

## HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS-DPB1 VE KARIŞIK LENFOSİT KÜLTÜR İLİŞKİSİ

Fatma SAVRAN OĞUZ, Filiz AYDIN, Mehmet GÜRTEKİN,  
Mahmut ÇARİN\*

### ÖZET

Çalışmamızda I. sınıf HLA antijenleri ve HLA-DPB1 gen bölgeleri uyumlu KİT planlanan 20 hasta ve bunların verici adayı kardeşlerinin II. sınıf HLA gen bölgesinde bulunan HLA-DPB1 allelleri PCR amplifikasyonu reverse dot blot hybridization yöntemi ile saptandı. Aynı zamanda 20 alıcı/verici çifte karışık lenfosit kültür testi uygulandı. DPB1 allelleri uyumlu olan çiftlerin MLC test sonuçlarının da negatif olduğu görüldü. HLA-DPB1 allellerinin akraba olmayan verici seçiminde araştırılmasının daha uygun olacağı kanısındayız.

*Anahtar Kelimeler:* MLC, HLA-DPB1 tiplmesi, PCR

### SUMMARY

The relation of HLA-DPB1 with mixed lymphocyte culture: In our study, HLA class I antigens and HLA-DRB1 gene region of 20 patients to whom BMT was planned, and HLA-DPB1 alleles found in HLA class II gene region of the siblings of the patients, were detected by the PCR amplified reverse dot blot hybridization method. Mixed lymphocyte culture test was then applied to 20 couples of donor and recipient. When the DPB1 alleles were matched with the couples, the results of MLC test were negative as well.

Our opinion is that would be more convenient to type HLA-DPB1 alleles in the selection of unrelated donors.

*Key Words:* MLC, HLA-DPB1 typing, PCR

### GİRİŞ

HLA bölgesinde genetik varyasyonların saptanması, transplantasyonlarda graft rejeksiyonunu azaltmak için "HLA uygun" alıcı/verici çiftlerin seçilmesinde çok faydalıdır. Pek çok laboratuvarında HLA II. sınıf antijenlerin saptanması serolojik yöntemler ile yapılmakta ve özellikle kemik iliği transplantasyonlarında (KİT) II. sınıf lokuslar için karışık lenfosit kültür (MLC= mixed lymphocyte culture ) testi uygulanmaktadır. MLC testi, akut GVHD (graft versus host disease) gelişme riskini önceden bildiren, alıcı ve vericinin HLA-D bölgesinin uygunluğunun araştırılmasında standart bir doku tipleme testi olarak kullanılmaktadır (9). HLA-DP bölgesi iki

çift A ve B genlerinden oluşmuştur. (DPA1/DPB1 ve DPA2/DPB2). Bu gen çiftlerinin DPA ve DPB genlerinin duplikasyonu ile oluştuğu düşünülmektedir. HLA-DPA1 ve DPB1 genlerinin her ikisi de fonksiyonel olup, HLA-DPA2 ve DPB2 genleri ise frame shift (şifre kayması) mutasyonlar ile fonksiyonsuz hale gelmişlerdir (5). HLA-DP moleküllerinin fonksiyonları diğer II. sınıf antijenleri kadar yoğun bir şekilde incelenmemiştir. Aynı fonksiyonel özellikleri paylaşımlarına rağmen, antijen sunumundaki kısıtlayıcı elemanlar olarak rol oynadıkları transfeksiyon çalışmaları ile gösterilmiştir (7). HLA-DP antijenleri hem kuvvetli bir

## HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS-DPB1 VE KARIŞIK LENFOSİT KÜLTÜR İLİŞKİSİ

ikincil proliferatif cevabı, hem de diğer II. sınıf moleküllere benzer olarak primer karışık lenfosit kültürde doza bağımlı T hücre proliferasyonunu uyarırlar (13). HLA-DP uyuşmazlığının akut GVHD'yi uyardığı bazı çalışmalarda belirtilmiştir (14). HLA-DP antijenleri başlangıçta PLT (primed lymphocyte typing) kullanılarak tanımlanmıştır (17). HLA-DPA1 ve DPB1 genleri daha sonra RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemi ve monoklonal antikorlar ile ve son zamanlarda DNA dizi analizi ve PCR (polimerase chain reaction)'a dayalı yöntemler ile daha yoğun olarak incelenmiştir (2,10,16). Bu incelemeler sonucunda bu genlerdeki polimorfizmin, hücresel tekniklerde tanımlanandan çok daha fazla olduğu görülmüştür. Bu çalışmada I. sınıf antijenleri ve HLA-DRB1 gen bölgeleri uyumlu olan hasta / vericilerin HLA-DPB1 allelleri PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide) reverse dot blot hybridization yöntemi (3) ile belirlendi. MLC testindeki RRI (relative response indeks) ve SI (stimülasyon indeks) değerleri ile DPB1 allellerinin ilişkisi araştırıldı.

### MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada çeşitli hematolojik hastalıklar nedeniyle KİT planlanan 20 hasta ve bunların sağlıklı verici adayı 20 kişiden alınan kan örnekleri kullanılmıştır.

#### DNA izolasyonu

EDTA'lı tam kan örneklerinden Trimethyl amonyum tuzları ile denaturasyon ve presipitasyonu yöntemi ile DNA elde edildi (8).

PCR-SSO reverse dot blot hybridization PCR ile amplifiye olan DNA örneği, kağıt membranlar üzerinde tespit edilmiş olan spesifik oligonükleotid problemler ile hibridize edilir. Amplifikasyon sırasında DNA materyali biotin ile işaretlenir. Hibridizasyon sonrası streptavidin ile işaretlenmiş olan alkali fosfataz ortama eklenir ve önceden oluşmuş olan biotinli hibrit ile bağlanır. Daha sonra BCIP/NBT kromojen ile inkübe edilir. Kağıt membranlar üzerinde mor-

kahve rengi bant oluşumunun gözlenmesi ile plastik okuma kartı kullanarak pozitif problemler belirlenir. Bilgisayar programı kullanılarak alleller saptanır (3).

#### Karışık lenfosit kültür (MLC)

Alıcı ve verici çiftlerden heparinli kan alınır. Ficoll-Hypaque gradient santrifüj yöntemi ile 1500 rpm de ayrılan lenfositler RPMI-1640 ile iki kez yıkandıktan sonra % 5 fetal calf serum içeren complete medium içerisinde kültür ortamına alınır ve 96 saat için %5 CO2 içeren 37 0 C lik inkübatöre bırakılırlar. 96 saatin sonunda kuyulara H3-thymidine ilave edilir ve 16-18 saat sonra, yaklaşık bir hücre siklusu sonucunda hücreler toplanarak b sayacında sayım yapılır (6). Testin sonucunda SI ve RRI değerleri proliferasyon ölçümleri olarak hesaplanır.

### BULGULAR

20 Hasta ve 20 sağlıklı verici olmak üzere 40 kişinin DPB1 gen bölgesindeki allelleri PCR-SSO reverse dot blot hybridization yöntemi ile araştırıldı. Tek kağıt membran üzerinde pozitif problemlerin varlığı renk değişimine göre tespit edildi. Okuma kartı kullanılarak elde edilen sayılar bilgisayara kaydedilerek allel saptaması yapıldı. Hasta ve vericilerinin DPB1 allellerinin uyumlu oldukları ve MLC testinde RRI değerlerinin (-) olduğu ve SI değerlerinin  $\leq 1$  olduğu gösterildi (Tablo 1).

### TARTIŞMA

Serolojik yöntemlerin yetersizliği nedeniyle HLA-DP tiplemesi allogeneik kemik iliği naklinden önce rutin olarak yapılmıyordu. DNA'nın moleküler düzeyde incelenmesine olanak veren yöntemlerin geliştirilmesi sonucu HLA-DP tiplemesine başlanmıştır. Alıcı/verici arasındaki DP uyuşmazlığı alıcı verici hücrelerin in vitro kültür ortamında karşılaştırıldığı MLC testini etkiler. HLA-A,-B,-DR antijenleri uyumlu olan çiftlerde bile MLC testinde görülen pozitif sonuçların, DP uyumsuzluğuna bağlı olabileceği bildirilmektedir (12). HLA-DR ve -DP gen bölgeleri arasında %1-%3 oranında rekombinasyon olduğu (15) ve HLA (-A, -B,

