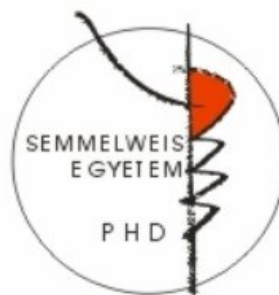


# Hazai populációk immungenetikai jellemzése a vérképző őssejtdonor szelekció javítása érdekében

Doktori értekezés

**Inotai Dóra**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tordai Attila, MTA doktora, egyetemi tanár,  
intézetigazgató

Hivatalos bírálók: Dr. Kriván Gergely, PhD, osztályvezető főorvos  
Dr. Miklós Katalin, CSc

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Benyó Zoltán, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Folyovich András, PhD, osztályvezető  
főorvos  
Dr. Vásárhelyi Barna, MTA doktora, egyetemi  
tanár, intézetigazgató

Budapest  
2018

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	5
1 Bevezetés .....	7
1.1 A HLA rendszer .....	7
1.1.1 A HLA rendszer felfedezése, felépítése, öröklődése .....	7
1.1.2 A HLA-rendszer funkciója .....	11
1.1.3 A HLA-rendszer nevezéktana .....	12
1.1.4 A HLA allélcsoportok meghatározása (HLA tipizálás) .....	15
1.1.5 A HLA null allélek jelentősége a vérképző őssejt átültetés vonatkozásában....	16
1.1.6 A HLA-C*04:09N null allél.....	18
1.2 A HLA-rendszer vizsgálatának populációgenetikai jelentősége.....	19
1.2.1 Az Európában élő roma etnikai csoportok genetikai kapcsolata.....	20
1.2.2 A magyarországi roma kisebbség rövid története .....	21
1.3 A HLA-rendszer vizsgálatának klinikai jelentősége .....	23
1.3.1 Betegségasszociáció .....	23
1.3.2 Szolid szerv transzplantáció .....	23
1.3.3 Hematopoetikus őssejt transzplantáció .....	24
1.3.3.1 A hematopoetikus őssejtátültetés általánosságban .....	24
1.3.3.2 A donorkiválasztás szempontjai allogén HSCT előtt.....	26
1.3.3.3 Nemzetközi őssejtdonor regiszterek és a Magyar Őssejtdonor Regiszter ....	34
1.3.3.4 A Transzplantációs Immungenetikai Laboratórium kivizsgálási algoritmus HSCT előtt.....	36
1.3.3.5 A HLA rendszer vizsgálatának klinikai jelentősége a HSCT során.....	38
2 Célkitűzések.....	40
3 Anyagok és módszerek .....	42
3.1 Vizsgált csoportok.....	42
3.1.1 Vizsgált csoportok a HLA-C*04:09N vizsgálatokhoz.....	42
3.1.2 Vizsgált csoportok a HLA-A, -B, és -DRB1 lókuszeket összehasonlító vizsgálatokhoz .....	43
3.1.2.1 Magyarországi populációk.....	43
3.1.2.2 Közép- és délkelet-európai és roma eredetű populációk .....	44
3.2 Molekuláris biológiai módszerek .....	45
3.2.1 DNS izolálás.....	45

3.2.2	HLA allélcsoportok meghatározása .....	46
3.2.2.1	Polimeráz láncreakció szekvencia specifikus primerekkel (PCR-SSP) .....	46
3.2.2.2	Polimeráz láncreakció és szekvencia specifikus oligonukleotid hibridizáció (PCR-SSO).....	46
3.2.3	A HLA-C*04:09N jelenlétének direkt meghatározása allélspecifikus PCR-rel	47
3.2.4	A HLA-C*04:09N jelenlétének indirekt meghatározása .....	48
3.2.5	Sanger szekvenálás .....	49
3.3	Populációgenetikai módszerek .....	50
3.3.1	Allélcsoport frekvencia értékek, Hardy-Weinberg egyensúly és becsült heterozigótáság meghatározása Gene[RATE] program segítségével .....	50
3.3.2	Kumulatív allélcsoport frekvencia értékek számítása .....	50
3.4	Statisztikai módszerek .....	50
3.4.1	Az AF értékek összehasonlítása .....	50
3.4.2	F-statisztika .....	51
3.4.3	Nem-metrikus sokdimenziós skálázás (Non-metric Multidimensional Scaling Analysis, NMDS).....	51
4	Eredmények .....	54
4.1	A HLA-C*04:09N alléllal kapcsolatos vizsgálatok eredményei .....	54
4.1.1	A HLA-C*04:09N allél gyakoriságának meghatározása .....	54
4.1.2	A HLA-C*04:09N allélt hordozó haplotípusok gyakoriságának becslése.....	55
4.2	A HLA-A, -B és -DRB1 allélcsoport gyakoriság vizsgálatok a magyarországi populációkban .....	57
4.2.1	A Hardy-Weinberg egyensúly ellenőrzése.....	57
4.2.2	Allélcsoport gyakoriságok.....	57
4.2.3	Kumulatív allélcsoport frekvencia értékek és géndiverzitás .....	60
4.3	A magyarországi populációk összehasonlítása nemzetközi adatokkal .....	61
4.3.1	F-statisztika .....	61
4.3.2	Nem-metrikus sokdimenziós skálázás.....	64
5	Megbeszélés.....	68
6	Következtetések .....	73
7	Összefoglalás .....	76
8	Summary.....	77
9	Irodalomjegyzék .....	78
10	Saját publikációk jegyzéke .....	89

11 Köszönetnyilvánítás.....	90
12 Függelék.....	91
12.1 Ábrák jegyzéke.....	91
12.2 Táblázatok jegyzéke.....	91

## Rövidítések jegyzéke

AA	aplasztikus anémia
AF	allélcsoport frekvencia
ALL	akut limfoid leukémia
AML	akut mieloid leukémia
BM	bone marrow (csontvelő)
BMDW	Bone Marrow Donors Worldwide (Nemzetközi Csontvelődonor Adatbázis)
CBU	cord blood unit (köldökzsinórvérből származó őssejt)
CDC	complement dependent cytotoxicity (komplementfüggő citotoxicitás)
CML	krónikus mieloid leukémia
CMV	citomegalovírus
GVHD	graft versus host disease (graft versus host betegség)
GVL	graft versus leukémia
H	estimated heterozygosity (becsült heterozigótaság)
HLA	humán leukocita antigén
HR	high resolution (nagy felbontású HLA eredmény)
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation (vérképző őssejt átültetés)
HVG	host versus graft
HWE	Hardy-Weinberg Egyensúly
MAC	myeloablative conditioning (mieloablatív kondicionálás)
MDS	mielodiszpláziás szindróma
MDS1	sokdimenziós skálázás első dimenziója
MHC	Major Histocompatibility Complex (fő hisztokompatibilitási komplex)
MM	mismatch (eltérés)
MUD	matched unrelated donor (önkéntes nem rokon HLA egyezettetett donor)
NMDP	National Marrow Donor Program (nemzeti csontvelő donor program)
NMDS	Non-metric Multidimensional Scaling (nem-metrikus sokdimenziós skálázás)
NGS	Next Generation Sequencing (új generációs szekvenálás)
NRM	non-relapse mortality (nem relapszus okozta mortalitás)
OS	overall survival (összesített túlélés)
OVSz	Országos Vérellátó Szolgálat
PBSC	peripheral blood stem cell (perifériás vérből származó őssejt)

PCR	polymerase chain reaction (polimeráz lánreakció)
PCR-SSO	sequence specific oligonucleotide (szekvencia specifikus oligonukleotid)
PCR-SSP	sequence specific primer (szekvencia specifikus primer)
RIC	reduced intensity conditioning (csökkentett intenzitású kondicionáló kezelés)
SBT	sequence based typing (szekvencia alapú tipizálás)
TCR	T-sejt receptor
WMDA	World Marrow Donor Association (Nemzetközi Csontvelődonor Szervezet)

A dolgozatban a latin eredetű orvosi szakkifejezéseket igyekeztem következetesen magyarosítva írni és a magyar helyesírás szabályait figyelembe véve használni.

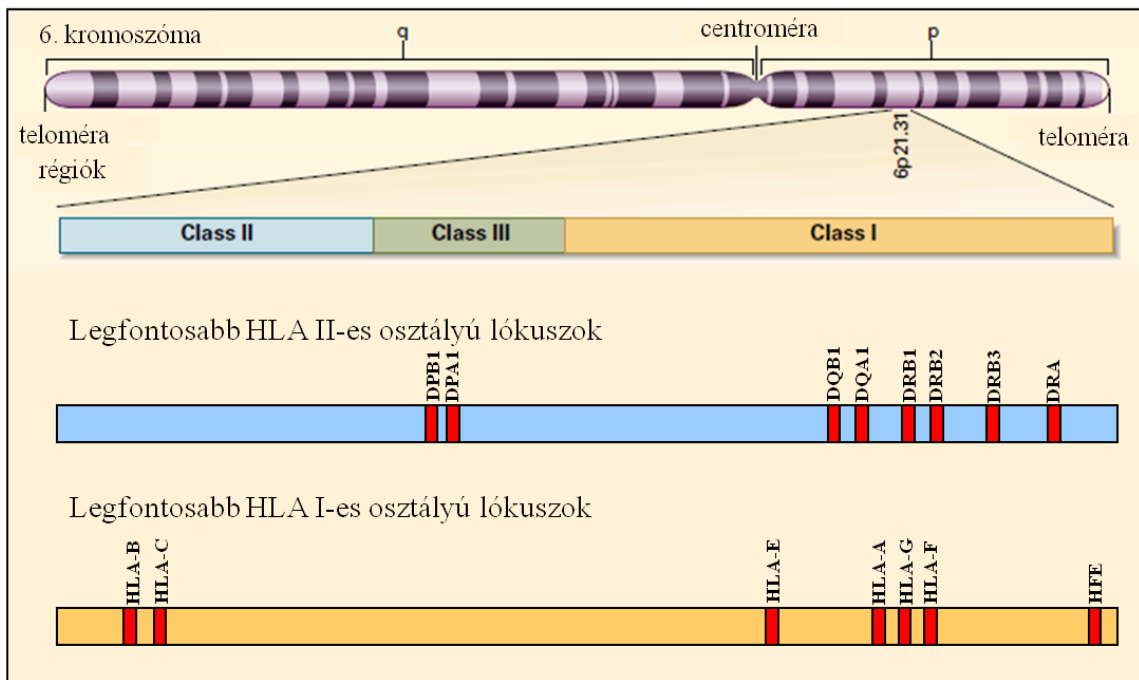
# 1 Bevezetés

## 1.1 A HLA rendszer

### 1.1.1 A HLA rendszer felfedezése, felépítése, öröklődése

A fő hisztokompatibilitási antigének felfedezése elengedhetetlen volt a sikeres szerv és szövet transzplantációk kivitelezéséhez, hiszen a HLA antigének egyeztetése a recipiens és a donor tekintetében alapvetően befolyásolja a transzplantáció sikerességét. A fő hisztokompatibilitási komplex (*Major Histocompatibility Complex* – MHC) felfedezése George Snell, amerikai immunológus nevéhez fűződik. Snell az 1940-es években végzett egérikísérleteket, amelyek során daganatokat oltott át különböző egyedekbe és a vizsgálatok során egyes egyedekben a daganat növekedését (megtűrést), más egyedekben pedig a daganat elpusztulását (kilökődését) tapasztalta. Megállapította, hogy a megtapadást vagy a kilökődést a sejtekre jellemző genetikailag meghatározott különbségek vagy azonosságok határozzák meg. Snell a jellemző sejt felszíni fehérjéket "hisztokompatibilitási antigéneknek", és az azokat meghatározó genetikai rendszert "fő hisztokompatibilitási komplexnek" nevezte el. (Petrányi, 2005) A "hisztokompatibilitási antigén" kifejezés azonban ténylegesen csak a transzplantációs terminológiában állja meg a helyét, hiszen a szervátültetés során zajló folyamatok nem tekinthetők fiziológiásnak. Az MHC-gének által kódolt fehérjék csak a nem kompatibilis szövet- vagy szervátültetés mesterségesen létrehozott szituációjában viselkednek antigénként, evolúciósan speciális biológiai funkciókkal rendelkező membránfehérjék. Az emberi MHC-régió általánosan használt elnevezése, a *Human Leukocyte Antigen* (HLA) Jean Dausset, francia kutató nevéhez köthető. (Rajnavölgyi, 2012)

A HLA-génkomplex a 6. kromoszóma rövid karján helyezkedik el (Klein, 2000), mintegy 4000 kb hosszúságával a teljes emberi genom 0,13%-át teszi ki. (1. ábra) Rendkívül nagymértékű géndenzitás mellett több mint 200 gént tartalmaz. Az MHC-komplexben tartozó gének közül körülbelül 50% kódol fehérjét. Az MHC régió erősen konzervált nukleotid sorrendű része a humán genomnak és az egyik legtöbbet vizsgált szakasza is.



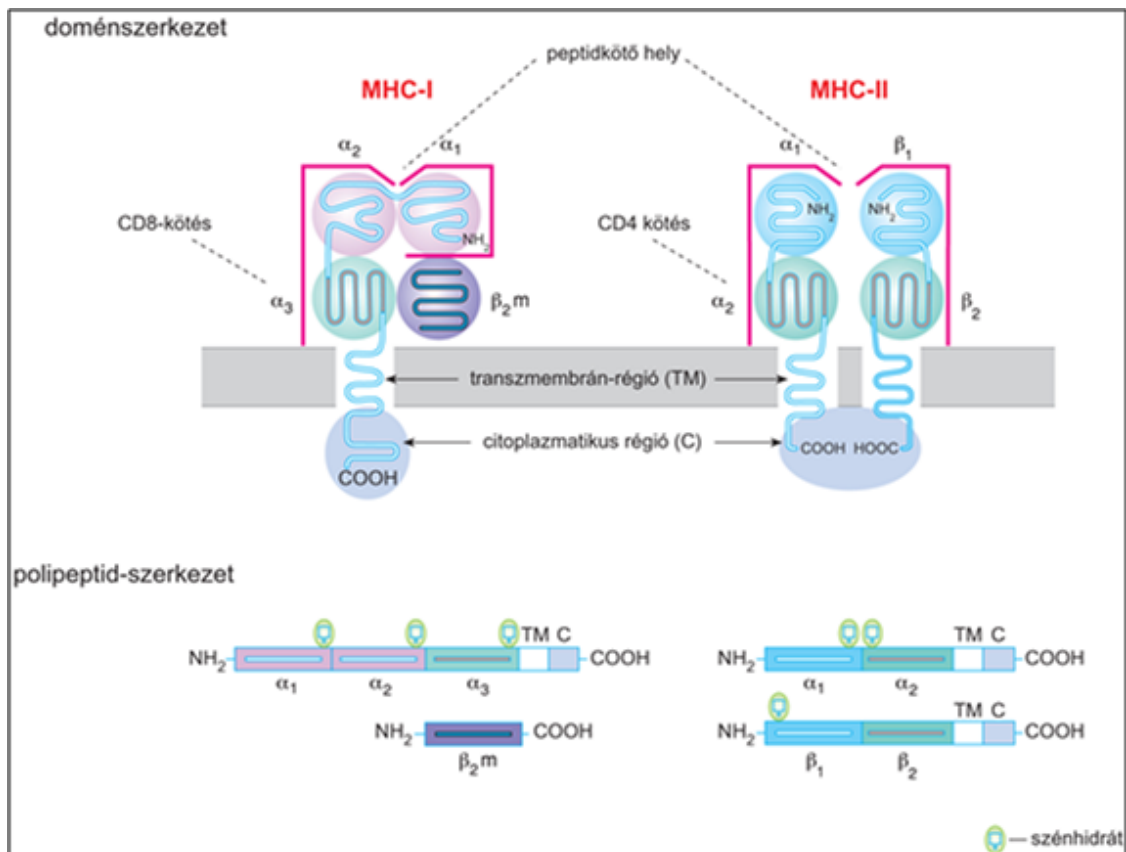
**1. Ábra: A HLA génkomplex elhelyezkedése a 6. kromoszómán** (Klein, 2000 nyomán)

A HLA génkomplexen belül három fő régió különíthető el: a HLA-I-es osztályú (narancssárga blokk), -II-es osztályú (kék blokk) és -III-as osztályú (szürke blokk) gének csoportja. A hematopoetikus őssejtátültetés szempontjából legfontosabb lókuszok a HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 és -DPB1.

A 6. kromoszóma rövid karján a telomerikus rész felől haladva a centroméra felé három fő régiót különíthetünk el: Class I, Class III, Class II. A klasszikus HLA I-es osztályba tartozik -többek között- a HLA-A, -B és -C lókusz, az általuk kódolt fehérjetermékek minden magvas sejt felszínén megtalálhatók. (Shiina 2009) A HLA-A, -B és -C lókuszain elhelyezkedő szerkezeti gének az I. osztályba tartozó klasszikus MHC-fehérjék (MHC-I)  $\alpha$ -láncát kódolják, ez a lánc a  $\beta$ -2-mikroglobulin ( $\beta$ 2m) fehérjével társulva jelenik meg a sejtek felszínén. (2. ábra) A  $\beta$ 2m-t kódoló gén a 15. kromoszómán található. A HLA-C lókusz a HLA-A és HLA-B között helyezkedik el. A II. osztályba tartozó legfontosabb MHC-molekulák (MHC-II) kódolásáért a HLA-DR, HLA-DQ és HLA-DP lókuszok felelősek. Ezek a lókuszok A és B géneket tartalmaznak, amelyek a dimer HLA-D molekulák  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncát határozzák meg. A polimorfizmusok leginkább a  $\beta$ -láncon lokalizálódnak. A génduplikációk eredményeként a HLA-DR lókusz több B gént is tartalmaz. A DRB1, DRB3, DRB4 és DRB5 funkcionális gének, míg a DRB2 pszeudogén. A DRB3 génterméke a DR52 antigén, a DRB4 kódolja a DR53 antigént és a DRB5 a DR51 antigént fejezi ki. A DRB3, 4, 5 gének szorosan kapcsolatosak adott DRB1 allélcsoportokkal. A III. osztályba



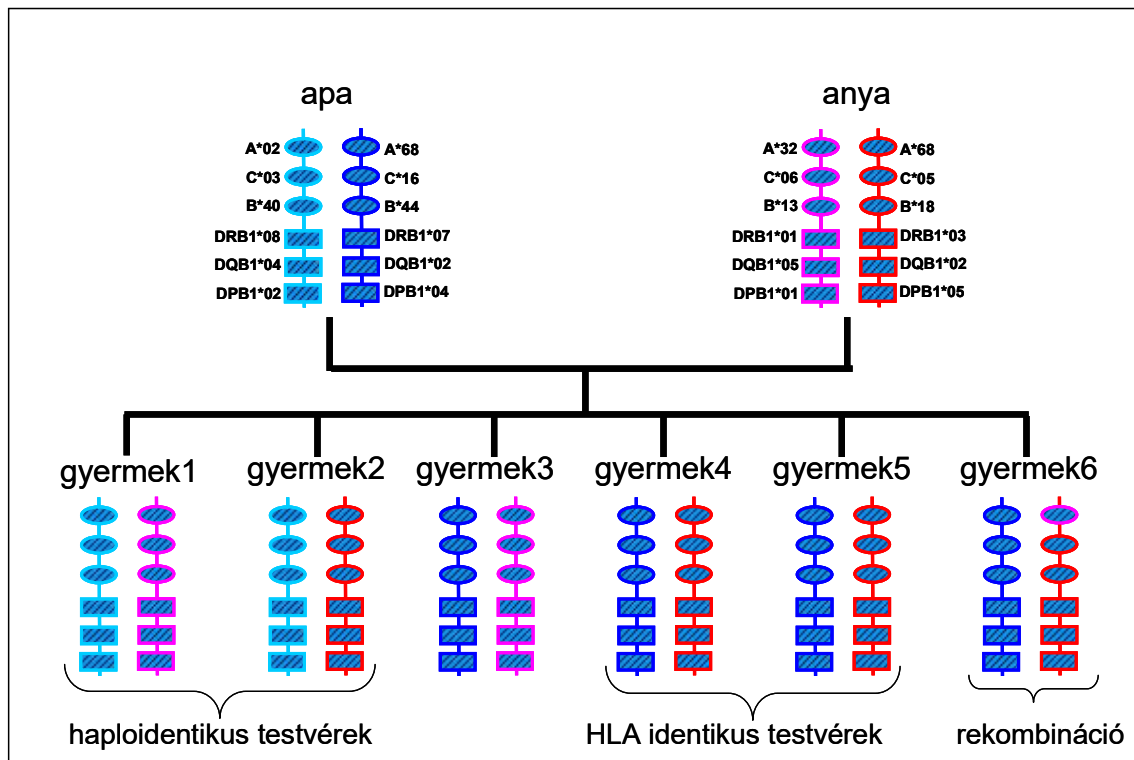
sorolt gének által kódolt fehérjék is fontos immunológiai szerepet töltenek be, ide tartozik a komplementrendszer néhány eleme (C2, C4A, C4B), a hősokk fehérjék egyike (HSP70), továbbá a tumor nekrozis faktor- $\alpha$  és - $\beta$  (TNF). (Rajnavölgyi, 2012, Rajczy, 2013)



**2. Ábra: Az MHC-I és MHC-II molekulák felépítése** (Rajnavölgyi, 2012) Az MHC-I molekula egy polimorf  $\alpha$ - és egy konzervált  $\beta$ -2-mikroglobulin ( $\beta$ 2m) láncot tartalmazó heterodimer. Az I-es osztályú molekulákat két peptidkötő domén ( $\alpha$ 1 és  $\alpha$ 2), egy immunglobulinszerű domén ( $\alpha$ 3), egy transzmembrán régió és egy citoplazmatikus régió építi fel. Az MHC-II molekula egy polimorf  $\alpha$ - és egy polimorf  $\beta$ -láncot tartalmazó heterodimer. A II-es osztályú molekulák peptidkötő régióját az  $\alpha$ 1 és  $\beta$ 1 lánc alakítja ki, további alkotóegységek: az immunglobulinszerű domén ( $\alpha$ 2 és  $\beta$ 2), a transzmembrán régió és a citoplazmatikus szakasz.

A HLA lókuszon elhelyezkedő allélek a mendeli öröklésment szerint kodominánsan öröklődnek, vagyis a szülőktől öröklött valamennyi allél terméke kifejeződik. (3. ábra) Abban az esetben, ha adott HLA lókuszon az apai és anyai kromoszómán is kétféle allél található, az utódok genotípusa a variációs lehetőségekből adódóan négyféle lehet. Az utódokba a különböző HLA-lókuszon lévő allélek együtt öröklődnek tovább.

Haplotípusnak nevezzük az egy kromoszómán lévő, az utódokba együtt tovább öröklődő allélek csoportját. (Rajnavölgyi, 2012) Ezért nemcsak annak a valószínűsége 25%, hogy adott egyén a testvérével azonos lesz adott HLA-lókusz tekintetében, hanem annak is, hogy ha minden lókuszra heterozigóták a szülők és nem történt crossing over, akkor az összes HLA lókuszra is identikusak lesznek. (3. ábra) A haplotípusok crossing overekkel viszont megváltozhatnak, a rekombináció legnagyobb valószínűséggel a HLA-A és -C, illetve a HLA-B és -DR lókuszok között következik be, mert ezen a két helyen helyezkednek el egymástól a gének a legnagyobb távolságban. Két (vagy több) lókusz együttes vizsgálatakor fontos kérdés, hogy az egyik lókuszon detektált genotípus korrelál-e a másik lókuszon azonosított genotípussal. Ha nincs ilyen korreláció, akkor a lókuszok kapcsoltsági egyensúlyban vannak. Abban az esetben, ha a lókuszok nincsenek kapcsoltsági egyensúlyban, akkor az egyik lókuszon azonosított genotípus mellett az egyén gyakrabban (vagy ritkábban) hordoz a másik lókuszon egy adott genotípust. A kapcsoltsági egyensúlytól való eltérés mértéke az ún. *linkage disequilibrium* (LD). (Jorde, 2000) A meiotikus rekombináció és a LD erőssége között fordított relációt mutattak ki az MHC Class II régiójában, ebből következik, hogy a rekombináció tölti be a legfontosabb szerepet a haplotípus blokkok erősségének a meghatározásában. (Cullen, 2002) A HLA régió belül nagyobb valószínűséggel fordul elő kapcsoltság, mint a humán genom más részeiben, különösen a HLA-DRB1 alléljei és bizonyos -DQA1 és -DQB1 allélek között. (Klitz, 2003)



**3. Ábra: A HLA gének öröklésmenete** A HLA gének a mendeli öröklésment szerint kodominánsan öröklődnek. 25% a valószínűsége annak, hogy a testvérek mindkét szülőtől ugyanazt a haplotípust kapják és így HLA-identikusak egymással (gyermek4 és gyermek5). A szülők gyermekeikkel mindig haploidentikusak, kivéve, ha rekombináció történt, mert akkor nem hordozzák ugyanazt a haplotípust. Gyermek6 esetében rekombináció történt az anyai kromoszómán a HLA-A és HLA-C lókuszek között. Gyermek1 és Gyermek2 haploidentikusak egymással, mivel ugyanazt az apai kromoszómát örökölték.

### 1.1.2 A HLA-rendszer funkciója

Az MHC-rendszer által kódolt fehérjék az immunglobulinok családjába tartoznak. A klasszikus MHC-I és -II molekulák membrántól távol eső részén sajátos peptidkötő hely található. Az MHC-molekulák rendkívül konzervált felépítésűek, ugyanakkor a peptidkötő hely kialakításában nagyfokú változatosságot mutatnak. Különböző HLA molekulák más és más peptideket képesek megkötni. A T-limfociták, az antigénprezentáló sejtekkel ellentétben, kizárólag az MHC-peptid-TCR komplexben (TCR: T-sejt receptor) képesek az antigén felismerésére. A HLA-I-es osztályú molekuláknak az antigén prezentáció endogén útjában van jelentősége. A  $T_{\text{citotoxikus}}$ -sejtek képesek a HLA-I molekulákkal asszociált endogén peptidek felismerésére. A  $T_{\text{helper}}$ -sejtek az exogén eredetű peptidek HLA-II molekulákkal alkotott komplexeit ismerik fel. (Klein, 2000, Rajnavölgyi, 2012) Az I-es és II-es osztályú HLA molekulák eltérő szöveti megoszlást mutatnak. Az I-es osztályú fehérjék minden magas sejt

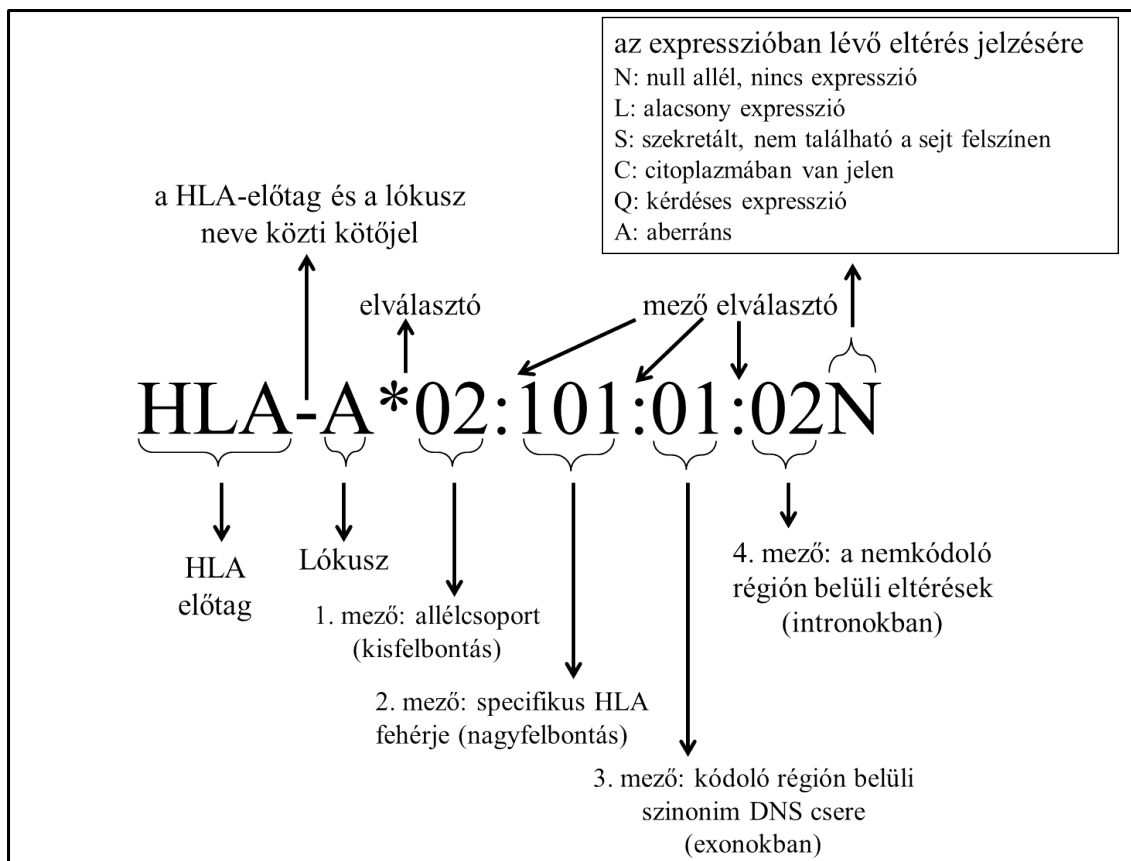
felszínén megtalálhatók, de eltérő mértékben fejeződnek ki a különböző szövetekben. A II-es osztályú membránfehérjék kifejeződése szigorúan szabályozott, elsősorban a hivatásos antigénprezentáló sejtek felszínén találhatóak meg, amelyek közé a B-limfociták, a makrofágok és a dendritikus sejtek sorolhatók. Ezek a sejtípusok tehát I-es és II-es osztályú HLA-fehérjéket is kifejeznek, az expresszió mértéke pedig elsősorban a sejtek aktiváltsági szintjétől függ. Az MHC fehérjék peptidkötő receptorként működnek, és a fent említett nagyfokú polimorfizmus úgy valósul meg, hogy a különböző allélek nukleotid sorrendjében azonosított aminosav változást okozó eltérések nagy része a peptidkötő hely kialakításáért felelős exonokban lokalizálódik, de a teljes molekula térszerkezetét alapvetően nem befolyásolja. Adott MHC fehérjének egyetlen kötőzsebébe többféle peptid is illeszkedhet, de egyidejűleg csak egy kötődhet. Az MHC-molekulák kettős szerepet töltenek be az adaptív immunrendszer működésében. Egyrészt a saját fehérjékből származó peptideket folyamatosan mutatják be a fejlődő és érett T-limfociták számára, mint tolerálható anyagokat, másrészt az antigén felismerésben játszanak szerepet, azzal, hogy az idegen, illetve a megváltozott saját fehérje antigénekből származó peptideket kötik meg és mutatják be az érett T-limfociták számára, ezáltal az antigén-specifikus immunválaszt indítják el. Szerv vagy szövet transzplantáció során az MHC molekulák fő szövetösszeférhetőségi antigénként viselkednek és intenzív T-sejt választ provokálnak. (Klein, 2000, Rajnavölgyi, 2012)

### **1.1.3 A HLA-rendszer nevezéktana**

A HLA molekulákat egységes szabályrendszer szerint nevezik el és a szakirodalomban ezeket figyelembe véve hivatkoznak rájuk. A HLA-A\*02:101:01:02N példáján keresztül szeretném bemutatni a HLA molekulák nevezéktanát. (4. ábra) Minden esetben a HLA-előtagot követi a lókuszt (A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, stb) megjelölése, elválasztásuk kötőjellel történik. A II-es osztályú lókusztok A és B gént tartalmaznak, amelyek a dimer HLA-D molekulák alfa és béta láncát határozzák meg, például a DR lókusztok béta könnyű láncának a génje: HLA-DRB1. A fő lókusztok nevében gyakori a „w” jelölés, amely a HLA antigének elnevezésére alakult nemzetközi munkacsoportokra („workshop”) utal (pl. Cw4). A felső indexben található csillag (\*) jelölés azt mutatja, hogy a tipizálás DNS alapú módszerrel történt, amennyiben a lókuszt után közvetlenül az antigéncsoportot jelölő szám következik (pl.: HLA-A2), ez azt jelenti, hogy a HLA típus szerológiai módszerrel lett meghatározva. Az első mezőben található kétjegyű arab szám jelöli az allélcsoportot (HLA-A\*02), ezt nevezzük

kisfelbontású vagy allélcsoport-szintű eredménynek. A mezőket egymástól kettőspont választja el. A második mezőben két vagy háromjegyű szám található, amely a specifikus HLA fehérjét határozza meg (HLA-A\*02:101), tehát ebben az esetben a HLA-A\*02 allélcsoporton belül a HLA-A\*02:101-es allélről beszélünk. Ennek az allélnak még további változatait lehet azonosítani, aszerint, hogy a nukleotid szekvenciában azonosított különbség hol helyezkedik el. Kódoló régió belüli (exon) szinonim (aminosaveltéréssel nem járó) cserét a harmadik mezőben (HLA-A\*02:101:01), kódoló régió kívüli (intron) eltérést a negyedik mezőben (HLA-A\*02:101:01:02) jelölünk. A negyedik mező után különböző betűjelek (N, L, S, C, Q, A) szolgálnak az expresszió mértékének a kifejezésére. A normál expressziót a betű hiánya mutatja. „N” betű jelöli az úgynevezett null alléleket, amelyek terméke nem fejeződik ki a sejt felszínén. Az „L” betű alacsony expressziós szintre utal (angolul „low”). Azokat az alléleket, amelyek olyan fehérjéket határoznak meg, amelyek szolubilis szekretált molekulaként fejeződnek ki, de nincsenek jelen a sejt felszínén „S” utótaggal jelöljük. „C” betűjel olyan alléleket jelöl, amelyek terméke csak a citoplazmában van jelen, de a sejt felszínre nem kerül ki. Az olyan allélek, amelyekben egy korábban azonosított mutáció jelentős hatással lehet a sejt felszíni expresszióra, viszont ez a megállapítás nincs megerősítve, „Q” utótaggal jelöljük a kérdéses (angolul „questionable”) kifejeződés mértékére utalva. Végül, azokban az esetekben, ahol valamilyen kétség merül fel azzal kapcsolatban, hogy a fehérje egyáltalán kifejeződik-e, az aberráns szóra utalva „A” jelölés szükséges. (<http://hla.alleles.org>, Robinson, 2015, Nunes E, 2011, Marsh 2010, Elsner 2004, Klein, 2000)

Az tekinthető nagyfelbontású eredménynek, ahol a vizsgált személyben az adott HLA génben az antigénkötő zseb meghatározásáért felelős exonok szekvenciája ismert, tehát a HLA I-es osztály esetén a 2-es és 3-as exon, a HLA II-es osztályú lókuszek esetén a 2-es exon nukleotid sorrendje van meghatározva, illetve a null allélek jelenléte ki van zárva. (Nunes E, 2011) A nagyfelbontású eredmény (high resolution –HR) azonban nem minden esetben egyezik meg az allélszintű meghatározással. A HR eredménynél gyakori az ún. *ambiguitás*, amikor több allél azonos az említett releváns exonokban, és a polimorfizmusok ezeken a régiókon kívül helyezkednek el, bizonyos allélpárok pedig a polimorfizmusok cisz-transz helyzete miatt nem zárhatók ki (lókuszszerkezet specifikus szekvenálás). Allélszintű eredményről akkor beszélhetünk, ha a módszer egyetlen konkrét HLA allélt határoz meg.



