

TÜRKİYE'DE HLA-C ALEL DAĞILIMI

Güher SARUHAN DİRESKENELİ*

ÖZET

İnsan genomunun en değişken bölgesini majör histokompatibilite kompleksi (MHC) oluşturmaktadır. MHC de yer alan genlerin gen frekansları, farklı etnik gruplarda farklı dağılım özellikleri göstermektedir.

Türkiye popülasyonundaki HLA-C dağılımını gen düzeyinde araştırmayı amaçlayan bu çalışmada toplam 153 kişiden toplanan DNA örneklerinde HLA-C incelenmiş, yöntem olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve diziyeye özgü oligonükleotitlerle hibridizasyon (DÖOH) uygulanmıştır.

HLA-C lokusunda en sık rastlanan aleller Cw*04 (0,176), *0701/5 (0,114), *0202 (0,111), *0602 (0,082), *0702 (0,075) ve *0102/3 (0,068) dir.

Çalışmada Türkiye popülasyonunda serolojik olarak değerlendirilemeyen HLA-C'nin dağılım özellikleri belirlenmiş, Türkiye'deki dağılım komşu ve diğer dünya popülasyonları ile karşılaştırılmıştır. Dağılım özellikleri açısından Türkiye diğer Akdeniz ülkeleri ile yakın özellikler göstermiştir.

Anahtar kelimeler: HLA-C, MHC, Türkiye

SUMMARY

Distribution of HLA-C alleles in Turkey. The most polymorphic region of the human genome is the major histocompatibility complex (MHC). The allelic frequencies of genes within MHC show remarkable differences between different ethnic groups. With the advances in the methods, the differences are detected more precisely. The pattern of the allelic distribution in different HLA loci is investigated around the world, to complete a HLA map.

The aim of this study was to investigate the HLA-C distribution in the population of Turkey at the gene level by using recently developed methods. The DNA samples of 153 unrelated Turkish individuals are investigated by polymerase chain reaction and sequence specific oligonucleotide hybridizations. Using this method HLA-C region is evaluated.

The most frequently detected alleles at HLA-C locus were Cw*04 (0,176), *0701/5 (0,114), *0202 (0,111), *0602 (0,082), *0702 (0,075) and *0102/3 (0,068).

The study has provided a pattern of distribution of HLA-C alleles in the population of Turkey. The distribution of alleles has shown common features with other Mediterranean populations.

Key words: HLA-C, MHC, Turkey

GİRİŞ

Majör histokompatibilite kompleksi (MHC) 6.kromozomda yer alan geniş bir gen bölgesini oluşturur. Bu bölgede kodlanan HLA moleküllerinin immun sistemdeki işlevsel önemi ve genetik düzeyde polimorfik özelliği açısından bu genler yoğun şekilde araştırılmaktadır. MHC genleri insanda bilinen en geniş polimorfizm örneğini oluşturur (8).

İnsanda 6.kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan MHC kendi içinde alt bölgelere ayrılarak incelenmekte, her alt bölge işlevsel

olarak da bir grup oluşturan HLA proteinlerini kodlayan genleri içermektedir. MHC sınıf I bölgesinde klasik olarak bilinen HLA-A, HLA-B, HLA-C gibi transplantasyon antijen lokusları yanında HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J, HLA-K ve HLA-L adını alan ve "klasik olmayan" gen lokusları da tanımlanmıştır. Bu genlerden HLA-A lokusu için 85, HLA-B lokusu için 171 ve HLA-C için 39 kadar alel tanımlanmıştır. Her alel bir HLA sınıf I molekülünün glikoprotein zincirini (α zinciri) belirlemekte, bir tek glikoproteine kaynaklık etmektedir.

MHC sınıf I bölgesinde yer alan ve yaklaşık 4-5 kb uzunluk kaplayan genler yapısal olarak 7 ya da 8 eksondan oluşurlar. Bunlardan sınıf I molekülünün α zincirinin peptit bağlayan değişken bölgesini belirleyen (1 "domain" ini ekson II ve $\alpha 2$ "domain" ini ekson III kodlar. $\alpha 3$ "domain" i ise ekson IV de kodlanır. Bu eksolar yaklaşık 270 baz çifti uzunluğundadır ve sınıf I ağır zincirinde görülen 3 hücre dışı "domain" yapısına uygunluk gösterirler.

