

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

TEPECİK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
DOKU TİPLEME LABORATUVARI'NA BAŞVURAN
BİREYLERİN İNSAN LÖKOSİT ANTİJEN (HLA)
ALLELLERİNİN VE HAPLOTİPLERİNİN
FREKANSLARI

BURCU AKMAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. İBRAHİM PİRİM

2016-İZMİR

**T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**TEPECİK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
DOKU TİPLEME LABORATUVARI'NA BAŞVURAN
BİREYLERİN İNSAN LÖKOSİT ANTİJEN (HLA)
ALLELLERİNİN VE HAPLOTİPLERİNİN
FREKANSLARI**

**BURCU AKMAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. İBRAHİM PİRİM**

Bu tez İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2015-TYL-SABE-0021 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

2016-İZMİR

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**Anabilim Dalı** **Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

*(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)

Üye :

*(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)

Üye :

*(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)

Üye :

*(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)

Üye :

*(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)

ONAY : Butezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

(İMZA)

(Ünvanı, Adı Soyadı)

Enstitü Müdürü

*** (Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA) kısımları silinerek ilgili öğretim üyelerine ait bilgiler bilgisayar ortamında yazılarak imzalatılmalıdır.**

ÖNSÖZ

Bu çalışmam ve yüksek lisans eğitimim süresince her türlü yardım ve fedakârlığı sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmama ışık tutan, ayrıca bana bu çalışmayı vererek kendimi geliştirmemde büyük katkısı olan başta değerli danışman hocam Prof. Dr. İbrahim PİRİM'e ve değerli hocalarım Doç. Dr. Tülay K. AYNA'ya ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ'e; ; tez yazım aşamasındaki her türlü yardımlarından ve manevi desteklerinden dolayı değerli dostlarım Aslı Özkızılcık KOÇYİĞİT'e ve Burcu Çerçi GÜRBÜZ'e; test aşamasında teknik bilgilerinden yararlandığım değerli çalışma arkadaşım Halime KİRAZ'a bu tezi yazarken manevi desteklerini ve sabrını esirgemeyen değerli Doku Tipleme Ekibi'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Her koşulda yanımda olan, sevgisini, desteğini ve sabrını esirgemeyen sevgili aileme sevgilerimi ve saygılarımı sunarım...

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	ii
Önsöz.....	iii
İçindekiler.....	iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	vi
Şekiller Dizini.....	viii
Tablolar Dizini.....	x
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİ	2
2.1 HLA Tarihi.....	2
2.2 İnsan Lökosit Antijenleri (HLA).....	3
2.2.1 HLA Gen Yapısı	4
2.2.1.1 Sınıf I HLA Genleri	5
2.2.1.2 Sınıf II HLA Genleri.....	7
2.2.1.3 Sınıf III HLA Genleri	8
2.2.2 HLA Moleküler Yapısı	9
2.2.2.1 Sınıf I HLA Molekülleri	9
2.2.2.2 Sınıf II HLA Molekülleri.....	10
2.3 HLA Adlandırılması.....	11
2.4 HLA Genlerinin Kalıtımı	12
2.4.1 HLA Haplotipleri	13
2.4.2 Bağlantı Dengesizliği	14
2.5 HLA Polimorfizmi	15
2.6 HLA Fonksiyonu	17
2.6.1 Antijen Sunumu	17
2.6.2 İmmünolojik self/nonself ayrımı.....	18
2.7 HLA ve Hastalık İlişkisi.....	19
3 GEREÇ ve YÖNTEM.....	21
3.1 Çalışma Grubu- Popülasyonu.....	21
3.2 Yöntem	21
3.2.1 PCR-SSP Yöntemi	21

3.2.2	PCR-SSOP Yöntemi	22
3.2.3	Sanger SBT Yöntemi	24
3.2.4	Haplotiplerin Belirlenmesi	25
3.2.5	İstatistiksel Analiz	25
4	BULGULAR	26
5	TARTIŞMA	41
	KAYNAKLAR	49
	ÖZGEÇMİŞ	53

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

- α : Alfa
 β : Beta
 β 2m: β 2-mikroglobülin
CTL: Sitotoksik T lenfositler
D: Bağlantı dengesizliği
D': Göreceli bağlantı dengesizliği (relative LD)
dk: dakika
EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit
HeExp: Beklenen heterozigotluk
HeObs: Gözlenen hetergotluk
HLA: İnsan Lökosit Antijeni
Kb: Kilobaz
kDa: kilo dalton
LD: Bağlantı dengesizliği
Mb: Megabaz
MHC: Majör histokompatibilite kompleksi
p: olasılık değeri (anlamlılık)
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
SA-PE: Streptavidin-Fikoeritrin
SBT: Sekans bazlı tiplleme
SD: Standart sapma
SSOP: Sekans spesifik oligonükleotit prob
SSP: Sekans spesifik primer
TBE: Tris-Boric asit-EDTA
TCR: T hücre reseptörü
T_C: Sitotoksik T lenfosit
T_H: Yardımcı T lenfosit
UV: Ultraviyole
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

Şekiller Dizini

Şekil 1. MHC gen bölgesi	4
Şekil 2. Sınıf I HLA geni	6
Şekil 3. Sınıf II HLA genleri.....	8
Şekil 4. HLA sınıf I ve II moleküllerinin yapısı.	10
Şekil 5. HLA Adlandırılması	12
Şekil 6. HLA-A-B-DR haplotiplerinin kalıtımı.....	14
Şekil 7. Sınıf I ve Sınıf II HLA moleküllerinin antijen sunumu.....	18
Şekil 8. HLA-hastalık ilişkisi.....	19
Şekil 9. HLA lokuslarında saptanan farklı allel sayıları	27
Şekil 10. HLA allellerinin frekansları.....	28
Şekil 11. HLA-B allellerinin frekansları.....	29
Şekil 12. HLA-DRB1 allellerinin frekansları	30
Şekil 13. En sık görülen 5 HLA-A, HLA-B ve HLA-DRB1 allellerinin frekansları	31
Şekil 14 En sık görülen 10 HLA-A-B-DRB1 haplotiplerinin frekansları	32
Şekil 15 Grup 1’de en sık bulunan haplotip frekansları	33
Şekil 16. Grup 2 ve 3’te sık bulunan haplotip frekansları	34
Şekil 17 Grup 4’te sık bulunan haplotip frekansları	35
Şekil 18. HLA-A-B haplotiplerinin frekansları	35
Şekil 19. HLA-B-DR haplotiplerinin frekansları.....	36
Şekil 20. HLA-A-DRB1 haplotiplerinin frekansları.....	37
Şekil 21. Rekombinasyon saptanan aile pedigrisi (1).....	39
Şekil 22.Rekombinasyon saptanan aile pedigrisi (2).....	39
Şekil 23. Rekombinasyon saptanan aile pedigrisi (3).....	40
Şekil 24. Rekombinasyon saptanan aile pedigrisi (4).....	40

Tablolar Dizini

Tablo 1. DR haplotipleri.....	7
Tablo 2. HLA allel sayıları.....	16
Tablo 3. Sınıf I HLA lokuslarının allel sayıları.....	16
Tablo 4. Sınıf II HLA lokuslarının allel sayıları	16
Tablo 5. DRB bölgesi allel sayıları	16
Tablo 6. Aile gruplarının ve bireylerinin sayıları	26
Tablo 7. Hardy-Weinberg Analizi	26
Tablo 8 HLA-A lokusundaki allellerin frekansları	27
Tablo 9. HLA-B allellerinin frekansları	28
Tablo 10. HLA-DRB1 allellerinin frekansları	30
Tablo 11. En sık görülen 26 HLA-A-B-DRB1 haplotiplerinin frekansları.....	31
Tablo 12. Grup 1’de en sık bulunan haplotip frekansları	32
Tablo 13. Grup 2 ve 3’te sık bulunan haplotip frekansları.....	33
Tablo 14. Grup 4’te sık bulunan haplotip frekansları.....	34
Tablo 15. HLA-A-B haplotiplerinin frekansları.....	36
Tablo 16. HLA-B-DRB1haplotiplerinin frekansları	37
Tablo 17. HLA-A-DRB1 haplotiplerinin frekansları	38
Tablo 18. Rekombinasyon sayı ve yüzdeleri.....	38

1 GİRİŞ

İnsan büyük doku uyuşum kompleksini (MHC) kapsayan genler 6. Kromozomun kısa kolunda 6p21.3 bölgesinde yaklaşık 4 megabazlık bir bölgede lokalize olmuşlardır. Hastalıklara yatkınlık ve klinik transplantasyonlarda önemli rol oynayan insan lökosit antijeni (HLA) genlerinin MHC bölgesinde keşfedilmesinin sonucu olarak, yaklaşık son 40 yıldır MHC insan genomunun en kapsamlı çalışılan bölgesidir (1)(2).

HLA genleri hem poligenik hem de polimorfiktir. Bu komplekslik çok sayıda çeşitli peptid sunumu için son derece önemlidir. HLA bölgesi sınıf I, sınıf II ve sınıf III olmak üzere 3 temel bölgeye ayrılır. Sınıf III HLA molekülleri kompleman proteinleri ve sitokinler gibi molekülleri kodlarken, sınıf I ve sınıf II HLA molekülleri antijen sunumunda rol alan transmembran proteinleri kodlarlar (3).

Endojen peptidleri sunan sınıf I HLA molekülleri polimorfik α zinciri ve polimorfik olmayan β zincirinden oluşurken, ekzojen peptidleri sunan sınıf II HLA molekülleri polimorfik α ve β zincirlerinden oluşur (4).

İnsanda en polimorfik bölge olarak bilinen HLA bölgesinde rekombinasyon düşük oranda gerçekleşmektedir. Dolayısıyla bu bölgede yüksek oranda bağlantı dengesizliği görülmekte ve HLA allelleri haplotipler şeklinde kalıtılmaktadır (5). HLA allel ve haplotip frekansları farklı popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir (6).

Bu çalışmada 2011-2015 İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'nda HLA doku tiplemesi değerlendirilerek birçok hastalık ile ilişkisi bulunan, organ ve kemik iliği nakillerinde doku uyumunu belirleyen HLA allel ve haplotip frekanslarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2 GENEL BİLGİ

2.1 HLA Tarihçesi

HLA genleri evcil fare ve tavşan soyları üzerinde yapılan çalışmalar sırasında tanımlanmıştır. 1916'da Little ve Tyzzer farklı fare soyları arasında tümör nakilleri yaptılar ve tümörlerin bazı fare soyları arasında nakledilebildiğini fakat bazılarında ise ret edildiğini olduğunu gördüler. 1927'de Bover identik ikizlerde yapılan nakillerde dokunun ret edilmediğini gözlemledi. Bu gözlemler donör ve alıcı arasındaki doku uyumunun genetik olarak kontrol edildiği gösterdi. 1933'te Haldane transplante tümörün rejeksiyonuna neden olan immün yanıtın tümöre özgü antijenlerden ziyade normal hücresel antijenler tarafından tetiklendiğini iddia etti. 1930'ların sonunda ise Gorer "antijen I, II, III ve IV" olarak adlandırdığı dört kan grubu antijeni keşfetti ve tümör büyümesi veya reddinin bu antijenlerin ekspresyonu ile ilgi olduğunu buldu (7).

1940'larda Medavar ve çalışma arkadaşları tavşanlarda greft reddinin aslında yabancı dokuya saldıran immün yanıtın kaynaklandığını gösterdiler. Birkaç yıl sonra Snell ve çalışma arkadaşları yabancı dokuların rejeksiyonunu kontrol eden tek bir genetik bölge hariç genetik olarak neredeyse identik olan farklı laboratuvar faresi soyları (konjenik soylar) yetiştirdiler. Snell doku reddini kontrol eden bu genleri doku uyumu (histocompatibility, H) genleri olarak adlandırdı (8). Sonraki çalışmalar aynı kromozom üzerinde doku reddini kontrol eden çok sayıda genin bulunduğunu gösterdi. Bu bölge günümüzde büyük doku uyumu kompleksi (MHC) olarak bilinmektedir (9).

HLA'nın esas immünolojik işlevleri 1970'lere kadar hala tam olarak bilinmiyordu. Bu sürede immün yanıtın MHC molekülleri ve T lenfositler arasındaki etkileşim ile kontrol edildiği bulundu. 1975'te Zinkernagel ve Doherty T hücre yanıtının sadece antijen aynı zamanda da MHC ile de kısıtlandığını gösterdiler ve HLA'sı heterozigot olan bireylerin daha kapsamlı T-hücre yanıtı oluşturduğunu

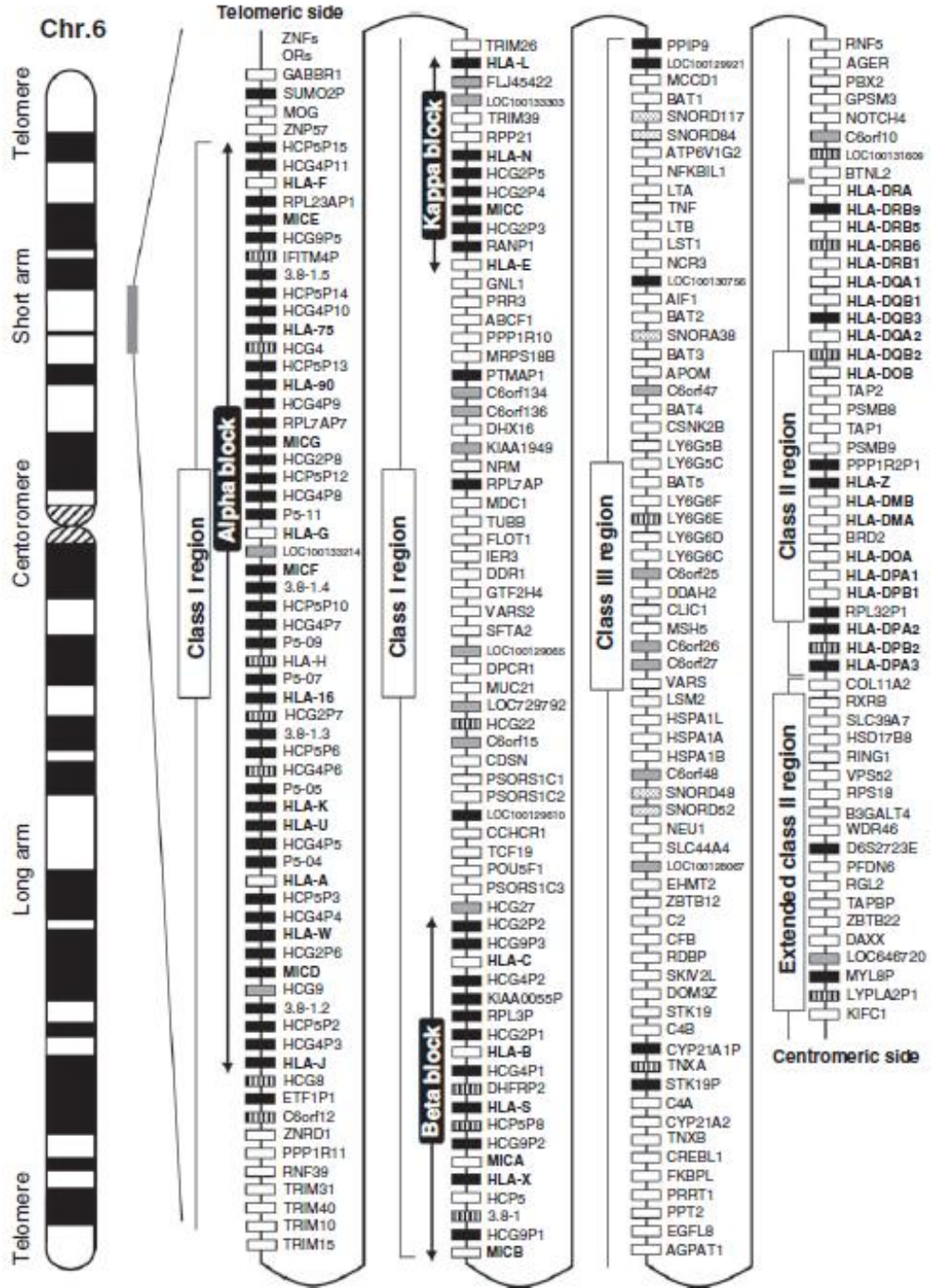
ortaya koydular. Sonra, MHC moleküllerinin hücre sel yanıt gibi antikor aracılı yanıtta işlev gördüğü belirlendi. 1980 ve 1990'lar süresince X-ray kristalografi çalışmaları ile HLA moleküllerinin yapısı belirlendi (9).

2.2 İnsan Lökosit Antijenleri (HLA)

MHC insanda 4 milyon bazlık (Mb) bir alanı veya başka bir deyişle insan genomunun %0,1'ini kaplayan ve 200'den fazla kodlama yapan lokus içeren DNA'daki en büyük gen bölgesidir (8).

Gen düzenlenmesindeki farklılığa rağmen, MHC genleri 3 molekül sınıfı kodlayan bölgeler şeklinde organize olurlar. Sınıf I MHC genleri tüm nükleusu olan hücrelerin yüzeyinde eksprese olan glikoprotein kodlarlar, sınıf gen ürünlerinin temel fonksiyonu T_C hücrelerine antijen sunumudur. Sınıf II MHC genleri daha çok, işlenmiş antijenik peptidleri T_H hücrelerine sunan antijen sunan hücrelerin (makrofajlar, dentritik hücreler ve B hücreleri) yüzeyinde eksprese olan glikoproteinleri kodlarlar. Sınıf III MHC genleri diğer ürünlere ek olarak, kompleman sistemi bileşenleri ve inflamasyon ile ilgili molekülleri içeren immün fonksiyona sahip salgılanmış proteinleri kodlarlar (10).

İnsan lökosit antijenleri (HLA), büyük doku uyuşum kompleksi (MHC)'de sınıf I ve sınıf II içinde kodlanır ve tüm insan popülasyonlarında en polimorfik genleri teşkil eder. Başlangıçta lökositlerdeki kan grupları olarak tanımlanmalarına rağmen, HLA molekülleri hemen hemen bütün çekirdekli hücrelerin yüzeyinde eksprese olurlar. Biyolojik rolleri patojenlerden kaynaklanan peptitleri veya kendi değişmiş proteinlerini konağın immün sistemine sunmaktır (11).



