

ORIGINALNI NAUČNI RADOVI ORIGINAL STUDIES

Zavod za transfuziju krvi Novi Sad

Originalni naučni radovi
Original study
UDK 612.118:575.113.2

NERAVNOTEŽA VEZIVANJA ALELA U MNSs KRVNOGRUPNOM SISTEMU U POPULACIJI JUŽNE BAČKE

LINKAGE DISEQUILIBRIUM IN MNSs BLOOD GROUP SYSTEM IN POPULATION OF SOUTH BAČKA

Svetlana VOJVODIĆ

Sažetak - Neravnoteža vezivanja alela je odlika MNSs krvnogrupnog sistema koja predstavlja pojavu češćeg udruživanja alela vezanih lokusa u genotipovima, od očekivanog pojavljivanja spram alelnih frekvencija svakog pojedinačnog alela. Mera neravnoteže vezivanja alela predstavlja razliku između stvarnih i očekivanih frekvencija genotipova i iskazana je kroz koeficijent neravnoteže vezivanja alela. Cilj rada je da se odredi postojanje fenomena neravnoteže vezivanja alela u MNSs sistemu u populaciji Južne Bačke na osnovu izračunatih alelnih frekvencija. Ispitivanje krvnogrupne pripadnosti u MNSs sistemu je obuhvatilo obradu 1.000 zdravih nesrodnih osoba, nakon čega su primenom populaciono-genetičke analize izračunavane alelne (genske) frekvencije, stvarne i očekivane frekvencije genotipova, njihove razlike i statistička značajnost dobijenih razlika. Rezultati ispitivanja su pokazali da najvišu alelnu frekvenciju ima s alel (0,672), najmanju S alel (0,33), da su najviše očekivane frekvencije genotipova izračunate za Ms/Ns (0,2235) i Ms/Ns (Ms/NS) (0,2182) genotipove, dok su najviše stvarne frekvencije kod genotipova: Ms/Ns (0,193), MS/Ns (Ms/NS) (0,184) i Ns/Ns (0,153). Statistički značajna razlika očekivanih i stvarnih frekvencija genotipova je nađena za genotipove MS/MS i Ns/Ns, što govori o češćem udruživanju alela M i S i N i s, odnosno o postojanju fenomena neravnoteže vezivanja alela u populaciji Južne Bačke.

Ključne reči: Neravnoteža vezivanja; MNSs krvno grupni sistem; Aleli; Genotip

Summary - Linkage disequilibrium is a characteristic of MNSs blood group system which performs more frequent association of linked alleles than it is expected in comparison with their allelic frequencies. Measure of linkage disequilibrium is the difference between expected and actual genotypic frequencies which is stated in coefficient of linkage disequilibrium. The purpose of this study was to fortify existence of linkage disequilibrium phenomenon inside MNSs blood group system in population of South Bačka in comparison with calculated allelic frequencies. Blood group typing in MNSs system included 1.000 healthy nonrelated persons where allelic frequencies, expected and actual genotype frequencies had been calculated, as well as the differences between them. Results of investigation showed that allele has the highest allelic frequency (0,672), S allele has the lowest frequency (0,33), the highest expected frequencies are calculated for Ms/Ns (Ms/NS) (0,218) and Ms/Ns (0,2235) genotypes, while the actual frequencies are highest for MS/MS (Ms/NS) (0,184), Ms/Ns (0,193) and Ns/Ns (0,153) genotypes. Statistically significant difference between expected and actual genotypic frequencies occurs for Ms/MS and Ns/Ns genotypes, which means that S and M and N and s alleles are more frequently associated and prove the existence of linkage disequilibrium phenomenon in population of South Bačka.

Key words: Linkage Disequilibrium; MNSs Blood Group System; Alleles; Genotype

Uvod

MNSs krvnogrupni sistem je polimorfni sistem koga čine pet antigena velike učestalosti M, N, S, s i U, i mnoštvo asociiranih krvnogrupnih antigena koji odražavaju njihove genetske varijante. Jedna od osobina MNSs krvnogrupnog sistema jeste postojanje vezanog nasleđivanja alela ili linkaže.

Vezano nasleđivanje ili linkaža predstavlja izuzetak od Mendelovog zakona o nezavisnoj segregaciji naslednih karakteristika tokom mejotske deobe [1,2,3,4]. Linkaža je pojava kad se dva različita gena smeštena na istom hromozomskom paru ne razdvajaju nezavisno tokom mejotske deobe, pa se prenose nerazdvojeni na gamete [5].

Introduction

MNSs blood group system is a polymorphous system composed of five antigens of high frequency: M, N, S, s and U, and large number of associated blood group antigens which reflect their genetic variants. One of the remarkable characteristics of MNSs blood group system is the existence of linked inheritance of their alleles or linkage.

Linked inheritance of alleles or linkage, represents an exception of Mendelian segregation of hereditary traits during meiotic division [1,2,3,4]. Linkage represents the occurrence when two different genes located on the same chromosome pair do not segregate independently during meiotic division and transmit unseparately to gametes [5].

