

## OTİZM İLE İLİŞKİLİ HLA ALELLERİNİN PCR-SSP YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI ♦

Behiye ALYANAK\*, Fatma OĞUZ\*\*, A. Sarper DİLER\*\*, Tülay AYNA\*\*, Nahit MOTAVALLI\*, Mahmut ÇARIN\*\*

### ÖZET

Bu çalışmanın amacı Otistik Bozukluk ile HLA ilişkisini DNA düzeyinde belirlemektir. Sero-lojik yöntemle saptanan HLA-DR4, -DR14, -B57 antijenlerinin PCR-SSP yöntemiyle altgrupları araştırıldı. Otizm ile DRB1\*1407 aleli ilişkili bulundu. Ayrıca klinik parametrelerden sadece kendine zarar verici davranışla ilgisi olduğu önceki çalışmada saptanan ( $p=0.0006$ ) HLA-DR14'ün DRB1\*1407 alelinin otistik olgularda kontrollere göre daha anlamlı bulunması ( $p=0.02$ ) kendini tanıma, kendine yönelik yıkıcı davranışlar ve otoimmün süreçlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Otizm, HLA alelleri

### SUMMARY

*Investigation of autism related hla alleles with pcr-ssp technique.* The aim of the study was to investigate the relation of autism with HLA in DNA level. HLA-DR4, DR14 and B57 serologically detected antigens were analysed with PCR-SSP technique. DRB1\*1407 allele was found to be related with autism. As HLA DR14 was found to be related to significance of DRB1\*1407 allel with respect to controls ( $p=0.02$ ) led us drive the suggestion that this may have relations with self-destructive behavior and autoimmune processes.

**Key words:** Autism, HLA alleles.

### GİRİŞ

Otistik bozukluğun etiyopatogenezinde immün yetersizlikle ve/veya otoimmün mekanizmalarla ilişkili bir immün sistem disregülasyonunun rolü olduğu bilinmekte (3); bu durum kısmen, 6.Kromozomun kısa kolu üzerindeki HLA-B'den HLA-DR'ye uzanan bölgedeki genler ile ilişkili görülmektedir. HLA-B44-SC30-DR4 haplotipinde sıklık ve HLA-DRB1'in üçüncü hipervariable (çok değişken) bölgesi ile otizmi belirleyici gen/genler ilişkisi öne sürülmüştür. Otistiklerde C4B geni aleli yokluğu, geniş (extended) haplotip B44-SC30-DR4 daha sık görüldüğü (2) ve HLA-DRB1\* 0401/0404 genotipinin %46 otistik olguda bulunması (8) dikkat çekici olmuştur.

Bu çalışmada, 3-15 yaşları arasında DSM-IV'e göre otistik bozukluk tanısı alan, HLA sınıf I ve sınıf II antijenlerine bakılmış 92 ol-

gudan 24'ünde yüksek sıklıkta ve klinik özelliklerle ilişkili olan DR4 ve B57 (17) antijenlerinin PCR-SSP yöntemi ile genotiplemesi yapılması ve hangi alel alt tiplerinin otizm ile ilişkili olduğunun araştırılması amaçlandı.

Ayrıca klinik parametrelerden sadece kendine zarar verici davranışla ilgisi olduğu önceki çalışmada saptanan ( $p=0.0006$ ) (1) HLA-DR14'ün kendini tanıma, kendine yönelik yıkıcı davranışlar ve otoimmün süreçlerle ilişkili olabileceğini düşünerek otistik olgularda DR14 alt grupları sağlıklı kontrollere karşılaştırılarak araştırıldı.

Böylece etnik ve coğrafi farklılıklara göre değişiklikler gösterdiği bilinen (7) HLA doku tiplerinden bir önceki çalışmada özellikli saptadığımız antijenlerin kodlandığı gen bölgelerini araştırmayı istedik.

Mecmuaya geldiği tarih: 23.05.2001

\* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

\*\* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

♦ Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje No:1300/050599

## MATERYAL ve METOD

### 1. Olgular

Bu araştırmada incelenen olgular yaygın gelişimsel bozukluklar ve çocukluk çağı psikotik bozukluklarının takip ve tedavisinin yürütüldüğü, İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Psikiyatrisi Anabilim Dalı Otistik-Psikotik Bozukluklar Polikliniği'nde ve Eğitim Grubu'nda izlenen hastalar arasından seçilmişti. Araştırmanın amacı ve uygulanan işlemler anababalara anlatılarak çalışmaya katılmak isteyenlerin onayları alındı. Çalışmaya alınan 92 otistik olgudan DR4, DR14, B17 antijenleri bulunan toplam 24 olgu ile çalışıldı. Olguların 8'inde B17(57), 16'sında DR4, 6'sında DR14, birinde B17(57) ve DR14, iki olguda ise DR4 ve DR14 birlikte çalışıldı. DR4 ve DR14 allelerini taşıyan sağlıklı 20 kişi kontrol olarak alındı. DRB1\*14 (n=7) ve DRB1\*04 (n=13) alellerinin alt tipleme yapıldı.

