

## FREKVENCIA ALEL LOKUSOV HLA-DRB1\* A -DQB1\* V SLOVENSKEJ POPULÁCI

FAZEKAŠOVÁ, H., SHAWKATOVÁ, I., BUC, M., FERENČÍK, S.

### HLA-DRB1\* AND HLA-DQB1\* ALLELE FREQUENCIES IN SLOVAK POPULATION

Results on HLA-DRB1\* and HLA-DQB1\* allele frequencies in the Slovak population by PCR-SSP method are presented. HLA-DRB1\* alleles were determined in 130 and HLA-DQB1\* alleles in 143 healthy unrelated individuals. The highest frequency was observed for the alleles HLA-DRB1\* 1101-13 (0,203), HLA-DRB1\* 0701 (0,142), HLA-DQB1\* 0301 (0,244), and HLA-DQB1\* 0201 (0,209). The least frequent alleles were HLA-DRB1\* 1402-6-9, HLA-DRB1\* 0901 (both 0,0038), HLA-DQB1\* 0401 (0,007), and HLA-DQB1\* 0601 (0,0035). The results obtained by DNA-typing were compared with those calculated from the serological study. No statistically significant differences were found. The allele frequencies obtained in our study were also compared with those of the Czech and Austrian populations. No statistically significant differences were observed. (Fig. 2, Tab. 3, Ref. 13.)

**Key words:** HLA-complex, population study, HLA-DRB1 and HLA-DQB1 allele frequencies.

*Bratisl Lek Listy 1998; 99: 601–604*

V súbore 130, resp. 143 zdravých nepríbuzných jednotlivcov sme pomocou metódy PCR-SSP určili frekvenciu alel lokusov HLA-DRB1 a HLA-DQB1 v slovenskej populácii. Zistili sme, že najčastejšie sa vyskytujú alely HLA-DRB1\* 1101-13 (0,203), HLA-DRB1\* 0701 (0,142), HLA-DQB1\* 0301 (0,244) a HLA-DQB1\* 0201 (0,209). Najnižšiu frekvenciu majú alely HLA-DRB1\* 1402-6-9, HLA-DRB1\* 0901 (obe 0,0038), HLA-DQB1\* 0401 (0,007) a HLA-DQB1\* 0601 (0,0035). Výsledky získané metódou DNA-typizácie sme porovnali s výsledkami dosiahnutými sérometódami. Nezistili sme žiadne štatisticky preukazné rozdiely. Frekvencie alel HLA-DRB1\* a HLA-DQB1\* lokusov sme ďalej porovnali s frekvenciami týchto alel v českej a rakúskej populácii. Takisto sme nezistili nijaké štatisticky preukazné rozdiely. (Obr. 2, tab. 3, lit. 13.)

**Kľúčové slová:** HLA-komplex, populačná genetika, frekvencia alel HLA-DRB1 a HLA-DQB1.

*Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 11, s. 601–604*

Hlavný histokompatibilný systém človeka je HLA-komplex (human leukocytes antigens). Je jedným z najkomplexnejších a najpolymorfnejších systémov človeka. Zahŕňa štruktúrne a funkčne odlišné molekuly rozdelené do dvoch tried: trieda I a trieda II (Buc a Ferenčík, 1994) (obr.1).

Gény determinujúce HLA-antigény triedy I sú lokalizované v telomerickkej oblasti krátkého ramena 6. chromozómu. V tejto oblasti sa nachádzajú lokusy HLA-A, -B, -C, ktorých génové produkty determinujú klasické Ia antigény, ďalej lokusy HLA-E, -F, -G, kódujúce neklasické Ib antigény a napokon lokusy HLA-H, -J, -K, -L, -M,

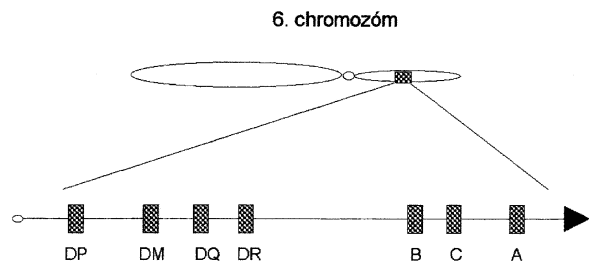
na ktorých sídlia pseudogény (Trowsdale a Campbell, 1988; Bodmer a spol., 1997).