Skraćenice

HLA	- <i>humani limfocitni antigeni</i>
MNSs	- <i>M, N, S i s krvnogrupsni antigeni</i>
crossingover	- <i>ukrštanje genetskog materijala</i>
Rh	- <i>antigeni Rhesus krvnogrupsnog sistema</i>

Kada su lokusi blisko vezani, rekombinacija je kod njih smanjena, tj. ukoliko su geni bliži jedan drugom na hromozomu, utoliko je manja verovatnoća da će doći do ukrštanja genetskog materijala [5]. Blisko locirani aleli istog hromozoma teže da se prenose zajedno iz generacije u generaciju i nasleđuju se u bloku, obrazujući haplotip [1,6].

Na osnovu postojanja vezanog nasleđivanja alela kod polimorfni multialelnih krvnogrupsnih sistema, zapažena je pojava neravnoteže vezivanja alela ili pojava neslučajnih asocijacija alela nazvana i gametski disekvilibririjum. Pojam neravnoteže vezivanja alela ili gametskog disekvilibririjuma predstavlja pojavu udruživanja alela vezanih lokusa više ili manje frekventno od očekivanog pojavljivanja, spram alelnih frekvencija svakog pojedinačnog alela. Kod alela koji se tokom mejotske deobe razdvajaju nezavisno i podležu zakonu nezavisne segregacije, stvarne frekvencije genotipova koje čine ti aleli, biće jednake produktu alelnih frekvencija tih individualnih alela. Kada je u pitanju vezano nasleđivanje, koje odstupa od Mendelovog zakona o nezavisnoj segregaciji alela tokom mejoze, stvarne frekvencije nekih genotipova koje čine aleli vezanih lokusa nisu jednake očekivanim frekvencijama. Drugim rečima, kod pojedinih alela vezanih lokusa dolazi zbog neravnoteže vezivanja alela do njihovog češćeg udruživanja nego što se očekuje spram alelnih frekvencija svakog od alela.

Fenomen neravnoteže vezivanja alela, *linkage disequilibrium* ili gametski *disequilibrium*, prvo je zapažen u odnosu na alele Rh krvnogrupsnog sistema. Fisher R. [6] uočio je 1943. godine, analizirajući podatke o raspodeli fenotipova Rh krvnogrupsnog sistema u jednoj populaciji, da se neki od alela u kombinacijama sa drugima ne javljaju u očekivanim frekvencijama nego učestalije, pri čemu se narušava ekvilibrijum ili ravnoteža u udruživanju alela. Na osnovu ovih zapažanja, Fisher je dao i svoje tumačenje o nasleđivanju polimorfni sistema, kakav je Rh krvnogrupsni sistem, po kome je nasleđivanje determinisano serijom blisko vezanih alela, među kojima je *crossingover* veoma redak. Različite kombinacije antigena D, C, c, E ili e nasleđuju se zajedno [7].

Na primer, pojava neravnoteže vezivanja alela zapažena je i u HLA (*Human Lymphocyte Antigens*) sistemu koji je poznat kao najpolimorfniji sistem u čoveka. U HLA sistemu uočeni su brojni primeri neravnoteže vezivanja alela kod belaca [6,7,8,9,10], kao na primer, A1B8, A3B7, A2B5, B8Dw3, B7Dw2, dok je kod Rh sistema uočeno frekventnije pojavljivanje cDe/cde i cde/cde kombinacija u poređenju sa Cde/cde [10].

Abbreviations

HLA	- <i>Human Lymphocyte Antigens</i>
MNSs	- <i>M, N, S and s blood group antigens</i>
crossing over	- <i>recombination of hereditary material</i>
Rh	- <i>antigens of Rhesus blood group system</i>

In cases when genetic loci are closely linked, recombination rate is much lower, respectively, if the genes are located closer to each other on the same chromosome, there is a lower probability for crossing over [5].

Closely linked alleles located on the same chromosome tend to transmit together from generation to generation and are inherited in block, creating a haplotype [1,6].

On the basis of linked inheritance of alleles, in polymorphous multiallelic blood group systems, appearance of linkage disequilibrium of alleles occurs or unexpected associations of alleles named gametic disequilibrium.

The phenomenon of linkage disequilibrium or gametic disequilibrium represents association of linked loci more or less frequently than it is expected in regard to allelic frequencies of each single gene.

In alleles which segregate independently during meiotic division, and being liable of independent segregation law, observed frequencies of genotypes which are composed of these alleles, will be equal to the product of individual alleles frequencies.

In case of linked inheritance which does not follow Mendel's law of independent segregation of alleles, observed frequencies of some genotypes which are composed of linked loci, are not equal to expected frequencies. In other words, in some alleles of linked loci it becomes evident that alleles are more commonly associated than it is expected in regard to each allelic frequency.

The phenomenon of linkage disequilibrium or gametic disequilibrium was first noticed in relation to the alleles of the Rh blood group system. In 1943 Fisher R. [6] noticed, during examination of Rh blood group phenotypes distribution in population, that some of alleles presented in several combinations, do not occur in expected frequencies, but more frequently, therefore, the equilibrium or balance in associations of alleles is violated.