**4. ábra: A HLA-rendszer nevezéktana** (Marsh, 2010 nyomán) A WHO Nomenclature Committee egységesen nevezi el a HLA alléleket az ábrán látható szempontok szerint. A HLA-előtagot követi a lókuszt megnevezése, a \* elválasztó jelenti a DNS alapú meghatározást. Az első mező jelöli az allélcsoportot, amely a kisfelbontású eredménynek felel meg. A második mezőben található szám specifikus HLA fehérjét határoz meg. Kódoló régió belüli szinonim cserét a harmadik mezőben, kódoló régió kívüli eltérést a negyedik mezőben jelölünk. A negyedik mező után különböző betűjelek (N, L, S, C, Q, A) szolgálnak az expresszió mértékének a kifejezésére.

Az azonosított HLA allélek száma folyamatosan nő, amely leginkább az egyre fejlettebb molekuláris biológiai módszereknek köszönhető. Napjainkban különösen az új generációs szekvenálás (*Next Generation Sequencing* – NGS) segítségével számos új allélt írtak le. Feltehetően nem az egyre nagyobb számban megjelenő polimorfizmus okozza az exponenciális növekedést a HLA allélek számában, sokkal inkább valószínű, hogy a polimorfizmusok nagyobb része már régóta jelen van, csak a módszerek nem voltak alkalmasak a detektálásukra, illetve kis mintaszám esetén sem feltétlenül kerül be a csoportba olyan személy, aki hordoz korábban nem azonosított allélt. (Sanchez-Mazas 2011) 2017 decemberéig 12631 db HLA I-es osztályú, valamint 4700 HLA II-es osztályú allélt írtak le. A legpolimorfabb lókuszt a HLA-B, 4859 azonosított alléllal. A

vérképző őssejt transzplantációban legfontosabb szerepet játszó, úgynevezett fő HLA-lókuszokban azonosított allélek számát a 1. táblázat mutatja.

**1. táblázat A fő HLA lókuszokban azonosított allélek, fehérjék és null allélek száma**

([www.hla.alleles.org](http://www.hla.alleles.org) (belépve 2017. december 1-én), Robinson (2015))

gén neve	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DPB1
allélek száma	3968	4828	3579	2103	1142	894
fehérjék száma	2781	3501	2490	1520	774	641
null allélek száma	186	147	131	52	31	22

#### 1.1.4 A HLA allélcsoportok meghatározása (HLA tipizálás)

A HLA tipizálás kezdetben szerológiai módszerekkel történt, amelynek alapját a Paul Terasaki nevéhez fűződő 1964-től bevezetett komplementfüggő mikrocitotoxicitási (CDC) módszer adta. (Terasaki 1964) A módszer során az úgynevezett Terasaki tálcák vályúiba előzetesen betöltött egyedi specificitású anti-HLA savókhoz adjuk a vizsgálni kívánt személy izolált fehérvérsejtjeit. A savóban jelenlévő ellenanyagok specifikusan kikötődnek a fehérvérsejtek felszínén jelenlévő HLA antigénekhez, majd komplement hozzáadásával a komplementrendszer aktiválódik, amelynek hatására ezek a sejtek elpusztulnak és membránjuk átjárhatóvá válik. Vitális festéket, majd formalint adva a rendszerhez, az elpusztult sejtek megfestődnek, és a fixált reakció fáziskontraszt mikroszkóppal leolvasható. A pozitív és negatív reakciókból határozható meg a HLA típus. A módszer egyik fő hátránya, hogy a fehérvérsejtek életképességének csökkenése jelentősen megnehezíti a kiértékelést. Emellett a szerológia alapú tipizálásnak jelentős korlátai vannak: a HLA-C lókusz esetén nem alkalmas a Cw12, Cw14, Cw15, Cw16, Cw17, Cw18 azonosítására, illetve a DP-antigének kimutatására sem állnak rendelkezésre megfelelő ellenanyagok. (Balas 2002, Rajczy, 2013) Ugyanakkor a szerológiai HLA meghatározásnak nagy előnye, hogy a detektált HLA-molekula ténylegesen jelen van a sejt felszínén, szemben a molekuláris technikákkal azonosított allélekkel, amelyek expressziós szintjéről a módszer nem ad információt. Ennek különösen a null allélek esetén van jelentősége.

A HLA tipizálás történetében a DNS-alapú módszerek megjelenése hozott forradalmi változást. Ezekkel a módszerekkel megbízhatóbb eredményt kaphatunk és segítségükkel nagyfelbontású eredmények is meghatározhatók. Kis, illetve nagyfelbontású eredmény nyerhető a következő módszerekkel: PCR szekvencia specifikus primerrel (PCR-SSP)

(Schaffer, 2001), illetve PCR és szekvencia specifikus oligonukleotidokkal történő hibridizáció (PCR-SSO) (Dalva, 2014), valamint *Real Time PCR*. Nagyfelbontású eredményt kaphatunk a szekvencia alapú tipizálással (SBT) (Voorter, 2014) és a legpontosabb HLA meghatározási módszer az új generációs szekvenálás (NGS) (Gabriel, 2014), hiszen segítségével az egyes HLA génekben található összes exon és intron szekvenciája meghatározható (kivéve HLA II-es osztály a szekvenálandó szakasz hossza miatt). Az NGS nagy valószínűséggel képes lesz kiváltani a többi módszert a jövőben. A Transzplantációs Immungenetikai Laboratóriumban a fent említett módszerek közül a PCR-SSP, -SSO és SBT-t alkalmazzuk, a Real Time PCR és NGS bevezetését a közeljövőben tervezzük. (A PCR-SSP és PCR-SSO módszerek részletes leírását lásd az Anyagok és módszerek című fejezetben.)

### **1.1.5 A HLA null allélek jelentősége a vérképző őssejt átültetés vonatkozásában**

Null alléleknek a HLA gének olyan variánsait nevezzük, amelyek fehérjeterméke rendkívül kis koncentrációban, vagy egyáltalán nem fejeződik ki a sejt felszínén, ebből következően ezek az allélek szerológiai módszerekkel nem detektálhatók. Laboratóriumunkban jelenleg a HLA tipizálást kizárólag olyan DNS-alapú módszerekkel végezzük, amelyek a HLA géneknek a peptidkötő régiót kódoló exonokról adnak információt. Amennyiben a null allélt okozó polimorfizmus ezeken a régiókon kívül esik, a null alléllal a vizsgált szakaszon megegyező szekvenciájú, átlagos expressziót mutató HLA allélt azonosítunk. (Elsner, 2004) 2017 decemberéig 569 null allélt írtak le a fő HLA lókusznál, ezek közül 464 db null allélt a HLA-A, -B és -C lókuszekben, 105 db-ot pedig a HLA-DRB1, -DQB1 és -DPB1 lókuszekben találtak. (<http://hla.alleles.org/nomenclature>) Az expresszió nagymértékű csökkenését vagy teljes hiányát sokféle DNS-szerkezeti változás okozhatja a kódoló régióban. Előfordulhatnak pontmutációk, deléciók, inszerciók, amelyek legtöbbször korai stop kodont alakítanak ki. Ezen kívül a megváltozott expressziós szint hátterében előfordulhatnak olyan allélek is, amelyekben a kódoló régió belül nincs változás, viszont a promóter vagy az intronikus régiókon belül történnek módosulások (pl. *alternatív splicing*). (Balas, 2002) A vérképző őssejt transzplantáció során különösen nagy jelentősége van annak, hogy kizárjuk a null allélek jelenlétét a recipiensben és a donorban egyaránt. Abban az esetben, ha valamelyikükben nem expresszálódik egy adott HLA molekula, akkor molekuláris genetikai szinten a donor és recipiens egyezést



mutathat, de szerológiai szinten eltérnek és a transzplantációt követően súlyos szövődmény léphet fel. Ráadásul, ha ilyen eltérésről a transzplantáló hematológusnak nincsen tudomása a null allél azonosításának hiánya miatt, akkor a graft versus host betegség profilaxis nem állítható be megfelelő módon. Ha a donornak van HLA null allélje és a recipiens rendelkezik ennek az allélnek az átlagos expressziós szinten kifejeződő terméket kódoló variánsával, ez utóbbit a donor T-limfocitái felismerik és súlyos akut graft versus host betegséget okozhatnak. Ellenkező esetben, vagyis, ha a recipiensnek van sejt felszínen nem kifejeződő HLA allélje, akkor host versus graft irányban térnek el a HLA allélek egymástól, amely viszont a graft kilökődését eredményezheti. Ebben az esetben HLA identikus donort találni a recipiensnek meglehetősen nehéz, hiszen az önkéntes donor poolban nagyon kis valószínűséggel található azonosított null alléllal rendelkező donor, aki a többi fő HLA lókuszkban is egyezést mutat a beteggel. Ha nincs HLA-identikus donor, akkor a legjobb megoldás az, ha a donor homozigóta arra a HLA allélre, amelynek a termékét a recipiens átlagos szinten expresszálja, így a host versus graft irányú eltérés elkerülhető. (Elsner, 2004)

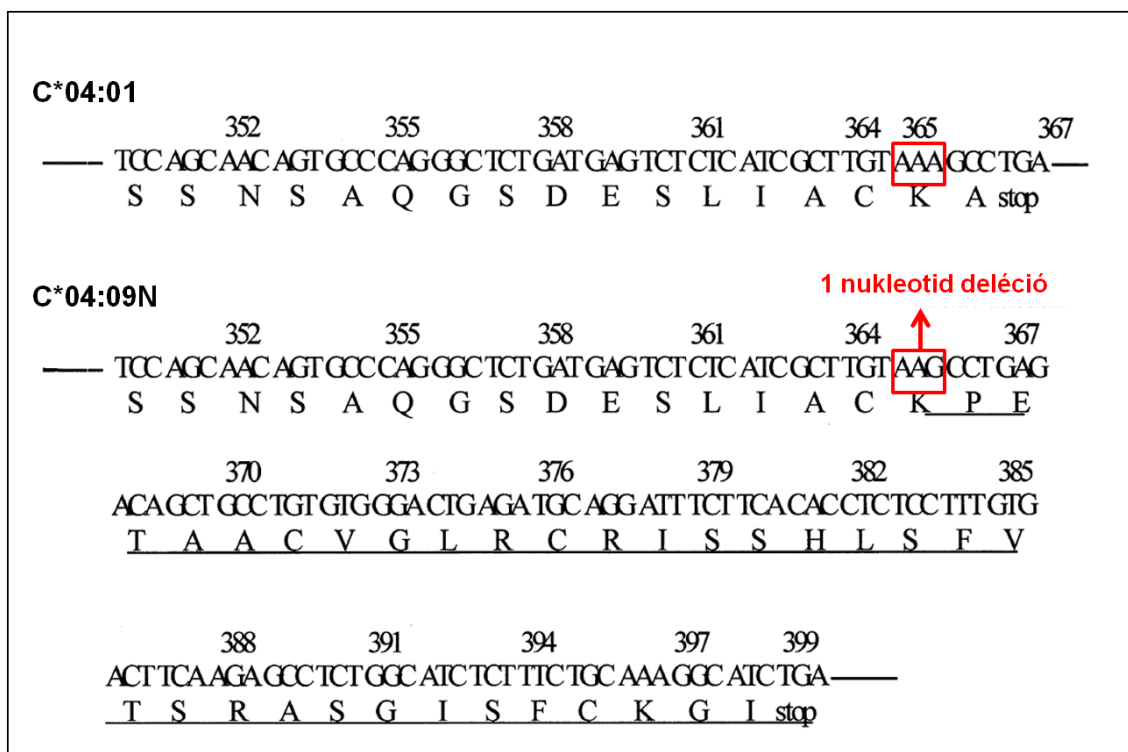
CDC módszerrel megállapítható, hogy adott HLA allél terméke jelen van-e a sejt felszínen vagy nincs, azonban a szerológiai HLA tipizálás helyét (annak számos metodikai korlátja miatt) idővel teljesen átvették a molekuláris biológiai módszerek. A Transzplantációs Immungenetikai Laboratóriumban nagyfelbontású HLA meghatározásra használt SBT módszer csak azokat a null alléleket zárja ki, amelyekben a null allélt okozó polimorfizmus az antigénkötő zseb kialakításáért felelős vizsgált exonokban lokalizálódik. Egyéb esetekben ambiguitásos eredményt kapunk a null alléleket tekintve. Fontos megjegyeznünk, hogy a „*Catalogue of common and well-documented (CWD) HLA alleles of American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*” elnevezésű adatbázis a fő lókuszkban leírt kb. 17 000 HLA allélnek csak kb. 7%-át tartalmazza. A „*common*” csoportba azok az allélek tartoznak, amelyeket számos populációban detektáltak és allélgyakoriságuk  $>0,001$  (0,1%) legalább 1500 főből álló csoportban. A „*well documented*” kategóriába olyan alléleket soroltak, amelyek nem terjedtek el olyan általánosan a humán populációban, csak kisebb népcsoportokban. Ezeknél az alléleknél a frekvencia nem pontosan ismert, és a következő két kritériumból az egyiknek érvényesülnie kell rájuk: a) legalább öt alkalommal figyelték meg egymással nem rokon egyéneken és SBT módszerrel határozták meg a releváns exonokat vagy b) három alkalommal detektálták SBT módszerrel, illetve specifikus haplotípusban figyelték meg nem rokon vizsgált

személyekben. A „ritka” kategóriában az allél frekvencia a HLA I. osztályú allélek esetén kisebb, mint 1/50000, a HLA II. osztályú allélek esetén pedig kisebb, mint 1/100000. Ide tartozik a null allélek jelentős része, (NMDP két évente megjelenő alléllista) azonban a fent említett „*common and well-documented alleles*” listán szerepel a HLA-A\*24:09N, B\*51:11N és a C\*04:09N is a „*common*” kategóriában. (Mack 2013, <http://igdawg.org/cwd.html>) Azért tartottuk fontosnak a C\*04:09N allél gyakoriságát hazai populációban meghatározni, mert a laboratóriumunkban alkalmazott módszer nem alkalmas a kizárására. A másik két fent említett null allél SBT módszerrel kizárható, mert az expresszió hiányáért felelős polimorfizmus a rutinszerűen meghatározott exonokban található. (NMDP policy, 2015)

### 1.1.6 A HLA-C\*04:09N null allél

A HLA-C\*04:09N volt az első null allél, amelyet a HLA-C lókuszbán azonosítottak, Balas és mtsai írták le 2002-ben. A HLA-C gén 8 exont tartalmaz, amelyek közül az 1-es exon kódolja a *leader* (vezető) peptidet, a 2-es és a 3-as exon pedig az antigénprezentációban szerepet játszó  $\alpha 1$  és  $\alpha 2$  domént. A 4-es exon kódolja a  $\alpha 3$  domént, az 5-ös exon pedig a transzmembrán régiót, illetve a citoplazmatikus farok kezdeti részét. A 6-os, 7-es és 8-as exon felelős a citoplazmatikus domén C-terminális részéért. A HLA-C\*04:09N allél egyetlen nukleotidban különbözik az átlagos expressziójú molekulát kódoló HLA-C\*04:01 alléltól. (5. ábra) A molekuláris biológiai módszerrel rutinszerűen nem vizsgált 7-es exon 1095. pozíciójában lévő adenin deléciója következtében a C\*04:09N allél jelenlétében a leolvasási keret elcsúszik és 97 bázispárral 3' irányban (*downstream* helyzetben) alakul ki egy új transzlációs stop kodon (c.1095delA). A mRNS meghosszabbodása miatt 32 aminosavval hosszabb lesz a fehérje citoplazmatikus doménje a vad típushoz képest, és ez a termék nem expresszálódik a sejt felszínén. (Balas 2002, Wang 2002, Elsner 2004, Lind 2013) A C\*04:09N allélt az egyik leggyakoribb null allélként tartják számon, 1000 kaukázusi származású amerikai között 2-5 esetben fordul elő. (Pinto 2004) A HLA-C\*04:09N allél frekvenciája 0,065% volt egy 8412 fős wales-i donorállományt vizsgálva (Downing 2002), egy másik tanulmányban 170 kaukázusi kanadai HLA-C\*04-et hordozó egyén közül 1,8%-nak volt a HLA-C\*04:09N allélváltozata (Potok 2006). A C\*04:09N allél nagy valószínűséggel kapcsolatos az A\*02:01, A\*23:01, a B\*44:03, a DRB1\*07:01 és a DQB1\*02 allélekkel ugyanis az A\*02:01/A\*23:01~B\*44:03~DRB1\*07:01~DQB1\*02

haplotípusokban gyakran fordul elő a HLA-C\*04:09N. (Downing 2002, Pinto 2004, Potok 2006)



5. Ábra: A C\*04:01 és C\*04:09N allélek nukleotid és aminosav szekvenciájában azonosított különbség (Wang, 2002 nyomán) A C\*04:09N allélben a 365. tripletben (1095. pozíció) bekövetkezett deléció (piros nyíl) következtében elcsúszik a leolvasási keret, ezért az új stop kodon 97 bázispárral 3' irányban alakul ki. A meghosszabbodott cDNS (aláhúzott szakasz) miatt 32 aminosavval hosszabb lesz a fehérje citoplazmatikus doménje a vad típushoz képest. A C\*04:09N allél terméke nem expresszálódik a sejt felszínén.

## 1.2 A HLA-rendszer vizsgálatának populációgenetikai jelentősége

Néhány éve a populációgenetikai vizsgálatok fókuszpontjába kerültek a HLA gének. Az allél- és haplotípus gyakoriság vizsgálatok rávilágíthatnak adott populáción belül genetikai különbségekre (Buhler, 2012) vagy éppen a nagy földrajzi távolság ellenére a közös eredet jelenlétére. (Nunes JM, 2010) 2009-ben nemzetközi munkacsoportok alakultak a HLA-NET hálózat keretében (HLA-NET: European network of the HLA diversity for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics). Elsődleges céljuk az volt, hogy javítsák az egyes populációknál elérhető HLA adatok minőségét, továbbá, hogy kifejlesszenek egy olyan módszert a feltöltött adatok analizálására, amely standardizált, és ezáltal egymással összehasonlítható eredményeket

hoz létre. Összehasonlító populációgenetikai vizsgálatok alapján próbáltak összefüggéseket találni a különböző földrajzi területeken meghatározott HLA genetikai diverzitás és ezen populációk történelme, illetve a természetes szelekció hatása között. (Nunes JM, 2010) A munkacsoportok több közleményben is megfogalmaztak általános irányelveket a HLA diverzitással kapcsolatos populációgenetikai vizsgálatok során, amelyek nagy segítséget jelentenek a hasonló kutatások elvégzéséhez. Elavult terminológiák (pl. kaukázusi) helyett informatívabb kifejezéseket (pl. pán-európai) határoztak meg. Továbbá mintavételi szempontokat fogalmaztak meg, pl.: a minimális elemszámot 100 főben állapították meg. Kiemelten fontos adatnak tekintik a vizsgált egyének adott országon belüli földrajzi hovatartozását, a beszélt nyelvét, és amennyiben lehetőség van rá, az etnikai identitását. A nagyfelbontású HLA-tipizálási eredményeknél a maximális információ megőrzését tartják célravezetőnek, az összes ambiguitás felsorolását, NMDP-kódok helyett. (Az NMDP-kódok olyan betűkódok, amelyek magukban foglalnak bizonyos alléleket. Nem egyértelmű HLA eredménynél használatosak, mivel annál több információt nyújtanak, mintha csak az allélcsoport van megadva, viszont nem elegendő a nagyfelbontású eredményhez. (<https://bioinformatics.bethematchclinical.org/hla>) (Sanchez-Mazas, 2012, Nunes 2014) Számos európai ország szoros együttműködésével több összehasonlító tanulmányt publikáltak, illetve a kooperáció kiterjedt Afrikára és Ázsiára is. (Nunes, 2010, Sanchez-Mazas, 2011, Vidan-Jeras, 2014, Sanchez-Mazas, 2017b) Kifejlesztették a HLA-specifikus Gene[RATE] statisztikai programot, amely tudja kezelni a heterogén (kis és nagyfelbontású eredményt egyaránt tartalmazó) mintákat, és az ambiguitásokkal rendelkező adathalmazokat is. (Nunes JM, 2010, Sanchez-Mazas, 2012, Nunes JM, 2014) A HLA-NET hatására a közelmúltban megjelent tanulmányoknak köszönhetően ma sokkal többet tudunk az európai HLA diverzitásról, mint néhány évvel ezelőtt. (Sanchez-Mazas, 2017a) Ez a megállapítás különösen igaz olyan területekre, amelyekről korábban nagyon kevés adat állt rendelkezésre, mint például Szerbia (Andric, 2014), Horvátország (Grubic, 2014), Románia (Constantinescu, 2016), Albánia (Sulcebe, 2016). A magyar populáció adatait feldolgozó jelen tanulmány is ebbe a folyamatba illeszthető be.

### **1.2.1 Az Európában élő roma etnikai csoportok genetikai kapcsolata**

A HLA polimorfizmus vizsgálatok egy része az európai országokban jelenlévő roma etnikai csoportok eredetével foglalkozik. Az elmúlt néhány száz évben bekövetkezett

egyik legjelentősebb népvándorlási folyamat eredményeként Európában a legnagyobb kisebbséget a roma etnikai csoport teszi ki. Becslések szerint Európában kb. 10 millió roma él, legnagyobb számban Közép- és Délkelet-Európában telepedtek le. Nincsenek róluk megbízható történelmi feljegyzések, de a nyelvi, antropológiai, történelmi és genetikai bizonyítékok arra utalnak, hogy Észak-Indiából származnak, innen vándoroltak a 11. században a Bizánci Birodalom területére (mai Görögország és Törökország), majd a 14-15. században Európa szinte minden részét elérték. Számos tanulmány eredményei alapján azt mondhatjuk, hogy bizonyos mértékű genetikai keveredés történt a roma nép és más népcsoportok között, de eközben az eredeti karakterjegyeket is megőrizték. A nomád életmódjuk, a szociális és kulturális szokásaik (pl. gyakori endogámia) bizonyos mértékben izoláltan tartják őket más populációktól. Ezért az egyes országokban élő roma közösségek populációgenetikai vizsgálatoknál kiemelten fontos célcsoportok. (Ramal, 2001, Mendizabal, 2011, Mendizabal, 2012, Martinez-Cruz 2016)

### **1.2.2 A magyarországi roma kisebbség rövid története**

Előre szeretnénk bocsátani, hogy tanulmányunkban a *roma* megnevezést, illetve annak szinonimájaként a *cigány* kifejezést egyaránt használjuk, hasonlóan azokhoz a tudományos munkákhoz, amelyeket referenciaként tüntettünk fel. Magyarországon az 1993. évi LXXVII. törvény még a cigány terminust alkalmazta, a 2011. évi CLXXIX. törvényben már a roma megnevezés szerepel. Azt mondhatjuk azonban, hogy a cigány megnevezés gyűjtőfogalomként továbbra is fennmaradt és tudományos munkákban nem társul hozzá negatív asszociáció. (Pásztor, 2013) A cigány közösségek Északnyugat-Indiából származnak, ahol évszázadok alatt alakult ki a rájuk jellemző törzsi szerveződés és szokásrendszer. A népvándorlások Kr. u. 6-10. században kezdődtek, amelynek során a roma törzsek először Perzsiába, majd Bizáncba jutottak el. (Kállai, 2005) A Bizánci Birodalom sok évszázadon keresztül befogadta a cigány közösségeket, amelyek valószínűsíthetően a török hódítás elől menekültek Délkelet-Európába a 14. század elején. Később, a 15. századra a Kárpát-medencén átvándorolva érték el Nyugat-Európa határait. Erdélyben tűntek fel az első nagyobb roma csoportok 1416-ban, az évtized végén pedig már Párizsban, Bolognában és Rómában is feljegyezték megjelenésüket. (Mezey, 1998) Kezdetben barátságosan fogadták őket, de a nyugat-európai polgárosodó társadalmak rendje és az adóztatási rendszere megszilárdult, amellyel hamar összeütközésbe került a cigány társadalom. (Kállai, 2005) A

mindennapi létfenntartásukhoz igénybe vett eszközeik összeütköztek a tulajdon szentségére épülő polgári társadalom értékrendjével, vallási hiedelmeik és rítusaik összeegyeztethetetlenek voltak az akkor még monopolhelyzetben lévő katolikus egyház dogmaival. (Mezey, 1998) Nyugat-Európa radikális eszközökkel üldözte a cigány közösségeket, amelynek eredményeképpen a cigányság nagy része visszafordult Közép-Európa felé. (Kállai, 2005) A Kárpát-medence lett végső otthona ennek a népcsoportnak, illetve a kelet felől újonnan beáramló cigány törzseknek. A három részre szakadt Magyarországon, a török háborúk ideje alatt a sokféle népcsoport között a cigány létforma a 16-17. század Magyarországon nem került alapvető konfliktusba a fennálló társadalmi viszonyokkal. A magyar társadalom részéről nem volt elvárás a cigány népcsoport beolvadása, ez a sajátos együttélés tartósította a cigány életformát. (Mezey, 1998) A 18. század elején azonban II. József és Mária Terézia uralkodása idején az abszolút hatalom újraszervezte a társadalmat, az adóztatási rendszert, megteremtette a közbiztonságot, s ebbe a helyzetbe már nem simultak bele olyan könnyen a cigány közösségek. Az összetűzések megállítására a hatalom a cigány kisebbség radikális asszimilációját és a hagyományos cigány életvitel megszüntetését hirdette meg. A hatóságok elkobozták a roma közösségektől szekereiket, bevonták útleveleiket, széttelepítették a csoportokat, a cigány gyermekeket családjuktól elszakítva távoli vidékre adták ki nevelőszülőkhöz, illetve megtiltották a cigány nyelv használatát. Ezek az intézkedések azonban részben a várt hatás ellenkezőjét váltották ki: a cigány közösségek ahelyett, hogy oszlásnak indultak volna, megerősödtek ebben az időszakban. Jelentős változást csak a 19. század hozott, az 1893. évi összeírás szerint a roma társadalom nagy része megtelepedett, házakban él, felhagyott a nomád életmóddal, amely arra utal, hogy bizonyos mértékig betagoledott a magyar társadalomba. Az összeírás szerint létszámuk ekkor 280 000 főre tehető. (Mezey 1998, Kállai 2005) Európában és Magyarországon egyaránt problémát jelent a cigányság számának valós adatokhoz közelítő meghatározása. A hivatalos népszámlálás során a besorolás önmeghatározás szerint történik, a magukat romának vallók aránya a tényleges értéknek mindössze harmadát-negyedét teszi ki. Emiatt a népszámlálási adatok fenntartással kezelhetők a roma kisebbséget tekintve. (Pásztor, 2013) A 2011-ben történt legutolsó hivatalos népszámlálás során a Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint, 315 583-an vallották magukat cigány nemzetiségűnek és így Magyarország legnagyobb etnikai kisebbségét alkotják. Egyes tanulmányok szerint ennél sokkal nagyobb a számuk, 1993-ban az ország egészére vonatkozó Kertesi-Kézdi féle

közvetlen népességbecslés szerint 357 ezer és 547 ezer közé tehető a számuk. (Kertesi-Kézdi, 1998) Kemény István becslése szerint külső besorolás alapján a cigány háztartásokban élő emberek száma 2003 elején 520 ezer és 650 ezer között volt, ez a szám Magyarország akkori összlakosságának kb. 6%-át tette ki. (Kemény, 2004)

### **1.3 A HLA-rendszer vizsgálatának klinikai jelentősége**

#### **1.3.1 Betegségasszociáció**

Számos autoimmun betegséggel kapcsolatban vizsgálták a HLA allélek feltételezett hajlamosító szerepét. Az egyik legerősebb kapcsolat a Bechterew-kór és a HLA-B27 között van (Robinson, 2014). A rheumatoid arthritis-ben szenvedő betegek nagy része hordozza DRB1\*01 vagy DRB1\*04 allélcsoportot (Fugger 2000), a lisztérzékenység (*coeliakia*) a DQB1\*02:01~DQA1\*05:01 és a DQB1\*03:02~DQA1\*03 haplotípussal asszociált, valamint a transz helyzetben lévő DQB1\*02:02 és DQA1\*05:05 alléllal (Mubarak 2013). Szoros kapcsolatot mutattak ki a narcolepsia és a HLA-DQB1\*06:02 allél között (Chabas, 2003), valamint a pikkelysömör (*psoriasis*) és a HLA-C\*06 allélcsoport között (Mallon 1997, Gudjonsson, 2003). Trombotikus trombocitopéniás purpura (TTP) esetében hajlamosító (DRB1\*11~DQB1\*03 és DRB1\*15~DQB1\*06) és protektív (DRB1\*13~DQB1\*06 és DRB1\*07~DQB1\*02) haplotípusokat azonosítottak (Sinkovits 2017).