Triedu II predstavujú HLA-DR, -DQ, -DP a -DM antigény, ktorých gény sú lokalizované v centromerickej oblasti krátkého ramena 6. chromozómu, v tzv. HLA-D oblasti (Trowsdale a Campbell, 1988). HLA-antigény triedy II sú determinované najmenej dvoma génmi A-génom pre  $\alpha$ -refazec a B-génom pre  $\beta$ -refazec antigénu. Jednotlivé gény majú viacero konkrétnych foriem prejavu, t.j. alel. HLA-DR podoblast zahŕňa jeden A-lokus, na ktorom sídli gén pre  $\alpha$ -refazec a deväť B-lokusov s génmi pre  $\beta$ -refazec HLA-DR antigénu. Podoblasti HLA-DQ a HLA-DP zahŕňajú po štyri lokusy: dva A-lokusy s génmi determinujúcimi  $\alpha$ -refazec a dva B-lokusy s génmi determinujúcimi  $\beta$ -refazec. Nie všetky lokusy sú však obsadené funkčnými génmi. Na väčšine sídlia pseudogény, čo znamená, že k tvorbe HLA-antigénov nedochádza. Sú to lokusy HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, DRB8, DRB9, -DQA2, -DQB2, -DPA2 a -DPB2 (obr. 2) (Trowsdale a Campbell, 1992; Campbell a Trowsdale, 1993).

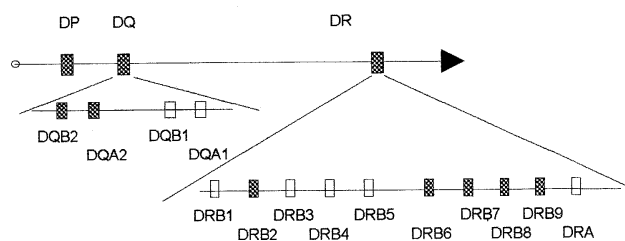
Doterajšia charakteristika HLA-komplexu slovenskej populácie vychádzala zo sérologickej identifikácie HLA-A, -B, -C anti-

Imunologický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a <sup>1</sup>Imunologický ústav univerzitnej nemocnice v Essene (SRN) The Institute of Immunology, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava, and <sup>1</sup>The Institute of Immunology, University Hospital, Essen (SRN)

**Address for correspondence:** H. Fazekašová, Mgr, Imunologický ústav LFUK, Sasínkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia.  
Phone: +421.7.5357 314, Fax: +421.7.5357 578,  
Internet: fazekasova@fmed.uniba.sk



Obr. 1. Génová mapa HLA-komplexu.  
Fig. 1. Gene map of the HLA-complex.



Obr. 2. HLA-DR a HLA-DQ podoblasti.  
Fig. 2. HLA-DR and HLA-DQ subregions.

génov (Buc a spol., 1975; Nyulassy a spol., 1977 a), HLA-DR antigénov (Nikš a spol., 1982) a HLA-Dw antigénov (Buc a spol., 1979). V našej terajšej práci sme sa zamerali na identifikáciu jednotlivých alel HLA-DRB1 a HLA-DQB1 lokusov a stanovenie ich frekvencie. Cieľom predkladanej práce je doplniť charakteristiku slovenskej populácie o podrobnejšiu analýzu výskytu HLA-DR a HLA-DQ alel v populácii, porovnať dosiahnuté výsledky so sérologickými štúdiami a porovnať výskyt jednotlivých alel v slovenskej, českej a rakúskej populácii.