Genomik düzeyde MHC nin incelenmesi için gelişen moleküler yöntemler bu genlere uyarlanarak tiplendirme metodları geliştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)-diziye özgü oligonükleotid proplarla hibridizasyon (DÖOH) genom üzerinde tek kopya olarak bulunan MHC bölgesinin çok miktarda arttırılmasını ve DNA dizisinin araştırılabilmesini sağlamıştır. PZR sonrası ürün farklı alelik dizilere komplementer oligonükleotid proplarla hibridize edilerek taşıdığı dizi saptanabilmektedir. Kullanılan çok sayıda proptan nükleotid dizileri alellerle tam uyumlu (komplementer) olanların reaksiyonlarına göre alel çeşitliliği ayırdedilebilmektedir.

Sınıf I genlerinde ekson II ve ekson III ü sınırlayan bölgede lokusa özgü dizilerin bulunmaması bu yöntemin uygulanması için uygun primer bulunmasını zorlaştırmıştır. Bu sorun intronları da kapsayacak şekilde seçilen primer çiftlerinin kullanılması ya da 2 den çok primer çiftinin aynı zamanda kullanılması ile aşılabilmektedir (3).

Bu çalışmada Türkiye'de normal sağlıklı popülasyonda HLA dağılımı ile ilgili çalışmalarımızı HLA-C lokusuna genişletmeyi amaçladık. PZR-DÖOP hibridizasyon yöntemini HLA-C bölgesine uyarlayarak seroloji ile ancak çok az sayıda ayrıştırılabilen bu lokusun polimorfizmini ilk kez DNA düzeyinde inceledik.

MATERYAL ve METOD

ÖRNEK GRUBU:

Donörler İstanbul'da yaşayan, karışık etnik kökenli popülasyona örnek olmak üzere Kıvılcık Kan Merkezine kan bağışlayan donörler ve İstanbul Tıp Fakültesi çalışanlarından rastgele seçildi. Bu seçim yapılırken İstanbul yöresinde yaşayan insanların, İstanbul'un özgün nitelikleri göz önüne alınarak, Türkiye popülasyonunu yansıtmak açısından oldukça uygun bir grup oluşturduğu varsayımına dayanıldı. Donörlerin kadın/erkek oranı 89/64 yaş ortalaması 29.8 idi.

DNA Hazırlanması:

Toplanan tüm antikoagüle edilmiş kan örneklerinden (%1 EDTA içeren) tuzla çökeltme yöntemi ile DNA izole edildi. DNA örnekleri spektrofotometrik yöntemlerle protein içerikleri ve DNA konsantrasyonları açısından ölçüldü. Tüm DNA ların konsantrasyonlarını eşitlemek ve DNA stoklarını korumak amacıyla DNA sulandırılmaları (30 μ g/ml) hazırlandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

HLA-C nin α zincirini kodlayan gen lokusuna özgü primer çifti kullanılarak PZR yapıldı ve elde edilen ürünler hibridizasyon deneylerinde kullanıldı. PZR de 5' primeri olarak 5Cln1-61 (intron 1-42:AGC GAG GG/TG CCC GCC CGG CGA) ve 3' primeri olarak 3Cln3-12 (intron 3-12: GGA GAT GGG GAA GGC TCC CCA CT) kullanıldı. 909 baz çifti uzunluğunda bir ürün elde edildi. Bu ürün C lokusunun 1.intronundan başlayarak 2.ekson, 2.intron, 3.ekson ve 3.intronun bir kısmını içeren bölgeyi içermektedir.