#### **1.3.2 Szolid szerv transzplantáció**

Az ún. szolid szervek (vese, szív, tüdő, máj, hasnyálmirigy) átültetése során eltérő a jelentősége a HLA molekuláknak. Számos tanulmány foglalkozik azzal, hogy a HLA antigének egyezése a donor és a recipiens között hogyan befolyásolja a szervtúlélést, illetve a HLA-ellenes antitestek jelenléte a szervkilökődés esélyét. A vese átültetést megelőzően szelekciós szempont a HLA antigének egyeztetése a recipiens és a donor között, egyrészt annak érdekében, hogy minél jobb egyezéssel történjen a transzplantáció, másrészt azért, hogy kizárjuk az olyan HLA antigénnel rendelkező donort, amely ellen a recipiens antitesteket termel. (Morath, 2014, Süsal, 2015, Richter, 2016) Szív és máj transzplantációnál nem szelekciós szempont a HLA antigének egyeztetése, de a preformált antitestek jelenléte ezeknél a szerveknél is rontja a szerv hosszútávú túlélését. (Mangiola, 2017, O'Leary, 2014) A transzplantáció esélyének meghatározásához szintén az adott országok HLA diverzitás adatai szükségesek.

### 1.3.3 Hematopetikus őssejt transzplantáció

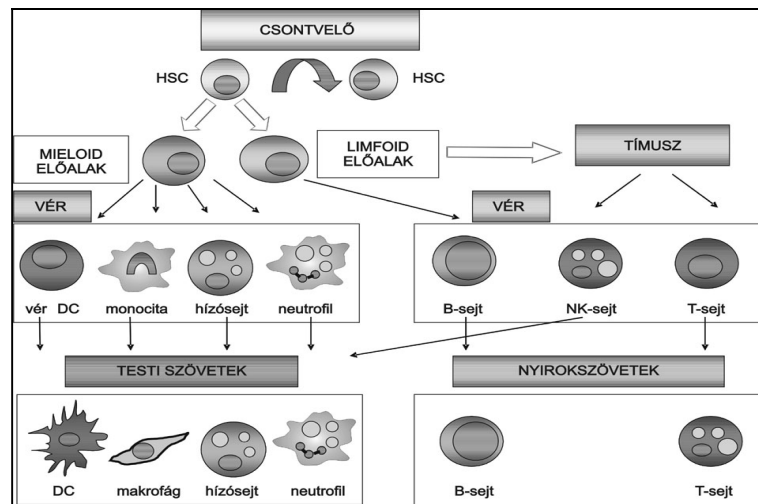
#### 1.3.3.1 A hematopoetikus őssejtátültetés általánosságban

Az elmúlt ötven évben a transzplantációs immunológia dinamikusan fejlődő területté vált, különösen a vérképző őssejt transzplantációval (hematopoietic stem cell transplantation - HSCT) foglalkozó ága. A hematopoetikus őssejt átültetés egyre szélesebb körben alkalmazott immunterápia lett világszerte és hazánkban is. Az első Magyarországon végzett csontvelő-transzplantáció Kelemen Endre nevéhez fűződik és a Semmelweis Orvostudományi Egyetem I.sz. Belklinikán végezték 1975-ben. 1984-től az Országos Hematológiai és Vértranszfúziós Intézetben Hollán Zsuzsa vezetésével indult el a csontvelő-átültetés, majd 1992-ben a Szent László Kórházban Tímár László irányításával gyermek recipiensek transzplantációja is elkezdődött. (Masszi, 2000) 2016 óta négy allogén vérképző őssejt transzplantációs központ működik Magyarországon: két gyermek (Budapest és Miskolc) és két felnőtt (Budapest és Debrecen).

A vérképző őssejt transzplantáció során az intravénásan beadott őssejtek a keringésbe kerülnek, majd megtalálják a csontvelői sztrómát és ott megtelepednek (*homing*). (Pálóczi, 2003) A HSCT során két fontos cél fogalmazható meg. A rövidtávú cél a leukémiás sejtek elpusztítása, ezért a recipiens saját csontvelői őssejtjeit és az abból származó minden sejtvonalt sejtjeit megsemmisítik. A hosszú távú cél viszont a recipiens szervezetében egy új, működőképes immunrendszer létrehozása. Ennek érdekében a hiányzó sejteket egy másik egyén őssejtjeivel vagy a saját csontvelői őssejtek egy korábban levett részével pótolják. Mivel a hematopoézis során minden sejtvonalt a multipotens hematopoetikus őssejtből (HSC) alakul ki, a bejuttatott őssejtek képesek a vérképző és immunrendszer teljes helyreállítására. (6. ábra, Rajnavölgyi, 2004) Az őssejteket és progenitorsejteket tartalmazó, transzplantáció céljára alkalmazott sejt készítmény a graft. A transzplantáció a graft eredetének megfelelően lehet autológ vagy allogén. Az autológ graft magától a betegtől nyerhető betegségmentes klinikai stádiumban (remisszió) és fagyasztás-tárolás után később kerül transzplantációra. Az allogén graft egy egészséges egyéntől levett donorsejteket jelent. Az allogén graft testvértől, egyéb rokontól vagy nem rokon önkéntes donortól származhat. Az allogén átültetés különleges esete a szingén transzplantáció, amelynek során az egypetéjű ikerpár egészséges tagjától származik a graft. (Sureda, 2015) Munkánk során az allogén transzplantációra fókuszálunk. Sikeres allogén őssejt-transzplantáció után a betegek kimérák, hiszen a vérképzésük teljesen, az immunrendszer sejtjei dominálónan egy másik



egyénből származnak, míg szomatikus sejtjeik, közöttük a csontvelő és immunrendszer sztrómasejtjei sajátok.



**6. ábra A humán hematopoézis.** (Rajnavölgyi, 2004) A közös hematopoetikus őssejtből (HSC) történik a limfoid és mieloid sejtek differenciációja. A limfoid progenitor sejtekből a B- és T-sejtek, valamint az NK-sejtek származnak. A mieloid progenitor sejtekből alakulnak ki a monociták, a granulociták, az eritrociták és a megakariociták.

A klinikai gyakorlatban csontvelő (BM), perifériás vér (PBSC) és köldökzsínórvér (CBU) lehet vértképző őssejtforrás. (Sureda 2015) Ebben az összefüggésben őssejtnek tekinthetők azok a progenitor sejtek, amelyek képesek a kemoterápiával és/vagy sugárkezeléssel elpusztított csontvelő funkciójának a tartós helyreállítására. Ezek a sejtek rendelkeznek az önmegújulás és a pluripotencia képességével, hordozzák a CD34 sejtfelszíni antigént (őssejt-markert), viszont a sejtfelszínükről hiányoznak a sejtvonalkötelezett antigének. (Pálóczi, 2013) A köldökzsínórvér alkalmazására elsősorban gyermekekben van lehetőség, hiszen a sikeres transzplantáció előfeltétele a megfelelő mennyiségű CD34+ őssejt bejuttatása, és a köldökzsínórvérben ezeknek a száma nem feltétlen éri el az átlag felnőtt testsúlyra számított mennyiséget. (Pálóczi, 2004) Eleinte kizárólag csontvelő transzplantációt végeztek, majd fokozatosan nőtt a perifériás őssejtgraftok száma és 2005-től jelentős többségben ültetnek be perifériás vérből származó őssejteket. (Bátai, 2017) Ennek megfelelően az általánosságban használt „csontvelő átültetés” terminológia már nem használható minden esetben, sokkal pontosabban fejezi ki a folyamatot a „vértképző őssejt átültetés” kifejezés. A perifériás őssejtforrás elterjedése leginkább a donor szempontjából magyarázható. A csontvelő gyűjtés sebészeti úton műtéti beavatkozás során történik, ez sok donor számára

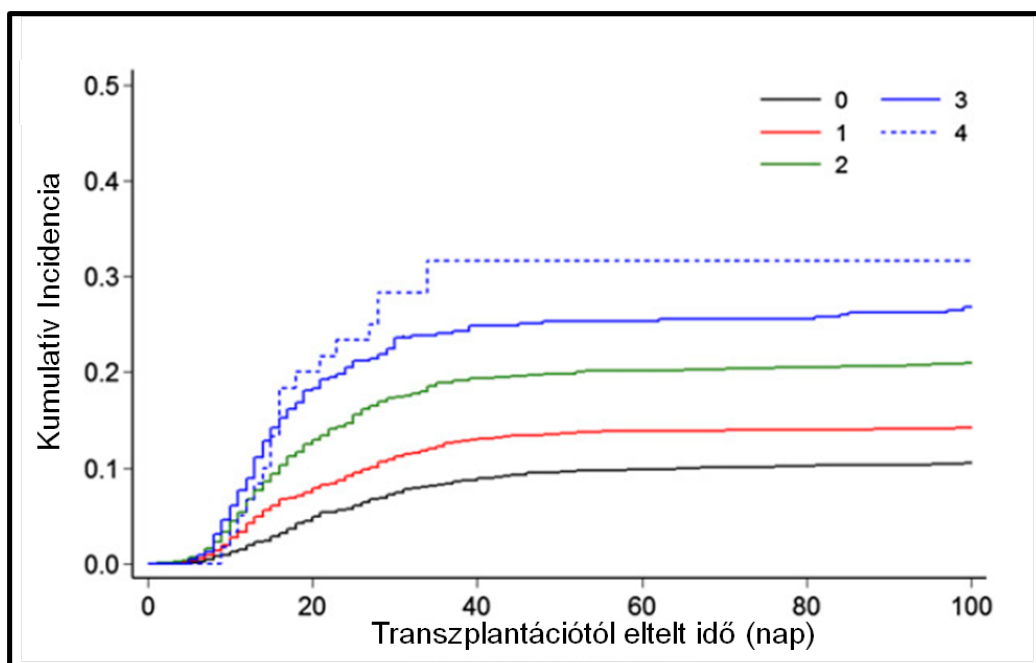
kockázatosnak tűnő beavatkozás. A perifériás őssejt donáció során a donor nagy dózisú granulocita növekedési faktor előkezelésben részesül, amely lehetővé teszi, hogy a csontvelőből a vérbe kerüljenek a transzplantációra alkalmas őssejtek és elődsejtek. Az őssejt gyűjtés aferezis révén a keringő vérből történik, ez pedig sokkal kevésbé veszi igénybe a donor szervezetét. (Báta, 2017) (Pálóczi, 2004)

A transzplantáció indikációit tekintve allogén transzplantációt főként szerzett őssejt-kiindulású vérképzőrendszeri malignus betegségekben (akut mieloid leukémia (AML), akut limfoid leukémia (ALL), krónikus mieloid leukémia (CML), aplasztikus anémia (AA), mielodiszplázias szindróma (MDS)) és egyes veleszületett immunológiai, anyagcsere- és vérképzőszervi megbetegedésben alkalmaznak. Autológ transzplantációt leginkább a csontvelőt (legalábbis részben) megkímélő betegségekben, pl. Hodgkin-kór, nem-Hodgkin limfómák, szolid tumorokban végeznek, de válogatott beteganyagban akut leukémiákban, illetve mieloma multiplexben is. (Pálóczi, 2013) Az elmúlt 17 évben jelentősen megváltozott a transzplantációk indikációja hazai és nemzetközi viszonylatban egyaránt. Magyarországon 2000-ben és azt megelőzően a CML-ben szenvedő betegeknél végeztek legnagyobb számban HSCT-t, de a hatékony tirozinkináz-gátló kezelésnek köszönhetően jelentősen lecsökkent a transzplantációra szoruló CML-es betegek száma. Ezzel egy időben (arányaiban és számszerűen is) megnőtt az akut leukémiák és az MDS miatt elvégzett őssejt átültetések száma. A csökkentett intenzitású kondicionáló kezelés megjelenésének köszönhetően kitolódott a transzplantált betegek korhatára, továbbá olyan betegeknél is megvalósíthatóvá vált, akiknél a mieloablatív kondicionálás (MAC) a magas toxicitása miatt életveszélyes szövődményeket okozna. (Báta, 2017) Így évről évre egyre több beteget transzplantálnak világszerte és hazánkban is.

### **1.3.3.2 A donorkiválasztás szempontjai allogén HSCT előtt**

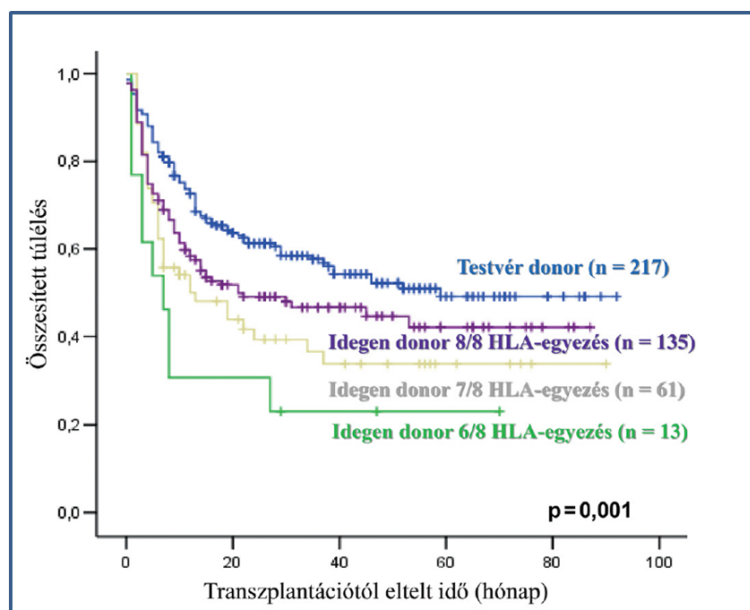
Az allogén HSCT után a szolid szerv transzplantációtól eltérő módon kétirányú felismerési (kilökődési) folyamat történhet a sejtek felszínén lévő antigénként viselkedő HLA molekulák miatt. Az átültetett donor eredetű őssejtekből differenciálódott T-sejtek vagy a grafftal egyidejűleg bekerült érett T-sejtek idegenként ismerhetik fel a recipiens eredetű sejtek felszínén található MHC molekulákat és ez a folyamat immunreakcióvá válhat ki. Ezt a folyamatot nevezzük *graft versus host* betegségnek (GVHD), amely veszélyt jelent több szervrendszerre nézve (bőr, bélrendszer, máj) és súlyos esetben mortalitást okozhat. Ezzel egyidejűleg létrejön a *graft versus leukémia* hatás (GVL),

amely a megmaradt tumor sejtek elpusztításán keresztül elengedhetetlen a teljes gyógyuláshoz. Természetesen a szervezetben jelenlévő recipiens eredetű immunrendszer sejtei is felismerhetik a donor eredetű sejtek felszínén lévő antigéneket, ezt a folyamatot nevezzük *host versus graft* (HVG) reakciónak (kilökődés). Mindkét folyamat az immunszuppresszált állapot ellenére bekövetkezhet, ezért a donor választás során kiemelt jelentősége van a HLA antigének egyeztetésének a recipiens és a donor között. (Pálóczi, 2013) Attól függően, hogy mennyi HLA lókuszt vesszünk figyelembe a recipiens és a donor összehasonlításánál, megkülönböztetünk 8/8-as, 10/10-es és 12/12-es egyezésű donort. 8/8-as egyezésnél a HLA-A, -B, -C és -DRB1 lókuszt vesszük figyelembe, 10/10-es egyezést mutató donornál, ezen kívül a HLA-DQB1-et is beleszámítjuk és a 12/12-es donor esetén még a HLA-DPB1 lókuszt is egyeztetjük. Úgynevezett „mismatch”-et (HLA eltérés (*mismatch* - MM) mutató donor az, aki egy vagy több HLA-lókuszban eltér a recipienstől. Továbbá, minél nagyobb számú HLA-eltérés mutatható ki egy donor-recipiens párnál, annál nagyobb eséllyel következik be akut GVHD. (Shaw, 2010, Morishima, 2015) A 7. ábrán jól látható a különbség az akut GVHD kumulatív incidenciájában a 12/12-es donor (0 MM) és az 1-4 MM-et mutató donorokkal történő átültetés után.



7. Ábra: A III-IV-es fokozatú akut GVHD kumulatív incidenciája (Morishima, 2015 nyomán) 0 MM-et mutató donor: fekete vonal, 1 MM: piros vonal, 2 MM: zöld vonal, 3 MM: kék folytonos vonal, 4 MM: kék szaggatott vonal

A HLA-eltérések főleg a GVHD esélyének növelésén keresztül az összesített túlélésre (*Overall Survival – OS*) is erősen hatnak. Ráadásul nem csak az eltérések számának növekedésével romlik szignifikánsan az összesített túlélés, de rövidtávon különbség van a HLA-identikus testvér donor, illetve a 8/8-as MUD donor esetén megfigyelt összesített túlélés között is. (Bátai, 2017) (8. ábra) Ezért a HLA-identikus testvérral rendelkező recipienseknél mindig elsődleges választás a testvérdonor, még akkor is, ha a betegnek sok potenciális donora van az őssejtdonor regiszterekben. Hosszútávon hasonló eredményeket írtak le testvérdonoros őssejt átültetésnél és 10/10-es MUD donorokkal végzett transzplantáció során. (Yakoub-Agha, 2006) Itt fontos megjegyezni, hogy az elmúlt évtizedekben a hároméves túlélés szignifikánsan nőtt. Egy 2015-ös tanulmányban több mint 15000 MUD donorral (*matched unrelated donor - önkéntes nem rokon donor*) transzplantált beteg túlélési adatát hasonlították össze a 2000-2004 és a 2005-2009 közötti időszakban. Minden alcsoportban szignifikánsan nőtt a három éves túlélés, a növekedés mértéke 7-10% között volt. Természetesen több tényező okozza ezt a jelentős javulást, de a szerzők az egyik legfontosabb tényezőként azt emelik ki, hogy a második periódusban sokkal nagyobb számban voltak azok a betegek, akik DNS-alapú módszerrel, allél szinten egyeztetett donorral voltak transzplantálva. Emellett azt is hangsúlyozzák, hogy a National Marrow Donor Program (NMDP) összesített regiszterében mennyire dinamikusan nő a donorok száma, amely lehetővé teszi a minél nagyobb mértékű HLA egyezést mutató donor kiválasztását. (Majhail 2015)



**8. Ábra Kaplan-Meier szerint ábrázolt összesített túlélés a donor típusa szerint** (Bátai, 2017) Az ábrán a 2007-2013 között a Szent László Kórház Hematológiai és Őssejt-

transzplantációs Osztályán malignus hematológiai kórkép miatt transzplantált betegek adatai láthatók. A legjobb túlélést a HLA-identikus testvérdonorral átültetett recipiensek mutatják, ettől kis mértékben, de elmarad a 8/8 HLA-egyezést mutató idegen donoros átültetés. További HLA-eltérés a donor és recipiens között jelentős romlást eredményez az összesített túlélésben.

A transzplantáció indikációja és az átültetés megvalósulása között eltelt idő alapvetően befolyásolhatja a transzplantáció kimenetelét. Különösen fontos, hogy a kivizsgált és kiválasztott donor rendelkezésre álljon, amikor a recipiens remisszióba kerül, hogy a transzplantáció minél nagyobb eséllyel jöhessen létre ebben az ablakperiódusban. A fent említettekből látható, hogy a legideálisabb donor egyértelműen a HLA-identikus testvér, azonban a betegeknek mindössze 30%-a rendelkezik testvérdonorral. (Gragert, 2014) Ez egyrészt annak köszönhető, hogy csak 25% annak az esélye, hogy egy beteg és a testvére identikus legyen a fő HLA lókuszokban, másfelől sok olyan beteg van, akinek csak egy testvére van, vagy egyáltalán nincs. Amennyiben a recipiens nem rendelkezik ilyen donorral, alternatív megoldást jelent a teljes egyezést mutató nem-rokon önkéntes őssejt-donor. Amennyiben nem áll rendelkezésre HLA-identikus MUD donor, elvégezhető a transzplantáció HLA eltérést mutató idegen donorral is. Számos (olykor ellentmondásos) tanulmány foglalkozik azzal, hogy különböző HLA eltérések milyen hatással lehetnek a transzplantáció kimenetelére. Fürst és mtsai megerősítette azt a feltevést, hogy a HLA-A, -B, -C, -DRB1 és -DQB1 lókuszok közül egyetlen HLA eltérést vizsgálva a legnagyobb mortalitást a HLA-A, -B, és -DRB1 eltérések okozzák. Továbbá kimutatta, hogy az allél- és allélcsoport szintű eltérésnek ugyanakkora hatása van, ezért fontos, hogy a nagyfelbontású eredmények ismeretében történjen a donorválasztás. (Fürst, 2013) Egy másik tanulmányban összefüggést mutattak ki (szintén attól függetlenül, hogy kis- vagy nagyfelbontású eltérés volt a donor és recipiens között) a HLA-A, -B, -C és -DRB1 lókuszokban kimutatott egyetlen eltérés (single mismatch) és a rosszabb túlélés, illetve gyakoribb GVHD között. (Lee, 2007) A HLA eltérések hatása viszont attól is függ, hogy az eltérés *graft versus host* (GVH) vagy *host versus graft* (HVG) irányban valósul meg. GVH irányú eltérés nagyobb eséllyel okoz akut GVHD-t, mivel az eltérést mutató antigén fő célpontja lehet a donor T-sejteknek. HVG irányú eltérés viszont rejekciót indukálhat, hiszen a visszamaradt recipiens T-sejtek felismerhetik a recipienssel nem egyező donor HLA antigént. (Kanda, 2013)

Néhány indokolt esettől eltekintve, a hazai transzplantációs gyakorlat szerint a HLA-DRB1 lókuszbán azonosított eltérés a beteg és donora között nem megengedhető, ugyanakkor a hat fő HLA antigén közül a DPB1 eltérés tekinthető a legkisebb rizikónak. Ráadásul a DPB1 lókusznál az epitóp analízis alapján vannak megengedhető és nem megengedhető eltérések. (Pidala, 2014) Természetesen, ha adott donor esetén több HLA eltérés figyelhető meg, akkor a transzplantáció szempontjából kedvezőtlen hatások még fokozottabban jelentkezhetnek. (Morishima, 2015) A Transzplantációs Immungenetikai Laboratórium adott betegnek egyszerre egy donorjelöltet vizsgál ki, azonban a transzplantáció sürgősségére való tekintettel indokolt esetben (főként gyermekeknél) a Regiszter egyszerre két potenciális donort is bekér. A hatékony donorkeresési folyamat, a megfelelő donor bekérése megerősítő HLA vizsgálatokra kiemelten fontos a recipiens szempontjából, ahol az időtényező kritikus lehet. Nem megfelelő donor bekérése esetén nem elhanyagolható szempont a vizsgálat költsége és tipizáló laboratórium oldalán jelentkező indokolatlan mintaszám növekedés, amely megnövelheti a mintaátfordulási időt. Nehézséget jelent, hogy a regiszterekben elérhető donorok eltérő mértékben vannak kivizsgálva, a donorok kb. 20%-ánál csak HLA-A és -B lókuszból típusa ismert, de egyre nagyobb számban találhatók olyan donorok, akiknél a hat fő lókusznál (HLA-A, -B, -C, -DRB1, DQB1, -DPB1) nagyfelbontású eredmény található. Ezekben az esetekben jó eséllyel már a megerősítő HLA tipizálás előtt tudni lehet, hogy mekkora az egyezés a recipiens és a donorjelölt között. Míg azok a donorok, akik csak kevesebb lókuszból és kisfelbontással vagy szerológiai tipizálással meghatározott adatok állnak rendelkezésre, gyakran mutatnak HLA eltérést a megerősítő tipizálás során, aminek következtében nem feltétlen lesznek alkalmasak adott beteg részére.

Amennyiben adott betegnek számos potenciális HLA identikus nem-rokon donor áll rendelkezésre az adatbázisban, további szempontok is figyelembe vehetők. A donor életkorával kapcsolatban eddig ellentmondásos publikációk jelentek meg. Még nem sikerült teljes mértékben bizonyítani, hogy az idősebb donorból származó hematopoetikus őssejtek átültetése esetén valóban lassabb lesz a megtapadás és hosszabb a neutropeniás és a trombocitopeniás állapot. Rezvani és mtsai azt mutatták ki, hogy 60 év feletti donorból származó graft nem befolyásolja hátrányosan az allogén HSCT kimenetelét a fiatal donorokkal összehasonlítva. (Rezvani, 2015) A hazai gyakorlat szerint, amennyiben lehetőség van rá, a fiatalabb donort választják. A donor neme is figyelembe vehető szempont lehet. A férfi recipiens-női donor pároknál

figyelték meg, hogy magasabb előfordulási valószínűsége van a GVHD-nak és a nem relapszus okozta mortalitásnak (NRM), a relapszus esélye viszont alacsonyabb, összehasonlítva a férfi recipiens-férfi donor párokhoz képest. (Randolph, 2004, Gahrton, 2005) Magyarországon is gyakorlat, hogy férfi beteg számára általában férfi donort választanak. A HLA rendszer és az ABO vércsoport rendszer egymástól függetlenül öröklődik, ezért előfordulhat, hogy egy HLA identikus MUD donor és a recipiens között vércsoport inkompatibilitás áll fenn. Előnyös, ha a beteg és donora ABO vércsoport kompatibilisek, de ez nem előfeltétele a sikeres transzplantációnak. Brierley és mtsai nem találtak szignifikáns különbséget vércsoport inkompatibilitás esetén az összesített túlélést, a relapszus-mentes túlélést, a nem-relapszus okozta mortalitást és a relapszus esélyét tekintve. Az akut GVHD-ra szintén nem volt hatással az inkompatibilitás, viszont a krónikus GVHD nagyobb eséllyel fordult elő azokban az esetekben, ahol a donor és a beteg között minor (donor antitest a recipiens vörösvértestje ellen irányul) vagy major (recipiens antitest a donor vörösvértestje ellen irányul) eltérés volt a vércsoportban. (Brierley, 2015) Fontos lehet a citomegalovírus (CMV) státusz egyeztetése beteg és donor között, különösen gyermek recipienseknél. Allogén HSCT utáni CMV fertőzés (primer fertőzés, reaktiváció, felülfertőződés más CMV törzssel) kialakulását leginkább befolyásoló tényező a recipiens és a donor szerológiai státusza. A legnagyobb rizikót az jelenti, ha egy CMV-szernegatív beteg CMV-szeropozitív donortól kap összejt, az ilyen esetekben a betegeknek kb. 30%-ában alakul ki primer fertőzés. (Ljungman, 2011) A különböző összejt források is befolyásolhatják a transzplantáció kimenetelét, és az önkéntes összejtdonorok nem minden esetben vállalják a PBSC mellett a csontvelő adást is. Számos szempont szerint hasonlíthatjuk össze összejt forrásokat, mindhárom eltérő előnyökkel és hátrányokkal rendelkezik. BM és PBSC esetén gyorsabb a megtapadás a CBU grafthoz képest, ezáltal rövidebb a graft megtapadása. Rokon donorral végzett átültetés esetén sok vizsgálat támasztja alá, de nem rokon donorok esetén is úgy tűnik, hogy a PBSC és a BM között nincs különbség az összesített túlélés és a betegség mentes túlélés (*disease free survival*) tekintetében hematológiai malignusban szenvedő betegeket vizsgálva. PBSC graft esetén kisebb az esélye a graft elégtelenségnek, viszont gyakoribb a GVHD, ez részben annak köszönhető, hogy több érett T-sejtet tartalmaz a csontvelő grafthoz képest. Azonban a GVHD profilaxisban illetve kezelésben használt új eljárásoknak köszönhetően ennek a jelentősége egyre kisebb. Továbbá a GVHD által fenntartott GVL hatás kiemelten fontos a daganatsejtek elpusztításában és ez által a teljes gyógyulás

elérésében, illetve a későbbi relapsus megelőzésében. BM vagy PBSC grafttal nagyobb valószínűséggel jutnak be vírusok a recipiens szervezetébe, főleg a CMV átvitelnek nagy a valószínűsége, hiszen a felnőtt lakosság nagy része CMV-szeropozitív. A CBU-ból származó donorsejtek viszont még naivak, nem találkoztak antigénekkkel, ezért a recipiens szervezetében toleránsabbak lesznek, kisebb eséllyel okoznak immunológiai szövődményt. A HLA egyezés szempontjából CBU esetén több eltérés is megengedhető a kisebb alloreaktivitás miatt. HSCT során nem előfeltétel, hogy a donor és a recipiens azonos ABO vércsoporttal rendelkezzen, azonban vércsoport inkompatibilitás esetén a csontvelő graftot plazma és/vagy vörösvértest-mentesíteni kell. PBSC és CBU sokkal kevesebb vörösvértestet és plazmát tartalmaz a csontvelő grafthoz képest, ezért nincs szükség vörösvértest- és/vagy plazmamentesítésre. (Cheuk, 2013) (Masszi, 2000, Pálóczi könyvfejezet, 2013) Gyermeknél a csontvelő graft preferált a PBSC-vel szemben, ez különösen benignus betegségekre igaz, ahol nincs szükség GVL hatásra, viszont a csontvelő graftnak köszönhetően kisebb eséllyel következik be GVHD.

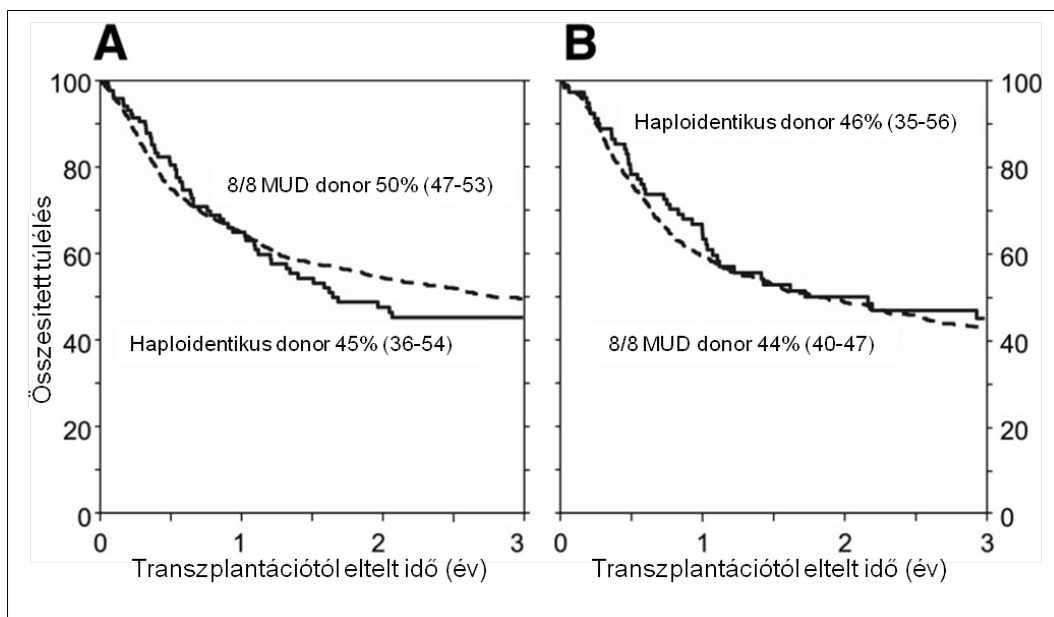
Végezetül szempont lehet a donort biztosító regiszter lokalizációja, hiszen logisztikai tényezők is befolyásolhatják az őssejt adás létrejöttét, illetve a levett őssejtkészítmény szállítási idejét, minőségét.

A fent említettekből látható, hogy nagyon sok szempont vehető figyelembe és ezek eltérő mértékben befolyásolhatják a transzplantáció kimenetelét, ráadásul a szakirodalomban sokszor ellentmondásos eredmények találhatók ezzel kapcsolatban. Az talán egyértelmű, hogy a HLA-nak van a legnagyobb szerepe a HSCT kimenetelét tekintve, de a többi tényező már bonyolult mérlegelést igényel. Természetesen a meghatározott irányelveket figyelembe véve, de valójában minden betegnél egyedileg lehet csak dönteni, hogy a transzplantáció melyik donorral történjen meg.