According to these findings, Fisher postulated his own explanation of polymorphous systems inheritance, where Rh blood group system belongs, and their inheritance is determined by series of closely linked loci, with very rare crossing-over among them. Therefore, various combinations of antigens D, C, E, c and e are inherited together [7].

Linkage disequilibrium phenomenon is seen also in HLA (*Human Lymphocyte Antigens*) system which is the most polymorphous system in humans. In HLA system numerous examples of disequilibrium linkage phenomenon are noticed in whites [6,7,8,9,10], for

MNSs krvnogrupni sistem je dobar primer gde se uočava postojanje fenomena gametskog disekvilibrizacije. U ovom sistemu je uočeno češće udruživanje alela M i S i N i s nego što je očekivano u odnosu na alelne frekvencije [11].

Kada se dva vezana gena u genotipu ponašaju tako da njihovo zajedničko pojavljivanje ne utiče na gensku frekvenciju ni jednog ni drugog alela, tada se oni nalaze u ekvilibrijumu ili ravnoteži vezivanja. Aleli kod kojih postoji neravnoteža vezivanja mogu tokom mnogih generacija dostići taj ekvilibrijum, i udruživati se u skladu sa njihovim individualnim frekvencijama u populaciji [1], što se dešava u populacijama slobodne oplodnje. Smanjenje tog disekvilibrizacije biće zavisno od frekvencije rekombinacije, i kada se ekvilibrijum jednom postigne, tada će gameti nastali serijom vezanog nasleđivanja i nezavisnog razvrstavanja biti u istoj frekvenciji.

Neravnoteža vezivanja alela smatra se jednim od bitnih mehanizama koji održavaju genetičku varijabilnost populacija. U formiranju određenog nivoa genetičke varijabilnosti populacija učestvuju više mehanizama, od kojih neki predstavljaju i glavne snage evolucionih procesa. Tu spadaju mutacije, protok gena između lokalnih populacija, genetički drift (genetička slučajnost), migracije, prirodna selekcija itd. [6,12,13].

Termine vezanih (*linkage*) alela, treba razlikovati od pojave udruženosti-asocijacije pojedinih krvnogrupnih alela sa određenim bolestima. Primeri povezanosti krvnogrupnih antigena i nekih bolesti, poznati su, ali su brojniji i čvršći u HLA sistemu nego u bilo kom krvnogrupnom sistemu.

Materijal i metode

Određivana je krvnogrupna pripadnost u MNSs sistemu kod 1.000 zdravih nesrodnih osoba sa svih područja regiona Južne Bačke, sa najvećim brojem ispitanika iz najrazvijenijih centara. Među ispitanicima je 701 muškarac i 299 žena, svih starosnih kategorija od 20 do 79 godina, sa najvećim brojem ispitanika srednjeg životnog doba u intervalu 40-44 godine.

Determinisanje fenotipske ekspresije krvnogrupnih antigena MNSs sistema na ispitivanim eritrocitima, uz pomoć antiseruma poznatih specifičnosti, podrazumeva sprovođenje serološke reakcije aglutinacije koja se sprovodi uz poštovanje osnovnih uslova za njeno odvijanje, a to su: uslovi za delovanje zakona o dejstvu aktivnih masa, tj. srazmera, koja mora biti 2:1 u korist seruma; sredina, koja za antigene MNSs sistema predstavlja 3-5% suspenziju eritrocita u fiziološkom rastvoru; temperatura, koja je različita u zavisnosti od tipa antitela i može biti +4°C i +22°C, ako su u pitanju kompletna antitela IgM klase (za M i N antigene), i +37°C, za inkompletna antitela IgG klase (za S i s antigene); vreme inkubacije, koje zavisi od upotrebljenog antiseruma,

example A1B8, A3B7, A2B5, B8Dw3, B7Dw2, while in Rh blood group system there is a more frequent occurrence of cDe/cde and cde/cde combinations in comparison to Cde/cde [10].

MNSs blood group system is a good example where gametic disequilibrium is noticed. In this system more frequent association between M and S and N and s alleles occur, than it is expected in regard to their allelic frequencies [11].

When two linked loci in a genotype are associated so that this does not influence the gametic frequencies of either of alleles, then they are in equilibrium, or in balance of linking. Genes with disequilibrium linkage phenomenon can, during many generations, reach equilibrium, and associate in accordance with their individual frequencies in population [1], which happens in random matching populations.

Reduction of disequilibrium linkage between closely linked loci, depends on the recombination rate, and once when equilibrium is reached, gametes transmitted by assembly of linked inheritance and independent segregation will be in equal frequency.

Disequilibrium linkage phenomenon is considered to be as one of essential mechanisms which preserves genetical variability in populations. Several mechanisms are involved in creating certain values of genetic variabilities in populations, and some of them represent the leading energy in evolution processes. In this group are mutations, gene flow among local populations, genetic drift, migrations, natural selection etc. [6,12,13].