PZR optimizasyonu ile saptanan deney koşullarına göre PZR de 1x reaksiyon tamponu (10x Tampon: 750 mM Tris-HCl (pH9), 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, %0.1 Tween), dNTP μ 200 (M), MgCl_2 (1.5 mM), 5' ve 3' primerler (0.2

μ M), enzim (*Taq* polimeraz, 1 ünite /40 μ l) (Promega, ABD), ve DNA (100 ng) kullanıldı. Bu reaksiyon karışımı 96°C de 3' denatüre edildikten sonra 96°C de 30", 64°C de 1' ve 72°C de 1'dan oluşan döngünün 30 kez tekrarlandığı programla gerçekleştirildi. Elde edilen ürünün uzunluğu açısından beklenene uygunluğu agaroz jel (Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponunda %1.5 agaroz) ile araştırıldı.

Örnek DNA ları ile birlikte C lokusundaki alelleri bilinen kontrol DNA örnekleri (12 adet) de çoğaltıldı ve PZR ürünleri C lokusu için tanımlanan toplam 26 adet diziyeye özgü ve biotinle işaretli propla hibridizasyona alındı (Tablo 1). Özgün olmayan reaksiyon gösteren ya da kontrol örnekleriyle de pozitiflik göstermeyen proplarla deneyler tekrarlandı.

Hibridizasyon deneyleri

Hibridizasyon deneylerinde kullanılan ve HLA-C lokusuna özgü biotin işaretli proplar ve PZR ürünleri ile beklenen reaksiyon patternleri Tabloda gösterilmiştir (Tablo 1). HLA-C lokusunun hibridizasyon deneyleri Kennedy ve arkadaşlarının⁽⁵⁾ önerdiği protokole göre her lokusta uygun prop seti ile radyoaktif olmayan işaretleme ve gösterme (detection) tüm proplar için yapıldı. Isıtma yoluyla denatüre edilen PZR ürünlerinin 3 μ l si pozitif yüklü naylon membranlara damlatılarak emdirildi ve 5' UV ye maruz bırakılarak ile membranlara bağlandı. Deneylerde 42°C de 30' hibridizasyon tamponu ile (HT: 5xSSC (20XSSC: 3M NaCl, 0.3 M sodyum sitrat), %0.5 bloke edici madde (blocking agent=BA, Amersham), %0.1 N-lauroyl-sarcosine, % 0.02 sodyum dodesil sulfat (SDS)) önhibridizasyonu izleyerek, 42°C de 90' uygun proplarla HT içinde hibridizasyon (20 pmol/10 ml) yapıldı. Hibridizasyonu izleyerek yapılan ilk yıkama 5XSSC, %0.1 SDS ile oda sıcaklığında, kritik olan 2. yıkama ise propların Tm değerlerine uygun ısılarda,

propların Tm değerlerinin 1-2 derece altında ısılarda 1XSSC, %0.1 SDS içinde 2 kez 15 ya da 1 kez 30 dakika süreyle yapıldı. Tablolarda proplar için uygulanan yıkama ısıları gösterilmiştir. Bu aşamada 5XSSC ile oda ısısında yıkanan membranlar özgün bağlanmanın gösterilmesinden önce bloke edici madde (BA) ile kaplandı. Bunu izleyerek gösterme işlemi için biotine bağlanan streptavidin-peroksidaz kompleksi 1:7000 tampon 1 (0.15 M NaCl, 0.1 M Tris baz, pH 7.5) içinde sulandırılarak membranlarla oda sıcaklığında inkübe edildi (Amersham), membranlar tampon 2 (0.4 M NaCl, 0.1 M Tris baz, pH 7.5) ile yıkandı ve peroksidaz enziminin luminesan veren özgün substratını içeren sistemle işlendi. Bu amaçla "enhanced chemoluminescence" sistemi üreticilerin önerdiği gibi kullanıldı (Amersham). Membranlar 5-10 dakika süreyle radyolojik filme maruz bırakıldı ve sinyaller film banyosunu izleyerek okundu.

Membranlar yeniden kullanılmak üzere önce 5XSSC ile yıkandı, sonra 0.1X SSC, %0.1SDS ile 65°C de 1 saat inkübe edildi ve sonra yine yıkanarak HT içinde bekletildi.