#### Materiál a metódy

Frekvencie alel lokusov HLA-DRB1 a HLA-DQB1 sme stanovovali v súbore 130, resp. 143 nepríbuzných náhodne vybraných jednotlivcov slovenskej populácie. *Izolácia DNA.* Genómovú DNA sme izolovali z periférnej krvi odobratej do EDTA (20mM) modifikovanou vysolovacou metódou. Erytrocyty sme lyzovali pridaním 1 ml lyzačného roztoku (0,32 M sacharóza, 1 % Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM Tris, pH 7,5) do 500 µl krvi. Po centrifugácii (10 000 ot/min, 5 min) sme sediment premyli vodou a rozpustili v 300 µl proteinázového roztoku (0,375 M NaCl, 0,12 M EDTA, pH 8,0), 10 µl 1 % SDS a 100 µl 5 M NaCl. Proteíny sme vyzrážali pridaním 500 µl zmesi fenol/chloroform (1:1) a oddelili centrifugáciou (10 000 ot/min, 10 min). Vrchnú vodnú fázu s obsahom DNA sme odobrali a pridal 1 ml 96 % etanolu. Vyzrážanú DNA sme premyli 70 % etanolom a rozpustili vo vode.

*Amplifikačné primery.* Alely lokusov HLA-DRB1 a HLA-DQB1 sme určovali metódou PCR-SSP. Sekvencia, špecifickosť a dĺžka primerov použitých v reakciách je zhodná s primermi uvedenými v publikáciách Olerupa a Zetterquista (1992) a Olerupa a spol. (1993). Amplifikačné primery boli syntetizované na oligosyntetizátore 392 firmy Perkin-Elmer v Essene, SRN. *Amplifikácia.* Na identifikáciu alel lokusu HLA-DRB1 sme použili celkom 23 párov primerov, z toho 20 párov na určenie alel lokusu DRB1 determinujúcich antigény DR1 až DR18 a tri páry na určenie génov lokusov DRB3, DRB4 a DRB5 determinujúcich antigény DRw51, DRw52, resp. DRw53. Na identifikáciu alel lokusu HLA-DQB1, determinujúcich antigény DQ1 až DQ9, sme použili 22 párov primerov. Amplifikačné zmesi obsahujú 2,5 pmol špecifického primeru, 60 ng genómovej DNA, 10 µl reakčnej zmesi (10 mM Tris pH 8,3, 75 mM NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM z každého dNTP, 1 % ficoll, 0,05 % cresol red), 0,3 U polymerázy Ampli-Taq (La Roche). Amplifikáciu sme uskutočnili na ter-

mocykleri "PTC-100™-Programmable Comprised Thermal Controller" (MJ Research, Inc., USA). Amplifikácia pozostávala z 30 cyklov zahrňujúcich denaturáciu (94 °C, 20 s), pripojenie prímery k matrici a vlastnú amplifikáciu (65 °C, 1 min).

*Vizualizácia amplifikácie.* Identifikácia jednotlivých alel sa zakladala na zisťovaní prítomnosti, alebo neprítomnosti produktov amplifikácie, ktoré sme detegovali agarózovou gélovou elektroforézou v 2 % agarózovom géle s obsahom 0,5 µg etídium bromidu na 1 ml gélu. Elektroforéza prebiehala 25–30 min pri napätí 7–8 V/cm v roztoku TBE (89 mM Tris, 89 mM kyselina bóritá, 2 mM EDTA, pH 8,0). Amplifikačné produkty sme vizualizovali pod UV transiluminátorom "Bioblock-scientific" a dokumentovali vyhotovením fotografií.

Tab. 1. Frekvencia alel lokusov HLA-DRB1 a -DQB1 v slovenskej populácii.  
Tab. 1. HLA-DRB1 and -DQB1 allele frequencies in Slovak population.

HLA-DRB1 n=260		HLA-DQB1 n=286	
DRB1*	g	DQB1*	g
*0101-2	0,0731	*0201	0,2098
*0103	0,	*0301	0,2448
*1502-2	0,1231	*0302	0,0559
*1601-5	0,0538	*0303	0,0419
*0301	0,0962	*0401	0,0070
*0302	0,	*0402	0,0385
*0401-14	0,1116	*0501	0,1119
*1101-5	0,2038	*0502	0,0559
*1201-2	0,0153	*0503	0,0280
*1301-2	0,0654	*0601	0,0035
*1303-4	0,0153	*0602	0,1014
*1305	0,	*0603	0,0839
*1306	0,	*0604	0,0175
*1401,-4,-5,-7,-8	0,0231		
*1402,-6,-9	0,0038		
*1410	0,		
*1701	0,1423		
*1801-6	0,0462		
*1901	0,0038		
*1001	0,0231		
Spolu	0,9999		1,0