Şekil 1. MHC gen bölgesi (Shiia et al. (2009)(12)'den alınmıştır).

2.2.1 HLA Gen Yapısı

HLA genleri 3 bölgede lokalize olurlar. Sınıf I ve sınıf II bölgeleri yapı ve fonksiyonları birbirinden farklı hücre membran reseptörleri kodlarlar ve HLA sınıf I

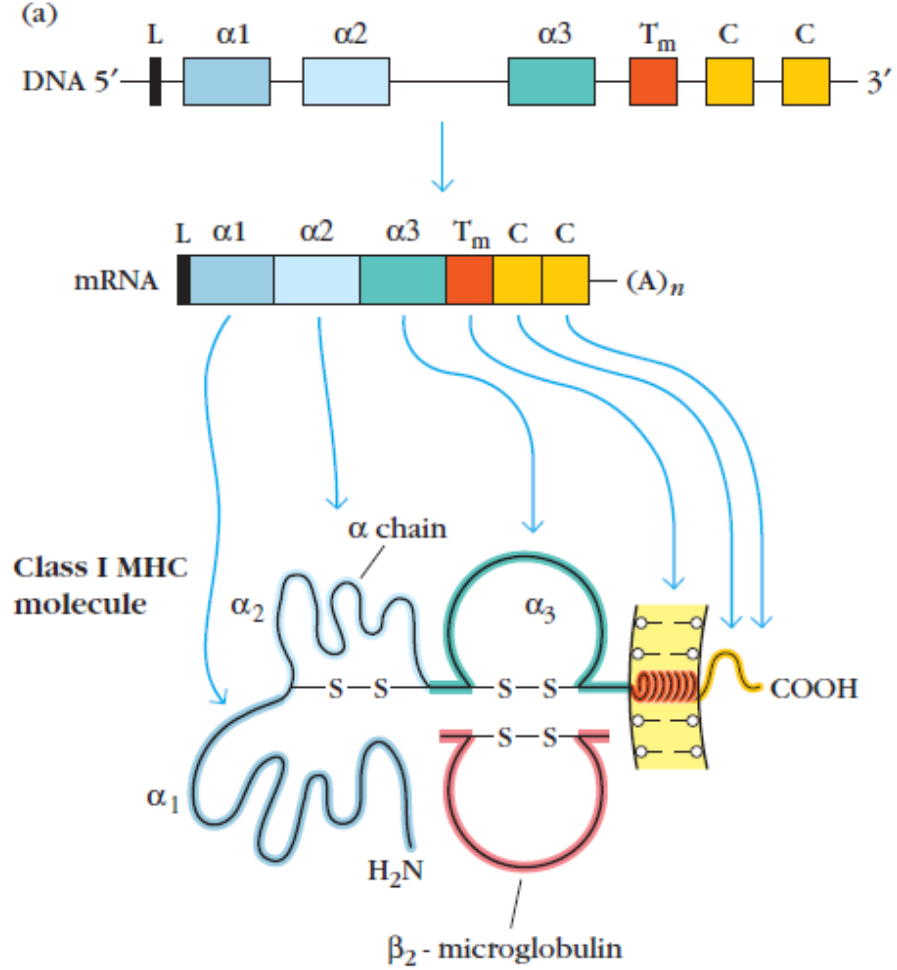
ve sınıf II bölgeleri arasında yerleşmiş olan sınıf III bölgesi kompleman ve sitokinler gibi immün yanıtlarda yer alan çözümler faktörler kodlayan genler içerir. Sınıf I ve sınıf II bölgeleri sekans ve genel yapıdaki benzerlikler baz alınarak sınıflandırılır. Bununla birlikte iki bölgede de bazı gen ürünleri ayrı fonksiyonları yerine getirmek için evrimleşmiştir. Dizi ve yapıda homolojileri olan sınıf I ve sınıf II içerisindeki çok sayıda gen atasal genin mutasyonlar ve fonksiyon ayrılmalarıyla birlikte duplikasyonları ile ortaya çıkmışlardır. Bu sürece gen delesyonları ve bazı durumlarda insersiyonlar eşlik etmişlerdir. Bunlar da gen sayısı ve sonuçta da gen yapısı açısından farklılıklar gözlemlenen bireylerin olduğu insan popülasyonlarındaki heterojeniteye neden olurlar. Bu durum özellikle sınıf II HLA bölgesinde barizdir Bu evrimleşme süreci MHC içerisinde kodlama yapma genler ve psödogenler gibi çok sayıda fonksiyonel olmayan gen oluşturmuştur. Örneğin sınıf I bölgesinde genlerin %50'den fazlası herhangi bir protein ürün kodlamazlar. Bu çok sayıdaki fonksiyonel olmayan genin hiç birinin biyolojik amacı henüz bilinmemektedir. Belki de milyonlarca yıldır süregelen evrimsel sürecin kalıntıları olabilirler (12).

2.2.1.1 Sınıf I HLA Genleri

Sınıf I genleri daha da sınıflandırılarak 2 gruba ayrılmışlardır: Klasik olan (1A) ve klasik olmayan (1B) sınıf I genleri. Klasik olan sınıf I genleri HLA-A, HLA-B ve HLA-C'den oluşur. Bunlar en polimorfik sınıf I genleridir, bunların ürünleri tüm nükleuslu hücrelerde eksprese edilir ve T hücrelerine peptit sunulması konusundaki fonksiyonları moleküler seviyede ayrıntılı bir şekilde anlaşılmıştır. Tersine, klasik olmayan sınıf I genleri daha az polimorfiktirler, kısıtlı ekspresyon ve ayrı fonksiyonlara sahiptirler (10).

Klasik sınıf I HLA genleri 6 ekzondan oluşmaktadır. İlk ekzon gen transkripsiyonunu başlatan lider sekansı kodlar. İkinci ekzon sınıf I molekülünün $\alpha 1$ domainini, üçüncü ekzon $\alpha 2$ domaini ve dördüncü ekzon $\alpha 3$ domainini kodlar. Geriye kalan iki ekzon molekülün transmembran kısmını ve molekülü bağlayan

sitoplazmik kuyruğu kodlar. Son olarak da, genin 3' ucunda çevrilmeyen bölge bulunmaktadır (13).



Şekil 2. Sınıf I HLA geni (Kuby et al (2003)(10)'dan alınmıştır.)

Klasik olmayan sınıf I HLA genleri eksprese olan HLA-E, HLA-F ve HLA-G genlerinden ve ekspresyonu olmayan HLA-H, HLA-J, HLA-K ve HLA-L genlerin oluşmaktadır. Bu genlerin özellikleri; kısıtlı polimorfizmleri, farklılaşmış doku dağılımları ve farklılaşmış fonksiyonlarıdır. Hem doğuştan hem de adaptif immün sistemde rol oynarlar (14).

2.2.1.2 Sınıf II HLA Genleri

Sınıf II HLA bölgesi DR, DQ ve DP olarak tanımlanan 3 alt bölgeden oluşur (15).

DR alt bölgesinde DRA ve DRB1-9 şeklinde tanımlanan 10 tane HLA geni bulunmaktadır. Bunlardan DRA1, DRB1, DRB3, DRB4 ve DRB5 membranda eksprese olan ürün kodlarıdır. Geri kalan DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 ve DRB9 eksprese olmazlar. Farklı kromozomlar üzerinde genlerin farklı sayı ve kombinasyonlarının gözlemlenmesi MHC evrimi sırasında ortaya çıkan çeşitliliğin başka bir çarpıcı örneğidir. Duplikasyon, delesyon ve mutasyonlarla ile tek bir atasal genden seçici baskı altında bugün gözlemlediğimiz genetik yapı oluşmuştur. Sınıf II genleri sadece 5 ekzona sahip olmalarıyla temel yapı açısından sınıf I genlerinden farklıdır. İlk ekzon sinyal dizisi kodları, ikinci ve üçüncü ekzonlar iki ekstrasellüler domaini kodlar, dördüncüsü molekülün transmembran kısmını kodlarken, beşinci ekzon molekülün hücre içine tutunmasını sağlayan sitoplazmik kuyruğu kodlar (16).

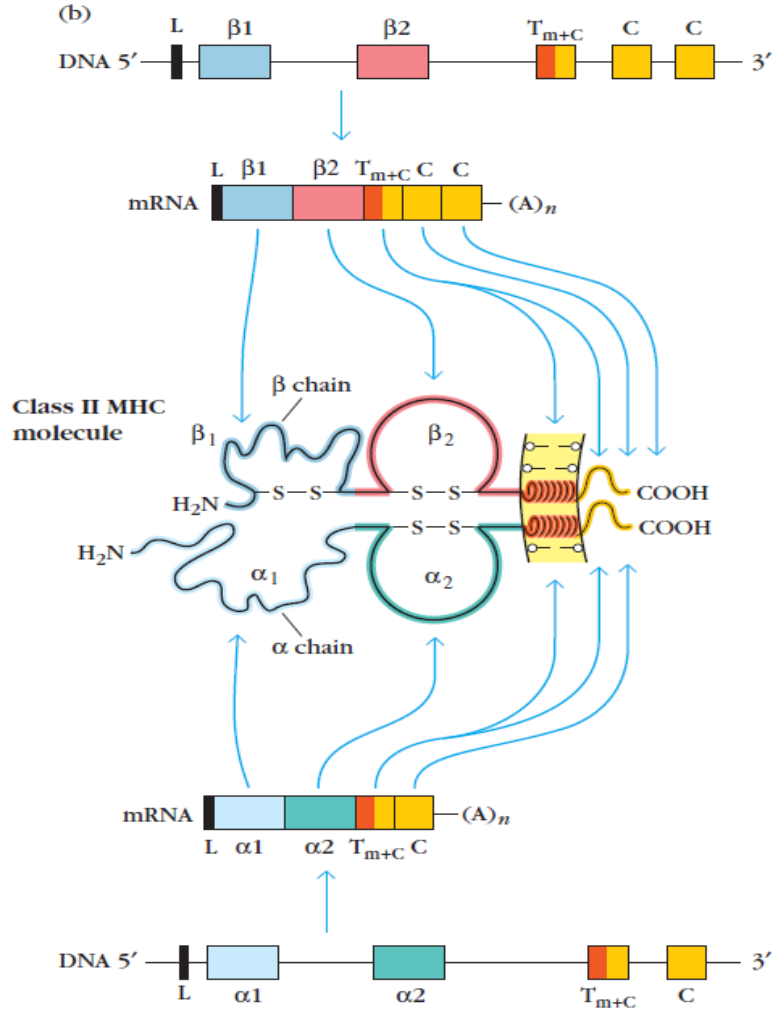
Hücre yüzeyinde eksprese olmuş dört farklı DR heterodimeri gözlemlenebilir: DRA/DRB1, DRA/DRB3, DRA/DRB4, DRA/DRB5. Bu heterodimerlerin kombinasyonları Tablo 1’de gösterilen haplotiplerde bulunabilir. Tüm haplotiplerde bulunan tek heterodimer literatürde DRB1 olarak geçen DRA/DRB1’dir (12).

Tablo 1. DR haplotipleri

Haplotip 1	DRB1	DRB6	-	-	DRB9	DRA
Haplotip 2	DRB1	DRB6	DRB5	-	DRB9	DRA
Haplotip 3	DRB1	DRB2	DRB3	-	DRB9	DRA
Haplotip 4	DRB1	DRB7	DRB8	DRB4	DRB9	DRA
Haplotip 5	DRB1	-	-	-	DRB9	DRA

DQ alt bölgesinde 5 HLA geni lokalize olmuştur. Bunlar DQA1, DQB1, DQA2, DQB2 ve DQB3’tür. DR alt bölgesinde olduğu gibi burada da duplikasyonlar ve mutasyonlar eksprese olmayan DQA2, DQB2 ve DQB3’ün oluşmasına neden olmuştur. Bu nedenle eksprese olan tek DQ heterodimeri DQA1 ve DQB1 genlerinin protein ürünleri arasında kovalent olmayan bağlarla oluşmuş olan heterodimerdir (14).

DP ve DQ alt bölgelerinin gen yapıları arasında benzerlik bulunur. Yani eksprese olan tek bir DP heterodimeri DPA1/DPB1 ve eksprese olmayan üç gen DPA2, DPB2 ve DPB3 bulunur. DP heterodimerinin ekspresyon seviyesi DR ve DQ'ya göre önemli oranda daha azdır (16).



Şekil 3. Sınıf II HLA genleri (Kuby et al (2003)(10)'dan alınmıştır).

2.2.1.3 Sınıf III HLA Genleri

DNA'da yaklaşık 700 Kb'lık bir alanda sınıf I ve sınıf II bölgeleri arasında lokalize olan sınıf III bölgesi 35'i protein ürün kodlayan 75 gen serisini kapsayarak MHC'nin gen bakımından en zengin segmentidir. Bu bölge 3 tip gen bulunmaktadır. Bunlar immün yanıtta rol alan moleküller kodlayan genler, ürünleri immün

regülasyonla ilgili fonksiyonu olmayan genler ve eksprese olmayan genlerdir. İmmünolojik fonksiyona sahip olmayan genlerin sınıf I ve sınıf II genleri arasında bulunmasının nedeni tam olarak anlaşılmamıştır (14).

2.2.2 HLA Moleküler Yapısı

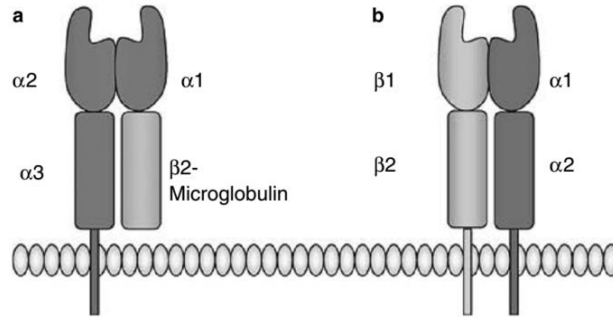
2.2.2.1 Sınıf I HLA Molekülleri

Sınıf I HLA molekülü 12-kDa β 2-mikroglobülin molekülü ile non-kovalent olarak ilişkili 45-kDa α zinciri içerir. α zinciri insanda HLA komplekste A, B ve C bölgelerindeki polimorfik genler tarafından kodlanan transmembran glikoproteindir. β 2-mikroglobülin ise farklı bir kromozomda lokalize olmuş son derece korunmuş gen tarafından kodlanan bir proteindir. α zincirinin β 2-mikroglobülin ile ilişkisi sınıf I moleküllerinin hücre membranlarında ekspresyonu için gereklidir. α zinciri, hidrofobik transmembran segmenti ve hidrofilik sitoplazmik kuyruğu ile plazma membranına bağlanır (17).

Yapısal analizler neticesinde, sınıf I HLA molekülünün α zinciri, her biri yaklaşık 90 amino asit içeren 3 eksternal (α 1, α 2 ve α 3) domainden, yüklü hidrofilik amino asit kısa dizisinin izlediği yaklaşık 25 hidrofobik amino asitten oluşan transmembran domain ve 30 amino asitlik sitoplazmik bağlanma segment şeklinde oluştuğu belirlenmiştir. β 2-mikroglobülin, α 3 domaini ile boyut ve organizasyon açısından benzerdir, transmembran domaini yoktur ve kovalent olmayan bağla sınıf I glikoproteinine bağlanır. Sekans bilgileri α 3 domaini ile β 2-mikroglobülin arasındaki homolojiyi ortaya çıkarmıştır. α 3 domaini ile büyük ölçüde etkileşen β 2-mikroglobülin, α 1 ve α 2 domainlerinin aminoasitleriyle de etkileşir. β 2-mikroglobülin etkileşimi ve sınıf I α zinciri ile birlikte peptit, sınıf I molekülünün tam katlanmış konformasyona ulaşması için gereklidir. β 2-mikroglobülin yokluğunda, sınıf I HLA α zinciri hücre membranına eksprese olamaz (10).

$\alpha 1$ ve $\alpha 2$ domainleri 2 uzun α helikal bölgeleri tarafından 8 antiparalel β iplik sarılan 8 antiparalel β iplik platformunu oluşturmak üzere etkileşirler. Bu yapı derin bir oluk veya yarık oluşturur. Bu peptid bağlanma yarığı sınıf I HLA molekülünün üst yüzeyinde lokalize olur ve 8-10 aminoasitlik peptit bağlamaya yetecek büyüklüktedir. Sınıf I molekülünün X-ray kristalografik analizlerindeki büyük sürpriz, yarıkta proteinle birlikte kristalize olmuş olan küçük peptitler bulmak oldu. Bu peptitler, esasen derin oluktaki $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ domainlerine bağlı olan işlenmiş antijen ve self-proteinlerdir (13).

$\alpha 3$ domaini ve $\beta 2$ -mikroglobülin, her biri aminoasitlerin anti paralel β iplikleri tarafından şekillendirilmiş 2 β kıvrımlı levhalar şeklinde organizedirler. Bu yapı, immünoglobülin katlanmsı olarak bilinir ve immünoglobülin domainleri için karakteristiktir. Bu yapısal benzerlikten dolayı, sınıf I HLA molekülleri ve $\beta 2$ -mikroglobülin immünoglobülin süper ailesinin üyeleri olarak sınıflandırılırlar. $\alpha 3$ domaini sınıf I molekülleri içinde son derece korunmuş görünür ve Tc hücrelerinin üzerinde bulunan CD8 membran molekülü ile etkileşen bir sekans içerir (10).



Şekil 4. HLA sınıf I ve II moleküllerinin yapısı (Cassinotti et al. (2009) (18)'den alınmıştır).