Tablo 1. Alıcı/vericilerin HLA-DPB1 allelleri ve MLC sonuçları

Alıcı/Verici no	DPB1 allelleri	RRI*	SI**
1	0401-0401	-17	0,401
2	0401-0402	-18	0,763
3	0401-0401	-30	0,551
4	0401-4101	-40	0,601
5	0402-4101	-8	0,890
6	0401-1701	-0.9	0,948
7	0401-4101	-16	0,875
8	0402-4101	-12	0,820
9	0401-4101	-112	0,302
10	02012-2901	+9	1,083
11	0301-0401	-22	0,767
12	01011-0401	-23	0,068
13	0402-1701	-12	0,532
14	2901-4901	+2	1,095
15	0301-0402	-19	0,904
16	0401-0401	-24	0,653
17	0401-1701	-23	0,311
18	02011-0301	-12	0,798
19	1701-3701	-150	0,614
20	0401-0402	-15	0,820

\* RRI- relative response indeks

\*\* SI- stimülasyon indeks

-DR, -DQ) identik kardeşlerde -DP uyuşmazlığının rekombinasyonlara bağlı olarak nadiren de olsa görüldüğü bildirilmektedir. HLA identik kardeşlerden yapılan KİT de DP tiplmesi ile ilgili üç ayrı seri çalışma rapor edilmiştir. Bu çalışmalardan birisinde RFLP yöntemi kullanılmış ve 34 çiftin hiçbirinde DP uyuşmazlığı görülmemiş (11), yine RFLP ile 26 çiftin DP tiplmesi yapılmış bunlardan ikisinde uyuşmazlık görülmüştür (1). Otuz

beş çiftin ikisinde PLT (primed lymphocyte typing) uygulanarak araştırılan DP allelerinde uyumsuzluk saptanmıştır. Akriba olmayan KİT' de ise DP uyuşmazlık oranının yüksek olduğu bildirilmektedir(12). Türkiye'de KİT adayı hasta ve bunların sağlıklı vericilerinin DPB1 allellerinin araştırılmasına yönelik bir çalışmaya rastlamadık. Bizim çalışmamızda hasta ve vericilerde saptanan allellerin bazıları (\*4101,\*2901,\*1701,\*3701, \*4901 gibi)

## HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS-DPB1 VE KARIŞIK LENFOSİT KÜLTÜR İLİŞKİSİ

halen serolojik yöntemler ile saptanamamaktadır. Çünkü hücre yüzeylerinde yeterli miktarda DP moleküllerinin ekspresyonu olamadığı için serolojik yöntemlerin yetersiz kaldığı bilinmektedir (12). Bu çalışmada DPB1 gen bölgesinde II farklı allel, hastalar ve vericiler de saptandı. Biz I. sınıf HLA antijenleri ve HLA-DRB1 allelleri uyumlu olan alıcı ve vericilerinin HLA-DPB1 allellerinin de tam uyumlu olduklarının gördük. HLA-DP allelleri uyumlu olan bu çiftlerin MLC'de RRI değerlerinin -150 ile +9 arasında ve SI değerlerinin ise  $\leq 1$  olduğunu saptadık. İki çiftin RRI değerlerinin +2 ve +9 olmasına rağmen MLC testindeki +20'ye kadar olan RRI değerleri negatif kabul edildiği için MLC sonuçları negatif olarak değerlendirilmiştir. HLA-DP antijenlerinin MLC cevabını uyarmadığı kabul edilse de bazı çalışmalar da HLA-DR uyumlu olanlarda DP uyumsuzluğuna bağlı olarak MLC reaktivitesinde artış gösterilmiştir. De Gast ve ark.'ları kardeşler arasında uygulanan MLC de RRI>%5 üzerinde olması halinde DP uyumsuzluğundan şüphe edilmesi gerektiğini düşünmelerine rağmen, HLA-DP farklılığında bile (-) MLC değerleri elde etmişlerdir. HLA identik KİT'ten önce gözlenen MLC cevabındaki artış'ın genetik farklılığı göstermediğini bunun lösemi ile ilişkili antijenlere bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (4). Çalışmamızda RRI değeri %5'in üzerinde tek bir çift vardır ve DPB1 allelleri uyumlu olarak bulunmuştur. Sonuç olarak HLA-DRB1 identik kardeşler arasında çok nadir görülebilecek olan DPB1 allel uyumsuzluğunun akraba olmayan vericiler arasında yapılacak olan KİT öncesinde MLC testi ile birlikte araştırılmasının daha uygun olacağını düşünüyoruz.