Gen frekansları (gf), sayılarak bulunan fenotip frekansları (ff) ile $gf = (1-ff)$ formülüne göre hesaplandı.

BULGULAR

HLA-C geninin incelenmesinde kullanılan PZR-DÖO proplarla hibridizasyon deneylerinde PZR yi izleyerek hibridizasyonlarda, özellikle dizileri açısından benzerlik gösteren Cw*0202 ile Cw*1202 ve Cw*1203 alelleri ayrıştıran bir grup prop (C3E12, C3E1203, C3A212, C3G2612 ve C3H2) için, hibridizasyonlar farklı koşullarda yinelenildi. Bu lokus için tanımlanan sınırlı sayıda probun bazıları için pozitif kontrol DNA örneklerinin olmaması, sonuçların değerlendirilmesinde tek bir probun reaksiyonuna bağlı olarak birkaç alelin ayrıştırılması zorunlulu-

Tablo 1. HLA-C lokusu proplarının Tm değerleri, yıkama ısıları ve reaksiyon paterni

	C 2 E A L L	C 2 G 1	C 2 G 2	C 3 A 1	C 3 E 1 2	C 3 E 2 0 3	C 3 A 2 1 2	C 3 G 2 6 1 2	C 3 H 2	C 3 J 1 7	C 3 G 1 7 1 2	C 3 A 7 0 2 3	C 3 G 7 1 6	C 3 G 1 6 A	C 2 D 6	C 3 H 3	C 3 K 3	C 2 H 3 0 3	C 3 C A	C 3 A 4	C 3 B 4	C 3 D 5 8	C 3 A 1 4	C 3 C 1 5	C 3 G 8 0 1 3	
Tm	56	56	54	54	56	56	56	56	56	54	54	54	56	54	56	56	54	54	56	56	54	56	54	54	54	
Yıkama	55	54	54	54	58	55	58	58	58	55	55	55	58	55	54	55	54	55	55	55	58	55	54	54	55	
*0101/2																										*0101/2
*0201/2																										*0201/2
*1701																										*1701
*0302																										*0302
*0303																										*0303
*0304																										*0304
*0401/2																										*0401/2
*0701																										*0701
*0702																										*0702
*0703																										*0703
*0704																										*0704
*0501																										*0501
*0801/3																										*0801/3
*0802																										*0802
*0602																										*0602
*1601																										*1601
*1602																										*1602
*1603																										*1603
*1201																										*1201
*1202																										*1202
*1203																										*1203
*1301																										*1301
*1401/2																										*1401/2
*1403																										*1403
*1501/2/3/5																										*1501/2/3/5
*1504																										*1504

ğu bu lokusta sonuç alınmasını zorlaştırdı (Bkz. Tablo 1).

Bu grupta incelenen toplam 153 örnekte saptanan alel dağılımı Tablo 2 de gösterilmektedir. Toplam 22 çeşit alel ya da alel grubu gösterilmiştir. Tablo 1 de gösterilen reaksiyon paterninde görüldüğü gibi kullanılan proplarla ayrıştırılması olanağı olmayan

aleller yanında, heterozigot örneklerde paternlerin örtüşmesine bağlı olarak da ayrıştırma sınırlanmaktadır. Örneğin Cw*0701 ile Cw*0704 alelleri eğer diğer HLA-C aleli Cw*0602 ise birbirinden ayırdedilememektedir. Örtüşen paternler ve uygulanan yöntemin sınırlılıkları HLA Toplantı kitabında ayrıntılı olarak gösterilmiştir⁽⁵⁾. İncelenen grupta toplam 11 DNA örneğinde ancak tek

