in tretji ekson gena pomnožujemo ločeno v dveh epruvetah za PCR. Po končanem pipetiranju smo epruvetke za kratek čas centrifugirali, postavili v aparat za PCR in vključili ustrezen temperaturni program prikazan v Preglednici III.

Preglednica III: Temperaturni program, ki smo ga uporabili za pomnoževanje tarčnih genov HLA z metodo PCR

Število ciklov	Temperatura (°C)	Čas (min)
1	95.0	10:00
36	96.0	00:20
	60.0	00:30
	72.0	3:00
1	4.0	∞

Preverjanje uspešnosti pomnoževanja in čiščenje produktov PCR :

V mikrotitersko ploščico smo napipetirali 3 µl nanašalnega pufra, dodali 3 µl produkta PCR iz epruvetke in zmes prenesli v žepke 2% agaroznega gela. Elektroforeza je potekala 15 minut pri 184 V. Pod UV lučjo transiluminatorja smo preverili prisotnost, kvaliteto in dolžino produkta PCR ter gel fotografirali. Pomnoževanje je bilo uspešno, če je bila na gelu jasno vidna lisa produkta PCR ustrezne dolžine, kot je to prikazano na Sliki 10. Pri negativni kontroli mora biti lisa za produkt PCR odsotna.



Slika 10: Na agaroznem gelu osvetljenem z UV lučjo vidni produkti PCR pomnoženih genov HLA

Produkte PCR smo čistili tako, da smo dodali 3 µl reagenta ExoSap, s katerim smo odstranili prebitek začetnih oligonukleotidov in nevgrajene dNTP-je. Na kratko smo centrifugirali, da so se komponente med seboj dobro premešale in postavili v aparat za PCR in vključili ustrezni temperaturni program prikazan v Preglednici IV.

Preglednica IV: Temperaturni program, ki smo ga uporabili za čiščenje produktov PCR

Število ciklov	Temperatura (°C)	Čas (min)
1	37.0	30:00
1	80.0	15:00
	4.0	∞

Sekvenčna reakcija:

V prostoru PRE-PCR smo razdelili po 8 µl za ekson specifičnih sekvenčnih mešanic (glede na sekvencirani gen HLA) v mikrotitersko ploščico z 96 vdolbinicami in v vsako vdolbinico dodali po 2 µl z ExoSap očiščenega produkta PCR ter vdolbinice zaprli s plastičnimi pokrovčki. V Preglednici V. je prikazan primer načrta raztakanja sekvenčnih mešanic v mikrotitersko ploščico za različne gene HLA.

Preglednica V: Načrt raztakanja za ekson specifičnih sekvenčnih mešanic v mikrotitersko ploščico

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A_2F	B_2F	C_2F	DRB1_2F								
B	A_2R	B_2R	C_2R	DRB1_2R								
C	A_3F	B_3F	C_3F	DRB1_R86								
D	A_3R	B_3R	C_3R	DQB1_2F								
E	A_4F	B_4F	C_4F	DQB1_2R								
F	A_4R	B_4R	C_4R	DQB1_3F								
G				DQB1_3R								
H												

Mikrotitersko ploščico smo za kratek čas centrifugirali, postavili v aparat za PCR ter vključili temperaturni program prikazan v Preglednici VI.

Preglednica VI: Temperaturni program, ki smo ga uporabili za sekvenčno reakcijo

Število ciklov	Temperatura (°C)	Čas (min)
25	96.0	00:20
	50.0	00:30
	60.0	2:00
1	4.0	∞

Etanolna precipitacija produktov PCR in priprava za elektroforezo na sekvenatorju ABI 3130

V vdolbinice mikrotiterske ploščice, kjer je potekala sekvenčna reakcija, smo dodali 2 µl pufra NaOAc/EDTA, centrifugirali 5 s pri 500 x g in nato dodali se 25 µl absolutnega etanola. Mikrotitersko ploščico smo močno in skrbno stresali na stresalniku ter

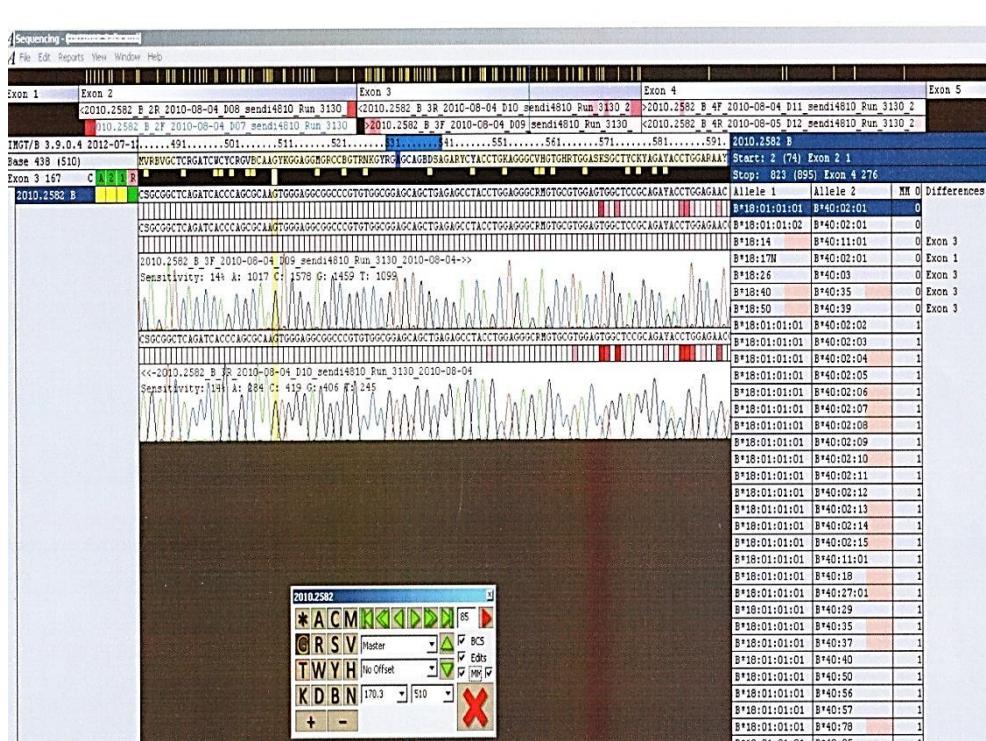
centrifugirali 30 minut pri 200 x g. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant tako, da smo mikrotitersko ploščico obrnili na papirnato brisačko in centrifugirali 10 s pri 50-100 x g. Sledil je dodatek 50 µl 80% etanola, ki smo ga predhodno pripravili z ustreznim redčenjem absolutnega etanola z dH₂O ter nato centrifugiranje 5 minut pri 2000 x g. Supernatant smo odstranili z obračanjem mikrotiterske ploščice na papirnato brisačko in centrifugiranjem 10 s pri 50-100 x g. Tako pripravljeno ploščico smo pokrili z gumijastim pokrovom odpornim na visoke temperature. Če s postopkom sekvenciranja nismo nadaljevali še isti dan, smo ploščico shranili na -20°C za največ 2 dni. V nasprotnem primeru smo nadaljevali s postopkom priprave vzorca za kapilarno elektroforezo na sekvenatorju.

Priprava vzorca za kapilarno elektroforezo na sekvenatorju

V vdolbinice smo dodali 15 µl Hi-Di formamida, za kratek čas centrifugirali in 2 minuti toplotno denaturirali v aparatu za PCR pri temperaturi 95°C. Mikrotitersko ploščico smo vpeli v poseben nosilec in postavili v sekvenator ABI 3130. Kapilarna elektroforeza produktov sekvenčne reakcije poteka na polimeru POP-7.

Interpretacija rezultatov sekvenciranja

Sekvenčne podatke smo analizirali z računalniškim programom Sequence Analyzer, ki rezultate sekvenciranja poda v obliki elektroferograma. Sekvence smo nato prenesli v računalniški program Assign-SBT, ki posameznemu vrhu elektroferograma dodeli ustrezeno nukleotidno bazo in dobljena nukleotidna zaporedja (sekvence) primerja z vsemi znanimi sekvencami alelov HLA v podatkovni bazi (knjižnici alelov HLA) ter poda rezultat v obliki možnih kombinacij alelov HLA. Knjižnico alelov HLA smo redno posodabljali preko spletne strani proizvajalca računalniškega programa. Ponujeni rezultat smo vedno preverili tako, da smo pregledali vse pozicije v sekvenci, ki bi lahko vplivale na končni rezultat. Primer računalniške obdelave sekvence gena HLA prikazuje Slika 11.



Slika 11.: Sekvence gena HLA v računalniškem programu Assign-SBT

Rezultati

Rezultati sekvenciranja genov HLA morajo biti podani v skladu s standardi Evropske federacije za imunogenetiko (EFI), in sicer na sledeč način (51):

1. Kadar se ponujeni aleli HLA ne razlikujejo v funkcionalno pomembnem eksonu/ih (2 in 3 ekson za alele HLA I. razreda in 2 ekson za HLA II. razreda), lahko rezultat zapišemo tako, da alele naštejemo in ločimo s poševnico. Drugi možni način je, da takoj za najnižjim aleлом v skupini zapišemo oznako G.
2. Računalniški program lahko poda rezultat v obliki več možnih kombinacij alelov, ki se med seboj razlikujejo v funkcionalno pomembnem eksonu/ih. Takrat je potrebno narediti dodatne tipizacije PCR-SSP ali dodatne sekvenčne reakcije, da izberemo oz. določimo pravilno kombinacijo alelov.
3. Kadar nam računalniški program ponudi kombinacijo z ničelnim aleлом, je potrebno z dodatnimi tipizacijami PCR-SSP njegovo prisotnost izključiti.
4. V primeru, da nam računalniški program ponudi rezultat, ki nakazuje na homozigotnost osebe za določen gen HLA, je homozigotnost potrebno potrditi z dodatnimi tipizacijami PCR-SSP na nizki stopnji ločljivosti, da izločimo morebitno prisotnost drugega alela oz. izpad alela HLA (angl. *allelic dropout*).

5. Pogosto so med možnimi kombinacijami tudi aleli, ki se od specifičnega alela razlikujejo v tihi mutaciji, mutaciji izven kodirajoče regije ali v načinu izražanja na celični površini. Ker te razlike ne vplivajo na funkcijo molekule HLA (glej Preglednico I), lahko v takšnih primerih rezultat podamo tako, da zapis alela zaokrožimo na prva dva seta številk, ki označujeta specifičen alel.

Računalniški izpis rezultatov sekvenciranja genov HLA in pristop k razreševanju dvoumnih rezultatov prikazuje Slika 12.

Vzorec: 2009.2662
Knjižnica alelov: IMGT/Cw 3.1.0 2010-07-16

Alelni pari, ki imajo enako skupno nukleotidno zaporedje:

C*04:01:01:01	C*06:02:01:01
C*04:01:01:01	C*06:02:01:02
C*04:01:01:02	C*06:02:01:01
C*04:01:01:02	C*06:02:01:02
C*04:01:01:03	C*06:02:01:01
C*04:01:01:03	C*06:02:01:02
C*04:01:09	C*06:02:08
C*04:09N	C*06:02:01:01
C*04:09N	C*06:02:01:02
C*04:30	C*06:02:01:01
C*04:30	C*06:02:01:02
C*04:54	C*06:09

Ekson 3
Ekson 7
Ekson 7
Ekson 7
Ekson 7
Ekson 3

Zapisovanje alelov lahko zaokrožimo na prva dva seta številk, saj razlike v tihih mutacijah med navedenimi aleli niso ključne za funkcijo molekule

Prisotnost ničelnega alela C*04:09N izključimo s tipizacijo C*04 na visoki stopnji ločljivosti

Med aleli so razlike v funkcionalnem tretjem eksonu, zato je potrebno dvoumni rezultat: C*04:01, C*06:02 ali C*04:54, C*06:09 razrešiti s tipizacijo C*04 ali C*06 z metodo PCR-SSP na visoki stopnji ločljivosti

Če izključimo ničelni alel in alelna kombinacija C*04:54, C*06:09, je pravilen zapis rezultata sekvenciranja gena HLA-C: **C*04:01/04:30, C*06:02 ali C*04:01G, C*06:02**, saj med aleloma C*04:01 in C*04:30 ni razlik v funkcionalno pomembnih eksonih.

Nadaljevanje Slike 12.:

Vzorec: 1998.284
Knjižnica alelov: IMGT/A 3.0.0 2010-04-01

Alelni pari, ki imajo enako skupno nukleotidno zaporedje:

A*02:01:01:01	A*02:01:01:01
A*02:01:01:01	A*02:01:01:02L
A*02:01:01:01	A*02:01:01:03
A*02:01:01:02L	A*02:01:01:02L
A*02:01:01:02L	A*02:01:01:03
A*02:01:01:03	A*02:01:01:03



Homozigotnost genskega lokusa HLA-A potrdimo s tipizacijo gena HLA-A na nizki stopnji ločljivosti z metodo PCR-SSP

Zapisovanje alelov lahko zaokrožimo na prva dva seta številk, saj razlike v tihih mutacijah in načinu izražanja na celični površini (oznaka L) med navedenimi aleli niso ključne za funkcijo molekule

Če homozigotnost potrdimo je pravilen zapis rezultata sekvenciranja gena HLA-A:
A*02:01

Slika 12.: Računalniški izpis rezultatov sekvenciranja in pristop k razreševanju dvoumnih rezultatov

3.7 Tipizacija genov HLA z metodo PCR-SSP

Princip:

Osnovni princip metode je opisan v podoglavlju uvoda (1.2.1)

Tipizacija genov HLA z metodo PCR-SSP temelji na pomnoževanju polimorfnih odsekov tarčnega gena HLA z uporabo komercialnih kompletov reagentov, ki vsebujejo plošče z raztočenimi in liofiliziranimi izbranimi pari sekvenčno specifičnih začetnih oligonukleotidov v natančno določenih koncentracijah. Sestava reagentov za tipizacijo genov HLA mora zagotoviti možnost določitve vseh znanih alelov preiskovanega gena.

Material:

Za pripravo reakcijske zmesi za PCR in pomnoževanje:

- izolirana genomska DNA znane koncentracije
- komercialni kompleti reagentov za PCR-SSP (Olerup)
- reagent za PCR (priložen v komercialnem kompletu reagentov za PCR-SSP)

- Taq DNA polimeraza, koncentracija: 5 U/ μ l (Thermoscientific)
- stresalnik
- aparat za PCR (GeneAmpPCR-system, Applied Biosystems)
- sterilne plastične epruvetke
- pipete in sterilni nastavki
- sterilna deionizirana voda (dH₂O)

Za izvedbo elektroforeze in detekcijo pomnoženih produktov PCR na agaroznem gelu:

- 2% agarozni gel
- kadička za elektroforezo
- usmernik električnega toka
- označevalec velikosti produktov PCR (ThermoScientific, dolžine: 50, 200, 400, 850, 1500 bp)
- transiluminator z UV lučjo in kamero

Analiza rezultatov PCR-SSP:

- računalniški program HELMBERG-SCORE tekoče in posodobljene verzije (Olerup)

Postopek dela:

Z razpoložljivimi komercialnimi kompleti reagentov lahko tipiziramo različne gene HLA na nizki ali visoki stopnji ločljivosti. Pri našem delu smo tipizirali gene HLA-A, B, C, DRB1 in DQB1 na nizki in visoki stopnji ločljivosti. V vdolbinicah plošč komercialnih kompletov reagentov so poleg izbranih parov sekvenčno specifičnih začetnih oligonukleotidov prisotni tudi pari specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki pomnožujejo gen za človeški rastni hormon. Pomnožek tega gena služi kot notranja kontrola, ta mora biti pozitivna, da lahko govorimo o uspešnem pomnoževanju v posamezni vdolbinici. Pripravo reakcijske zmesi za PCR moramo izvesti v prostoru, ki ni kontaminiran s produkti PCR (prostor PRE-PCR). Vse naslednje stopnje potekajo v prostorih POST-PCR.

Priprava reakcijske zmesi za PCR in pomnoževanje:

Volumni predpisanih reagentov za pripravo reakcijske zmesi za PCR so odvisni od koncentracije izolirane DNA in števila vdolbinic z raztočenimi pari sekvenčno specifičnih začetnih oligonukleotidov v plošči uporabljenega kompleta reagentov. Ustrezne volumne

reagentov za pripravo reakcijske zmesi za PCR smo razbrali oz. izračunali s pomočjo tabele in navodil objavljenih na spletni strani proizvajalca (52).

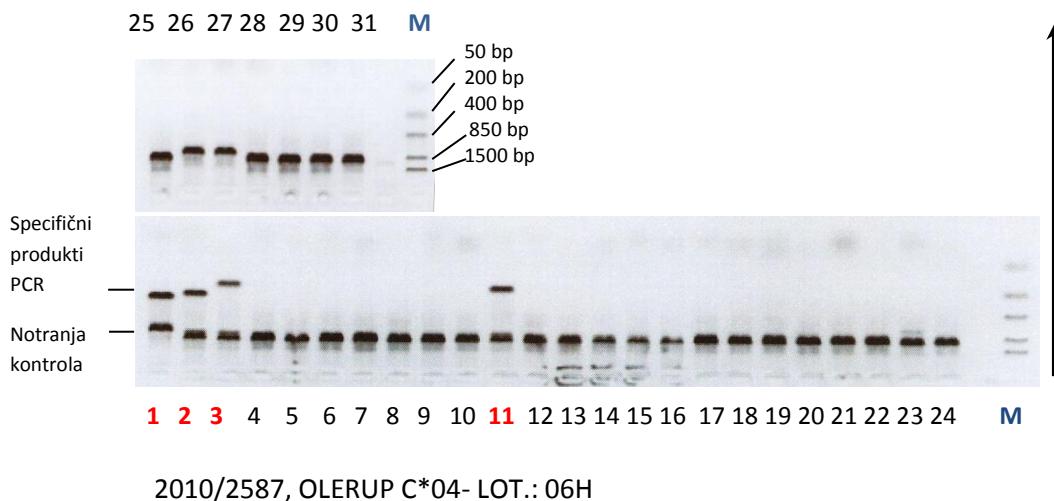
V 1,5 ml epruvete smo dodali ustrezne količine reagenta za PCR, dH₂O, izolirane DNA in Taq DNA polimeraze, jih nato premešali na stresalniku in po 10 µl mešanice napipetirali v vsako od vdolbinic v plošči. Ploščo smo zaprli s prozorno folijo, da bi preprečili izhlapevanje in jo namestili v aparat za PCR ter vključili primeren temperaturni program prikazan v Preglednici VII.

Preglednica VII: Temperaturni program, ki smo ga uporabili za pomnoževanje tarčnih genov HLA z metodo PCR-SSP

Število ciklov	Temperatura (°C)	Čas (min)
1	94.0	02:00
10	94.0	00:10
	65.0	01:00
20	94.0	00:10
	61.0	00:50
	72.0	00:30
/	4.0	∞

Elektroforeza in detekcija produktov PCR na agaroznem gelu:

Po zaključku temperaturnega programa za PCR smo v žepke na agaroznem gelu nanesli po 10 µl produktov PCR iz vsake posamezne vdolbine v plošči. V žepek na koncu vsake vrstice smo nanesli 10 µl označevalca velikosti, kot pomoč pri odčitavanju dolžin produktov PCR. Elektroforeza produktov PCR je tekla 24 minut pri 184 V. Po končani elektroforezi smo gel izpostavili UV svetlobi v transiluminatorju in ga fotografirali (Slika 13). Specifični produkti PCR so bili vidni kot lise na agaroznem gelu. Vzorec lis na agaroznem gelu je značilen za vsak gen in alel HLA. Dolžine specifičnih produktov PCR smo ocenili s pomočjo označevalca velikosti, ki vsebuje fragmente DNA znanih dolžin.



Slika 13: Agarozni gel slikan pod UV lučjo. Tipizacija HLA-C*04 na visoki stopnji ločljivosti s komercialnim kompletom reagentov PCR-SSP (Olerup). Vidni so pomnožki notranjih kontrol (1-31), z rdečo barvo so označene pozicije s specifičnimi produkti PCR (1-3, 11). Puščica označuje smer poteka elektroforeze. M-označevalec velikosti produktov PCR (dolžine so označene na desni strani slike)

Analiza rezultatov PCR-SSP:

Fotografiran vzorec lis na agaroznem gelu smo vnesli v računalniški program HELMBERG-SCORE, ki podatke o vnešeni kombinaciji lis poveže s podatki o parih sekvenčno specifičnih začetnih oligonukleotidov v posameznih vdolbinicah plošče komercialnega kompleta reagentov in zaključi rezultat tipizacije HLA v obliki specifičnega alela ali skupine alelov HLA, odvisno od stopnje ločljivosti tipizacije.

3.8 Statistična analiza in poročanje rezultatov

Statistično analizo vzorčenih skupin so v sklopu projekta HLA-NET, izvedli bioinformatiki Antropološke enote Oddelka za genetiko in evolucijo Univerze v Ženevi. V ta namen so uporabili statistični program GENE[RATE], posebaj razvit in prirejen za delo z velikim številom dvoumnih rezultatov, ki spremljajo uporabo različnih metod tipizacije genov HLA na visoki stopnji ločljivosti in so posledica njihovega izjemnega polimorfizma (34, 35). Izsledki statistične analize alelnega polimorfizma genov HLA I. in II. razreda in haplotipskih povezav v antropološko vzorčeni slovenski populaciji, kot tudi relativni deleži posameznih alelov znotraj alelnih skupin HLA-B*44:02:01G in HLA-DRB1*14:01:01G,

so bili kot del projekta HLA-NET predstavljeni v okviru antropološke komponente 16. IHIWS v Angliji (48).

Sodelovanje pri projektu HLA-NET je vključevalo tudi odkrivanje in poročanje na svetovni ravni redkih alelov HLA. Kandidatne alele smo izbrali na podlagi izkušenj in beleženja redkeje pojavljajočih se alelov HLA v sklopu rutinskega in raziskovalnega dela v Centru za tipizacijo tkiv. Pogostnost pojavljanja kandidatnih alelov na svetovni ravni smo preverjali v javno dostopni podatkovni bazi imenovani Allele Frequency Net Database (AFND), ki med drugim skrbi za evidentiranje, objavo in posodabljanje pogostnosti pojavljanja genov in genskih različic sistema HLA. Izследke odkrivanja redkih alelov HLA je predstavila in objavila skupina znanstvenikov, ki je v okviru 16. IHIWS, vodila projekt Redki aleli (angl. *Rare Alleles project*) (44, 53).

V sklopu projekta HLA-NET je potekalo tudi intenzivno proučevanje genetskih razmerij med populacijami, predvsem v smislu analize korelacije med genetskimi in geografskimi razdaljami. V analizo je bila skupaj z ostalimi populacijami Evrope in širšega svetovnega geografskega področja vključena tudi antropološko vzorčena slovenska populacija. Rezultati te obsežne analize so bili nedavno objavljeni v obliki poročila projekta Analize HLA v populacijah (angl. *Analysis of HLA Population Data-AHPD*), ki je potekal v okviru antropološke komponente 16. IHIWS (54).

Za bolj specifičen vpogled v genetska razmerja med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in določenimi populacijami s skupnega geografskega področja so nam bioinformatiki projekta HLA-NET omogočili oceno in prikaz genetskih razdalj med Slovenci in izbranimi evropskimi populacijami.

A. Antropološko vzorčena slovenska populacija

Rezultate sekvenciranja genov HLA v antropološko vzorčeni slovenski populaciji smo podali kot tipizacijo na visoki stopnji ločljivosti. Dvoumne rezultate tipizacije PCR-SBT in homozigotne rezultate sekvenciranja smo razreševali z dodatnimi tipizacijami z metodo PCR-SSP visoke in/ali nizke stopnje ločljivosti. Prisotnost ničelnih alelov smo izključevali s tipizacijo PCR-SSP visoke stopnje ločljivosti ali na podlagi preteklih rezultatov serološke tipizacije. V primeru, da se ponujeni aleli niso razlikovali v funkcionalno pomembnem eksonu/ih, smo za aleлом z najnižjo štirištevilčno številko v skupini zapisali oznako G. Izjemoma smo v primerih vzorca DNA slabe kakovosti (razpadla DNA v starejših vzorcih), težav pri pridobivanju novega vzorca krvi za izolacijo DNA in večkratnih

neuspešnih poskusih sekvenciranja določenega gena HLA, za tipizacijo uporabili izključno metodo PCR-SSP.

Statistična analiza je obsegala:

- (i) analizo pogostnosti pojavljanja alelov genov HLA-A, -B, -C, -DRB1 in -DQB1 z algoritmom EM (angl. *Expectation-Maximization*), ki temelji na štetju alelov in izračunu maksimalne verjetnosti preiskovanega parametra
- (ii) analizo pogostnosti pojavljanja dvolokusnih haplotipskih povezav med aleli preiskovanih genov HLA z algoritmom EM, ki temelji na štetju haplotipskih povezav in izračunu maksimalne verjetnosti preiskovanega parametra
- (iii) test odstopanja pogostnosti pojavljanja alelov preiskovanih genov in dvolokusnih haplotipskih povezav HLA od Hardy-Weinbergovega genskega ravnovesja (test HWE)
- (iv) oceno heterozigotnosti populacije in selektivne nevtralnosti z Ewens-Watterson-Slatkin testom (test EWS)
- (v) analizo vezavnega neravnovesja dvolokusnih haplotipov in globalnega vezavnega neravnovesja (gLDP) med preiskovanimi lokusi HLA s testiranjem razmerja verjetnosti (angl. *InLikelihood-ratio test*) in pristopom večkratnega vzorčenja prilagojenega za delo z majhnimi vzorci
- (vi) prikaz genetskih razdalj z analizo večdimenzionalnega skaliranja (angl. *Multidimensional scaling analysis*-MDS), temelječi na izračunu povprečnih Reynoldsovih genetskih razdalj med preiskovanimi lokusi HLA antropološko vzorčene slovenske populacije in izbranimi, pri projektu HLA-NET, sodelujočimi populacijami

B. Vzorec članov slovenskih družin

Analizirane tipe HLA članov slovenskih družin smo v CTT določili s serološkimi in/ali genskimi tipizacijami na nizki stopnji ločljivosti. Ker smo za določanje tipa HLA članov družin tekom let uporabljali različne metode (predvsem za tipa HLA-A in HLA-B), smo v namen učinkovite statistične analize vse zapise genskih tipizacij HLA-A in HLA-B poenotili s pretvorbo v ustrezne serološke ekvivalente (antigen HLA), medtem ko smo za tip HLA-DRB1 obdržali obliko zapisa alelne skupine, ki kodira serološko določljiv antigen oz. serološko alelno skupino.