A nemzetközi regiszterekben az európai származású betegek kb. 75%-ának sikerül 8/8-as donort találni. (Gragert, 2014) Ennek ellenére előfordulhat, hogy egy recipiensnek nagyon kevés potenciális donora van, például egy Magyarországon ritka haplotípus következtében, amely a nemzetközi regiszter adatbázisában sem fordul elő vagy csak néhány donorban. (Viszonyításképpen, gyakori haplotípusokkal rendelkező betegnek több száz, akár több ezer potenciális donor is rendelkezésre állhat.) Főként emiatt szükséges alternatív transzplantációs módszerek bevezetése más őssejforrásokkal. Először a köldökzsinórvérből izolált őssejtgraft jelentett megoldást a recipiensek egy részének, de úgy tűnik, hogy sokkal elterjedtebb lesz a haploidentikus donorokkal történő átültetés. Két személy akkor haploidentikus egymással, ha mindketten



hordoznak egy közös haplotípust. (lásd. HLA rendszer öröklődése c. fejezet) Haploidentikus donor elvileg minden recipiens számára elérhető, hiszen a beteg szüleivel és a gyermekeivel biztosan hordoz egy közös haplotípust, amennyiben nem történt rekombináció. A testvérek pedig 50%-ban lehetnek haploidentikusak a recipienssel. Ezért kis számú potenciális donornál, illetve, ha a beteg klinikai állapota megköveteli a sürgős transzplantációt, elindulhat a kivizsgálás haploidentikus rokon donor irányba is egyidejűleg a MUD donor kereséssel. A fentiekből következik, hogy haploidentikus donor esetén a 12 fő HLA allélcsoport közül 6 allélcsoportban biztosan lesz egyezés a recipienssel, további egyezés viszont csak kis valószínűséggel fordulhat elő. Haploidentikus transzplantációnál tehát kifejezett GVHD-ra és nagy eséllyel rejekcióra kell számítani, aminek a megelőzésére a poszttranszplantációs ciklofoszfamidot alkalmazzák az átültetést követő 3-4. napon. Ebben a fázisban az őssejtek csontvelői sztrómába kerülése még folyamatban van, tehát ezek a sejtek nem osztódnak. Az alloreaktív T-sejtek (donor és recipiens eredetű sejtek) azonban proliferálnak és így a ciklofoszfamid célzottan tudja őket támadni és apoptózist generálva elpusztítani őket, megakadályozva a súlyos GVHD illetve rejekció kialakulását. (Luznik, 2010) Az AML-es betegeknél esetében kimutatták, hogy a haploidentikus, illetve MUD donorral végzett HSCT között nincs szignifikáns különbség az összesített túlélés tekintetében. (9. ábra) (Ciurea, 2015)



**9. Ábra Kaplan-Meier szerint ábrázolt összesített túlélés a donor típusa szerint MAC (A) és RIC (B) kezelést követően (Ciurea 2015 nyomán) A haploidentikus (folytonos vonal) és 8/8-as MUD donorral (szaggatott vonal) végzett átültetés után detektált 3 éves**

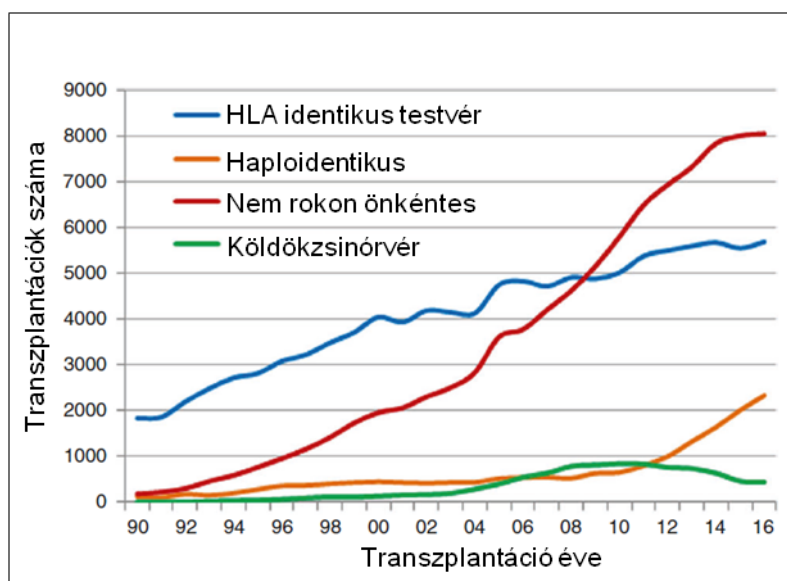
összesített túlélés nem különbözik szignifikánsan függetlenül az alkalmazott kondicionáló kezeléstől. (A zárójelben a betegek életkora látható.)

A nemzetközi gyakorlatban 2016-tól megfigyelhető, hogy bizonyos esetekben a MUD donoros HSCT-t haploidentikus donorral helyettesítik. (Passweg, 2018) A hazai gyakorlatban főleg azoknál a betegeknél jön szóba a haploidentikus HSCT, akiknek nincs megfelelő MUD donoruk vagy nagyon sürgössé válik a transzplantáció. Gyermekek recipiensekben már évek óta alkalmazzák bridging-terápiaként, de 2017-ben kis számban felnőtt betegeknél is végeztek hazánkban haploidentikus donorral transzplantációt.

### **1.3.3.3 Nemzetközi őssejtdonor regiszterek és a Magyar Őssejtdonor Regiszter**

Az elmúlt évtizedben három fő tendencia figyelhető meg a vérképző őssejt átültetési gyakorlatban. Egyrészt, a kevésbé toxikus kondicionáló kezelések következtében jelentősen kitolódott a transzplantálható betegek korhatára. Másrészt, a legáltalánosabb őssejt forrás a perifériás vérből származó vérképző őssejtek lettek. Továbbá, jelentősen megnőtt a kereslet a nem-rokon donorok iránt (Gratwohl, 2009). A szervdonációk többségétől eltérően a HSCT során az őssejt mindig élő donortól származik, hasonlóan a vérhez. Ha egy beteg nem rendelkezik HLA-identikus testvérdonorral, akkor a donor lehet őssejt donorként regisztrált önkéntes idegen donor vagy nem HLA-identikus családi donor. A HLA génekre jellemző nagyfokú genetikai polimorfizmus miatt az emberi populáció eltérő HLA-mintázattal jellemezhető egyedekből áll, ezen kívül különböző populációkban is eltérnek a HLA allél és haplotípus frekvencia értékek. Napjainkban a csökkenő gyermekvállalás következtében egyre több betegnek csak egy testvére van, vagy egyáltalán nincs testvére, az ő esetükben HLA-identikus donorkeresés kizárólag a vérképző őssejtdonor regiszterekben történhet. Egyrészt annak a ténynek, hogy azonos etnikai háttérrel rendelkező beteg és donor nagyobb eséllyel lesz HLA-identikus (Arrieta-Bolanos, 2010), másrészt a fent említett szociológiai változásnak a hatására alakultak regiszterek világszerte és Magyarországon is. Ezt a változást egyébként jól mutatja a Szent László Kórház Hematológiai és Őssejt-transzplantációs Osztályán végzett testvérdonoros és MUD donoros transzplantációk számának változása az elmúlt években. (Báti, 2017) Hasonló a helyzet Európában, ahol 2009 óta a MUD HSCT-k száma meghaladja a testvérdonoros átültetések számát.

(10.ábra) (Passweg, 2018) Az ábrán látható a haploidentikus átültetések számának növekedése is.



**10. ábra: Nemzetközi őssejtátültetések száma a donor típusa szerint 1990 és 2016 között.** (Passweg, 2018 nyomán) 2009-től nagyobb számban végeznek őssejt transzplantációt nem rokon önkéntes donorral (MUD), mint HLA-identikus testvér donorral.

Az első regisztert 1974-ben az Anthony Nolan Alapítvány hozta létre Angliában, a Nemzetközi Csontvelődonor Adatbázis (Bone Marrow Donors Worldwide - BMDW) pedig 1988-ban indult. A jelenleg nyilvántartott donorok száma elérte a 30 milliót ([www.bmdw.org](http://www.bmdw.org)), e nagy szám ellenére is van olyan beteg, akinek nem lehetséges teljes vagy elfogadható mértékű HLA-egyezést mutató donort találni, ezért az egyes országoknak érdeke a saját nemzeti regiszterét fejleszteni. Egyrészt a donorszám, másrészt a donorok kivizsgáltsági szintjének növelése lehet cél, annak érdekében, hogy az adott népességre jellemző HLA-alléleket hordozó donorokat hatékonyabban lehessen megtalálni. A Magyar Őssejtdonor Regiszter 1991-ben alakult (akkor még Magyar Csontvelődonor Regiszter néven), kezdetben azzal a céllal, hogy a hematopoetikus őssejt transzplantációra váró magyar betegeknek nemzetközi regiszterekben keressen megfelelő donort. 1992-ben a Regisztert bejegyezték a Nemzetközi Csontvelődonor Szervezetbe (WMDA), a külföldi regiszterekkel való közvetlen kapcsolat pedig a párizsi központú Európai Donor Titkárságon (European Donor Secretariat – EDS) keresztül indult el, és ugyanebben az évben jött létre a kapcsolat a BMDW-vel is. A magyar donorok toborzása 1990-1991-ben kezdődött, jelenleg mindössze 7000 donor van nyilvántartva. A donoraink legnagyobb részénél HLA-A, -B, -DRB1 lókuszosok

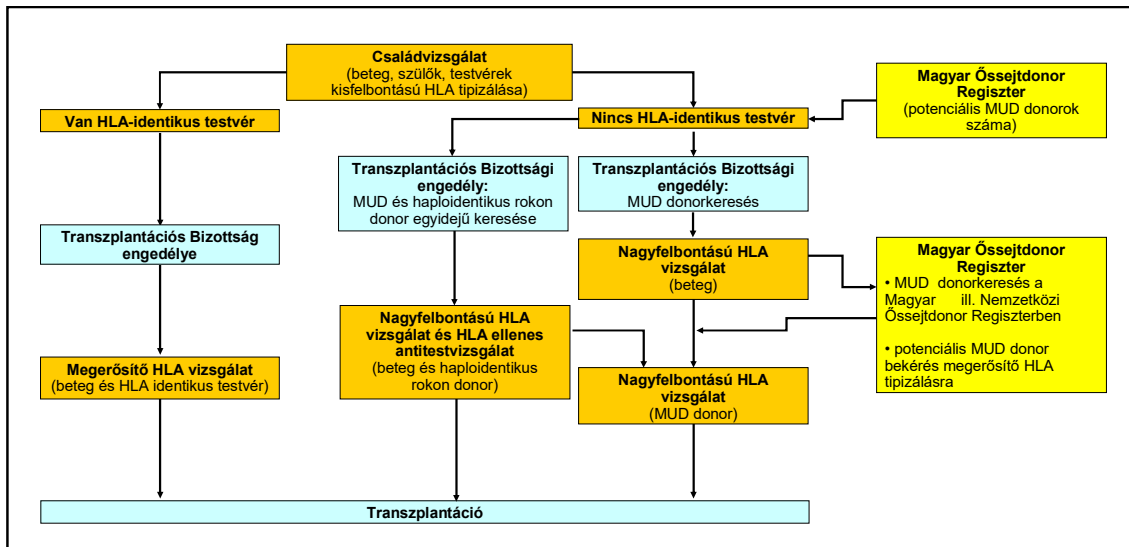
kisfelbontású eredménye áll rendelkezésre, csak azoknál a donoroknál végezzük el az egyéb lókuszok (HLA-C, -DQB1) vagy ugyanezen lókuszok nagyfelbontású tipizálását, akik konkrét betegnél kerülnek kiválasztásra. A Regiszter legfőbb feladata megfelelő donorok keresése a magyar és nemzetközi adatbázisban a magyar betegek részére, továbbá potenciális magyar donorok aktiválása külföldi betegek számára. A magyar betegek részére kivizsgált potenciális donorok 76%-a a Német Óssejtdonor Regiszter tagja. 1990 és 2016 között összesen 17 magyar donor került kiválasztásra, ebből 12 esetben magyar beteg, 3 esetben az USA-ban és 1-1 esetben Németországban, illetve Görögországban kezelt recipiens számára adományoztak őssejtet. (Az adatokat a Magyar Óssejtdonor Regiszter munkatársai bocsátották rendelkezésünkre. Szakmai Beszámoló, 2014)

#### **1.3.3.4 A Transzplantációs Immungenetikai Laboratórium kivizsgálási algoritmus a HSCT előtt**

Vérképző őssejt átültetést megelőzően a donorkeresés családvizsgálattal kezdődik. (11. ábra) Az Országos Vérellátó Szolgálat (OVSz) Transzplantációs Immungenetikai Laboratóriumában (továbbiakban Laboratórium) a recipiens és a szülők (amennyiben elérhetők) esetében a HLA-A, -B, -C, -DRB1 és -DQB1, a testvéreknél pedig a HLA-A, -B és -DRB1 lókuszokat tipizáljuk. A családvizsgálat során két fontos cél fogalmazható meg. Egyrészt meghatározzuk, hogy van-e a betegnek HLA-identikus testvérdonora vagy nincs. A másik cél a szülői HLA típusok megállapítása a haplotípus meghatározásához. A HLA antigének kodomináns öröklődésének köszönhetően 25% annak a valószínűsége, hogy egy beteg HLA identikus a testvérével. 50% pedig annak a valószínűsége, hogy haploidentikusak, vagyis a HLA-lókuszokat vizsgálva félig egyeznek, tehát az egyik szülőtől ugyanazt a haplotípust örökölték, a másik szülőtől pedig eltérőt. (3. ábra) Amennyiben a recipiensnek van HLA identikus testvérdonora, a Nemzeti Óssejt Transzplantációs Bizottság (továbbiakban Transzplantációs Bizottság) engedélyével történik a megerősítő HLA tipizálás, amely során kizárjuk a rekombinációt és az esetleges mintacserét, illetve bizonyítjuk a beteg és testvére allélszintű egyezését. A rekombináció valószínűsége kevesebb, mint 1%, de általa új haplotípusok jöhetnek létre (részletesebben lásd 1.1.1. fejezet). A családvizsgálat során, ahol csak kisfelbontású HLA tipizálás áll rendelkezésre, nem minden esetben lehet meghatározni a haplotípusokat, ezért megkülönböztetünk genotípus és fenotípus szinten identikus testvéreket. Megtörténhet olyan eset, amikor fenotípus szinten egyező

testvérek egyikénél rekombináció játszódik le, és ők valójában allél szinten nem egyeznek, ennek a lehetőségét ki kell zárni. A Transzplantációs Bizottság dönt a recipiens transzplantációs várólistára helyezéséről.

Amennyiben a recipiensnek nincsen HLA-identikus családi donora, a Magyar Óssejtdonor Regiszter (továbbiakban Regiszter) előzetes keresés során felméri, hogy a kifelbontású HLA típus alapján hány potenciális donora van a betegnek a hazai donorok között, illetve a nemzetközi regiszterek közös adatbázisában. Ebben a folyamatban van jelentősége annak, hogy a recipiens milyen haplotípusokat hordoz, hiszen így figyelembe lehet venni adott haplotípus földrajzi elterjedését, és ez által célzottabb keresésre van lehetőség annak a földrajzi régióknak a regiszterében, ahol gyakoribb az előfordulási valószínűsége a recipiens által hordozott haplotípusnak. A potenciális donorok számát a Regiszter közvetíti a Nemzeti Óssejt Transzplantációs Bizottság felé. Amennyiben a Transzplantációs Bizottság indokoltnak tartja és engedélyezi az idegen donoros keresést, a betegtől új vérmintát kap a Laboratórium nagyfelbontású vizsgálatok elvégzéséhez. A HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, valamint -DPB1 lókuszek nagyfelbontású eredményének ismeretében a Regiszter a potenciális donorok közül kiválasztja a legmegfelelőbbet. A klinikus partner a keresési stratégiát befolyásoló tényezők közlésével segíti a Regiszter munkáját (diagnózis, preferált őssejtforrás, transzplantáció sürgőssége, stb.) A Regiszter kiegészítő adatokat kérhet be a külföldi donorokról (életkor, nem, CMV-státusz, vércsoport), amelyek befolyásolhatják a donor kiválasztást. (a donor kiválasztás szempontjait lásd 1.3.3.2 fejezet) Megfelelő potenciális donor kiválasztása esetén vérmintát kap a Laboratórium a donorjelölttől megerősítő nagyfelbontású vizsgálatra. A donor esetében is HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, valamint -DPB1 vizsgálatok készülnek, majd egy összehasonlító leleten feltüntetjük az egyezés mértékét a vizsgált HLA lókuszek tekintetében. Amennyiben a transzplantációt végző klinikus elfogadja a potenciális donort, a beteg donorkeresési státuszából transzplantációs várólistára kerül. Abban az esetben, ha adott recipiensnek nagyon kevés potenciális MUD donora van ( $n < 20$ ) vagy a transzplantáció válik nagyon sürgetővé, a Transzplantációs Bizottság egyidejű alternatív donorkeresésre ad engedélyt, így párhuzamosan történik MUD donor és haploidentikus rokon donorkeresés.



**11. Ábra: Donorkeresési algoritmus Magyarországon HSCT-t megelőzően.** A donorkeresési folyamat első lépése a recipiens, valamint a szülők, testvérek HLA típusának kifelbontású meghatározása. HLA-identikus testvér donorral rendelkező betegeknél a transzplantáció a megerősítő HLA vizsgálat után végezhető el. HLA-identikus családi donor hiányában őssejtdonor regiszterekben történhet keresés, nagyfelbontású HLA vizsgálatot követően kerülhet kiválasztásra az önkéntes őssejt donor. Továbbá haploidentikus családi donor is választható, amennyiben sem a recipiens, sem a donor nem termel HLA-ellenes antitesteket a másik ellen.

### 1.3.3.5 A HLA rendszer vizsgálatának klinikai jelentősége a HSCT során

Gyakori allélekkel vagy haplotípussal rendelkező recipiens számára több száz vagy akár több ezer donor is rendelkezésre állhat, ezzel szemben, ritka alléllal vagy haplotípussal rendelkező recipiensek számára még a több millió donort tartalmazó regiszterekben is kihívást jelent megfelelő donort találni. Különböző populációk eltérő genetikai profillal rendelkeznek, ez egyrészt a genetikai sodródás hatása, másrészt a nagy földrajzi távolságokat legyőző népvándorlások következménye. (Sanchez-Mazas, 2012) Jelentősen lerövidítheti a keresési folyamatot és megnövelheti a beteg esélyeit a gyógyulásra, ha azonos etnikai háttérrel rendelkező donorok között történik a keresés. További fontos paraméter lehet egy adott haplotípus esetén a kapcsoltsági egyensúlytól való eltérés mértéke. Populáció-specifikus nagyfelbontású haplotípus gyakoriság eloszlás vizsgálatok is segíthetnek a donorkeresésben, különösen azoknál a donoroknál, akiknél valamelyik HLA lókuszt csak kifelbontással vagy egyáltalán nincs tipizálva. Ezekben az esetekben nagy valószínűséggel megmondható az egyezés mértéke, ha rendelkezésre állnak adott populációnál allél és haplotípus frekvencia adatok. A fent említettekből látható, hogy ugyan a legtöbb HLA diverzitással foglalkozó tanulmányban

az elsődleges célja, hogy a populációk eredetéről, illetve a migráció során bekövetkezett genetikai keveredésről szolgáltatson új információt, ezzel egyidejűleg számos hasznos adattal segíti a megfelelő őssejtdonor keresés folyamatát. Az egyes populációkat jól reprezentálják az őssejtdonor regiszterekben lévő donorok, hiszen véletlenszerűen jelentkeznek az ország egész területéről, dedikáltan egészségesek és megfelelően nagy elemszámot is biztosítanak. Számos ország arra is nagy hangsúlyt fektet, hogy az etnikai kisebbségek is megfelelő létszámban képviseltessék magukat a regiszterekben. (Balas, 2010, Grubic, 2014, Schmidt, 2009, Sanchez-Mazas, 2012)

## 2 Célkitűzések

A hematopoetikus őssejt átültetést megelőzően kifejezetten nagy jelentősége van a null allélek azonosításának. A HLA-C\*04:09N az egyike a leggyakoribb null alléleknek, ezért a C\*04:09N alléllal kapcsolatos vizsgálatok során az alábbi célokat foglalmaztuk meg:

1. a HLA-C\*04:09N allél azonosítására alkalmas módszer létrehozása
2. a HLA-C\*04:09N allél gyakoriságának meghatározása a magyar populációban (n=7345).
3. a HLA-C\*04:09N allélt hordozó haplotípusok gyakoriságának meghatározása a magyar populációban

A vérképző őssejt transzplantáció előtt jelentősen lerövidítheti a donorkeresési folyamatot és ez által megnövelheti a recipiens gyógyulási esélyeit, ha hasonló genetikai háttérrel rendelkező önkéntes őssejtdonorok között történik a keresés. Szinte mindegyik európai populáció HLA frekvencia adata elérhető publikált tanulmányokban vagy online HLA-adatbázisban. Magyar HLA allélcsoport gyakoriság adatokat reprezentatív mintaszámon korábban nem közöltek. Munkánk egy új és átfogó képet kíván adni a magyar populáció és Magyarország legnagyobb etnikai kisebbségét alkotó magyar roma populáció elhelyezkedéséről a HLA allélcsoportok genetikai térképén.

4. Munkánk célja volt, hogy 2402 magyar önkéntes hematopoetikus őssejtdonor körében megállapítsuk a HLA-A, HLA-B és HLA-DRB1 lókuszekben az allélcsoport frekvenciákat.
5. Másik célunk volt, hogy egy 186 főből álló magyarországi roma populációban meghatározzuk a HLA-A, HLA-B és HLA-DRB1 lókuszekben az allélcsoport gyakoriságokat.
6. A magyar kohorszban és a magyarországi roma csoportban a populációgenetikai paraméterek meghatározásához és ezek összehasonlításához az alábbi céljaink voltak:
  - A. a HWE egyensúlytól való eltérés meghatározása a vizsgált populációkban
  - B. a kapott allélcsoport frekvencia (AF) értékek összehasonlítása



- C. a kumulatív allélcsoport frekvencia értékek meghatározása a vizsgált populációkban
  - D. a géndiverzitás és a becsült heterozigótaság meghatározása a vizsgált populációkban
7. Munkánk további célja volt, hogy szisztematikus összehasonlítást végezzünk a két magyarországi csoport, továbbá közép- és délkelet-európai kohorszok (Csehország, Ausztria, Horvátország, Szerbia, Románia) és más roma eredetű csoportok (spanyolországi roma, Észak-Gudzsarát (India)) között. Annak érdekében, hogy feltérképezzük a genetikai kapcsolatokat a kilenc populáció között, célunk volt:
- A. a kilenc csoport páronkénti és lókuszonkénti összehasonlítása az F-statisztika segítségével, amely az allélcsoport frekvenciákat veszi alapul.
  - B. a kilenc populáció között a genetikai távolságok meghatározása lókuszonként, valamint a távolságok grafikus ábrázolása két dimenzióban.

## 3 Anyagok és módszerek

### 3.1 Vizsgált csoportok

#### 3.1.1 Vizsgált csoportok a HLA-C\*04:09N vizsgálatokhoz

A HLA-C\*04:09N allélgyakoriság és haplotípus vizsgálatokhoz három csoportot analizáltunk. (2. táblázat) Az első csoport 1953 fő nem rokon önkéntes csontvelői őssejtdonorból állt (1-es csoport). A HLA-A és -B típus meghatározása kezdetben szerológiai módszerrel, a DRB1 lókuszt esetében PCR-SSP módszerrel történt, 2007-től kezdődően viszont mindhárom HLA lókuszt tipizálását PCR-SSP vagy PCR-SSO módszerrel végeztük. Megvizsgáltunk továbbá 717 HSCT-re váró beteget (2-es csoport), ebben a csoportban a HLA-A, -B, -C, -DRB1 és -DQB1 lókuszt PCR-SSO vagy SBT módszerrel lettek tipizálva. A harmadik csoport klinikai szempontból változatos, többek között, HSCT-re, illetve szolid szerv transzplantációra váró betegeket is tartalmazott. Esetükben a HLA-A, -B, -C, -DRB1 tipizálás szerológiával vagy PCR-SSP módszerrel történt. Ezt a csoportot tovább bontottuk két részre, 2238 főnél rendelkezésre állt DNS-minta (3a), ami lehetőséget adott utólagos molekuláris biológia vizsgálatok elvégzésére, míg 2437 főnél tárolt DNS-minta nem volt elérhető (3b). A 2-es és 3-as csoport egyaránt tartalmaz HSCT-re váró betegeket, a két csoportot azért nem egyesítettük, mert időben és a vizsgált HLA-lókusztok és a HLA-tipizáló módszerek tekintetében is teljesen elkülönültek egymástól.

**2. táblázat: A HLA-C\*04:09N allélgyakoriság és haplotípus frekvencia vizsgálatokhoz felhasznált populációk**

	Csontvelői őssejt donorok (1)	HSCT betegek (2)	Klinikailag változatos csoport (3)		Összesen
			DNS elérhető (3a)	DNS nem elérhető (3b)	
Gyűjtés időtartama	1996-2014	2010-2014	1983-2007	1983-2007	-
Vizsgált kromoszómák száma (2n) (HLA-A, -B, -DRB1 típus elérhető)	3906	1434	4476	4874	14690

### **3.1.2 Vizsgált csoportok a HLA-A, -B, és -DRB1 lókuszokat összehasonlító vizsgálatokhoz**

#### **3.1.2.1 Magyarországi populációk**

Összesen 2402 egészséges, nem rokon, önkéntes magyar őssejt donor HLA-A, -B, és –DRB1 tipizálási eredményeit vizsgáltuk. A donorok 57%-a férfi, 43%-a nő, életkoruk 18 és 62 év között volt. A Magyar Őssejtdonor Regiszterbe 1990 és 2012 között jelentkeztek. Ez a csoport reprezentálja a magyar átlagpopulációt, mindegyikük magyar állampolgár, de nem zárható ki, hogy donornak jelentkezett olyan személy is, aki más etnikai közösséghez tartozik. Ezen a csoporton kívül 186 egészséges, önkéntes, magyar roma őssejt donor HLA-A, -B és –DRB1 allélcsoport frekvencia adatait analizáltuk. A donorok toborzása 2004 és 2005 között történt két földrajzi régióból, egyrészt Hajdú-Bihar megyéből, másrészt Mohácsról és környékéről. A csoport tagjai önbevallás útján vallották magukat romának. A vizsgált személyek 60%-a férfi és 40%-a nő, az életkor pedig 18 és 62 év között alakult. A Roma kohorsz esetén minden erőfeszítést megtettünk, hogy a közeli rokonságban álló személyeket kizárjuk, de a roma nép életmódjából és kulturális szokásaiból eredően rejtett kapcsolatok lehetnek a vizsgált személyek között. Ez befolyásolhatja az eredményeket, de izolált populációk esetén, nem zárható ki a rokoni kapcsolatok jelenléte. (Sanchez-Mazas, 2012)

A Magyar Őssejtdonor Regiszterbe történő jelentkezéskor, minden donor aláír egy beleegyező nyilatkozatot, amelyben hozzájárul a HLA adatainak tudományos célra történő felhasználáshoz. Mindkét csoport HLA tipizálását a Budapesti Transzplantációs Immungenetikai Laboratórium végezte. Az izolált DNS-t minden donor esetében anonim módon azonosító számmal tároljuk.

A magyar populációt reprezentáló csoport esetén a HLA-tipizálás heterogén volt, a felbontás mértékét, a tipizált lókuszok számát, illetve a tipizálási módszert tekintve. Ez utóbbi annak köszönhető, hogy a Laboratóriumban a DNS alapú tipizálás először a HLA-DRB1 lókusznál lett bevezetve és csak évekkel később tértünk át arra a HLA-A és –B lókusznál is. Ezért azokat a mintákat választottuk ki, akiknél a HLA-DRB1 lókusz DNS alapú tipizálással rendelkezésre állt (n=2402). Ebben a csoportban nem volt minden mintánál elérhető a HLA-A és HLA-B lókusz tipizálási eredménye, ezért ennél a két lókusznál kisebb mintaszámmal dolgoztunk (HLA-A: n=1644; HLA-B: n=1653). Ez a tény nem befolyásolta az eredményeket, hiszen az egyes lókuszokat külön-külön

elemztük és hasonlítottuk össze más populációkban talált allélcsoport frekvencia adatokkal.

### **3.1.2.2 Közép- és délkelet-európai és roma eredetű populációk**

Az összehasonlító vizsgálatokhoz használt populációkat (3. Táblázat) egyrészt a földrajzi elhelyezkedésük, másrészt az etnikai eredetük alapján választottuk ki. Az első szempont szerint Magyarországgal közvetlenül szomszédos országok közül Ausztriát (n=200), Horvátországot (n=4000), Szerbiát (n=1992) és Romániát (n=6936) reprezentáló populációk kerültek be a tanulmányba. A szlovák populáció helyett - adathiány miatt - a közvetlenül határos Csehországot reprezentáló csoportot (n=310) vizsgáltuk, ez azért is tekinthető jogos helyettesítésnek, mert az Osztrák-Magyar Monarchia egyik utódállamaként a két nemzet együttműködése hozta létre Csehszlovákiát, amely 1918-1938 és 1945-1992 között állt fenn.

Az etnikai hovatartozást figyelembe véve a magyarországi roma csoport mellé egy másik európai roma populációt választottunk Spanyolországból (Andalúzia; n=99). Továbbá a roma népcsoport feltételezett őshazájában, az Indiában elhelyezkedő Észak-Gudzsarátban élő csoportot (n=338) is bevettük a vizsgálatokba. Az összehasonlító populációgenetikai vizsgálatokhoz beválasztott populációk HLA frekvencia adatai egyrészt nemzetközi szakirodalomban publikált eredmények, másrészt az [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net) HLA adatbázisban található meg.

A földrajzi elhelyezkedés és a feltételezett közös etnikai eredet mellett irányadó volt Sanchez-Mazas és mtsai (Sanchez-Mazas, 2012) által megállapított minimális elemszám (n=100), amelytől egyedül a Spanyolországi Roma csoport esetében voltunk kénytelenek eltekinteni (n=99). További szempont volt, hogy minden populációnál rendelkezésre álljon a HLA-A, -B és -DRB1 lókuszok frekvencia adatai.

3. Táblázat A HLA-A, -B, -DRB1 allélcsoport gyakoriság vizsgálatokhoz felhasznált populációk

Populáció neve	Rövidítés	n	Forrás	
			Publikált adat	<i>allelefreqencies.net</i> oldalra feltöltötte:
Magyarország	HUN	2402	jelen tanulmány	–
Magyarországi Roma	HUN-GYP	186	jelen tanulmány	–
Ausztria	AUS	200	–	Faé (2007)
Horvátország	CRO	4000	Grubic (2014)	–
Csehország	CZE	310	Riccio (2013)	–
Románia	ROM	6936	–	Constantinescu (2003)
Szerbia	SER	1992	Andric (2014)	–
Spanyolországi Roma	SPA-GYP	99	–	Lopez Nevot (2005)
Észak-Gudzsarát (India)	IND	338	–	Shah (2012)

n: elemszám (a vizsgált személyek száma)

## 3.2 Molekuláris biológiai módszerek

A DNS izolálást és a HLA tipizálást az OVSz Transzplantációs Immungenetikai Laboratóriumában végeztük.

### 3.2.1 DNS izolálás

A vizsgálatokhoz alvadásgátolt perifériás vérmintából izolált genomiális DNS-t használtunk. Az izolálást a gyártó protokolljának megfelelően „kisózásos” módszerrel végeztük (Gentra Puregene Blood Kit, Qiagen). Az eljárás a vörösvértestek hipozmotikus lízisével kezdődik, majd a fehérvérsejtek feltárását követően ammónium-acetáttal kicsapjuk a fehérjéket, és eltávolítjuk a rendszerből. A DNS-t izopropanollal, illetve 70%-os etanollal mossuk, végül a kiszárított DNS-t megfelelő DNS pufferben vesszük fel. Nanodrop 1000 spektrofotométerrel ellenőrizzük a DNS koncentrációját és tisztaságát, végül a koncentrációt 50 ng/μl-re állítottuk be.

### **3.2.2 HLA allélcsoportok meghatározása**

A HLA tipizáláshoz felhasznált két DNS-alapú módszerrel (PCR-SSP, PCR-SSO) kifelbontású HLA eredményeket határoztunk meg. Mindkét esetben a primerek adott HLA lókuszt esetén az antigénkötő zsebet meghatározó exonok amplifikálására vannak tervezve (HLA I-es osztály: exon2 és exon3; HLA II-es osztály: exon3). A PCR-SSP és PCR-SSO módszernél a primerek pontos szekvenciája nem ismert, a gyártó megadja, hogy melyik exonon van a tapadási helyük, továbbá, hogy melyik allél amplifikálására képesek és mekkora terméket hoznak létre.