Tablo 2. HLA-C sonuçları: Fenotip (ff) ve gen (gf) frekansları gösterilmiştir

HLA-C	N	ff	n	gf	SIKLIK SIRASI
HLA-C	153		306	0.176	1
*0401/2/3	49	0.320	53	0.114	2
*0701/5	33	0.216	33	0.111	3
*02021/2	32	0.209	33	0.082	4
*0602	24	0.157	24	0.075	5
*0702	22	0.144	22	0.068	6
*0102/3	20	0.131	23	0.061	
*0303	18	0.118	18	0.061	
*0501	18	0.118	19	0.057	
*12021/2	17	0.111	19	0.040	
*1402/3	12	0.078	12	0.037	
*1203	11	0.072	11	0.030	
*0704	9	0.059	9	0.030	
*0802	9	0.059	9	0.013	
*1602	4	0.026	4	0.010	
*0703	3	0.020	3	0.010	
*1504/5	3	0.020	3	0.010	
*1701/2	3	0.020	3	0.007	
*0302	2	0.013	2	0.007	
*0304	2	0.013	2	0.007	
*1601	2	0.013	2	0.003	
*0801/3	1	0.007	1	0.003	
*15051/2	1	0.007	1		
*1301	0		0		
*1502/3	0		0		
1801	0		0		
*0701/2/3/5	58	0.379	58	0.212	

bir aleli düşündüren reaksiyon paterni gözlenmesi bu DNA örneklerinin "homozigot" olması şeklinde değerlendirildi.

HLA-C alellerinden incelenen örnek grubunda en sık rastlanan Cw*04 grubu oldu, bu grubun gen frekansı (gf) 0.176 olarak saptandı. Cw*0401, *0402 ve *0403 alellerini kapsayan bu gruba uygun reaksiyon paterni toplam 49 DNA örneğinde gösterildi. Bu grubun ayrıştırılması uygulanan yöntemle olanaklı değildir. İkinci sıklıkla rastlanan HLA-C aleli Cw*0202 aleli olmuş, bu alelin gf= 0.111 olarak hesaplanırken, toplam 32 DNA örneğinde rastlandı. Bunları izleyerek sırasıyla Cw*0701/5 (gf=0.114), Cw*0602

(gf=0.082), Cw*01 (gf=0.075) ve Cw*0102/3 (gf=0.068) alelleri gösterildi.

TARTIŞMA

Bu çalışmada Türkiye popülasyonundan rastgele seçilen, sağlıklı ve akraba olmayan bir grupta MHC sınıf I grubundan HLA-C geni moleküler yöntemlerle araştırılmış, bu lokustaki alel dağılımı belirlenmiştir.

Çalışma Türkiye popülasyonu HLA dağılımı konusunda ayrıntılı bir incelemeyi oluşturmaktadır. Çalışmada incelenen örnek grubu yalnızca İstanbul'da yaşayan kişilerden oluşturulmuş olup Türkiye popülasyonunun tü-

münü temsil etmiyor sayılabilir. Ancak İstanbul'un Türkiye açısından taşıdığı önem ve göç merkezi olarak rolü gözönüne alındığında, bu şehirde yapılan rastgele bir örnekleme nin oldukça iyi bir temsil işlevi yerine getirebileceği kabul edilebilir.

HLA-C geninin moleküler DNA yöntemleri ile incelenbilmesi 1996 yılında yapılan XII.HLA Toplantısında ilk defa yapılmıştır. Toplantı kapsamında çok sayıda örnekte uygulanmış ve HLA-C alellerinin ayrıştırılması olanaklı olmuştur. Özellikle serolojik olarak değerlendirilmesi olanağı çok az olan HLA-C polimorfizminin DNA yöntemleri ile araştırılabilmesi bu Toplantının en önemli katkılarından biri olmuştur (2). Bu sayede incelenen çok sayıda etnik toplulukta en yüksek sıklıkla rastlanan alellerin topluca değerlendirilmesi en sık rastlanan HLA-C alellerinin sırasıyla Cw*07G1, Cw*04G1, Cw*0602, Cw*08, Cw*0304 ve Cw*0202 olduğunu göstermiştir (1). Bu sıralama ile Türkiye'de elde edilen dağılımın benzerlikleri özellikle gözlenmektedir. HLA-C sonuçlarında en sık rastlanan alel grubunun Cw*04 olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada sonuçlarda Cw*07G1 grubu Cw*0701/5, Cw*0702, Cw*0703 ve Cw*0704 altgruplarına ayrıştırılarak değerlendirilmiştir ve bu şekilde Cw*0701/5 alelleri 3.sıklıkta bulunmuştur. Ancak Toplantı kapsamında yapıldığı gibi Cw*07G1 (Cw*0701, *0702, *0703, *0705) grubunun gen frekansına bakılırsa, bu grubun Türkiye'de incelenen örnek grubunda da 0.212 alel frekansı ile ilk sırada yer aldığı görülmektedir. Bunu izleyerek Cw*04G1 grubu 2.sıklıkta saptanmıştır.