2.2.2.2 Sınıf II HLA Molekülleri

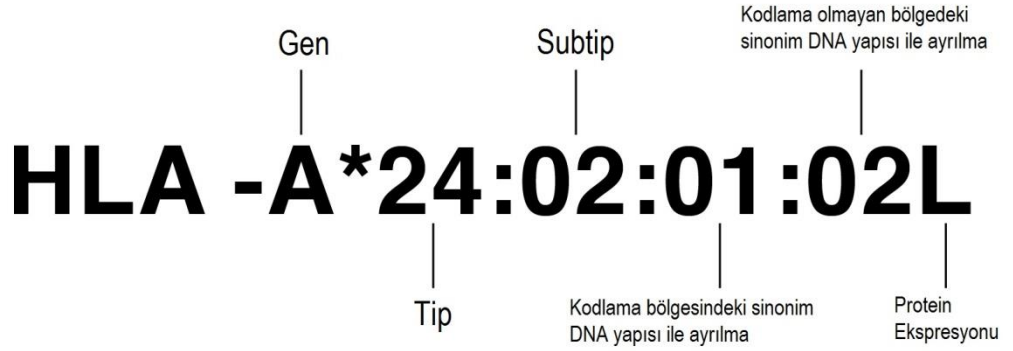
Sınıf II HLA molekülleri 2 farklı polipeptid zinciri içerirler. Bunlar; kovalent olmayan etkileşimler tarafından ilişkilendirilen 33-kDa'luk α zinciri ve 28-kDa'luk β zincirleridir. Sınıf I α zincirinde olduğu gibi, sınıf II HLA molekülleri de eksternal domainler, transmembran segment ve sitoplazmik segmentten oluşan membrana bağlı glikoproteinlerdir. Sınıf II molekülündeki her bir zincir 2 eksternal domain

içerir: $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ bir zincirde ve $\beta 1$ ve $\beta 2$ diğeri bir zincirde. Sınıf I HLA molekülünün membran proksimalindeki $\alpha 3/\beta 2$ -mikroglobülin domainlerine benzeyen membran proksimalindeki $\alpha 2$ ve $\beta 2$ domainleri, immünoglobülin katlanma yapısına benzer dizilim taşır ve bu nedenle sınıf II HLA molekülleri immünoglobülin süper ailesi içerisinde sınıflandırılır. Sınıf II molekülünün membran distal kısmı $\alpha 1$ ve $\beta 1$ domainlerinden oluşur ve işlenmiş antijenler için antijen bağlanma yarığı oluştururlar (13).

X-ışını kristalografik analizi ile sınıf I ve sınıf II moleküllerinin benzerlikleri gösterilmiştir. HLA-DR1'in peptit bağlama oluğu, sınıf I moleküllerinde olduğu gibi, sekiz antiparalel β iplikten ve antiparalel α heliks taraftan oluşur (10).

2.3 HLA Adlandırılması

HLA sisteminin keşfinde beri, hem HLA antijenlerinin tespit teknikleri hem de sınıflandırılmaları kullanılan adlandırma metotları hızla değişmektedir. Başlangıçta seroloji sınıf I ve sınıf II lokuslarının polimorfizmlerinin tanımlanmasında mevcut olan tek teknolojik araçtı. HLA allellerinin sekanslanmasıyla birlikte, daha fazla polimorfizm tanımlandı ve polimorfizmin derecesinin bilinenden çok daha fazla olduğu açığa çıktı. Alleller arasındaki sekans farklılığı saptandı ve her bir allel için ikili numara gruplarından oluşan yeni adlandırma metodu geliştirildi. İlk ikili numara allelin ait olduğu serolojik grubu gösterirken, ikinci ikili numara ise tanımlanma sırasını ifade eder (19). En sonda bulunan harf eğer "L" ise düşük ekspresyonu, "N" ise null allel olduğunu, "S" ise çözünür bir ürün olduğunu, "C" ise allelik ürünün membranda bulunmayan fakat sitoplazmada bulunduğunu, "A" ise atipik bir allel olduğunu ve eğer "Q" ise kuşkulu bir allel olduğunu ifade etmektedir (20).



Şekil 5. HLA Adlandırılması (Cassinotti et al. (2009)(18)'den modifiye edilmiştir).

Yeni HLA genlerinin ve allel sekanslarının adlandırılması ve kalitelerinin kontrol edilmesi 1968'te kurulan "World Health Organization (WHO) Nomenclature Committee for Factors of the HLA System" komitesinin sorumluluğundadır. Komite bu konuları tartışmak için düzenli olarak toplanır ve bugüne kadar 19 ana rapor yayınlamıştır. Bu raporlar başlangıçta serolojik olarak tanımlanmış HLA allellerini dökümente ederken son dönemlerde nükleotid sekanslarıyla tanımlanmış olan gen ve allelleri bildirmektedir (21).

Daha sonra 16 Aralık 1998'de IMGT/HLA veritabanı kurulmuştur. O günden beri veritabanı 3 ayda bir güncellenmektedir (21).

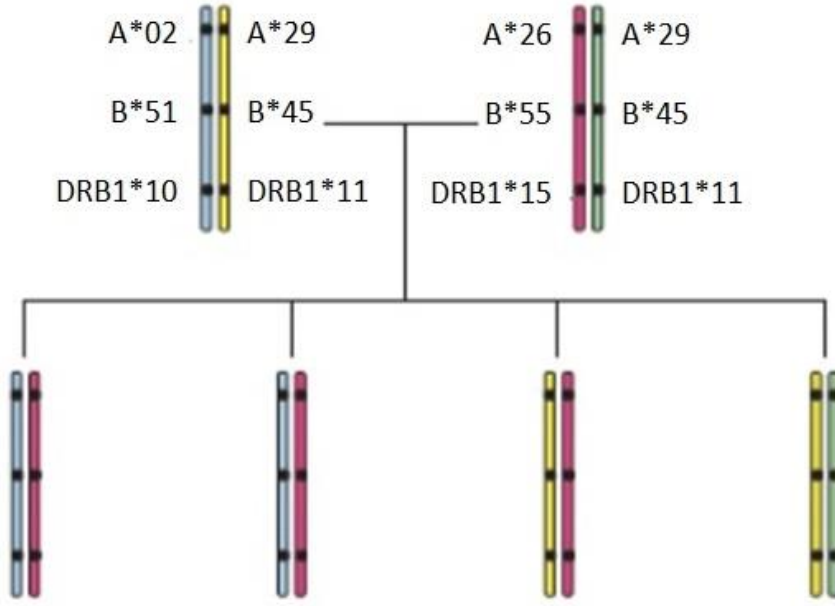
2.4 HLA Genlerinin Kalıtımı

HLA gen bölgesinin en karakteristik genetik özellikleri eş baskınlık, haplotipik kalıtım ve bağlantı dengesizliğidir. Eşbaskınlık, her bir allel çifti tarafından kodlanan antijenlerin hücre membranında eksprese olduğu anlamına gelir ve herhangi bir çekinik gen bulunmamaktadır. Eğer bir bireyin iki kromozomundaki haplotipler HLA-A*11:01, B*27:04 ve HLA-A*24:01, B*07:02 ise, dört farklı HLA molekülü bireyin sitomembran yüzeyinde eksprese olmaktadır (22). Homolog kromozomlar arasında bu allellerde rekombinasyon nadiren görülür. Üreme sırasında, HLA haplotipleri bütün bir genetik takım olarak ebebeynden yavruya

geçer. Eğer bu haplotiplerde farklı lokuslardaki allellerin birlikte görülme sıklığı, beklenen rasgele sıklıktan yüksek ise (başka bir deyişle gözlenen haplotip frekansı teorik değerden yüksek ise), bu bağımsız olmayan kombinasyon durumu bağlantı dengesizliği olarak tanımlanır (17).

2.4.1 HLA Haplotipleri

Aynı kromozom üzerindeki genler tarafından kodlanan HLA antijenlerinin kombinasyonları HLA haplotipi olarak bilinir. Mendelyan ayrılmaya göre kardeş donörün hasta ile ortak iki haplotipi paylaşma olasılığı %25'tir. Tek bir haplotipi paylaşma olasılığı ise %50'dir. Bu durumda kardeşin haploidentik olduğu söylenir ve bu tanımlamaya göre ebeveynler de haploidentiktirler. Haplotiplerin ayrımı düşük çözünürlüklü HLA-A, B, DRB1 tiplemesine dayanarak tanımlanabilir. Çünkü her lokustaki heterozigotluk belirsizlik olmadan allellerin kalıtımının belirlenmesine olanak verir. Homozigotluk durumunda ve akraba olmayan donörler analiz edildiğinde ise olası değildir. Bu durumlarda, hasta ve potansiyel (akraba ve akraba olmayan) donör arasında doğru ve tam uyumluluk için yüksek çözünürlükte tipleme gereklidir (11).



Şekil 6. HLA-A-B-DR haplotiplerinin kalıtımı (Tiercy et al (2014)(11)'den modifiye edilmiştir.

2.4.2 Bağlantı Dengesizliği

Bağlantı dengesizliği (BD) iki veya daha fazla lokustaki allellerin rasgele olmayan ilişkisidir. Bağlantı dengesizliğinin belirlenmesi dengenin yokluğunu ya da bağlantının varlığını göstermez. Bağlantı dengesizliği allellerin beklenenden daha sık (pozitif bağlantı dengesizliği) ya da daha nadir (negatif bağlantı dengesizliği) birlikte görüldüğü durumlarda ortaya çıkar (23).

Bağlantı dengesizliği birçok faktörden etkilenir ve birçok faktörü etkiler. Bağlantı dengesizliği geçmiş durumlar hakkında bilgi sağlar. Doğal ve yapay seçilime potansiyel yanıtı kısıtlar. Tüm genomdaki bağlantı dengesizliği popülasyon geçmişi, üreme sistem ve coğrafik alt bölgelerin yapısını gösterirken, her bir genomik bölgedeki bağlantı dengesizliği doğal seçim tarihçesi, gen değişimi, mutasyon ve gen frekanslarının değişimine neden olan diğer güçleri gösterir. Bu faktörlerin belirli lokus çiftleri arasında veya belirli genomik bölgedeki bağlantı dengesizliğine olan etkileri lokal rekombinasyon oranlarına bağlıdır (23).

İki lokustaki alleller arasındaki bağlantı dengesizliği farklı yollarla tanımlanmaktadır. Fakat bütün tanımlamalar iki lokustaki A ve B allel çiftini taşıyan gametlerin frekansı ile A ve B allel frekansları arasındaki farklılığa dayanır:

$$D_{AB} = P_{AB} - P_A \cdot P_B$$

[D_{AB} : A ve B allelleri arasındaki bağlantı dengesizliği, P_{AB} : A ve B'nin birlikte kalıtıldığı gametlerin frekansı, P_A : A allelinin frekansı, P_B : B allelinin frekansı]

Bağlantı dengesizliğinin farklı hesaplamalarının olmasının nedeni, her bir hesaplanmada rasgele ilişkinin farklı bir özelliğin kullanılmasıdır. Bütün hesaplamalar temelde D formülünü esas alsa da, D hesaplaması her bir allel çiftinin olası D değeri allel frekansları tarafından kısıtlandığından lokuslardaki farklı allel çiftlerinin bağlantı dengesizliğini kıyaslanmasında doğru bir istatistik değildir. Lewontin, D'yi teorik maksimum değere bölerek normalize eden farklı bir hesaplama geliştirmiştir:

$$D' = D/D_{\max} \text{ (24).}$$

2.5 HLA Polimorfizmi

Araştırmacılar genetik varyasyonları bir gruptaki bireyler arasındaki varyasyonları ve farklı gruplardaki bireyler arası varyasyonları kıyaslayarak (popülasyon içi ve popülasyonlar arası farklılıklar) değerlendirirler. Bireysel varyasyonların kaynakları polimorfik allellere neden olan genomdaki rekombinant olaylar ve mayozdaki mutasyonel olaylardır. Gruplar arasındaki varyasyon genom üzerindeki seçici baskılardan, çevredeki farklılıklardan, genetik sürüklenme ve kurucu etkinin sonucunun birleşiminden kaynaklanır. Bu farklılıklar popülasyonlardaki göç modellerinin oluşturulmasına kaynaklık ederler. Popülasyonlardaki genetik çeşitliliğin dört ana nedeni vardır. Bunlar; (1) gametlerin rasgele seçilimi, (2) mutasyon, (3) göç ve genetik değişim ve (4) doğal seçilimdir (25).

HLA genleri ve molekülleri de son derece polimorfiktir. Bu polimorfizmin nedeni çok sayıda olası peptidin HLA proteinleri tarafından T hücrelere sunulması gerekliliğidir (15). 1980'lerin başında HLA sınıf I (A, B) ve sınıf II (DRA/DRB1)

genlerinin ilk sekanslanması ve klonlanmasından beri, yeni HLA varyantlarının sayısı sürekli olarak artmaktadır (11). IMGT/HLA veritabanının Ekim 2015'te güncellenen verilerine göre allel sayıları 10297 sınıf I ve 3543 sınıf II olmak üzere toplamda 13840 HLA alleli olarak verilmiştir (26).

Tablo 2. HLA allel sayıları

HLA ALLELLERİ	
HLA Sınıf I Allelleri	10297
HLA Sınıf II Allelleri	3543
HLA Allelleri	13840
Diğer Non HLA Allelleri	175
Confidential Alleles	5

Tablo 3. Sınıf I HLA lokuslarının allel sayıları

SINIF I HLA ALLELLERİ						
Gen	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-E	HLA-F	HLA-G
Allel	3,285	4,077	2,801	18	22	51
Protein	2,313	3,011	1,985	7	4	17
Null	153	128	93	1	0	2

Tablo 4. Sınıf II HLA lokuslarının allel sayıları

SINIF II HLA ALLELLERİ										
Gen	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	DMA	DMB	DOA	DOB
Allel	7	1932	54	876	42	587	7	13	12	13
Protein	2	1412	32	595	21	480	4	7	3	5
Null	0	47	1	22	0	15	0	0	1	0

Tablo 5. DRB bölgesi allel sayıları

DRB ALLELLERİ									
Gen	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DRB6	DRB7	DRB8	DRB9
Allel	1825	1	60	17	22	3	2	1	1
Protein	1335	0	48	10	19	0	0	0	0
Null	41	0	1	3	2	0	0	0	0

Polimorfizmlerin çoğu peptitlerin bağlandığı oluğu şekillendiren ve HLA moleküllerinin en uzak kısmını kodlayan ekzonlarda yer almalarına rağmen (sınıf I antijenleri için $\alpha 1/\alpha 2$ domainleri ve sınıf II antijenleri için $\alpha 1/\beta 1$ domainleri), varyasyonlar aynı zamanda genlerde herhangi bir yerde lokalize olurlar. HLA sınıf I ve sınıf II allellerinin yaklaşık %25'i sessiz yer değiştirmelerle farklılaşır ve %3'ü hücre yüzey ekspresyonunun yokluğuna neden olan (null alleller) kodlama olan ve kodlama olmayan bölgelerdeki mutasyonlar ile karakterize olurlar (11).

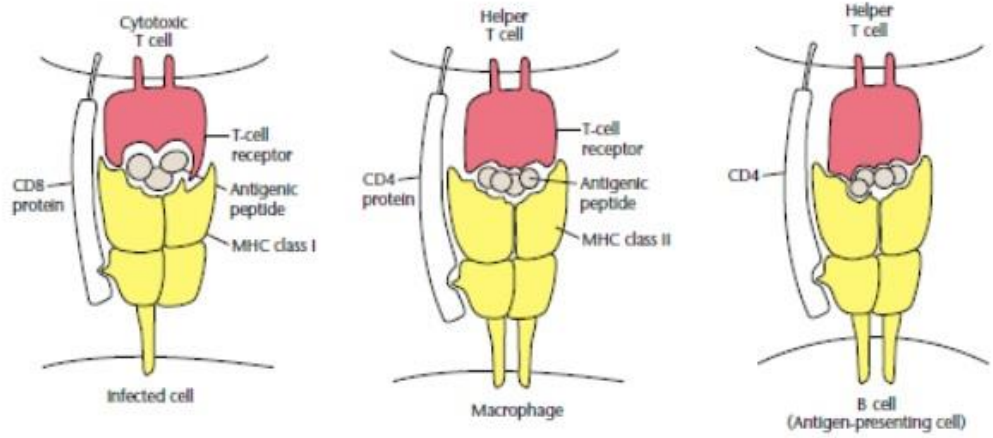
Fonksiyonel düzeyde HLA polimorfizmi daha kısıtlıdır. Sınıf II HLA moleküllerinin büyük ölçüde örtüşen peptit repertuvarlarına sahip oldukları bilinmektedir. Fakat son yıllarda bazı çalışmalar bu durumun sınıf I için de geçerli olduğunu gösterdi. Bu seçici olmayan peptit bağlanması lokus içi allellerle kısıtlı olmayıp farklı sınıf I HLA lokuslarındaki allelleri kapsar (27).

2.6 HLA Fonksiyonu

2.6.1 Antijen Sunumu

HLA molekülleri sınıf I ve sınıf II olmak üzere iki formda şekillenir (8).

Nükleuslu her hücre yaklaşık 100.000 sınıf I HLA molekülü eksprese eder. Sınıf I moleküllerinin fonksiyonu hücre içi orijinli (endojen) antijenleri sitotoksik T lenfositlere (CTL) sunmaktır. Sınıf II HLA molekülleri ise esas olarak dentritik hücreler, makrofajlar ve B hücreler gibi immün sistemin özelleşmiş hücrelerinde bulunurlar. Görevleri, hücreye giren (ekzojen) antijenleri yardımcı T hücrelerine sunmaktır (18).



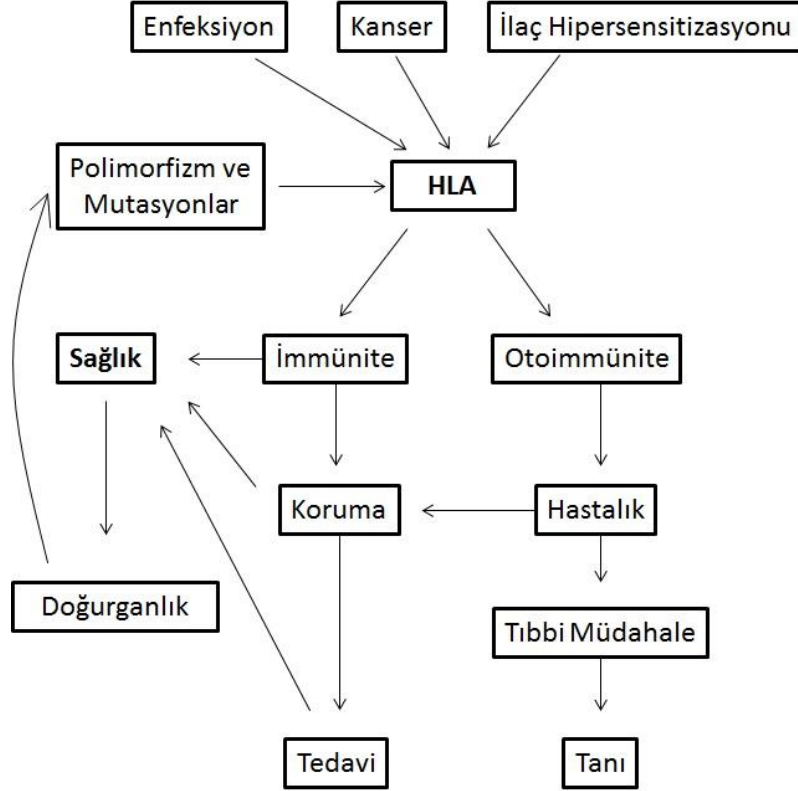
Şekil 7. Sınıf I ve Sınıf II HLA moleküllerinin antijen sunumu (Penn (2002)(8)'den alınmıştır).