#### **3.2.2.1 Polimeráz láncreakció szekvencia specifikus primerekkel (PCR-SSP)**

A PCR-SSP módszert a gyártó protokolljának megfelelően végeztük (Olerup SSP). A módszer során több szekvencia specifikus primert alkalmazunk, ezek külön-külön reakcióban tudnak kikötődni a velük komplementer HLA allélhoz. Ha a primer nem tud kikötődni a vizsgálni kívánt mintában jelenlévő HLA allélhoz, mert az amplifikációs primerek 3' vége nem illeszkedik a cél szekvenciához, akkor nem képződik róla specifikus termék. Minden reakcióban a HLA-allélra specifikus primerek mellett jelen van egy belső amplifikációs kontrollként szolgáló primer pár (multiplex PCR), amely a humán növekedési hormon gén egy szakaszára specifikus, és megfelelő PCR körülmények és DNS koncentráció esetén mindig képez terméket. A PCR reakció után 2%-os agarózon gélelektroforézissel szétválasztjuk a termékeket méret szerint, majd a specifikus termékek pozícióját és méretét figyelembe véve a kiértékelés a Score szoftverrel (Helmberg Score), illetve a gyártó által kiadott megoldó kulcs segítségével történik. A program a pozitív reakciók különböző kombinációjából állapítja meg a HLA típust.

#### **3.2.2.2 Polimeráz láncreakció és szekvencia specifikus oligonukleotid hibridizáció (PCR-SSO)**

A PCR-SSO módszernél is a gyári leírást követtük (One Lambda). A metodika első lépése egy PCR reakció (amplifikáció), amelynek során az antigén kötő zseb kialakításáért felelős exonokat sokszorosítjuk fel. A primerek biotinnal vannak jelölve, így a keletkező PCR termékek is jelölve lesznek. Az ellenőrző gélelektroforézis 2%-os agaróz gélen történik, ezt követően a PCR-termékeket hibridizáltatjuk 5,6 µm átmérőjű polisztirol mikrogyöngyök felszínéhez kovalensen kikötött jelöletlen oligonukleotidokhoz (hibridizáció). Mivel a hordozóhoz fixált jelöletlen próbához

hibridizál a jelölt PCR termék, ezt a módszert reverz SSO-nak (rSSO) nevezzük. Különböző gyöngyök felszínén a hibridizációs próbák különböző HLA-allélcsoportokkal komplementerek és az antigén kötő zseb kialakításáért felelős exonok polimorf régióira vannak tervezve. (A gyöngyök száma lókuszonként eltérő: HLA-A: 82, HLA-B: 100, HLA-C: 62, HLA-DRB1: 75, DQA1 és DQB1: 93.) A gyöngyök belseje meg van festve különböző arányban használt vörös és infravörös festékkel. A két festék különböző aránya 100 féle gyöngy azonosítását eredményezi. Az áramlási citometria elvén működő rendszer során a két festék különböző intenzitású kombinációja lehetővé teszi minden egyes gyöngy azonosítását. A hibridizáció után sztreptavidinnel konjugált fikoeritrin adunk a rendszerhez (jelölés). A sztreptavidin hozzá kapcsolódik a biotinhoz és ez által a PCR termékhez, a fikoeritrin pedig gerjesztés hatására fluoreszcens fényt bocsát ki, amit a Luminex 200 műszer detektálni képes. A műszerben található piros lézer gerjeszti, ennek következtében azonosítja a specifikus gyöngyöket, míg a zöld lézer a gyöngyök felszínéhez kötődő jelölt molekulákat gerjeszti és az így keletkezett fluoreszcens jel intenzitását méri a műszer (detektálás). A különböző gyöngyökön mért reakciók kombinációjából állapítható meg a HLA típus. A kiértékelés a Fusion szoftver segítségével történik.

### **3.2.3 A HLA-C\*04:09N jelenlétének direkt meghatározása allélspecifikus PCR-rel**

A HLA-C\*04:09N jelenlétének direkt meghatározásához létrehoztunk egy új allélspecifikus PCR rendszert. A primertervezés során a HLA-C\*04:09N-re tervezett oligonukleotidok közül a Pinto és mtsai által is használt primereket alkalmaztuk, valamint a HLA-I-es osztályú gének közelében elhelyezkedő HLA-H (HFE) génre terveztünk primereket (HHC1 és HHC2). Az utóbbi primerpárt amplifikációs kontrollként használtuk, hogy kizárjuk azokat az eseteket, amelyekben a C\*04:09N-re specifikus primerekkel kapott negatív reakció hátterében a nem megfelelő minőségű DNS vagy PCR körülmény állt. Továbbá minden sorozatmérésnél használtunk pozitív kontroll mintát, amely bizonyítottan hordozta a C\*04:09N allélt. A mintát Prof. Marie-Paule Emonds a mecheleni (Belgium) HLA laboratórium vezetője bocsátotta rendelkezésünkre. (A pozitív kontroll személy HLA típusa: A\*01; A\*23; B\*44; B\*57; C\*04:09N; C\*06; DRB1\*07; DRB1\*11; DQB1\*02; DQB1\*03; DPB1\*04.) A primerek szekvenciája és a PCR körülmények a 4. és 5. táblázatban találhatóak. Az allélspecifikus PCR-nél ún. touch down PCR-t alkalmaztunk, amelynek lényege, hogy az anellációs

hőmérsékletet folyamatosan csökkentjük 1-3 °C-kal ciklusonként. A primerek kitapadása a célszekvenciához magasabb hőmérsékleten specifikusabb, ezért kevesebb aspecifikus termék keletkezik a kezdeti ciklusok során. A kiértékelést 3%-os agaróz gélelektroforézissel végeztük.

**4. táblázat: A HLA-C\*04:09N allél azonosítására létrehozott allélspecifikus PCR során használt primerek szekvenciái**

Primer-párok	szekvenciák	termék méret
C4-9N-7F C4-1-8R	5'-GTCTCTCATCGCTTGTAAG-3' 5'-GCAGAAAGAGATGCCAGAGG-3'	276 bp
HHC1: HHC2:	5'-TGGCAAGGGTAAACAGATCC-3' 5'-CTCAGGCACTCCTCTCAACC-3'	393 bp

**5. táblázat: Az allélspecifikus touch down PCR körülményei**

PCR körülmények	ciklusszám
95°C 30''	1
95°C 30'' 65°C 30'' 72°C 45''	3
95°C 30'' 62°C 30'' 72°C 45''	3
95°C 30'' 61°C 30'' 72°C 45''	3
95°C 30'' 60°C 30'' 72°C 45''	15
95°C 30'' 59°C 30'' 72°C 45''	15
72°C 7'	1

### 3.2.4 A HLA-C\*04:09N jelenlétének indirekt meghatározása

A C\*04:09N allél két haplotípusban fordul elő a leggyakrabban, a HLA-A\*02~B\*44~C\*04~DRB1\*07 és a HLA-A\*23~B\*44~C\*04~DRB1\*07 haplotípusban. Erre alapozva a HLA-C\*04:09N jelenléte leszűkíthető azokra a személyekre, akik hordozzák a fenti allélkombinációkat. Azonban a vizsgált személyek nagy részénél csak HLA-A, -B és -DRB1 tipizálási eredmények álltak rendelkezésre. Ezért a HLA-C\*04:09N vizsgálatokhoz felhasznált három csoportban (1-es csoport, 2-es csoport, 3a csoport) a HLA-A\*02, B\*44, DRB1\*07 allélcsoportokat hordozó személyeknél elvégeztük a HLA-C pótló tipizálását PCR-SSO-val, hiszen a DNS-alapú módszerrel tipizált személyek közül potenciálisan azok hordozhatják a C\*04:09N allélt, akik



hordozzák a C\*04 allélcsoportot, mivel az, hogy a genetikai állományban jelen van a C\*04 allélcsoport, még nem feltétlenül jelenti azt, hogy a fehérjetermék expresszálódik a sejt felszínén. (A 3b csoportban ezt a vizsgálatot nem tudtuk elvégezni, mert nem állt rendelkezésre DNS.) Amennyiben jelen volt a C\*04 allélcsoport, allélspecifikus PCR-rendszerrel határoztuk meg a null allél jelenlétét. A vizsgált személyeknek volt egy része, akiknél a HLA-C lókuszt tipizálása szerológiai módszerrel történt. Azon személyeknél, akiknél ezzel a módszerrel csak egy HLA-Cw4 antigént (a C\*04 szerológiai megfelelője a Cw4) lehetett azonosítani, nem eldönthető, hogy valóban homozigóták Cw4-re vagy a szerológiai módszer korlátai miatt (lásd. 1.1.4) nem lehetett detektálni a másik HLA-C antigént vagy ténylegesen nem jelenik meg a sejt felszínén a gén termék a null allél következtében. Az ilyen esetekben szintén elvégeztük a HLA-C lókuszt tipizálását DNS-alapú módszerrel, és ahol a C\*04 mellett nem detektáltunk másik allélcsoportot allélspecifikus PCR-rendszert alkalmaztunk. A C\*04:09N másik gyakori megjelenési formája a HLA-A\*23, B\*44, DRB1\*07 allélkombináció, amely közel 100%-ban kapcsolt a HLA-C\*04 allélcsoporttal, ezen allélkombináció hordozása esetén nem tipizáltuk a HLA-C lókuszt, hanem feltételeztük a C\*04 jelenlétét és valamennyi esetben elvégeztük az allélspecifikus PCR-rendszert. A HLA-A\*23~B\*44~C\*04~DRB1\*07 haplotípus gyakorisága 0,007 kaukázusi populációban. Ennél nagyságrendekkel ritkább egy másik haplotípus ( $f=0,00007$ ), amelyben a HLA-C\*04 helyett a C\*16 allélcsoport (HLA-A\*23~B\*44~C\*16~DRB1\*07) szerepel. ([www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net), belépve 2014. október 1-én) Azokban az esetekben teljes biztonsággal kizárható volt a HLA-C\*04:09N jelenléte, ahol a szerológiai módszerrel a Cw4 antigén mellett egy másik antigén jelenlétét is azonosítottuk. Ezeket a mintákat negatívnak értékeltük a C\*04:09N jelenléte szempontjából.

### **3.2.5 Sanger szekvenálás**

Az azonosított C\*04:09N allél megerősítéséhez külön szekvenáló primert terveztünk (C4-1-8R-seq: 5'-TCCCACACAGGCAGCTGTC). Megismételtük az allélspecifikus PCR-t amplifikációs kontroll primerek használata nélkül, azért hogy elkerüljük a termék gélből történő kivágását. Ezt követően a felszaporított PCR-terméket ExoSAP enzimkeverékkel tisztítottuk, amely a nem beépült primereket lebontja és defoszforilálja a nukleotidokat. A szekvenáló reakció során a C4-1-8R-seq primert használtuk. Az így kapott terméket Sephadex G-50-nel tisztítottuk, ezt követően a szekvenálás ABI3100 Genetic Analyzer készüléken történt.

### 3.3 Populációgenetikai módszerek

#### 3.3.1 Allélcsoport frekvencia értékek, Hardy-Weinberg egyensúly és becsült heterozigótaság meghatározása Gene[RATE] program segítségével

A Gene[RATE] program (<http://hla-net.eu>, Nunes JM, 2010, 2014) „transliterate tool” funkciója segítségével végeztük el a HLA tipizálási adatok előkészítését. Kis számban előfordultak nagyfelbontású eredmények, ezért először az adatokat egységesítettük, vagyis minden minta esetében kislebontású eredménnyé alakítottuk. Az allélcsoport gyakoriságok számítására szintén a Gene[RATE] programot használtuk az egyes populációknál lókuszonként külön-külön. Gene[RATE] program segítségével meghatároztuk, hogy a vizsgált populációk Hardy-Weinberg egyensúlyban vannak-e, továbbá a heterozigótaság (H) mértékét. A géndiverzitásnak számszerű indikátora a becsült heterozigótaság (estimated heterozygosity) mértéke, amely a következő képlettel számolható ki:  $H=1-\sum p_i^2$ , ahol a  $p_i$  az i-dik allél gyakorisága. A H értéke 0-1 között mozoghat, ahol H=0 azt jelenti, hogy egyáltalán nincs heterozigótaság, az 1-hez közeli szám sok hasonló gyakoriságot mutató allélra utal és nagy populáción belüli diverzitást mutat. (Schmidt, 2010, Testi, 2011)

#### 3.3.2 Kumulatív allélcsoport frekvencia értékek számítása

A populációkban jelenlévő diverzitás számszerűsítésére a kumulatív allélcsoport frekvenciákat számítottuk ki. Ennek során lókuszonként sorba rendeztük az allélcsoport gyakoriság értékeket, megnéztük, hogy a leggyakoribb allélcsoport milyen gyakorisággal fordul elő, majd azt határoztuk meg, hogy az első két, három, négy, stb. leggyakoribb allélcsoport a vizsgált csoportban milyen frekvenciát mutat. A kumulatív allélcsoport gyakoriságokat ábrázoltuk az allélcsoportok számának a függvényében. Fontos paraméter volt, hogy hányadik allélcsoportnál éri el az összesített gyakoriság a 100%-ot, illetve mennyire egyenletesen vagy meredeken emelkedik a görbe.

### 3.4 Statisztikai módszerek

#### 3.4.1 Az AF értékek összehasonlítása

Az egyes allélcsoport frekvencia értékek páronkénti összehasonlítását chi-négyzet próbával végeztük el a GraphPad InStat program segítségével. A választott

szignifikancia szint minden esetben  $p < 0,05$  volt. A többszörös tesztelés miatt Bonferroni korrekciós számításokat végeztünk. Az allélcsoport frekvenciák páronkénti összehasonlítását azért tartottuk fontosnak a magyar és a magyar roma populáció között, mert az F-statisztika és a nem-metrikus sokdimenziós skálázás módszere is az allélcsoport frekvencia értékeket együtt analizálva határozza meg, hogy két populáció között van-e genetikai kapcsolat vagy nincs. Árnyalni szeretnénk volna eredményeinket azzal, hogy meghatározzuk, konkrétan mely allélcsoportok között van szignifikáns különbség a csoportok között.

### **3.4.2 F-statisztika**

A vizsgált populációk között fennálló genetikai rokonsági fok meghatározásához hagyományos Wright-féle F-statisztika vizsgálatot használtunk. A kilenc csoportot páronként és lókuszonként hasonlítottuk össze egymással. A párokra vonatkozó  $F_{ST}$  értékeket és azok statisztikai szignifikanciáját az Arlequin szoftver segítségével határoztuk meg. (Excoffier, 2010) A választott szignifikancia szint minden esetben  $p < 0,05$  volt. Az F-statisztika az allélcsoport gyakoriságokat veszi alapul, és az  $F_{ST}$  érték a populáció differenciációs index, amely dimenzió nélküli szám. A Wright-féle  $F_{ST}$  érték azt mutatja meg, hogy a vizsgált csoportokban meglévő totális molekuláris variancia mekkora része tulajdonítható a populációk között lévő varianciának. (Wright, 1951) A páronként számított  $F_{ST}$  index ad információt a populációk között lévő genetikai távolságról. A Reynolds-féle genetikai távolság (DR) közvetlenül az  $F_{ST}$  értékekre épül. (Reynolds, 1983) A Reynolds féle távolság linearizált  $F_{ST}$ -eredetű távolság, amelynek evolúciós jelentősége van ugyanakkor nem-metrikus természetű, ezért nem tekinthető matematikai távolságnak. Az  $F_{ST}$  értéket közös leszármazási együttthatónak is szokták nevezni. (Wright, 1951)

### **3.4.3 Nem-metrikus sokdimenziós skálázás (Non-metric Multidimensional Scaling Analysis, NMDS)**

A populációk között lévő genetikai távolságokat a nem-metrikus sokdimenziós skálázás (NMDS) módszerével ábrázoltuk. A sokdimenziós skálázás egy olyan elemzési módszer, amellyel egy halmaz objektumai között a páronkénti távolságokat ismerve, azok geometriai ábrázolása készíthető el. A módszer során adatredukciós eljárással ábrázoljuk a vizsgált csoportokat két- vagy háromdimenziós térben, és ennek során a vizsgált objektumok -egy bizonyos hiba határon belül- ugyanolyan távolságban

helyezkednek el egymástól, mint az eredeti sokdimenziós térben. A csökkentett kiterjesztésű térben két hasonló elemet két egymáshoz közel lévő pont, két nagyon különböző objektumot pedig két távoli pont jelenít meg. A populációk közötti páronkénti genetikai távolság értékeket mátrix formában kapjuk meg. A koordináták értelmezését az ábrázolt pontok helyzetének vizsgálatával végezzük. A tengelyek beskálázásával minden objektumhoz skálaértéket kapunk a tengelyeknek megfelelő dimenziók mentén. A vizsgált csoportokat szeretnénk az eredeti sokdimenziós térhez viszonyítva a legpontosabban ábrázolni, ugyanakkor, éppen az adatredukció miatt, mindenképpen kell hibával számolnunk. Ezért szükséges, hogy olyan objektív mérőszámok álljanak rendelkezésre, amelyek a kapott távolságok illeszkedésének a pontosságáról adnak információt. A stress függvények azt vizsgálják, hogy a modell által meghatározott térben, mekkora az eltérés az eredeti távolságok és a modell által létrehozott távolságok között. A függvényekből számított stress érték a legfontosabb mérőszám, amely az illeszkedésnek a minőségét, úgynevezett „jóságát” mutatja. (6. táblázat) Minél kisebb értéket mutat, annál kisebb információvesztés történt. Ha tehát tökéletes a megfelelés az eredetileg érzékelt és az ábrázolt különbségek között, akkor a hiba és a stress érték is zérus. (Fontos megjegyezni, hogy néha az s-stress mutató helyett az úgynevezett stress mutató értékét használják, mely az s-stress mutató négyzetgyöke.) (Kruskal, 1964)

**6. táblázat: Az NMDS során használt stress függvények értékelése (Kruskal, 1964 nyomán)**

s-stress	minőség	megjegyzés
0	tökéletes	<ul style="list-style-type: none"> <li>tökéletes illeszkedés</li> </ul>
0-0,05	kiváló	<ul style="list-style-type: none"> <li>valószínűleg minden releváns információt tartalmaz</li> </ul>
0,05-0,1	jó	<ul style="list-style-type: none"> <li>megfelelő, az eredmények értelmezhetők</li> </ul>
0,1-0,2	elfogadható	<ul style="list-style-type: none"> <li>az eredmények többnyire értelmezhetők, de fenntartással kezelendők</li> </ul>
0,2 fölött	nem megfelelő	<ul style="list-style-type: none"> <li>adott dimenziószámánál csak nagy információvesztéssel ábrázolható</li> <li>szükséges a dimenziók számának növelése</li> </ul>

Esetünkben az állélcsoport frekvenciákon alapuló Reynolds féle genetikai távolságokat vehetjük alapul a populációk között, amely azonban nem-metrikus természetű, ezért

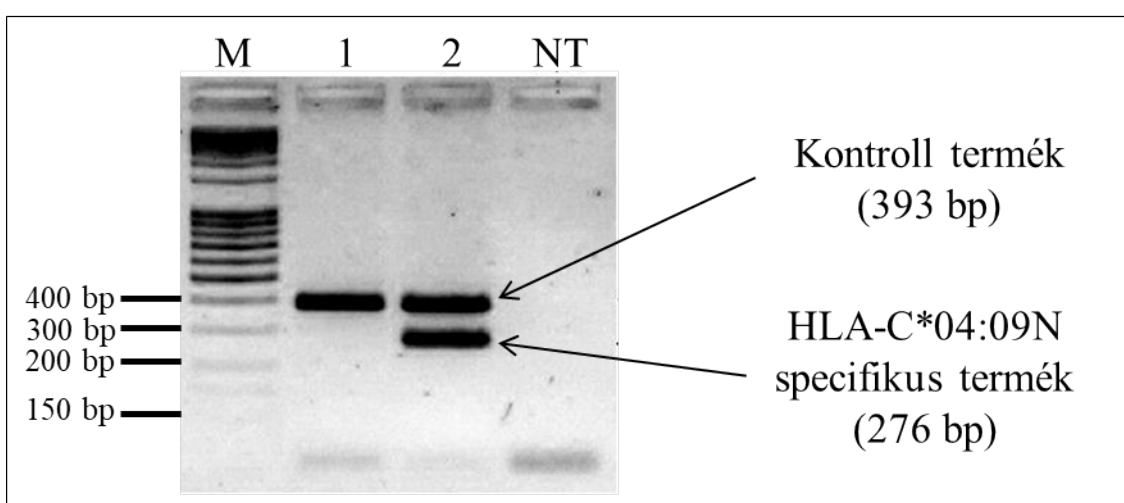
nem tekinthető matematikai távolságnak. Emiatt nem-metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) segítségével végeztük el a kilenc populáció összehasonlítását és ábrázoltuk grafikusán két dimenzióban az R program (Ihaka, 1996) segítségével.

## 4 Eredmények

### 4.1 A HLA-C\*04:09N allállal kapcsolatos vizsgálatok eredményei

#### 4.1.1 A HLA-C\*04:09N allél gyakoriságának meghatározása

Létrehoztunk a HLA-C\*04:09N jelenlétének meghatározásához egy új allélspecifikus PCR rendszert. Az allélspecifikus PCR során kapott gélelektroforézis képe a 12. ábrán látható.



12. ábra: A HLA-C\*04:09N meghatározására létrehozott allélspecifikus PCR kiértékelése gélelektroforézissel

M: molekulasúly marker, amely ismert méretű lineáris DNS molekulák keveréke

1: C\*04:09N-negatív minta: csak a HHC-1 és HHC-2 primerek által felszaporított amplifikációs kontroll terméket tudtuk detektálni, a C\*04:09N-re specifikus primerek nem adtak terméket

2: C\*04:09N-hordozó minta: mindkét primerpárral kaptunk terméket

NT: negatív kontroll (dH<sub>2</sub>O)

Meghatároztuk a HLA-C\*04:09N allél frekvenciáját 7345 főből álló beteganyagban, amely jól reprezentálja a magyar populációt. Mivel két jellemző haplotípusra (HLA-A\*02, B\*44, C\*04, DRB1\*07, illetve HLA-A\*23, B\*44, C\*04, DRB1\*07) lehetett szűkíteni a C\*04:09N allél előfordulását, ezért nem volt szükséges a teljes mintaszámon alkalmazni az allélspecifikus PCR-t, a vizsgált minták nagy részénél kizárható volt a HLA-C\*04 jelenléte, és ezáltal a C\*04:09N allél jelenléte is.

Összesen 44 olyan személyt azonosítottunk, aki hordozza a HLA-A\*02, B\*44, C\*04, DRB1\*07 allélkombinációt. (7. táblázat) Ezek közül 25 esetben a szerológiai módszerrel kapott eredmény alapján, 18 esetben pedig az allélspecifikus PCR segítségével zártuk ki a C\*04:09N jelenlétét. A 44 személyt vizsgálva mindössze

egyetlen esetben azonosítottunk HLA-C\*04:09N allélt az allélspecifikus PCR segítségével. Összesen 114 esetben detektáltunk HLA-A\*23, B\*44, DRB1\*07 allélkombinációt a három vizsgált csoportban. Egyetlen esetben sem azonosítottuk a HLA-C\*04:09N allélt, 61 esetben szerológiai módszerrel, 53 esetben pedig allélspecifikus PCR-rel zártuk ki a jelenlétét. Az eredményeinket összesítve megállapíthatjuk, hogy a HLA-C\*04:09N allél gyakorisága a magyar populációban 0,0068% (1/14690).

**7. táblázat A C\*04:09N allél jelenlétének vizsgálatára irányuló allélspecifikus PCR és szerológiai módszerrel kapott eredmények összesítése**

	Csontvelő donorok (1)	HSCT betegek (2)	Klinikailag változatos csoport (DNS elérhető) (3a)	Klinikailag változatos csoport (DNS nem elérhető) (3b)	módszer / összesített AF (Σ)
HLA-A*02, B*44, C*04, DRB1*07 allélkombinációt hordozó kromoszómák száma (%)	0	2	12	11	szerológia
	<b>12+1 pozitív</b>	4	2	0	AS-PCR
	13 (0,33)	6 (0,41)	14 (0,31)	11 (0,22)	Σ44 (0,29)
HLA-A*23, B*44, DRB1*07 allélkombinációt hordozó kromoszómák száma (%)	0	6	20	35	szerológia
	32	11	10	0	AS-PCR
	32 (0,82)	17 (1,2)	30 (0,67)	35 (0,72)	Σ114 (0,78)

#### **4.1.2 A HLA-C\*04:09N allélt hordozó haplotípusok gyakoriságának becslése**

A C\*04:09N szorosan asszociált a HLA-B\*44:03 allélhoz, továbbá eddig csak a HLA-A\*02~B\*44:03~DRB1\*07:01~DQB1\*02, illetve a HLA-A\*23:01~B\*44:03~DRB1\*07:01~DQB1\*02 haplotípusban írták le. Figyelembe véve a haplotípus frekvencia adatokat 1000 főnél nagyobb mintaszámok esetén ([www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net)), azt feltételeztük, hogy ha a B\*44 és a DRB1\*07 együtt fordul elő az A\*02 vagy A\*23 allélcsoporttal, és egyidejűleg jelen van a C\*04 allélcsoport is, ez csak akkor fordulhat elő, ha a HLA-B lókuszbán a B\*44:03 allél van jelen. Tehát, ha HLA-C\*04-et detektáltunk, a fenti feltételezésre alapozva, nem teszteltük külön a B\*44:03 allél jelenlétét, hanem a szoros kapcsoltságra való tekintettel

elfogadtuk azt. A HLA-A\*23, B\*44 és DRB1\*07 nincsenek kapcsoltsági egyensúlyban egymással, vagyis nagy valószínűséggel együtt fordulnak elő és öröklődnek tovább az utódokba. Ez a haplotípus a HLA-C\*04:01 allélt is gyakran hordozza. Közel 100-szor nagyobb annak a valószínűsége, hogy a C\*04:01 allél fordul elő, mint hogy attól eltérő allél van jelen.

Ezeket az adatokat alapul véve először megállapítottuk, hogy a C\*04 allélcsoport jelen van-e a vizsgált személyekben. Ennek érdekében, egyrészt elvégeztük a HLA-C lókusztípizálását azoknál a betegeknél, akik hordozták a HLA-A\*02, B\*44, DRB1\*07 allélkombinációt és rendelkezésre állt a DNS-minta. A HLA-A\*23, B\*44, DRB1\*07 allélkombinációt hordozók esetében, azonban a HLA-C lókusztípizálását elhagytuk, mivel a fentiek alapján elhanyagolható az esélye annak, hogy ebben az allélkombinációban más HLA-C allélcsoport legyen, mint C\*04.

Az 1953 csontvelő donor (1-es csoport) körében végzett vizsgálatok alapján 13 fő (0,66%) hordozott HLA-A\*02, B\*44, C\*04, DRB1\*07 allélkombinációt, valamint 32 fő (1,64%) hordozott HLA-A\*23, B\*44, DRB1\*07 allélkombinációt. Ebben a csoportban nem vizsgáltuk a családtagokat, ezért a haplotípusokat nem tudtuk meghatározni. A HSCT előtt álló betegek esetében (2-es csoport) hasonló eredményeket kaptunk. A HLA-A\*02, B\*44, C\*04, DRB1\*07 allélkombinációt 0,84% (6/717) hordozta, a HLA-A\*23, B\*44, DRB1\*07 allélkombinációt pedig 2,37% (17/717). Ebben a csoportban néhány beteg esetében a rutindiagnosztikai családvizsgálat során a szülőket is vizsgáltuk, így kilenc esetben meg tudtuk erősíteni, hogy a vizsgált allélkombinációk valós haplotípust alkottak. (A szülőket ebbe a tanulmányba nem vettük bele.) A klinikailag változatos csoport (3a+3b) esetében a betegek 0,53%-ában (25/4575) mutattunk ki HLA-A\*02, B\*44, C\*04, DRB1\*07 allélkombinációt, továbbá 1,39%-uk (65/4675) hordozza együttesen a HLA-A\*23, B\*44, DRB1\*07 allélcsoportokat. A családvizsgálatok alapján ebben a csoportban 17 betegben sikerült bizonyítani, hogy a fenti allélkombinációk valós haplotípust alkotnak, a többi esetben nem tudtuk a haplotípusokat meghatározni. A HLA-haplotípus adatbázisokban lévő frekvencia adatok alapján az összes detektált allélkombináció nagy valószínűséggel haplotípusnak feleltethető meg. (allelefreqencies.net; bethematchclinical.org)



## 4.2 A HLA-A, -B és –DRB1 allélcsoport gyakoriság vizsgálatok a magyarországi populációkban

### 4.2.1 A Hardy-Weinberg egyensúly ellenőrzése

A HLA-A, -B és –DRB1 allélcsoport frekvencia értékek meghatározásához vizsgált két magyarországi populációban a genotípus eloszlás mindhárom vizsgált lókuszt esetén Hardy-Weinberg egyensúlyban van. Így a vizsgált populációkban véletlenszerű párosodási rendszer valósul meg. Az egyensúlytól való eltérés egyik esetben sem szignifikáns, (a  $p$  értékek a 8. táblázatban találhatók), ebből következik, hogy a vizsgált csoportokban mért frekvencia adatok jól reprezentálják a magyar populációban és a magyarországi cigány populációban jelenlévő allélgyakoriságokat, ezért a kapott értékek felhasználhatók a két populáció egymással, illetve más populációkkal történő összehasonlításához. (Riccio, 2013)

8. táblázat: A Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálat  $p$  értékei

	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1
HUN	0,54	0,07	1,00
HUN-GYP	0,87	0,82	0,59

A két vizsgált magyarországi csoportban (HUN: magyar populáció, HUN-GYP: magyar roma csoport) a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés egyik lókusznál sem volt szignifikáns.

### 4.2.2 Allélcsoport gyakoriságok

DNS-alapú módszerekkel meghatározott kifelbontású HLA-A, -B, -DRB1 adatokat retrospektíven elemeztünk egy magyar önkéntes összejt donorokból álló reprezentatív csoportban ( $n=2402$ , a továbbiakban „HUN” csoportként hivatkozunk rá). Továbbá egy magyar cigány önkéntes összejt donorokból álló csoportban kapott HLA adatokat vizsgáltunk ( $n=186$ , a továbbiakban „HUN-GYP” csoportként hivatkozunk rá). Az allélcsoport frekvencia adatok a 9. táblázatban találhatók.

A HLA-A lókuszt vizsgálatánál a húsz különböző allélcsoport közül valamennyit azonosítottunk a HUN csoportban, és mindössze 15 allélcsoportot a HUN-GYP csoportban. Mindkét mintában az A\*02 allélcsoport mutatta a legnagyobb frekvenciát (HUN: 29,2% és HUN-GYP: 30,4%), a második leggyakoribb allélcsoport az A\*01 lett (15,2% és 27,4%), azonban a HUN-GYP csoportban szignifikánsan nagyobb volt ez az

érték ( $p < 0.0001$ ). A HUN populációban a harmadik legnagyobb gyakorisági értéket az A\*03 mutatta (11,8%), viszont a HUN-GYP csoportban ez az érték szignifikánsan kisebbnek bizonyult (3,5%) ( $p < 0.0001$ ). Másrészt, az A\*11 allélcsoport 18,8%-ban volt jelen és ezzel az értékkel a harmadik leggyakoribb allélcsoport a HUN-GYP mintában. A HUN csoportban ezzel szemben az A\*11 szignifikánsan ritkábban volt jelen (6,0%) ( $p < 0.0001$ ). A negyedik legnagyobb frekvenciát mindkét csoportban az A\*24 mutatta (8,9% és 7%). A HUN populációban még egy olyan allélcsoport volt, amelynek a frekvenciája meghaladta az 5%-ot, az A\*26 (5,3%-ban volt jelen), viszont a HUN-GYP csoportban a többi allélcsoport gyakorisága nem érte el az 5%-os értéket. A HUN csoportban a legkisebb frekvencia értékeket (<1%) a következő allélcsoportok mutatták: A\*31, A\*36, A\*23, A\*25, A\*34 és A\*66. Öt olyan allélcsoport volt, amelyeket a HUN populációban detektáltak, de a HUN-GYP csoportban egyáltalán nem volt kimutatható (A\*29, A\*30, A\*69, A\*74, A\*80).