Komşu ülkelerde saptanan HLA-C dağılımı ile Türkiye bulguları karşılaştırıldığında Yunanistan'da en sık rastlanan HLA-C aleli Cw*07, bunu izleyerek Cw*04 ve Cw*12 olarak bildirilmiştir (6). Akdeniz ülkelerinden İtalyada, Portekizde ve Sardunya adasında da en sık HLA-C aleli Cw*07 ve Cw*04 grupları olup, Sardunya'da Cw*05

ve İtalya'da ve Portekiz'de Cw*06 bunları izlemektedir. Yakın ülkelerden Bulgaristan'da da Cw*07 en sık, bunu izleyerek Cw*04 ve Cw*12 gelmektedir (4). Ürdün'lülerde ise Cw*0502 en sık olup, bunu Cw*0401 ve Cw*0602 izlemektedir (7).

Bizim bulgularımızda ilk iki alel açısından tüm komşu ülkelerle benzerlikler göstermekle birlikte, 3.sıklıkla rastladığımız Cw*0202 alelinin sıklığı, bildirilen komşu etnik gruplardan farklı olarak, yüksek bulunmuştur. Bu bulgu HLA Toplantısında incelenen küçük (n=11) "Pavia" topluluğunda da benzer şekilde yüksek bulunmuştur (8).

Sonuç olarak HLA-C alelleri ülkemizde çevre etnik topluluklar ile benzerlik göstermektedir. Çalışmanın sonuçları HLA ile hastalık ilişkilerinin araştırılmalarında, organ ve kemik iliği transplantasyonlarında referans oluşturması açısından yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bodmer JG, Cambon-Thomsen A, Hors J, Piazza A, Sanchez-Mazas: Antropology report introduction, in HLA: Genetic diversity of HLA. ed: Charron D., cilt I, EDK, Paris, (1997) s. 269.
2. Bodmer W: Summary of the 12th International Histocompatibility Workshop and Conference, in HLA: Genetic diversity of HLA. ed: Charron D., cilt II, EDK, Paris, (1997) s: 98.
3. Cereb N, Maye P, Lee S, Kong Y, Yang SY: Locus specific amplification of HLA class I genes from genomic DNA: locus-specific sequences in the first and third introns of HLA-A, -B, and -C alleles. Tissue Antigens 45: 1 (1995)
4. Ivanova M, Spassova P, Michailova A, Naumova E: Distributions of HLA class I alleles and haplotypes in Bulgarians- contribution to understanding the origin of the population. Tissue Antigen 57: 208 (2001)
5. Kennedy LJ, Poulton KV, HLA class I SSOP protocol, in HLA: Genetic diversity of HLA. Ed: Charron D., cilt I, EDK, Paris, (1997) s: 564.
6. Papassavas EC, Spyropoulou-Vlachou M, Papassavas AC, Schipper RF, Doxiadis IN, Giokas CS: MHC class I and class II Phenotype, Gene and Haplotype frequencies in Greeks using molecular typing data. Human Immunology 61: 615 (2000)
7. Sanchez- Velasco P, Karadsheh NS, Garcia-Martin A, Alegria CR, Leyva-Cobian F: Molecular analysis of HLA allelic frequencies and haplotypes in Jordanians and comparison with other related populations. Human Immunology 62: 901 (2001)
8. Trowsdale J, Campbell RD: The 12th International MHC map, in HLA: Genetic diversity of HLA. Ed: Charron D., cilt I, EDK, Paris, (1997) s: 499.