2.6.2 İmmünolojik self/nonself ayrımı

İstilacı patojenlere saldırmak için immün sistem kendinden olanı yabancı dokudan ayırabilmelidir. HLA molekülleri hem self hem de nonself peptitleri sunar. T hücreleri aslında self ve nonself peptitleri ayırt etmez. Basit şekilde self peptitleri tanıyan T hücreler immün sistem gelişimi sırasında elimine edilir veya inaktiflenir. Doğumdan önce olgunlaşmamış, farklılaşmamış T lenfositler kemik iliğinde çoğalır, daha sonra olgunlaştıkları ve timik seçilimden geçtikleri timusa göç ederler. Timusta T hücre proliferasyonu meydana gelir ve TCR genlerinin yeniden düzenlenmesiyle T hücrelerinin muazzam çeşitliliği sağlanır. 1011 kadar farklı tipte T hücresi üretilir fakat rasgele bir üretim olduğundan çoğu self antijenlere bağlanma eğilimindedir ve dolayısıyla yaklaşık %95'i elimine edilir ya da inaktiflenir. Sadece self peptit-MHC kompleksini aviditenin eşik değeri altında tanıyan T hücreler olgunlaşır ve dolaşıma girerler (pozitif seçilim). Eşik değeri üstünde bağlananlar ise öldürülür veya inaktif edilirler (negatif seçilim). Böylece timik seçilim boyunca HLA genleri bireyin T hücre repertuarını etkilerler (8).

2.7 HLA ve Hastalık İlişkisi

İmmün sistemin merkezinde yer alan HLA gen ve proteinleri bireylerin yaşam süresi, popülasyonun sağkalımı, enfeksiyonlara, otoimmün hastalıklara ve kansere yatkınlık ve direnç ve de gebeliğin sürdürülmesinde işlev görmektedir (28).



Şekil 8. HLA-hastalık ilişkisi (Dyer et al. (2013)(28)'den modifiye edilmiştir).

Yaklaşık son 40 yıldır belirli HLA antijenleri ile hastalıklara yatkınlık arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır. Bu ilişki HLA-B antijenlerinin cross reaktif grupları ile Hodgkin's lenfoma, HLA-2 ile akut lenfosittik lösemi ve daha iyi bilinen HLA-B27 ve ankilozan spondilit gibi hem kötü huylu hem de otoimmün hastalıkları içermektedir. Çok sayıda HLA-hastalık ilişkisi tanımlanması HLA sisteminin genetik kompleksliği ve kapsamlı polimorfizmi hakkındaki artan algımız ile paraleldir. Belirli HLA genotipleri çok sık ortaya çıkan birkaç yüzden fazla hastalık bildirilmiştir. Bu hastalıklar immün aracılı hastalıkların geniş bir

spektrumunu kapsamaktadır. Buna rağmen, HLA ilişkili hastalıkların moleküler immünopatogenezindeki HLA polimorfizminin ettirgen rolü ile sonuçlanan mekanizmaların net açıklaması kuraldan ziyade kural dışı kalmıştır. Bu durumun birçok sebebi vardır. İlki, HLA lokusları arasındaki bağlantı dengesizliğidir ve bu lokusların son derece polimorfik olmalarıdır. İkincisi, insanda MHC bölgesinde klasik HLA lokuslarına ek olarak 200'den fazla genin bulunmasıdır. Üçüncüsü, birçok HLA ve hastalık ilişkisi çalışmasının doğrulanmamış olması ve erken literatürlerde yanlış pozitif ilişkiler kurmaya yatkın olduğu bilinen dar grup çalışmalarının fazla olmasıdır. Bütün bunlar bir araya geldiğinde, belirli bir hastalık ile primer HLA ilişkisini kurmak için farklı etnik gruplarda geniş grup çalışmaları gerekmektedir (29) .

3 GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Çalışma Grubu- Popülasyon

Bu çalışmaya 2011-2015 İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'nda HLA-A, HLA-B ve HLA-DRB1 doku tipleme çalışılan bireyler dahil edilmiştir. Haplotiplerin belirlenebilmesi için bu bireyler öncelikle ailesel düzeyde değerlendirilmiştir. Aileler anne ve babanın HLA genotipleme sonuçlarının bulunup bulunmamasına göre gruplandırılmıştır. Bu gruplar; anne ve babanın olduğu grup (Grup 1: 95 aile, 417 birey), sadece annenin olduğu grup (Grup 2: 64 aile, 175 birey), sadece babanın olduğu grup (Grup 3: 50 aile, 132 birey) ve de anne ve babanın olmadığı grup (Grup 4: 182 aile, 641 birey) şeklindedir. Bunlar dışında herhangi bir aileye dahil olmayan ve haplotipleri belirlenemeyen bireylerin allelleri, allel frekanslarının hesaplanmasına dahil edilmiştir.

Bu çalışma İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yerel Etik Kurul Komitesi'nin 19.03.2015 tarihli ve 4 nolu kararı ile etik kurul onayı alınmıştır.

3.2 Yöntem

Bu çalışmada bireylerin HLA genotipini belirlemek için moleküler yöntemler olan PCR-SSP, PCR-SSOP veya Sanger SBT yöntemleri uygulanmıştır.

Bireylerin DNA'ları EDTA'lı tüpe alınan periferik kandan EZ1 DNA Blood 200 µl Kit (Qiagen, Hollanda) ile izole edilmiştir.

3.2.1 PCR-SSP Yöntemi

Bu yöntem için HLA-A-B-DR Combi Tray Kit (Olerup, İsveç) kullanılmıştır. Prosedür, üretici firmanın talimatlarına göre oluşturulmuştur. Bu kitin içinde önceden

alikitlanmış primerlerin olduğu 96 kuyucuklu plak, PCR master mix ve yapışkanlı PCR seal'i bulunmaktadır. Bunların dışında Taq polimeraz (Qiagen, Hollanda) ve distile su kullanılmıştır.

312 µl master mix üzerine 8,3µl DNA Taq polimeraz eklenmiştir. Bu karışımdan 3 µl alınarak alikitlanmış primerlerin bulunduğu 96 kuyucuklu plakta içinde primer bulunmayan kontrol kuyusuna eklenmiştir. Daha sonra bu kuyuya 7 µl distile su eklenmiştir. Kalan master mix-distile su karışımı üzerine 605 µl distile su konulmuştur. Bu karışım ise 100 µl DNA örneğinin bulunduğu tüpe eklenmiştir. Tüp hafifçe vortekslenip, santrifüjlenmiştir. Sonra kalan tüm kuyulara 9,8 µl olarak dağıtılmaktadır. Daha sonra plağın üzeri PCR seal ile kaplanıp, plak firmanın talimatlarına göre oluşturulmuş olan PCR protokolü seçilerek thermal cycler'a yerleştirilmiştir.

PCR işlemi sonrası 0,5X TBE buffer (Tris-Boric asit-EDTA tampon) içerisine 2 gr toz agaroz eklenerek mikrodalga fırında eriyene kadar kaynatılmıştır. Eriyip berraklaşan agaroz 2 damla etidyum bromid damlatılmaktadır. Elektroforez tepsisine taraklar yerleştirildikten sonra jel dökülüp 15-20 dakika donması beklenmiştir. PCR ürünleri hazırlanan 96 kuyulu agaroz jel içerisine sırayla yüklenip 140 volt, 40 mili amperde 20 dakika yürütülmüştür. Tanktan çıkartılan jel UV transluminatörde görüntülenmiştir.

Olerup SSP Start Score programı kullanılarak, jel görüntüsünde elde edilen bantlar programa girilmiştir.

3.2.2 PCR-SSOP Yöntemi

Bu yöntem için Lifecodes HLA SSO Typing Kit (Immucor, ABD) kullanılmaktadır. Her bir lokus için lokusa özgü kit kullanılmıştır. Çalışma prosedürü, üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanmıştır. Bu kitlerin içinde lokusa özgü olarak hazırlanmış olan master mix, probe mix ve dilüsyon solüsyonu bulunmaktadır. Bunların dışında DNA Taq polimeraz (Qiagen, Hollanda), distile su, 8'li strip, coster plate, seal ve SA-PE (streptavidin-fikoeritrin) kullanılmıştır.

Bu yöntemin ilk aşaması HLA-A, -B, -DR lokuslarının PCR ortamında ayrı ayrı çoğaltıldığı amplifikasyon aşamasıdır. Bu basamak standart bir PCR reaksiyonundan farklıdır. Standart bir PCR reaksiyonunda eşit miktarlarda forward ve reverse primerler bulunurken, bu yöntemde primerlerden biri diğerinden fazla miktarda bulunmaktadır. Bu durumda çift iplikli ürünlere ek olarak bir miktar da tek iplikli DNA ürünü oluşmaktadır. Bu basamakta oluşan tek iplikli ve çift iplikli ürünler hibridizasyon reaksiyonunda kullanılacaktır.

Master mix oda sıcaklığına ısıtılmıştır (18-30 °C). Yaklaşık 10 sn. hafifçe vortekslenmiş ve 5-10 sn. mikrosantrifüjde spin attırılmıştır. Aşağıdaki tablo kullanılarak n+1 reaksiyonluk bileşenler hazırlanmıştır (DNA hariç). Reaksiyon başına son miktar 50 µL olacak şekilde hesaplanarak nuclease-free su eklenmiş sonrasında hafifçe vorteks yapılmıştır. Karışım PCR tüplerine dağıtılarak DNA'lar eklenmiştir. Örnekler termal cycler'a yerleştirilip amplifikasyon aşaması gerçekleştirilmiştir.

Hibridizasyon basamağında prob mix'ler 55-60 °C'de 5-10 dk. ısıtılmıştır. Ardından yaklaşık 15 sn. sonikatörde tutulup ve 15 sn. kadar hafifçe vorteks yapılmıştır. Costar plaklara 5 µL PCR ürünü ve üzerine 15 µL prob mix eklenmiştir. Plağın üzeri silikon ile kapatılıp örnekler termal cycler'da inkübasyon koşullarında hibridize edilmiştir. Örnekler hibridize edilirken 1:200 oranında Dilüsyon solüsyonu/SA-PE karışımı hazırlanmıştır (1 örnek için 0,85 µL SAPE 170 µL dilüsyon solüsyonu olacak şekilde hazırlanır). Dilüsyon solüsyonu/SA-PE karışımı oda sıcaklığında ve karanlıkta saklanmıştır (SA-PE ışığa duyarlıdır). Plak termal cycler'da ve 56°C'de iken her bir kuyucuğa 170 µL dilüe SA-PE eklenmiştir ve ardından plak Luminex cihazına yerleştirilmiştir.

Kullanmakta olduğumuz Luminex cihazı örnekler analiz edilmeden en az 30 dk. önce açılmıştır. Cihazı analize hazırlamak için cihaz programındaki "prime", "alcohol flush" ve "wash" basamakları tamamlanmış ve örnekler analizden önce toplu olarak cihaza kayıt edilmiştir.

3.2.3 Sanger SBT Yöntemi

Sanger SBT yönteminde HLA-A, -B ve -DR lokusları için QIAGEN Long Range PCR Kit (Qiagen, Hollanda), SBTexcellerator Core Kit (GenDX, Hollanda), SBTexcellerator Extended Kit (GenDX, Hollanda) kitleri kullanılmaktadır.

Bu yöntemin ilk basamağında HLA-A, -B ve -DR lokusları Qiagen Long Range PCR kiti kullanılarak lokuslar şeklinde amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonucu elde edilen ürünlerin saflaştırılması, ortamdaki deoksiribonükleotid trifosfat ve primerlerin uzaklaştırılması için Exo-SAP basamağı uygulanmıştır. Bu basamakta Exonuclease ve SAP kullanılmıştır. Sonrasından işlemin kontrolü amacıyla elektroforez işlemi yapılmıştır. Jel, UV translüminatör ile görüntülenmiştir. Oluşan bantlarda kirlilik gözlemlendiği takdirde işlem tekrarlanmış olup, temiz bantlar elde edildiğinde ise bir sonraki aşamaya geçilmiştir. Bu aşama temizlenmiş lokuslara özgü amplikonların ekzonlar şeklinde çoğaltıldığı sekans aşamasıdır. Bu basamakta SBTexcellerator Core Kit ile sekans reaksiyon plateleri kullanılmıştır. Her bir lokus için lokusa özgü 6'şar adet primer bulunmaktadır. Her bir kuyuda 5,5 µL su, 1,5 µL buffer ve 1 µL reaksiyon mix olacak şekilde n+1'lik mix hazırlanmıştır ve kuyulara 8'er µL mix ve üzerine 1 µL primer ve 1 µL amplikon dağıtılmıştır. Plate'in üzeri kapatılarak thermal cycler'a yerleştirilmiştir.

Sonraki basamak filtrasyon aşamasıdır. Filtrasyon için plate'lerde sephadex hazırlanıp plate santrifüjle filtrasyon gerçekleştirilmiştir. Bunun için sephadex özel aparatı ile kuyucuk başına 45g olacak şekilde plate aktarılmıştır ve her kuyuda sephadex üzerine 300 µl steril distile su eklenir ve 3 saat donması için beklendikten sonra plate santrifüjle 800 g'de 500 dk. olacak şekilde suyu uzaklaştırılmıştır. Daha sonra PCR ürünlerinin üzerine 10 µl steril distile su ilave edilmiş ve örnekler sephadex'li plate'e aktarılarak tekrar 800 g'de 500 dk. ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda örnekler dizileme için kullanılan barkotlu plate'lere geçmiştir.

Son aşama olarak, örneklerin bulunduğu barkodlu plate thermal cycler'da denatürasyon için hazırlanmış protokol ile denatüre edilmiştir. Thermal cycler'dan çıkarılan örnekler buz üzerinde taşınarak sekans cihazına yerleştirilmiştir.

Cihazın analizi bittikten sonra sonuçlar SBTengine ver 3.9.0 (GenDX, Hollanda) değerlendirilmiştir.

3.2.4 Haplotiplerin Belirlenmesi

Haplotipler segregasyon ile saptanmıştır. Hesaplamalar için, akrabalık ilişkisi bulunmadığından anne ve babaların haplotipleri dahil edilmiştir. Böylelikle haplotip tekrarından kaçınılmıştır. Anne ve babadan en az birinin genotipinin bilinmediği ailelerde ise anne ve babanın haplotipleri çocuklardaki geçişlerden çıkarılmıştır.

3.2.5 İstatistiksel Analiz

Hardy-Weinberg Dengesi (Hardy-Weinberg Equilibrium) analizi ($p>0,05$) ve Bağlantı Dengesizliği (Linkage Disequilibrium) analizi Arlequin ver 3.5.2.2 ile Windows 7 bilgisayar programı ortamında yapılmıştır.

Frekans analizleri Statistical Package for Social Sciences for Windows Version 21.0 (SPSS 21.0 Inc, Chicago, USA) kullanılarak Windows 7 bilgisayar programı ortamında yapılmıştır.

4 BULGULAR

Bu çalışmada 2011-2015 yılları arasında HLA doku tiplemesi yapılan 2341 bireyin doku tipi bilgilerine ulaşılarak tek bir dosyada toplandı ve istatistiksel analizleri yapıldı. HLA-A, -B, -DRB1 lokusları çalışılmış ve haplotipleri belirlenebilen 391 aile gruplandırılarak pedigrileri çıkarıldı. Bu aileler, anne ve baba bilgilerinin bulunup bulunmamasına göre dört alt gruba ayrıldı (Tablo 6). Anne ve babanın olduğu aile (Grup 1) sayısı 95, sadece annenin olduğu aile (Grup 2) sayısı 64, sadece babanın olduğu aile (Grup 3) sayısı 50, son olarak da anne ve babanın olmadığı aile (Grup 4) sayısı 182 olarak belirlendi. Toplamda 1272 HLA-A-B -DRB1 haplotipi saptandı. Bu frekanslar hem toplamda hem de gruplar içinde ayrı ayrı değerlendirildi. Allel frekansları için haplotipi saptanamayan gruptan akrabalık bağı bulunmayan 261 birey de dahil edildi ve toplamda 1797 allelin frekansları hesaplandı.

Tablo 6. Aile gruplarının ve bireylerinin sayıları

	Aile Grubu	Sayısı	Birey Sayısı
Grup 1	Anne ve Babanın Olduğu Grup	95	417
Grup 2	Sadece Annenin Olduğu Grup	64	175
Grup 3	Sadece Babanın Olduğu Grup	50	132
Grup 4	Anne ve Babanın Olmadığı Grup	182	641
	TOPLAM	391	1365

HLA-A, -B, -DRB1 lokuslarının Hardy-Weinberg dengesi analizi sonuçları Tablo 7’te gösterilmektedir.

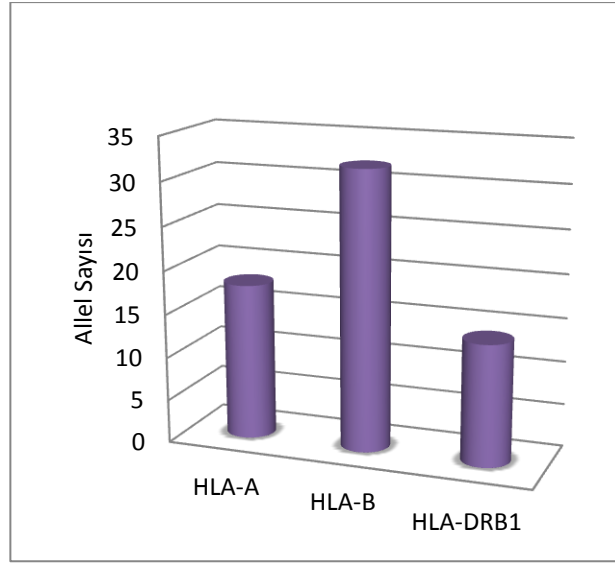
Tablo 7. Hardy-Weinberg Analizi

LOKUS	HeObs	HeExp	p	SD
HLA-A	0.89971	0.89394	0.20377	0.00030
HLA-B	0.90857	0.92090	0.11080	0.00018
HLA-DRB1	0.87143	0.88037	0.37615	0.00050

HeObs: Gözlenen heterozigotluk HeExp: Beklenen heterozigotluk p: olasılık (istatistiksel anlamlılık)

SD: Standart sapma

Her bir HLA lokusunda görülen allel sayısı Şekil 9’da gösterilmektedir.