A HLA-B lókuszt esetében tapasztaltuk a legnagyobb diverzitást mindkét csoportban. A HUN csoportban 28 db, a HUN-GYP mintában 26 db allélcsoportot detektáltunk. A HUN populációban a legnagyobb mértékben reprezentált allélcsoportok a következők voltak: B\*44 (12,2%), B\*35 (11,3%), B\*08 (10,3%), B\*18 (9,6%), B\*07 (8,1%) és B\*51 (6,8%). Ezzel szemben a HUN-GYP csoportban csak a B\*35 frekvenciája (11,6%) volt összemérhető ezekkel az értékekkel, a B\*44 (5,6%) és B\*08 (6,5%) allélcsoport gyakoriság értékek szignifikánsan kisebbek voltak, mint a HUN csoportban kapott értékek ( $p = 0.0003$ ;  $p = 0.024$ ). Továbbá, a B\*18, B\*07 és B\*51 frekvenciája az 5%-ot sem érte el. A HUN-GYP mintában a leggyakoribb allélcsoportok a következők voltak: B\*52 (14,2%), B\*40 (13,4%), B\*35 (11,6%), B\*57 (7,0%), B\*08 (6,5%) és B\*27 (6,2%). A HUN-GYP csoportban azonosított két leggyakoribb allélcsoport a HUN populációban szignifikánsan kisebb értéket mutatott (2,0% és 4,4%;  $p < 0,0001$ ). A legkevésbé gyakori (<1%) allélcsoportok a HUN mintában a következők voltak: B\*58, B\*56, B\*45, B\*53, B\*47, B\*48, B\*78 és B\*73. Néhány ezek közül a HUN-GYP csoportban is 1%-nál kisebb frekvencia értéket mutatott, viszont a B\*54 allélcsoportot kizárólag a HUN-GYP populációban detektáltuk. A HLA adatbázisban hivatalosan nyilvántartott allélcsoportok közül a B\*42 és B\*46 nem volt kimutatható egyik vizsgált csoportban sem. (Robinson J, 2015)

A tizenhárom HLA-DRB1 allélcsoport közül mindegyiket azonosítottunk a HUN populációban. Az első hat leggyakoribb csoport a DRB1\*11 (15,4%), DRB1\*03 (12,4%), DRB1\*13 (12,2%), DRB1\*07 (11,4%), DRB1\*04 (11,0%) és DRB1\*15

(10,6%). Ezeket az eredményeket összehasonlítva a HUN-GYP csoportban kapott értékekkel (ahol összesen 11 különböző allélcsoportot azonosítottunk), azt találtuk, hogy a DRB1\*13 frekvenciája szignifikánsan kisebb volt az utóbbi csoportban (6,2%;  $p < 0,001$ ). A HUN-GYP mintában a DRB1\*15 (17,7%) mutatta a legnagyobb frekvencia értéket, ezt követte a DRB1\*03 (16,9%) és DRB1\*14 (13,5%). A DRB1\*15 és a DRB1\*14 ehhez képest szignifikánsan kisebb mértékben fordult elő a HUN mintában (10,6% ( $p < 0,001$ ) és 5,1% ( $p < 0,001$ ). Mindkét populációban ugyanannak a két allélcsoportnak (DRB1\*10, DRB1\*09) a frekvenciája nem érte el az 1%-ot, továbbá a HUN-GYP csoportban nem azonosítottunk DRB1\*08 és DRB1\*12 allélcsoportot.

Itt fontos megemlíteni, hogy az allélcsoport frekvencia értékek között megállapított szignifikáns különbségek, a többszörös tesztelés miatt végzett Bonferroni korrekciós számításokat követően is szignifikánsak maradtak, kivéve a B\*08 esetén.

A magyar populáció és a magyar roma populáció allélcsoport frekvencia értékeit feltöltöttük a [www.hla-net.eu](http://www.hla-net.eu) oldalra, ezáltal Magyarország felkerült Európa HLA térképére.

**9. Táblázat: Allélcsoport frekvencia adatok a magyar populációban (HUN) és a magyar roma (HUN GYP) populációban a HLA-A, -B és -DRB1 lókuszok tekintetében**

HLA-A			HLA-B			HLA-DRB1		
allél- csoport	HUN	HUN- GYP	allél- csoport	HUN	HUN- GYP	allél- csoport	HUN	HUN- GYP
	(n=1644)	(n=186)		(n=1653)	(n=186)		(n=2402)	(n=186)
	AF (%)	AF (%)		AF (%)	AF (%)		AF (%)	AF (%)
A*02	29,2	<b>30,4</b>	B*44	12,2	5,6	DRB1*11	15,4	11,5
A*01	15,2	<b>27,4</b>	B*35	11,3	<b>11,6</b>	DRB1*03	12,4	<b>16,9</b>
A*03	11,8	3,5	B*08	10,3	6,5	DRB1*13	12,2	6,2
A*24	8,9	7,0	B*18	9,6	3,5	DRB1*07	11,4	11,5
A*11	6,0	<b>18,8</b>	B*07	8,1	1,9	DRB1*04	11,0	7,7
A*26	5,3	3,0	B*51	6,8	3,8	DRB1*15	10,6	<b>17,7</b>
A*68	4,2	1,1	B*15	4,7	3,8	DRB1*01	8,5	4,2
A*25	4,0	0,5	B*27	4,7	6,2	DRB1*16	7,4	9,6
A*32	3,6	4,6	B*40	4,4	<b>13,4</b>	DRB1*14	5,1	<b>13,5</b>
A*23	3,0	0,5	B*38	4,1	4,6	DRB1*08	2,5	0,0
A*30	2,8	0,0	B*13	4,0	0,27	DRB1*12	2,0	0,0
A*29	1,9	0,0	B*14	3,0	1,6	DRB1*10	0,9	0,38
A*33	1,5	1,1	B*57	2,5	7,0	DRB1*09	0,58	0,77
A*31	1,4	0,8	B*39	2,2	1,1			
A*66	0,85	0,3	B*52	2,0	<b>14,2</b>			
A*74	0,15	0,0	B*41	1,9	3,0			

allél- csoport	HUN (n=1644)	HUN- GYP (n=186)	allél- csoport	HUN (n=1653)	HUN- GYP (n=186)	allél- csoport	HUN (n=2402)	HUN- GYP (n=186)
	AF (%)	AF (%)		AF (%)	AF (%)		AF (%)	AF (%)
A*69	0,12	0,0	B*49	1,7	1,3			
A*34	0,09	0,3	B*55	1,2	3,2			
A*36	0,06	0,8	B*50	1,1	0,54			
A*80	0,03	0,0	B*37	1,1	0,0			
			B*58	0,88	3,5			
			B*56	0,67	1,3			
			B*45	0,57	0,27			
			B*53	0,36	0,0			
			B*47	0,33	0,27			
			B*48	0,15	0,54			
			B*78	0,09	0,54			
			B*73	0,06	0,0			
			B*54	0,0	0,54			
k	20	15	k	28	26	k	13	11
H	0,856	0,788	H	0,928	0,922	H	0,893	0,874

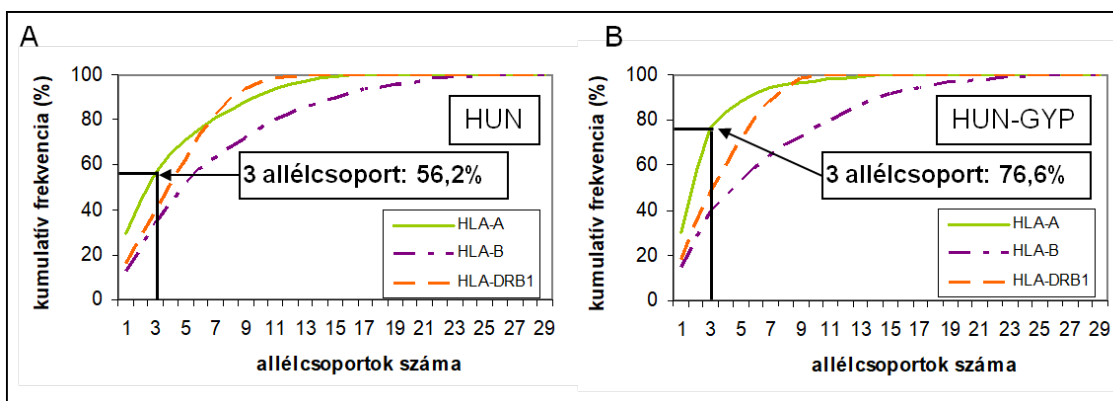
n=vizsgált személyek száma; AF=allélcsoport frekvencia; k=azonosított allélcsoportok száma; H=becsült heterozigótaság; Az allélcsoportok a HUN csoportban detektált frekvencia értékek szerint vannak csökkenő sorba rendezve. A HUN-GYP csoportban kapott három leggyakoribb AF érték félkövér betűtípussal van kiemelve mindhárom HLA lókuszbán.

#### 4.2.3 Kumulatív allélcsoport frekvencia értékek és géndiverzitás

A HLA-A, -B, -DRB1 lókusznál számított kumulatív allélcsoport frekvencia értékek grafikus reprezentációja a 13. ábrán látható. A HUN populáció (13. ábra/A) esetén a legnagyobb diverzitást és a legegyszerűsebb emelkedést a HLA-B lókusznál mutattunk ki, míg a HLA-A és -DRB1 lókusznál kisebb diverzitás volt megfigyelhető. Ehhez hasonló eredményeket kaptunk a HUN-GYP (13. ábra/B) minta esetén, kivéve a HLA-A lókusznál, ahol sokkal meredekebb görbét kaptunk, mint a HUN csoportban. A három leggyakoribb allélcsoportokhoz tartozó kumulatív frekvencia érték a HUN csoportban 56,2%, ehhez viszonyítva szignifikánsan magasabb volt a HUN-GYP csoportban detektált érték (76,6%). A többi lókusznál a különbség nem szignifikáns (HLA-B: 39,2% vs. 33,7%; HLA-DRB1: 48,1% vs. 40,0%).

A becsült heterozigótasági értékek (H) mindkét populációban magasak voltak (HUN: HLA-A (0,86) HLA-B (0,93) és HLA-DRB1 (0,89) és HUN-GYP HLA-A (0,79) HLA-B 0,92 és HLA-DRB1 (0,87) (10. táblázat)), chi-négyzet próbával páronként összehasonlítva az eredményeket, a HLA-A lókusznál kaptunk szignifikáns különbséget

a HUN-GYP csoportban szignifikánsan kisebb értéket detektáltunk a HUN csoporthoz képest (0,79 vs 0,86).



**13. ábra: A kumulatív allélcsoport frekvencia értékek grafikus ábrázolása** A kumulatív allélcsoport gyakoriságokat ábrázoltuk az allélcsoportok számának a függvényében a magyar populációban (HUN) és a magyar roma populációban (HUN-GYP). Fontos paraméter, hogy hányadik allélcsoportnál éri el az összesített gyakoriság a 100%-ot, illetve a görbe meredeksége ad információt a vizsgált csoportokban jelen lévő diverzitás mértékéről.

**10. táblázat: A becsült heterozigótasági értékek a magyar (HUN) és a magyar roma (HUN-GYP) populációban a HLA-A, -B, -DRB1 tekintetében**

	HUN	HUN-GYP
HLA-A	0,86	0,79
HLA-B	0,93	0,92
HLA-DRB1	0,89	0,87

Mindkét populációban a HLA-B lókuszt mutatja legnagyobb heterozigótasági értéket. A két csoportot egymáshoz hasonlítva a HLA-A lókuszt esetében kaptunk szignifikáns különbséget.

### 4.3 A magyarországi populációk összehasonlítása nemzetközi adatokkal

#### 4.3.1 F-statisztika

A két hazai csoport és az Ausztriát (AUS), Horvátországot (CRO), Csehországot (CZE), Romániát (ROM) és Szerbiát (SER) reprezentáló csoportok, valamint az Észak-Gudzsarát (IND) és Andalúziai Cigány (SPA-GYP) populáció között jelenlévő genetikai kapcsolatok meghatározására F-statisztikai analízist használtunk, amely az allélcsoport frekvenciákat veszi alapul. A vizsgált csoportokat páronként és a HLA-A, -

B és -DRB1 lókuszokra külön-külön hasonlítottuk össze az Arlequin program segítségével. A vizsgált csoportokban detektált allélcsoport gyakoriság értékeket a 11. táblázatban gyűjtöttük össze.

Az  $F_{ST}$  értékek és a hozzájuk tartozó  $p$  értékek a 12. táblázatban találhatóak. A HLA-A lókusz vizsgálata során detektáltuk a legtöbb genetikai kapcsolatot. Magyarország és Ausztria ( $p > 0,05$ ), illetve Magyarország és Csehország ( $p > 0,05$ ) között egyértelmű kapcsolat figyelhető meg, továbbá Ausztria Csehországgal ( $p > 0,05$ ), Horvátországgal ( $p > 0,05$ ) és Szerbiával ( $p > 0,05$ ) is rokonságot mutat. Románia minden vizsgált csoporttól szignifikánsan különbözik és a roma eredetű populációk sem mutatnak rokonságot sem egymással, sem az európai csoportokkal. A fent említett eredményektől eltérően a HLA-B lókuszt analizálva Magyarország és Ausztria, illetve Magyarország és Csehország között nem látható genetikai kapcsolat, Ausztria egyedül Csehországgal mutat rokonságot ( $p > 0,05$ ). Ehhez hasonlóan Ausztria és Csehország a HLA-DRB1 lókuszban sem mutatott szignifikáns különbséget. Szintén a HLA-B és -DRB1 lókuszt vizsgálva a magyarországi cigány populáció az andalúziai cigány csoporttal genetikai rokonságot mutat ( $p > 0,05$ ), viszont Észak-Gudzsaráttól szignifikánsan különbözik mindhárom vizsgált HLA lókuszban.

**11. táblázat: A kilenc populációban detektált allélcsoport frekvencia (AF) és becsült heterozigótásági értékek (H) a HLA-A, -B, és -DB1 lókuszekben (A populációkhoz tartozó referenciákat lásd a 3. táblázatban.)**

HLA-A allele group	HUN-GYP N=186	HUN N=1644	CRO N=4000	AUS N=200	ROM N=6936	SER N=1992	IND N=338	CZE N=310	SPA-GYP N=99
A*01	0.2742	0.1521	0.1246	0.1450	0.1200	0.1426	0.1923	0.1558	0.2790
A*02	0.3038	0.2923	0.3024	0.3120	0.2600	0.2947	0.2101	0.2876	0.1620
A*03	0.0349	0.1180	0.1242	0.1520	0.0900	0.1132	0.0740	0.1608	0.0190
A*11	0.1882	0.0596	0.0691	0.0320	0.0800	0.0612	0.1257	0.0403	0.1690
A*23	0.0054	0.0298	0.0250	0.0220	0.0300	0.0223	0.0133	0.0401	0.0060
A*24	0.0699	0.0888	0.1139	0.1050	0.1200	0.1109	0.1420	0.0948	0.1040
A*25	0.0054	0.0401	0.0314	0.0220	0.0300	0.0264	0.0015	0.0287	0.0060
A*26	0.0296	0.0526	0.0481	0.0420	0.0500	0.0602	0.0473	0.0352	0.0390
A*29	0.0000	0.0189	0.0091	0.0200	0.0200	0.0073	0.0281	0.0210	0.0260
A*30	0.0000	0.0280	0.0171	0.0380	0.0200	0.0211	0.0148	0.0274	0.0260
A*31	0.0081	0.0143	0.0231	0.0200	0.0200	0.0193	0.0163	0.0194	0.0000
A*32	0.0457	0.0356	0.0393	0.0280	0.0400	0.0477	0.0385	0.0306	0.0260
A*33	0.0108	0.0146	0.0205	0.0100	0.0300	0.0254	0.0651	0.0113	0.0450
A*34	0.0027	0.0009	0.0004	0.0080	0.0000	0.0000	0.0000	0.0016	0.0000
A*36	0.0081	0.0006	0.0001	0.0000	0.0400	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
A*66	0.0027	0.0085	0.0039	0.0020	0.0000	0.0038	0.0000	0.0065	0.0580
A*68	0.0108	0.0423	0.0461	0.0420	0.0300	0.0422	0.0296	0.0355	0.0120
A*69	0.0000	0.0012	0.0009	0.0000	0.0000	0.0018	0.0014	0.0000	0.0000
A*74	0.0000	0.0015	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
A*80	0.0000	0.0003	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
blank	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0200	0.0000	0.0000	0.0034	0.0230
H	0.788	0.856	0.851	0.839	0.878	0.854	0.867	0.849	0.846

HLA-B allele group	HUN-GYP N=186	HUN N=1653	CRO N=4000	AUS N=200	ROM N=6936	SER N=1992	IND N=338	CZE N=310	SPA-GYP N=99
B*07	0.0188	0.0808	0.0709	0.1290	0.0500	0.0497	0.0459	0.1161	0.0250
B*08	0.0645	0.1028	0.0778	0.1100	0.0600	0.0863	0.0444	0.0903	0.0810
B*13	0.0027	0.0399	0.0377	0.0550	0.0300	0.0329	0.0237	0.0500	0.0050
B*14	0.0161	0.0302	0.0247	0.0280	0.0200	0.0316	0.0030	0.0226	0.0350
B*15	0.0376	0.0472	0.0481	0.0650	0.0300	0.0366	0.1139	0.0742	0.0500
B*18	0.0349	0.0959	0.0818	0.0520	0.1000	0.0989	0.0444	0.0645	0.0350
B*27	0.0618	0.0472	0.0621	0.0480	0.0400	0.0500	0.0252	0.0323	0.0400
B*35	0.1156	0.1125	0.1391	0.1150	0.1400	0.1313	0.1243	0.0855	0.1160
B*37	0.0000	0.0106	0.0094	0.0100	0.0000	0.0133	0.0340	0.0161	0.0050
B*38	0.0457	0.0408	0.0439	0.0220	0.0300	0.0562	0.0044	0.0242	0.0100
B*39	0.0108	0.0224	0.0309	0.0080	0.0300	0.0314	0.0030	0.0161	0.0300
B*40	0.1344	0.0445	0.0377	0.0500	0.0500	0.0361	0.1036	0.0613	0.0860
B*41	0.0296	0.0191	0.0085	0.0150	0.0200	0.0133	0.0030	0.0113	0.0200
B*42	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000
B*44	0.0565	0.1216	0.0930	0.1200	0.0800	0.0916	0.0681	0.1403	0.0810
B*45	0.0027	0.0057	0.0019	0.0050	0.0000	0.0010	0.0030	0.0032	0.0200
B*46	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0030	0.0000	0.0000
B*47	0.0027	0.0033	0.0014	0.0020	0.0000	0.0050	0.0044	0.0032	0.0000
B*48	0.0054	0.0015	0.0014	0.0000	0.0000	0.0010	0.0089	0.0016	0.0000
B*49	0.0134	0.0166	0.0193	0.0080	0.0200	0.0294	0.0104	0.0258	0.0350
B*50	0.0054	0.0112	0.0147	0.0180	0.0200	0.0113	0.0207	0.0145	0.0250
B*51	0.0376	0.0684	0.1136	0.0520	0.0900	0.1285	0.1124	0.0548	0.0760
B*52	0.1425	0.0197	0.0146	0.0150	0.0400	0.0118	0.0710	0.0129	0.1010
B*53	0.0000	0.0036	0.0068	0.0080	0.0200	0.0023	0.0015	0.0016	0.0050
B*54	0.0054	0.0000	0.0003	0.0050	0.0000	0.0003	0.0000	0.0000	0.0000
B*55	0.0323	0.0121	0.0125	0.0120	0.0200	0.0113	0.0192	0.0129	0.0350
B*56	0.0134	0.0067	0.0099	0.0080	0.0100	0.0113	0.0044	0.0081	0.0050
B*57	0.0699	0.0254	0.0266	0.0300	0.0100	0.0188	0.0607	0.0484	0.0710
B*58	0.0349	0.0088	0.0105	0.0080	0.0200	0.0085	0.0385	0.0081	0.0000
B*73	0.0000	0.0006	0.0009	0.0020	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B*78	0.0054	0.0009	0.0000	0.0000	0.0300	0.0000	0.0000	0.0000	0.0050
blank	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0400	0.0000	0.0000	0.0000	0.0030
H	0.922	0.928	0.927	0.923	0.935	0.925	0.924	0.926	0.933

HLA-DRB1 allele group	HUN-GYP N=186	HUN N=2402	CRO N=4000	AUS N=200	ROM N=6936	SER N=1992	IND N=338	CZE N=310	SPA-GYP N=99
DR*01	0.0423	0.0849	0.1130	0.1380	0.0800	0.1029	0.0165	0.1048	0.0610
DR*03	0.1692	0.1245	0.1001	0.1180	0.1100	0.1087	0.1592	0.0790	0.1790
DR*04	0.0769	0.1097	0.0958	0.0950	0.0900	0.0899	0.0856	0.1145	0.0870
DR*07	0.1154	0.1145	0.0978	0.1320	0.0700	0.0713	0.1036	0.1758	0.1070
DR*08	0.0000	0.0248	0.0343	0.0250	0.0200	0.0309	0.0195	0.0290	0.0050
DR*09	0.0077	0.0058	0.0026	0.0080	0.0000	0.0038	0.0075	0.0081	0.0000
DR*10	0.0038	0.0090	0.0104	0.0020	0.0100	0.0110	0.0541	0.0112	0.0460
DR*11	0.1154	0.1542	0.1668	0.1430	0.1900	0.1689	0.1021	0.1548	0.0870
DR*12	0.0000	0.0204	0.0154	0.0120	0.0200	0.0191	0.0390	0.0128	0.0050
DR*13	0.0615	0.1216	0.1205	0.1420	0.1500	0.1323	0.1246	0.1193	0.0360
DR*14	0.1346	0.0506	0.0388	0.0250	0.0700	0.0542	0.0931	0.0242	0.1880
DR*15	0.1769	0.1062	0.1002	0.1320	0.0900	0.0984	0.1847	0.1274	0.1430
DR*16	0.0962	0.0739	0.1043	0.0280	0.1000	0.1087	0.0105	0.0387	0.0560
blank	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0000
H	0.874	0.893	0.892	0.880	0.886	0.893	0.883	0.881	0.875

Rövidítések: HUN-GYP: magyar roma; HUN: Magyaro; CRO: Horvátó; AUS: Ausztria; ROM: Románia, SER: Szerbia; IND: India; CZE: Cseho; SPA-GYP: spanyol roma; N: elemszám; H: becsült heterozigótáság

12. Táblázat Az  $F_{ST}$  értékek (átló alatt) és a hozzájuk tartozó  $p$  értékek (átló felett) a HLA-A (A), HLA-B (B) és HLA-DRB1 (C) lókuszokra. Az F-statisztikát, amely az allélcsoport gyakoriság értékek veszi alapul, a populációk páronkénti összehasonlításához használtuk. A nem szignifikáns  $p$  értékek ( $p > 0,05$ ), amelyek adott populációk közötti genetikai kapcsolatot jelentenek, piros színnel vannak kiemelve. A többi  $p$  érték fekete színnel van szedve.

(A)

$F_{ST}/p$ értékek	HUN- GYP	HUN	CRO	AUS	ROM	SER	CZE	SPA- GYP	IND
HUN-GYP	*	0	0	0	0	0	0	0,00208	0
HUN	0,02357	*	0,0001	<b>0,17226</b>	0	0,00604	<b>0,07583</b>	0	0
CRO	0,02725	0,00102	*	<b>0,10623</b>	0	0,0103	0,00505	0	0
AUS	0,03312	0,00056	0,00085	*	0	<b>0,08712</b>	<b>0,8809</b>	0	0
ROM	0,02519	0,00374	0,00315	0,00603	*	0	0	0	0
SER	0,02439	0,00055	0,00034	0,00106	0,00285	*	0,00554	0	0
CZE	0,03108	0,00078	0,00191	-0,00109	0,00599	0,00197	*	0	0
SPA-GYP	0,01359	0,0323	0,0379	0,04344	0,02791	0,03324	0,03844	*	0,00089
IND	0,0161	0,01199	0,01273	0,01714	0,0077	0,01041	0,01518	0,00873	*

(B)

$F_{ST}/p$ értékek	HUN- GYP	HUN	CRO	AUS	ROM	SER	CZE	SPA- GYP	IND
HUN-GYP	*	0	0	0	0	0	0	<b>0,06029</b>	0
HUN	0,02116	*	0	0,00594	0	0	0,001	0	0
CRO	0,02179	0,00252	*	0	0	0	0	0	0
AUS	0,02393	0,00182	0,00548	*	0	0	<b>0,55747</b>	0	0
ROM	0,01738	0,00531	0,00367	0,01014	*	0	0	0	0
SER	0,0241	0,00351	0,00082	0,00934	0,00404	*	0	0	0
CZE	0,02365	0,00235	0,00695	-0,00022	0,01124	0,01001	*	0	0
SPA-GYP	0,00248	0,00964	0,0094	0,01209	0,00791	0,01103	0,01131	*	0,00297
IND	0,01139	0,01463	0,01151	0,01482	0,01218	0,01431	0,01328	0,00486	*

(C)

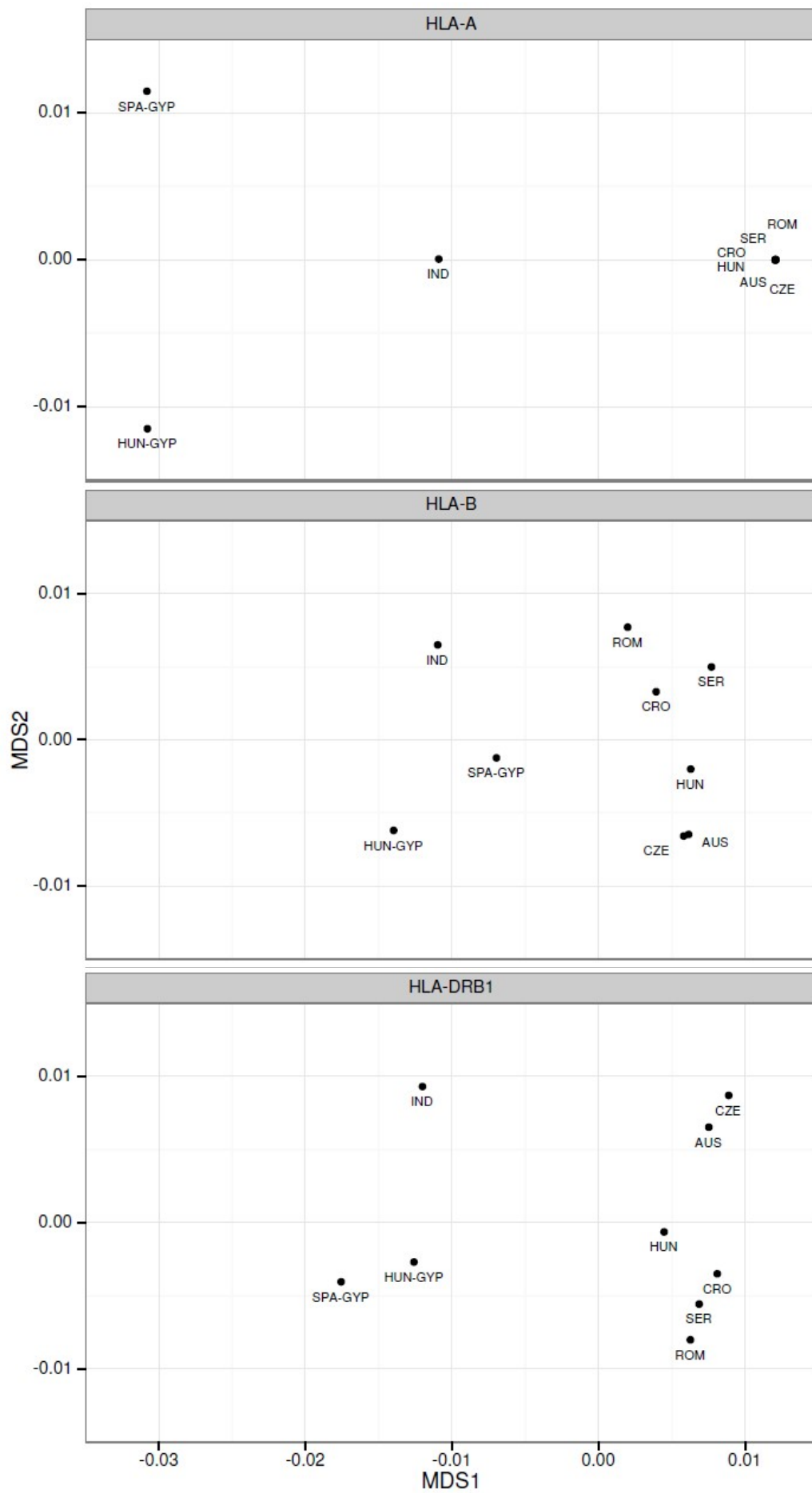
$F_{ST}/p$ értékek	HUN- GYP	HUN	CRO	AUS	ROM	SER	CZE	SPA- GYP	IND
HUN-GYP	*	0	0	0	0	0	0	<b>0,17672</b>	0
HUN	0,01154	*	0	0,00119	0	0	0	0	0
CRO	0,01677	0,00165	*	0	0	0,0002	0	0	0
AUS	0,01913	0,00285	0,00454	*	0	0	<b>0,1287</b>	0	0
ROM	0,01698	0,00328	0,00256	0,00929	*	0	0	0	0
SER	0,01582	0,00229	0,00056	0,00678	0,00086	*	0	0	0
CZE	0,02057	0,00396	0,00605	0,00119	0,012	0,0099	*	0	0
SPA-GYP	0,00171	0,0187	0,02557	0,02662	0,02539	0,02415	0,02893	*	0,0002
IND	0,00851	0,01236	0,02061	0,01505	0,0192	0,0194	0,01779	0,0107	*

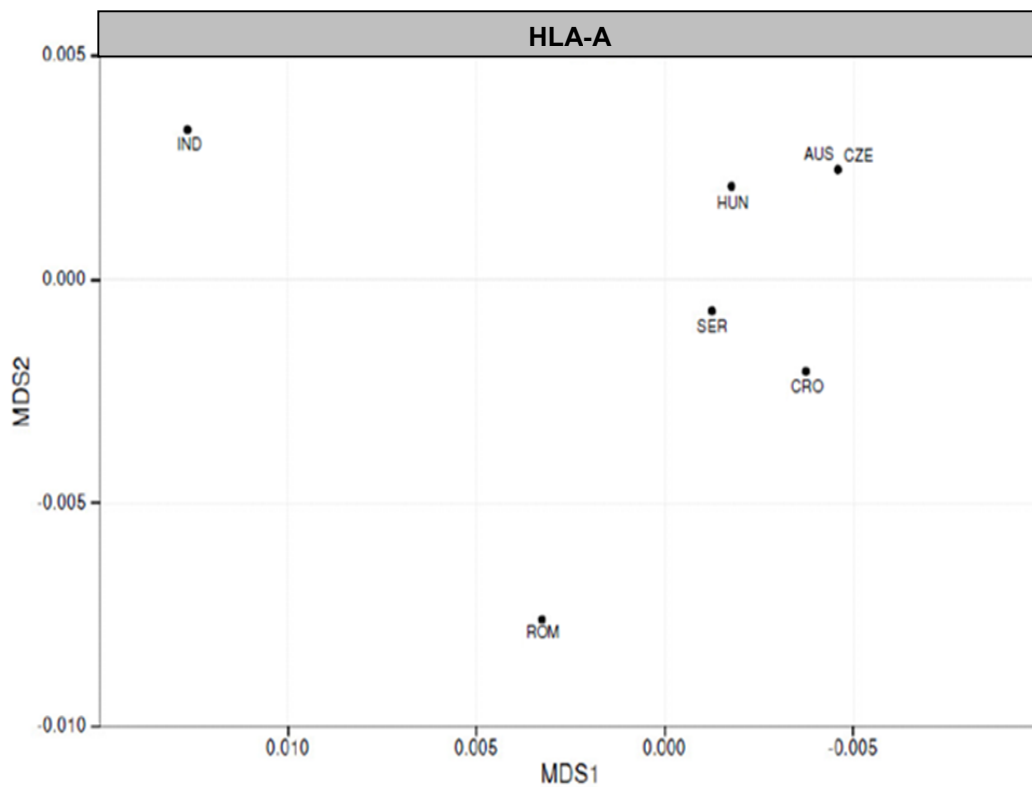
#### 4.3.2 Nem-metrikus sokdimenziós skálázás

Az F-statisztikával összehasonlított csoportokat tovább vizsgáltuk a nem-metrikus sokdimenziós skálázás módszerének segítségével és lókuszonként ábrázoltuk őket. (14. ábra) Az összes s-stress-érték kiválóan bizonyult (HLA-A:  $6,4 \times 10^{-9}$ ; HLA-B: 0,004;



HLA-DRB1: 0,00001). A továbbiakban a sokdimenziós skálázás első dimenzióját MDS1-nek jelöljük, a második dimenziót pedig MDS2-nek. Mindhárom lókusznál egy kifejezett tagolódás figyelhető meg az 1. tengely (MDS1) mentén. A hat nem-roma eredetű európai populáció az egyik oldalon csoportosul, miközben a két cigány és az indiai eredetű csoport a másik oldalon. Bizonyos különbségekkel további genetikai elkülönülés figyelhető meg az utóbbi három populációt vizsgálva az 1. és/vagy a 2. tengely (MDS2) mentén a három lókusznál. A HLA-B lókuszt alapján a két cigány populáció (HUN-GYP és SPA-GYP) rokonságot mutat egymással, az indiai csoporttól viszont távol helyezkedik el, ez a kapcsolat még kifejezettebb a HLA-DRB1 lókuszt esetén és még inkább elkülönülnek az IND populációtól. Ezzel szemben a HLA-A lókusznál a 2. tengely mentén kifejezetten távol helyezkednek el egymástól. A HLA-B és -DRB1 lókusztokat vizsgálva az európai populációk elhelyezkedése is hasonló egymáshoz képest. Mindkét lókusznál a 2. tengely mentén a HUN populáció erősen központi pozíciót foglal el. Egyik oldalán a CZE és AUS helyezkedik el, ez a két csoport ráadásul nagyon közel van egymáshoz. A HUN csoport másik oldalán a CRO, SER és ROM populációk csoportosulnak. A HLA-A lókusznál olyan nagy a genetikai távolság a HUN-GYP és SPA-GYP csoport között, összehasonlítva a nem-cigány csoportok közötti távolsághoz képest, hogy a két cigány populáció különleges helyzete miatt az európai populációk egymásra vetülnek. Ezért a grafikus ábrázolást megismételtük a cigány populációk eltávolításával és így az európai populációk elhelyezkedésében hasonló eredményt kaptunk, mint a HLA-B és -DRB1 esetén.