**Tab. 2. Frekvencia alel lokusu HLA-DRB1 v slovenskej, českej a rakúskej populácii.****Tab. 2. HLA-DRB1 allele frequencies in Slovak, Czech, and Austrian populations.**

HLA-DRB1	Slovenská populácia DNA n=260	Slovenská populácia sérol. n=224	Česká populácia DNA n=424	Rakúska populácia DNA n=1274
	g	g	g	g
*0101-4	0,0731	0,064	0,1084	0,1044
*1501-6	0,1231	0,221	0,1367	0,1350
*0601-8	0,0538		0,0283	0,0243
*0301-11	0,0962	0,103	0,0636	0,1021
*0401-24	0,1116	0,113	0,0966	0,1389
*1101-30	0,2038	0,161	0,1698	0,1460
*1201-5	0,0153		0,0212	0,0094
*1301-30	0,0807	0,079	0,1226	0,1263
*1401-29	0,0269		0,0377	0,0322
*0701, *0901	0,1461	0,098	0,1320	0,1295
*0801-16	0,0462	0,027	0,0566	0,0330
*1001	0,0231		0,0070	0,0063

**Tab. 3. Frekvencia alel lokusu HLA-DQB1 v slovenskej, českej a rakúskej populácii.****Tab. 3. HLA-DQB1 allele frequencies in Slovak, Czech, and Austrian populations.**

HLA-DQB1	Slovenská populácia DNA n=224	Česká populácia DNA n=424	Rakúska populácia DNA n=1274
	g	g	g
*0201	0,2098	0,1674	0,1938
*0301	0,2448	0,2334	0,2284
*0302-3,*0401-2	0,1433	0,1508	0,1507
*0501-3	0,1958	0,1698	0,2017
*0601-3	0,2028	0,2594	0,2253

## Výsledky

Frekvencie jednotlivých HLA-DRB1 alel uvádzame v tabuľke 1. Zistili sme, že najčastejšie sa vyskytuje alela HLA-DRB1\*1101-13 s frekvenciou 0,203 a HLA-DRB1\*0701 s frekvenciou 0,142. Najnižšiu frekvenciu má alela HLA-DRB1\*1402-6-9, s frekvenciou 0,0038 a HLA-DRB1\*0901, s frekvenciou 0,0038. Frekvencie jednotlivých alel lokusu HLA-DQB1 uvádzame tiež v tabuľke 1. Najčastejšie sa vyskytuje alela HLA-DQB1\*0301, s frekvenciou 0,244 a HLA-DQB1\*0201, s frekvenciou 0,209. S najnižšou frekvenciou sa vyskytuje alela HLA-DQB1\*0401, s frekvenciou 0,007 a HLA-DQB1\*0601, s frekvenciou 0,0035. Dosiahnuté výsledky sa zhodujú s uvádzanou väzbovou nerovnováhou medzi jednotlivými alelami lokusov HLA-DRB1 a HLA-DQB1 (Tsujii a spol., 1991). Alela HLA-DRB1\*1101-13 je vo väzbovej nerovnováhe s alelou HLA-DQB1\*0301, pričom z tabuľky 1 vyplýva, že práve tieto alely sa v slovenskej populácii vyskytujú s najvyššou frekvenciou. Lite-

ratúra uvádza, že aj alely s nami zistenou druhou najvyššou frekvenciou, HLA-DRB1\*0701 a HLA-DQB1\*0201 sú vo väzbovej nerovnováhe (Tsujii a spol., 1991).