Statistična analiza je obsegala:

- (i) analizo pogostnosti pojavljanja posameznih tipov HLA-A, -B, -DRB1 z algoritmom EM (angl. *Expectation-Maximization*), ki temelji na štetju tipov HLA in izračunu maksimalne verjetnosti preiskovanega parametra
- (ii) hi-kvadrat test za ugotavljanje statistično značilnih razlik med pogostnostmi pojavljanja posameznih tipov HLA-A, -B in -DRB1 med vzorcem članov slovenskih družin in antropološko vzorčene slovenske populacije
- (iii) analizo pogostnosti pojavljanja dvolokusnih in trilokusnih haplotipskih povezav med preiskovanimi tipi HLA z algoritmom EM, ki temelji na štetju haplotipskih povezav in izračunu maksimalne verjetnosti preiskovanega parametra
- (iv) test odstopanja pogostnosti pojavljanja preiskovanih tipov HLA in dvolokusnih haplotipskih povezav HLA od Hardy-Weinbergovega genskega ravnovesja (test HWE)
- (v) analizo vezavnega neravnovesja dvolokusnih haplotipov in globalnega vezavnega neravnovesja (gLd) med preiskovanimi lokusi HLA s testiranjem razmerja verjetnosti (angl. *InLikelihood-ratio test*) in pristopom večkratnega vzorčenja prilagojenega za delo z majhnimi vzorci

C. Vzorec nacionalnega registra Slovenija-Donor

V namen primerjave nacionalnega registra Slovenija-Donor in antropološko vzorčene slovenske populacije smo v sodelovanju z delovno skupino antropološke enote, Oddelka za genetiko in evolucijo, iz vzorca 14.040 NDKMC s t.i. pristopom ponovnega vzorčenja naključno izbrali 1000 manjših vzorcev v velikosti slovenske populacije ($N=143$). Pogostnosti pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 v naključnih vzorcih registra smo nato primerjali s tistimi v antropološko vzorčeni slovenski populaciji.

Statistična analiza je obsegala:

- (i) analizo pogostnosti pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 z algoritmom EM (angl. *Expectation-Maximization*), ki temelji na štetju tipov HLA in izračunu maksimalne verjetnosti preiskovanega parametra
- (ii) test odstopanja pogostnosti pojavljanja preiskovanih tipov HLA od Hardy-Weinbergovega genskega ravnovesja (test HWE)

- (iii) primerjava pogostnosti pojavljanja posameznih tipov HLA-A, -B in -DRB1 med vzorcem registra in antropolško vzorčeno slovensko populacijo z metodo Fisherjeve meta-analize (izračun indeksa fiksacije F_{ST})

D. Vzorec posameznikov s tipom HLA-B*44 in/ali -DRB1*14

V vzorcu posameznikov z določenimi aleli tipov HLA-B*44 in/ali -DRB1*14 smo izračunali relativne deleže vseh alelov, ki smo jih zasledili v vzorcu. Prav tako smo izračunali relativne deleže alelov HLA-B*44:02 in B*44:27 ter HLA-DRB1*14:01 in DRB1*14:54 znotraj alelnih skupin HLA-B*44:02:01G ter HLA-DRB1*14:01:01G ter ugotovitve primerjali z rezultati drugih evropskih populacij vključenih v projekt HLA-NET.

4. REZULTATI

4.1 Določanje tipa HLA na ravni alelne skupine G v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

Za zanesljivo statistično analizo polimorfizma genov HLA na ravni alelne skupine G v antropološko vzorčeni slovenski populaciji (AVSP) ($N=143$) je bilo potrebno rezultate sekveciranja preiskovanih genov HLA podati tako, da sledijo veljavnim standardom EFI. To pomeni, da morajo biti dvoumni rezultati, ki se nanašajo na funkcionalne eksone genov HLA (2 in 3 ekson), kot tudi ničelni aleli, izključeni, ter homozigotni rezultati sekvenciranja potrjeni, za kar so potrebne dodatne tipizacije z metodo PCR-SSP visoke in/ali nizke stopnje ločljivosti. S tipizacijami PCR-SSP nizke stopnje ločljivosti smo potrjevali homozigotnost v alelih HLA v namen izključevanja lažno homozigotnih tipov HLA, zaradi izpada oz. nepomnoževanja posameznega alela HLA.

Število dvoumnih rezultatov smo prešteli za vsak lokus HLA posebaj, in sicer smo šteli le tiste dvoumne rezultate, ki vključujejo alele z nesinonimnimi mutacijami v funkcionalnih eksonih genov HLA I. in II. razreda.

Preglednici VIII. in IX., za posamezen genski lokus, prikazujeta skupno število dvoumnih rezultatov in njihov seštevek, število opravljenih tipizacij PCR-SSP v namen izključitve dvoumnih rezultatov in njihov seštevek, alelni par, za potrditev katerega smo morali izključiti največje število dvoumnih rezultatov (t.i. alelni par z največjim številom dvoumnih rezultatov). Preglednici prav tako prikazujeta ničelne alele, ki smo jih izključevali, njihovo število in skupno število dodatnih tipizacij, s katerimi smo potrdili homozigotnost na ravni alela, kot tudi število oseb, katerih tipa HLA nismo uspeli določiti z metodo PCR-SBT.

Preglednica VIII.: Razreševanje dvoumnih rezultatov sekvenciranja na ravni alelne skupine G za lokuse HLA I. razreda

	Genski lokus			VSOTA Σ
	HLA-A	HLA-B	HLA-C	
Skupno število dvoumnih rezultatov (2 in 3 ekson)	342	331	206	879
Skupno število tipizacij PCR-SSP za izključitev dvoumnih rezultatov	113	109	110	332
Alelni par z največjim številom dvoumnih rezultatov	A*02:01, A*26:01, 10	B*44:02, B*51:01, 17	C*03:03, C*07:01G, 11	
Ničelnii aleli in njihovo število	A*03:01:01:02N, 33 A*01:01:01:02N, 25 A*68:11N, 11 A*03:69N, 3 A*02:226N, 2 A*29:01:01:02N, 1 A*32:19N, 1	B*18:17N, 23 B*44:19N, 9 B*15:01:01:02 N, 7 B*37:03N, 1	C*04:09N, 38 C*03:20N, 10	
Število tipizacij PCR-SSP za potrditev homozigotnosti	30	6	9	
Število oseb s tipom HLA določenim s PCR-SSP	7	4	5	

Največje skupno število dvoumnih rezultatov, ki so vključevali alele z razlikami v nukleotidnih zaporedjih funkcionalno pomembnih eksonov, smo zasledili pri sekvenciranju gena HLA-A, in sicer 342, sledita mu HLA-B z 331 in HLA-C z 206 dvoumnimi rezultati. Vsota vseh dvoumnih rezultatov je bila 879. V namen razreševanja dvoumnih rezultatov je bilo izvedenih skupno 332 tipizacij PCR-SSP na visoki stopnji ločljivosti, in sicer 113 v primeru gena HLA-A in 109 ter 110 za HLA-B in HLA-C. Pri sekvenciranju genov HLA I. razreda smo največjo prisotnost dvoumnih rezultatov, in sicer 17, opazili pri alelnem paru HLA-B*44:02, B*51:01. Največ različnih ničelnih alelov spremišča sekvenciranje HLA-A, in sicer 7, sledita mu HLA-B z 4 in HLA-C z 2 ničelnimi aleli. Prav tako smo največ homozigotov opazili v alelih HLA-A, in sicer 30, medtem ko je bilo homozigotov v alelih HLA-B le 6 in v alelih HLA-C 9. Pri enem članu AVSP nismo uspeli potrditi homozigotnosti v alelih HLA-A, saj smo z metodo PCR-SSP določili prisotnost še drugega alela HLA-A. Z metodo PCR-SBT nam ni uspelo določiti tipa HLA-A sedmim, tipa HLA-B štirim in tipa HLA-C petim članom slovenske populacije, saj so bili ti vzorci izolirane

DNA starejši od 15 let in posledično slabše kakovosti, zato smo tip HLA teh članov AVSP določili s tipizacijo PCR-SSP na visoki stopnji ločljivosti.

Preglednica IX.: Razreševanje dvoumnih rezultatov sekvenciranja na ravni alelne skupine

G za lokuse HLA II. razreda

	Genski lokus		
	HLA-DRB1	HLA-DQB1	VSOTA Σ
Skupno število dvoumnih rezultatov (2 ekson)	637	28	665
Skupno število tipizacij PCR-SSP za izključitev dvoumnih rezultatov	153	24	177
Alelni par z največjim številom dvoumnih rezultatov	DRB1*03:01, DRB1*11:01, 19	DQB1*03:01 DQB1*05:02, 5	
Ničelni aleli in njihovo število	DRB1*01:33N, 7	0	
Število tipizacij PCR-SSP za potrditev homozigotnosti	14	14	
Število oseb s tipom HLA določenim s PCR-SSP	1	14	

Pri tipizaciji genov HLA II. razreda članov slovenske populacije smo zasledili kar 637 dvoumnih rezultatov ob sekvenciranju genov HLA-DRB1 in le 28 ob sekvenciranju HLA-DQB1, kar znaša skupno 665 dvoumnih rezultatov. Dvoumne rezultate, ki so se pojavljali pri sekvenciranju HLA-DRB1 in HLA-DQB1, smo razrešili s skupno 177 tipizacijami PCR-SSP visoke stopnje ločljivosti, in sicer 153 za HLA-DRB1 in 24 za HLA-DQB1. Največ dvoumnih rezultatov pri sekvenciranju genov HLA-DRB1 je spremljalo alelni par HLA-DRB1*03:01, DRB1*11:01, in sicer 19. Pri HLA-DQB1 je bil alelni par z največjim številom dvoumnih rezultatov DQB1*03:01, DQB1*05:02 s 5 dvoumnimi rezultati. Ničelni alel, ki smo ga izključevali s tipizacijo PCR-SSP, je bil HLA-DRB1*01:33N. Pri sekvenciranju HLA-DQB1 nismo zasledili ničelnih alelov. Število homozigotov za alele HLA-DRB1 in HLA-DQB1 je bilo 14. S sekvenciranjem nismo uspeli določiti tipa HLA-DRB1 enemu članu in tipa HLA-DQB1 štirinajstim članom vzorca slovenske populacije, najverjetnejše zaradi razpadle DNA in posledičnih težav pri sekvenciranju, zato je bil tip DNA teh oseb določen z metodo PCR-SSP visoke stopnje ločljivosti.

4.2 Statistična analiza polimorfizma lokusov HLA-A, -B, -C, -DRB1 in -DQB1 v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

4.2.1 Pogostnost pojavljanja alelov HLA v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

Alelni polimorfizem in pogostnosti pojavljanja alelov HLA I. in II. razreda v AVSP prikazujejo Grafi 1-5. Prikazani so le aleli, katerih pogostnost pojavljanja je večja od 0,01.

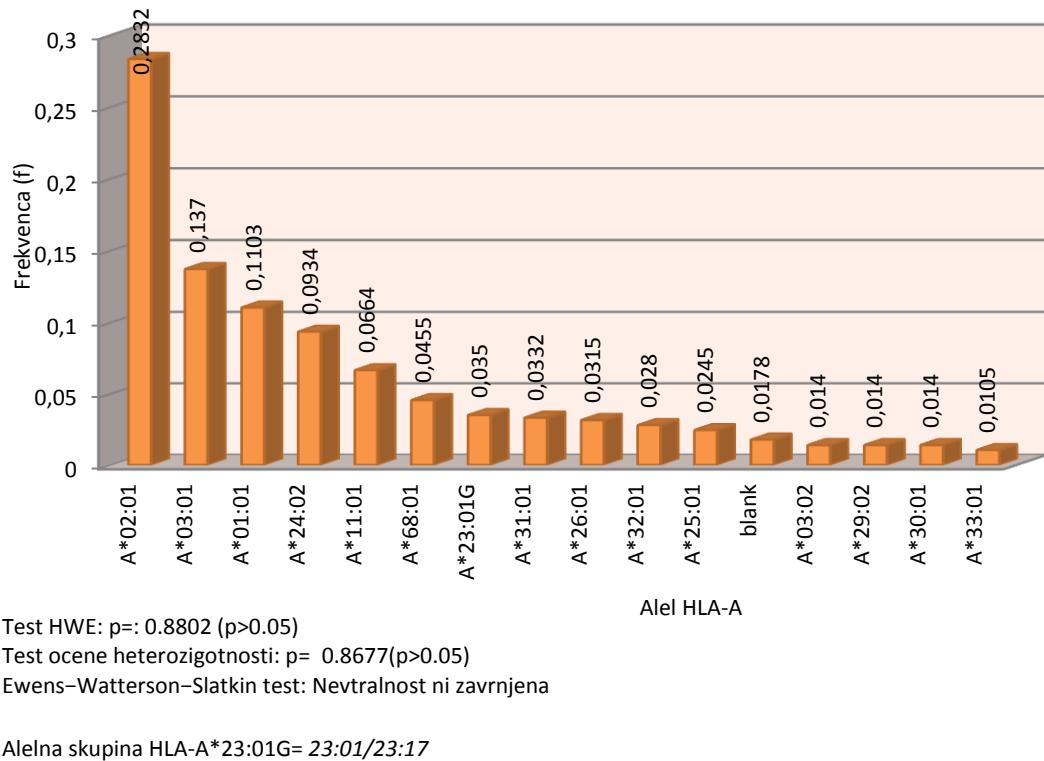
Aleli s pogostnostjo pojavljanja manj kot 0,01 so navedeni v Prilogi A.

Rezultati testiranja Hardy-Weinbergovega genskega ravnovesja (HWE), heterozigotnosti, selektivne nevtralnosti ter aleli, vsebovani v posameznih alelnih skupinah G, katerih prisotnost z uporabljenimi metodami tipizacije nismo mogli izključiti, so prikazani v sklopu ustreznih grafov.

Test HWE je pokazal, da pogostnosti pojavljanja alelov HLA statistično značilno ne odstopajo od Hardy-Weinbergovega načela ($p>0.05$) in so v genskem ravnovesju. Vrednosti pogostnosti pojavljanja alelov v AVSP ($N=143$) so zato s statističnega stališča zanesljive in primerne za nadaljnjo statistično analizo.

S testom heterozigotnosti smo potrdili presežek heterozigotnih alelnih kombinacij v primerjavi s homozigotnimi, kar je razvidno iz vrednosti p, ki so visoke in blizu maksimalne vrednosti ($p=1$).

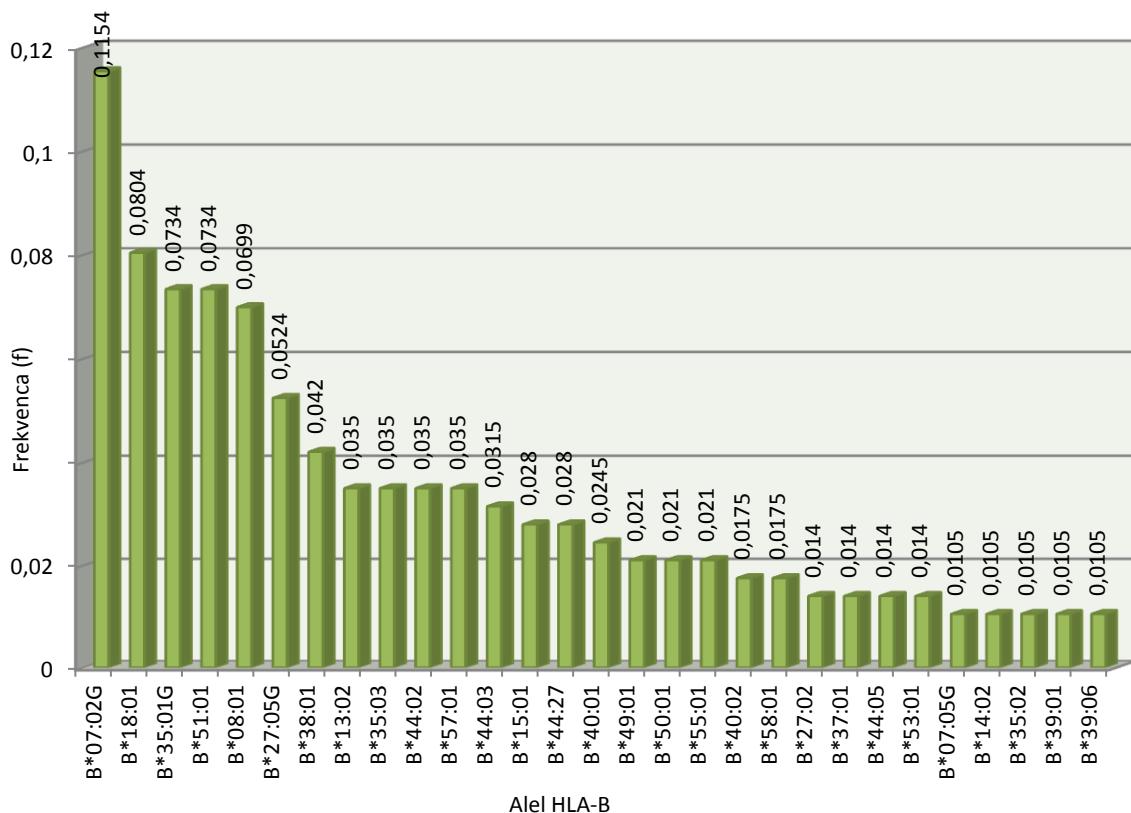
A. Pogostnost pojavljanja alelov HLA-A:



Graf 1: Pogostnost pojavljanja alelov HLA-A v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

V AVSP smo določili 24 alelov HLA-A. Z največjo pogostnostjo se pojavlja alel HLA-A*02:01 ($f=0,283$), ki mu sledijo A*03:01 ($f=0,137$), A*01:01 ($f=0,11$) in A*24:02 ($f=0,093$), kot drugi, tretji in četrti najbolj pogost alel HLA-A. S pogostnostjo pojavljanja nad 0,05 se pojavlja še alel A*11:01 ($f=0,066$).

B. Pogostnost pojavljanja alelov HLA-B:



Test HWE: $p= 1$ ($p>0.05$)

Test heterozigotnosti: $p= 0.9485$ ($p>0.05$)

Ewens–Watterson–Slatkin test: Nevtralnost ni zavrnjena

*Alelna skupina HLA- B*07:02G=07:02/07:61*

*Alelna skupina HLA- B*35:01G=35:01/35:42/35:57*

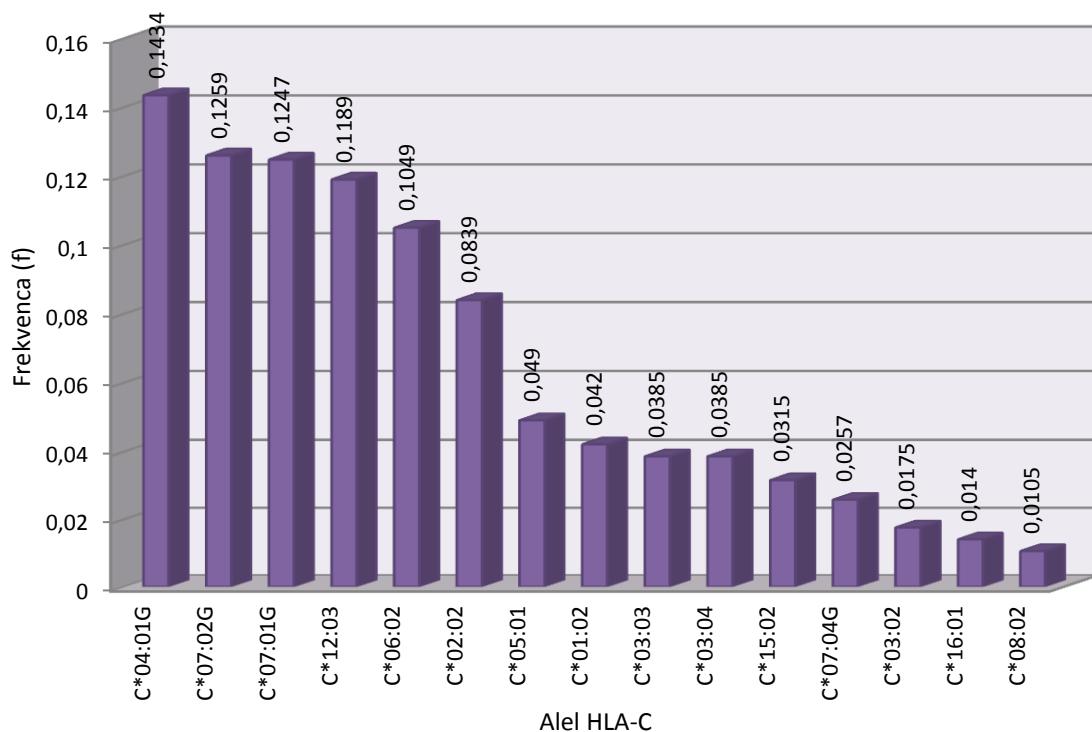
*Alelna skupina HLA- B*27:05G=27:05/27:13*

*Alelna skupina HLA- B*07:05G=07:05/07:06*

Graf 2: Pogostnost pojavljanja alelov HLA-B v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

Med 37 aleli HLA-B, ki smo jih določili v AVSP, se najpogosteje pojavljajo aleli iz alelne skupine B*07:02G ($f=0,115$), sledi B*18:01 ($f=0,08$) in aleli iz skupine B*35:01G ter alel B*51:01, ki se pojavljajo z enako pogostnostjo ($f=0,073$). S pogostnostjo pojavljanja nad 0,05 zasledimo še alel B*08:01 ($f=0,069$) in alelno skupino B*27:05G ($f=0,052$). Pogostnost pojavljanja ostalih alelov je manjša od 0,05.

C.Pogostnost pojavljanja alelov HLA-C:



Test HWE: $p= 1(p>0.05)$

Test heterozigotnosti: $p= 0.9063 \ (p>0.05)$

Ewens–Watterson–Slatkin test: Nevtralnost ni zavrnjena

Alelna skupina HLA- C*04:01G= 04:01/C*04:28/C*04:30/C*04:79/C*04:82/C*04:84

Alelna skupina HLA- C*07:02G= 07:02/C*07:50

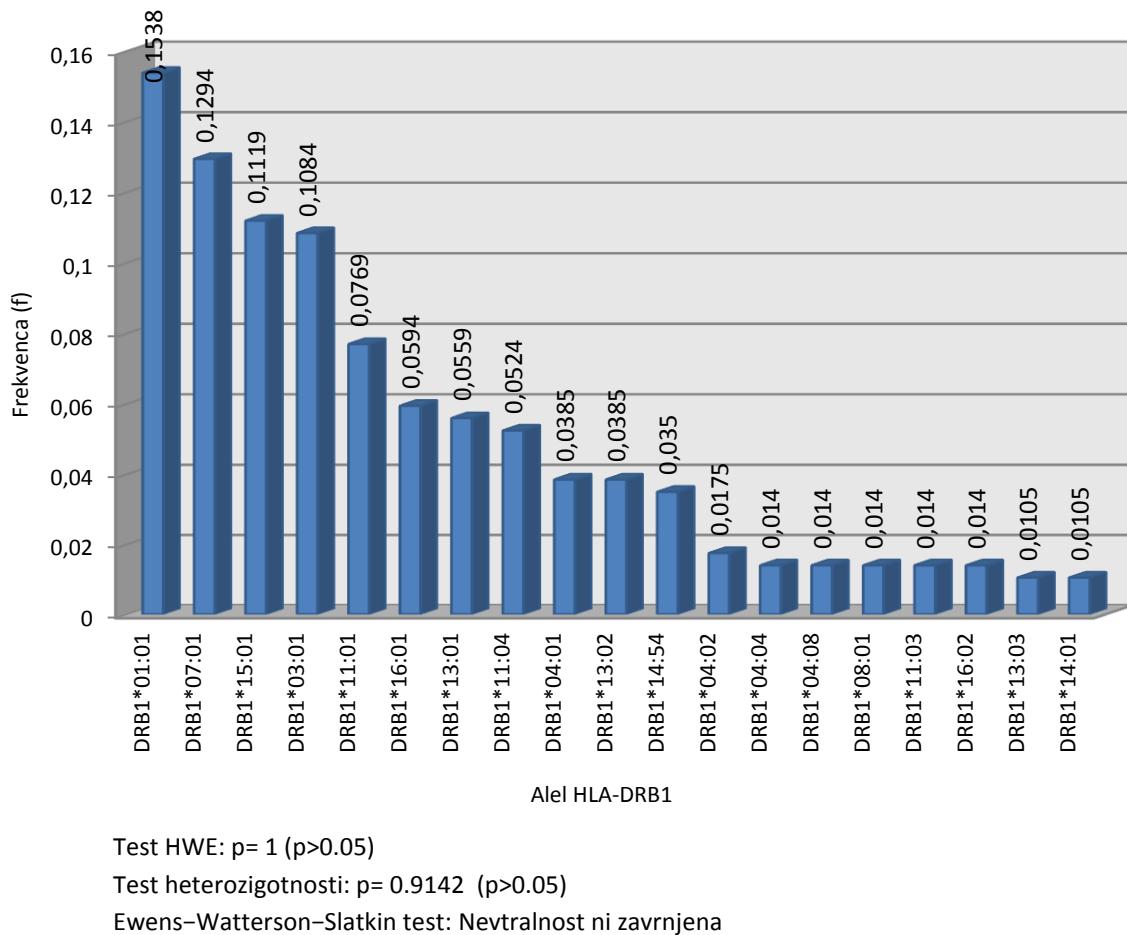
Alelna skupina HLA- C*07:01G= 07:01/C*07:06/C*07:18/C*07:52

Alelna skupina HLA- C*07:04G= 07:04/C*07:11

Graf 3: Pogostnost pojavljanja alelov HLA-C v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

V AVSP smo zasledili 21 alelov HLA-C. Najpogosteje se pojavlja alelna skupina HLA-C*04:01G ($f=0,143$), sledita alelni skupini C*07:02G ($f=0,126$) in C*07:01G ($f=0,125$). Na četrtem mestu po pogostnosti pojavljanja je alel C*12:03 ($f=0,119$), sledijo C*06:02 ($f=0,105$) in C*02:02 ($f=0,084$) ter C*05:01 ($f=0,049$). Ostali aleli HLA-C se pojavljajo s pogostnostjo manjšo od 0,05.

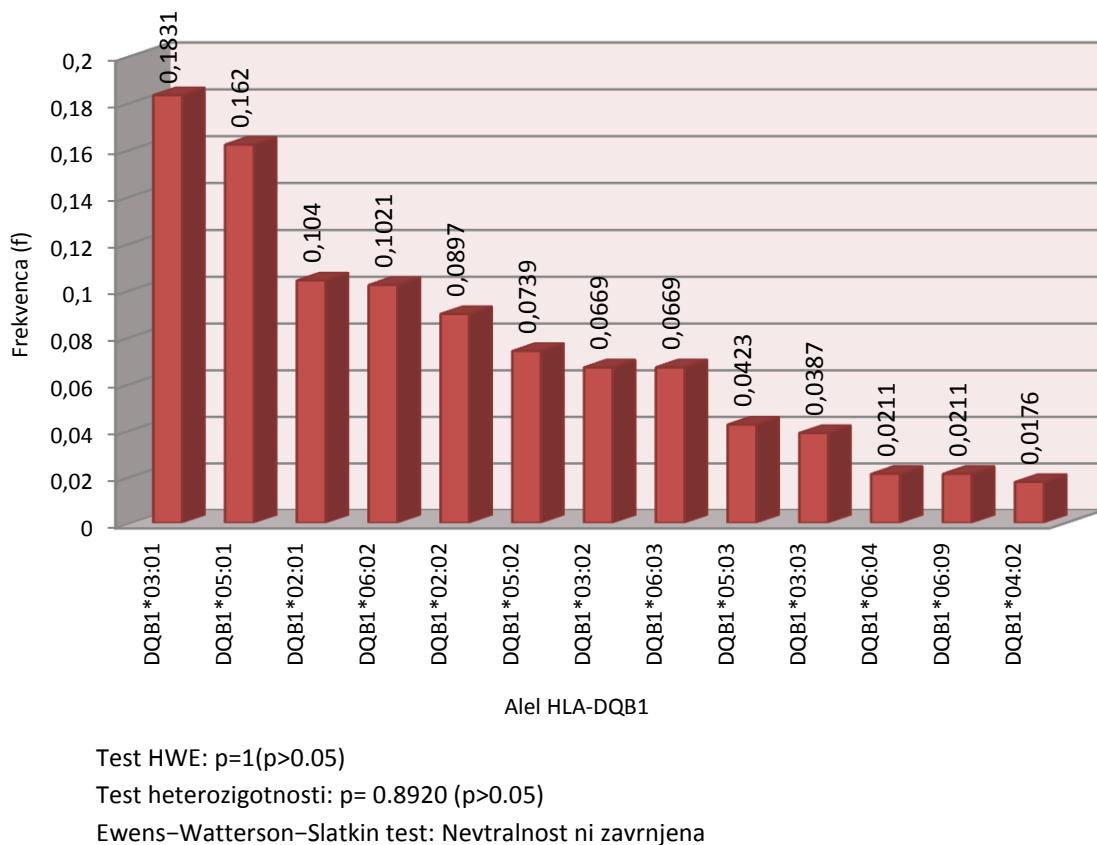
D. Pogostnost pojavljanja alelov HLA-DRB1:



Graf 4: Pogostnost pojavljanja alelov HLA-DRB1 v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

Med 28 aleli HLA-DRB1 v AVSP prevladuje DRB1*01:01 ($f=0,154$). Na drugem in tretjem mestu po pogostnosti pojavljanja sta DRB1*07:01 ($f=0,129$) in DRB1*15:01 ($f=0,112$), sledita DRB1*03:01 ($f=0,108$) in DRB1*11:01 ($f=0,077$). Alele DRB1*16:01, DRB1*13:01 in DRB1*11:04 zasledimo s pogostnostjo pojavljanja okoli 0,05.