### 2. Gereçler

C) HLA tayini: Araştırmaya alınan olguların HLA tayinleri İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı DNA laboratuvarında gerçekleştirildi.

#### Kandan DNA izolasyonu:

450 µl EDTA'lı kan örneği 2 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. 450 µl %12'lik DTAB çözeltisi eklendikten sonra hafifçe karıştırılarak 68°C'deki su banyosunda 5' bekletildi. 900 µl kloroform eklendi ve karıştırıldıktan sonra 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant CTAB solüsyonu içeren 1.5 ml'lik ependorf tüp içine aktarıldı ve hafifçe karıştırılarak 10.000 rpm'de 2' santrifüj edildi. Pelet üzerine 300 µl 1.2 M NaCl eklenip karıştırıldıktan sonra 750 µl %99.5'lük etanol eklendi ve hafifçe çalkalanarak DNA ipliklerinin görünür hale gelmesi sağlandıktan sonra 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Pelet üzerine 1000 µl %70'lik etanol eklenerek 13.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant

atıldı. Peleti içeren tüpün iç kısmında kalan alkol damlacıkları steril bir eküvyon yardımı ile pelete değmeden alındı. Pelete 50 µl kadar dH<sub>2</sub>O eklenerek 30 sn. kadar karıştırılıp tamamen çözünmesi sağlandı (4) izole edilen DNA örneklerin saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrede 260/280 dalga boylarında okunarak saptandı. DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

#### Diziye özgü primerler (SSP) ile PCR amplifikasyonu

##### Diziye özgü primer seti:

Çalışmamızda DRB1\*04 ve DRB1\*14 alellerini belirleyebilmek amacıyla DYNAL firmasından sağlanan diziye özgü primer setleri kullanıldı. Her set içindeki her bir primer solüsyon hem alel ve grup spesifik primer hemde internal kontrol primer çiftlerini içermektedir.

1- B17 gen bölgesinin kodladığı antijenlerinden birisi olan B57 antijeni ile ilişkili olan bu gen bölgesinin araştırılması amacıyla B17 için hazırlanmış primer seti kullanılmaktadır. 5', 3' primerlerini içeren set ile B\*5701 ve B\*5704 tanımlaması için 8 ayrı PCR reaksiyonu yapılır. PCR ürünlerinin uzunlukları 85-240 bp arasında olup, internal pozitif kontrol primeri ile human growth hormon geninin 1070bp'lik segmenti amplifiye olur.

2- DRB1\*04 primer seti ile DRB1\*1401'den DRB1\*1430 kadar olan alelleri tanımlayabilmek için 16 ayrı PCR reaksiyonu yapılır. PCR ürünlerinin uzunlukları 100-260 bp olup, internal pozitif kontrol primeri ile human growth hormon geninin 429 bp'lik segmenti amplifiye olur

3- DRB1\*14 primer seti ile DRB1401'den DRB1\*1430 kadar olan alelleri tanımlayabilmek için 16 ayrı PCR reaksiyonu yapılır. PCR ürünlerinin uzunlukları 100-260 bp olup, internal pozitif kontrol primeri ile human growth hormon geninin 429 bp'lik segmenti amplifiye olur.

Thermocycler'dan alınan PCR ürünleri %2'lik agaroz gelde (110 V, 15 dk.) yürütüldükten sonra UV altında incelendi ve fotoğraf ile görüntülendi (6).

İstatistik Değerlendirme: İstatistiksel anlamlılık  $\chi^2$  testi ve gerektiğinde Fisher'in "exact" testi kullanılarak yapıldı.  $P < 0.05$  anlamlı değer olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Önceki çalışmada 92 olgudan oluşan çalışma grubu ile 195 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlı bulunanlar HLA-DR4 ( $P=0.04$ ), DR14 ( $p=0.01$ ), HLA-B57 ( $p=0.02$ ) oldu. Bu antijenlerde rölatif riske de bakıldı ve yüksek olduğu ve klinik özelliklerle ilişkili görüldüğü için bu antijenlerle bağlantılı olan gen bölgeleri PCR-SSP yöntemi ile araştırıldı (Tablo 1).

HLA-B44, çalışma grubunda %17.4, kontrol grubunda %17.5 oranındaydı ( $p=1$ ). Otistik olgularla normaller arasında bir fark bulunmadı.

Çalışma grubunda 2 olguda HLA B44 ve DR4 birlikte bulunurken (%2); kontrol grubunda 16 olguda (%8) bulundu.