The terms linkage or linked loci, must be differed from the occurrence of associations between some blood group antigens with certain diseases. Numerous examples of associations between blood group alleles and several diseases are known, but these associations are stronger and more frequent with HLA antigens than any of the blood group system antigens.

Material and methods

MNSs blood group was determined in 1000 healthy unrelated persons from all parts of South Bačka region, most of them being from the most developed centers. There were 701 men and 299 women, from 20-79 years of age, most aged 40-44 years.

Determination of the phenotype expression of MNSs blood group antigens on the erythrocyte surface, using antisera with known specificities, means conduction of serological reaction of agglutination which requires special conditions which are as follows: conditions for performing the fundamental law of mass action, that is proportion, which must be 2:1 with benefit to serum; - environment, for MNSs antigens 3-5% erythrocyte suspension in physiological saline; - temperature, which is different for various

čiji optimum dejstva propisuje proizvođač antiseruma.

Rezultati imunohematološkog ispitivanja poslužili su za primenu populaciono-genetičke analize kojom su izračunavani sledeći parametri:

Alelne (genske) frekvencije

Alelne (genske) frekvencije dobijaju se računanjem po formuli:

$$\text{alelna frekvencija} = \frac{2x (\text{broj MM homozigota}) + (\text{broj MN heterozigota})}{2x \text{ ukupan broj individua [12,14]}}$$

Stvarne frekvencije genotipova

Nađene ili stvarne frekvencije genotipova dobijene su na osnovu podataka o broju osoba koje pripadaju određenom genotipu u odnosu na ukupan broj osoba [14,15].

Očekivane frekvencije genotipova

Računate su očekivane frekvencije genotipova, koje su, u populaciji slobodne oplodnje, u skladu sa Hardy-Weinbergovim zakonom ravnoteže ili ekvilibrijuma, po kome se frekvencije genotipova računaju po formuli:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1.$$

Kada se posmatraju dva ili više lokusa zajedno, očekivana frekvencija za dva lokusa dobija se množenjem očekivane frekvencije za svaki pojedinačni lokus prema tabeli 1.

Koeficijent gametskog disekvilibrijuma (Δ) računat je po sledećoj formuli:

Tabela 1. Očekivana frekvencija genotipova u slučaju dva lokusa

Table 1. Expected genotype frequency in case of two loci

Genotipovi i frekvencija	r2 (SS)	2rs (Ss)	s2 (ss)
<i>Genotypes and frequency</i>			
p2(MM)	p2r2(MMSS)	2p2rs(MMSs)	p2s2(MMss)
2pq(MN)	2pqr2(MNSS)	4pqrs(MNSs)	2pqs2(MNss)
q2(NN)	q2r2(NNSS)	2q2rs(NNSs)	q2s2(NNss)

[12]

$$\Delta = F - p1q1,$$

gde je:

F = uočena frekvencija za datu gensku frekvenciju,

p1q1 = očekivana frekvencija za tu gensku kombinaciju (65,66,67,68,69,70,71).

Statistička značajnost razlike učestalosti stvarnih i očekivanih vrednosti genotipova je računata χ^2 testom, putem vrednosti izraženih apsolutnim brojevima, po sledećoj formuli:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{stvarne-očekivane})^2}{\text{očekivane}}$$

Stepen slobode je uvek 1 [16].

types of antibodies, and may be +4°C and +22°C if there are IgM class antibodies (for M and N antigens), and +37°C for IgG antibodies (for S and s antigens); - incubation time which depends on used antisera with conditions for optimal conduction determined by the producer.

The results of immunohematological investigation were used as basis for performing a population-genetic analysis which was used to establish the following parameters:

Allelic (gene) frequencies

Allelic frequencies were calculated using the following formula:

$$\text{allelic frequency} = \frac{2x (\text{number of MM homozygotes}) + (\text{number of MN heterozygotes})}{2x \text{ total number of individuals [12,14]}}$$

Determined genotype frequencies

Determined genotype frequencies were calculated on the basis of the number of persons who belong to a certain genotype in comparison to the total number of investigated persons [14,15].

Expected genotype frequencies

Expected genotype frequencies were calculated in accordance with Hardy-Weinberg's law or equilibrium, mostly in random mating populations, using formula:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1.$$

When two or more loci have been observed together, expected frequencies for two loci are obtained by multiplying the expected frequencies for each single gene, according to table 1:

Gametic disequilibrium coefficient (Δ)

Gametic disequilibrium coefficient was calculated by following formula:

$$\Delta = F - p1q1,$$

F = determined frequency for given gene frequency,

p1q1 = expected frequency for that gene combination (65,66,67,68,69,70,71).

Statistical significance of differences between determined and expected genotype frequencies was calculated using chi-square test, with absolute number of values, using the following formula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{determined-expected})^2}{\text{expected}}$$

The degree of freedom is always 1 [16].

Results

Results of investigation pointed to the following values of allelic (gene) frequencies, presented in table 2.