E. Pogostnost pojavljanja alelov HLA-DQB1:



Graf 5: Pogostnost pojavljanja alelov HLA-DQB1 v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

Med 15 aleli HLA-DQB1 se najpogosteje pojavlja DQB1*03:01 ($f=0,183$). Sledijo aleli DQB1*05:01 ($f=0,162$), DQB1*02:01 ($f=0,104$) in DQB1*06:02 ($f=0,102$). Pogostnost pojavljanja pod 0.10 velja za alele DQB1*02:02 ($f=0,090$), DQB1*05:02 ($f=0,074$), DQB1*03:02 ter DQB1*06:03 (oba $f=0,067$). Alela DQB1*03:03 in DQB1*06:04 se pojavljata s pogostnostjo manj kot 0,05.

4.2.2 Redki aleli HLA

Alele HLA-A*29:01, A*34:02, A*02:35, A*30:02, B*07:10, DRB1*04:03, DRB1*04:13, DRB1*11:12 in DQB1*05:04, smo v AVSP opazili manj kot trikrat, zato smo jih izbrali za kandidatne redke alele HLA. Vendar pa se po preverjanju njihovih pogostnosti pojavljanja v podatkovni bazi AFND nobeden izmed navedenih alelov ni izkazal za redkega v svetovnem merilu. Prav tako v AVSP nismo zasledili nobenega izmed treh alelov, ki smo jih določili pri rutinskem delu in jih poročali v sklopu projekta HLA-NET. Ti aleli so bili v času poročanja opredeljeni kot redki v svetovnem merilu in pri nesorodnih posameznikih opaženi manj kot trikrat ter jih prikazuje Slika 14.

Seznam vodij delovnih skupin, ki so sodelovali pri odkrivanju in poročanju potencialno redkih alelov v sklopu projekta HLA-NET, ter število alelov, ki so jih posamezne delovne skupine odkrile in poročale, prikazuje Slika 15.

"Tissue Typing Center, Blood Transfusion Center of Slovenia"
Slajmerjeva 6, 1000 Ljubljana, Slovenia
Ljubljana, SVN

Alel	Številka vzorca	Rasa	Populacija	Metoda	Predlagatelj	Haplotip / Genotip
B*27:30	2005/92	Caucasian	Slovene-Italian	SBT, SSP	Blanka Vidan-Jeras	Hap1: A*03-B*2730-C*02-DRB1*16-
B*27:30	2010/4088	Caucasian	Slovene	SSP, Sequencing	Blanka Vidan-Jeras	Phenotype: -
B*35:08:02	2005/1979	Caucasian	Slovene-Italian	SBT, SSP	Blanka Vidan-Jeras	Phenotype: A*03/24, B*07/35:08:02, C*04/07, DRB1*14/15
C*15:13	2009/ 822	Caucasian	Unknown	SBT, SSP	Blanka Vidan-Jeras	Phenotype: A*25:01/32:01, B*44:02/51:01, C*05:01/15:13, DQB1*03:01/03:02, DRB1*11:01/04:02

Slika 14.: Redki aleli določeni pri rutinskem delu v Centru za tipizacijo tkiv (prirejeno po literaturi 55)

HLA-NET

A European network of the HLA diversity for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics.

Ime	Mesto delovne skupine	Država delovne skupine	Poslano število alelov
Gottfried Fischer	Vienna	Austria	26
Milena Ivanova	Sofia	Bulgaria	6
Zorana Grubic	Zagreb	Croatia	3
Marja-Liisa lokki	Helsinki	Finland	3
Anne Dormoy	Besancon	France	14
Valerie Dubois	Lyon	France	50
Chryssa Papasteriades	Athens	Greece	9
Francesca Poli	Milan	Italy	38
Prof. F. Claas/ Dr. D. Roelen/ W. Verduijn	Leiden	Netherlands	76
Benedicte Lie	Oslo	Norway	5
Dario Ligeiro	Lisbon	Portugal	51
Blanka Vidan-Jeras	Ljubljana	Slovenia	4
Jean-Marie Tiercy	Geneva	Switzerland	8
Ann-Margaret Little	Glasgow	United Kingdom	2
Vsota:			295

Slika 15.: Število redkih alelov, ki so jih poročali vodje delovnih skupin v sklopu projekta HLA-NET (prirejeno po literaturi 56)

4.2.3 Pogostnost pojavljanja haplotipov HLA in vezavno neravnovesje v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

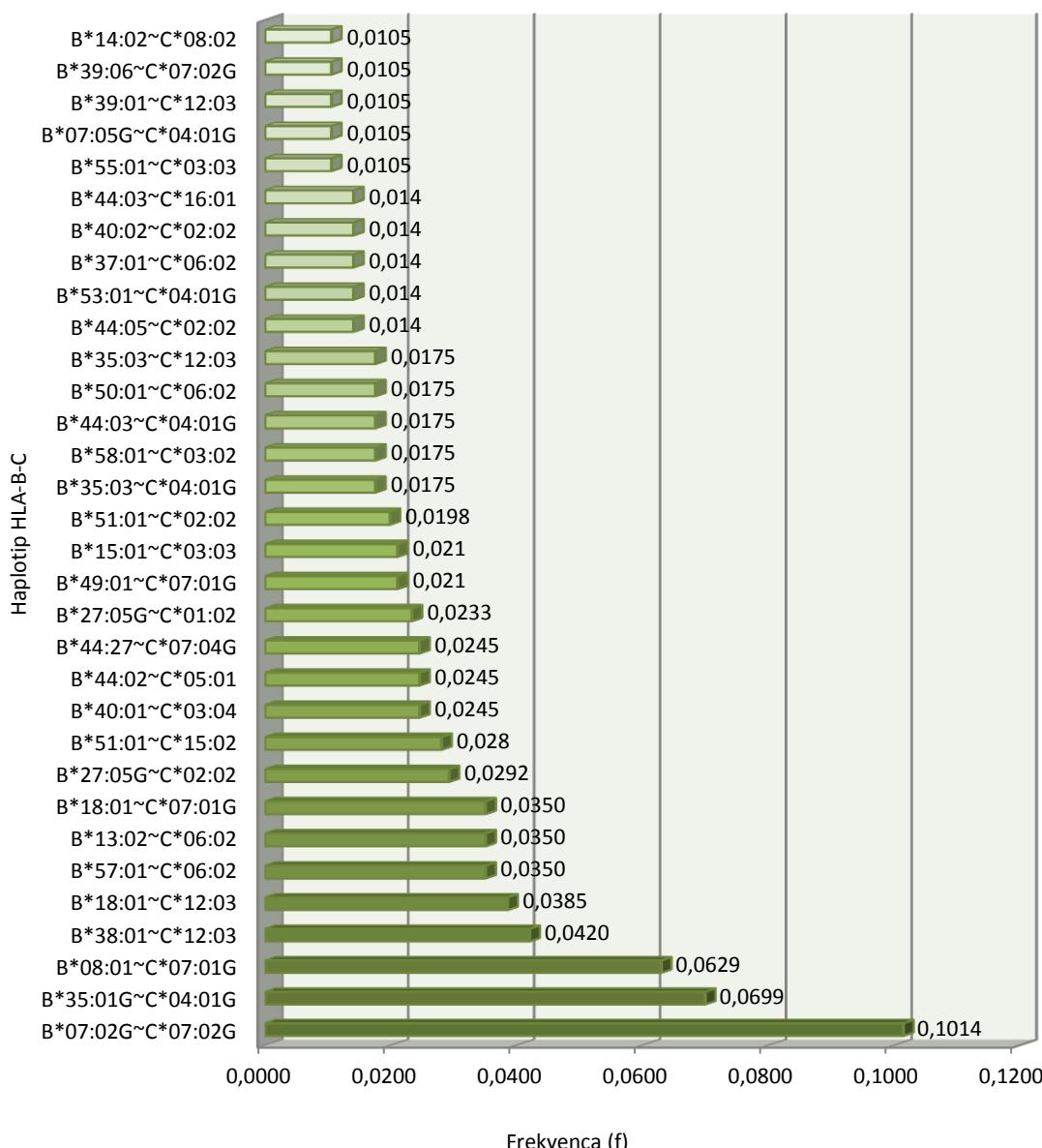
V AVSP smo izračunali pogostnost pojavljanja haplotipskih povezav alelov in vezavno neravnovesje (LD) med različnimi aleli HLA.

V primeru izračunov haplotipskih povezav smo za statistično zanesljive šteli le tiste, katerih pogostnosti pojavljanja niso značilno odstopale od HWE. Za takšne so se izkazale le haplotipske povezave med aleli HLA-B in HLA-C ter HLA-DRB1 in HLA-DQB1, medtem ko so dvolokusni haplotipi HLA-A-B, -A-C, -A-DRB1, -B-DRB1 in -C-DRB1 statistično značilno odstopali od HWE. Iz omenjenega razloga so grafično prikazane (Graf 6 in 7) le pogostnosti pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-B-C in HLA-DRB1-DQB1, ki z največjo zanesljivostjo predstavljajo resnično porazdelitev pogostnosti pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA V AVSP. V grafih so navedeni le dvolokusni haplotipi,

katerih pogostnosti pojavljanja so večje od 0,01. Dvolokusni haplotipi z manjšo pogostnostjo pojavljanja so navedeni v Prilogi B.

Ker bi bila, zaradi odstopanja večine haplotipov HLA od HWE, analiza stopnje moči vezavnega neravnovesja med aleli HLA nezanesljiva, smo se odločili to analizo opustiti.

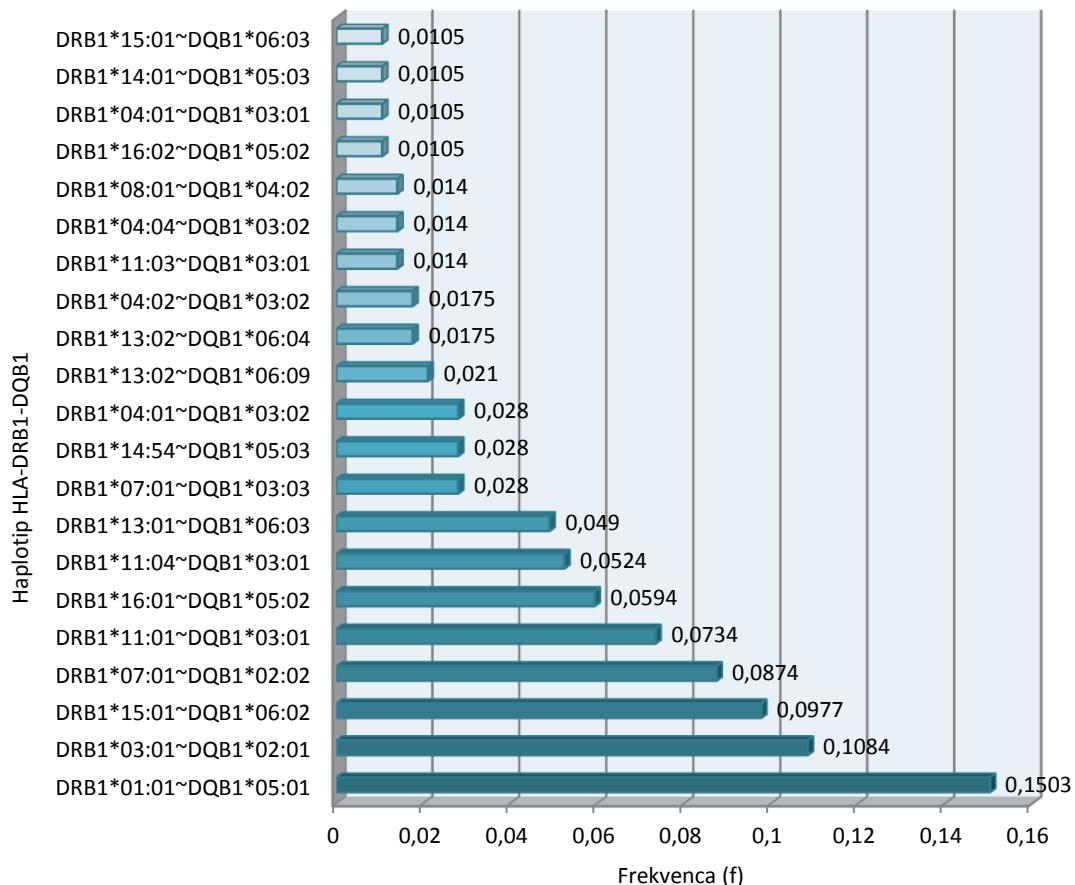
A. Pogostnost pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-B-C



Graf 6: Pogostnost pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-B-C v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

V AVSP smo opazili 67 različnih dvolokusnih haplotipov HLA-B-C. Prevladuje HLA-B*07:02G-C*07:02G ($f=0,101$), sledijo B*35:01G-C*04:01G ($f=0,069$) in B*08:01-C*07:01G ($f=0,063$), kot drugi in tretji najpogostejši dvolokusni haplotip. Vsi ostali dvolokusni haplotipi se pojavljajo s pogostnostjo, manjšo od 0,05.

B. Pogostnost pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-DRB1-DQB1



Graf 7: Pogostnost pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-DRB1-DQB1 v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

Med 52 različnimi dvolokusnimi haplotipi HLA-DRB1-DQB1 močno prevladuje haplotip DRB1*01:01-DQB1*05:01 ($f=0,150$). Naslednja dva po pogostnosti pojavljanja sta DRB1*03:01-DQB1*02:01 ($f=0,108$) in DRB1*15:01-DQB1*06:02 ($f=0,098$). S pogostnostjo pojavljanja, večjo od 0,05, smo zasledili se naslednje haplotipe: DRB1*07:01-DQB1*02:02 ($f=0,087$), DRB1*11:01-DQB1*03:01 ($f=0,073$), DRB1*16:01-DQB1*05:02 ($f=0,059$) in DRB1*11:04-DQB1*03:01 ($f=0,052$).

4.2.4 Genetske razdalje med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in izbranimi evropskimi populacijami

Izračunali smo genetske razdalje v lokusih HLA-A, -B, -C, -DRB1 in -DQB1 med AVSP in izbranimi evropskimi populacijami. Vodilo pri izbiri evropskih populacij za izračun genetskih razdalj je bila predvsem geografska oddaljenost, tako smo, zaradi specifične lege Slovenije, izbirali med zahodno in srednjeevropskimi populacijami ter populacijami JV. Evrope oz. Balkana. Na izbiro je pomembno vplivala tudi razpoložljivost podatkov za posamezne populacije in rezultati preteklih analiz genetskih razdalj med Slovenci in ostalimi Evropeji.

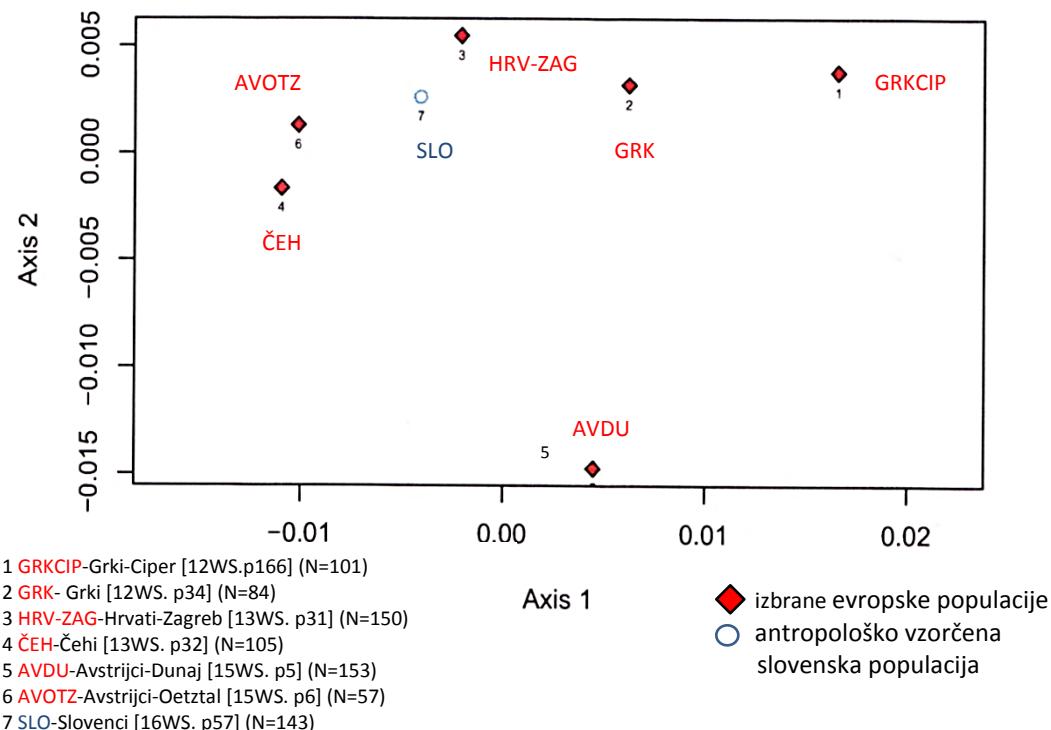
Vir podatkov za izračun genetskih razdalj so bile Mednarodne delavnice s področja tkivne skladnosti, v katerih so izbrane evropske države sodelovale s svojimi vzorci populacij.

Izračuni genetskih razdalj so predstavljeni v obliki 2D grafov, pridobljenih z MDS analizo (Grafi 8-12). Posamezna populacija je predstavljena s točko v n-D prostoru. Razporeditev točk in evklidske razdalje med njimi odražajo stopnjo različnosti glede na lokuse HLA. Izbrane populacije so navedene v sklopu grafičnega prikaza genetskih razdalj za posamezen lokus. Poleg imena populacije sta navedeni tudi številka Mednarodne delavnice s področja tkivne skladnosti, v kateri je država z določenim vzorcem populacije sodelovala, zaporedna številka populacije in velikost vzorca.

Reprezentativnost MDS analize odraža t.i cenovna funkcija (angl. *Stress*), katere vrednost nam pove, v kolikšni meri sta razporeditev točk na grafu in razdalje med njimi ustrezen oz. zanesljiv pokazatelj resničnih genetskih razdalj med preiskovanimi populacijami. Z manjšanjem vrednosti cenovne funkcije narašča reprezenativnost MDS analize in grafov. V našem primeru je cenovna funkcija za 2D prikaze genetskih razdalj za preiskovane lokuse blizu vrednosti nič.

A. Genetske razdalje/HLA-A

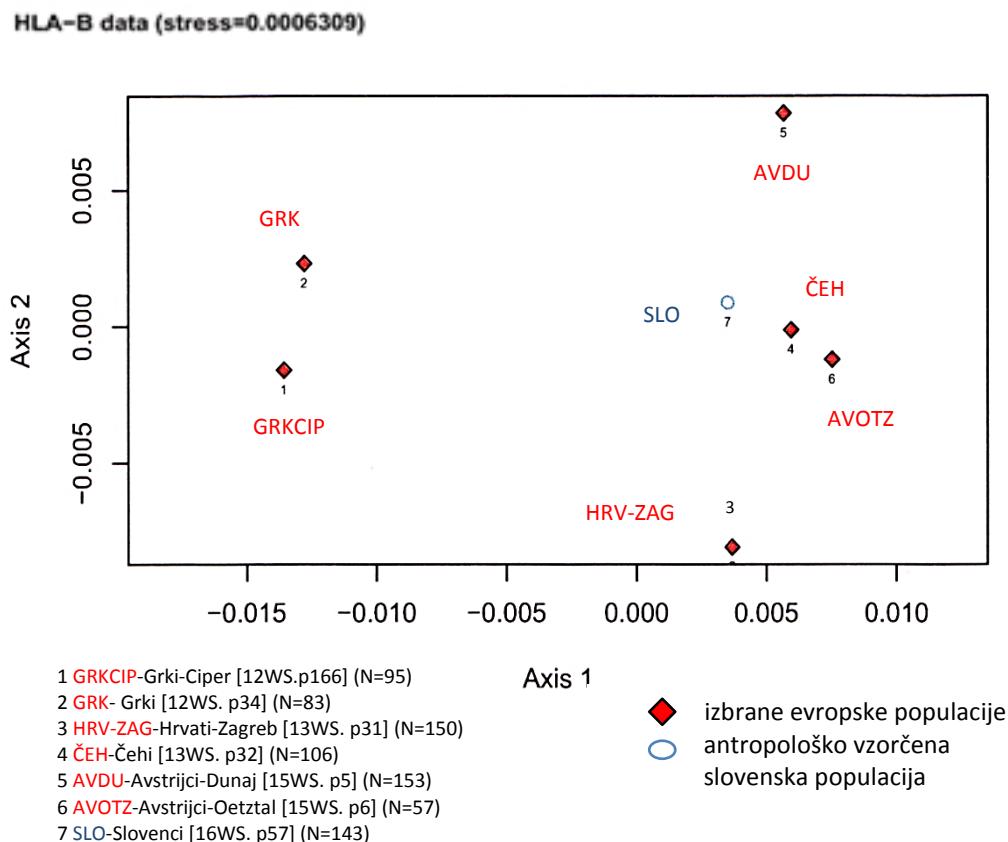
HLA-A data (stress=0)



Graf 8: 2D prikaz genetskih razdalj v lokusu HLA-A med izbranimi evropskimi populacijami

Iz grafičnega prikaza genetskih razdalj za lokus HLA-A je najmanjša genetska razdalja prisotna med Slovenci in Hrvati, kar tudi ustreza dejanski geografski razdalji med državama. Sledita avstrijska populacija vzorčena na področju Tirolske regije Oetztal in češka populacija. Razvidno je, da se populacije razporejajo v genetsko precej različne regije, in sicer na eni strani populacije Srednje Evrope (avstrijska, češka) ter na drugi populaciji s področja Balkana oz. JV Evrope, ki ju na grafu predstavljajo Grki in Ciprski Grki, medtem ko vmesni prostor zapolnjujeta AVSP in hrvaška populacija.

B. Genetske razdalje/HLA-B

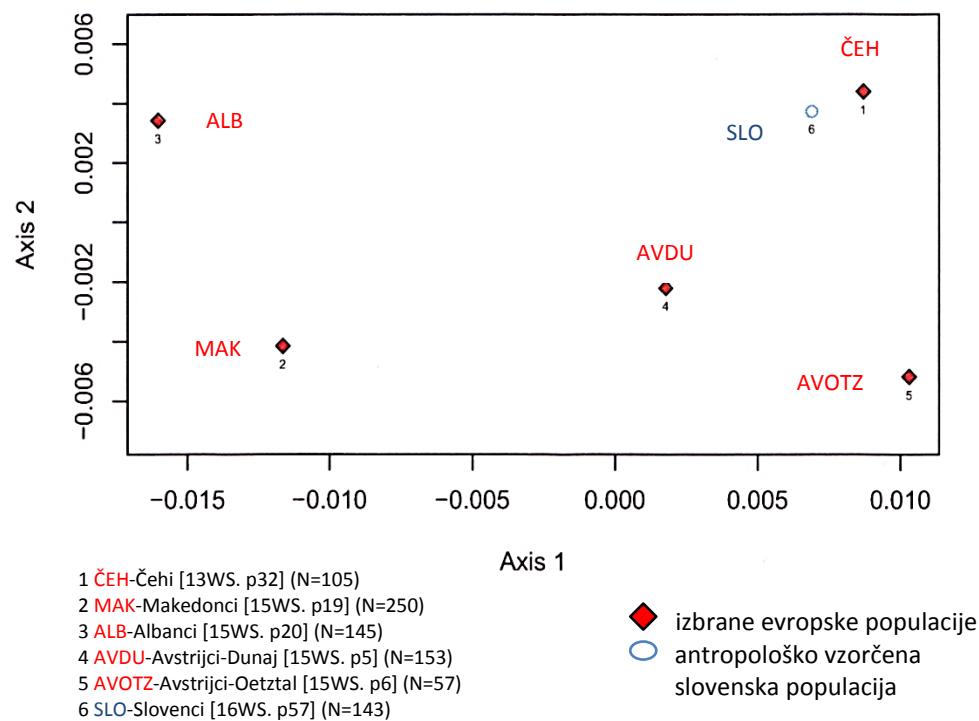


Graf 9: 2D prikaz genetskih razdalj v lokusu HLA-B med izbranimi evropskimi populacijami

Tudi v primeru genetskih razdalj v lokusu HLA-B lahko opazimo največjo genetsko sorodnost s srednjeevropskimi populacijami, kot sta češka in avstrijska (Oetztal), sledita avstrijska (Dunaj) in hrvaška populacija. Na drugi polovici grafa sta, genetsko bolj oddaljeni, obe grški populaciji.

C. Genetske razdalje/HLA-C

HLA-C data (stress=0.0001477)

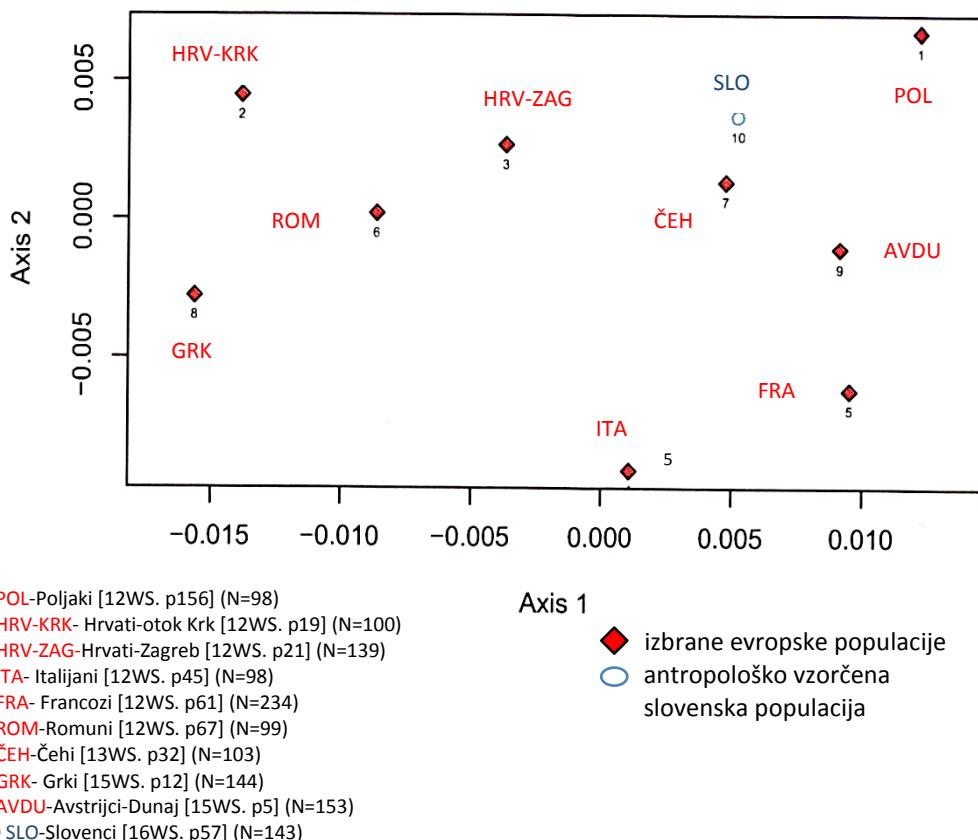


Graf 10: 2D prikaz genetskih razdalj v lokusu HLA-C med izbranimi evropskimi populacijami

Podobno kot v primeru lokusov HLA-A in HLA-B so tudi v HLA-C najmanjše genetske razlike opazne med Slovenci in populacijami Češke in Avstrije (Oetzal in Dunaj). Večje genetske razdalje so prisotne v razmerju do populacij JV. Evrope, in sicer Makedonije in nato Albanije.