## Diskusia

Frekvencie alel lokusov HLA-DR a HLA-DQ sme vyšetrili v súbore 130, resp. 143 nepríbuzných náhodne vybraných jedincov slovenskej populácie. Na identifikáciu jednotlivých alel sme použili metódu PCR-SSP. Pri výbere metódy sme vychádzali z materiálo-technického vybavenia nášho pracoviska. PCR-SSP je jednoduchá a rýchla metóda vhodná najmä pre spracovanie menšieho množstva vzoriek. Výsledky dosiahnuté metódou DNA-typizácie sme porovnali s výsledkami dosiahnutými sérometódami (Nikš a spol., 1982). Podľa našich výsledkov sa v slovenskej populácii s najvyššou frekvenciou vyskytujú alely HLA-DRB1\*1101-5 ( $g=0,219$ ) a HLA-DRB1\*0701 ( $g=0,153$ ). Podľa sérometód sa v slovenskej populácii s najvyššou frekvenciou vyskytujú antigény DR2 kódované alelami HLA-DRB1\*1501-2 ( $g=0,221$ ) a HLA-DRB1\*1101-2 ( $g=0,161$ ). Porovnaním týchto výsledkov (tab. 2) sme zistili, že rozdiely medzi frekvenciami určenými týmito dvoma metódami nie sú štatisticky preukazné. Metódy DNA-typizácie nám však umožňujú identifikáciu aj takých alel, ktoré sérometódy nie sú schopné identifikovať.

Frekvencie výskytu jednotlivých alel lokusu HLA-DRB1 v slovenskej populácii sme ďalej porovnávali s frekvenciami v českej populácii (Laudová a spol., 1996) a v rakúskej populácii (Fischer a spol., 1992), ktoré sa tiež určovali metódami DNA-typizácie. Výsledky sú uvedené v tabuľkách 2 a 3. Keďže všetky tri populácie sú geograficky a historicky úzko spojené a sú súčasťou kaukazoidnej populácie, neočakávali sme štatisticky významné rozdiely.

V českej populácii sa takisto ako v slovenskej s najvyššou frekvenciou vyskytuje alela HLA-DRB1\*1101-5 ( $g=0,1698$ ). Druhú najvyššiu frekvenciu dosiahla alela HLA-DRB1\*1501-3 ( $g=0,1367$ ), ktorá je v slovenskej populácii až na tretom mieste ( $g=0,1231$ ). Tento rozdiel však nie je štatisticky významný.

Alela HLA-DRB1\*1101-5 ( $g=0,1460$ ) má aj v rakúskej populácii najvyššiu frekvenciu. Druhú najvyššiu frekvenciu v rakúskej populácii má alela HLA-DRB1\*0401-14 ( $g=0,1389$ ). V slovenskej populácii sa táto alela vyskytuje s nižšou frekvenciou ( $g=0,116$ ); tento rozdiel však nie je štatisticky významný.

S najnižšou frekvenciou sa vo všetkých troch populáciách vyskytujú alely HLA-DRB1\*1001 (slovenská —  $g=0,0231$ ; česká —  $g=0,007$ ; rakúska —  $g=0,0063$ ) a HLA-DRB1\*1201-5 (slovenská -  $g=0,0153$ ; česká —  $g=0,0212$ ; rakúska —  $g=0,0094$ ).

Frekvencie alel HLA-DRB1\*0701 a \*0901 v tabuľke 2 a alel HLA-DQB1\*0302-3 a \*0401-2 v tabuľke 3 uvádzame spolu, pretože metóda, ktorú použili autori rakúskej populačnej štúdie, neumožňuje identifikovať tieto dve skupiny alel. Pre názornejšie vyhodnotenie sme frekvencie týchto alel spojili aj v slovenskej a českej populácii.

Z alel lokusu HLA-DQB1 sa v českej populácii s najvyššou frekvenciou vyskytuje alela HLA-DQB1\*0601-3, s  $g=0,2594$ . V slovenskej a rakúskej populácii dosiahla najvyššiu frekvenciu alela HLA-DQB1\*0301 ( $g=0,2448$ , resp.  $g=0,2284$ ), ktorá v českej populácii dosiahla druhú najvyššiu frekvenciu ( $g=0,2334$ ). V slovenskej populácii má druhú najvyššiu frekvenciu alela HLA-DQB1\*0201 ( $g=0,2098$ ) a v rakúskej populácii alela HLA-

DQB1\*0601-3 ( $g=0,2253$ ). Zistené rozdiely medzi jednotlivými populáciami nie sú však štatisticky preukazné.