**14. ábra: A genetikai távolságok ábrázolása a kilenc vizsgált populáció között nem-metrikus sok dimenziós skálázás (NMDS) módszerrel.** Az NMDS során az allélcsoport frekvenciákon alapuló Reynolds féle genetikai távolságokat adatredukciós eljárással ábrázoljuk. A vizsgált populációk kétdimenziós geometriai reprezentációját az R program segítségével készítettük el. A sokdimenziós skálázás első dimenzióját MDS1-nek jelöljük, a második dimenziót MDS2-nek. Két hasonló objektumot ebben a térben két egymáshoz közeli pont, két jelentősen különböző objektumot két távoli pont reprezentál.

## 5 Megbeszélés

Munkánk során meghatároztuk a HLA-C\*04:09N allél gyakoriságát reprezentatív magyar populációban. Összesen egy esetben tudtuk a C\*04:09N allélt kimutatni 7345 vizsgált személy közül, ez alapján az allélgyakoriság 0,0068%. Eddig három tanulmányban található adat a C\*04:09N allél frekvenciájával kapcsolatban. Pinto és mtsai kaukázusi származású amerikai személyeket vizsgálva azt tapasztalták, hogy a HLA-A\*23:01~B\*44:03~C\*04 haplotípussal rendelkező személyek 33%-a hordozta a C\*04:09N allélt. Az általuk vizsgált populációban a HLA-A\*23:01~C\*04:01 haplotípus gyakorisága 1,1% volt, a HLA-A\*23:01~B\*44:03 haplotípus pedig a vizsgált személyek 0,75%-ában fordult elő. Ezek alapján a C\*04:09N allél frekvenciáját 0,1%-0,25%-ra (2-5/2000) becsülték. (Pinto, 2003) Downing és mtsai 8412 wales-i önkéntes csontvelő donort vizsgálva 11 esetben azonosított C\*04:09N allélt, ez alapján az allélfrekvencia 0,065% volt. (Downing, 2002) Potok és mtsai 340 kromoszómát vizsgáltak, amelyek HLA-C\*04 hordozók voltak és három esetben mutatták ki a C\*04:09N allél jelenlétét (0,88%). A C\*04 allélcsoport frekvenciája 12,16% a kaukázusi származású amerikai populációban ([www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net)), e két adat alapján a C\*04:09N allélfrekvenciája 0,107%-ra becsülhető a vizsgált populációban. Chi-négyzet próbával hasonlítottuk össze a magyar populációban meghatározott értéket és a nemzetközi irodalomban talált adatokat. A magyar populációban kimutatott allélfrekvencia érték szignifikánsan kisebb volt mindhárom fent említett populációban talált értékekhez képest ( $p=0,043-0,0001$ ,  $p=0,018$  és  $p=0,001$ ). Ugyanezen a vizsgált anyagon meghatároztuk a becsült haplotípus frekvencia értékeket a HLA-A\*02~B\*44~C\*04~DRB1\*07 és a HLA-A\*23~B\*44~DRB1\*07 haplotípusok esetében. Az előbbi haplotípus esetében az 1, 2 és 3a csoportokban 33 kromoszómát találtunk a 9816-ból, ahol előfordult az A\*02~B\*44~C\*04~DRB1\*07 allélkombináció, így a becsült haplotípus gyakoriság 0,336%. (A 3b csoportot ennél a kérdésfeltevésnél kizártuk, mivel tárolt DNS minta nem állt rendelkezésre a HLA-C lókuszt meghatározásához.) A HLA-A\*23~B\*44~DRB1\*07 allélkombinációt 114 vizsgált személyben azonosítottuk a teljes beteganyagban. A szakirodalom szerint ezek az allélcsoportok nagy valószínűséggel haplotípusban fordulnak elő, ezért a becsült haplotípus gyakoriság 0,78% (114/14690). A kapott értékek összhangban vannak a nemzetközi HLA adatbázisban ([www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net)) talált adatokkal. Kaukázusi eredetű, 1000 elemszámot meghaladó populációkban az A\*02~B\*44~C\*04~DRB1\*07

haplotípus gyakorisága 0,03%-1,22% között volt, az A\*23~B\*44~DRB1\*07 haplotípusé pedig 0,32%-1,29% közötti értéket mutatott. Felhasználva a HSCT recipiensek (2-es, 3-as csoport) vizsgálatba be nem választott szüleinek HLA adatait, 20 esetben sikerült megerősíteni, hogy a HLA-A\*23, B\*44, C\*04, DRB1\*07 allélkombináció valós haplotípus. A [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net) adatai alapján azt feltételezzük, hogy az általunk azonosított valós haplotípusok a következő alléleket hordozzák: A\*23:01, B\*44:03, DRB\*07:01. Pinto és mtsai tanulmányában azonosított A\*23:01~B\*44:03~DRB\*07:01~DQB1\*02 haplotípusok egyharmada volt pozitív a C\*04:09N allélre. Ezzel szemben a magyar csoportban, abban a 20 esetben, ahol a HLA-A\*23, B\*44, C\*04, DRB1\*07 allélkombináció fordult elő egyetlen C\*04:09N allélt sem tudtunk azonosítani ( $p=0,0086$ ). A vizsgált mintánkban egyedüli C\*04:09N allél, amelyet sikerült azonosítanunk éppen az A\*02, B\*44, DRB1\*07 allélkombinációban fordult elő.

Továbbá, egy Magyarországot jól reprezentáló önkéntes vérvételező össejt donor csoportot és Magyarország legnagyobb etnikai kisebbségét, a roma közösséget reprezentáló cigány össejt donorkat vizsgáltunk a HLA allélcsoportok diverzitása szempontjából. Elsőként határoztunk meg DNS-alapú HLA allélcsoport frekvencia értékeket és a két csoport összehasonlítása alapján, számos allélcsoport szignifikánsan gyakrabban fordult elő a magyarországi cigány populációban, a magyar populációhoz képest (pl.: A\*01; A\*11; B\*40; B\*52; DRB1\*14 és DRB1\*15). Más allélcsoportok gyakorisága viszont szignifikánsan alacsonyabb volt (pl.: A\*03; B\*07; B\*18; B\*44 és DRB1\*13) a magyar roma csoportban. Ezek az eredmények sok szempontból összhangban vannak Gyódi és mtsai korábbi tanulmányával, ahol a fent említett allélcsoportok szerológiai megfelelőjét vagy a nagyobb ún. „broad” csoportot vizsgálva hasonló szignifikáns különbségeket találtak a magyar és a magyar roma csoportban az A1, A3, B7, B12, B40, B52 antigén frekvenciák esetén. (A B\*44 szerológiai megfelelője a B44(12), a B44 és B45 a közös B12 csoportba tartozik.) Az A11-nél nem mutattak ki szignifikáns különbséget, de a roma csoportban fordult elő gyakrabban (12,1% vs. 7,3%). Egy kivétel volt mindössze, ahol saját eredményeinkkel ellentétben tendencia sem volt detektálható, a B18 esetén közel azonos frekvencia értéket kaptak a magyar és a roma csoportban (7,3% és 8,3%). (Gyódi, 1981) Az eltérés magyarázható egyrészt, azzal, hogy a DNS-alapú módszerek megbízhatóbb eredményt adnak a korábban használt szerológiai tipizáláshoz képest, illetve a jelen tanulmány jóval nagyobb mintaszámot dolgoz fel a magyar populációt tekintve ( $n=587$ ). A HLA-DRB1

lókusznál nem volt lehetséges a DNS-alapú és a szerológiai módszerrel meghatározott eredmények tényleges összehasonlítása, mert a DR13 és a DR14 is a DR6 broadba tartozik, amely frekvenciája a cigány csoportban szignifikánsan magasabb volt a Gyódi-féle tanulmányban. Az általunk vizsgált magyar populációban a DRB1\*13, a roma csoportban pedig a DRB1\*14 fordult elő gyakrabban. Ha összevonjuk a DRB1\*13 és \*14 csoportot és így viszonyítjuk egymáshoz a frekvenciákat, tehát létrehozunk egy virtuális DR6 csoportot, akkor a Gyódi-féle munkához hasonlóan esetünkben is a roma mintában volt nagyobb a frekvencia (19,7% vs. 17,3%), de a különbség nem volt szignifikáns.

A géndiverzitás szempontjából külön-külön megvizsgálva mindkét populációt, a HLA-B lókusz esetén detektáltuk a legtöbb allélcsoportot mindkét populációban (HUN:28 és HUN-GYP:26). Ez az eredmény egybevág az irodalmi adatokkal, amely szerint a fő HLA lókuszok közül a HLA-B lókusz a legpolimorfabb és a HLA-B esetén azonosították a legtöbb allélcsoportot és allélt. (Robinson J, 2015) Ezzel összhangban vannak az általunk detektált becsült heterozigótasági értékek, amelyek szintén a HLA-B lókuszánál voltak a legmagasabbak (HUN: 0,93 és HUN-GYP: 0,92). A HLA-DRB1 gén sokkal kisebb mértékben mutat polimorfizmust, hiszen összesen tizenhárom allélcsoport létezik, amelyek közül mindegyik előfordult a magyar csoportban és csak a DRB1\*08 és DRB1\*12 nem volt jelen a roma populációban. A becsült H értékek ebben az esetben sem tértek el szignifikánsan. A két populáció kumulatív AF értékeit ábrázolva a HLA-B és HLA-DRB1 esetén a görbék hasonló lefutást mutattak lókuszonként egymáshoz hasonlóan a két populációban.

A legnagyobb különbségeket minden szempontból a HLA-A lókuszban detektáltuk. A húsz különböző HLA-A allélcsoport közül valamennyi előfordult a magyar populációban. Ezzel szemben, a magyar cigány csoportban az A\*30, A\*29, A\*74, A\*69 és A\*80 nem fordult elő egy vizsgált személyben sem, így a roma csoportban csak tizenöt féle HLA-A allélcsoportot azonosítottunk. Az A\*74 és A\*80 esetében ezt az eredményt okozhatja a magyar roma populáció kis elemszáma. Ezek az allélcsoportok ugyanis a tanulmányunkban vizsgált kilenc csoport közül csak a nagy elemszámú magyar és horvát populációban fordultak elő, és a frekvenciájuk ebben a két csoportban is rendkívül alacsony volt (AF: 0,01%-0,15%). A többi vizsgált populációban viszont a magyar roma csoporthoz hasonlóan nem fordultak elő (AF: 0%). (11. táblázat) Az A\*29 és A\*30 allélcsoport azonban minden más általunk vizsgált populációban jelen volt (AF: 0,73%-3,8%), a spanyol roma mintában (n=99) ráadásul 2,6%-ban fordult elő,

ezért ennél a két allélcsoportnál nem valószínű, hogy a magyar roma csoport kis mintaszáma miatt nem lehetett detektálni. Továbbá a becsült heterozigótaság értéke a magyar roma csoportban volt a legalacsonyabb (0,79) a HLA-A lókuszt tekintetében, a többi csoportban ennél szignifikánsan magasabb értéket detektáltunk (0,84-0,88). Ezen kívül szignifikánsan nagyobb értéket kaptunk a magyar roma populációban a három leggyakoribb allélcsoporthoz tartozó kumulatív AF értékeket összehasonlítva a magyar csoportban kapott értékkel (76,6% vs. 56,2%). Ez az eredmény jól látszik a kumulatív AF értékek grafikus ábrázolásánál is, hiszen a HLA-A lókusznál sokkal meredekebb görbét kaptunk a roma csoportban a magyar kohorszhoz hasonlítva.

A magyar és magyar roma csoport vizsgálatánál a HLA-A lókusztban megfigyelt több szempontból is szignifikáns különbség feltételezhetően az alapító hatásnak (*founder effect*), illetve a genetikai sodródásnak a következménye, amely a cigányság Indiából történő kivándorlása során következett be, több mint ezer évvel ezelőtt. Az őshazából csak egy kis létszámú csoport vándorolt el, amely nem reprezentálhatta pontosan a populáció eredeti genetikai összetételét, egyes allélcsoportok előfordulása sokkal kisebb lehetett, mint a kiindulási populációban volt. Kis populációkban erős a genetikai sodródás, ennek köszönhetően az alapító populációból bizonyos HLA allélcsoportok teljesen eltűnhettek, mások pedig felszaporodtak. Az általunk vizsgált roma populációban feltételezhetően a fent említett A\*29 és A\*30 allélcsoport veszett el teljesen, míg az A\*02, A\*01 és az A\*11 gyakorisága annyira megnőtt, hogy nem csak a három legnagyobb frekvencia értéket mutatják, hanem a detektált gyakorisági értékek összege meghaladja a 76%-ot. Az alapító hatást a cigány közösségekben felerősítette a nagymértékben jelen lévő izoláltság és endogámia is. (Mendizabal 2011, 2012) Itt fontos kiemelni, hogy a HLA-A lókuszt tekintetében a spanyol roma populáció nagymértékben különbözik az összes többi vizsgált csoporttól, a magyar cigány populációt is ideértve. Ez a jelenség szintén a múltbeli alapító hatásnak, illetve egy filogenetikai elágazásnak az eredménye. Az is figyelemreméltó, hogy a spanyol mintában a diverzitás mértéke ( $H=0,85$ ) eléri azt a szintet, amelyet a többi európai csoportban figyeltünk meg. (11. táblázat) Ez arra enged következtetni, hogy a történelmük során kevésbé endogám életmódot folytattak.

Az F-statisztika vizsgálatok során kapott eredményeket alátámasztják az allélcsoport frekvencia értékek összehasonlítása. A HLA-A lókusztban Magyarország és Ausztria genetikai hasonlóságot mutat az  $F_{ST}$  értékek alapján. Ezt megerősíti, hogy a magyar populációban azonosított négy leggyakoribb allélcsoport az A\*02; A\*01; A\*03 és

A\*24. Ausztriában ugyanez a négy allélcsoport adja a legnagyobb frekvencia értékeket, de a sorrend A\*02; A\*03; A\*01 és A\*24-re változik. A gyakoriság értékek viszont szignifikánsan nem különböznek egymástól ( $p > 0,05$ ). (11. táblázat)

Munkánk további fontos eredménye, hogy a magyar csoportot és a magyar roma populációt összehasonlítottuk további öt közép- és délkelet-európai ország adataival (Csehország, Ausztria, Horvátország, Szerbia, Románia), valamint 2 roma-eredetű kohorsszal (spanyolországi cigány, Észak-Gudzsarát (India)). A kilenc populáció összehasonlításához alkalmazott F-statisztika és NMDS módszerrel kapott eredmények megerősítik egymást, valamint szintén azt mutatják, hogy a HLA-B és HLA-DRB1 lókusztól eltérő genetikai kapcsolatok vannak jelen a HLA-A esetén. A HLA-B és HLA-DRB1 vizsgálatok a magyarországi cigány és a spanyolországi cigány csoport egymáshoz közel helyezkedik el. Ezt az eredményt alátámasztja az F-statisztika vizsgálat, amely szerint a két csoport nem különbözik egymástól szignifikánsan. Mindkét lókusztól a két cigány populáció és az É-Indiai Gudzsarát csoport határozottan elkülönül a közép- és délkelet-európai csoportoktól, amely alátámasztja a feltételezett közös származást. (Mendizabal, 2011, 2012) A HLA-A lókusznál viszont nagy genetikai távolság figyelhető meg a két roma populáció között, és az  $F_{ST}$  értékek is szignifikánsan különböznek egymástól. Eredményeink azt mutatják, hogy a HLA-B és – DRB1 lókusztól eltérően a HLA-A lókusztól evolúciójára sokkal erősebben hatottak a demográfiai hatások, például a genetikai sodródás, a HLA-B és HLA-DRB1 esetén pedig feltehetően az ún. kiegyensúlyozó szelekció volt hangsúlyos. (Buhler, 2011, Sanchez-Mazas, 2013) Ennek eredményeképpen a két utóbbi lókusznál a populációk közötti differenciálódás folyamata lelassult és a populációk között jelenlévő genetikai kapcsolatok állandósultak.



## 6 Következtetések

A transzplantációs immunológia és azon belül is a vérképző őssejt átültetés napjainkban dinamikusan fejlődő tudományterület. A transzplantáció sikerességét alapvetően befolyásolja a recipiens és a donor közötti HLA egyezés mértéke. Munkánk egy új és átfogó képet kíván adni a magyar populáció és a magyar roma populáció elhelyezkedéséről a HLA allélcsoportok genetikai térképén. Hazánkban ilyen jellegű összehasonlító tanulmány korábban nem készült, noha nagyon fontos területről van szó. A genetikai diverzitást és a HLA allélcsoport gyakoriságokon alapuló genetikai távolságokat meghatározva, kimutattuk, hogy a magyar populáció szignifikánsan különbözik a legnagyobb magyar etnikai kisebbségtől, a magyar cigány populációtól. A magyar roma csoport ugyanakkor egy másik európai (spanyol) roma populációval hasonló genetikai profilt mutat, továbbá kevésbé kifejezett formában, de ez a két populáció rokonságot mutat a romák feltételezett őshazájából származó csoporttal, az Indiában található észak-gudzsaráti csoporttal. A magyar populáció a hozzá földrajzilag is közel elhelyezkedő európai csoportokkal mutat hasonlóságot a genetikai térképen, a közép-európai (Ausztria, Csehország) és a délkelet-európai (Horvátország, Szerbia, Románia) populációk között helyezkedik el intermedier pozícióban. Ezek az eredmények tovább erősítik azt a feltevést, amely szerint a HLA polimorfizmus vizsgálatok alkalmasak populációk közötti genetikai kapcsolatok meghatározására, ezáltal a populációk eredetének tisztázására. Ez a tanulmány alapot biztosít további populációgenetikai vizsgálatokhoz, amelyek a magyar populáció vagy a Magyarországon élő etnikai csoportok genetikai diverzitásával foglalkoznak. A magyarországi allélcsoport frekvencia vizsgálatokat szeretnénk kiterjeszteni további HLA-lókuszokra (HLA-C, -DQB1, -DPB1), illetve fontosnak tartjuk ezeket a vizsgálatokat nagyfelbontású HLA eredményeken is elvégezni. Az őssejtdonor keresés szempontjából pedig különösen fontos célkitűzés két-, három- négy- és ötponos haplotípusok meghatározása, főleg a recipiensek és az alacsony mértékben tipizált donorjelöltek egyezési esélyeinek meghatározásában. A magyar populációban mért allélcsoport gyakoriság eredmények a fent említetteken kívül hivatkozható referenciát jelentenek magyar betegek körében végzett bármely betegségasszociált HLA-A, -B, és -DRB1 vizsgálat során.

Tanulmányunkból levonható másik fontos következtetésünk, hogy a HLA lókuszokra eltérő evolúciós folyamatok hatnak. Kimutattuk, hogy a HLA-A esetén kisebb mértékű

diverzitás figyelhető meg, valamint a populációk között jelenlévő differenciálódás kifejezettebb, mint a HLA-B és –DRB1 lókuszbán. Eredményeinket korábban megjelent munkák támasztják alá. (Nunes 2014, Sanchez-Mazas 2007, 2013, Solberg 2008)

A populációgenetikai eredményeink azonban éppen a különböző etnikai csoportok között fennálló genetikai kapcsolatok feltérképezésével klinikai jelentőséggel is bírnak, legfőképpen a hematopoetikus őssejt transzplantáció területén. A kevésbé toxikus kondicionáló kezelések megjelenésével kitolódott a transzplantálható betegek felső korhatára, Magyarországon is évről évre egyre nagyobb számban végeznek allogén őssejt transzplantációt. A betegeknek azonban csak kisebb része rendelkezik HLA-identikus testvérdonorral, amely az átültetés sikeressége szempontjából a legideálisabb választás. A betegek nagyobb része HLA-egyeztetett nem rokon donortól kaphat vérképző őssejtek. Magyarországon 2017-től bevezették felnőtt recipienseknél is a haploidentikus donorral történő transzplantációt, de várhatóan az őssejt donor regisztereknek továbbra is nagy jelentőségük lesz. Elméletileg haploidentikus donor mindenkinek rendelkezésre állhat, hiszen a recipiens szülei és gyermekei biztosan, a testvérei pedig kis valószínűséggel alkalmas haploidentikus donorok lehetnek. Azonban fontos megjegyezni, hogy a betegek egy része, éppen a vérképzőrendszeri megbetegedések jellegéből fakadóan politranszfundált, és egyrészt emiatt, másrészt nők esetében a terhességek miatt HLA-ellenes antitesteket termelhetnek a potenciális haploidentikus donorok ellen. Szintén problémát jelenthet, ha a donor immunizálódott a recipiens ellen terhesség vagy más ok miatt. Ezekben az esetekben deszenzitizációs protokollok szükségesek, vagy továbbra is az őssejtdonor regiszterekben történik HLA-egyeztetett donorkeresés.

Minden országnak érdeke a közösségi őssejt donor regiszter fejlesztése. Tanulmányunkból egyértelműen kiderül, hogy adott betegnek az etnikai hovatartozása nagyon fontos információ a donorkeresésnél. A magyar betegek helyzete kedvezőbb, hiszen a vizsgált magyar populáció a környező országokkal nagy genetikai hasonlóságot mutat, és ez igaz az összehasonlításba nem beválasztott német populációra is, hiszen a magyar betegek legnagyobb része HLA-egyeztetett német donortól kap őssejtgraftot. A roma etnikai közösséghez tartozó recipienseknek azonban nagyon kis eséllyel lehet találni megfelelő donort a populációgenetikai értelemben vett európai származású önkéntes őssejt donorok között. Sőt, eredményeink azt mutatják, hogy a magyar roma csoport annak ellenére, hogy a HLA-B és –DRB1 lókuszbán tekintetében genetikai hasonlóságot mutat a másik két roma eredetű csoporttal, a HLA-A lókuszbán

szempontjából viszont genetikailag távol vannak egymástól. Következésképp, legnagyobb eséllyel olyan magyar önkéntes donorok között találhatnánk alkalmas donorokat, akik maguk is a magyarországi roma etnikai közösséghez tartoznak. Ehhez a Magyar Óssejtdonor Regiszterben lévő donorok számának növelése lenne szükséges, ráadásul célzottan a roma kisebbség megszólítása jelenthetne igazi megoldást. Természetesen ez lehetőséget jelentene Európában vagy máshol élő roma betegek számára is. A létszám növelése mellett, a donorok kivizsgálási szintjének növelése is fontos lenne, a jelenleg rutinszerűen tipizált HLA-A, -B, és -DRB1 lókuszek kifelbontású meghatározását érdemes lenne további lókuszekre kiterjeszteni (HLA-C, -DQB1, -DPB1) és legalább a DRB1 esetén nagyfelbontású vizsgálatra cserélni. Itt fontos megjegyezni, hogy a HLA tipizálás minőségének javítása érdekében 2014 óta rutinszerűen kizárjuk a leggyakoribb null alléleket a recipienseknél és a kiválasztott donoroknál. Ez annak ellenére fontos, hogy tanulmányunk egyik fontos eredménye éppen az, hogy a magyar populációban a C\*04:09N allél szignifikánsan ritkábban fordul elő, mint más vizsgált páneurópai csoportban.

A Magyar Óssejtdonor Regiszterben nyilvántartott donorok minél jobban vannak kivizsgálva és minél nagyobb a számuk, annál nagyobb valószínűséggel kerülhetnek kiválasztásra magyar vagy külföldi recipiens számára. A transzplantáció indikációja és a tényleges megvalósulása között eltelt idő alapvetően befolyásolhatja a transzplantáció sikerességét. A donorkeresés sok részfolyamatból tevődik össze, a Magyar Óssejtdonor Regiszternek kiemelt szerepe van a donorkeresés/kiválasztás folyamatában. Különösen akkor van ennek jelentősége, ha a beteg HLA típusa (haplotípusa) nem gyakori a regisztrált donorok között. Teljesen kivizsgált, HLA-egyező donor hiányában a populációgenetikai eredmények figyelembevételével, a beteggel egyező etnikai háttérű donorok közötti célzott keresés lehet a leghatékonyabb, amelynek során a populációgenetikai adatokra alapozva a nem meghatározott lókuszek HLA típusa is prediktálható. A hazai donorállomány általános növelése azért is célszerű lenne, mert logisztikai szempontokat figyelembe véve, hamarabb valósulhat(na) meg egy őssejt átültetés magyar donor esetén (behívás, vizsgálatok elvégzése, őssejtgyűjtés, esetleges donor limfocita infúzió, stb.). Tervezhetőbb lenne a transzplantáció, amely különösen fontos azokban az esetekben, ahol rövid ablakperiódus áll rendelkezésre. Nem utolsó szempont a pénzügyi kérdés figyelembevétele, amely szintén kedvezőbben alakulna egy magyar donor kiválasztása esetén.

## 7 Összefoglalás

A vérképző őssejt transzplantáció (HSCT) sikerességét alapvetően befolyásolja a recipiens és a donor humán leukocita antigénjei (HLA) között kimutatható egyezés mértéke. A null allélek kizárása alapvető fontosságú HSCT előtt. Az egyik leggyakoribb null allél, a C\*04:09N frekvenciáját határoztuk meg a magyar populációban (n=7345). A detektált érték (0,0068%) szignifikánsan alacsonyabb, mint a nemzetközi szakirodalomban található adatok. Jelentősen lerövidítheti a donorkeresési folyamatot és növelheti a beteg gyógyulási esélyeit, ha a beteggel azonos etnikai háttérű donorok között történik a keresés. Munkánk egy új és átfogó képet ad a magyar populáció és a magyar roma csoport elhelyezkedéséről a HLA allélcsoportok genetikai térképén. Elsőként határoztunk meg DNS-alapú HLA-A, -B és -DRB1 allélcsoport frekvencia értékeket a magyar populációban és Magyarország legnagyobb etnikai kisebbségét alkotó roma csoportban. Kimutattuk, hogy a magyar populáció szignifikánsan különbözik a magyar roma populációtól. Ez különösen igaz a HLA-A lókuszra, amelynél a detektált allélcsoportok számában, a kumulatív allélcsoport gyakoriságokban és a heterozigótaságban detektált szignifikáns különbségek egymást alátámasztva azt mutatják, hogy a magyar roma populációban kisebb a géndiverzitás a magyar populációhoz képest. Ez feltételezhetően az alapító hatásnak a következménye, amely a cigányság Indiából történő kivándorlása során következett be, illetve ezt a hatást a roma közösségekre jellemző izoláltság és endogámia is felerősíthette. További populációkra kiterjesztett szisztematikus összehasonlító vizsgálatok során kimutattuk, hogy a magyar populáció a hozzá földrajzilag közel elhelyezkedő csoportokkal mutat genetikai rokonságot, intermedier pozícióban elhelyezkedve Ausztria és Csehország, valamint Horvátország, Szerbia és Románia között. A HLA-B és -DRB1 lókuszoknál a magyar roma csoport egy másik európai (spanyol) roma populációval mutat hasonló genetikai profilt, és kevésbé kifejezett formában rokonságot mutat a romák feltételezett őshazájából származó észak-gudzsarati csoporttal. A HLA-A lókuszánál megfigyelhető nagy genetikai távolság arra utal, hogy a HLA lókuszokra eltérő evolúciós hatások érvényesek. Klinikai következtetése eredményeinknek, hogy a magyar betegek részére reális esély van európai regiszterekben megfelelő donort találni, míg a magyar roma etnikai közösséghez tartozó recipienseknek legnagyobb eséllyel velük azonos etnikai háttérű donorok között található alkalmas donor. Ennek érdekében a magyar roma kisebbség körében célzott donortoborzás jelenthetne megoldást.

## 8 Summary

The efficiency of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is essentially affected by HLA match between the recipient and the donor. It is important to exclude the presence of null alleles before HSCT. We determined that the allele frequency of HLA-C\*04:09N in the Hungarian population (n=7345) was 0.0068%, which was significantly lower compared to other populations. Taking into account the ethnicity of the recipient and the registered donors is expected to increase the efficiency of unrelated donor searches and to shorten the delay of the process. Our study provided new and comprehensive aspects of genetic differences based on HLA diversity between Hungarian population and the largest minority group, Hungarian Gypsies. In these two groups DNA-based HLA-A, -B and -DRB1 allele group frequencies were defined at the first time by our group. We determined that the Hungarian population and Hungarian Gypsy cohort significantly differed for all analyzed loci, especially for HLA-A. Significant differences in the number of detected allele groups, cumulative allele group frequencies and heterozygosity values supporting each other showed that the genetic diversity for HLA-A was lower among Hungarian Gypsies compared to the general Hungarian population. These results are most probably the consequence of both a strong founder effect followed by genetic drift that occurred when Gypsies migrated out of India and of a rather high level of endogamy and isolation in this population. Moreover, the systematical examination of further populations indicated that the genetic distance was small between Hungary and geographically closely located populations, namely Hungarians were found in an intermediate position between the Czechs and Austrians, on one side and the Croats, Serbs and Romanians, on the other side. For HLA-B and HLA-DRB1, Hungarian Gypsy and Spanish Gypsy populations appeared to be related to each other and to a lesser extent, to North Gujarat, the putative ancestral geographic area of present-day European Gypsies. However, on the genetic map, these three cohorts were projected far apart from each other for HLA-A suggesting that different evolutionary effects influence particular HLA loci. The clinical consequence of our work is that whereas suitable donors for a Hungarian recipient can be found with high probability in European registries, HLA-identical donors for a Hungarian Gypsy patient are only available among volunteers with the same ethnical background. In order to improve the current situation, targeted donor recruitment would be beneficial in Hungarian Gypsy minority group.