D. Genetske razdalje/HLA-DRB1

HLA-DRB1 data (stress=0.06087)

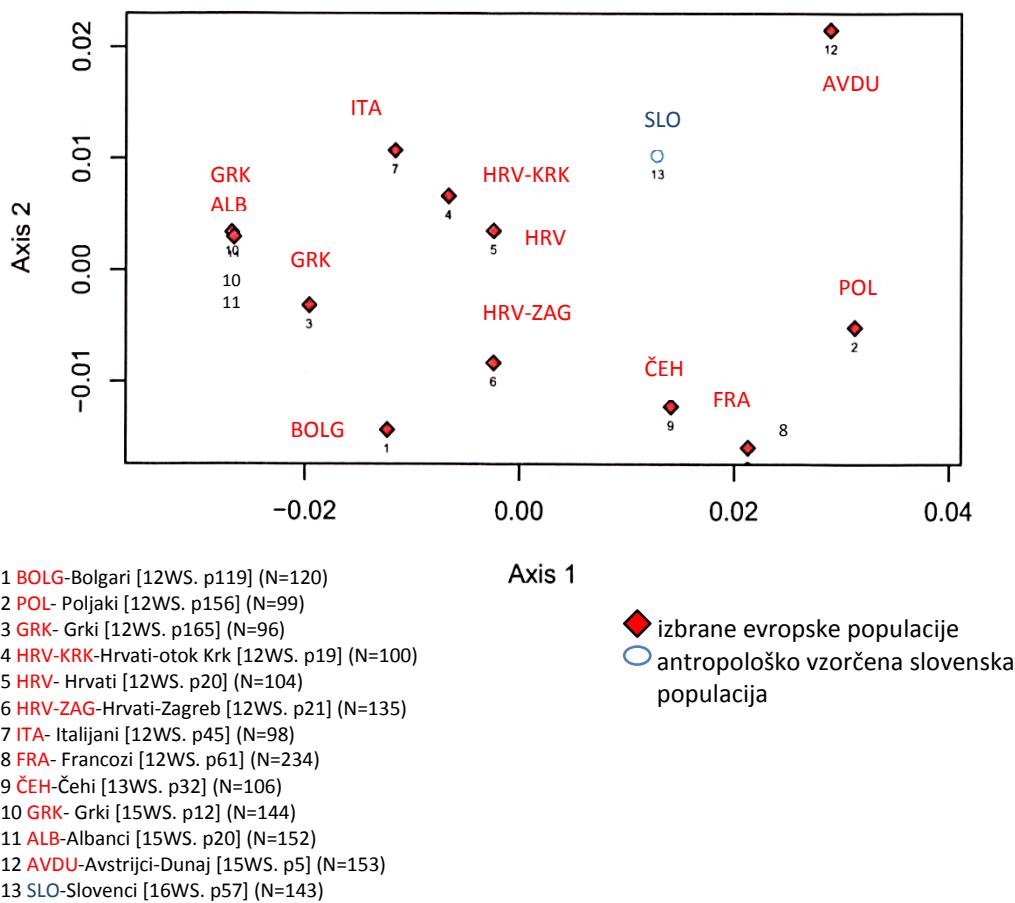


Graf 11: 2D prikaz genetskih razdalj v lokusu HLA-DRB1 med izbranimi evropskimi populacijami

Glede na lokus HLA-DRB1 je največja sorodnost opazna s češko in avstrijsko populacijo (Dunaj) ter v nekoliko manjši meri s poljsko populacijo. Med populacijami JV Evrope se najmanjše genetske razdalje pojavljajo s hrvaško populacijo ter naraščajo z geografsko razdaljo v smeri južne osi, kar se odraža v večjih genetskih razdaljah s populacijama Romunije in Grčije. Večja genetska razdalja je opazna tudi s hrvaško populacijo, vzorčeno na otoku Krku; ta je posebna v tem, da se v veliki meri razlikuje tudi od celinske hrvaške populacije. Tudi v primeru lokusa HLA-DRB1 je razvidno porazdeljevanje zahodno in srednjeevropskih ter populacij JV. Evrope na različnih straneh grafa, s Slovenijo v vmesnem prostoru, vendar z večjo genetsko podobnostjo s populacijami Srednje Evrope.

E. Genetske razdalje/HLA-DQB1

HLA-DQB1 data (stress=0.09138)

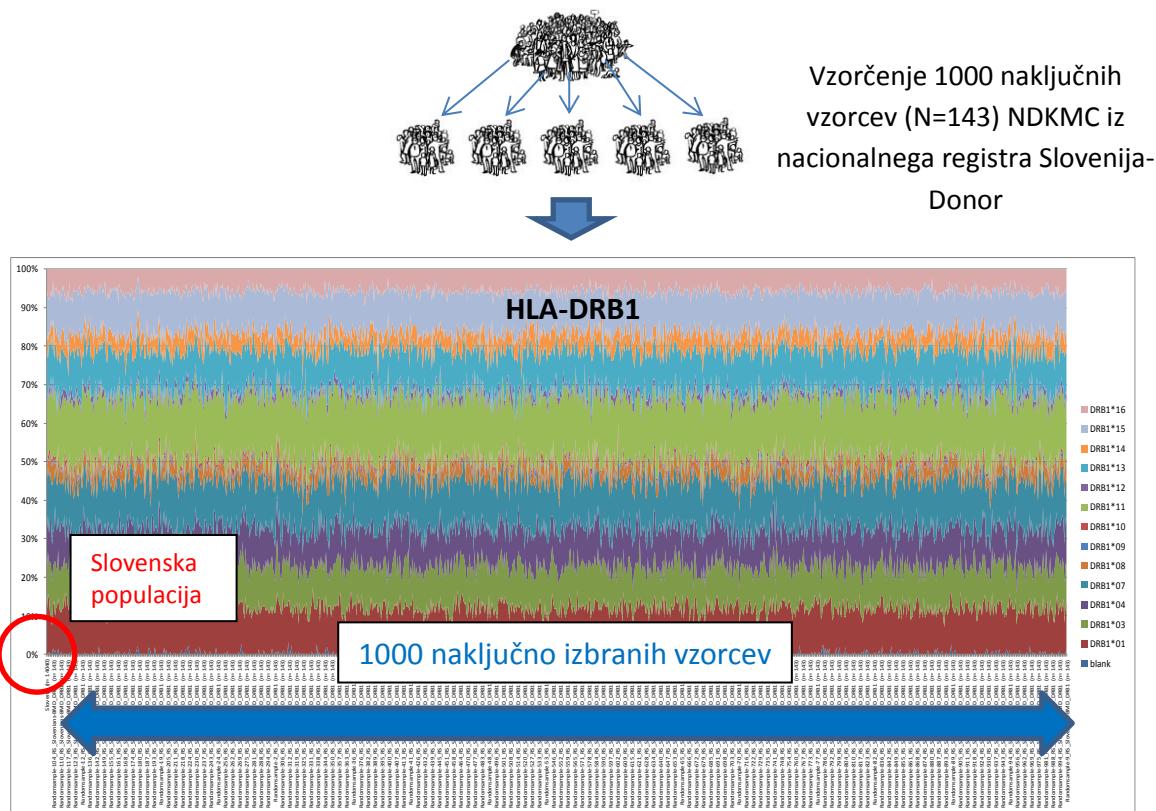


Graf 12: 2D prikaz genetskih razdalj v lokusu HLA-DQB1 med izbranimi evropskimi populacijami

Opazne so približno enake genetske razdalje med Slovenci in populacijama Avstrije in Poljske na eni strani in treh hrvaških, češke ter italijanske na drugi strani. Največje genetske razdalje se ponovno pojavljajo v razmerju do populacij s področja Balkana.

4.2.5 Primerjava pogostnosti pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in nacionalnim registrom Slovenija-Donor

Rezultati statistične analize so pokazali, da pogostnosti pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 ne odstopajo od HWE v nobenem od naključno izbranih tisočih vzorcev NDKMC iz nacionalnega registra Slovenija-Donor, zato lahko s stališča HWE, te v naključnih vzorcih registra interpretiramo kot zanesljive. Izследki primerjave z izračunom indeksa fiksacije (F_{ST}) so pokazali, da med naključno izbranimi vzorci registra in AVSP ni statistično značilnih razlik v pogostnosti pojavljanja preiskovanih tipov HLA. Na podlagi omenjenega lahko nacionalni register Slovenija-Donor obravnavamo kot reprezentativen za AVSP. Shematski prikaz načina vzorčenja tisoč naključnih vzorcev iz nacionalnega registra Slovenija-Donor in izpis primerjave za tip HLA-DRB1 sta prikazana na Sliki 16.



Slika 16.: Shematski prikaz načina vzorčenja tisoč naključnih vzorcev iz nacionalnega registra Slovenija-Donor in izpis primerjave med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in nacionalnim registrom Slovenija-Donor za tip HLA-DRB1 (prirejeno po literaturi 57)

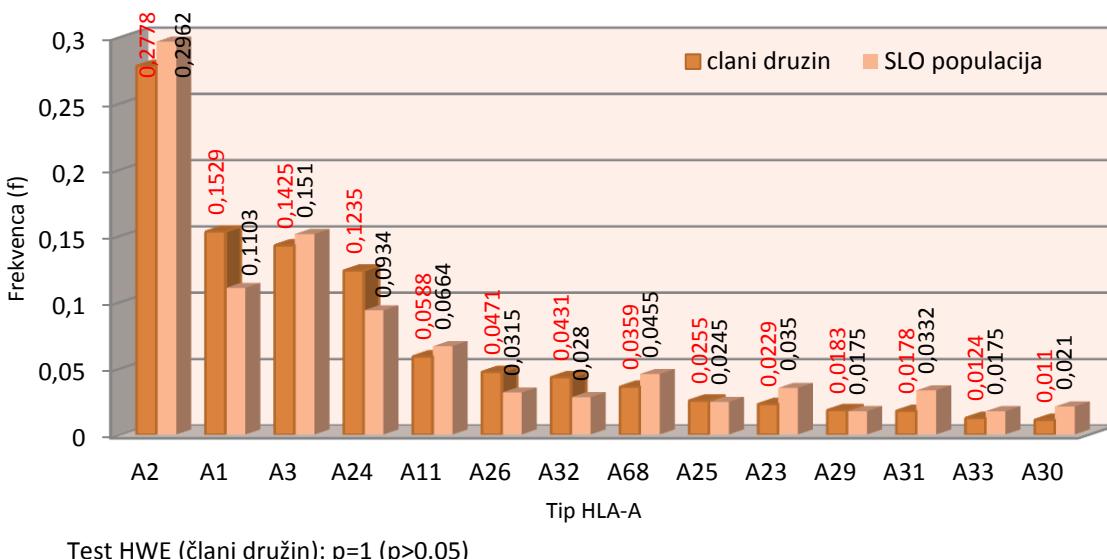
4.3 Statistična analiza tipov HLA-A, -B in -DRB1 v slovenskih družinah

4.3.1 Pogostnost pojavljanja tipov HLA v slovenskih družinah in primerjava z antropološko vzorčeno slovensko populacijo

Rezultati pogostnosti pojavljanja tipov HLA v vzorcu članov slovenskih družin, katerih vrednosti so višje od 0,01, so grafično prikazani z Grafi 8-10. V sklopu grafičnih prikazov so podani tudi rezultati testiranja HWE, ki niso pokazali značilnega odstopanja pogostnosti pojavljanja določenih parametrov. Tipi HLA s pogostnostjo pojavljanja manj kot 0,01 so navedeni v Prilogi C.

Za primerjavo pogostnosti pojavljanja posameznih tipov HLA v vzorcu članov slovenskih družin s tistimi v AVSP, smo grafične prikaze opremili z vrednostmi pogostnosti pojavljanja posameznih tipov HLA obeh vzorčenih skupin. Ker je bila AVSP, za razliko od vzorca članov slovenskih družin, tipizirana z metodama visoke stopnje ločljivosti, smo v namen zanesljive primerjave, pogostnosti pojavljanja alelov znotraj posameznega tipa HLA v vzorcu slovenske populacije sešteli. Kadar je bila razlika v pogostnosti pojavljanja posameznega tipa HLA med preiskovanima vzorcema večja od 2%, smo statistično značilnost te razlike preverili s testom hi-kvadrat (χ^2 test).

A.Pogostnost pojavljanja tipov HLA-A

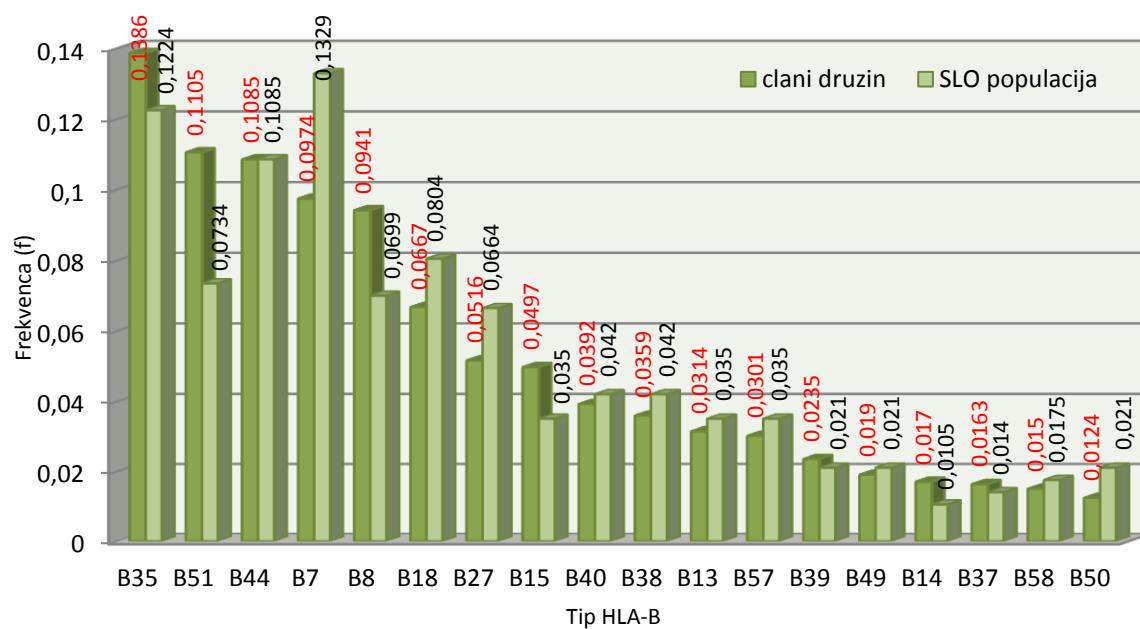


Graf 8: Primerjava pogostnosti pojavljanja tipov HLA-A med člani slovenskih družin in antropološko vzorčeno slovensko populacijo

V vzorcu članov slovenskih družin smo opazili 19 različnih tipov HLA-A, med katerimi je po pogostnosti pojavljanja močno prevladoval tip HLA-A2 ($f=0,278$). Kljub temu se A2 pri članih slovenskih družin pojavi za približno 2% manj kot v AVSP. Po pogostnosti pojavljanja mu sledita A1 ($f=0,153$) in A3 ($f=0,143$). Njuno razmerje je pri članih družin ravno obratno od tistega, opaženega v AVSP. Prav tako je pogostnost pojavljanja tipa A1 je pri članih družin za 4% višja. S pogostnostjo pojavljanja nad 0,05 se pojavljata še tipa A24 ($f=0,124$) in A11 ($f=0,059$). Čeprav se vrednosti pogostnosti pojavljanja za tip A24 v obeh skupinah razlikujeta za več kot 2%, se le-ta v obeh skupinah pojavlja kot četrti najpogosteji antigen.

S testom hi-kvadrat za več kot 2% razlike v pogostnosti pojavljanja tipov A2, A1, A24 in A31 med preiskovanima vzorcema nismo potrdili statistične značilnosti ($p>0,05$). Za omenjene tipe HLA-A so bile izračunane vrednosti p naslednje: A2 ($p=0,709$), A1 ($p=0,202$), A24 ($p=0,276$) in A31 ($p=0,201$).

B. Pogostnost pojavljanja tipov HLA-B



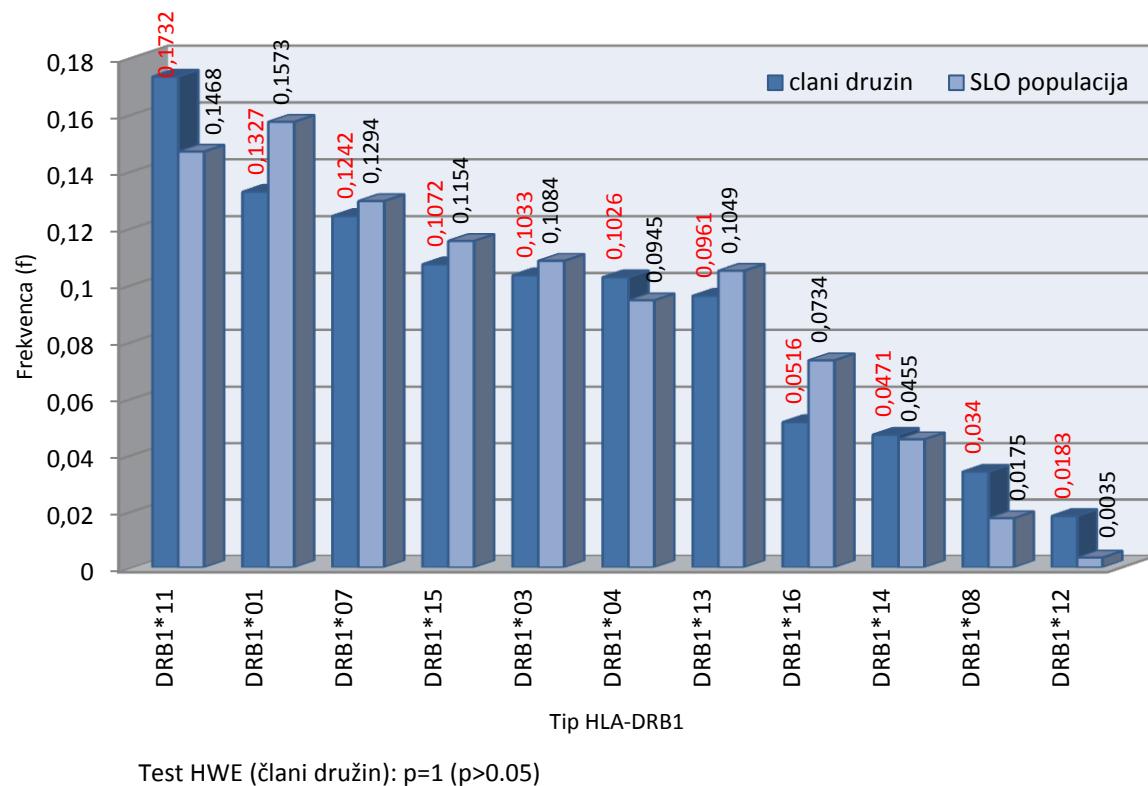
Test HWE (člani družin): $p=1$ ($p>0,05$)

Graf 9.: Primerjava pogostnost pojavljanja tipov HLA-B med člani slovenskih družin in antropološko vzorčeno slovensko populacijo

V primeru HLA-B se največje razlike med preiskovanima vzorcema odražajo v porazdelitvi tipov s pogostnostjo pojavljanja nad 5%. Med 29 tipi HLA-B, po pogostnosti

pojavljanja, v obeh preiskovanih vzorcih izstopa B35 ($f=0,139$). Drugi najpogostejsi tip B51 ($f=0,111$), je v AVSP šele peti najpogostejsi. Odstopanja med obema vzorcema so najbolj opazna v primeru tipa B7; ta je najpogosteje opaženi tip HLA-B v AVSP, medtem ko je pri članih slovenskih družin četrti najpogostejsi. V primerih omenjenih tipov HLA-B so bile razlike v pogostnostih pojavljanja med preiskovanima vzorcema med 3 in 4%. Prav tako smo v slovenskih družinah večkrat določili tip B8 ($f=0,094$), medtem ko se B44, presenetljivo, v obeh vzorcih pojavlja z enako pogostnostjo ($f=0,109$). Med tipi HLA-B, prikazanimi v spodnji polovici grafa (pod 5%) med primerjanima skupinama nismo opazili razlik, ki bi bile večje od 2%. Vzorca sta se v pogostnostih pojavljanja tipov B35, B51, B7, B8 in B18 razlikovala za 2% ali več, vendar pa test hi-kvadrat ni potrdil statistično značilnost opaženih razlik med preiskovanima vzorcema. Izračunane vrednosti p za omenjene tipe HLA-B so bile naslednje: B35 ($p=0,685$), B51 ($p=0,222$), B7 ($p=0,209$), B8 ($p=0,343$) in B18 ($p=0,456$).

B. Pogostnost pojavljanja tipov HLA-DRB1



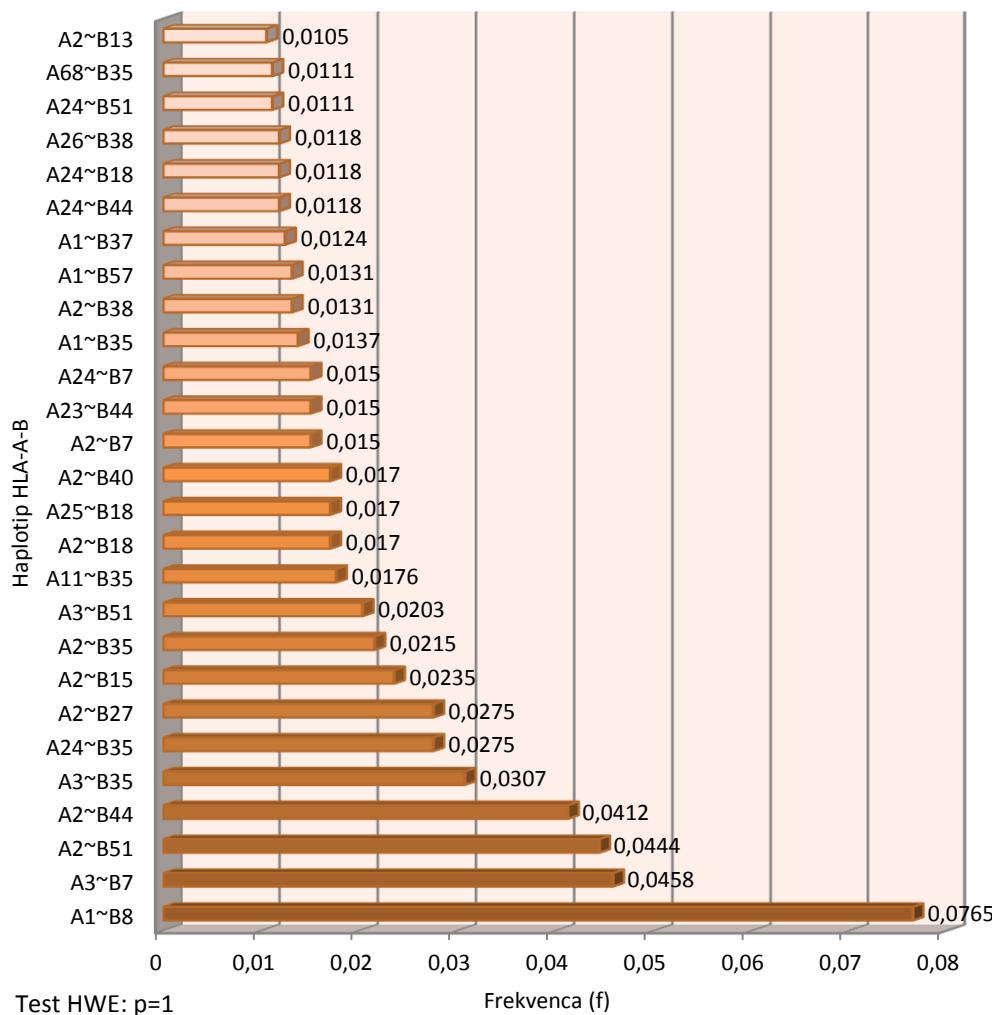
Graf 10: Primerjava pogostnosti pojavljanja tipov HLA-DRB1 med člani slovenskih družin in antropološko vzorčeno slovensko populacijo

Pri članih slovenskih družin smo zasledili 13 različnih tipov HLA-DRB1. Prevladuje DRB1*11 ($f=0,173$), katerega pogostnost pojavljanja je za 2,6% večja od tiste v AVSP, sledita mu DRB1*01 ($f=0,133$), DRB1*07 ($f=0,124$). Omenjeni trije tipi HLA-DRB1 so v AVSP ravno tako med prvimi tremi najpogostejšmi, le da za 2,5% prevladuje DRB1*01, ki mu sledi DRB1*11 ($f=0,1468$). S pogostnostjo pojavljanja okoli 0,10 smo pri članih družin opazili tipe DRB1*15, DRB1*03, DRB1*04 in DRB1*13. Tipa DRB1*16 in DRB1*14 se pojavljata s pogostnostjo približno 0,05, prvega smo nekoliko pogosteje (2,18%) opazili v AVSP kot pri članih slovenskih družin. Razlike, večje od 2%, in sicer v tipih DRB1*11, DRB1*01, DRB1*16, DRB1*08 in DRB1*12, se niso izkazale za statistično značilne. Izračunane vrednosti p so bile naslednje: DRB1*11 ($p=0,451$), DRB1*01 ($p=0,381$), DRB1*16 ($p=0,240$), DRB1*08 ($p=0,417$) in DRB1*12 ($p=0,330$). Razlik v pogostnostih pojavljanja, ki bi presegale 2% med tipi HLA-DRB1 v preiskovanima vzorcema nismo zasledili. Najmanjkrat se pri članih družin pojavita DRB1*08 ($f=0,034$) in DRB1*12 ($f=0,018$), slednji v AVSP ne presega 1% praga pogostnosti pojavljanja.

