

HLA ve Doku Tiplendirilmesi

Meral BEKSAÇ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Hematoloji Bilim Dalı

1. HLA YAPISI, GELİŞİMİ VE İŞLEVLERİ

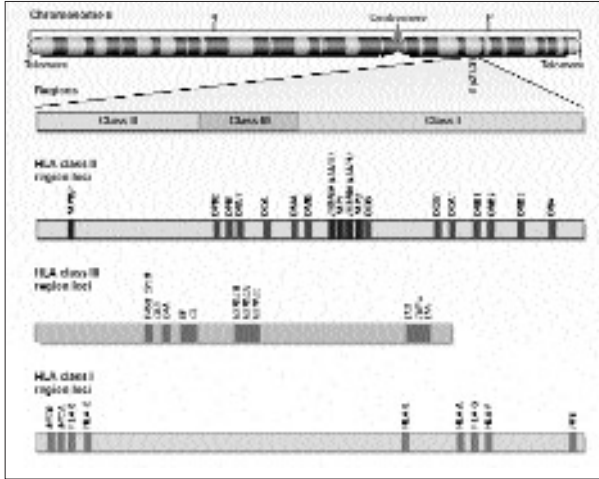
HLA kısaltmasının karşılığının Human Leucocyte Antigens olduğuna birçok yerde rastlanmaktadır. Oysa başlangıçta bu terim, ilk tanımlanan HLA A antijenlerine atfen, Human Leucocyte antigens series A için kullanılmış ancak daha sonra tanımlanan diğer histokompatibilite bölgelerinin de bu terim kapsamına girdiği görülmektedir. HLA'nın bugün en çok kullanıldığı alan, transplantasyon immunolojisidir. Oysa bu konu ile ilk uğraşmaya başlayanlar, tümör immunolojisi konusunu araştıranlar olmuştur. Yaklaşık 100 yıl kadar önce, farelerde spontan gelişen tümörlerin yine aynı farede kendiliğinden kaybolabildiğini farkedince, bu tümörleri hasta fareden alıp sağlıklı fareye aktarma girişiminde bulunuldu. Amaçları tümörleri uzun süre yaşatarak araştırmalarını ilerletebilmektir. Ancak tümör transplantasyonu farelerin çoğunda hüsrarla sonuçlandı. Akıba fareler arasında transplantasyonun başarılı olduğunun farkedilmesi, bugünkü bilgilerimizin temelini oluşturmaktadır.

Bu sonuçları, doğal olarak, doku naklindeki red olayının sadece tümör dokusuna karşı mı yoksa aynı zamanda sağlıklı dokulara karşı da olup olmayacağı sorusu izledi. Nitekim birbirine çok yakın veya daha uzak akrabalık gösteren fareler arasında yapılan transplantasyon deneyleri doku reddinde rol oynayan gen bölgelerinin saptanmasını sağladı. Böylece farelerde bir bölgenin çok güçlü etkisi olduğu, bunun dışında yer alan 10-20 kadar daha daha zayıf etkide bölgenin bulunduğu anlaşıldı ve bu genlerin tümüne doku uyum bölgesi (tissue histocompatibility loci) adı verildi. Farelerdeki bu ilk çalışmalar sonucunda bu genlere histokompati-

bilite antijeni karşılığı olarak H-2 adı verildi.

İnsanlarda ise en güçlü etkiye sahip olan bölge, esas doku uyum bileşkesi (major histocompatibility loci=MHC) olarak adlandırılırken diğerleri de ufak doku uyum bileşkesi (minor histocompatibility complex=mHC) olarak tanımlandı. 11 Nisan 1958 de ikiz doğum yapan bir gebede aşırı kanama nedeniyle uygun kan grubundan kan transfüzyonunu takiben gelişen hipotansiyon, titreme ile seyreden tablonun neden ortaya çıktığı araştırılırken, hastanın multipar olduğu ve buna bağlı olarak serumunda transfüze lökositleri agglutine eden paternal HLA moleküllerine karşı gelişmiş yüksek titrede alloantikörlerin varlığı ilk kez gösterildi. Böylece hücresele yöntemle HLA tiplerinin ve farklılıklarının saptanmasına başlandı. İlk saptanan alloantijen bugün HLA-A2 olarak bildiğimiz ancak 1954 yılında Mac adı verilen antijenin Dausset tarafından keşfidir. Bunu bugün Bw4 ve Bw6 olarak bildiğimiz geniş(broad) antijenlerin 1963'te van Rood tarafından bulunması izledi. Bir yıl sonra Bodmerler HLA A grubunu tanımladılar ve Mac antijenini içerdiğini gösterdiler. MHC yi oluşturan gen bölgesi bugün için oldukça iyi tanımlanmış bulunmaktadır (Şekil 1). Bu genlerden transplantasyon immunolojisi açısından en büyük öneme sahip olanlar Class I ve Class II genleridir. Zaman geçtikçe HLANın yapısının ne kadar polimorfik ve karmaşık olduğu ortaya çıkmaya başladı ve böylece HLA insan immunolojisinin önemli bir bölümünü oluşturmayı başardı.