S najnižšou frekvenciou sa vo všetkých troch populáciách vyskytujú alely HLA-DQB1\*0302-3 a \*0401-2 s frekvenciami (slovenská —  $g=0,1433$ ; česká —  $g=0,1508$  a rakúska —  $g=0,1507$ ).

Pre HLA-komplex je charakteristické, že jednotlivé alely HLA-lokusov sú vo väzbovej nerovnováhe. V slovenskej populácii sa s najvyššou frekvenciou vyskytujú alely HLA-DRB1\*1101-5 a HLA-DQB1\*0301, čo potvrdzuje, že tieto dve alely sú vo väzbovej nerovnováhe a je v súlade s údajmi udávanými v literatúre (Tsuji a spol., 1991).

Dosiahnuté výsledky tvoria základ, ktorý chceme v budúcnosti doplniť o údaje o frekvencii alel lokusu HLA-DPB1 a o frekvencii alel lokusov determinujúcich HLA antigény triedy I. Urobíme tak komplexnú populačnú štúdiu o frekvencii HLA-alel v slovenskej populácii. Tieto poznatky využijeme pri štúdiu vzťahov medzi HLA-systémom a chorobami, v transplantáčnom programe a pri riešení paternitných sporov.

#### Literatúra

**Bodmer J.G., Marsh G.E., Albert E.D., Bodmer W.S., Bontrop R.E., Dupont B., Erlich H.A., Fauchet R., Mach B., Mayr W.R., Parham R., Sasazuki T., Schreuder G.M., Strominger J.L., Svejgaard A., Terasaki P.L.:** Nomenclature for the factors of the HLA-system. *Tissue Antigens*, 49, 1997, č. 3, s. 297–321.

**Buc M., Ferenčík M.:** *Imunogenetika*. Bratislava, Alfa plus 1994, 472 s.

**Buc M., Nyulassy Š., Štefanovič J.:** Zisťovanie, biologický a medicínsky význam histokompatibilných (transplantačných) antigénov. *Folia Fac. Med. Univ. Comenianae Bratisl.*, 13, 1975, č. 2, s. 75–124.

**Buc M., Nyulassy Š., Hnilica P., Bušová B., Štefanovič J.:** The frequency of HLA-Dw1 determinant in Subacute (de Quervain's) thyroiditis. *Tissue Antigens*, 14, 1979, s. 63–67.

**Campbell R.D., Trowsdale J.:** Map of the human MHC. *Immunol. Today*, 14, 1993, s. 349–352.

**Fischer F.G., Faé I., Pickl F.W.:** Distribution of Polymorphic HLA-DR and -DQ Alleles as Determined by Restriktion Fragment Length Polymorphism Analysis in an Austrian Population. *Vox Sang*, 62, 1992, s. 236–241.

**Loudová M., Siegllová Z., Holeňa O., Cukrová V., Brdička R.:** HLA Class Gene Frequency in Czech Population. *Folia Biol.*, 42, 1996, s. 241–244.

**Nikš M., Nyulassy Š., Buc M., Hirschová V., Štefanovič J., Silvánová E.:** HLA-DR antigény v slovenskej populácii. *Bratisl. lek. Listy*, 77, 1982 a, s. 701–711.

**Nyulassy Š., Hirschová V., Buc M., Silvánová E., Štefanovič J.:** Sledovanie HLA systému v slovenskej populácii. Frekvencia antigénov A, B a C lokusov. *Bratisl. lek. Listy*, 68, 1977 a, s. 436–444.

**Olerup O., Zetterquist H.:** HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 39, 1992, s. 225–235.

**Olerup O., Aldener A., Fogdel A.:** HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*, 41, 1993, s. 119–134.

**Trowsdale J., Campbell R.D.:** Physical map of the human HLA-region. *Immunol. Today*, 9, 1988, s. 34–42.

**Trowsdale J., Campbell R.D.:** Complexity in the Major Histocompatibility Complex. *J. Immunogenet.*, 19, 1992, s. 443–446.

**Tsuji K., Aizawa M., Sasazuki T. (Ed.):** HLA 1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference I., Oxford Scient. Public., 1991.

Do redakcie došlo 7.10.1997.