Rezultati ispitivanja

Rezultati ispitivanja pokazali su sledeće vrednosti alelnih (genskih) frekvencija, prikazanih tabeli 2.

Tabela 2. Alelne (genske) frekvencije

Table 2. Allelic (gene) frequencies

Alelne frekvencije/Allelic frequencies	
Alel/Allele	Frekvencija/Frequency
M	0,55
N	0,45
S	0,328
s	0,672

U tabeli 3 prikazane su izračunate vrednosti očekivanih frekvencija genotipova.

Tabela 3. Očekivane frekvencije genotipova

Table 3. Expected genotype frequencies

Očekivane frekvencije genotipova Expected frequencies	
Genotip/Genotype	Frekvencija/Frequency
MS / MS	0,0325441
MS / Ms	0,1333516
Ms / Ms	0,1366041
MS / NS	0,053254
MS / Ns (Ms/NS)	0,2182118
Ms / Ns	0,223534
NS / NS	0,0217857
NS / Ns	0,0892684
Ns / Ns	0,0914457

Prema izračunatim vrednostima očekivanih frekvencija genotipova za dva lokusa sa četiri alela, najvišu vrednost uočavamo kod genotipa Ms/Ns (0,223534) i MS/Ns (Ms/NS) (0,2182118). Najniže vrednosti očekivanih frekvencija genotipova izračunate su za genotip MS/MS (0,0325441) i NS/NS (0,0217857).

Tabela 4 prikazuje vrednosti stvarnih frekvencija genotipova.

Najviše stvarne frekvencije genotipova uočavaju se kod genotipova Ms/Ns (0,194), MS/Ns (Ms/NS) (0,184) i Ns/Ns (0,153). Najniže vrednosti stvarnih frekvencija genotipova nađene su za genotip NS/NS (0,02) i MS/NS (0,06).

U tabeli 5 prikazane su razlike između očekivanih i stvarnih frekvencija genotipova, odnosno koeficijent neravnoteže vezivanja alela nazvan i koeficijent gametskog disekvilibrizma.

Na grafikonu 1 prikazan je koeficijent neravnoteže vezivanja alela ili gametskog disekvilibrizma.

Vrednost koeficijenta gametskog disekvilibrizma je kod nekih genotipova sa negativnim predznakom, a kod nekih je pozitivna. Pozitivna vrednost koeficijenta gametskog disekvilibrizma ukazuje na češće udruživanje alela koji su u sastavu genotipova čija je vrednost (Δ) pozitivna što se ne očekuje spram njihovih alelnih frekvencija. U grupi zdravih ispitanika

Table 3 shows the calculated values of expected genotype frequencies.

According to the calculated values of expected genotype frequencies of two loci and four alleles, the highest values occurred for genotypes Ms/Ns (0,223534) and MS/Ns (Ms/NS) (0,2182118). The lowest values of expected genotype frequencies were calculated for genotypes MS/MS (0,0325441) and NS/NS (0,0217857).

Table 4 presents the values of determined genotype frequencies.

The most common determined genotype frequencies occurred for genotypes Ms/Ns (0,194), MS/Ns (Ms/NS) (0,184) and Ns/Ns (0,153). The lowest values of determined genotype frequencies were found for genotypes NS/NS (0,02) and MS/NS (0,06).

Tabela 4. Stvarne frekvencije genotipova

Table 4. Determined genotype frequencies

Stvarne frekvencije genotipova Determined genotype frequencies	
Genotip/Genotype	Frekvencija/Frequency
MS / MS	0,064
MS / Ms	0,13
Ms / Ms	0,139
MS / NS	0,057
MS / Ns (Ms / NS)	0,184
Ms / Ns	0,193
NS / NS	0,02
NS / Ns	0,06
Ns / Ns	0,153

Table 5 shows the differences between expected and observed genotype frequencies, respectively, the coefficient of linkage disequilibrium, named gametic disequilibrium coefficient.

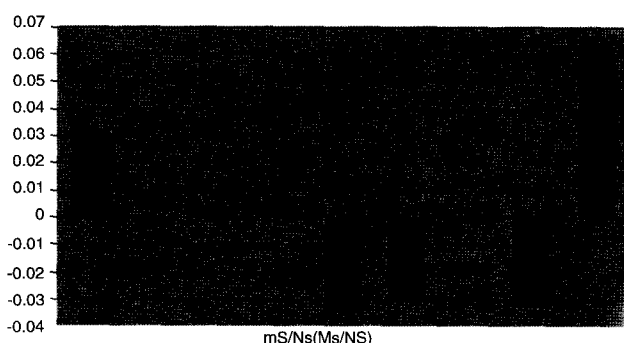
Tabela 5. Koeficijent neravnoteže vezivanja alela ili gametskog disekvilibrizma

Table 5. Linkage disequilibrium coefficient

Koeficijent gametskog disekvilibrizma: Δ Linkage disequilibrium coefficient: Δ	
Genotip/Genotype	Δ
MS / MS	0,0314559
MS / Ms	- 0,0033516
Ms / Ms	0,0023959
MS / NS	0,003746
MS / Ns (Ms / NS)	-0,0342118
Ms / Ns	-0,030534
NS / NS	-0,0017857
NS / Ns	-0,0292684
Ns / Ns	0,0615543

Graph 1 presents the coefficient of linkage disequilibrium, or gametic disequilibrium coefficient.