92 olguda HLA-DR grubu antijenlerin varlığı ile klinikte özellikli parametrelerin; hamilelikte kanama, hareketlilik, kendine zarar

verici davranış, otitis media arasındaki ilişkiler anlamlı bulundu (Tablo 2).

Bu çalışmada ilgili antijenleri taşıyan olgularda PCR-SSP yöntemi ile DRB1\*04, B\*17, DRB1\*14 alellerine bakıldı. Olguların 6'inde B17, 13'sında DR4, 7'sında DR14 ve DR14, iki olguda ise DR4 ve DR14 birlikte B57 antijeni taşıyan otistik olgulara DNA düzeyinde alt tiplleme yapıldığında bu olgulardan iki tanesinde B\*5801, dört tanesinde B\*5701 aleli saptandı (Tablo 3).

Sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DRB1\*04 alellerinde istatistiksel olarak anlamlılık görülmedi.

DRB1\*1401 alleli ile otizm arasında negatif bir ilişki saptanırken ( $p=0.02$ ,  $OR=0.02$ , %95 güven aralığı=0.001-0.5); DRB1\*1407 aleli ile pozitif bir ilişki bulundu ( $p=0.02$ ,  $OR=3.3$ , %95 güven aralığı=1.3-8.3).

## TARTIŞMA

Çalışmaya alınan 92 otistik olgudan DR4, DR14, B17 antijenleri bulunan 47 sinin çalışmaya alınması planlanmıştı ancak poliklinik takibini sürdüren 24 olgu ile bu çalışma tamamlandı. Olgularımızda en sık saptanan alel DR4 idi. 16 Olguda DRB1\*04 alellerinin alt gruplarını incelediğimizde DRB1\*0402 ve 0403 alellerinin yüksek sıklıkta olduğunu saptadık.

Tablo 1. Olguların HLA tiplerinin normallerle karşılaştırılması

	Otistik Grup		Normal Kontroller		SD	$\chi^2$	P	Relatif Risk
	(%)	n=92	(%)	n=195				
HLA-B44	17.4	16	17.5	34	1	0	1	
HLA- B57	14.1	13	2	4	-	Fisher	0.0001*	4.547
HLA-DR4	19.5	18	32.8	64	1	4.75	0.02	0.49
HLA-DR6	21.7	20	8.7	17	1	8.31	0.002*	2.90
HLA-DR14	9.7	9	2.5	5	-	Fisher	0.01	4.12

\*Bonferroni düzeltme  $p < 0.0025$

**Tablo 2.** Özellikli bulunan HLA antijenlerinin klinik bulgularla ilişkisi

KLİNİK ÖZELLİK	n	HLA	n	%	P	X <sup>2</sup>
Hamilelikte kanama	9	B44	(4)	44.4	0.036	Fisher
		DR6	(4)	44.4	0.025	Fisher
Hareketlilik (aktivite/pasivite)	74	DR4	(11)	14.8	0.028	Fisher
Kendine zarar verici dav.	41	DR6	(16)	39.0	0.056	Fisher
		A3	(14)	35.8	0.004	Fisher
Otitis media geçme	39	DR4	(12)	30.7	0.055	Fisher
		A3	(14)	35.8	0.004	Fisher

Warren ve arkadaşları otistik çocuklarla yaptıkları benzeri bir çalışmada, DRB1 alellerini PCR-RFLP yöntemi ile araştırmış ve bu aleller ile otizm arasında kuvvetli bir ilişki ortaya koymuştur (10). Bu grup içinde özellikle DRB1\*0401 ve 0404 alellerinin yüksek sıklıkta olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırıcının başka bir çalışmasında MHC genlerinden birisi olan II.sınıf HLA gen lokusundan DRB1 alelleri ile III. Sınıf HLA gen lokusundan C4B kompleman geni otistik olgularda araştırmış, C4B null alel ile DRB1 alellerinin belirgin olarak arttığını saptamışlardır (11).

Başka bir çalışmada 22 otistik olguda B44-SC30-DR4 haplotip sıklığının yüksek olduğu görülmüştür (2). HLA-B44-SC30-DR4 haplotipinde sıklık ve HLA-DRB1'in üçüncü hipervariable (çok değişken) bölgesi ile otizmi belirleyici gen/genler ilişkisi öne sürülmüştür (8). Biz olgularımızda bu haplotipe işaret edebilecek HLA-B44 ve DR4 birlikteliğini kontrol grubuna göre daha az sıklıkta saptadık. Biri ağır hiperaktif olan 2 olguda B44 ve DR4 birlikteliği bulduk. Ancak biz kompleman bakmadığımız için bu olgularda belirtilen haplotipin olup olmadığını bilemiyoruz.