4.3.2 Pogostnost pojavljanja haplotipov HLA v slovenskih družinah

Pogostnosti pojavljanja dvolokusnih haplotipov v vzorcu članov slovenskih družin statistično značilno ne odstopajo od HWE in jih kot take lahko štejemo za zanesljive. Podatka o odstopanju trilokusnih haplotipov od HWE nismo mogli pridobiti, zaradi napake v delovanju statističnega programa. Primerjave porazdelitve pogostnosti pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA v vzorcu članov slovenskih družin s tistimi v AVSP ni bilo možno izvesti, zaradi odstopanja ključnih dvolokusnih haplotipov slovenske populacije od HWE. Dvo in trilokusnih haplotipov HLA s pogostnostjo pojavljanja večjo od 0,01 prikazujejo Grafi 11-14. Dvolokusni haplotipi z manjšo pogostnostjo so navedeni v Prilogi D, medtem ko trilokusnih haplotipov s pogostnostjo manj kot 0,01, zaradi preobsežnega števila haplotipov nismo posebaj navedli.

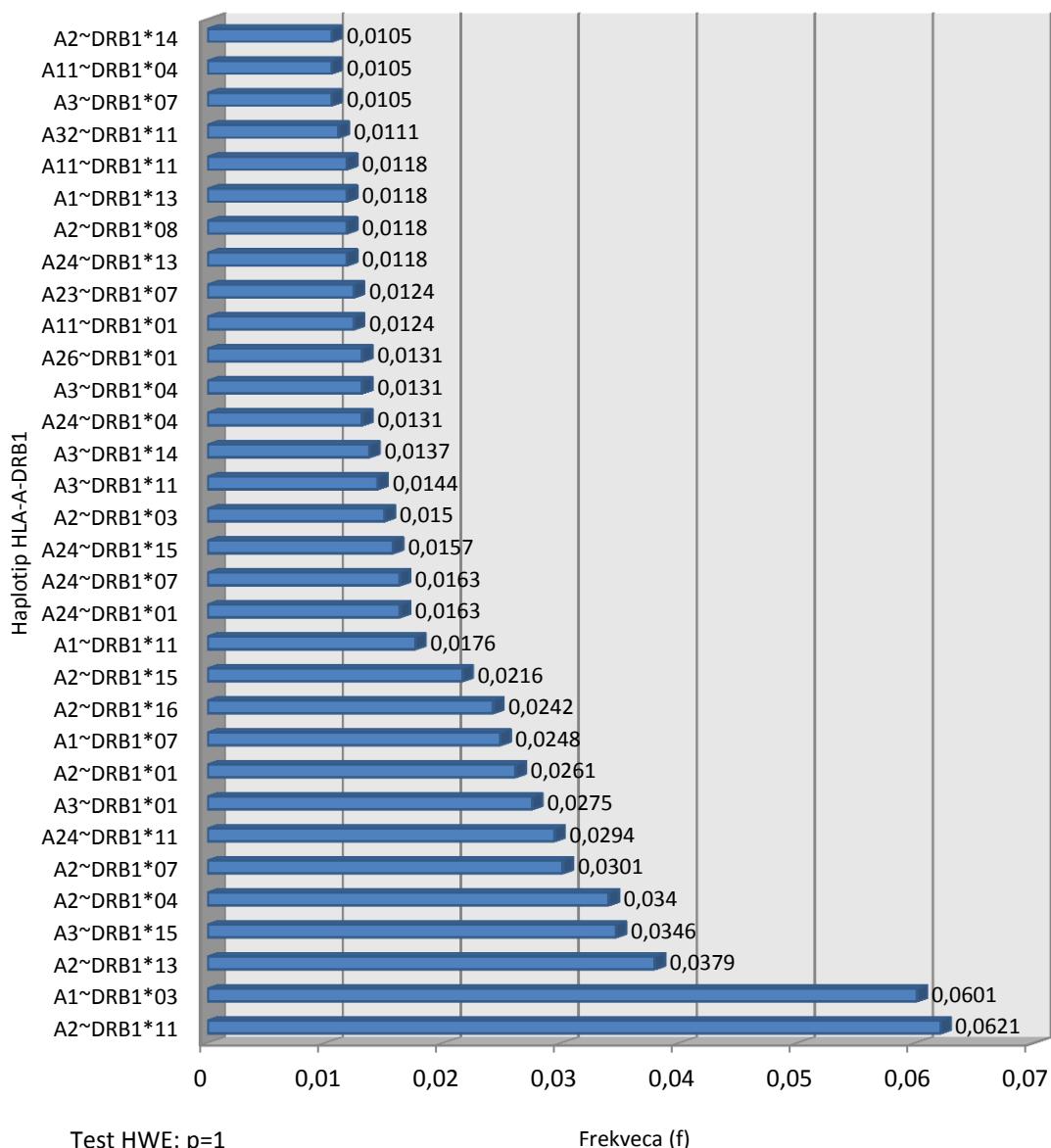
A. Pogostnost pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-A-B



Graf 11:Pogostnost pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-A-B v slovenskih družinah

V vzorcu članov slovenskih družin smo zasledili 215 haplotipov HLA-A-B, med katerimi močno izstopa dvolokusni haplotip A1-B8 ($f=0,077$), na drugem mestu mu sledi A3-B7 ($f=0,046$) in na tretjem mestu A2-B51 ($f=0,044$). Haplotype A2-B44 se pojavlja z pogostnostjo $f=0,041$. S pogostnostjo pojavljanja med 0,04 in 0,01 zasledimo veliko število različnih haplotipov.

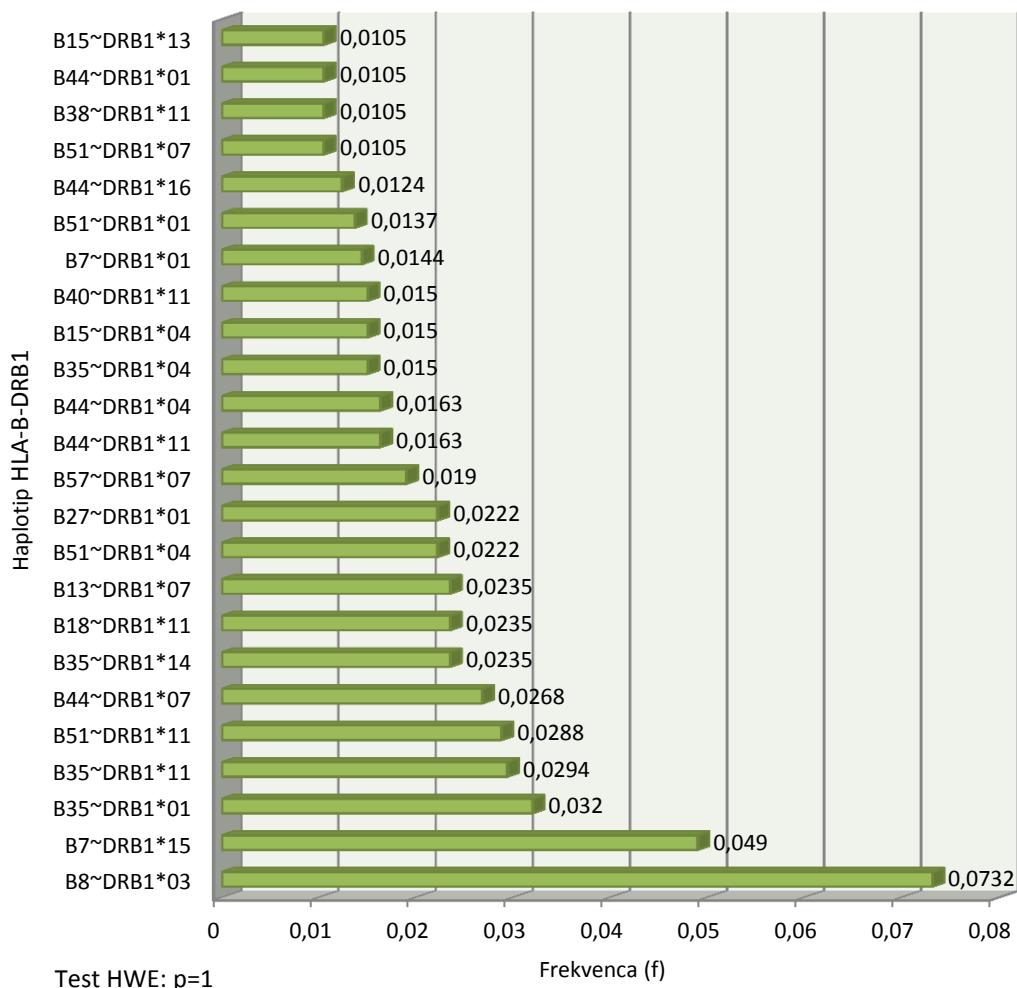
B. Pogostnost pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-A-DRB1



Graf 12: Pogostnost pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-A-DRB1 v slovenskih družinah

S prevladujočo pogostnostjo pojavljanja v slovenskih družinah zasledimo dva haplotipa, in sicer A2-DRB1*11 ($f=0,062$) in A1-DRB1*03 ($f=0,060$). Podobno kot v primeru haplotipov HLA-A-B zasledimo zelo veliko število haplotipov (157), vendar pa se velika večina teh pojavlja s pogostnostjo pod 0,04.

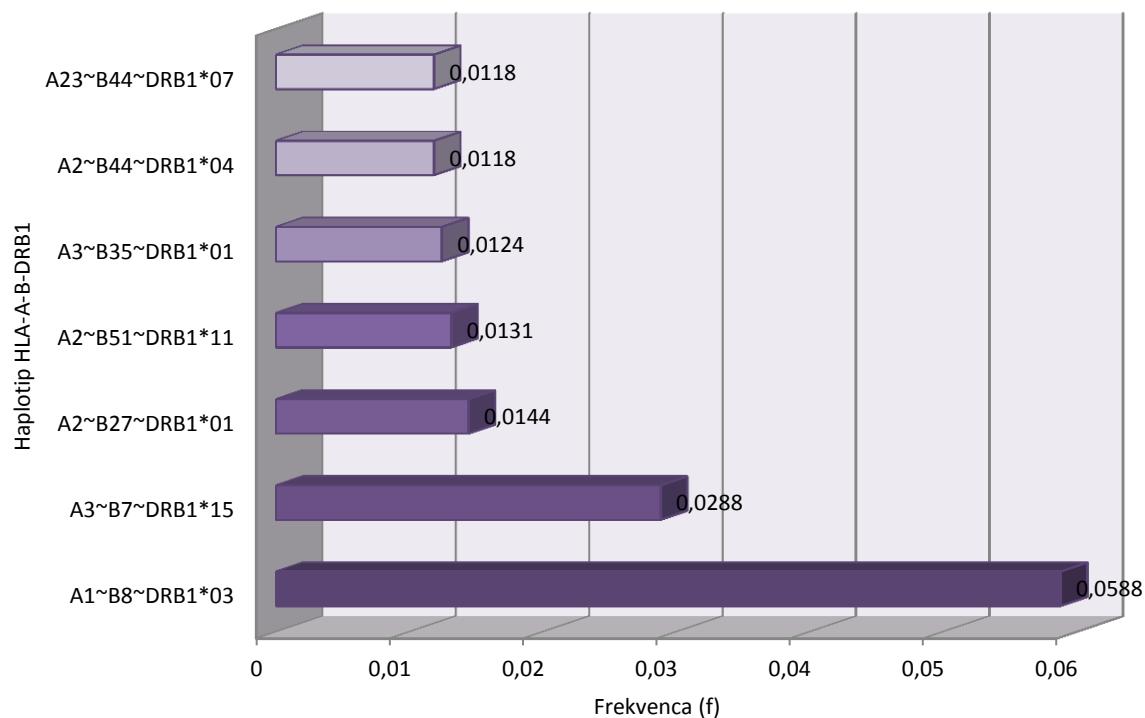
C. Pogostnost pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-B-DRB1



Graf 13: Pogostnost pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-B-DRB1 v slovenskih družinah

Med 202 haplotipi je najpogostešji dvolokusni haplotip B8-DRB1*03 ($f=0,073$), ki mu sledi B7-DRB1*15 ($f=0,049$). Pod to mejo se pojavlja množica različnih dvolokusnih haplotipov.

D. Pogostnost pojavljanja trilokusnih haplotipov HLA-A-B-DRB1



Graf 14: Pogostnost pojavljanja trilokusnih haplotipov HLA-A-B-DRB1 v slovenskih družinah

V vzorcu slovenskih družin smo zasledili kar 611 različnih trilokusnih haplotipov HLA-A-B-DRB1, vendar pa se s pogostnostjo pojavljanja med 0,06 in 0,01 pojavlja zgolj 7 haplotipov med katerimi močno prevladuje haplotip A1-B8-DRB1*03, ki mu sledi A3-B7-DRB1*15.

4.3.3 Vezavno neravnovesje dvolokusnih haplotipov HLA v slovenskih družinah

Testirali smo vezavno neravnovesje (LD) dvolokusnih haplotipov, ki je prisotno, kadar je razlika (D) med opazovano ali dejansko in pričakovano pogostostjo pojavljanja haplotipa različna od nič ($D \neq 0$). Poleg testiranja LD za posamezne dvolokusne haplotipe HLA, smo z metodo testiranja razmerij verjetnosti in večkratnega vzorčenja testirali tudi t.i. globalno vezavno neravnovesje (angl. *global Linkage Disequilibrium-gLD*) med dvema lokusoma HLA. Rezultati obeh metod testiranja gLD so se izkazali za primerljive.

Preglednice X-XII prikazujejo rezultate testiranj, in sicer prvi dve vrstici prikazujeta rezultate testiranja gLD z obema metodama, četrta in peta kolona pa rezultate testiranja LD za posamezne dvolokusne haplotipe (vrednosti-D) ter prispeveke posameznih dvolokusnih haplotipov k gLD (STDRES).

Preglednice prikazujejo le dvolokusne haplotipe z opazovanimi pogostnostmi pojavljanja večjimi od 0,01. Dvolokusni haplotipi in pripadajoče vrednosti D, ki smo jih komentirali v nadaljevanju so označeni rdeče.

Preglednica X.: Vezavno neravnovesje dvolokusnih haplotipov HLA-A-B

METODA 1.:	TEST RAZMERJA VERJETNOSTI	vrednost p za 551 haplotipov: 0,04184047		
METODA 2.:	VEČKRATNO VZORČENJE	opazovana vrednost p: kvantil 999 od 1000 simulacij		
HAPLOTIP (H)	OPAZOVANA f (OBS.)	PRIČAKOVANA f (EXP.)	RAZLIKA (D)	STANDARDNI PREOSTANEK (STDRES)
A1~B8	0,0765	0,01438789	0,062112	20,10835
A3~B7	0,0458	0,0138795	0,031921	10,52431
A25~B18	0,017	0,00170085	0,015299	14,49808
A2~B51	0,0444	0,0306969	0,013703	3,011945
A2~B27	0,0275	0,01433448	0,013166	4,270292
A23~B44	0,015	0,00248465	0,012515	9,8088
A2~B44	0,0412	0,0301413	0,011059	2,453709
A3~B35	0,0307	0,0197505	0,01095	3,017305
A24~B35	0,0275	0,0171171	0,010383	3,077515
A26~B38	0,0118	0,00169089	0,010109	9,608011
A1~B37	0,0124	0,00249227	0,009908	7,753191
A2~B15	0,0235	0,01380666	0,009693	3,204468
A11~B35	0,0176	0,00814968	0,00945	4,077979
A1~B57	0,0131	0,00460229	0,008498	4,888312
A68~B35	0,0111	0,00497574	0,006124	3,387563
A2~B40	0,017	0,01088976	0,00611	2,277808
A3~B51	0,0203	0,01574625	0,004554	1,40825
A24~B18	0,0118	0,00823745	0,003563	1,529023
A2~B38	0,0131	0,00997302	0,003127	1,218656
A24~B7	0,015	0,0120289	0,002971	1,053227
A2~B13	0,0105	0,00872292	0,001777	0,741002
A2~B18	0,017	0,01852926	-0,00153	-0,43535

A24~B44	0,0118	0,01339975	-0,0016	-0,53693
A24~B51	0,0111	0,01364675	-0,00255	-0,8469
A1~B35	0,0137	0,02119194	-0,00749	-1,99161
A2~B7	0,015	0,02705772	-0,01206	-2,82819
A2~B35	0,0215	0,03850308	-0,017	-3,32353

Lokusa HLA-A in HLA-B sta v statistično značilnem gLD, saj je vrednost p pri testu razmerja verjetnosti pod 0,05 in pri metodi večkratnega vzorčenja večja od kvantila 950. Med dvolokusnimi haplotipi v vzorcu družinskih članov največje LD izkazuje dvolokusni haplotip A1-B8. V Evropi se kombinacija A1-B8 najpogosteje pojavlja kot del ancestralnega haplotipa A1-B8-DR3, katerega pogostnost pojavljanja močno prevladuje tudi v našem vzorcu. Dvolokusni haplotip B8-DRB1*03, ki tvori drugi del ancestralnega haplotipa, izkazuje še večjo stopnjo LD (Preglednica XII) kot A1-B8. Opazovane pogostnosti pojavljanja teh haplotipov so veliko večje od pričakovanih, zato haplotipske povezave med A1, B8 in DRB1*03, zasledimo pogosteje kot bi to pričakovali glede na posamične pogostnosti pojavljanja teh tipov HLA v danem vzorcu in njihovega naključnega razporejanja v haplotipe.

Drugo najvišjo vrednost LD izkazuje dvolokusni haplotip A3-B7, ki smo ga v vzoru članov slovenskih družin največkrat opazili kot del drugega najpogostejšega ancestralnega haplotipa A3-B7-DR15. Tudi v tem primeru izkazuje haplotip B7-DRB1*15 večje LD kot haplotipa A3-B7 ter A3-DRB1*15 (Preglednici XI in XII). Med dvolokusnimi haplotipi z visokim pozitivnim LD izstopa tudi haplotip A25-B18.

Med dvolokusnimi haplotipi HLA-A-B imajo haplotipi A1-B8, A3-B7 in A25-B18 najvišje vrednosti STDRES in zato najbolj prispevajo k statistično značilnemu gLD. Najvišjo vrednost negativnega LD pa smo opazili pri haplotipu A2-B35. Zaradi negativnega LD je verjetnost, da bomo A2 in B35 opazili skupaj v istem haplotipu, manjša od pričakovane. Ta haplotip z najnižjo vrednostjo STDRES najmanj prispeva k statistično značilnem gLD.

Preglednica XI.: Vezavno neravnovesje dvolokusnih haplotipov HLA-A-DRB1

METODA 1.:	TEST RAZMERJA VERJETNOSTI	vrednost p za 247 haplotipov: 1		
METODA 2.:	VEČKRATNO VZORČENJE	opazovana vrednost p : kvantil 0 od 1000 simulacij		
HAPLOTIP (H)	OPAZOVANA f (OBS.)	PRIČAKOVANA f (EXP.)	RAZLIKA (D)	STANDARDNI PREOSTANEK (STDRES)
A1~DRB1*03	0,0601	0,01579457	0,04430543	13,68017479
A3~DRB1*15	0,0346	0,015276	0,019324	6,068693176
A2~DRB1*11	0,0621	0,04811496	0,01398504	2,433109276
A2~DRB1*13	0,0379	0,02669658	0,01120342	2,646017078
A2~DRB1*16	0,0242	0,01433448	0,00986552	3,199922849
A23~DRB1*07	0,0124	0,00284418	0,00955582	6,998688287
A3~DRB1*01	0,0275	0,01890975	0,00859025	2,420266028
A24~DRB1*11	0,0294	0,0213902	0,0080098	2,119164866
A3~DRB1*14	0,0137	0,00671175	0,00698825	3,32532358
A26~DRB1*01	0,0131	0,00625017	0,00684983	3,378454912
A1~DRB1*07	0,0248	0,01899018	0,00580982	1,633354786
A2~DRB1*04	0,034	0,02850228	0,00549772	1,255478918
A11~DRB1*01	0,0124	0,00780276	0,00459724	2,027765711
A11~DRB1*04	0,0105	0,00603288	0,00446712	2,242833324
A32~DRB1*11	0,0111	0,00746492	0,00363508	1,639532547
A24~DRB1*15	0,0157	0,0132392	0,0024608	0,830992504
A2~DRB1*08	0,0118	0,0094452	0,0023548	0,943264341
A11~DRB1*11	0,0118	0,01018416	0,00161584	0,623101308
A24~DRB1*07	0,0163	0,0153387	0,0009613	0,301268563
A24~DRB1*04	0,0131	0,0126711	0,0004289	0,14808993
A24~DRB1*13	0,0118	0,01186835	-6,84E-05	-0,024394755
A24~DRB1*01	0,0163	0,01638845	-8,85E-05	-0,026803186
A3~DRB1*04	0,0131	0,0146205	-0,0015205	-0,488261846
A2~DRB1*14	0,0105	0,01308438	-0,00258438	-0,87794139
A1~DRB1*13	0,0118	0,01469369	-0,00289369	-0,926868055
A2~DRB1*07	0,0301	0,03450276	-0,00440276	-0,911001993
A3~DRB1*07	0,0105	0,0176985	-0,0071985	-2,09769285
A2~DRB1*15	0,0216	0,02978016	-0,00818016	-1,826329255
A1~DRB1*11	0,0176	0,02648228	-0,00888228	-2,106514335
A3~DRB1*11	0,0144	0,024681	-0,010281	-2,527976549
A2~DRB1*01	0,0261	0,03686406	-0,01076406	-2,15210788
A2~DRB1*03	0,015	0,02869674	-0,01369674	-3,116908612

Lokusa HLA-A in -DRB1 za dani nabor podatkov nista v gLD. Četudi posamezni dvolokusni haplotipi izkazujejo določeno stopnjo LD, so vrednosti STDRES teh dvolokusnih haplotipov majhne in ne prispevajo k statistično značilnemu gLD. Splošno gledano so vrednosti LD za dvolokusne haplotipe HLA-A-DRB1 manjše. Vzrok temu je večja genska razdalja med lokusoma HLA-A in -DRB1 in s tem večja verjetnost naključne rekombinacije v vmesnem genskem prostoru, ki zmanjšuje LD med dvema genoma in vodi v pojav novih haplotipov.

LD dvolokusnih haplotipov A1-DRB1*03 in A3-DRB1*15 so opisana v kontekstu razlage Preglednice X. Poleg omenjenih haplotipov smo visoko stopnjo LD opazili tudi za haplotipa A2-DRB1*11 in A2-DRB1*13.

Pregledica XII.: Vezavno neravnovesje dvolokusnih haplotipov HLA-B-DRB1

METODA 1.:	TEST RAZMERJA VERJETNOSTI	vrednost p za 377 haplotipov: 5.995204e-15		
METODA 2.:	VEČKRATNO VZORČENJE	opazovana vrednost p: kvantil 999 od 1000 simulacij		
HAPLOTIP (H)	OPAZOVANA f (OBS.)	PRIČAKOVANA f (EXP.)	RAZLIKA (D)	STANDARDNI PREOSTANEK (STDRES)
B8~DRB1*03	0,0732	0,00972053	0,06347947	25,06183826
B7~DRB1*15	0,049	0,01044128	0,03855872	14,68291342
B13~DRB1*07	0,0235	0,00389988	0,01960012	12,25265824
B35~DRB1*14	0,0235	0,00652806	0,01697194	8,189604654
B27~DRB1*01	0,0222	0,00684732	0,01535268	7,232319615
B57~DRB1*07	0,019	0,00373842	0,01526158	9,74513497
B35~DRB1*01	0,032	0,01839222	0,01360778	3,888525167
B44~DRB1*07	0,0268	0,0134757	0,0133243	4,459316982
B18~DRB1*11	0,0235	0,01155244	0,01194756	4,3227975
B51~DRB1*04	0,0222	0,0113373	0,0108627	3,967827256
B15~DRB1*04	0,015	0,00509922	0,00990078	5,409450321
B51~DRB1*11	0,0288	0,0191386	0,0096614	2,705418887
B40~DRB1*11	0,015	0,00678944	0,00821056	3,884384222
B44~DRB1*16	0,0124	0,0055986	0,0068014	3,545562751
B15~DRB1*13	0,0105	0,00477617	0,00572383	3,231862958
B35~DRB1*11	0,0294	0,02400552	0,00539448	1,345437179

B44~DRB1*04	0,0163	0,0111321	0,0051679	1,905199272
B38~DRB1*11	0,0105	0,00621788	0,00428212	2,117527066
B7~DRB1*01	0,0144	0,01292498	0,00147502	0,504201073
B35~DRB1*04	0,015	0,01422036	0,00077964	0,253906872
B51~DRB1*01	0,0137	0,01466335	-0,00096335	-0,308891199
B44~DRB1*11	0,0163	0,0187922	-0,0024922	-0,704401529
B51~DRB1*07	0,0105	0,0137241	-0,0032241	-1,06908317
B44~DRB1*01	0,0105	0,01439795	-0,00389795	-1,261486037

Genska lokusa HLA-B in -DRB sta za dani nabor podatkov v statistično značilnem globalnem vezavnem neravnovesju.

Rezultati testiranja LD prvih dveh najpogostejših dvolokusnih haplotipov HLA-B-DRB1 so opisani v kontekstu razlage Preglednice X. Veliko razliko med dejansko in pričakovano pogostnostjo pojavljanja smo opazili tudi pri haplotipu B13-DRB1*07, ki se glede na vrednost LD uvršča takoj za haplotipoma B8-DRB1*03 in B7-DRB1*15.

4.4 Relativni delež alelov znotraj alelnih skupin HLA-B*44:02:01G in HLA-DRB1*14:01:01G ter primerjava z evropskimi populacijami

V vzorcu 306-ih preiskovancev s tipom HLA-B*44 in 142-ih preiskovancev s tipom HLA-DRB1*14 smo z uporabljenimi metodami tipizacije določili prisotnost 6 alelov HLA-B*44 od 172 ter 3 alele HLA-DRB1*14 od 140, določljivih alelov HLA-B*44 in DRB1*14. Alele in njihove relativni deleže (v %) v vzorcu prikazuje Preglednica XIII.

Relativni delež preiskovanih alelov B*44:02 in B*44:27 ter DRB1*14:01 in DRB1*14:54 znotraj alelnih skupin HLA-B*44:02:01G in HLA-DRB1*14:01:01G, skupaj s primerjavo z evropskimi populacijami, je predstavljen v Preglednici XIV.

Preglednica XIII.: Relativni delež alelov HLA-B*44 in -DRB1*14 v preiskovanem vzorcu

ALEL HLA-B*44	N	Relativni delež (%)
B*44:02	145	47,4
B*44:03	84	27,5
B*44:04	1	0,3
B*44:05	32	10,5
B*44:21	3	0,9
B*44:27	41	13,4
VSOTA	Σ 306	Σ 100
ALEL HLA-DRB1*14	N	Relativni delež (%)
DRB1*14:01	108	22,5
DRB1*14:54	32	76,1
DRB1*14:04	2	1,4
VSOTA	Σ 142	Σ 100

V preiskovanem vzorcu se z največjo pogostnostjo pojavlja alel B*44:02. Pogosta sta tudi alela B*44:03 in B*44:05, ki se od B*44:02 razlikujeta v funkcionalno pomembnih drugem in tretjem eksonu ter ju, za razliko od B*44:27, z molekularnimi metodami tipizacije lahko ločimo od B*44:02 brez uporabe dodatnih metod. Alela B*44:04 in B*44:21 smo v preiskovanem vzorcu zasledili redkeje.