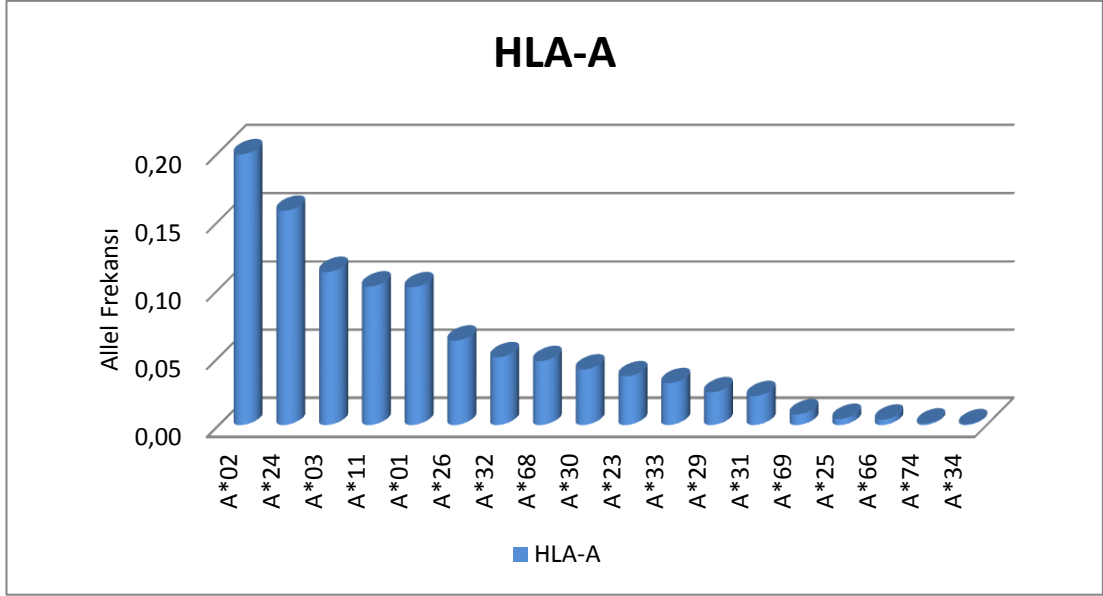


Şekil 9. HLA lokuslarında saptanan farklı allel sayıları

Gözlenen 18 farklı HLA-A allelinin frekansları Tablo 8 ve Şekil 10’da gösterilmiş olup en sık görülen 3 allel sırasıyla A*02, A*24 ve A*03 olarak belirlendi.

Tablo 8 HLA-A lokusundaki allellerin frekansları

HLA-A	FREKANS
A*02	0,198
A*24	0,157
A*03	0,112
A*11	0,102
A*01	0,101
A*26	0,062
A*32	0,050
A*68	0,047
A*30	0,041
A*23	0,036
A*33	0,031
A*29	0,024
A*31	0,021
A*69	0,008
A*25	0,004
A*66	0,004
A*74	0,001
A*34	0,001



Şekil 10. HLA allellerinin frekansları

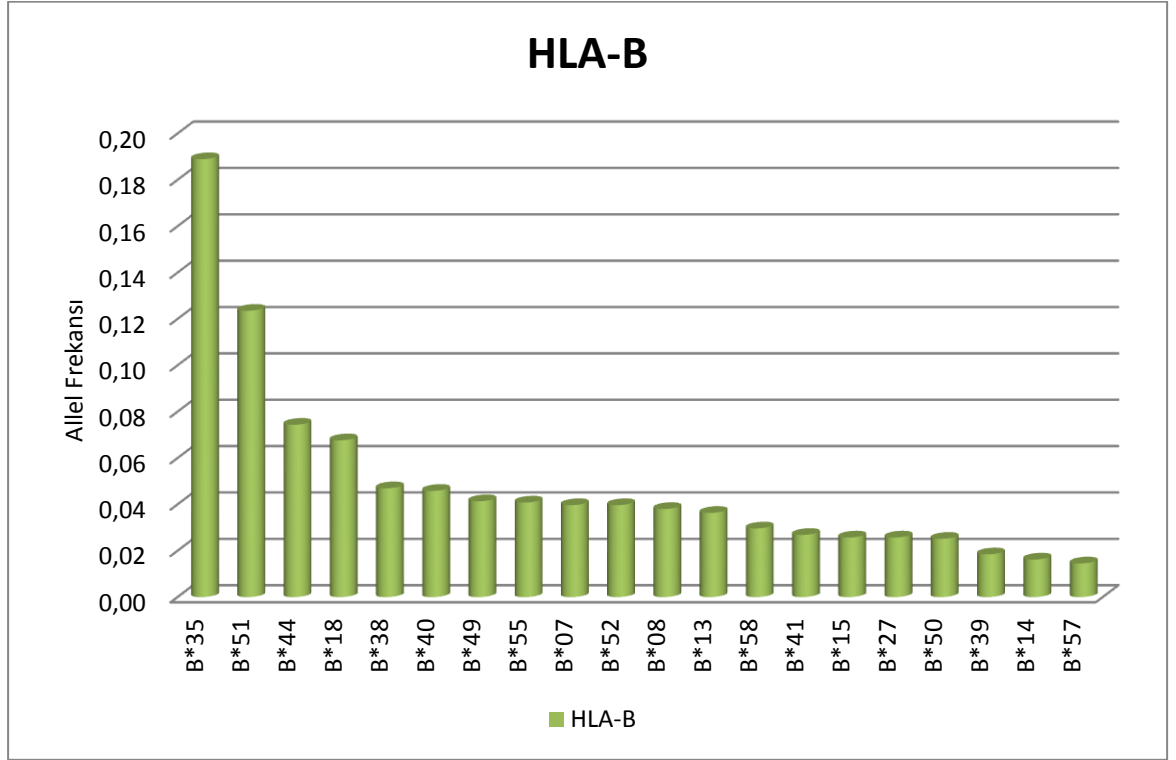
HLA-B lokusunda saptanan 32 farklı HLA-B allellerinin frekansları Tablo 9 ve Şekil 11’de gösterildi ve B*35, B*51 ve B*44 allelleri en sık görülenlerdi.

Tablo 9. HLA-B allellerinin frekansları

HLA-B	FREKANS
B*35	0,188
B*51	0,124
B*44	0,074
B*18	0,068
B*38	0,046
B*40	0,046
B*49	0,041
B*55	0,041
B*07	0,040
B*52	0,040
B*08	0,038
B*13	0,036
B*58	0,030
B*41	0,027
B*15	0,026
B*27	0,026
B*50	0,025
B*39	0,018
B*14	0,016
B*57	0,014

Tablo 9. HLA-B allellerinin frekansları (devamı)

B*37	0,012
B*53	0,007
B*47	0,003
B*45	0,003
B*48	0,003
B*56	0,002
B*54	0,002
B*62	0,001
B*46	0,001
B*60	0,001
B*63	0,001
B*73	0,001

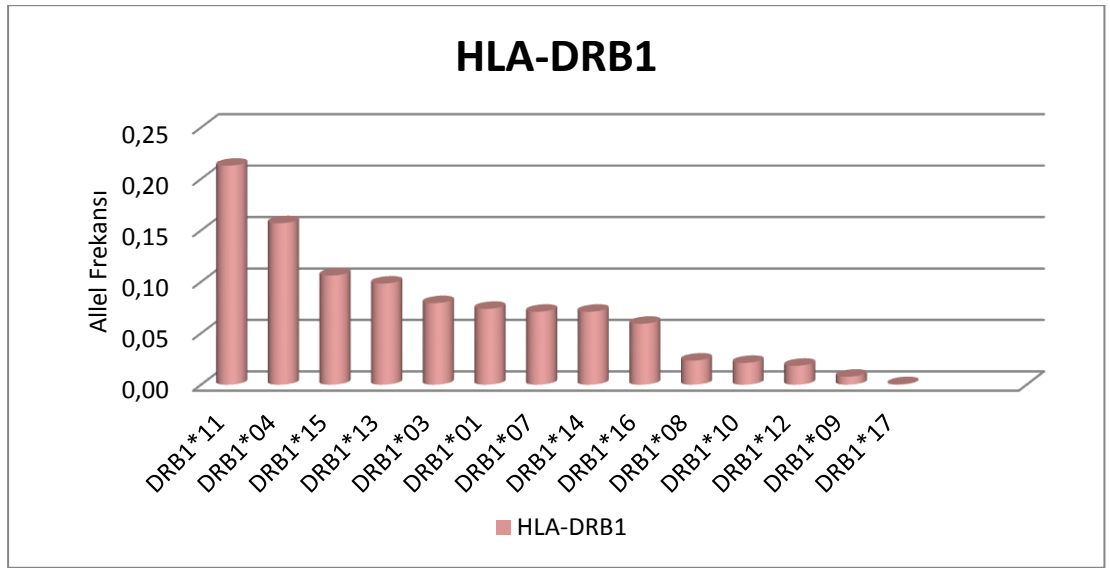


Şekil 11. HLA-B allellerinin frekansları

HLA-DRB1 lokusunda 14 farklı allel belirlendi. En sık görülen alleller DRB1*11, DRB1*04 ve DRB1*15 olarak bulundu (Tablo 10, Şekil 12).

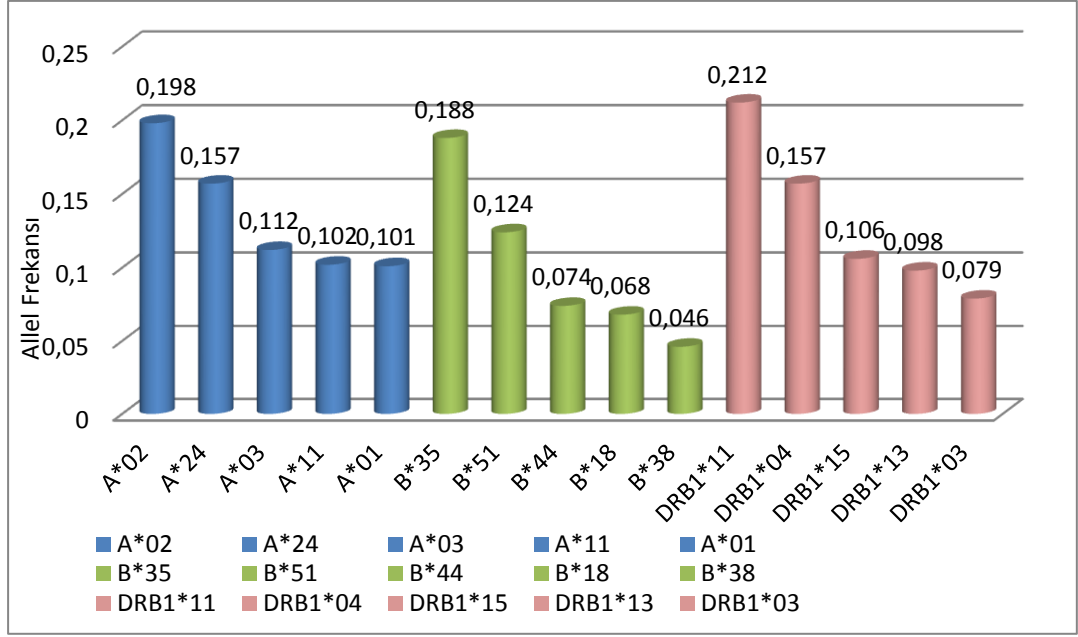
Tablo 10. HLA-DRB1 allellerinin frekansları

HLA-DR	FREKANS
DRB1*11	0,213
DRB1*04	0,157
DRB1*15	0,106
DRB1*13	0,098
DRB1*03	0,079
DRB1*01	0,074
DRB1*07	0,071
DRB1*14	0,071
DRB1*16	0,059
DRB1*08	0,023
DRB1*10	0,021
DRB1*12	0,018
DRB1*09	0,008
DRB1*17	0,001



Şekil 12. HLA-DRB1 allellerinin frekansları

Çalışılan HLA lokuslarında en sık görülen 5 allel Şekil 13’de frekansları ile birlikte gösterilmektedir.



Şekil 13. En sık görülen 5 HLA-A, HLA-B ve HLA-DRB1 allellerinin frekansları

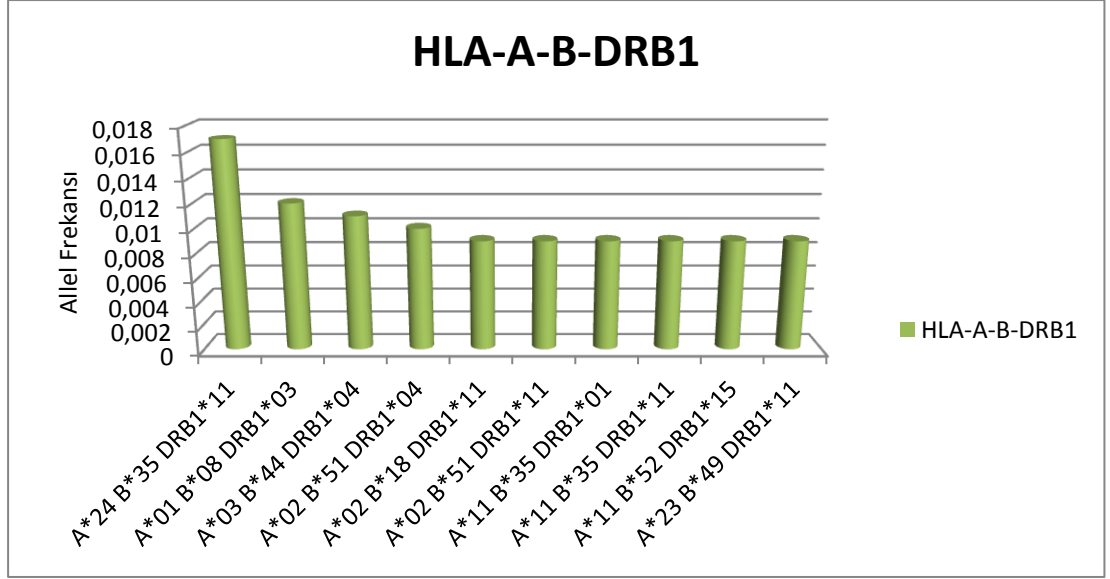
Çalışma grubumuzdaki 1272 HLA-A-B-DR haplotipi içerisinde 646 farklı belirlendi. Bu haplotiplerden 236 tanesi 2-21 arası tekrarlararken, 410 tanesi ise sadece bir defa gözlemlendi. En sık görülen 26 haplotipin frekansı Tablo 11’de verilmektedir. Şekil 14’te en sık 10 haplotip ve frekansları gösterilmektedir.

Tablo 11. En sık görülen 26 HLA-A-B-DRB1 haplotiplerinin frekansları

A-B-DRB1 HAPLOTİP	FREKANS
A*24 B*35 DRB1*11	0,017
A*01 B*08 DRB1*03	0,012
A*03 B*44 DRB1*04	0,011
A*02 B*51 DRB1*04	0,010
A*02 B*18 DRB1*11	0,009
A*02 B*51 DRB1*11	0,009
A*11 B*35 DRB1*01	0,009
A*11 B*35 DRB1*11	0,009
A*11 B*52 DRB1*15	0,009
A*23 B*49 DRB1*11	0,009
A*01 B*52 DRB1*15	0,008
A*02 B*35 DRB1*04	0,008
A*02 B*44 DRB1*11	0,008
A*11 B*35 DRB1*04	0,008
A*02 B*50 DRB1*07	0,007
A*03 B*35 DRB1*11	0,007
A*24 B*44 DRB1*11	0,007
A*24 B*51 DRB1*11	0,007
A*30 B*13 DRB1*07	0,007
A*03 B*18 DRB1*11	0,006

Tablo 11. En sık görülen 26 HLA-A-B-DRB1 haplotiplerinin frekansları (devamı)

A*24 B*18 DRB1*11	0,006
A*02 B*44 DRB1*04	0,006
A*02 B*44 DRB1*15	0,006
A*03 B*35 DRB1*01	0,006
A*03 B*35 DRB1*04	0,006
A*24 B*38 DRB1*13	0,006

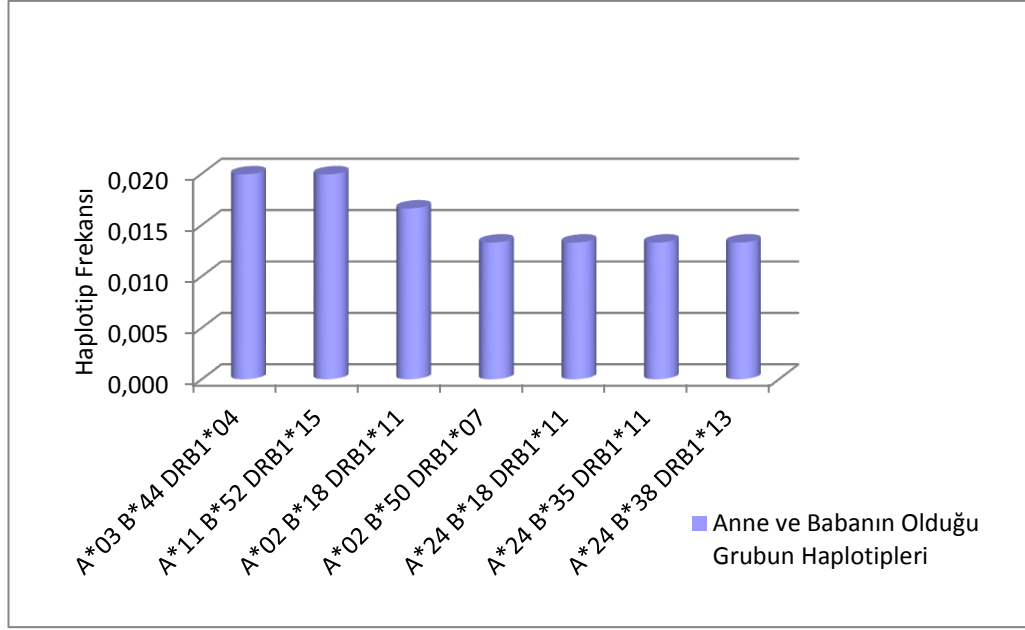


Şekil 14 En sık görülen 10 HLA-A-B-DRB1 haplotiplerinin frekansları

Aile grupları içerisinde çıkarılan haplotipler de ayrıca değerlendirildi. Anne ve babanın olduğu Grup 1’de 417 bireyin olduğu 95 ailenin haplotip frekansları analiz edildi (Tablo 12 ve Şekil 15).