The disequilibrium linkage coefficient for some genotypes was negative, while for some it was positive. The positive value of disequilibrium linkage coefficient points to more frequent association of alleles



Grafikon 1. Koeficijent neravnoteže vezivanja alela ili gametskog disekvilibriruma

Graph 1. Linkage disequilibrium coefficient

pozitivna vrednost koeficijenta gametskog disekvilibriruma uočava se kod genotipova MS/MS, Ms/Ms, MS/NS i Ns/Ns, dok je za ostale genotipove ta vrednost negativna.

Testirana je nulta hipoteza da nema statistički značajne razlike između stvarnih i očekivanih vrednosti genotipova ili koeficijenta gametskog disekvilibriruma.

Od genotipova sa pozitivnim koeficijentom gametskog disekvilibriruma, nađena je statistički značajna razlika između stvarnih i očekivanih frekvencija, kod genotipova MS/MS i Ns/Ns, što ukazuje na češće udruživanje alela M i S i N i s.

Diskusija

Neravnoteža vezivanja alela uočena je najpre u Rh krvnogrupnom sistemu a kasnije i u HLA sistemu, gde je zapaženo češće udruživanje pojedinih alela u genotipovima kao na primer: A1B8, A2B5, A3B7... I MNSs krvnogrupni sistem je dobar primer postojanja ovog fenomena. Neravnoteža vezivanja alela predstavlja jedan od bitnih mehanizama održavanja genetske varijabilnosti u populacijama.

Faktore koji menjaju genetičku ravnotežu populacije i doprinose genetskoj varijabilnosti, možemo podeliti u one koji dovode do sistematskih promena i one koji dovode do slučajnih, nesistematskih promena u frekvenciji genskih alela u populacijama. U sistematske faktore spada selekcija, a u slučajne faktore mutacije, migracije i genetički drift ili genetička slučajnost.

Izučavanje uzroka nastanka i održavanja fenomenne neravnoteže vezivanja alela u populacijama ukazalo je na postojanje nekoliko mogućih mehanizama koji pojedinačno ili u sadejstvu dovode do njegovog nastanka. Do sada opisani u literaturi su: jake genske interreakcije, epistaze ili maskiranje dejstva gena od strane drugog, rekombinacije koje nastaju zbog inverzije ili translokacije, a kao mogući mehanizam navodi se i smanjena izmena genskog materijala to-

Tabela 6. Statistička značajnost koeficijenta gametskog disekvilibriruma Δ

Table 6. Statistical significance of linkage disequilibrium coefficient Δ

Statistička značajnost koeficijenta disekvilibriruma Statistical significance of Δ	
Genotip/Genotype	χ^2
MS / MS	30,404086
Ms / Ms	0,0420217
MS / NS	0,2635016
Ns / Ns	135,85266
$p < 0,05$	$V = 3,841$

with the genotypes with positive coefficient (Δ) than it is expected in regard to their allelic frequencies. In our group of investigated persons, positive values of disequilibrium linkage coefficient occurred for genotypes MS/MS, Ms/Ms, MS/NS and Ns/Ns, while for other genotypes these values were negative.

The null hypothesis that there are no significant differences between expected and determined genotype frequencies, or for values of disequilibrium linkage coefficient was tested. Among genotypes with positive values of disequilibrium linkage coefficient, there are statistically significant differences between determined and expected genotype frequencies for genotypes MS/MS and Ns/Ns, which points to more frequent association of M and S and N and s alleles.

Discussion

The phenomenon of linkage disequilibrium was first noticed in Rh blood group system and then in HLA system, where more frequent associations between some alleles in genotypes were noticed as for example: A1B8, A2B5, A3B7... MNSs blood group system is also a good example for this phenomenon. Linkage disequilibrium represents one of essential mechanisms which preserves genetic variabilities in populations.

The main factors which contribute to changing of genetic balance and genetic variabilities, can be classified as those which lead to systematic changes, and those which lead to unexpected, unsystematic changes of gene frequencies in populations. Systematic factors include natural selection, but unsystematic include mutations, migrations and genetic drift.

Investigations of causes and maintenance of linkage disequilibrium phenomenon in populations, pointed to several possible mechanisms which separately or in association contribute to their development. Up to now, the following causes have been described in literature: strong gene inter-reactions, epistasis or masking some gene effects under the influence of another gene, recombinations, which occur due to inversion or translocation, and as a possible mechanism there is also decreased change of hereditary material during meiotic division as well is linked inheritance [12].

kom mejotske deobe kao kod vezanog nasleđivanja [12].