Preglednica XIV.: Relativni delež alelov znotraj alelnih skupin HLA-B*44:02:01G in HLA-DRB1*14:01:01G v različnih evropskih populacijah (prirejeno po literaturi 48)

VZOREC	N	ALELNA SKUPINA HLA-B*44:02:01G	
		B*44:02	B*44:27
Ciper-Grki	21	100	0
Italija	87	100	0
Francija	409	99,98	0,02
Švica	100	99	1
Portugalska	81	93,82	6,17
Slovenija	186	77,96	22,04
Bolgarija	57	63,18	36,82

Nadaljevanje Preglednice XIV.:

VZOREC	N	ALELNA SKUPINA HLA-DRB1*14:01:01G	
		DRB1*14:01	DRB1*14:54
Bolgarija	85	52,9	47,1
Ciper-Grki	43	34,9	65,1
Grki	84	33,5	66,5
Italija	104	28,8	71,2
Slovenija	140	22,9	77,1
Švica	235	11	89
Finska	20	10	90
Francija	185	9,7	90,3
Hrvaška	34	8,8	91,2
Avstриja	100	6	94

Rezultati primerjav kažejo veliko variabilnost relativnih deležev alelov znotraj skupin HLA-B*44:02:01G in HLA-DRB1*14:01:01G med analiziranimi populacijami. Najvišji relativni delež alela B*44:27 je prisoten v slovenski in bolgarski populaciji, medtem ko se je v populacijah Francije in Švice izkazal za zelo redkega, v populacijah Italije in Grčije pa ga sploh niso zasledili.

Alel DRB1*14:01 se v visokem relativnem deležu pojavlja pri Bolgarih, Grkih, Italijanh in Slovencih, medtem ko je v ostalih preiskovanih populacijah prisotnost tega alela veliko manjša.

5. RAZPRAVA

Razvoj in začetek množične uporabe molekularnih metod tipizacije genov HLA na visoki stopnji ločljivosti je razkril izjemno razsežnost alelnega polimorfizma sistema HLA, ki je številne strokovnjake s področja HLA spodbudila k še bolj poglobljenemu preučevanju genov HLA in pridobitvi podrobnejšega vpogleda v razlike v genih HLA, tako med posamezniki kot tudi populacijami.

V antropološko definirani slovenski populaciji 143-ih nesorodnih posameznikov smo raziskavo polimorfizma genov HLA na alelni ravni izvedli v sklopu projekta HLA-NET in 16. IHWS, in sicer s tipizacijo genov HLA I. in II. razreda na visoki stopnji ločljivosti s kombinacijo metod PCR-SBT in PCR-SSP.

Z namenom primerjave pogostnosti pojavljanja tipov HLA med antropološko definirano populacijo in naključno izbranimi preiskovanci iz istega geografskega področja smo raziskavo razširili na vzorca prostovoljnih NDKMC iz nacionalnega registra Slovenija-Donor in članov slovenskih družin, ki smo jih v Centru za tipizacijo tkiv obravnavali v sklopu rutinskega iskanja sorodnega darovalca KMC. Z oceno genetskih razdalj med AVSP in izbranimi evropskimi populacijami smo želeli pridobiti vpogled v podobnost profilov HLA med njimi. Raziskavo smo zaključili z določitvijo relativnih deležev posameznih alelov znotraj alelnih skupin B*44:02:01G in DRB1*14:01:01G in primerjavo le-teh z evropskimi populacijami.

5.1 Določanje tipa HLA na ravni alelne skupine G v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

Določanje tipa HLA na visoki stopnji ločljivosti z metodo klasičnega sekvenciranja po Sangerju velikokrat spremljajo številni dvoumni rezultati, kar pomeni, da je za določitev pravilnega tipa HLA na ravni alelne skupine G potrebno izključiti vse preostale možne kombinacije alelov, in sicer predvsem tiste, ki vključujejo alele z razlikami v funkcionalno in klinično pomembnem eksonu/-ih. Določanje tipa HLA na ravni alelne skupine G pri 143-ih članih slovenske populacije je spremljalo skupno 1544 dvoumnih rezultatov, in sicer 879 pri sekvenciranju genov HLA I. razreda ter 665 pri sekvenciranju genov HLA II. razreda. Za njihovo razrešitev smo opravili skupno 509 dodatnih tipizacij PCR-SSP na visoki stopnji ločljivosti. Prav tako smo opravili 103 dodatne tipizacije PCR-SSP na nizki

stopnji ločljivosti v namen potrjevanja homozigotnih rezultatov sekvenciranja. Zaradi obsežnosti dvoumnih rezultatov predstavlja njihovo razreševanje in določitev pravilnega tipa HLA pogosto velik, tako časovni, kot tudi finančni izliv številnim laboratorijem.

Pri določanju alelnega polimorfizma genov HLA I. in II. razreda v AVSP smo največje število dvoumnih rezultatov, kljub večjemu polimorfizmu genov HLA I. razreda, opazili pri sekvenciranju gena HLA-DRB1, in sicer skupno 637. Pri genu HLA-DRB1 je največja stopnja polimorfizma zastopana v drugem eksonu, ki ga sekvenciramo. Ta kodira funkcionalni del molekule, medtem ko je tretji ekson veliko manj polimorfen. Razlog za veliko število dvoumnih rezultatov pri sekvenciranju gena HLA-DRB1 gre lahko iskatи v določeni stopnji podobnosti nukleotidnih zaporedij drugega eksona alelov znotraj tipov DRB1*11, DRB1*03, DRB1*13, katerih alelne kombinacije so v AVSP pogoste. Tako smo tudi največ, in sicer 19 dvoumnih rezultatov opazili pri sekvenciranju alelnega para DRB1*03:01, DRB1*11:01, kar pomeni, da je 19 možnih kombinacij alelov oz. alelnih parov prispevalo enako skupno nukleotidno zaporedje (konsenzus sekvenca) drugega eksona kot pravilen alelni par DRB1*03:01, DRB1*11:01, zato je bilo za potrditev pravilnega alelnega para potrebno izvesti ustrezne tipizacije PCR-SSP na visoki stopnji ločljivosti.

Pri sekvenciranju genov HLA I. razreda smo zasledili skupno 342 dvoumnosti pri HLA-A, 331 pri HLA-B in 206 pri HLA-C, ki smo jih razrešili z dodatnimi tipizacijami genov HLA I. razreda na visoki stopnji ločljivosti. Tudi v tem primeru so bili alelni pari z največjim številom dvoumnih rezultatov tisti, ki so vključevali v AVSP pogoste tipe HLA, kot na primer A*02, B*44, B*51, C*07. Z rutinskim sekvenciranjem genov HLA-A, -B, -C smo zajeli funkcionalno in klinično pomembna drugi in tretji ekson, kjer je zastopan tudi največji delež polimorfnih mest.

Najmanše število dvoumnih rezultatov smo opazili pri sekvenciranju gena HLA-DQB1, ki se, v primerjavi z ostalimi preiskovanimi geni HLA, pojavlja v manjšem številu genskih različic.

H kompleksnosti določitve pravilnega tipa HLA dodatno prispevajo tudi dvoumni rezultati, ki vključujejo kombinacije alelov z razlikami izven drugega in/ali tretjega eksona in katerih klinični pomen še ni v celoti razjasnjen, ter dvoumni rezultati, katerih vzrok je nepoznan del sekvence določenega gena. Poleg dvoumnih rezultatov se pri sekvenciranju genov HLA srečujemo tudi z velikim številom ničelnih alelov. Za ničelne alele je značilno, da ne kodirajo s serološko tipizacijo določljivih molekul HLA na površini celic, saj se,

zaradi insercije, delecije ali točkovne mutacije v intronih ali eksonih genov HLA, v nukleotidno zaporedje alela vnese stop kodon (58). To lastnost ničelnih alelov smo izkoristili pri zaključevanju tipa HLA, saj smo lahko na podlagi rezultatov preteklih seroloških tipizacij, ki dokazujejo prisotnost določenega antiga, prisotnost ničelnih alelov HLA-A, -B, -C pri posameznih članih antropološko vzorčene slovenske populacije izključili. Izključevanje prisotnosti ničelnih alelov v tipu HLA posameznika je ključnega pomena pri transplantaciji KMC, saj lahko napaka pri potrditvi ničelnega alela oz. zamenjava z različico, ki se izraža, povzroči neujemanje para bolnik/NDKMC in stimulira alogene limfocite T, kar vodi v zavnitev presadka (59).

Največje število različnih ničelnih alelov smo opazili pri sekvenciranju gena HLA-A, in sicer 7, medtem ko pri sekvenciranju gena HLA-DQB1 nismo opazili nobenega. Ker so bili opaženi ničelni aleli, neizražajoče se različice v antropološko vzorčeni slovenski populaciji pogostih alelov HLA, kot so A*03:01, B*44:02, C*04:01 itd., je bilo število dodatnih tipizacij PCR-SSP za njihovo izključitev sorazmerno s pogostnostjo teh alelov v slovenski populaciji. Veliko ničelnih alelov smo lahko izključili že s sekvenciranjem drugega in tretjega eksona. Ničelne alele, ki se od izražajoče se alelne različice razlikujejo izven drugega in tretjega eksona, pa bi lahko izključili tudi s sekvenciranjem dodatnih eksonov ustreznega gena, za kar bi potrebovali ustrezne komercialne kiti.

Določitev pravilnega tipa HLA zahteva tudi potrjevanje homozigotnega rezultata sekvenciranja. Največje število tipizacij PCR-SSP na nizki stopnji ločljivosti, in sicer 30, smo opravili za potrditev homozigotnosti v alelih HLA-A, pri tem nam homozigotnosti ni uspelo potrditi v enem primeru. Ker lahko v tem primeru izključimo nizko koncentracijo ali razpadlo DNA, je najverjetnejši vzrok preferenčnega pomnoževanja specifičnega alela HLA sprememba v nukleotidnem zaporedju mesta naleganja specifičnega začetnega oligonukleotida in s tem onemogočeno pomnoževanje tega alela v reakciji PCR, ki je sestavni del procesa sekvenciranja (60).

Danes je klasično sekvenciranje po Sangerju zlati standard na področju tipizacije genov HLA, ki je pripomogel k odkritju več kot 8.000 alelov HLA I in II. razreda (61). Vendar pa, zaradi naraščajočega števila dvoumnih rezultatov, na področju sekvenciranja iščemo rešitve, s katerimi bi omejili zamudno in drago dodatno tipiziranje na visoki stopnji ločljivosti za razreševanje le-teh. V zadnjem času v ospredje prihajajo nove tehnologije t.i. Naslednje Generacije Sekvenciranja-NGS (angl. *Next Generation Sequencing*), ki obetajo

drastično zmanjšanje števila dvoumnih rezultatov in ničelnih alelov, vendar so te tehnologije še v procesu optimizacije in preizkušanja (61, 62).

5.2 Statistična analiza polimorfizma lokusov HLA-A, -B, -C, -DRB1 in -DQB1 v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

5.2.1 Pogostnost pojavljanja alelov HLA v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

V vzorcu slovenske populacije se je skladno s pričakovanji za najpogosteji alel izkazal A*02:01 ($f=0,28$), s pogostnostjo pojavljanja, ki presega tiste, opažene za ostale alele genov, tako HLA I. kot II. razreda. Tip A*02 je v svetovnem merilu eden najbolj razširjenih in polimorfnih, alel A*02:01 pa se z visoko pogostnostjo pojavlja tako pri Evropejcih, še posebaj z območij Srednje in Z. Evrope, kot tudi v populacijah evropskega izvora (54). Pogostnost pojavljanja alelov A*02:06, A*02:05 in A*02:02, ki so pogosti v azijskih in afriških populacijah, je v AVSP manjša od 0,01 (53, 63). Podobno kot alel A*02:01 sta tudi drugi in tretji najpogosteji alel v AVSP, in sicer A*03:01 ($f=0,137$) in A*01:01 ($f=0,110$), pogosta pri Evropejcih, kjer predvsem v severnoevropskih populacijah (Finska, Švedska) dosegata pogostnosti tudi nad 0,25 (53). Zaporedje pogostnosti pojavljanja tipov A*02, A*03 in A*01 je v skladu s predhodnimi ugotovitvami o polimorfizmu genov HLA pri Slovencih (9). Med pogosteje opaženimi aleli ($f>0,05$) v AVSP sta tudi alela A*24:02 ($f=0,093$) in A*11:01 ($f=0,066$), katera prav tako ne odstopata od poročanih pogostnosti pojavljanja v evropskih populacijah (53).

Pri analizi genskega lokusa HLA-B smo v AVSP opazili veliko heterogenost in enakomernejšo porazdelitev pogostnosti pojavljanja alelov HLA-B, saj za razliko od alelov HLA-A, kjer A*02:01 v zastopanosti močno prevladuje nad ostalimi aleli HLA-A, med najbolj zastopanimi aleli oz. alelnimi skupinami HLA-B, to so B*07:02G ($f=0,115$), B*18:01 ($f=0,080$), B*35:01G ($f=0,073$), B*51:01 ($f=0,073$) in B*08:01 ($f=0,069$), ni tako velikih razlik v pogostnosti pojavljanja. Vsi našteti aleli so pogosti v celotnem evropskem prostoru. Alel B*07:02 je najpogosteje opaženi alel v AVSP, ki se pri Evropejcih in populacijah evropskega izvora najpogosteje pojavlja kot del razširjenega ancestralnega haplotipa HLA-A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02 (64, 65). Drugi (B*51:01) in tretji (B*18:01) najpogostejsi alel v AVSP sta med pogosteje opaženimi aleli

tudi v mediteranskih državah in na področju Balkana, vendar pa sta pogostnosti pojavljanja obeh alelov bližje tistim opaženim v srednjevropskih populacijah (53). V AVSP sta pogosteje zastopana tudi alela B*35:01 in B*08:01, prvi je med pogostimi aleli na Finskem, Rusiji in državah v okolici Črnega morja (Romunija, Gruzija-Svaneti), medtem ko je B*08:01, kot del razširjenega haplotipa HLA-A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01, eden najbolj pogostih alelov v populacijah SZ. Evrope (Irska, Anglija, Belgija, Nemčija), kjer dosega pogostnost pojavljanja nad 0,10, ki pa upada v smeri proti Srednji in JV. Evropi (53).

Podobno kot v primeru genov HLA-A in -B smo tudi v prvih treh najbolj zastopanih alelnih skupinah HLA-C (C*04:01G, C*07:02G, C*07:01G) zasledili alele, ki se uvrščajo med najpogostejše v Evropi. Ti se, zaradi bližine genskih lokusov HLA-B in -C na kromosому, z aleli HLA-B pogosto povezujejo v značilne dvolokusne haplotipe HLA-B-C, ki izkazujejo visoko stopnjo vezavnega neravnovesja.

Med aleli genov HLA II. razreda smo pri Slovencih kot prve štiri najpogostejše zasledili DRB1*01:01 ($f=0,154$), DRB1*07:01 ($f=0,129$), DRB1*15:01 ($f=112$) in DRB1*03:01 ($f=0,108$), le-ti so zelo pogosti tudi v srednjevropskih populacijah. Najpogostejši alel pri Slovencih, HLA-DRB1*01:01, so glede na poročilo analize populacij 16. IHIWS s pogostnostjo pojavljanja nad 15% opazili le še v finski in ruski populaciji (66).

Z analizo polimorfizma alelov HLA-DQB1 smo ugotovili, da se pri Slovencih kot prvi trije najpogostejši aleli pojavljajo DQB1*03:01 ($f=0,183$), DQB1*05:01 ($f=0,162$) in DQB1*02:01 ($f=0,104$). Tudi ti aleli so zelo pogosto opaženi v ostalih evropskih populacijah. DQB1*03:01 je med pogosteje (pogostnosti pojavljanja nad 0,30) opaženimi aleli HLA-DQB1 v državah JV. Evrope, medtem ko se DQB1*05:01 in DQB1*02:01 pogosteje pojavljata v S., Z. in Srednji Evropi (53).

Podobno kot v primeru alelov HLA-B in HLA-C lahko tudi alele HLA-DRB1 in HLA-DQB1, zaradi bližine obeh genskih lokusov, pogosto opazimo v močnem vezavnem neravnovesju.

Izsledki analize polimorfizma genov HLA ter poznavanje haplotipskih povezav in vezavnih neravnovesij na ravni alela so neobhodni za učinkovito delovanje področij transplantacijske medicine, kjer je glavni namen pridobitev, v genih HLA čim bolj skladnega darovalca organa, tkiv ali KMC. Ustrezno vzorčena in optimalno tipizirana populacija pa je ključnega pomena tako z antropološkega vidika, kot tudi v raziskavah in diagnostiki z geni HLA povezanih bolezni.

5.2.2 Redki aleli HLA

Skupina, ki je v okviru 16. IHWS vodila projekt redkih alelov HLA, je nedavno objavila poročilo, iz katerega je razvidno, da je med vsemi aleli HLA, navedenimi v podatkovni bazi IMGT/HLA, kar 40,1% takšnih, ki so jih opazili le enkrat (le ena objava nukleotidnega zaporedja alela). Ti aleli HLA so zato obdržali klasifikacijo zelo redkih alelov. Odstotek redkih alelov HLA, ki so jih pri nesorodnih posameznikih, od prve objave njihovega nukleotidnega zaporedja dalje, opazili največ trikrat, je bil 28,3%, medtem ko je bil odstotek pogostih alelov, opaženih več kot trikrat, enak 31,5% (44). V AVSP nismo opazili zelo redkih ali redkih alelov HLA, medtem ko smo pri rutinskem delu v CTT odkrili tri redke alele HLA, ki smo jih v sklopu projekta HLA-NET poročali v podatkovno bazo AFND. Z razširitvijo preiskovanega vzorca in vpeljevanjem novosti na področju sekvenciranja genov HLA na visoki stopnji ločljivosti, kot so tehnologije t.i. Naslednje Generacije Sekvenciranja-NGS, ki temeljijo na hitrem, masivnem, paralelnem in klonskem sekvenciranju ter dodatnim sekvenciranjem nefunkcionalnih eksonov genov HLA, katerih klinični pomen še ni v celoti opredeljen, bi lahko možnost odkritja novih, zelo redkih in redkih alelov povečali (61, 62). Zaradi naraščajočega polimorfizma sistema HLA je zato v namen odkrivanja novih, zelo redkih in redkih alelov HLA, primernejše sekvenciranje velikega števila posameznikov, kot je to v primeru registrov NDKMC. Poleg omenjenega je pri odkrivanju zelo redkih in redkih alelov HLA, zaradi hitrosti naraščanja števila teh alelov, pomembno redno oz. sprotno posodabljanje nomenklature sistema HLA v t.i. knjižnicah alelov ali računalniških podatkovnih zbirkah, ki se uporabljajo za identifikacijo alelov pri sekvenciranju.

5.2.3 Pogostnost pojavljanja haplotipov HLA in vezavno neravnovesje v antropološko vzorčeni slovenski populaciji

Analizo haplotipskih povezav in vezavnih neravnovesij v AVSP nismo mogli izpeljati v celoti, saj so pogostnosti pojavljanja večine dvolokusnih haplotipov, razen HLA-B-C in HLA-DRB1-DQB1, odstopale od HWE, in sicer kljub temu, da pogostnosti pojavljanja alelov posameznih genov niso odstopale od HWE. Odstopanje od HWE je redkeje opaženo v velikih populacijah, kjer med spoloma ni razlik v pogostnosti pojavljanja alelov in ki v bližnji preteklosti niso bile podvržene večjim migracijam, velikemu številu mutacij, selekciji specifičnih alelov oz. genov HLA, nenaključnemu razmnoževanju. Razlogi za

odstopanja od HWE so največkrat napake pri tipizaciji in vzorčenju. Najverjetnejši razlog za odstopanje od HWE v našem primeru je majhna velikost AVSP, zato bi jo bilo, za pridobitev zanesljivejših izračunov pogostnosti pojavljanja haplotipov in vezavnega neravnovesja, potrebno povečati.

Zaradi bližine genskih lokusov HLA-B in -C ter HLA-DRB1 in -DQB1 na kromosomu, so aleli teh dveh genov pogosto v močnem vezavnem neravnovesju, kar se tudi v AVSP odraža v značilni porazdelitvi in pogostnostih pojavljanja dvolokusnih povezav med najpogostejšimi aleli HLA-B in HLA-C ter HLA-DRB1 in HLA-DQB1. Tako smo med prvimi tremi najpogostejšimi dvolokusnimi haplotipi HLA-B-C opazili tiste, ki so vključevali alele HLA-B in HLA-C z najvišjimi pogostnostmi pojavljanja v AVSP, in sicer B*07:02G-C*07:02G ($f=0,101$), B*35:01G-C*04:01G ($f=0,070$) in B*08:01-C*07:01G ($f=0,063$). Podobno smo tudi med najbolj zastopanimi dvolokusnimi haplotipi HLA-DRB1-DQB1 opazili tiste z najpogostejšimi aleli HLA-DRB1 in HLA-DQB1, in sicer DRB1*01:01-DQB1*05:01 ($f=0,150$), DRB1*03:01-DQB1*02:01 ($f=0,108$) in DRB1*15:01-DQB1*06:02 ($f=0,098$). Dvolokusni haplotipi B*07:02G-C*07:02G in DRB1*15:01-DQB1*06:02 ter B*08:01-C*07:01G in DRB1*03:01-DQB1*02:01 so med najbolj zastopanimi v vseh evropskih populacijah z največjimi pogostnostmi pojavljanja v S. Evropi in se največkrat pojavljajo skupaj kot del razširjenih, evolucijsko ohranjenih ancestralnih haplotipov A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02 ter A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01. Tudi B*35:01G-C*04:01G in DRB1*01:01-DQB1*05:01 sta pogosta v evropskem geografskem prostoru in ju prav tako lahko opazimo skupaj, toda v večjem številu možnih večlokusnih haplotipskih povezav, med katerimi, sta pri Evropejcih in populacijah evropskega izvora, najpogostejši A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQB1*05:01 in A*11:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQB1*05:01 (65, 67). Omenjeni dvolokusni haplotipi HLA-B-C na nizki stopnji ločljivosti so bili, med najpogostejšimi tremi, opaženi tudi v predhodni analizi polimorfizma genov HLA I. razreda v AVSP (2). Ker so, razen HLA-B-C in HLA-DRB1-DQB1, ostali dvolokusni haplotipi žal odstopali od HWE, nismo dobili natančnega vpogleda v pogostnosti pojavljanja tri in večlokusnih haplotipov v AVSP. Vendar pa smo tipe B8, B7 in B35 ter DRB1*03, DRB1*15 in DRB1*01 opazili v vzorcu članov slovenskih družin, in sicer povezane v trilokusne haplotipse A1-B8-DRB1*03, A3-B7-DRB1*15, ki sta prvi in drugi najpogostejši haplotip ter A3-B35-DRB1*01, ki je na petem mestu po zastopanosti v vzorcu članov slovenskih družin. Glede na to, da je bil vzorec

slovenskih družin, v pogostnostih pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 na nizki stopnji ločljivosti, reprezentativen, za AVSP ter vezavna neravnovesja med lokusi HLA-A, -B in -DRB1, bi lahko zgoraj omenjene trilokusne haplotipe s podobnimi pogostnostmi pojavljanja opazili tudi v AVSP.

Najverjetnejše so bili ti haplotipi tekom evolucije v določeni populaciji na določenem geografskem področju prednostno izbrani in jih zato v populaciji opazimo pogosteje, kot bi to pričakovali glede na opažene pogostnosti pojavljanja posameznih tipov HLA, ki te haplotipe sestavlja.

Iz izračunov pogostnosti pojavljanja dvolokusnih haplotipov je prav tako razvidno, da se določeni, v AVSP pogosti aleli HLA-B, -C, -DRB1 in -DQB1, kot na primer B*18:01, B*51:01, C*04:01G, C*07:01G, C*12:03, DRB1*07:01, DQB1*03:01 pojavljajo v več možnih haplotipskih povezavah. Ker imajo NDKMC velikokrat tipizirane le gene HLA-A, -B, -DRB1 na nizki stopnji ločljivosti, nam poznavanje pogostnosti pojavljanja haplotipskih povezav omogoča, da lahko že na podlagi osnovne tipizacije predvidimo, katero haplotipsko povezavo HLA-B-C in/ali HLA-DRB1-DQB1 lahko pričakujemo ob tipizaciji genov HLA NDKMC na visoki stopnji ločljivosti, kar znatno pospeši iskanje oz. izbiro ustreznega NDKMC.

5.2.4 Genetske razdalje med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in izbranimi evropskimi populacijami

Specifična geografska lega Slovenije in pesta zgodovina migracij skozi slovenski prostor sta še danes glavna razloga za deljena mnenja glede izvora Slovencev. Iz prikazov medpopulacijskih genetskih razdalj na MDS grafih lahko vidimo, da se populacije najpogosteje razporejajo glede na njihovo geografsko oddaljenost, tako lahko na eni strani opazimo populacije Srednje Evrope (Avstrija, Češka, Poljska) in na drugi populacije JV. Evrope (Bolgarija, Makedonija, Grčija, itd.), v vmesnem prostoru pa sta populaciji Slovenije in Hrvaške. Pri oceni genetskih razdalj smo opazili, da se le-te, med AVSP in posamezno izbrano populacijo, razlikujejo glede na opazovani genski lokus, kar je najverjetnejše posledica vpliva specifičnih seleksijskih pritiskov, in sicer različnih virusov na lokuse HLA I. razreda ter različnih bakterij na lokuse HLA II. razreda, značilnih za dani geografski prostor. Tako smo med AVSP in hrvaško populacijo opazili najkrajše genetske razdalje v lokusih HLA-A in HLA-DQB1. Žal, zaradi omejene razpoložljivosti podatkov

za hrvaško populacijo, izračun genetske razdalje med AVSP in hrvaško populacijo za lokus HLA-C ni bil možen. Kratke genetske razdalje med omenjenima populacijama so najverjetneje posledica geografske bližine, kar pogojuje podvženost enakemu naboru patogenov ter s tem selekcijskim pritiskom, ki so izoblikovali ustrezni in značilen nabor genov HLA v obeh populacijah. Poleg Hrvaške smo krajše genetske razdalje opazili še z geografsko bolj oddaljeno češko populacijo, in sicer so bile le-te najkrajše v lokusih HLA-B, -C in -DRB1. Čehe uvrščajo v etnično skupino Zahodnih Slovanov živečih na ozemlju Srednje Evrope (68, 69). Genetsko sorodnost med AVSP in češko populacijo si lahko razlagamo kot posledico migracij s širšega področja današnje Češke, in sicer so prve znane migracije s tega področja potekale že 1200 let pr. Kr. vzdolž jantarne poti (70).

Čeprav Slovence pogosto umeščajo v južnoslovansko etnično skupino, ki naj bi po propadu rimskega cesarstva, kot del Starih Slovanov iz Zakratja, v 6. stol. naselila območje Balkana in se razširila vse do ozemlja današnje Slovenije, bi lahko na podlagi dosedaj opaženih genetskih razdalj s češko populacijo sklepali na večjo verjetnost vpliva poseljevanja ozemlja Slovenije z zahodnoslovanskimi populacijami iz smeri Srednje Evrope kot z populacijami JV. Evrope (71, 72).

5.2.5 Primerjava pogostnosti pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in nacionalnim registrom Slovenija-Donor

Nacionalni register Slovenija-Donor sestavlja darovalci iz vseh regij Slovenije. Statistična analiza je pokazala, da le-ta v pogostnosti pojavljanja tipov HLA-A, -B, -DRB1 statistično značilno ne odstopa od AVSP. Različni nacionalni registri so, predvsem v državah podvrženih močnim migracijskim tokovom, lahko zelo etnično heterogeni in kot taki nereprezentativni za populacijo na danem območju, kar se odraža v naboru genov HLA, njihovi pogostnosti pojavljanja in haplotipskih povezavah.