Tablo 12. Grup 1’de en sık bulunan haplotip frekansları

Anne ve Babanın Olduğu Grubun Haplotipleri	Frekans
A*03 B*44 DRB1*04	0,020
A*11 B*52 DRB1*15	0,020
A*02 B*18 DRB1*11	0,017
A*02 B*50 DRB1*07	0,013
A*24 B*18 DRB1*11	0,013
A*24 B*35 DRB1*11	0,013
A*24 B*38 DRB1*13	0,013

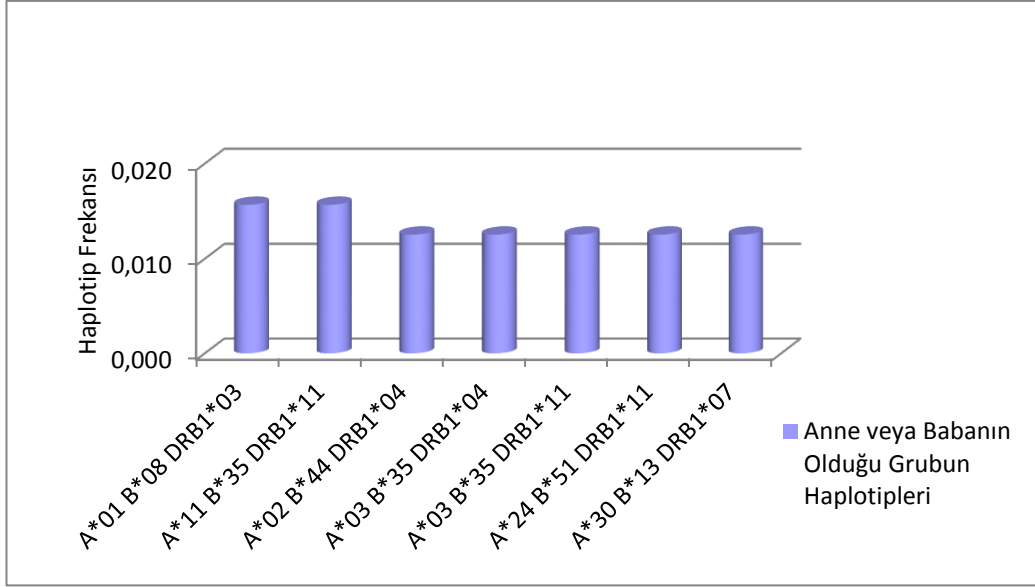


Şekil 15 Grup 1’de en sık bulunan haplotip frekansları

Annenin olduğu grup (Grup 2) ile babanın olduğu grup (Grup 3) birlikte değerlendirilmeye alındı. Toplamda 307 bireyin olduğu 114 aileden oluşan bu grubun (anne veya babanın olduğu grup) en sık görülen haplotipleri Tablo 13 ve Şekil 16’da verildi.

Tablo 13. Grup 2 ve 3’te sık bulunan haplotip frekansları

Anne veya Babanın Olduğu Grubun Haplotipleri	Frekans
A*01 B*08 DRB1*03	0,016
A*11 B*35 DRB1*11	0,016
A*02 B*44 DRB1*04	0,013
A*03 B*35 DRB1*04	0,013
A*03 B*35 DRB1*11	0,013
A*24 B*51 DRB1*11	0,013
A*30 B*13 DRB1*07	0,013

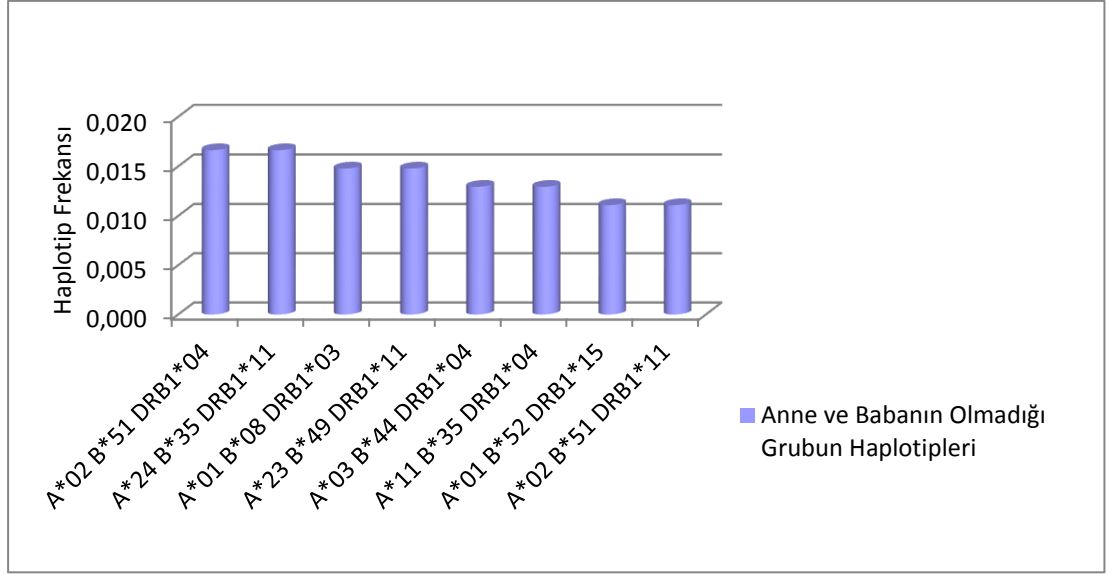


Şekil 16. Grup 2 ve 3'te sık bulunan haplotip frekansları

Anne ve babanın olmadığı grupta (Grup 4) toplamda 641 bireyin olduğu 182 ailenin haplotipleri arasında en sık olanlar A*02 B*51 DRB1*04 ve A*24 B*35 DRB1*11 olarak belirlendi (Tablo 14 ve Şekil 17).

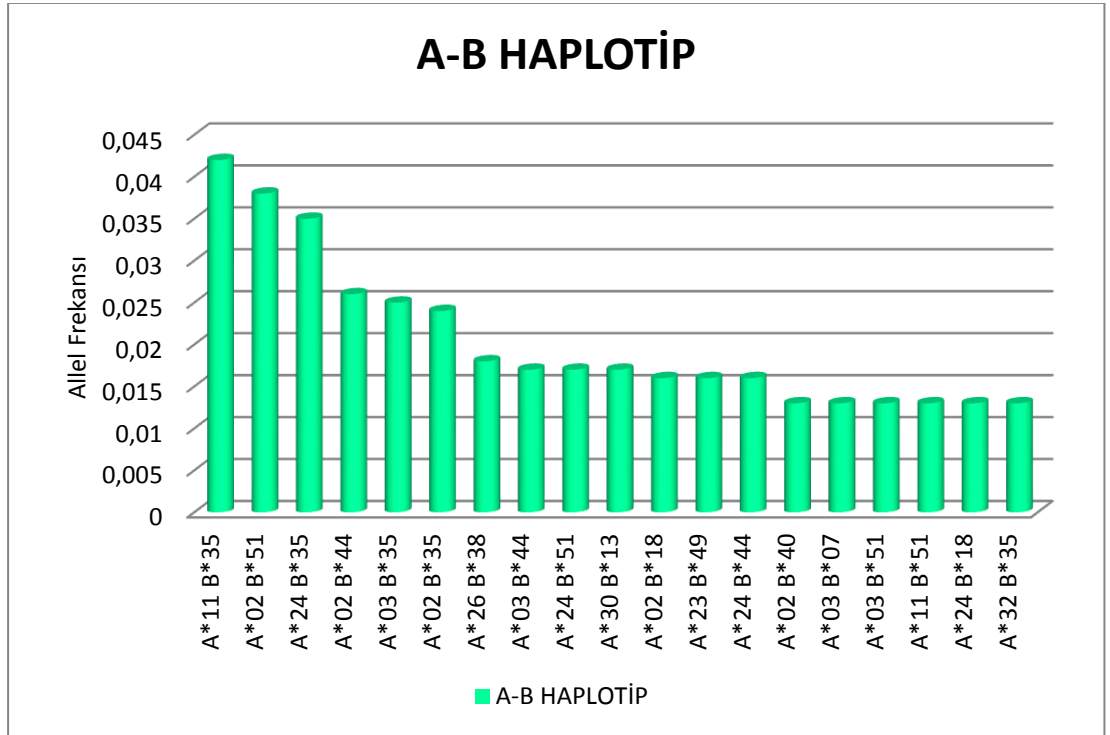
Tablo 14. Grup 4'te sık bulunan haplotip frekansları

Anne ve Babanın Olmadığı Grubun Haplotipleri	Frekans
A*02 B*51 DRB1*04	0,017
A*24 B*35 DRB1*11	0,017
A*01 B*08 DRB1*03	0,015
A*23 B*49 DRB1*11	0,015
A*03 B*44 DRB1*04	0,013
A*11 B*35 DRB1*04	0,013
A*01 B*52 DRB1*15	0,011
A*02 B*51 DRB1*11	0,011



Şekil 17 Grup 4'te sık bulunan haplotip frekansları

Ayrıca HLA-A-B, HLA-B-DRB1 ve HLA-A-DRB1 şeklinde ikili haplotiplerin sıklıkları belirlendi. Şekil 18 ve Tablo 15'te en sık 19 HLA-A-B haplotipinin frekansları gösterilmektedir. En sık görülen HLA-A-B haplotip A*11-B*35'tir.

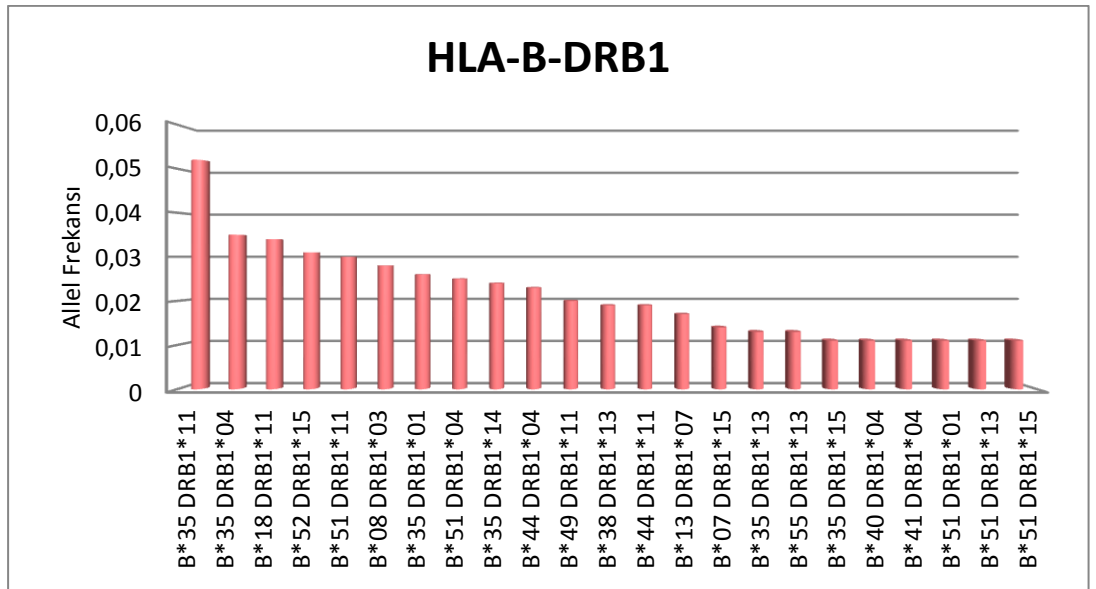


Şekil 18. HLA-A-B haplotiplerinin frekansları

Tablo 15. HLA-A-B haplotiplerinin frekansları

A-B HAPLOTİP	FREKANS	LD'
A*11 B*35	0,042	0,29
A*02 B*51	0,038	0,14
A*24 B*35	0,035	0,04
A*02 B*44	0,026	0,15
A*03 B*35	0,025	0,04
A*02 B*35	0,024	-0,36
A*26 B*38	0,018	0,35
A*03 B*44	0,017	0,11
A*24 B*51	0,017	-0,15
A*30 B*13	0,017	0,48
A*02 B*18	0,016	-0,59
A*23 B*49	0,016	0,39
A*24 B*44	0,016	0,04
A*02 B*40	0,013	0,09
A*03 B*07	0,013	0,22
A*03 B*51	0,013	-0,05
A*11 B*51	0,013	0,00
A*24 B*18	0,013	0,06
A*32 B*35	0,013	0,09

En sık görülen HLA-B-DR haplotipleri Şekil 19 ve Tablo 16'da gösterilmiş olup en sık görülen HLA-B-DRB1 haplotipi B*35-DRB1*11 olarak saptanmıştır.

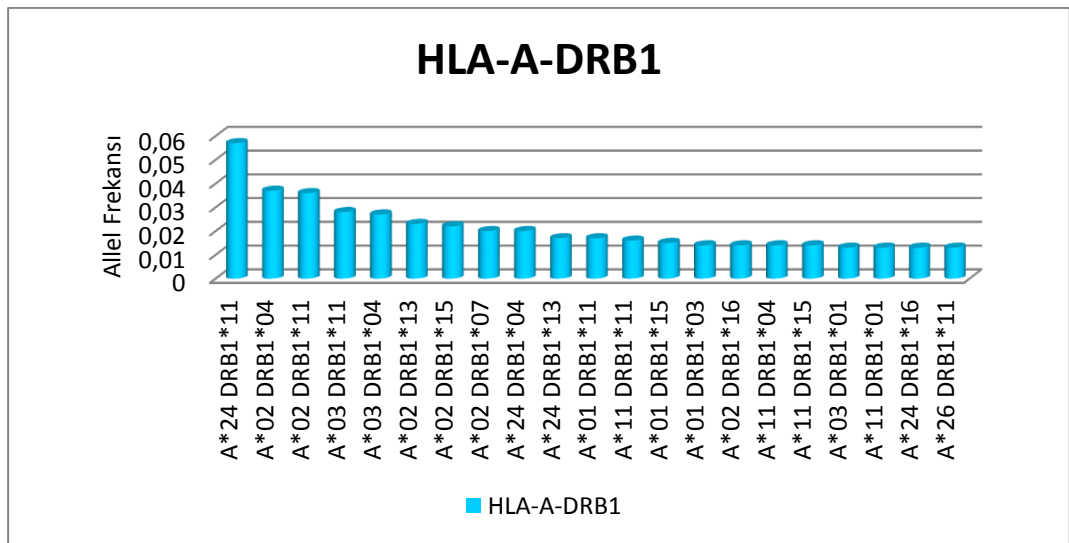


Şekil 19. HLA-B-DR haplotiplerinin frekansları

Tablo 16. HLA-B-DRB1 haplotiplerinin frekansları

B-DRB1 HAPLOTİP	FREKANS	LD'
B*35 DRB1*11	0,052	0,08974
B*35 DRB1*04	0,035	0,04814
B*18 DRB1*11	0,034	0,40420
B*52 DRB1*15	0,031	0,77205
B*51 DRB1*11	0,030	0,04135
B*08 DRB1*03	0,028	0,80398
B*35 DRB1*01	0,026	0,20526
B*51 DRB1*04	0,025	0,05636
B*35 DRB1*14	0,024	0,08974
B*44 DRB1*04	0,023	0,21170
B*49 DRB1*11	0,020	0,14895
B*38 DRB1*13	0,019	0,35255
B*44 DRB1*11	0,019	0,32566
B*13 DRB1*07	0,017	0,02882
B*07 DRB1*15	0,014	0,24858
B*35 DRB1*13	0,013	0,18089
B*55 DRB1*13	0,013	-0,33814
B*35 DRB1*15	0,011	-0,42625
B*40 DRB1*04	0,011	0,07511
B*41 DRB1*04	0,011	0,26081
B*51 DRB1*01	0,011	0,03063
B*51 DRB1*13	0,011	-0,18065
B*51 DRB1*15	0,011	-0,19913

HLA-A-DRB1 haplotiplerine ait frekanslar ise Şekil 20 ve Tablo 17'de gösterilmektedir. En sık görülen HLA-A-DRB1 haplotipi A*24-DRB1-11 olarak belirlendi.



Şekil 20. HLA-A-DRB1 haplotiplerinin frekansları

Tablo 17. HLA-A-DRB1 haplotiplerinin frekansları

A-DR HAPLOTİP	FREKANS	LD'
A*24 DRB1*11	0,057	0,18079
A*02 DRB1*04	0,037	0,03838
A*02 DRB1*11	0,036	-0,15677
A*03 DRB1*11	0,028	0,03486
A*03 DRB1*04	0,027	0,08806
A*02 DRB1*13	0,023	0,00639
A*02 DRB1*15	0,022	0,00866
A*02 DRB1*07	0,020	0,12132
A*24 DRB1*04	0,020	-0,22450
A*24 DRB1*13	0,017	-0,01534
A*01 DRB1*11	0,017	-0,22708
A*11 DRB1*11	0,016	-0,26389
A*01 DRB1*15	0,015	0,04817
A*01 DRB1*03	0,014	0,10566
A*02 DRB1*16	0,014	0,05163
A*11 DRB1*04	0,014	-0,11448
A*11 DRB1*15	0,014	0,03943
A*03 DRB1*01	0,013	0,07464
A*11 DRB1*01	0,013	0,08920
A*24 DRB1*16	0,013	0,00842
A*26 DRB1*11	0,013	0,01661

Yapılan analizler esnasında 391 aileden dördünde rekombinasyon olayı gözlemlenmiştir. Bunlardan üçü HLA-A ve HLA-B lokusları arasında, biri ise HLA-B ve HLA-DRB1 lokusu arasında gerçekleşmiştir (Tablo 18).