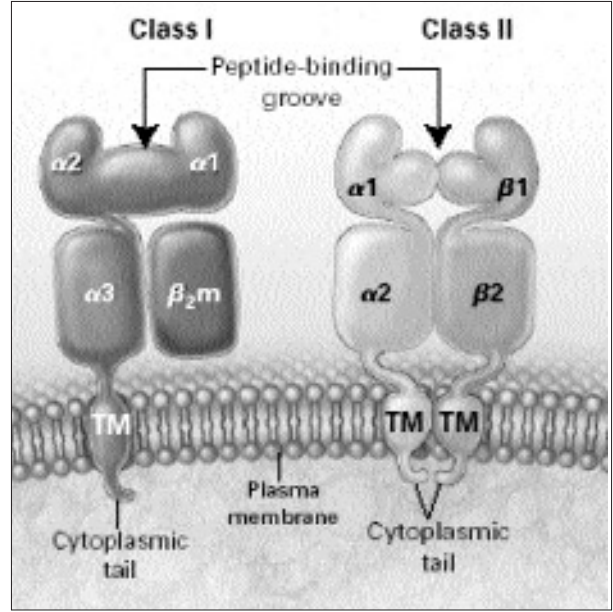
Eldeki yöntemler öncelikle antijenlerin saptanmasına olanak verdi. Klein MHC antijenlerini ekspresyon özellikleri ve birbirleri ile ilişkilerine göre iki sınıfa ayırdı:



Şekil 1. Major Histokompatibilite Kompleksi

Class I antijenler tüm çekirdekli hücrelerin membranında taşınır ve CD8 (sitotoksik/ supresör T lenfositleri ile köprü oluşturarak MHC sınırlı immun yanıtın ortaya çıkmasını sağlarlar. Class I molekülünün tüm bireylerde ortak olan, 15.kromozomdan kodlanan ve hafif zincir(beta) özelliğinde bir alt birimi vardır: beta-2 mikroglobulin. Bunun dışında 6.kromozom üzerindeki MHC bölgesi tarafından kodlanan bir ağır (alfa zinciri) bulunmaktadır (Şekil-2). Ağır zincirleri kodlayan Class I genleri HLA-A, -B, -C, -E, -F ve -G işlevsel HLA izoformlarını oluşturur. Bunlardan ilk üçü klasik Class I antijenlerini sentezler. Klasik olmayan HLA-E, -F ve -G ise doğal öldürücü hücreler ile ilişkili immun yanıtta görev almaktadırlar. Buna ilaveten HLA-H, -J, -K ve -L olarak adlandırılan ve bugün için henüz immunolojik özelliği olmadığı düşünülen yalancı genler bulunmaktadır. Tüm bireylerde, 6.kromozom HLA-A dan -G ye kadar tüm altı bölge genleri bulunurken bazı bireylerde HLA-H yalancı gen bölgesini içeren delesyonlar saptanmıştır. Moleküler HLA Class I tiplendirilmesinde kodlama ve polimorfik özelliklerine sahip ekson 2, en çok kullanılan bölgedir. MHC Class I moleküllerinin esas görevi, hücre içerisindeki peptidleri hücre yüzeyine taşımaktır. Burada amaçlanan, örneğin bir viral enfeksiyon sırasında sentezlenen viral peptidlerin hücre yüzeyine taşınmasını ve böylece bireye ait olmayan bu moleküllerin sitotoksik T lenfositleri tarafından tanınmasını sağlayarak enfekte hücrelerin öldürülmesine giden süreci başlatmaktır (Şekil3 ve 4a).

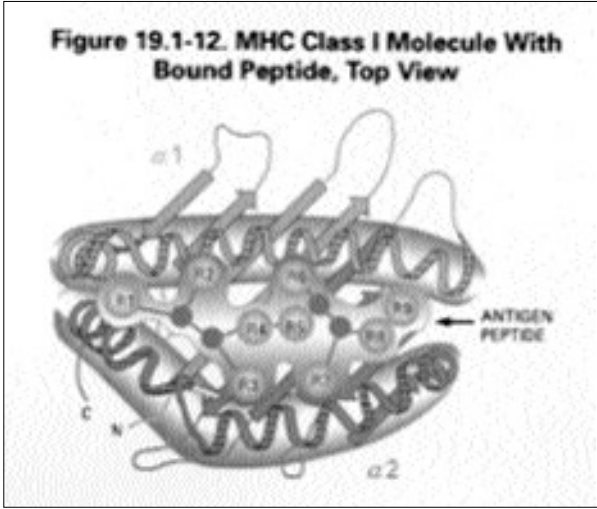
Class II molekülleri ise sadece bazı hücrelerin örneğin monositler, aktive T lenfositleri ve B lenfositleri ile Langerhans ve dendritik hücrelerin yüze-