Podobnost nacionalnega registra Slovenija-Donor in AVSP je za slovenskega bolnika v procesu iskanja skladnega NDKMC v domačem registru največkrat prednost. V primerih, kadar je bolnik pripadnik določene etnične manjšine ali migrant s svojevrstnim tipom HLA, pa lahko etnična homogenost registra postane tudi neugoden dejavnik, saj bo težko najti bolniku skladnega darovalca. Iskanje darovalca pa lahko oteži tudi rekombinacija genske snovi, ki privede do porušenja običajnega vezavnega neravnovesja med geni HLA.

Ker je najpomembnejši kriterij pri izbiri ustreznega NDKMC njegova skladnost v aleilih HLA z bolnikom, je vpogled v register s tipi HLA na nizki stopnji ločljivosti predvsem informativnega značaja in nam omogoča, da na podlagi znanih ter pričakovanih haplotipskih povezav in vezavnih neravnovesij ocenimo verjetnost pridobitve ustreznega NDKMC, saj se z večanjem stopnje ločljivosti in tipizacijo dodatnih genskih lokusov HLA, takšen potencialni NDKMC lahko velikokrat izkaže za neustreznega. Iz navedenih razlogov se strokovnjaki s področja HLA odločajo za intenzivnejše proučevanje, tako pogostnosti pojavljanja posameznih alelov HLA, kot tudi njihovih haplotipskih povezav ter vezavnega neravnovesja med genskimi lokusi HLA v registrih NDKMC, pri čemer jim je lahko v veliko pomoč tudi dobro vzorčena in tipizirana matična populacija (73).

5.3 Statistična analiza tipov HLA-A, -B in -DRB1 v vzorcu članov slovenskih družin

5.3.1 Pogostnost pojavljanja tipov HLA, haplotipske povezave in vezavno neravnovesje v slovenskih družinah ter primerjava z antropološko vzorčeno slovensko populacijo

V vzorcu članov slovenskih družin smo med prvimi tremi najbolj zastopanimi tipi HLA opazili A2 ($f=0,278$), A1 ($f=0,153$), A3 ($f=0,143$) med tipi HLA-A, tipe B35 ($f=0,139$), B51 ($f=0,111$), B44 ($f=0,109$) med tipi HLA-B ter DRB1*11 ($f=0,173$), DRB1*01 ($f=0,133$) in DRB1*07 ($f=0,124$) med tipi HLA-DRB1. Statistična analiza (test hi-kvadrat) je pokazala, da se vzorca članov slovenskih družin in AVSP statistično značilno ne razlikujeta v pogostnostih pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 na nizki stopnji ločljivosti in ga v tem pogledu lahko obravnavamo kot reprezentativnega za AVSP, kar kaže na to, da se je kljub migracijam oz. raznolikosti izvora prebivalcev v Sloveniji, najverjetneje ohranil določen nabor tipov HLA, ki se značilno ne razlikuje od tistega opaženega v AVSP. Vendar pa bi za podrobnejšo analizo in sklepanje potrebovali večje vzorce in dodatne tipizacije genov HLA na visoki stopnji ločljivosti. Analiza haplotipskih povezav je pokazala, da med dvolokusnimi haplotipi, v vzorcu članov slovenskih družin, z najvišjo pogostnostjo pojavljanja zasledimo haplotip A1-B8 ($f=0,077$), sledi mu haplotip B8-DRB1*03 ($f=0,073$). Med tipi HLA, ki sestavljajo zgoraj omenjene haplototipe smo opazili vezavna neravnovesja, katerih vrednosti so najvišje med tistimi določenimi za

dvolokusne haplotipe pri članih slovenskih družin, kar je tudi najverjetnejši razlog, da v istem vzorcu, med trilokusnimi haplotipi močno prevladuje haplotip A1-B8-DRB1*03 ($f=0,059$). Tudi drugi najpogostejsi trilokusni haplotip pri članih slovenskih družin A3-B7-DRB1*15 ($f=0,029$) prav tako tvorijo tipi HLA, ki se z močnimi vezavnimi neravnovesji povezujejo v pogosto opažene dvolokusne haplotipe A3-B7, A3-DRB1*15 in B7-DRB1*15. Omenjena trilokusna haplotipa se pojavljata kot razširjena ancestralna haplotipa, in sicer A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 in A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02 ter ju uvrščajo med najdaljše haplotipe HLA človeškega genoma, saj oba zavzemata približno 4,8Mb regije MHC (74). Haplotip A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 izkazuje izredno rezistenco na rekombinacijo in se je tekom evolucije pod vplivom seleksijskih dejavnikov razvil v prevladujoči haplotip Evropejcev ter populacij evropskega izvora z največjimi pogostnostmi pojavljanja v S. Evropi, kjer le-te dosegajo vrednosti tudi 0,10 ter ga že vrsto let povezujejo s številnimi avtoimunimi boleznimi kot so celiakija, diabetes tipa I, sistemski lupus eritomatozus itd. (75). Haplotipu A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02 pripisujejo vikingški izvor in se najpogosteje pojavlja v skandinavskih državah kot sta Švedska ($f=0,186$) in Finska ($f=0,144$) ter državah, ki so bile podvržene vikingškim vpadom in poseljevanju kot sta SZ. Anglija in J. Irska (12, 53).

Dvolokusna haplotipa HLA-B-C in HLA-DRB1-DQB1, ki tvorita del teh ancestralnih haplotipov se v AVSP pojavljata med prvimi tremi najbolj zastopanimi. Glede na znana močna vezava neravnovesja med tipi HLA-B in -C ter HLA-DRB1 in -DQB1 lahko sklepamo, da bi tudi v AVSP omenjena ancestralna haplotipa zasledili med najbolj pogostimi. Žal, zaradi odstopanja od HWE, podatkov o pogostnostih pojavljanja dvolokusnih haplotipov HLA-A-B, -B-DRB1 in -A-DRB1, njihovih vezavnih neravnovesij ter trilokusnih haplotipih v AVSP, nimamo. Tako tudi primerjave, v teh preiskovanih parametrih, z vzorcem članov slovenskih družin nismo mogli izvesti. Vendar pa bi glede na to, da lahko vzorec članov slovenskih družin opredelimo kot reprezentativen za AVSP v pogostnostih pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 na nizki stopnji ločljivosti, podobne rezultate lahko pričakovali tudi pri primerjavi pogostnosti dvo in trilokusnih haplotipskih povezav, ki vključujejo omenjene tipe HLA ter njihovih vezavnih neravnovesij med vzorcema.

Presenetljivo visoko stopnjo vezavnega neravnovesja smo v vzorcu članov slovenskih družin opazili tudi med tipoma A25 in B18, ki se običajno pojavljata kot del razširjenega

ancestralnega haplotipa HLA-A*25:01-B*18:01-C*12:03-DRB1*15:01-DQB1*06:02. Čeprav so pogostnosti pojavljanja tipov B*18, C*12 in DRB1*15 v AVSP in slovenskih družinah med višjimi, pa pri Slovencih haplotipskih povezav, ki bi vključevali omenjene tipe HLA nismo zasledili med najbolj zastopanimi. Med evropskimi populacijami so ta razširjeni haplotip pogosteje zasledili v poljski populaciji ($f=0,019$), in sicer predvsem na račun visoke pogostnosti pojavljanja alela A*25:01 ($f=0,063$), ki pa je pri Slovencih nižja ($f=0,024$) (76).

Med dvolokusnimi haplotipi z negativnim vezavnim neravnovesjem z visoko vrednostjo ($D=-0,017$) izstopa dvolokusni haplotip A2-B35. Glede na pogostnost pojavljanja je A2-B35 šele deveti od sedemindvajsetih dvolokusnih haplotipov, katerih pogostnost pojavljanja v vzorcu članov slovenskih družin je večja od 1%. Negativno vezavno neravnovesje med A2 in B35 nakazuje na to, da v naših preiskovanih vzorcih ta dva zelo razširjena tipa HLA veliko pogosteje tvorita haplotipske povezave z drugimi tipi HLA-A (npr. A3, A24) oz. HLA-B (npr. B51, B27, B44), katerih opazovane pogostnosti pojavljanja so zato posledično višje.

Pri primerjavi pogostnosti pojavljanja tipov HLA je potrebno upoštevati, da se določeni tipi HLA lahko pojavljajo v obliki številnih alelov, česar iz tipizacije na nizki stopnji ločljivosti ni možno razbrati. Takšen primer sta tudi B*35 in B*44, katerih aleli se pojavljajo z različno pogostnostjo v različnih populacijah ter z različnimi aleli HLA-A, -C, -DRB1 tvorijo haplotipe z različnimi stopnjami vezavnega neravnovesja. Stopnja ločljivosti uporabljene metode tipizacije genov HLA je zato ključnega pomena za težo primerjave, saj le s poznavanjem polimorfizma na visoki stopnji ločljivosti lahko dobimo natančnejši vpogled v porazdelitev haplotipskih povezav alelov HLA.

5.4 Relativni delež alelov znotraj alelnih skupin HLA-B*44:02:01G in HLA-DRB1*14:01:01G ter primerjava z evropskimi populacijami

Sekvenciranje genov HLA na visoki stopnji ločljivosti pogosto spremljajo dvoumni rezultati, katerih vzrok so lahko tudi medalerne razlike v nukleotidnem zaporedju izzven funkcionalnih eksonov genov HLA. Takšni dvoumni rezultati se pojavljajo tudi pri sekvenciranju alelnih parov, ki vključujejo alele B*44:02 ali B*44:27 (razlika v enem nukleotidu znotraj 4. eksona) ter DRB1*14:01 ali DRB1*14:54 (razlika v enem nukleotidu

znotraj 3. eksona). Po dogovoru in veljavnih standardih EFI lahko v takšnih primerih rezultat sekvenciranja zapišemo v obliki alelnih skupin G, in sicer B*44:02:01G ter DRB1*14:01:01G (51).

Razreševanje dvoumnih rezultatov znotraj alelnih skupin B*44:02:01G in DRB1*14:01:01G je pokazalo, da med populacijami obstajajo precejšnje razlike v relativnih deležih alelov B*44:02 in B*44:27 ter DRB1*14:01 in DRB1*14:54 znotraj njunih alelnih skupin, kar je potrdila tudi primerjalna raziskava med evropskimi populacijami, predstavljena v pričujočem delu (48). Iz izsledkov raziskave je namreč razvidno, da se pogostnosti pojavljanja teh alelov med evropskimi populacijami lahko razlikujejo za 30% in več. Pri Slovencih smo tako v primerjavi z ostalimi sodelujočimi populacijami opazili presenetljivo visok relativni delež alela DRB1*14:01 (22,9%), kot tudi alela B*44:27 (22%).

Ker v skladu z veljavnimi standardi dvoumnih rezultatov, ki so posledica razlik v nefunkcionalnih eksonih, ni potrebno razreševati, obstaja verjetnost, da bo med bolnikom in izbranim nesorodnim darovalcem NDKMC prisotno neujemanje v aleilih DRB1*14:01 in DRB1*14:54 ter B*44:02 in B*44:27. Prve retrospektivne raziskave posledic neujemanj v polimorfizmih izven eksonov, ki kodirajo vezavno mesto za peptid v molekulah HLA pri transplantiranih nesorodnih parih bolnik/darovalec KMC, so pokazale, da neujemanja nimajo bistvenega vpliva na izid presaditve KMC (46, 77, 78, 79).

Identifikacija točno določenega alela, poznavanje pogostnosti pojavljanja alelov znotraj alelnih skupin B*44:02:01G in DRB1*14:01:01G, njihovih haplotipskih povezav ter stopnje vezavnega neravnovesja z različnimi aleli genskih lokusov HLA, lahko v procesu iskanja skladnega NDKMC pripomorejo k hitrejšemu iskanju in pridobitvi optimalnega NDKMC tudi za bolnike z redkejšimi alelnimi različicami znotraj omenjenih alelnih skupin G ter njihovimi specifičnimi haplotipskimi povezavami.

6. SKLEPI

1. S sekvenciranjem po klasični Sangerjevi metodi (PCR-SBT) ter z uporabo metode PCR-SSP za razreševanje dvoumnih rezultatov v funkcionalno pomembnih eksonih in izključevanje prisotnosti ničelnih alelov, smo določili tipe HLA-A, -B, -C, -DRB1 in -DQB1 na ravni alelnih skupin G antropološko vzorčenim 143-im osebam slovenskega porekla. Določitev pravilnega tipa HLA je spremljalo skupno 1544 dvoumnih rezultatov, in sicer 879 pri sekvenciranju genov HLA I. razreda ter 665 pri sekvenciranju genov HLA II. razreda. Za razreševanje dvoumnih rezultatov smo opravili skupno kar 509 dodatnih tipizacij PCR-SSP na visoki stopnji ločljivosti. Največ dvoumnih rezultatov smo opazili pri sekvenciranju gena HLA-DRB1, najverjetneje zaradi podobnosti nukleotidnih zaporedij med aleli, v antropološko vzorčeni slovenski populaciji pogostih tipov HLA-DRB1, kot so DRB1*03, *11, *13. V sklopu raziskovalnega nismo potrdili prisotnosti nobenega ničelnega alela. Zaradi zamudnega in finančno zahtevnega razreševanja dvoumnih rezultatov iščemo rešitve v vpeljavi novih tehnologij sekvenciranja genov HLA, ki zagotavljajo manjše število dvoumnih rezultatov.

2. Analiza polimorfizma genov HLA I in II. razreda v antropološko vzorčeni slovenski populaciji je pokazala, da pogostnosti pojavljanja alelov preiskovanih genov HLA in dvolokusnih haplotipov HLA-B-C in HLA-DRB1-DQB1 ne odstopajo od HWE. Pogostnosti pojavljanja ostalih preiskovanih dvolokusnih haplotipov so od HWE odstopale, najverjetneje zaradi majhne velikosti antropološko vzorčene slovenske populacije. Med najpogosteje opaženimi aleli preiskovanih genov HLA-A, -B in -C so bili: A*02:01, A*01:01, A*03:01, B*07:02G, B*18:01, B*35:01G in B*51:01 ter C*04:01G, C*07:02G, C*07:01G, medtem ko so bili aleli DRB1*01:01, DRB1*07:01, DRB1*15:01 ter DQB1*03:01, DQB1*05:01, DQB1*02:01 najpogostejši aleli HLA-DRB1 in HLA-DQB1. Aleli HLA-B, -C, -DRB1 in -DQB1 so se v antropološko vzorčeni slovenski populaciji najpogosteje povezovali v dvolokusne haplotipe B*07:02G-C*07:02G, B*35:01G-C*04:01G in B*08:01-C*07:01G ter DRB1*01:01-DQB1*05:01, DRB1*03:01-DQB1*02:01 in DRB1*15:01-DQB1*06:02.

3. Z analizo polimorfizma genov HLA I. in II. razreda v antropološko vzorčeni slovenski populaciji nismo odkrili redkih alelov HLA, najverjetneje zaradi majhnega števila preiskovancev, smo pa tekom rutinskega dela zasledili tri redke alele HLA.

4. Opazili smo razlike v genetskih razdaljah med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in posamezno izbrano evropsko populacijo glede na opazovani genski lokus HLA, kar je najverjetneje posledica različnih selekcijskih pritiskov, ki v določenem geografskem prostoru delujejo na vsak posamezen genski lokus HLA posebaj. Ocena genetskih razdalj v genih HLA I. in II. razreda med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in izbranimi antropološko definiranimi evropskimi populacijami je pokazala največjo genetsko sorodnost oz. najmanjše genetske razdalje s populacijami Srednje Evrope (Češka, Avstrija) v genih HLA-B, -C in -DRB1 ter s hrvaško celinsko populacijo v genih HLA-A in -DQB1, medtem ko so bile ocenjene genetske razdalje s populacijami JV. Evrope večje.

5. Primerjava pogostnosti pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 med antropološko vzorčeno slovensko populacijo in nacionalnim registrom Slovenija-Donor (14040 NDKMC) je pokazala, da med vzorcema ni statistično značilnih razlik. Antropološko vzorčena slovenska populacija se prav tako statistično značilno ni razlikovala od vzorca 765 članov slovenskih družin. Nacionalni register Slovenija-Donor in vzorec članov slovenskih družin sta zato lahko reprezentativna za antropološko vzorčeno slovensko populacijo v pogostnostih pojavljanja tipov HLA-A, -B in -DRB1 na nizki stopnji ločljivosti. Posledično lahko tudi haplotipske povezave in vezavna neravnovesja, opažena v vzorcu članov slovenskih družin štejemo za reprezentativne za antropološko vzorčeno slovensko populacijo.

Analiza pogostnosti pojavljanja dvolokusnih haplotipov pri članih slovenskih družin in v antropološko vzorčeni slovenski populaciji je pokazala največjo zastopanost tistih, ki so izkazovali visoko stopnjo vezavnega neravnovesja, in obenem, v vzorcu članov družin, sestavljeni močno prevladajoči trilokusni haplotip HLA-A1-B8-DRB1*03 ter drugi najpogostejši trilokusni haplotip HLA-A3-B7-DRB1*15, ki ju uvrščajo med ancestralne haplotipe severnoevropskega izvora, ter sta pri Evropejcih in populacijah evropskega izvora najpogosteje opažena trilokusna haplotipa.

6. Primerjava relativnih deležev alelov HLA-B*44:02 in -B*44:27 ter HLA-DRB1*14:01 in -DRB1*14:54 je pokazala, da sta relativna deleža alelov B*44:27 in DRB1*14:01 v slovenskem vzorcu med večjimi glede na relativne deleže navedenih alelov v vzorcih drugih evropskih držav. Kljub temu, da dvoumnih rezultatov sekvenciranja alelov znotraj alelnih skupin B*44:02:01G in DRB1*14:01:01G ni potrebno razreševati in doslej opravljene raziskave, ki so zajele pare bolnik/NDKMC z neujemanji v omenjenih alelih, ne potrjujejo njihov vpliv na klinični izid presaditve KMC, bi bilo raziskavo, v namen optimizacije iskanja ustreznega NDKMC, v različnih populacijah smiselno razširiti na haplotipske povezave teh alelov (predvsem z aleli HLA-C in HLA-DQB1) ter izračun vezavnih neravnovesij.

7. Antropološko vzorčeno slovensko populacijo lahko glede na pogostnosti pojavljanja alelov HLA, njihovih haplotipskih povezav, kot tudi genetske razdalje od izbranih evropskih populacij umestimo v srednjeevropski prostor.

7. LITERATURA

1. The MHC sequencing consortium: Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 1999; 401: 921- 23,
<http://www.nature.com/nature/journal/v401/n6756/full/401921a0.html>
2. Tevfik Dorak M: Major Histocompatibility Complex,
<http://www.dorak.info/mhc/mhc.html>
3. Klein J, Sato A: The HLA System First of Two Parts. *N Engl J Med* 2000; 343:702-9
4. Mehra K. N , Kaur G: Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2003; 5: 1
http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_07/S1462399403005957sp001.pdf
5. Mehra K. N (Editor) : The Hla Complex in Biology and Medicine: A Resource Book, Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, 2010: 61-188
6. Naik S: The human HLA system. *J Indian Rheumatol Assoc* 2003; 11: 79-83
<http://medind.nic.in/jaa/t03/i3/jaat03i3p79.pdf>
7. Penn DJ : Major Histocompatibility Complex (MHC),
[http://web.udl.es/usuaris/e4650869/docencia/GenClin/content/recursos_classe_\(pdf\)/revisionsPDF/MHCcomplex.pdf](http://web.udl.es/usuaris/e4650869/docencia/GenClin/content/recursos_classe_(pdf)/revisionsPDF/MHCcomplex.pdf)
8. Choo SY: The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing and Clinical Implications. *Yonsei Med J.* 2007; 48(1): 11–23
9. Vidan-Jeras B: Vrednotenje uporabnosti statističnih metod populacijske genetike pri določanju polimorfizma genov HLA I. razreda v slovenski populaciji, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Magistrsko delo, 2002
10. <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>
11. Cavalli Sforza LL, Bodmer FW: The genetics of human population, W.H. Freeman & Company, San Francisco, 1971
12. Rodey G.E: HLA Beyond Tears: Introduction to Human Histocompatibility, Sec.edition, De Novo, Inc. Durango, CO, 2000
13. <http://www.qiagen.com/Knowledge-and-Support/Resource-Center/> -Instructions for Use-Olerup SSP HLA typing kits inkluding Taq polimerase
14. http://mediprotrans.net/DNA/Image/Artikel/RB_JLabMed_HLA_Diagnostic.pdf
15. https://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_041003.pdf

16. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>
17. Adams SD, Barracchini KC, Chen D, Robbins FM, Wang L, Larsen P, Luhm R, Stroncek DF: Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: when precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification. *Journal of Translational Medicine* 2004; 2:30
18. Reid GBR, Hetherington R: The climate connection: climate change and modern human evolution, Cambridge University Press., Cambridge, UK, 2010: 64
19. Marsh EGS, Parham P, Barber DL: The HLA Facts Book, Academic Press, London, San Diego, 2007: 73-8
20. Gibbons A: Who Were the Denisovans. *Science* 2011; 333: 1084-87
21. Parham P *et al.*:The Shaping of Modern Human Immune Systems by Multiregional Admixture with Archaic Humans. *Science* 2011; 334: 89-94
22. Green RE, Krause J *et. al.*: A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 2010; 328: 710-22
23. Sanchez-Mazas A, Fernandez-Viña M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, Di D, Rajalingam R, Dugoujon JM, Mack SJ, Thorsby E.: Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology* 2011; 133:143-64
24. Meyer D, Thomson G: How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. *Ann. Hum. Genet.* 2001; 65:1-26
25. Klein J: Natural History of the Major Histocompatibility Complex. John Wiley & Sons Inc., New York, 1986: 613
26. Tevfik Dorak M: Basic population genetics,
<http://www.dorak.info/genetics/popgen.html>
27. Sanchez-Mazas A, Lemaitre JF, Currat M: Distinct evolutionary strategies of human leucocyte antigen loci in pathogen-rich environments. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2012; 367: 830-39
28. Buhler S, Sanchez-Mazas A: HLA DNA Sequence Variantion among Human Population: Molecular Signatures of Demographic and Selective Events.*PloS ONE* 2011; 6(2):e14643. doi: 10.1371/journal.pone.0014643.
29. Chaix R, Cao C, Donnelly P. Is Mate Choice in Humans MHC-Dependent?. *PloS Genet* 2008; 4(9):e1000184. doi: 10.1371/journal.pgen.1000184.

30. Dolinar E: Frekvence antigenov in genov HLA-A in HLA-B pri 190 nesorodnih Slovencih, Univerza v Ljubljani, Diplomska naloga, 1982
31. Battelino T, Ursic-Bratina N, Dolzan V, Stopar-Obreza M, Pozzilli P, Krzisnik C, Vidan-Jeras B: The HLA-DRB, -DQB polymorphism and anti-insulin antibody response in Slovenian patients with type 1 diabetes. Eur J Immunogenet. 2003; 30(3): 223-7.
32. http://www.cost.eu/domains_actions/bmbs/Actions/BM0803
33. <http://hla-net.eu/>
34. <http://geneva.unige.ch/generate/>
35. Nunes JM: "Tools for Efficient HLA Data Handlings." In Immunobiology of the Human MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference, edited by JA Hansen, IHWG Press ,Seattle, WA, 2006: 143–47
36. ABSTRACTS Joint 16th International HLA and Immunogenetics Workshop, 26th European Federation for Immunogenetics Conference and 23rd British Society of Histocompatibility and Immunogenetics Conference, Liverpool, U.K. May 31st – June 3rd, 2012. Tissue Antigens 2012; 79(6): 399–597.
37. Pretnar J: Krvotvorne matične celice-pridobivanje, uporaba in posebnosti bolnikov po presaditvi, Zbornik predavanj 42. Strokovnega srečanja: Pridobivanje krvotvornih matičnih celic-zdravljenje in zdravstvena nega bolnika po presaditvi KMC, Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anasteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji, 2007, 22-25
38. Vidan-Jeras B: Testi tkivne skladnosti pred presaditvijo krvotvornih matičnih celic, Zbornik predavanj 42. Strokovnega srečanja: Pridobivanje krvotvornih matičnih celic-zdravljenje in zdravstvena nega bolnika po presaditvi KMC, Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anasteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji, 2007, 134-139
39. Tonejc M: Delovanje slovenskega registra prostovoljnih nesorodnih dajalcev KMC, Slovenija-Donor, Zbornik predavanj 42. Strokovnega srečanja: Pridobivanje krvotvornih matičnih celic-zdravljenje in zdravstvena nega bolnika po presaditvi KMC, Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anasteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji, 2007, 26-32
40. <http://www.bmdw.org/>

41. [http://www.ztm.si/sl/register_darovalcev_kmc/trenutno_stevilo_darovalcev_v_svetu_i
n_pri_nas/](http://www.ztm.si/sl/register_darovalcev_kmc/trenutno_stevilo_darovalcev_v_svetu_in_pri_nas/)
 42. Oudshoorn M, Horn P. A, Tilanus M. & Yu N.: Typing of potential and selected donors for transplant: methodology and resolution. *Tissue Antigens* 2007; 69: 10–12
 43. Middleton D. *et al.*: A bioinformatics approach to ascertaining the rarity of HLA alleles. *Tissue Antigens* 2009;74: 480-85
 44. Gonzalez-Galarza F F, Mack S J, Hollenbach J, Fernandez-Vina M, Setterholm M, Kempenich J, Marsh S G E, Jones A R, Middleton D and the HLA Rare Allele Consortium (2013), 16thIHIW: Extending the number of resources and bioinformatics analysis for the investigation of HLA rare alleles. *International Journal of Immunogenetics* 2013; 40: 60–65
 45. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/ambig.html>
 46. Xiao Y., Lazaro A. M., Masaberg C, Haagenson M, Vierra-Green C, Spellman S, Dakshanamurthy S, Ng J & Hurley C. K: Evaluating the potential impact of mismatches outside the antigen recognition site in unrelated hematopoietic stem cell transplantation: HLA-DRB1*1454 and DRB1*140101. *Tissue Antigens* 2009; 73: 595–98
 47. Fürst D, Solgi G, Schrezenmeier H, Mytilineos J: The frequency of DRB1*1454 in South German Caucasians. *Tissue Antigens* 2010; 76: 57–9
 48. Vidan-Jeras B, Dubois V, Grubic Z, Ligeiro D, Poli F, Buhler S, Tiercy JM: Resolution of HLA-DRB1*14:01:01G, DQB1*03:01:01G and B*44:02:01G ambiguities in 6 European population groups: High variability in relative ratios. *Tissue Antigens* 2012; 79(6): 565
 49. Schmidt AH, Baier D, Solloch VU, Stahr A, Cereb N, Wassmuth R, Ehninger G, Rutt C: Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Human Immunology* 2009; 70: 895-902
 50. <http://www.qiagen.com/Knowledge-and-Support/Resource-Center/> EZ1 DNA Blood Handbook- (EN)
 51. http://www.efiweb.eu/fileadmin/user_upload/pdf/EFI_Standards_v6_0_corrected.pdf
 52. <http://www.olerup-ssp.com/products/technical/instructions-for-use/>
 53. <http://www.allelefrequencies.net/default.asp>
-