Rekombinasyon yüzdeleri, aktarım başına yüzde olacak şekilde hesaplanmıştır.

Rekombinasyon yüzdesi = R/T

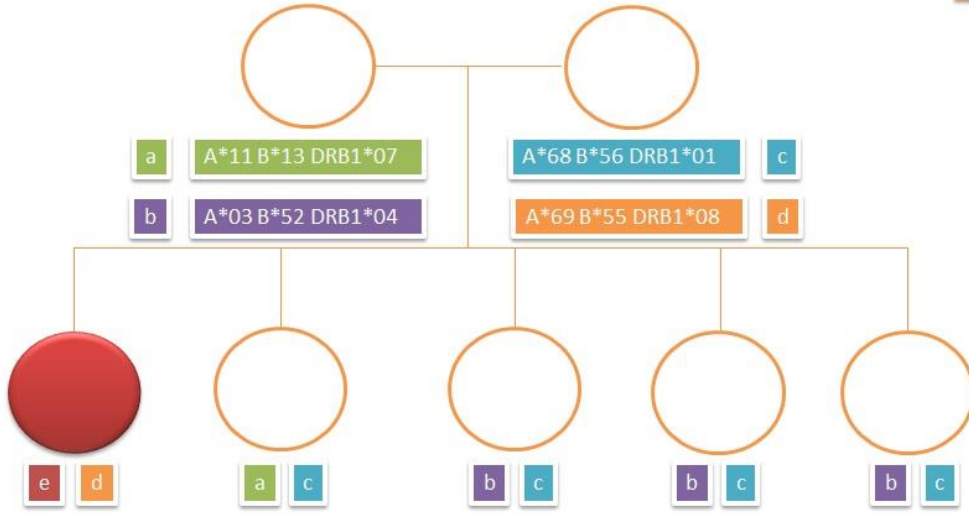
[R: rekombinasyon sayısı, T: Aktarım (Transmission) sayısı = çocuk sayısı x 2]

Tablo 18. Rekombinasyon sayı ve yüzdeleri

Toplam Aile Sayısı	Toplam Çocuk Sayısı	A/B Lokusları Arası Rekombinasyon Sayısı (%R/T)	B/DR Lokusları Arası Rekombinasyon Sayısı (%R/T)	Toplam Rekombinasyon Sayısı (%R/T)
391	1061	3 (0,57)	1 (0,19)	4 (0,75)

Saptanan 4 rekombinasyon durumu Şekil 21, 22, 23 ve 24'te ayrı ayrı gösterilmektedir.

1

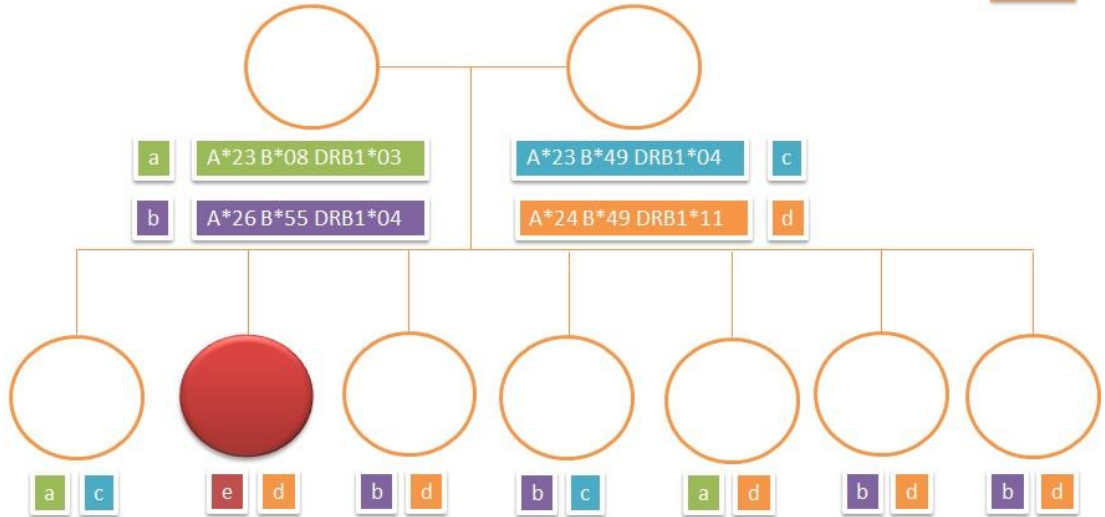


(e) A*03 B*52 DRB1*07

Rekombinasyon B/DR lokusları arasında olmuştur.

Şekil 21. Rekombinasyon saptanan aile pedigrisi (1) (Pedigrideki şekiller cinsiyete dair bir ayrım ifade etmemektedir.)

2

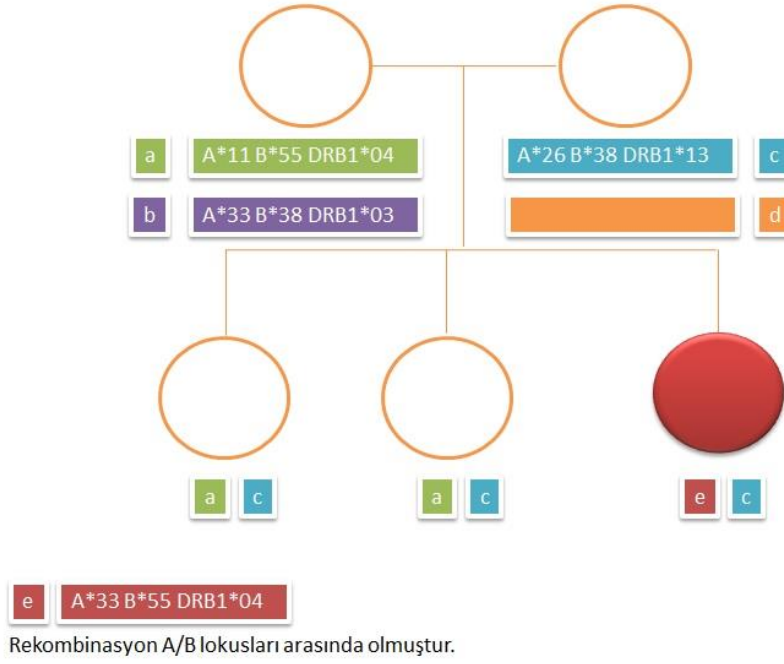


(e) A*23 B*55 DRB1*04

Rekombinasyon A/B lokusları arasında olmuştur.

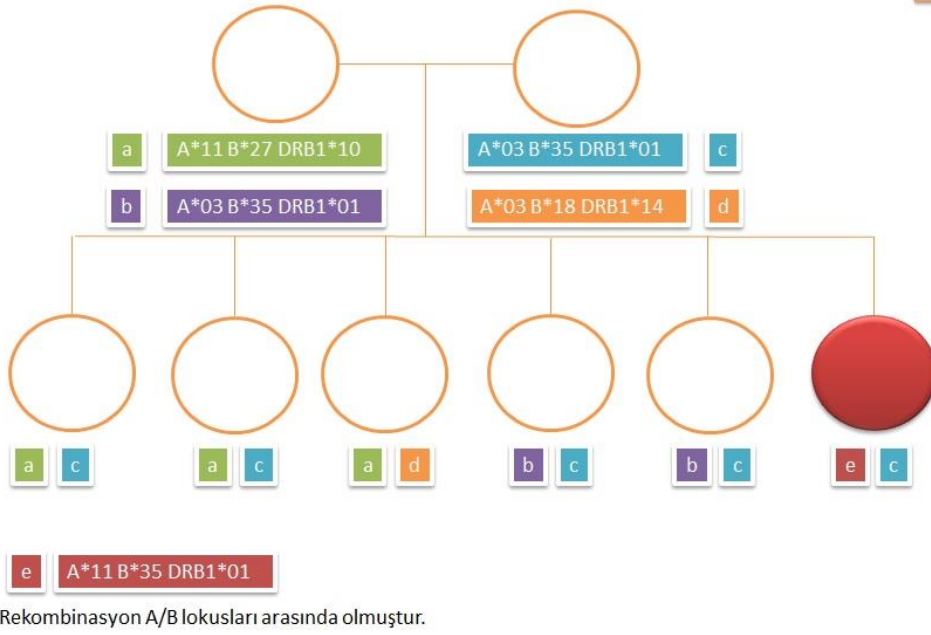
Şekil 22. Rekombinasyon saptanan aile pedigrisi (2) (Pedigrideki şekiller cinsiyete dair bir ayrım ifade etmemektedir.)

3



Şekil 23. Rekombinasyon saptanan aile pedigrisi (3) (Pedigrideki şekiller cinsiyete dair bir ayrım ifade etmemektedir.)

4



Şekil 24. Rekombinasyon saptanan aile pedigrisi (4) (Pedigrideki şekiller cinsiyete dair bir ayrım ifade etmemektedir.)

5 TARTIŞMA

Bu çalışmada HLA doku tiplemesi yapılmış olan 2341 kişinin doku tipleme sonuçları incelendi ve HLA-A,-B-DRB1 haplotipleri belirlenen toplamda 1365 bireyin bulunduğu 391 aile analiz edildi (Tablo 6). Anne ve babanın genotip bilgisinin bulunup bulunmamasına göre 4 gruba ayrılan ailelerin haplotipleri hem gruplar içinde hem de toplamda elde edilen 1272 haplotip bir arada olacak şekilde ayrı ayrı analiz edildi. Allel tekrarında kaçınmak için haplotiplerde bulunan alleller ve bunlara ek olarak haplotipi saptanamayan ve akrabalık ilişkisi bulunmayan 261 birey dâhil edilerek toplamda her bir lokusta (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1) 1797 allel frekanslarının bulunması için analiz edildi.

Kalıtıl denge yasası veya genetik denge yasası olarak da bilinen Hardy-Weinberg dengesinin temeli; mutlak, rastgele eşleşen bir grupta göç, mutasyon, seçim ya da genetik sürüklenmenin olmadığı durumda grupta genotip frekansı ve lokustaki gen frekansı Hardy-Weinberg dengesi olarak bilinen genetik denge durumuna ulaşarak nesilden nesile değişmeden kalacağı şeklindedir. Fakat, bu ideal popülasyon kriterlerini oluşturan koşullar, pratikte pek mümkün olmaz. Buna rağmen, Hardy-Weinberg dengesi gen dağılımı çalışmalarında temeldir. Çünkü bütün faktörlerin etkilediği model oluşturmak olası değildir ve çeşitli faktörler birbirlerini etkileyebilirler (22). Bu çalışmada 1797 allel verisi esas alınarak Hardy-Weinberg dengesi hesaplandığında beklendiği gibi HLA-A ($p=0,20377$), HLA-B ($p=0,11080$) ve HLA-DRB1 ($p=0,37615$) lokuslarında dengesizlik saptandı (Tablo 7).

Her geçen gün bilinen HLA allellerinin sayısı artsa da, tek popülasyon ele alındığında tipleme çözünürlüğü ve çoğunlukla da örnek sayısının az olması nedeniyle bu polimorfizmlerin çok küçük bir kısmı saptanabilmektedir. Her bir popülasyonda çoğu lokusta (sınıf II moleküllerinin α zincirini kodlayan genler hariç) 10 ile 30 arasında farklı allel görülmektedir. En çok farklı allelin görüldüğü HLA-B lokusunda ise ortalama 30-32'dir (30). Çalışmamızda her bir lokusta görülen farklı allel sayıları HLA-A lokusunda 18, HLA-B lokusunda 32 ve HLA-DRB1 lokusunda 14 farklı allel belirlendi (Şekil 9).

HLA bölgesindeki yüksek seviyedeki çeşitlilik sınıf I HLA genlerinde ekzon 2 ve ekzon 3'te, sınıf II genlerinde ise ekzon 2'den kaynaklanmaktadır. Bu ekzonlar protein düzeyinde HLA moleküllerinin peptit bağlama bölgelerinden sorumludur. HLA allelleri arasındaki DNA dizisi farklılığı yaklaşık olarak ortalama 10 ile 25 nükleotiddir. Farklı HLA molekülleri farklı peptit gruplarına bağlandığı için bu geniş kapsamlı fonksiyon gereği olarak HLA allelleri polimorfiktir. Farklı popülasyonlardaki HLA dağılımı bu fonksiyonel polimorfizmin sonucu olabilir (30).

Yaptığımız literatür taramalarına göre Türkiye popülasyonunda HLA allel frekansları ile ilgili yapılmış 5 farklı çalışma bulunmaktadır. Arnaiz-Villena ve ark. (31) 2001 yılında 228 birey ile yaptığı çalışmaya göre; A*02, A*24 ve A*03 en sık görülen 3 HLA-A, B*51, B*35 ve B*44 en sık görülen 3 HLA-B alleli, DRB1*11, DRB1*04 ve DRB1*07 en sık görülen 3 HLA*DRB1 alleli olarak belirlenmiştir. Saruhan-Direskeneli ve ark. (32) çalışmasında ise 250 bireyde en sık 3 HLA-DRB1 alleli DRB1*11:01, DRB1*03:01 ve DRB1*07:01 olarak saptanmıştır. Uyar ve ark. (33) yaptıkları çalışmada 152 bireyin HLA frekanslarını analiz etmişler ve HLA-A'da A*02, A*24, A*01 ve HLA-B'de B*35, B*51, B*44 en sık alleller olarak tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada Erikoğlu ve ark. (34) 362 bireyi dahil ettikleri çalışmalarında HLA-A lokusunda A*02, A*24 ve A*03, HLA-B lokusunda B*35, B*51 ve B*44, HLA-DRB1 lokusunda ise DRB1*11, DRB1*04 ve DRB1*13 allellerini en sık alleller olarak saptamışlardır. Diğer bir çalışmada Kayhan ve ark. (35) 408 diyaliz hastasında HLA allel frekanslarını analiz ettiklerinde A*02, A*24, A*11, B*35, B*51, DRB1*11, DRB1*04 ve DRB1*13 allellerini en sık alleller olarak belirlemişlerdir.

Çalışmamızda HLA-A, HLA-B ve HLA-DRB1 lokuslarındaki allellerin frekansları HLA-A lokusunda sırasıyla A*02 (%19,8), A*24 (%15,7), A*03 (%11,2), A*11 (%10,2) ve A*01 (%10,1) en sık bulunan 5 allel olarak belirlendi (Tablo 8, Şekil 10). HLA-B lokusundaki en sık alleller B*35 (%18,8), B*51 (%12,4), B*44 (%7,4), B*18 (%6,8) ve B*38 (%4,6) olarak belirlendi (Tablo 9, Şekil 11). HLA-DRB1 lokusunda ise en sık 5 allel DRB1*11 (%21,2), DRB1*04 (%15,7), DRB1*15 (%10,6), DRB1*13 (%9,8) ve DRB1*03 (%7,9) olarak bulundu (Tablo 10, Şekil 12). Türkiye popülasyonunda yapılan diğer çalışmalarda bulunan en sık 3 allel ile

bulduğumuz HLA-A ve HLA-B allellerinde uyum görüldü. HLA-DR lokusundaki en sık 3 allele baktığımızda ise frekans sıralamamızda ilk iki olan DRB1*11 ve DRB1*04 allelleri diğer çalışmalarla uyumluyken, üçüncü allel olan DRB1*15 çalışmalarda ilk üç sıralamasında görülmedi. Fakat sonuçlara detaylı bakıldığında DRB1*15 allelinin de diğer çalışmalarda ilk 5 allel içinde olduğunu gördük. Yapılan çalışmalarda frekans bakımından ikinci veya üçüncü olarak saptanan ve bizim çalışmamızda ilk üç sıralamasında olmayan allellerin çalışmamız içinde frekans bakımından ilk yedi içerisinde olduğu saptandı. Bu farklılıkların popülasyon çalışmalarında kısıtlayıcı rol oynayan çalışmanın örnek sayısı ve popülasyonun belirlenmesi gibi faktörlerden kaynaklandığını düşündürmektedir.

HLA bölgesinde rekombinasyon nadir gerçekleşir ve böylelikle HLA haplotipleri meydana gelir. İnsan popülasyonlarında bulunan HLA haplotiplerinin frekansları gözlenen allel frekansından düşük olur. Bu da bütün HLA haplotiplerinin popülasyonlarda aynı oranda bulunmayacağını gösterir. Gerçekten de farklı haplotipler farklı etnik gruplarda farklı frekanslarda görülmektedir (27).

Farklı lokuslardaki HLA allelleri arasında çok güçlü bir bağlantı dengesizliği (LD) veya rasgele olmayan bir ilişki mevcuttur. Başka bir deyişle, popülasyonlarda gen frekansları açısından bazı alleller beklenenden daha sık birlikte bulunurlar (30). Belirli hastalıklara karşı koruyucu etkisi olan HLA molekülleri haplotip frekanslarında önemli rol oynar. Bu HLA genlerini taşıyan haplotiplerin endemik bölgelerde yüksek frekansta olması beklenir (27). Farklı popülasyonlarda HLA allellerinin haplotip kombinasyonlarındaki farklılıklar için bir açıklama ise haplotipler tarafından kodlanan allelik ürünlerin farklı patojenlerden kaynaklanan peptit epitoplara bağlanmada tamamlayıcı/telafi edici özellikleri olduğu şeklindedir (30).

Kayhan ve ark. (35) 2013 yılında 408 diyaliz hastası ile yaptıkları çalışmada haplotip frekanslarını, popülasyon genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılan Arlequin bilgisayar programı ile hesaplamışlar ve 550 farklı HLA-A, -B, -DRB1 haplotipi içinde frekansları 0,01'den yüksek olan 4 haplotip saptamışlardır. Bu haplotiplerden üçü sırasıyla A*02-B*51-DRB1*11, A*11-B*35-DRB1*11 ve A*24-B*35-DRB1*11 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda 1365 bireyde ailesel geçiş ile

hesaplanan HLA-A, -B, -DRB1 haplotiplerinin frekansları saptandı ve 646 farklı haplotip bulundu. Bunlar arasında A*24-B*35-DRB1*11 (%1,7), A*01-B*08-DRB1*03 (%1,2) ve A*03-B*44-DRB1*04 (%1,1) en sık görülen 3 HLA-A, -B, -DRB1 haplotipi olarak belirlendi (Tablo 11, Şekil 14).