Otistik olgu popülasyonunda en yüksek rölatif risk (1,7) gösteren HLA-B57 antijeninin IgA eksikliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. IgA eksikliğinde sık görülen B57-SC61-DR7 extended haplotipine 40 otistik olgu

**Tablo 3.** Olguların HLA alelleri

Hasta No	HLA alelleri
1	DRB1*0407
2	B *5801
3	B *5801
4	DRB1*0404
5	B *5701
6	DRB1*0403
7	DR*1407
8	DR*1425
9	DRB1*04052
10	DRB1*04052
11	DRB1*0402, DRB1*1407
12	DRB1*0402
13	DRB1*1407
14	DRB1*0403, DRB1*1407
15	B *5701
16	DRB1*0403
17	B*5701
18	B*5701
19	DRB1*0402
20	DRB1*1407
21	DRB1*0402
22	DRB1*0403
23	DRB1*0402
24	DRB1*1401

nun 3'ünde rastlanmıştır. Bu olgularda serum IgA düzeyi oldukça düşük bulunmuştur (9).

Bir önceki çalışmamızda serolojik yöntemle HLA-B57 antijeni taşıyan 6 olguda B17 pri-

merleri kullanarak PCR-SSP yöntemiyle alt grup incelemesini yaptığımızda, olguların 4'ünde B\*5701, ikisinde ise 5801 alelerini bulduk; bu şekilde 2 olguda serolojik olarak hatalı tiplleme saptadık.

Serolojik yöntemle HLA-DR14'ün rölatif riskini yüksek bulmuştuk. Yapılan bir çalışmada HLA-DR14'ün in vitro self ve nonself peptidlerinin ayırımını belirsizleştirerek anti-jenik stimülasyonu kuvvetlendirdiği saptanmıştır (5). Klinik parametrelerden sadece kendine zarar verici davranışla ilgisi olduğunu gördüğümüz ( $p=0.0006$ ) HLA-DR14'ün kendini algılama, kendini tanıma ve otoimmün süreçlerle ilişkili olabileceği düşünülerek DRB1\*14 alelinin alt grupları araştırıldı.

Bu çalışmada DR14 antijeni taşıyan 7 olgu PCR-SSP yöntemi ile araştırıldı ve DRB1\*1407 alelinin yüksek sıklıkta olduğu (%71.42) görüldü DRB1\*14 ve DRB1\*04 alel alt tipleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DRB1\*1407 aleli istatistiksel olarak anlamlıdır. Otistik olgularda bu alel alt tipi %72 oranında bulunurken kontrol grubunda hiç saptanmadı.

Biz çalışmamızda otizm ile DRB1 genlerinin diğer genlere göre daha ilişkili olduğunu gördük. Özellikle DRB1\*1407 alelinin otizmle ilgili olabileceğini düşündük. Olgu sayımızın azlığı bu bulgunun değerini kısıtlamakta, geniş serilerde DRB1\*1407 alel alt tipinin araştırılmasının gereğini ortaya koymaktadır.

Özellikle DRB1\*04 alelleri bu çalışma grubu içinde diğer alellere göre daha yüksek sıklıkta bulunmuş ancak diğer çalışmacıların gösterdiği alel alt grupları değil de DRB1\*0402 ve DRB1\*0403 belki bizim popülasyonumuzun bir özelliği olarak yüksek sıklıkta saptanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Alyanak B: Otistik bozukluğun etiolojisinde doku uyumu antijenlerinin rolü. İst. Tıp Fak. Çocuk Ruh sağlığı ve Hastalıkları ABD Tez çalışması (1998).
2. Daniels WW, Warren RP, Odell JD, Maciulis A, Burger R A, Warren WL, Torres AR: Increased frequency of the extended or ancestral haplotype B44-SC30-DR4 in autism. *Neuropsychobiol* 32: 120 (1995).
3. Gillberg C, Coleman M: *The Biology of the Autistic Syndromes-2nd Ed.*, Mac Keith Press, (1992).
4. Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carnichi P: A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Bio Techniques* 11:298 (1991).
5. Matsushita S, Kohsaka H, Nishimura Y: Evidence for self and nonself peptide partial agonists that prolong clonal survival of mature T cell in vitro. *J Immunol* 158: 5685 (1997).
6. Olerup O, Zetterquist H: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence primers (PCR-SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigen* 39:225 (1992).
7. Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI: A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* 240: 1003-1009 (1988).
8. Warren RP, Odell DJ, Warren WL, Burger RA, Maciulis A, Daniels WW, Torres AR: Strong association of the third hypervariable region of HLA-DRB1 with autism. *J Neuroimmunol* 67: 97 (1997).
9. Warren RP, Odell J D, Warren W L, Burger RA: Brief report: Immunoglobulin A deficiency in a subset of autistic subjects. *J Autism Dev Disord* 27: 187 (1997).