Pojava neravnoteže vezivanja alela može biti posledica selektivne nadmoći nekog haplotipa nad drugim, nedovoljno dugog vremena da bi se dostigao ekvilibrijum narušen delovanjem mutacija ili nekim drugim uzrokom nastanka ovog fenomena, a mogući mehanizam je i inhibicija rekombinacije pojedinih DNA sekvencija koja dovodi do gametskog disekvilibrijuma [1].

Među faktorima koji dovode do održavanja ovog fenomena kroz generacije, ključnu ulogu igra izolovanost populacija.

U velikim populacijama u kojima vlada slobodna oplodnja, gde iz generacije u generaciju dolazi do pojave novih i raznovrsnih genotipova, koeficijent neravnoteže vezivanja alela će se iz generacije u generaciju smanjivati da bi u nekoj od generacija dostigao 0 ili ekvilibrijum. Nasuprot tome, u izolovanim populacijama gde ne vlada takav odnos genotipova i ukoliko delovanjem selekcije dolazi do favorizovanja jedne kombinacije alela nad drugom, koeficijent neravnoteže vezivanja alela će se iz generacije u generaciju povećavati a neravnoteža alela održavati.

Razlike učestalosti stvarnih i očekivanih frekvencija genotipova u zigotima, izražavaju se kroz koeficijent gametskog disekvilibrijuma (Δ). Na osnovu postojanja tih razlika potvrđuje se prisutnost fenomena disekvilibrijuma linkaže u MNSs krvnogrupsnom sistemu u populaciji Južne Bačke, a rezultati ovog dela ispitivanja u skladu su sa navedenim literaturnim podacima koji govore o neslučajnim asocijacijama alela [17,18]. Pozitivna vrednost koeficijenta gametskog disekvilibrijuma uočava se za genotipove MS/MS, Ms/Ms, MS/NS i Ns/Ns. To znači da svi genotipovi sa pozitivnom vrednošću koeficijenta gametskog disekvilibrijuma ispoljavaju frekventnije pojavljivanje i zastupljenost nego što se očekuje u odnosu na njihove genske frekvencije.

Pomenuti genotipovi u MNSs sistemu, ispoljavaju znatno učestalije pojavljivanje u populaciji Južne Bačke, a te razlike učestalosti statistički su signifikantne kada su u pitanju genotipovi MS/MS i Ns/Ns. Genotip MS/MS ima očekivanu frekvenciju genotipa 0,0325441 (tabela 3) koja je izračunata u odnosu na pojedinačne genske frekvencije M i S alela. Stvarno nađena frekvencija genotipa MS/MS je 0,064 (tabela 4). Ista je situacija i sa genotipom Ns/Ns gde su razlike između očekivane frekvencije (0,0914457) (tabela 3) i stvarno nađene (0,153) još izrazitije, pa je razlika očekivanih i stvarnih frekvencija pozitivna. To znači da se te kombinacije alela javljaju češće nego što se očekuje spram njihovih alelnih frekvencija. Ovi podaci ukazuju na učestalije udrživanje alela M i S i N i s, što je u skladu sa literaturnim podacima, a na osnovu postojanja disekvilibrijuma linkaže u populaciji Južne Bačke zapaža se usaglašenost u odnosu na većinu evropskih

Occurrence of linkage disequilibrium phenomenon may be a result of selective superiority of some haplotypes, insufficient time for reaching equilibrium which is violated by mutations or some other causes, and a possible mechanism is also recombination inhibition of several DNA sequences which contribute to gametic disequilibrium [1].

Among factors which contribute to maintenance of this phenomenon through many generations, isolation of populations plays the essential role.

In large populations with random-mating, where from generation to generation there are new, various genotypes, linkage disequilibrium coefficient is lower through generation to generation, with tendency to reach 0 in some generation or equilibrium. On the contrary, in isolated populations, where there are not so many genotypes, and the natural selection leads to favoring one allelic combination, linkage disequilibrium coefficient gets higher from generation to generation, and the disbalance between alleles is maintained.

Differences between expected and determined genotype frequencies in the zygotes, are presented by gametic disequilibrium coefficient (Δ). On the basis of occurrence of these differences, this phenomenon within MNSs blood group system in the population of South Bačka is confirmed, and results of investigation are in accordance with literature data pointing to unexpected allelic associations [17,18]. Positive levels of linkage disequilibrium coefficient were noticed for genotypes MS/MS, Ms/Ms, MS/NS and Ns/Ns. This means that genotypes with positive values of gametic disequilibrium coefficient exhibit more frequent occurrence than it is expected in regard to their gene frequencies.

The above mentioned genotypes in the MNSs blood group system, exhibit considerably frequent occurrence in population of South Bačka, whereas differences between determined and expected frequencies are statistically significant for genotypes MS/MS and Ns/Ns. The genotype MS/MS has the expected genotype frequency 0,0325441 (table 3) which is calculated in regard to gene frequencies of M and S alleles. Determined frequency for MS/MS genotype is 0,064 (table 4). The same goes for genotype Ns/Ns where differences between expected (0,0914457) (table 3) and determined frequency (0,153) are more expressive, therefore, the difference between them is positive. These results show that these allelic combinations are more frequent than it is expected in regard to their allelic frequencies. They also point to more frequent associations between M and S and N and s alleles, which is in accordance with literature data. On the basis of occurrence of linkage disequilibrium phenomenon in the population of South Bačka, there is a considerable resemblance to the results of majority European populations and white race in other geographical regions.

populacija i pripadnika bele rase u drugim geografskim područjima.