Şekil 2. HLA Class I ve Class II molekülleri

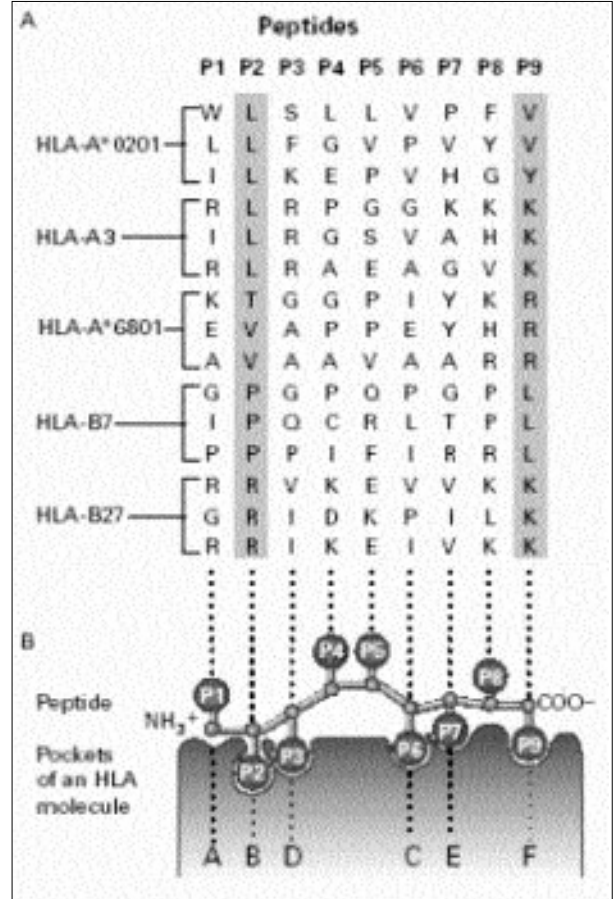
yinde bulunabilmektedirler. Kısacası sadece antijen sunan hücreler Class II moleküllerini yüzeyinde taşırlar denilebilir. Bu bölge genleri 6 kromozom üzerinde yerleşmiş olan beş izoform (HLA-DM, -DO, -DP, -DQ ve -DR) ve her birinin hem alfa ve hem beta zincir genleridir (Şekil-1, 2, ve 4b). Sonuçta klasik Class II antijenleri olan HLA-DR, DQ ve DP'nin sentezlenmesini sağlarlar. Class II antijen ve genlerinin hepsinde ortak D harfinin bulunmasının nedeni bu antijenlerin varlığını gösteren serolojik yöntem dışında farklı bir yöntem olarak hücre kültürüne dayanan bir çeşit MLC (Mixed Lymphocyte Culture) reaksiyonu ile gösterilen HLA-A, B ve C den sonra gösterilen bir antijen, HLA-D olarak adlandırılmasından kaynaklanmaktadır. Daha ileri tarihlerde alloreaktif antikorların yardımı ile de HLA-DR ve DQ antijenleri tanımlanabilmiştir. HLA-DP için bu yöntem geçerli olamamıştır. HLA-DQ'nun alfa ve beta zincirini sentezleyen genler HLA-DQA1 ve HLA -DQB1 olarak adlandırılır. A1 ve B1 genleri peptid bağlayan bölgeleri kodlarken A2 ve B2 bölgeleri ise immunglobulin benzer yapıda molekülleri kodlar. DRB genlerinin ancak %6 kadarı kodlama yapar ve ekson1-6 olarak sıralanmışlardır. Ekson 1 sinyal peptidi için kodlama yaparken, ekson 2 polimorfik olan β1 bölgesi, ekson 3 korunan β2 bölgesi, ekson 4-6 ise transmembran ve sitoplazmik bölümler için kodlama yaparlar. Moleküler HLA DRB1 incelemelerinde genellikle ekson 2 incelenir.