Popülasyon çalışmalarında HLA haplotipleri belirlenirken iki farklı yöntem başvurulmaktadır. Bunlardan biri ailesel geçişler esas alınarak anne, baba ve çocukların genotipleri incelenerek haplotiplerin belirlenmesi temeline dayanır. Diğeri ise; haplotip frekansı hesaplama algoritmasını esas alarak hazırlanmış olan bilgisayar programları ve online veritabanları ile tahminsel hesaplamalardır. Bu programlar ve online veritabanlarının hesaplamalarında örneklem farklılığı, eksik datalar ve tahminsel hatalar nedeniyle frekansların gerçek değerlerinden sapmalar olmaktadır. (36). Ikeda ve ark. (37) yaptıkları çalışmada hem aile çalışması ile hem de HAPLO.STATS (version 1.6.0) ile yazılımı ile haplotip frekanslarını hesaplanmışlardır. Yazılım ile bulunan tahminsel veriler, ailesel olarak bulunan gerçek haplotip sonuçları ile benzer olarak bulunmuştur.

Çalışmada ayrıca anne ve baba bilgilerine göre ayırdığımız ailesel alt gruplarda Grup 1, Grup 2 + Grup 3, Grup 4 olacak şekilde 3 ayrı analiz yapıldı. Grup 1’de en sık haplotip A*03 B*44 DRB1*04 (%2,0) (Tablo 12, Şekil 15), Grup 2 + Grup 3’te en sık haplotip A*01 B*08 DRB1*03 (%1,6) (Tablo 13, Şekil 16), Grup 4’teki en sık haplotip A*02 B*51 DRB1*04 (%1,7) (Tablo 14, Şekil 17) olarak saptandı. Yapılan analizlerin sonucunda bu gruplarda sık görülen haplotiplerin frekansları değişse de, toplu analiz sonucunda bulunan en sık haplotiplerle uyumlu olduğu görüldü.

Arnaiz-Villena ve ark. (31) çalışmasında HLA-A, -B ve HLA-B,-DRB1 haplotipleri ve bunların frekans ve bağlantı dengesizliği analizleri yapılmıştır. A*24-B*44, A*23-B*49, A*26-B*38 ve B*51-DRB1*11, B*50, DRB1*07, B*49-DRB1*14 en sık haplotipler olarak bulunmuştur. Uyar ve ark. (33) yaptıkları çalışmada HLA-A, -B haplotiplerini analiz ettiklerinde A*02-B*35, A*24-B*35, A*02-B*51 en sık 3 haplotip olarak belirlemişlerdir. Kayhan ve ark. (35) çalışmalarında A*01-B*35, A*02-B*07 ve A*02-B*08 haplotiplerini en sık HLA-A, -B haplotiplei olarak saptamışlardır. Bu çalışmada HLA-A, -B, HLA-B, -DR ve HLA-A, -DR şeklinde ikili haplotiplerin frekansları ve bunların bağlantı dengesizliği

analizleri yapıldı. HLA-A, -B haplotipleri arasında A*11-B*35 (%4,2; $D'=0,29$), A*02-B*51 (%3,8; $D'=0,14$), A*24-B*35 (%3,5; $D'=0,04$) en sık olarak saptandı (Tablo 15, Şekil 18). HLA-B, -DR haplotipleri analiz edildiğinde en sık olanlar B*35 DRB1*11 (%5,2; $D'=0,08974$), B*35 DRB1*04 (%3,5; $D'=0,04814$) ve B*18 DRB1*11 (%3,4; $D'=0,40420$) olarak bulundu (Tablo 16, Şekil 19). HLA-A, -DR analizine göre ise; A*24-DRB1*11 (%5,7; $D'=0,18079$), A*02-DRB1*04 (%3,7; $D'=0,03838$) ve A*02 DRB1*11 (%3,6; $D'=-0,15677$) frekansı en yüksek 3 haplotip olarak saptandı (Tablo 17, Şekil 20).

Bağlantı dengesizliği analizlerinde en çok kullanılan ortak değer, D' (relative linkage disequilibrium) değeridir (23). Bu değer yorumlanırken; $D'=1$ olduğunda tam bir bağlantı dengesizliği söz konusudur. $D'=0$ olduğunda ise tam bir denge durumu mevcuttur. $D'<1$ olan değerlerin göreceli büyüklüğü ile ilgili kesin bir yorum yapılamaz. Ek olarak küçük ölçekli örnek sayısı D' değerlerini artırabilir. D' değerlerinin büyüklüğü örnek sayısına bağlı olduğu için de, örnekler arası kıyaslama yapmak zordur (24). Frekansları yüksek olan haplotiplerin göreceli D' değerlerinin de beklenildiği gibi yüksek olmamasının nedeni; frekans analizi yapılırken gözlemlenen sayıların analiz edilirken, bağlantı dengesizliğinde “gözlemlenen” haplotip frekansları ile allellerin bireysel frekanslarına bağlı olarak hesaplanan “beklenen” haplotip frekansları kıyaslanarak hesaplanmasıdır.

Ikeda ve ark. (37) tarafından 2015’de 5824 aile ve 18604 birey ile Japon popülasyonunda yapılan çalışmada haplotipler segregasyon analizi ile saptanmıştır. Haplotiplerin saptanması esnasında karşılaşılan rekombinasyon olayları 266 ailede 836 çocukta aktarım başına rekombinasyon yüzdesi olarak hesaplandığında B/DRB1 lokusları arasında rekombinasyon olayı %0,54 ve A/DRB1 arasında rekombinasyon olayı %1,08 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda 391 ailede 1061 çocukta aktarım başına rekombinasyon yüzdeleri hesaplandı. Rekombinasyonlar A/B lokusları arasında 3 (%0,57) kez, B/DRB1 lokusları arasında 1 (%0,19) kez ve A/DRB1 lokusları arasında ise toplamda 4 (%0,75) kez görüldü (Tablo 18, Şekil 21, 22, 23, 24).

Sonuç olarak; Türkiye de dahil olmak üzere dünyada çok sayıda popülasyonda HLA allel ve haplotiplerinin belirlenmesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Bu

çalışmada da HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 allelleri ile HLA-A, -B, -DRB1 haplotip frekansları analiz edildiğinde allel frekansları Türkiye’de yapılan çalışmalar ile yüksek oranda benzerlik gösterdi. HLA-A, -B, -DRB1 haplotip frekansları bakımından daha önce yapılmış olan tek çalışma ile kıyaslandığında ise farklılık saptandı. Bu da seçilen çalışma gruplarının ve gruplardaki birey sayılarının farklılığının bu duruma neden olduğunu düşündürdü. Her bir etnik grupta, ulusta ve hatta coğrafik bölgede farklılık gösteren HLA allel ve haplotip frekanslarının bilinmesi günden güne önem kazanmaktadır. Günümüzde hematopoyetik kök hücre nakillerinde hasta ve donör arasındaki HLA uyumunun greft versus host hastalığı (GVHD) riskini düşürdüğü bilinmektedir. Bir popülasyonun HLA allel ve haplotip frekanslarının bilinmesi, hasta bireylerin donör arama süreçlerinde ve ulusal donör bankalarının stratejik planlamasında önemlidir. HLA polimorfizmlerinin analizi ve belirlenmesi en uyumlu donörün bulunmasında belirlenmesine yardımcı olabilir. Buna ek olarak, bir popülasyonun HLA polimorfizmlerinin belirlenmesi antropolojik çalışmalarda ve hastalık ilişkileri ile ilgili çalışmalarda kullanılabilir. İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı’nın yaklaşık 4 yıllık verileri kullanarak yapılan bu çalışma, hem İzmir ilinin Türkiye’deki etnik alt gruplar bakımından heterojen olması, hem bu güne kadar analiz edilen en geniş birey sayısına sahip olması ve uluslararası EFI akreditasyonu gereği verilerin güvenilirliği bakımından başta ulusal donör bankası planlaması olmak üzere birçok alana katkı sunacaktır.

ÖZET

Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'na Başvuran Bireylerin İnsan Lökosit Antijen (HLA) Allellerinin ve Haplotiplerinin Frekansları

Bu çalışmada 2011-2015 yılları arasında Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'na başvuran bireylerin HLA allel ve haplotip frekanslarını belirlemeyi amaçladık. Bu amaçla, 2341 bireyin verisi tarandı. Daha sonra bu veri içerisinde aileler tanımlandı (391 aile, 1365 birey) ve haplotipler segregasyon analizi ile saptandı. Haplotiplerdeki HLA allellerine ek olarak, akrabalık ilişkisi bulunmayan 261 bireyin HLA genotipi HLA allel frekanslarının belirlenmesinde kullanıldı. Bireylerin HLA genotiplendirmeleri SSP (Olerup, Sweden), SSO (Lifecodes, United States) ve Sanger SBT (GenDX, Holland) yöntemleri ile gerçekleştirildi. HLA allel ve haplotip frekansları SPSS programı ile, Hardy-Weinberg ve bağlantı dengesizliği analizi ise (relative LD, D') Arlequin programı ile analiz edildi. HLA-A lokusunda A*02 (%19,8), A*24 (%15,7), A*03 (%11,2), HLA-B lokusunda B*35 (%18,8), B*51 (%12,4), B*44 (%7,4), HLA-DRB1 lokusunda DRB1*11 (%21,2), DRB1*04 (%15,7) ve DRB1*15 (%10,6) en sık alleller olarak gözlemlendi. A*24-B*35-DRB1*11 (%1,7), A*01-B*08-DRB1*03 (%1,2) ve A*03-B*44-DRB1*04 (%1,1) ise en sık haplotipler olarak saptandı. Aileler üç ayrı grupta analiz edildiler: (i)anne ile babanın ve en az bir çocuğun bulunduğu aileler, (ii) Anne ve babadan yalnızca biri ile en az bir çocuğun bulunduğu aileler, (iii) anne ve babanın olmadığı fakat en az iki çocuğun bulunduğu aileler. Bu üç grup analiz edildiğinde benzer sonuçlar bulundu. Ayrıca, sonuçlarımızı Türkiye'de yapılan diğer popülasyon çalışmaları ile karşılaştırdık ve benzer sonuçlar gözlemledik.

Anahtar sözcükler: HLA, popülasyon, haplotip, allel frekansı

ABSTRACT

Allele and Haplotype Frequencies of Human Leukocyte Antigen (HLA) of Individuals Applied to Tissue Typing Laboratory in Tepecik Education and Research Hospital

In this study, we aimed to identify HLA allele and haplotype frequencies of individuals who were tested in Tepecik Education and Research Hospital Tissue Typing Laboratory between 2011 and 2015. For this purpose, the data of 2,341 individuals were screened. Then the families were defined (391 families, 1365 members) and the haplotypes were determined by segregation. In addition to HLA alleles in haplotypes, HLA genotypes of 261 individuals were used for calculating of HLA allele frequencies. HLA genotyping of individuals were performed by using SSP (Olerup, Sweden), SSO (Lifecodes, United States) and Sanger SBT (GenDX, Holland) methods. The allele and haplotype frequencies were calculated by using SPSS, and Hardy-Weinberg Equilibrium and relative LD (D') were evaluated by Arlequin. A*02 (19.8%), A*24 (15.7%), A*03 (11.2%) in HLA-A locus, B*35 (18.8%), B*51 (12.4%), B*44 (7.4%) in HLA-B locus and DRB1*11 (21.2%), DRB1*04 (15.7%) and DRB1*15 (10.6%) in HLA-DRB1 locus were observed as the most frequent alleles. A*24-B*35-DRB1*11 (1.7%), A*01-B*08-DRB1*03 (1.2%) and A*03-B*44-DRB1*04 (1.1%) were observed as the most frequent haplotypes. Families were divided into three groups: (i) families with both parents and one or more children, (ii) families with one parent and one or more children, and (iii) families with no parents but having two or more children. When we analyzed the haplotypes of these three groups, we found similar results. We also compared our results with other studies that included Turkish populations and obtained similar results.

Keywords: HLA, population, haplotype, allele frequency

KAYNAKLAR

1. de Cassia Salvadori L, de Souza Santana FC, & Marcos EVC. Frequency of alleles and haplotypes of the human leukocyte antigen system in Bauru São Paulo, Brazil. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia* 2014; 36: 108-114.
2. Gragert L, Madbouly A, Freeman J, Maiers M. Six-locus high resolution HLA haplotype frequencies derived from mixed-resolution DNA typing for the entire US donor registry. *Human Immunology* 2013; 74:1313–1320.
3. Needleman LA, & McAllister AK. The major histocompatibility complex and autism spectrum disorder. *Developmental neurobiology* 2012; 72: 1288-1301.
4. Kumbala D, & Zhang R. Essential concept of transplant immunology for clinical practice. *World journal of transplantation* 2013; 3:113.
5. Lam TH, Shen M, Chia JM, Chan SH, & Ren EC. . Population-specific recombination sites within the human MHC region. *Heredity* 2013; 111: 131-138.
6. Solberg OD, Mack SJ, Lancaster AK, Single RM, Tsai Y, Sanchez-Mazas, A, & Thomson G. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Human immunology* 2008; 69: 443-464.
7. Thorsby, E. A short history of HLA. *Tissue Antigens* 2009; 74.2: 101-116.
8. Penn D. Major Histocompatibility Complex (MHC). *Encyclopedia of life sciences* 2002; 1-7
9. Mehra, NK. History of HLA. In Mehra, NK. *The HLA complex in biology and medicine: a resource book* (First ed). Boydell & Brewer Ltd. 2010; p42-58.
10. Goldsby RA, Kindt TK, Osborne BA and Kuby J. Major Histocompatibility Complex. In Goldsby RA, Kindt TK, Osborne BA and Kuby J, *Immunology* (5th ed). W.H. Freeman and Company, New York, 200; p161-184
11. Tiercy JM and Frans C. Impact of HLA diversity on donor selection in organ and stem cell transplantation. *Human heredity* 2013; 76.3-4 178-186.

12. Shiia T, Hosomichi K, Inoko H, & Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of human genetics* 2009; 54(1), 15-39.
13. Mak TW, Saunders ME. *The Major Histocompatibility Complex*. Elsevier, Oxford, UK, 2008; 101-113
14. Mehra, NK. Genetic Structure and Functions of the Major Histocompatibility Complex. In Mehra, NK. *The HLA complex in biology and medicine: a resource book* (First ed). Boydell & Brewer Ltd. 2010; p61-78.
15. Mahdi BM. A glow of HLA typing in organ transplantation. *Clin Transl Med* 2013; 2:6.
16. Peakman M, and Vergani D. The Human Leukocyte Antigens. In Peakman M, and Vergani D. *Basic and Clinical Immunology* (First Edition). Churchill Livingstone 1997; p53-66
17. Choo SY. The HLA system: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Med J* 2007; 48:11-23.
18. Cassinotti A, Birindelli S, Clerici M, Trabattoni D, Lazzaroni M, Ardizzone S, Colombo R, Rossi E, and Bianchi Porro G. HLA and Autoimmune Digestive Disease: A Clinically Oriented Review for Gastroenterologists. *Am J Gastroenterol* 2009; 104:195 – 217
19. Tait BD. The ever-expanding list of HLA alleles: changing HLA nomenclature and its relevance to clinical transplantation. *Transplantation Reviews* 2011; 25.1: 1-8.
20. Leffell MS. MHC polymorphism: Coping with the allele explosion. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2002; 3: 35-46.
21. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, & Marsh SG. The IMGT/HLA database. *Nucleic acids research* 2013; 41:1222-1227.
22. Yuan F, & Xi Y. *Statistic and Analytical Strategies for HLA Data*. INTECH Open Access Publisher 2014; p1-39.
23. Slatkin, M. Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics* 2008; 9(6), 477-485.
24. Ardlie KG, Kruglyak L., & Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics* 2002; 3(4), 299-309.

25. Panneerchelvam S, & Norazmi MN. HLA Polymorphism in Anthropology. INTECH Open Access Publisher 2012; p1-18.
26. Web_1 (26 HAZİRAN 2015) HLA Nomenclature <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html> (05.10.2015)
27. Rao X, De Boer RJ, van Baarle D, Maiers M, & Kesmir C. Complementarity of binding motifs is a general property of HLA-A and HLA-B molecules and does not seem to effect HLA haplotype composition. *Frontiers in immunology* 2013; 4.
28. Dyer P, McGilvray R, Robertson V, & Turner D. Status report from ‘double agent HLA’: health and disease. *Molecular immunology* 2013; 55(1), 2-7.
29. Howell WM. HLA and disease: guilt by association. *International journal of immunogenetics* 2014; 41.1: 1-12.
30. Sanchez-Mazas, Alicia, et al. Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology* 2011; 133.2: 143-164.
31. Arnaiz-Villena, A., et al. HLA alleles and haplotypes in the Turkish population: relatedness to Kurds, Armenians and other Mediterraneans. *Tissue Antigens* 2001; 57.4: 308-317.
32. Saruhan-Direskeneli G, Uyar FA, Bakar Ş, & Eraksoy M. Molecular analysis of HLA-DRB1,-DQA1 and-DQB1 polymorphism in Turkey. *Tissue Antigens* 2000; 55:171-174.
33. Uyar FA, Dorak MT, and Saruhan-Direskeneli G. Human leukocyte antigen-A,-B and-C alleles and human leukocyte antigen haplotypes in Turkey: relationship to other populations. *Tissue antigens* 2004; 64.2: 180-187.
34. Erikoğlu M, Büyükdoğan M, and Cora T. The Relationship Between HLA Antigens and Blood Groups. *European Journal of General Medicine* 2011; 8.1.
35. Kayhan B., Kurtoglu E. L., Taskapan H., Piskin, T., Sahin, I., Otlu, G., & Unal, B. HLA-A,-B,-DRB1 allele and haplotype frequencies and comparison with blood group antigens in dialysis patients in the East Anatolia region of Turkey. In *Transplantation proceedings* 2013; 45: 2123-2128

36. Eberhard HP., et al. "Comparative validation of computer programs for haplotype frequency estimation from donor registry data." *Tissue antigens* 2013; 82.2: 93-105.
37. Ikeda N, et al. Determination of HLA-A,-C,-B,-DRB1 allele and haplotype frequency in Japanese population based on family study. *Tissue antigens* 2015; 85: 252-259

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İzmir’de doğdum. 2006 yılında İzmir İnönü Lisesi’nden mezun oldum. 2007 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde eğitimime devam ettim. 2012 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalından mezun oldum ve 2013 yılında İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik anabilim dalında yüksek lisansa başladım.