Zaključak

Analiza alelnih (genskih) frekvencija u ispitanika sa područja regiona Južne Bačke ukazuje da najvišu alelnu frekvenciju od 0,672 ima s alel a najnižu (0,33) ima S alel.

Na osnovu izračunatih očekivanih frekvencija genotipova u MNSs krvnogrupnom sistemu, najviše vrednosti se uočavaju za genotipove MS/Ns (Ms/NS) (0,2182) i Ms/Ns (0,2235).

Stvarne frekvencije genotipova pokazuju najviše vrednosti za genotipove MS/Ns (Ms/NS) (0,184), Ms/Ns (0,193) i Ns/Ns (0,153).

Positivna vrednost koeficijenta neravnoteže vezivanja alela uočava se za genotipove Ms/Ms, Ms/Ms, MS/NS i Ns/Ns, što govori o razlikama učestalosti stvarnih i očekivanih genotipova za date genotipove, koja je statistički značajna za MS/Ms i Ns/Ns genotipove. Ta razlika govori o češćem udruživanju M i S i N i s alela, odnosno o postojanju fenomena neravnoteže vezivanja alela u populaciji Južne Bačke.

Conclusion

Analysis of gene frequencies in examinees from South Bačka region, showed that s allele has the highest gene frequency of 0,672 and S allele has the lowest frequency (0,33).

In accordance to calculated expected genotype frequencies in MNSs blood group system, the highest values were found for MS/Ns (Ms/NS) (0,2182) and Ms/Ns (0,2235) genotypes.

Determined genotype frequencies show the highest values for MS/Ns (Ms/NS) (0,184), Ms/Ns (0,193) and Ns/Ns (0,153) genotypes.

Positive levels of linkage disequilibrium coefficient were found for genotypes MS/MS, Ms/Ms, MS/NS and Ns/Ns, which confirmed the differences between determined and expected genotypes, with statistically significant difference for MS/MS and Ns/Ns genotypes.

These differences point to a more frequent association between M and S and N and s alleles, confirming the existence of linkage disequilibrium phenomenon in the population of South Bačka.

Literatura

1. Walker RH. Technical Manual. 11th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1993;189-201:259-66.
2. Rudmann SV. Textbook of blood banking and transfusion medicine. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996; 2-15:121-30.
3. Sinot EV, Dobžanski T. Osnovi genetike. Beograd: Vuk Karadžić, 1970:222-5.
4. Dinić B. Osnovi hematologije krvnih grupa. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga, 1954:71.
5. Emery AEH. Osnovi medicinske genetike. Beograd: Savremena administracija, 1986:52-204.
6. Kičić M, Krajčinović B. Medicinska genetika. Beograd: Defektološki fakultet, 1994:11-491.
7. Mollison PL. Blood transfusion in clinical medicine. 8th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1987:383-93.
8. Stites DP, Stobo JD, Wells JV. Osnovna i klinička imunologija. 2nd ed. Beograd: Savremena administracija, 1989:50-63.
9. Zergollern LJ. Humana genetika. 4th ed. Zagreb: Jugoslavenska medicinska naklada, 1991;199-250:325-32.
10. Vogel F, Motulsky G. Human genetics. 2nd ed. Berlin: Springer Verlag, 1986:55-671.
11. Jakšić B, Grgičević D, Labar B. Hematologija i transfuziologija. Zagreb: Jugoslavenska medicinska naklada, 1989: 804.
12. Borojević K. Geni i populacija. 2nd ed. Beograd: 1991: 162-289.
13. Simonović R. Genetička varijabilnost i neslučajne asocijacije gena koji određuju proteine plazme, eritrocitne i histokompatibilne antigene kod stanovnika Srbije. Magistarski rad. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, 1992.
14. Hartl D. Human Genetics. Chapter 4. Cambridge, 1983: 111-486.
15. Kraljević-Balalić M, Petrović S. Praktikum iz genetike. Novi Sad, 1981:114-349.
16. Snyder LA, Fietelder D, Hartl DL. General genetics. Jones and Bartlett publishers, 1985:506-8.
17. Marinković M. Genetika. Beograd: Naučna knjiga, 1986:259-469.
18. Mourant AE, Kopeć AC, Domaniewska-Sobaczka K. Tables. In: Mourant AE, Kopeć AC, Domaniewska-Sobaczka K, eds. The distribution of the human blood group and other polymorphisms. Oxford: University Press, 1976:142-1016.

Rad je primljen 5. VII 1999.

Prihvaćen za štampu 28. VII 1999.

BIBLID.0025-8105:(2000):LIII:7-8:341-348.