## 9 Irodalomjegyzék

1. Andric Z, Popadic D, Jovanovic B, Jaglicic I, Bojic S, Simonovic R. (2014) HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in the Serbian population. *Hum Immunol.* 75(3):218-26.
2. Arrieta-Bolaños E, Maldonado-Torres H, Dimitriu O, Hoddinott MA, Fowles F, Shah A, Orlich-Pérez P, McWhinnie AJ, Alfaro-Bourrouet W, Buján-Boza W, Little AM, Salazar-Sánchez L, Madrigal JA. (2010) HLA-A, -B, -C, -DQB1, and -DRB1,3,4,5 allele and haplotype frequencies in the Costa Rica Central Valley Population and its relationship to worldwide populations. *Hum Immunol.* 72(1):80-6.
3. Balas A, Santos S, Aviles MJ, García-Sánchez F, Lillo R, Alvarez A, Villar-Guimerans LM, Vicario JL. (2002) Elongation of the cytoplasmic domain, due to a point deletion at exon 7, results in an HLA-C null allele, Cw\*0409N. *Tissue Antigens.* 59(2):95-100.
4. Balas A, Garcia-Sanchez F, Vicario JL. (2010) Allelic and haplotypic HLA frequency distribution in Spanish hematopoietic patients. Implications for unrelated donor searching. *Tissue Antigens* 77:45-53.
5. Bártai Á., Reményi P., Réti M., Barta A., Gopcsa L., Lengyel L., Torbágyi É., Csukly Z., Karászi É., Tordai A., Andrikovics H., Balassa K., Tasnády Sz., Masszi T. (2017) Allogén vérképzősejt-átültetés Magyarországon. *Orv Hetil.* 158:291-297.
6. Brierley CK, Littlewood TJ, Peniket AJ, Gregg R, Ward J, Clark A, Parker A, Malladi R, Medd P. (2015) Impact of ABO blood group mismatch in alemtuzumab-based reduced-intensity conditioned haematopoietic SCT. *BMT.* 50:931-938.
7. Buhler S, Sanchez-Mazas A. (2011) HLA DNA sequence variation among human populations: molecular signatures of demographic and selective events. *PLoS One.* 6:e14643.
8. Buhler S, Nunes JM, Nicoloso G, Tiercy JM, Sanchez-Mazas A. (2012) The heterogeneous HLA genetic makeup of the Swiss population. *Plos One* 7(7):e41400.
9. Chabas D, Taheri S, Renier C, Mignot E. (2003) The genetics of narcolepsy. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 4:459-83.

10. Cheuk DKL. (2013) Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World J Transplant.* 3(4):99-112.
11. Ciurea, Ciurea SO, Zhang MJ, Bacigalupo AA, Bashey A, Appelbaum FR, Aljitawi OS, Armand P, Antin JH, Chen J, Devine SM, Fowler DH, Luznik L, Nakamura R, O'Donnell PV, Perales MA, Pingali SR, Porter DL, Riches MR, Ringdén OT, Rocha V, Vij R, Weisdorf DJ, Champlin RE, Horowitz MM, Fuchs EJ, Eapen M. (2015) Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood* 126(8):1033-40.
12. Constantinescu I, Boscaiu V, Cianga P, Dinu AA, Gai E, Melinte M, Moise A. (2016) The frequency of HLA alleles in the Romanian population. *Immunogenetics.* 68:167–178.
13. Cullen M, Perfetto P S, Klitz W, Nelson G, Carrington M (2002) High-Resolution patterns of meiotic recombination across the human Major Histocompatibility Complex. *Am. J. Hum. Genet.* 71:759-776.
14. Dalva K, Beksac M. (2014) HLA Typing with Sequence-Specific Oligonucleotide Primed PCR (PCR-SSO) and Use of the Luminex™ Technology. *Methods Mol Biol.* 1109:87-99.
15. Downing J, Street J, Hammond L, Darke C. (2002) Identification of HLA-Cw\*0409N and its distribution in blood donors resident in Wales. *Eur J Immunogenet.* 29:351-70.
16. Elsner HA, Blasczyk R. (2004) Immunogenetics of HLA null alleles: implications for blood stem cell transplantation. *Tissue Antigens.* 64(6):687-95.
17. Excoffier L, Lischer HE. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 10(3):564-7.
18. Fugger L, Svejgaard A. (2000) Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA-DR4 and rheumatoid arthritis: studies in mice and men. *Arthritis Res.* 2(3):208-11.
19. Fürst D, Müller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, Schwerdtfeger R, Arnold R, Einsele H, Wulf G, Pfreundschuh M, Glass B, Schrezenmeier H, Schwarz K, Mytilineos J. (2013) High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood.* 122:3220-3229.

20. Gabriel C, Fürst D, Faé I, Wenda S, Zollikofer C, Mytilineos J, Fischer GF. (2014) HLA typing by next-generation sequencing – getting closer to reality. *Tissue Antigens*. 83(2):65-75.
21. Gahrton G, Iacobelli S, Apperley J, Bandini G, Björkstrand B, Blade J, Boiron JM, Cavo M, Cornelissen J, Corradini P, Kröger N, Ljungman P, Michallet M, Russell NH, Samson D, Schattenberg A, Sirohi B, Verdonck LF, Volin L, Zander A, Niederwieser D. (2005) The impact of donor gender on outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma: reduced relapse risk in female to male transplants. *BMT*. 35:609-617
22. Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, Hartzman R, Rizzo JD, Horowitz M, Confer D, Maiers M. (2014) HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *N Engl J Med*. 371(4):339-48.
23. Gratwohl A, Baldomero H. (2009) Trends of hematopoietic stem cell transplantation in the third millennium. *Curr Opin Hematol*. 16(6):420-6.
24. Grubic Z, Jankovic KS, Maskalan M, Serventi-Seiwerth R, Mikulic M, Kamenaric MB, Nemet D, Zunec R. (2014) HLA allele and haplotype polymorphisms among Croatian patients in an unrelated hematopoietic stem cell donor search program. *Transpl Immunol*. 31(3):119-24.
25. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir A, Runarsdottir EH, Hauksson VB, Upmanyu R, Gulcher J, Stefansson K, Valdimarsson H. (2003) Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw\*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *Br J Dermatol*. 148(2):233-5.
26. Gyódi É, Tauszik T, Petranyi G, Kotvász A, Pálffy G, Takács I, Nemák P, Hollán SR. (1981) The HLA antigen distribution in the Gipsy population in Hungary. *Tissue Antigens*. 18(1):1-12.
27. Ihaka R, Gentleman R. (1996) R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat*. 5:299–314.
28. Jorde LB. (2000) Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res*. 10(10):1435-44.
29. Kanda J. (2013) Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. 98:300-308.
30. Kállai E. (2005) Helyi Cigány Kisebbségi Önkormányzatok Magyarországon, Gondolat Kiadó, Budapest, 2005: 9-11.



31. Kemény I, Jánky B, Lengyel G. (2004) A Magyarországi Cigányság 1971-2003. Gondolat Kiadó, Budapest. 335-336.
32. Kertesi G, Kézdi G. (1998) A cigány népesség Magyarországon. Socio-Typo, Budapest. 94-96.
33. Klein J, Sato A. (2000) The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 343(10):702-9.
34. Klitz W, Maiers M, Spellman S, Baxter-Lowe LA, Schmeckpeper B, Williams TM, Fernandez-Viña M. (2003) New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens.* 62:296-307.
35. Kruskal J. (1964) Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika* 29:115-29.
36. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, Anasetti C. (2007) High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood.* 110: 4576-4583.
37. Lind C, Ferriola D, Mackiewicz K, Papazoglou A, Sasson A, Monos D. (2013) Filling the gaps - the generation of full genomic sequences for 15 common and well-documented HLA class I alleles using next-generation sequencing technology. *Hum Immunol.* 74(3):325-9.
38. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. (2011) Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol Oncol Clin North Am.* 25(1):151-69.
39. Luznik L, Jones RJ, Fuchs EJ. (2010) High dose cyclophosphamide for GVHD prevention. *Curr Opin Hematol.* 17(6): 493–499.
40. Mack SJ, Cano P, Hollenbach JA, He J, Hurley CK, Middleton D, Moraes ME, Pereira SE, Kempenich JH, Reed EF, Setterholm M, Smith AG, Tilanus MG, Torres M, Varney MD, Voorter CE, Fischer GF, Fleischhauer K, Goodridge D, Klitz W, Little AM, Maiers M, Marsh SG, Müller CR, Noreen H, Rozemuller EH, Sanchez-Mazas A, Senitzer D, Trachtenberg E, Fernandez-Vina M. (2013) Common and Well-Documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. *Tissue Antigens.* 81(4):194-203.
41. Majhail NS, Chitphakdithai P, Logan B, King R, Devine S, Rossmann SN, Hale G, Hartzman RJ, Karanes C, Laport GG, Nemecek E, Snyder EL, Switzer GE, Miller

- J, Navarro W, Confer DL, Levine JE. (2015) Significant Improvement in Survival after Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantation in the Recent Era. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21: 142-150.
42. Mallon E, Bunce M, Wojnarowska F, Welsh K. (1997) HLA-CW\*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis, and evidence Ala-73 is increased in male type I psoriatics. *J Invest Dermatol.* 109(2):183-6.
43. Mangiola M, Marrari M, Feingold B, Zeevi A. (2017) Significance of Anti-HLA Antibodies on Adult and Pediatric Heart Allograft Outcomes. *Front Immunol.* 27;8:4.
44. Marsh SGE., Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Mayr WR, Maiers M, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, A Svejgaard, PI Terasaki, JM Tiercy, J Trowsdale (2010) Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens.* 75:291-455.
45. Martinez-Cruz B, Mendizabal I, Harmant C, Pablo de R, Ioana M, Angelicheva D, Kouvatsi A, Makukh H, Netea M, Pamjav H, Zalán A, Tournev I, Marushiakova E, Popov V, Bertranpetit J, Kalaydjieva L, Quintana-Murci L, Comas D, Consortium G. (2016) Origins, admixture and founder lineages in European Roma. *Eur J Hum Genet.* 24(6):937-43.
46. Masszi Tamás (2000) Transzplantáció hemopoetikus őssejtekkel: egy új program elindításának tapasztalatai a Szent László Kórházban (1993-2000) Egyetemi doktori értekezés
47. Mendizabal I, Valente C, Gusmão A, Alves C, Gomes V, Goios A, Parson W, Calafell F, Alvarez L, Amorim A, Gusmão L, Comas D, Prata MJ. (2011) Reconstructing the Indian origin and dispersal of the European Roma: a maternal genetic perspective. *Plos One.* 10;6(1):e15988.
48. Mendizabal I, Lao O, Marigorta UM, Wollstein A, Gusmão L, Ferak V, Ioana M, Jordanova A, Kaneva R, Kouvatsi A, Kučinskas V, Makukh H, Metspalu A, Netea MG, de Pablo R, Pamjav H, Radojkovic D, Rolleston SJ, Sertic J, Macek M Jr, Comas D, Kayser M. (2012) Reconstructing the population history of European Romani from genome-wide data. *Curr Biol.* 22(24):2342-9.
49. Mezey B. Cigányok. In Ács Z. (szerk.): *Nemzeties etnikai kisebbségek Magyarországon.* Budapest: Auktor Kiadó. 1998:45-79.

50. Morath C, Opelz G, Zeier M, Süsal C. (2014) Clinical relevance of HLA antibody monitoring after kidney transplantation. *J Immunol Res.* 2014:845040.
51. Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M, Yabe T, Murata M, Doki N, Eto T, Mori T, Miyamura K, Sao H, Ichinohe T, Saji H, Kato S, Atsuta Y, Kawa K, Kodera Y, Sasazuki T, Japan Marrow Donor P. (2015) Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood.* 125: 1189-1197.
52. Mubarak A, Spierings E, Wolters V, van Hoogstraten I, Kneepkens CM, Houwen R. (2013) Human leukocyte antigen DQ2.2 and celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 56(4):428-30.
53. National Marrow Donor Program (2015) NMDP Policy for HLA Confirmatory Typing Requirements for Unrelated Adult Donors and Patients P00079 Revision 1.
54. Nunes E, Heslop H, Fernandez-Vina M, Taves C, Wagenknecht DR, Eisenbrey AB, Fischer G, Poulton K, Wacker K, Hurley CK, Noreen H, Sacchi N. (2011) Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood.* 118(23):e180-3.
55. Nunes JM, Riccio ME, Buhler S, Di D, Currat M, Ries F, Almada AJ, Benhamamouch S, Benitez O, Canossi A, Fadhlaoui-Zid K, Fischer G, Kervaire B, Loiseau P, de Oliveira DC, Papasteriades C, Piancatelli D, Rahal M, Richard L, Romero M, Rousseau J, Spiroski M, Sulcebe G, Middleton D, Tiercy JM, Sanchez-Mazas A. (2010) Analysis of the HLA population data (AHPD) submitted to the 15th International Histocompatibility/Immunogenetics Workshop by using the Gene[r]ate computer tools accommodating ambiguous data (AHPD project report). *Tissue Antigens.* 76(1):18-30.
56. Nunes JM, Buhler S, Roessli D, Sanchez-Mazas A (2014) The HLA-net GENE[R]ATE pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas. *Tissue Antigens.* 83(5):307-23.
57. O'Leary JG, Kaneku H, Demetris AJ, Marr JD, Shiller SM, Susskind BM, Tillery GW, Terasaki PI, Klintmalm GB. (2014) Antibody-mediated rejection as a contributor to previously unexplained early liver allograft loss. *Liver Transpl.* 20(2):218-27.
58. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Basak GW, Bonini C, Duarte R, Dufour C, Kröger N, Kuball J, Lankester A, Montoto S, Nagler A, Snowden JA, Styczynski J, Mohty M; European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT).

- (2018) Is the use of unrelated donor transplantation leveling off in Europe? The 2016 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant*. 2018 Mar 14. doi: 10.1038/s41409-018-0153-1.
59. Pálóczi K. (2003) Az immunrendszer újrafelépése csontvelő-átültetést követően: az allogén őssejtterápia immunológiai vonatkozásai. *Magyar Tudomány*. 2003/4 477-487.
  60. Pálóczi K., Barta A., Poros A. (2004) Vérbéplő őssejtek a gyógyításban. *Magyar Tudomány*. 2004/3 337-346.
  61. Pálóczi K. Vérbéplő őssejt transzplantáció. In: Perner F., Petrányi Gy. (szerk.), Szervátültetés. *Medicina*, Budapest, 2013:437-445.
  62. Pásztor I. Z. (2013) Társadalomföldrajzi vizsgálatok az északkelet-magyarországi cigányság körében. (Létszámváltozások, önkormányzatiság, kisebbségi választások) Doktori (PhD) értekezés.
  63. Petrányi Gy. Gyódi É. (2005) A fő hisztokompatibilitási rendszer (MHC) molekuláris genetikai szerepe a "saját és idegen" felismerésben és jelentősége a fajfejlődésben *Magyar Tudományos Akadémia Folyóirata*, 166. évfolyam, 2005/6. szám 659-670.
  64. Pidala J, Lee SJ, Ahn KW, Spellman S, Wang HL, Aljurf M, Askar M, Dehn J, Vina MF, Gratwohl A, Gupta V, Hanna R, Horowitz MM, Hurley CK, Inamoto Y, Kassim AA, Nishihori T, Mueller C, Oudshoorn M, Petersdorf EW, Prasad V, Robinson J, Saber W, Schultz KR, Shaw B, Storek J, Wood WA, Woolfrey AE, Anasetti C. (2014) Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 124: 2596-2606.
  65. Pinto C, Smith AG, Larsen CE, Fernández-Viña M, Husain Z, Clavijo OP, Wang ZC, Nisperos B, Hansen JA, Alper CA, Yunis EJ. (2004) HLA-Cw\*0409N is associated with HLA-A\*2301 and HLA-B\*4403-carrying haplotypes. *Hum Immunol*. 65(2):181-7.
  66. Potok E, Al-Saleh S, Stamm L, Berka N. (2006) Prevalence of Cw\*0409N allele and associated HLA antigens in bone marrow patients from Alberta, Canada. *Human Immunology* 67: Supplement 1: S131.
  67. Rajczy K. A transzplantáció immunológiája. In: Perner F, Petrányi Gy. (szerk.), Szervátültetés. *Medicina*, Budapest, 2013:37-47.

68. Rajnavölgyi É. Az őssejtek és az immunrendszer, Magyar Tudományos Akadémia Folyóirata CX. kötet – Új folyam, XLX. kötet, 2004/3. szám 306-318.
69. Rajnavölgyi É. A fő hisztokompatibilitási génkomplex. In: Erdei A., Sármy G., Prechl J. (szerk), Immunológia. Medicina, Budapest, 2012: 233-260.
70. Ramal LM, de Pablo R, Guadix MJ, Sánchez J, Garrido A, Garrido F, Jiménez-Alonso J, López-Nevot MA. (2001) HLA class II allele distribution in the Gypsy community of Andalusia, southern Spain. *Tissue Antigens*. 57(2):138-43.
71. Randolph SSB, Gooley TA, Warren EH, Appelbaum FR, Riddell SR. (2004) Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 103:347-352.
72. Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC. (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*. 105(3):767-79.
73. Rezvani AR, Storer BE, Guthrie KA, Schoch HG, Maloney DG, Sandmaier BM, Storb R. (2015) Impact of donor age on outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 21:105-112.
74. Riccio ME, Buhler S, Nunes JM, Vangenot C, Cuénod M, Currat M, Di D, Andreani M, Boldyreva M, Chambers G, Chernova M, Chiaroni J, Darke C, Di Cristofaro J, Dubois V, Dunn P, Edinur HA, Elamin N, Eliaou JF, Grubic Z, Jaatinen T, Kanga U, Kervaire B, Kolesar L, Kunachiwa W, Lokki ML, Mehra N, Nicoloso G, Paakkanen R, Voniatis DP, Papasteriades C, Poli F, Richard L, Romón Alonso I, Slavčev A, Sulcebe G, Suslova T, Testi M, Tiercy JM, Varnavidou A, Vidan-Jeras B, Wennerström A, Sanchez-Mazas A. (2013) 16(th) IHIW: analysis of HLA population data, with updated results for 1996 to 2012 workshop data (AHPD project report). *Int J Immunogenet*. 40(1):21-30.
75. Richter R, Süsal C, Köhler S, Qidan S, Schödel A, Holschuh L, Brzoska M, Asbe-Vollkopf A, Büttner S, Betz C, Herrmann E, Gauer S, Seifried E, Geiger H, Seidl C, Hauser IA. (2016) Pretransplant human leukocyte antigen antibodies detected by single-antigen bead assay are a risk factor for long-term kidney graft loss even in the absence of donor-specific antibodies. *Transpl Int*. 29(9):988-98.
76. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. (2015) The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases *Nucleic Acids Research* 43:D423-431.

77. Robinson PC, Brown MA. (2014) Genetics of ankylosing spondylitis. *Mol Immunol.* 57(1):2-11.
78. Sanchez-Mazas A. (2007) An apportionment of human HLA diversity. *Tissue Antigens.* 69 Suppl 1:198-202.
79. Sanchez-Mazas A, Fernandez-Viña M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, Di D, Rajalingam R, Dugoujon JM, Mack SJ, Thorsby E. (2011) Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology.* 133(2):143-64.
80. Sanchez-Mazas A, Vidan-Jeras B, Nunes JM, Fischer G, Little AM, Bekmane U, Buhler S, Buus S, Claas FH, Dormoy A, Dubois V, Eglite E, Eliaou JF, Gonzalez-Galarza F, Grubic Z, Ivanova M, Lie B, Ligeiro D, Lokki ML, da Silva BM, Martorell J, Mendonça D, Middleton D, Voniatis DP, Papasteriades C, Poli F, Riccio ME, Vlachou MS, Sulcebe G, Tonks S, Nevessignsky MT, Vangenot C, van Walraven AM, Tiercy JM. (2012) Strategies to work with HLA data in human populations for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics: HLA-NET methodological recommendations. *Int J Immunogenet.* 39(6):459-72.
81. Sanchez-Mazas A, Buhler S, Nunes JM. (2013) A new HLA map of Europe: Regional genetic variation and its implication for peopling history, disease-association studies and tissue transplantation. *Hum Hered.* 76:162-77.
82. Sanchez-Mazas A, Nunes JM, Middleton D, Sauter J, Buhler S, McCabe A, Hofmann J, Baier DM, Schmidt AH, Nicoloso G, Andreani M, Grubic Z, Tiercy JM, Fleischhauer K. (2017a) Common and well-documented HLA alleles over all of Europe and within European sub-regions: A catalogue from the European Federation for Immunogenetics *HLA* 89(2):104–113
83. Sanchez-Mazas A, Černý V, Di D, Buhler S, Podgorná E, Chevallier E, Brunet L, Weber S, Kervaire B, Testi M, Andreani M, Tiercy JM, Villard J, Nunes JM. (2017b) The HLA-B landscape of Africa: Signatures of pathogen-driven selection and molecular identification of candidate alleles to malaria protection. *Mol Ecol.* 26(22):6238-6252.
84. Schaffer M, Olerup O. (2001) HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing. *Tissue Antigens.* 58(5):299-307.
85. Schmidt AH, Baier D, Solloch UV, Stahr A, Cereb N, Wassmuth R, Ehninger G, Rutt C. (2009) 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. *Hum Immunol.* 70(11):895-902.
86. Schmidt AH, Solloch UV, Baier D, Stahr A, Wassmuth R, Ehninger G, Rutt C. (2010) Regional differences in HLA antigen and haplotype frequency distributions in Germany and their relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue Antigens.* 76(5):362-79.
  87. Shaw BE, Arguello R, Garcia-Sepulveda CA, Madrigal JA. (2010) The impact of HLA genotyping on survival following unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology.* 150: 251-258.
  88. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. (2009) The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet.* 54(1):15-39
  89. Sinkovits G, Szilágyi Á, Farkas P, Inotai D, Szilvási A, Tordai A, Rázsó K, Réti M, Prohászka Z. (2017) The role of human leukocyte antigen DRB1-DQB1 haplotypes in the susceptibility to acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum Immunol.* 78(2):80-87.
  90. Solberg OD1, Mack SJ, Lancaster AK, Single RM, Tsai Y, Sanchez-Mazas A, Thomson G. (2008) Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol.* 69(7):443-64.
  91. Sulcebe G, Shyti E. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in a population of 432 healthy unrelated individuals from Albania. (2016) *Hum Immunol.* 77:620–621.
  92. Sureda A, Bader P, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, Falkenburg JHF, Farge-Bancel D, Gennery A, Kroger N, Lanza F, Marsh JC, Nagler A, Peters C, Velardi A, Mohty M, Madrigal A, European Soc Blood M. (2015) Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplantation.* 50: 1037-105
  93. Süsal C, Seidl C, Schönemann C, Heinemann FM, Kauke T, Gombos P, Kelsch R, Arns W, Bauerfeind U, Hallensleben M, Hauser IA, Einecke G, Blasczyk R. (2015) Determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients: recommendations of the German Society for Immunogenetics. *Tissue Antigens.* 86(5):317-23.

94. Szakmai Beszámoló (2014) Országos Vérellátó Szolgálat, Magyar Össejtdonor Regiszter
95. Testi M, Lai S, Orrù S, Alba F, Cappai L, Firdous N, Gaziev J, Troiano M, Andreani M, Carcassi C. (2011) Distribution of HLA alleles and haplotypes in the Maldivian population. *Tissue Antigens*. 77(3):235-8.
96. Terasaki PI, MacCleveland JD. (1964) Microdroplet assay to human serum cytotoxins. *Nature*. 204: 998–1000.
97. Vidan-Jeras B, Buhler S, Dubois V, Grubic Z, Ivanova M, Jaatinen T, Ligeiro D, Lokki ML, Papasteriades C, Poli F, Spyropoulou-Vlachou M, Tordai A, Viken MK, Wenda S, Nunes JM, Sanchez-Mazas A, Tiercy JM. (2014) Resolution of HLA-B\*44:02:01G, -DRB1\*14:01:01G and -DQB1\*03:01:01G reveals a high allelic variability among 12 European populations. *Tissue Antigens*. 84(5):459-64.
98. Voorter CE, Palusci F, Tilanus MG. (2014) Sequence-Based Typing of HLA: An Improved Group-Specific Full-Length Gene Sequencing Approach. *Methods Mol Biol*. 1109:101-14.
99. Wang ZC, Smith AG, Yunis EJ, Selvakumar A, Ferrone S, McKinney S, Lee JH, Fernandez-Vina M, Hansen JA. (2002) Molecular characterization of the HLA-Cw\*0409N allele. *Hum Immunol*. 63(4):295-300.
100. Wright S. (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen*. 15(4):323-54.
101. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, Boiron JM, Ifrah N, Milpied N, Chehata S, Esperou H, Vernant JP, Michallet M, Buzyn A, Gratecos N, Cahn JY, Bourhis JH, Chir Z, Raffoux C, Socié G, Golmard JL, Jouet JP. (2006) Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J Clin Oncol*. 24:5695-5702.



## 10 Saját publikációk jegyzéke

### *A dolgozat anyagát képező nemzetközi tudományos közlemények*

1. **Inotai D**, Szilvasi A, Benko S, Boros-Major A, Illes Z, Bors A, Kiss KP, Rajczy K, Gelle-Hossó A, Buhler S, Nunes JM, Sanchez-Mazas A, Tordai A. (2015) HLA genetic diversity in Hungarians and Hungarian Gypsies: Complementary differentiation patterns and demographic signals revealed by HLA-A, -B and -DRB1 in Central Europe. *Tissue Antigens* 86: 115-121. **IF: 2,046**
2. Bors A, **Inotai D**, Andrikovics H, Benko S, Boros-Major A, Illés Z, Szilvási A, Gelle-Hossó A, Rajczy K, Tordai A. (2015) Low occurrence of the HLA-C\*04:09N allele in a large Hungarian cohort. *Tissue Antigens* 86:(1) pp. 32-35. **IF: 2,046**

### *Egyéb témában megjelent nemzetközi tudományos közlemények*

3. Balassa K, Andrikovics H, Remenyi P, Batai A, Szilvasi A, Bors A, Kiss KP, Rajczy K, **Inotai D**, Torbagyi E, Lengyel L, Barta A, Gopcsa L, Tordai A, Masszi T. (2018) Sex-specific survival difference in association with HLA-DRB1 \*04 following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for lymphoid malignancies. *Human Immunology* 79: 13-19.
4. Sinkovits G, Szilagyi A, Farkas P, **Inotai D**, Szilvasi A, Tordai A, Razso K, Reti M, Prohaszka Z. (2017) The role of human leukocyte antigen DRB1-DQB1 haplotypes in the susceptibility to acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Human Immunology* 78:80-87.
5. Balassa K, Andrikovics H, Remenyi P, Batai A, Bors A, Kiss KP, Szilvasi A, Rajczy K, **Inotai D**, Gopcsa L, Lengyel L, Barta A, Reti M, Tordai A, Masszi T. (2015) The potential role of HLA-DRB1\*11 in the development and outcome of haematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy. *Bone Marrow Transplantation* 50:1321-1325.
6. **Inotai D**, Boros-Major A, Illes Z, Szilvasi A, Nagy G, Rajczy K, Chmel R, Langer RM, Tordai A. (2012) Decrease in cold ischemic times as a result of protocol changes of urgent immunogenetic testing during cadaveric kidney transplantation in Hungary. *Transplantation Proceedings* 44: 2132-2135.

## 11 Köszönetnyilvánítás

Legelőször szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Tordai Attilának, hogy pályám kezdetén elindított a kutatói munka irányába. Kezdetől fogva támogatott, és számtalan lehetőséget biztosított számomra, amelyek segítettek tudományos fejlődésemet. Ösztönzése és bátorítása nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Alicia Sanchez-Mazas laboratóriumvezetőnek, hogy a kutatómunka kezdeti részét a Laboratory of Anthropology, Genetics and Peopling History genfi laboratóriumában végezhettem. Köszönöm José Manuel Nunes-nek és Dr. Stéphane Buhlernek a populációgenetikai módszerek elsajátításában nyújtott segítségét. Szeretném megköszönni Dr. Szilvási Anikónak, hogy hasznos észrevételeivel végig segítette munkámat és szakmai alaposágára, támogatására mindig számíthattam.

Köszönet illeti Dr. Bors András, hogy bármikor fordulhattam hozzá szakmai tanácsért, vagy néhány frappáns észrevételért.

Köszönettel tartozom Dr. Andrikovics Hajnalkának, hogy szakmai elhivatottságával példát állított elem, javaslatai és tanácsai mindig értékesnek bizonyultak.

Köszönöm Dr. Balassa Katalinnak, hogy bármikor fordulhattam hozzá kérdésekkel, alapos válaszai, lelkiismeretessége nagyon sokat jelentettek számomra.

Szeretnék köszönetet mondani a sok segítségért a Magyar Óssejt-donor Regiszter vezetőjének, Dr. Rajczy Katalinnak, valamint munkatársainak, Garamszegi Mónikának és Hossó Adriennek.

Köszönet illeti a Transzplantációs Immungenetikai Laboratórium valamennyi munkatársát, akik sokféle módon segítettek munkámat és biztosították a jó munkahangulatot.

Szeretném megköszönni férjemnek, Mesterházy Andrásnak, hogy végig bátorított és támogatott a disszertáció megírása alatt.

Végezetül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy folyamatos érdeklődésükkel és bátorításukkal arra ösztönöztek, hogy a dolgozat mihamarabb elkészülhessen.

Doktori értekezésemet sógornőmnek, Mesterházy-Ács Zsófiának ajánlom. Az akut mieloid leukémia miatt bekövetkezett fájdalmasan korai halála még jobban fokozta elhivatottságomat, hogy ez a munka mindenképpen létrejöhessen.

## 12 Függelék

### 12.1 Ábrák jegyzéke

1. Ábra: A HLA génkomplex elhelyezkedése a 6. kromoszómán
2. Ábra: Az MHC-I és MHC-II molekulák felépítése
3. Ábra: A HLA gének öröklésmenete
4. Ábra: A HLA-rendszer nevezéktana
5. Ábra: A C\*04:01 és C\*04:09N allélek nukleotid és aminosav szekvenciájában azonosított különbség
6. Ábra: A humán hematopoézis
7. Ábra: A III-IV-es fokozatú akut GVHD kumulatív incidencia görbéje
8. Ábra: Kaplan-Meier szerint ábrázolt összesített túlélés a donor típusa szerint
9. Ábra: Kaplan-Meier szerint ábrázolt összesített túlélés a donor típusa szerint MAC (A) és RIC (B) kezelést követően
10. Ábra: Nemzetközi őssejtátültetések száma a donor típusa szerint 1990 és 2016 között.
11. Ábra: Donorkeresési algoritmus HSCT-t megelőzően
12. Ábra: A HLA-C\*04:09N meghatározására létrehozott allélspecifikus PCR kiértékelése gélelektroforézissel
13. Ábra: A kumulatív AF értékek grafikus ábrázolása
14. Ábra: A genetikai távolságok ábrázolása a kilenc vizsgált populáció között NMDS módszerrel

### 12.2 Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: A fő HLA lókuszokban azonosított allélek, fehérjék és null allélek száma
2. táblázat: A HLA-C\*04:09N allélgyakoriság és haplotípus frekvencia vizsgálatokhoz felhasznált populációk
3. táblázat: A HLA-A, -B, -DRB1 allélcsoport gyakoriság vizsgálatokhoz felhasznált populációk
4. táblázat: A HLA-C\*04:09N allél azonosítására létrehozott allélspecifikus PCR során használt primerek szekvenciái
5. táblázat: Az allélspecifikus PCR körülményei
6. táblázat: Az NMDS során használt stress függvények értékelése

7. táblázat: A C\*04:09N allél jelenlétének vizsgálatára irányuló allélspecifikus PCR és szerológiai módszerrel kapott eredmények összesítése
8. A Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálat  $p$  értékei
9. táblázat: Allélcsoport frekvencia adatok a magyar populációban (HUN) és a Magyar Roma (HUN GYP) populációban a HLA-A, -B és -DRB1 lókuszok tekintetében
10. táblázat: A becsült heterozigótásági értékek a magyar és a magyar roma populációban a HLA-A, -B, -DRB1 tekintetében
11. táblázat: A kilenc populációban detektált allélcsoport frekvencia és becsült heterozigótáság értékek
12. táblázat: Az  $F_{ST}$  értékek (átló alatt) és a hozzájuk tartozó  $p$  értékek (átló felett) a HLA-A (A), HLA-B (B) és HLA-DRB1 (C) lókuszokra