54. Riccio M. E, Buhler S, Nunes J. M, *et al.*: 16th IHIW: Analysis of HLA Population Data, with updated results for 1996 to 2012 workshop data (AHPD project report). International Journal of Immunogenetics 2013; 40: 21–30
55. http://www.allelefrequencies.net/hla2003e.asp?axlab_authors=Blanka%20Vidan-Jeras
56. <http://www.allelefrequencies.net/hla6001d.asp>
57. Buhler S, Mendez A, Montanic S, Dolsak V, Jamnik K. S, Ambroz N, Sanchez-Mazas A, Nunes J, Vidan-Jeras B: The HLA genetic relationship between a well defined Slovenian population sample and the National Haematopoetic Stem Cell Donor Registry. Tissue Antigens 2013;81(5): 364
58. <http://hla.alleles.org/alleles/nulls.html>
59. Elsner H A, Blasczyk R: Immunogenetics of HLA null alleles: implications for blood stem cell transplantation. Tissue Antigens 2004; 64(6):687-95.
60. Walsh P S, Erlich H A, Higuchi R: Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. Genome Res. 1992; 1: 241-50
61. De Santis D, Dinauer D, Duke J, Erlich H A, Holcomb C L, Lind C, Mackiewicz K, Monos D, Moudgil A, Norman P, Parham P, Sasson A and Allcock R J N: 16th IHIW: Review of HLA typing by NGS. International Journal of Immunogenetics 2013; 40: 72–6
62. Erlich H: HLA DNA typing: past, present, and future. Tissue Antigens 2012; 80: 1–11
63. Chen KY, Liu J, Ren EC.: Structural and functional distinctiveness of HLA-A2 allelic variants. Immunol Res. 2012; 53(1-3):182-90
64. Askar M, Daghstani J, Thomas D, Leahy N, Dunn P, Claas F, Doran S, Saji H, Kanangat S, Karoichane M, Tambur A, Monos D, El-Khalifa M, Turner V, Kamoun M, Mustafa M, Ramon D, Gandhi M, Vernaza A, Gorodezky C, Wagenknecht D, Gautreaux M, Hajeer A, Kashi Z. and Fernandez-Vina M: 16th IHIW: Global distribution of extended HLA haplotypes. International Journal of Immunogenetics 2013; 40: 31–8.
65. [http://bioinformatics.nmdp.org/HLA/Haplotype Frequencies/High Res HLA Alleles US Pop/High- Resolution HLA Alleles and Haplotypes in the US Population.aspx](http://bioinformatics.nmdp.org/HLA/Haplotype_Frequencies/High_Res_HLA_Alleles_US_Pop/High-Resolution_HLA_Alleles_and_Haplotypes_in_the_US_Population.aspx)
66. <http://geneva.unige.ch/ahpd/One locus frequencies-and-stats graphs/>

67. http://www.allelefrequencies.net/hla6003a.asp?hla_locus1=&hla_locus2=B*35%3A01&hla_locus3=C*04%3A01&hla_locus4=DRB1*01%3A01&hla_locus5=&hla_locus6=&hla_locus7=&hla_locus8=&hla_population=&hla_country=&hla_dataset=&hla_region=&hla_ethnic=&hla_study=&hla_order=order_3&hla_sample_size_pattern=equal&hla_sample_size=&hla_sample_year_pattern=equal&hla_sample_year=&hla_loci=
68. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/548156/Slav#ref221385>
69. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/149085/Czech-Republic>
70. Bor M, Šavli J, Tomažič I: Veneti naši davní predníci, Editiones Veneti, Dunaj, 1989: 9-31
71. Štih P, Simoniti V: Na stičišču svetov: slovenska zgodovina od prazgodovinskih kultur do konca 18. Stoletja, Modrijan, Ljubljana, 2009: 26-8
72. Ivanič M: Kratka ilustrirana zgodovina Slovencev, Mladinska knjiga, Ljubljana, 1999: 10-14
73. Kemperle I, Montanič S, Jazbec J, Pretnar J, Vidan-Jeras B: Vpliv polimorfizma in rekombinacij v regiji HLA na izbiro darovalca krvotvornih matičnih celic za presaditev. Zdrav Vest 2012; 81(2): 361-72
74. Horton R, Gibson R, Coggill P, Miretti M, Allcock RJ, Almeida J, Forbes S, Gilbert JG, Halls K, Harrow JL, Hart E, Howe K, Jackson DK, Palmer S, Roberts AN, Sims S, Stewart CA, Traherne JA, Trevanion S, Wilming L, Rogers J, de Jong PJ, Elliott JF, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S: Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project. Immunogenetics 2008; 60(1): 1-18
75. Aly TA, Eller E, Ide A, Gowan K, Babu RS, Erlich AH, Rewers JM, Eisenbarth SG and Fain RP: Multi-SNP Analysis of MHC Region Remarkable Conservation of HLA-A1-B8-DR3 Haplotype. Diabetes 2006; 55: 1265-69
76. Nowak J, Mika-Witkowska R, Polak M, Zajko M, Rogatko-Koroś M, Graczyk-Pol E and Lange A: Allele and extended haplotype polymorphism of HLA-A, -C, -B, -DRB1 and -DQB1 loci in Polish population and genetic affinities to other populations. Tissue Antigens 2008; 71: 193–205
77. Pasi A, Crocchiolo R, Bontempelli M, Carcassi C, Carella G, Crespiatico L, Garbarino L, Mascaretti L, Mazzi B, Mazzola G, Miotti V, Porfirio B, Tagliaferri C, Valentini T, Vecchiato C, Fleischhauer K, Sacchi N, Bosi A, Martinetti M: The conundrum of

- HLA-DRB1*14:01/*14:54 and HLA-DRB3*02:01/*02:02 mismatches in unrelated hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant. 2011; 46:916-22
78. Bade-Doeding C, Cano P, Huyton T, Badrinath S, Eiz-Vesper B, Hiller O, Blasczyk R: Mismatches outside exons 2 and 3 do not alter the peptide motif of the allele group B*44:02P. Hum Immunol. 2011; 72: 1039-44
79. Bettens F, Schanz U, Tiercy JM: Lack of recognition of HLA class I mismatches outside $\alpha 1/\alpha 2$ domains by CD8+ alloreactive T lymphocytes: the HLA-B44 paradigm. *Tissue Antigens* 2013; 81: 414-8

PRILOGE

PRILOGA A: Aleli HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 s pogostnostjo pojavljanja manj kot 0,01 v slovenski populaciji

HLA-A	FREKVENCA (f)
A*02:05	0,007
A*33:03	0,007
A*66:01	0,007
A*02:06	0,0035
A*02:35	0,0035
A*29:01	0,0035
A*30:02	0,0035
A*30:04	0,0035
A*34:02	0,0035
HLA-B	FREKVENCA (f)
B*41:02	0,007
B*52:01	0,007
B*07:04	0,0035
B*07:10	0,0035
B*15:17	0,0035
B*15:18	0,0035
B*35:08	0,0035
B*56:01	0,0035
HLA-C	FREKVENCA (f)
C*12:02	0,007
C*14:02	0,007
C*16:04	0,007
C*17:03	0,007
C*16:02	0,0035
HLA-DRB1	FREKVENCA (f)
DRB1*01:02	0,0035
DRB1*04:03	0,0035
DRB1*04:07	0,0035
DRB1*04:13	0,0035
DRB1*08:02	0,0035
DRB1*10:01	0,0035
DRB1*11:12	0,0035
DRB1*12:01G	0,0035
DRB1*15:02	0,0035
HLA-DQB1	FREKVENCA (f)
DQB1*03:04	0,007
DQB1*05:04	0,0035

PRILOGA B: Dvolokusni haplotipi HLA-B-C in HLA-DRB1-DQB1 s pogostnostjo pojavljanja manj kot 0,01 v slovenski populaciji

HLA-B-C	FREKVENCA (f)	HLA-DRB1-DQB1	FREKVENCA (f)
B*51:01~C*01:02	0,0082	DRB1*13:03~DQB1*03:01	0,007
B*52:01~C*12:02	0,007	DRB1*07:01~DQB1*03:03	0,007
B*08:01~C*07:02G	0,007	DRB1*04:08~DQB1*03:04	0,007
B*07:02G~C*12:03	0,007	DRB1*15:01~blank	0,0037
B*18:01~C*05:01	0,007	DRB1*08:02~DQB1*04:02	0,0035
B*44:02~C*16:04	0,007	DRB1*04:03~DQB1*03:03	0,0035
B*41:02~C*17:03	0,007	DRB1*11:01~DQB1*03:01	0,0035
B*35:02~C*04:01G	0,007	DRB1*13:03~DQB1*03:01	0,0035
B*51:01~C*14:02	0,007	DRB1*07:01~DQB1*03:02	0,0035
B*15:01~C*03:04	0,007	DRB1*11:12~DQB1*03:01	0,0035
B*27:02~C*02:02	0,0049	DRB1*04:08~DQB1*03:02	0,0035
B*07:02G~C*03:04	0,0035	DRB1*13:01~DQB1*06:04	0,0035
B*51:01~C*05:01	0,0035	DRB1*04:13~DQB1*03:01	0,0035
B*51:01~C*12:03	0,0035	DRB1*01:02~DQB1*05:01	0,0035
B*07:10~C*07:02G	0,0035	DRB1*12:01G~DQB1*03:01	0,0035
B*27:02~C*01:02	0,0035	DRB1*13:01~DQB1*06:03	0,0035
B*15:18~C*03:03	0,0035	DRB1*14:54~DQB1*05:02	0,0035
B*35:01G~C*03:03	0,0035	DRB1*04:07~DQB1*03:01	0,0035
B*50:01~C*04:01G	0,0035	DRB1*16:02~DQB1*05:01	0,0035
B*07:04~C*07:02G	0,0035	DRB1*14:54~DQB1*03:01	0,0017
B*35:08~C*04:01G	0,0035	DRB1*04:08~DQB1*05:03	0,0017
B*07:02G~C*15:02	0,0035	DRB1*14:54~DQB1*05:03	0,0017
B*55:01~C*05:01	0,0035	DRB1*04:08~DQB1*03:01	0,0017
B*44:27~C*05:01	0,0035	DRB1*10:01~DQB1*05:01	0,0017
B*15:17~C*07:01G	0,0035	DRB1*15:02~DQB1*06:02	0,0017
B*55:01~C*03:04	0,0035	DRB1*10:01~DQB1*06:02	0,0017
B*51:01~C*16:02	0,0035	DRB1*15:02~DQB1*05:01	0,0017
B*55:01~C*01:02	0,0035	DRB1*01:01~DQB1*02:01	0,0017
B*56:01~C*01:02	0,0035	DRB1*07:01~DQB1*05:04	0,0017
B*35:02~C*06:02	0,0035	DRB1*01:01~DQB1*05:04	0,0017
B*27:02~C*05:01	0,0035	DRB1*07:01~DQB1*02:01	0,0017
B*40:02~C*05:01	0,0035		
B*44:02~C*07:04G	0,0035		
B*27:02~blank	0,0021		

PRILOGA C: Antigeni HLA-A, -B in geni HLA-DRB1 s pogostnostjo pojavljanja manj kot 0,01 pri članih družin

HLA-A	FREKVENCA (f)
A66	0,0046
A28	0,0033
A80	0,0013
A10	0,0007
A69	0,0007
HLA-B	FREKVENCA (f)
B56	0,0098
B41	0,0092
B55	0,0092
B52	0,0072
B47	0,002
B17	0,0013
B73	0,0013
B53	0,0013
B61	0,0007
B48	0,0007
B70	0,0007
HLA-DRB1	FREKVENCA (f)
DRB1*10	0,0072
DRB1*09	0,0026

PRILOGA D: Dvolokusni haplotipi HLA-A-B, -A-DRB1, -B-DRB1 s pogostnostjo pojavljanja manj kot 0,01 pri članih družin

HLA-A-B	FREKVENCA (f)	HLA-A-B	FREKVENCA (f)	HLA-A-B	FREKVENCA (f)
A11~B51	0,0098	A11~B27	0,0026	A80~B44	0,0013
A29~B44	0,0092	A24~B27	0,0026	A31~B18	0,0013
A2~B39	0,0078	A11~B15	0,0026	A1~B52	0,0013
A33~B14	0,0072	A29~B35	0,0026	A31~B52	0,0013
A68~B44	0,0072	A1~B7	0,0026	A3~B57	0,0013
A30~B13	0,0072	A3~B39	0,0026	A1~B49	0,0013
A24~B15	0,0072	A66~B41	0,0026	A25~B27	0,0013
A24~B13	0,0065	A31~B51	0,0026	A2~B41	0,0013
A32~B51	0,0065	A11~B7	0,0026	A68~B38	0,0013
A1~B18	0,0065	A2~B56	0,0026	A3~B47	0,0013
A2~B50	0,0059	A31~B7	0,0022	A3~B13	0,0013
A3~B27	0,0059	A24~B49	0,002	A30~B7	0,0011
A68~B51	0,0059	A26~B56	0,002	A23~B35	0,0007
A3~B18	0,0052	A26~B39	0,002	A24~B14	0,0007
A32~B40	0,0052	A68~B7	0,002	A29~B38	0,0007

A2~B49	0,0052	A23~B50	0,002	A25~B14	0,0007
A3~B15	0,0052	A31~B39	0,002	A10~B35	0,0007
A2~B58	0,0052	A3~B50	0,002	A32~B17	0,0007
A2~B8	0,0052	A68~B57	0,002	A28~B27	0,0007
A32~B35	0,0052	A1~B14	0,002	A26~B57	0,0007
A11~B44	0,0052	A11~B13	0,002	A29~B40	0,0007
A24~B38	0,0052	A2~B55	0,002	A30~B14	0,0007
A24~B40	0,0046	A2~B37	0,002	A33~B40	0,0007
A2~B57	0,0046	A24~B55	0,002	A2~B73	0,0007
A32~B44	0,0046	A11~B55	0,002	A23~B18	0,0007
A26~B27	0,0046	A32~B27	0,002	A23~B41	0,0007
A1~B15	0,0046	A11~B52	0,002	A32~B13	0,0007
A3~B44	0,0046	A26~B55	0,002	A25~B57	0,0007
A24~B39	0,0046	A26~B35	0,002	A26~B15	0,0007
A26~B7	0,0046	A32~B41	0,0013	A11~B39	0,0007
A32~B15	0,0046	A29~B7	0,0013	A29~B17	0,0007
A3~B8	0,0039	A28~B35	0,0013	A24~B52	0,0007
A26~B49	0,0039	A32~B18	0,0013	A33~B35	0,0007
A26~B51	0,0039	A31~B44	0,0013	A33~B51	0,0007
A1~B58	0,0039	A3~B56	0,0013	A25~B39	0,0007
A3~B40	0,0033	A32~B50	0,0013	A1~B73	0,0007
A26~B44	0,0033	A11~B56	0,0013	A68~B40	0,0007
A26~B8	0,0033	A32~B14	0,0013	A11~B61	0,0007
A23~B49	0,0033	A25~B44	0,0013	A30~B40	0,0007
A1~B51	0,0033	A11~B41	0,0013	A24~B56	0,0007
A24~B57	0,0033	A11~B57	0,0013	A26~B40	0,0007
A32~B7	0,0033	A11~B8	0,0013	A2~B47	0,0007
A31~B35	0,0026	A24~B50	0,0013	A3~B37	0,0007
A24~B8	0,0026	A2~B52	0,0013	A69~B51	0,0007
A1~B13	0,0026	A11~B53	0,0013	A32~B56	0,0007
A1~B27	0,0026	A32~B39	0,0013	A26~B52	0,0007
A33~B58	0,0026	A25~B51	0,0013	A29~B14	0,0007
A1~B44	0,0026	A25~B7	0,0013	A24~B41	0,0007
A3~B49	0,0026	A29~B58	0,0013	A66~B40	0,0007
A3~B38	0,0026	A1~B40	0,0013	A29~B15	0,0007
A68~B18	0,0026	A1~B39	0,0013	A3~B58	0,0007
A32~B57	0,0026	A31~B40	0,0013	A24~B48	0,0007
A11~B40	0,0026	A28~B18	0,0013	A32~B55	0,0007
A2~B14	0,0026	A11~B18	0,0013	A25~B8	0,0007
HLA-A-B	FREKVENCA (f)	HLA-A-B	FREKVENCA (f)		
A31~B27	0,0007	A66~B49	0,0007		
A68~B14	0,0007	A30~B18	0,0007		
A68~B41	0,0007				
A23~B57	0,0007				
A25~B35	0,0007				
A30~B58	0,0007				
A1~B56	0,0007				
A3~B14	0,0007				
A26~B58	0,0007				
A31~B38	0,0007				
A68~B27	0,0007				

A11~B38	0,0007
A29~B27	0,0007
A3~B55	0,0007
A26~B41	0,0007
A66~B7	0,0007
A68~B39	0,0007
A68~B8	0,0007
A24~B37	0,0007
A33~B56	0,0007
A31~B15	0,0007
A31~B37	0,0007
A31~B13	0,0007
A24~B70	0,0007

HLA-A-DRB1	FREKVENCA (f)	HLA-A-DRB1	FREKVENCA (f)	HLA-A-DRB1	FREKVENCA (f)
A1~DRB1*01	0,0092	A31~DRB1*04	0,0026	A31~DRB1*07	0,0013
A3~DRB1*13	0,0085	A25~DRB1*01	0,0026	A31~DRB1*01	0,0013
A26~DRB1*13	0,0085	A2~DRB1*12	0,0026	A23~DRB1*14	0,0007
A25~DRB1*15	0,0078	A68~DRB1*03	0,0026	A26~DRB1*08	0,0007
A1~DRB1*04	0,0078	A68~DRB1*07	0,0026	A10~DRB1*14	0,0007
A3~DRB1*03	0,0065	A31~DRB1*15	0,0026	A11~DRB1*08	0,0007
A24~DRB1*14	0,0065	A25~DRB1*03	0,0026	A28~DRB1*04	0,0007
A29~DRB1*07	0,0065	A68~DRB1*13	0,0026	A33~DRB1*16	0,0007
A68~DRB1*01	0,0065	A24~DRB1*16	0,0026	A23~DRB1*13	0,0007
A32~DRB1*04	0,0065	A3~DRB1*12	0,002	A33~DRB1*04	0,0007
A32~DRB1*01	0,0065	A31~DRB1*13	0,002	A30~DRB1*03	0,0007
A26~DRB1*15	0,0065	A26~DRB1*07	0,002	A28~DRB1*07	0,0007
A68~DRB1*11	0,0065	A33~DRB1*13	0,002	A29~DRB1*12	0,0007
A3~DRB1*08	0,0065	A1~DRB1*12	0,002	A69~DRB1*11	0,0007
A1~DRB1*15	0,0059	A25~DRB1*08	0,002	A29~DRB1*08	0,0007
A68~DRB1*08	0,0052	A23~DRB1*01	0,002	A29~DRB1*13	0,0007
A24~DRB1*03	0,0052	A29~DRB1*04	0,002	A2~DRB1*09	0,0007
A3~DRB1*16	0,0052	A25~DRB1*14	0,002	A25~DRB1*12	0,0007
A11~DRB1*07	0,0052	A24~DRB1*08	0,002	A23~DRB1*08	0,0007
A11~DRB1*14	0,0046	A26~DRB1*14	0,002	A32~DRB1*14	0,0007
A23~DRB1*11	0,0046	A28~DRB1*11	0,002	A31~DRB1*08	0,0007
A30~DRB1*07	0,0046	A29~DRB1*01	0,002	A68~DRB1*10	0,0007
A26~DRB1*16	0,0046	A66~DRB1*07	0,002	A68~DRB1*12	0,0007
A1~DRB1*14	0,0039	A32~DRB1*03	0,0013	A30~DRB1*15	0,0007
A32~DRB1*13	0,0039	A29~DRB1*10	0,0013	A33~DRB1*07	0,0007
A32~DRB1*15	0,0039	A31~DRB1*16	0,0013	A32~DRB1*09	0,0007
A26~DRB1*11	0,0039	A1~DRB1*09	0,0013	A66~DRB1*01	0,0007
A1~DRB1*16	0,0039	A31~DRB1*12	0,0013	A31~DRB1*03	0,0007
A33~DRB1*03	0,0039	A26~DRB1*04	0,0013	A32~DRB1*12	0,0007
A68~DRB1*04	0,0039	A25~DRB1*07	0,0013	A11~DRB1*03	0,0007
A25~DRB1*04	0,0039	A23~DRB1*04	0,0013	A66~DRB1*14	0,0007
A33~DRB1*01	0,0033	A33~DRB1*11	0,0013	A23~DRB1*03	0,0007
A11~DRB1*16	0,0033	A2~DRB1*10	0,0013		
A1~DRB1*08	0,0033	A25~DRB1*16	0,0013		
A29~DRB1*11	0,0033	A30~DRB1*04	0,0013		
A31~DRB1*11	0,0033	A68~DRB1*16	0,0013		
A68~DRB1*15	0,0033	A26~DRB1*12	0,0013		

A32~DRB1*07	0,0033	A31~DRB1*14	0,0013		
A30~DRB1*01	0,0033	A29~DRB1*15	0,0013		
A26~DRB1*03	0,0033	A25~DRB1*11	0,0013		
A11~DRB1*13	0,0033	A66~DRB1*13	0,0013		
A24~DRB1*12	0,0033	A80~DRB1*13	0,0013		
A32~DRB1*16	0,0033	A24~DRB1*10	0,0013		
A11~DRB1*15	0,0033	A1~DRB1*10	0,0013		
A11~DRB1*12	0,0033	A32~DRB1*10	0,0013		
HLA-B-DRB1	FREKVENCNA (f)	HLA-B-DRB1	FREKVENCNA (f)	HLA-B-DRB1	FREKVENCNA (f)
B44~DRB1*13	0,0098	B57~DRB1*11	0,0033	B37~DRB1*10	0,0013
B51~DRB1*13	0,0098	B14~DRB1*03	0,0033	B8~DRB1*16	0,0013
B18~DRB1*15	0,0098	B35~DRB1*12	0,0033	B14~DRB1*11	0,0013
B38~DRB1*13	0,0092	B18~DRB1*03	0,0033	B50~DRB1*13	0,0013
B35~DRB1*15	0,0085	B40~DRB1*15	0,0033	B47~DRB1*07	0,0013
B35~DRB1*13	0,0085	B57~DRB1*16	0,0033	B27~DRB1*14	0,0013
B40~DRB1*13	0,0078	B27~DRB1*15	0,0033	B7~DRB1*12	0,0013
B35~DRB1*07	0,0072	B51~DRB1*12	0,0026	B37~DRB1*13	0,0013
B50~DRB1*07	0,0072	B44~DRB1*03	0,0026	B13~DRB1*10	0,0013
B18~DRB1*01	0,0072	B39~DRB1*12	0,0026	B44~DRB1*10	0,0013
B14~DRB1*01	0,0065	B41~DRB1*07	0,0026	B58~DRB1*14	0,0013
B7~DRB1*11	0,0065	B49~DRB1*01	0,0026	B15~DRB1*14	0,0013
B15~DRB1*11	0,0065	B15~DRB1*15	0,0026	B15~DRB1*16	0,0013
B51~DRB1*16	0,0065	B44~DRB1*14	0,0026	B55~DRB1*15	0,0013
B27~DRB1*11	0,0065	B55~DRB1*11	0,0026	B13~DRB1*01	0,0013
B18~DRB1*13	0,0059	B18~DRB1*07	0,0026	B38~DRB1*08	0,0013
B39~DRB1*11	0,0059	B58~DRB1*08	0,0026	B52~DRB1*01	0,0013
B35~DRB1*08	0,0059	B41~DRB1*13	0,0026	B27~DRB1*08	0,0013
B58~DRB1*13	0,0059	B37~DRB1*15	0,0026	B55~DRB1*08	0,0013
B51~DRB1*08	0,0059	B18~DRB1*14	0,0026	B58~DRB1*04	0,0013
B27~DRB1*16	0,0052	B18~DRB1*16	0,002	B40~DRB1*01	0,0007
B37~DRB1*07	0,0052	B8~DRB1*14	0,002	B8~DRB1*09	0,0007
B18~DRB1*04	0,0052	B41~DRB1*03	0,002	B50~DRB1*11	0,0007
B7~DRB1*08	0,0052	B18~DRB1*08	0,002	B17~DRB1*07	0,0007
B49~DRB1*11	0,0052	B56~DRB1*08	0,002	B37~DRB1*16	0,0007
B49~DRB1*04	0,0046	B40~DRB1*08	0,002	B8~DRB1*12	0,0007
B35~DRB1*16	0,0046	B8~DRB1*07	0,002	B73~DRB1*04	0,0007
B8~DRB1*11	0,0046	B7~DRB1*04	0,002	B17~DRB1*04	0,0007
B27~DRB1*13	0,0046	B13~DRB1*04	0,002	B41~DRB1*16	0,0007
B44~DRB1*12	0,0046	B38~DRB1*04	0,002	B27~DRB1*12	0,0007
B44~DRB1*15	0,0046	B50~DRB1*03	0,002	B73~DRB1*07	0,0007
B15~DRB1*07	0,0046	B18~DRB1*12	0,002	B13~DRB1*03	0,0007
B27~DRB1*04	0,0046	B57~DRB1*13	0,002	B61~DRB1*11	0,0007
B56~DRB1*01	0,0046	B38~DRB1*16	0,002	B8~DRB1*01	0,0007
B15~DRB1*01	0,0046	B56~DRB1*15	0,002	B40~DRB1*03	0,0007
B39~DRB1*15	0,0046	B15~DRB1*03	0,002	B53~DRB1*11	0,0007

B52~DRB1*15	0,0046	B39~DRB1*14	0,002	B55~DRB1*14	0,0007
B51~DRB1*03	0,0046	B38~DRB1*14	0,002	B50~DRB1*01	0,0007
B7~DRB1*03	0,0039	B39~DRB1*08	0,002	B14~DRB1*15	0,0007
B8~DRB1*13	0,0039	B57~DRB1*01	0,002	B52~DRB1*04	0,0007
B40~DRB1*16	0,0039	B13~DRB1*15	0,002	B55~DRB1*13	0,0007
B49~DRB1*13	0,0039	B55~DRB1*16	0,002	B18~DRB1*10	0,0007
B7~DRB1*07	0,0039	B58~DRB1*03	0,002	B7~DRB1*09	0,0007
B37~DRB1*11	0,0039	B39~DRB1*01	0,0013	B50~DRB1*04	0,0007
B38~DRB1*15	0,0039	B40~DRB1*14	0,0013	B48~DRB1*12	0,0007
B38~DRB1*01	0,0039	B37~DRB1*01	0,0013	B51~DRB1*10	0,0007
B39~DRB1*16	0,0039	B8~DRB1*08	0,0013	B44~DRB1*08	0,0007
B40~DRB1*04	0,0039	B14~DRB1*13	0,0013	B52~DRB1*14	0,0007
B14~DRB1*07	0,0039	B7~DRB1*10	0,0013	B27~DRB1*07	0,0007
B8~DRB1*04	0,0039	B7~DRB1*16	0,0013	B58~DRB1*11	0,0007
B51~DRB1*15	0,0039	B51~DRB1*14	0,0013	B15~DRB1*08	0,0007
B7~DRB1*14	0,0039	B38~DRB1*03	0,0013	B49~DRB1*15	0,0007
B7~DRB1*13	0,0039	B39~DRB1*13	0,0013	B41~DRB1*10	0,0007
HLA-B-DRB1	FREKVENC A (f)				
B27~DRB1*03	0,0007				
B58~DRB1*01	0,0007				
B56~DRB1*16	0,0007				
B47~DRB1*13	0,0007				
B58~DRB1*07	0,0007				
B27~DRB1*09	0,0007				
B13~DRB1*11	0,0007				
B53~DRB1*04	0,0007				
B41~DRB1*01	0,0007				
B56~DRB1*13	0,0007				
B15~DRB1*09	0,0007				
B49~DRB1*03	0,0007				
B55~DRB1*04	0,0007				
B70~DRB1*13	0,0007				
B57~DRB1*04	0,0007				
B40~DRB1*07	0,0007				
B49~DRB1*14	0,0007				
B35~DRB1*03	0,0007				
B49~DRB1*07	0,0007				