### KAYNAKLAR

1. Al-Daccak, R., Loiseau, P., Soulie, A. et al.: HLA-DP genotyping in HLA-A,B and DR identical intrafamilial bone marrow transplantation, *Leukemia* 4: 222 (1990).
2. Bodmer, J., Bodmer, W., Heyes, J. et al.: Identification of HLA-DPA polymorphism with Dpa and Dpb probes and monoclonal antibodies: Correlation with primed lymphocyte typing, *Proc*

- Natl Acad Sci USA 84:4596 (1986).
3. Buysse, R., Decorte, M.: Rapid DNA typing class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization, *Tissue Antigens* 41:1 (1993).
4. De Gast, G.C., Mickelson, E.M., Beatty, P.G.: Mixed lymphocyte culture reactivity and graft versus-host disease in HLA -identical marrow transplantation for leukemia, *Bone Marrow Transplant.* 9:87-90 (1992).
5. Figuera, F., Klein, J.: The evolution of MHC class II genes, *Immunol Today* 7:78 (1986).
6. Fridman, E.A., Retan J.W., Marshal. D.C., Henry, L., Merrill J.: Accelerated skin graft rejection in human preimmunized with homologous peripheral leucocytes. *J Clin Invest* 40:2162 (1961).
7. Goodman, J.W.: Antigen presentation & the major histocompatibility complex. "Basic and Clinical Immunology", Editör: Stites DP., Abba IT., Parslow TG., Appleton and Lange, Connecticut (1994). P: 105.
8. Gustincich, S., Manfiolett, G., Del Sal, G., Schneider, C. and Carninci, P.: a fast method for high a quality genomic DNA extraction from whole human blood, *Bio Techniques* 298:302 (1991).
9. Hodes, R.J., Sedmyr, E.A.J.: Specificity cytotoxicity of H-2 incompatible mouse lymphocytes following multiple culture in vitro, *Transplantation* 9: 470 (1970)
10. Hyldig-Nielsen, J.J., Morling, N., Odum, N. et al.: Restriction fragment length polymorphism of the HLA-DP subregion and correlations to HLA DP phenotypes, *Proc Natl Acad Sci USA* 184:1644 (1987).
11. Moreau, P., Bignon, J.D., Milpied, N. et al.: Genomic HLA class II typing (DR,DQ,DP) MLR I and GVH disease: retrospective study of 41 allogeneic bone marrow transplantations. XV th annual ashı meeting, Toronto. *Hum Immunol* (Special issue) 96 (1989).
12. Moreau P., Cesbron A. HLA-DP and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 13:675 (1994).
13. Morris, P.J., Fuggle, S.V., Ting, A., Wood K.J.: HLA and organ transplantation. *Br Med Bull* 3: 184(1987).
14. Odum, N., Platz, P., Jakobsen, B.K. et al.: HLA-DP and bone marrow Transplantation: DP compatibility and severe graft versus host disease, *Tissue antigens* 30:213 (1987).
15. Pawelec, G., Ehninger, G., Schmidt, H., Wernet, P.: HLA-DP matching and graft versus host disease in allogeneic bone marrow transplantation, *Transplantation.* 42:558 (1986).
16. Rozemuller, E., Bouwens, A.: Sequencing-based typing reveals new insight in HLA-DPA1 polymorphism, *Tissue Antigens* 45:57 (1995).
17. Wank, R., Schendel, D.J.: Genetic analysis, of HLA-D region products defined by PLT", *Histocompatibility testing*" Editör: Albert ED, Baur Mp, Mayr WR, Berlin Springer-Verlag, Berlin (1984). P.289.