Terminolojik olarak HLA-DRB1*0401 gibi bir



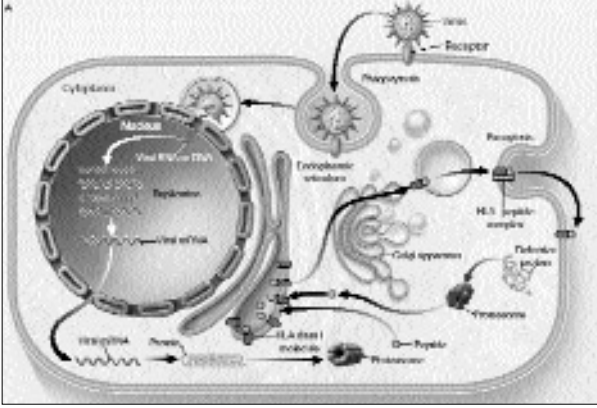
Şekil 3. HLA class ile peptid bağlanma ilişkisi

örnek verildiğinde anlatılmak istenen şudur: Moleküler tiplendirme sonucunda(* bunu göstermektedir) Class II nin R ailesinde beta1 zincir geninde 0401 allelik varyantı saptanmıştır. Bu alele karşılık gelen bir serolojik antijen HLA-DR 04'tür. Başka bir örnek olarak HLA-DRB1*0402 ise serolojik olarak yine aynı reaksiyonları verdiği için ancak moleküler tiplendirme ile diğer varyantlardan ayırt edilebilir. Saptanan allelin serolojik karşılığı olan numara ilk iki rakamı oluştururken bunu takip eden 2 basamakta moleküler tiplendirme ile ulaşılan yüksek çözünürlükteki alel tipi verilir. Eğer düşük çözünürlükte bir analiz yapıldı ve 3. ve 4. basamak karşılıkları bilinmiyor ise bilinmiyor anlamına gelecek şekilde "XX" koyulacaktır, Ör: HLADRB1*04XX. HLA-DR bölgesi genlerinin yapısı biraz karmaşıktır. Burada da hem işlevsel olan hem de yalancı gen özelliğinde bölgeler üstelik te aralarında belli bir düzenleme içerisinde bulunmaktadır. Bunlara DRB haplotipleri denilmektedir (Tablo1). Bir önceki örnekte verilen HLA-DR 04 ile bu haplotiplerden serolojik olarak saptanabilen DR 53 eşlik edebilmektedir. Class II moleküllerinin de Class I moleküllerine benzer görevleri vardır. Burada en önemli farklılık, Class I moleküllerinin genellikle endojen kökenli peptidleri, Class II moleküllerin ise ekzojen kökenli peptidleri bağlayarak hücre membranına taşıması ve eliminasyonunda rol oynamalarıdır. Ayrıca Class I ve II moleküllerinin yapısal farklılıkları da bağlayacakları peptidin özelliklerini ve bağlanma gücünü farklı kılmaktadır. Class I in daha kıvrımlı ve uçları kapalı yapısı, Class II ye oranla daha küçük peptidleri bağlamaya olanak verir. Oysa Class II daha açık ve daha düz yapısı ile büyük peptidleri, kenarları dışa

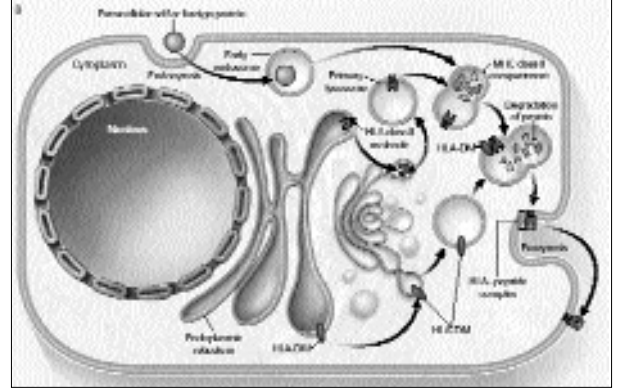


taşsa da, bağlamaya müsaittir. Monosit, B lenfosit gibi Class II molekülleri sentezleyebilen hücrelere fagositozla alınan ve lizozomlarda peptidlere parçalanmış proteinler HLA-DM molekülünün yardımı ile Class II molekülüne bağlanır. Oluşan MHC-peptid kompleksi ekzositozla hücre membranına taşınır. Burada devreye CD4 yardımcı lenfositler girer. T lenfosit reseptörü ile Class II molekülü arasında oluşan köprü sonucunda yardımcı T lenfositinden interferon sentezi başlar. Interferon ise uyarıcı hücreden daha fazla Class II molekülü yapılmasını dolayısıyla daha güçlü bir immün yanıtın ortaya çıkmasını sağlar (Şekil 4b ve şekil-3 ve -6). Tüm T lenfositleri, hemen tüm Class I antijenlerini tanımlamaktadırlar. Ancak Bw4 antijeni doğal öldürücü hücre reseptörlerine bağlanabilmektedir.

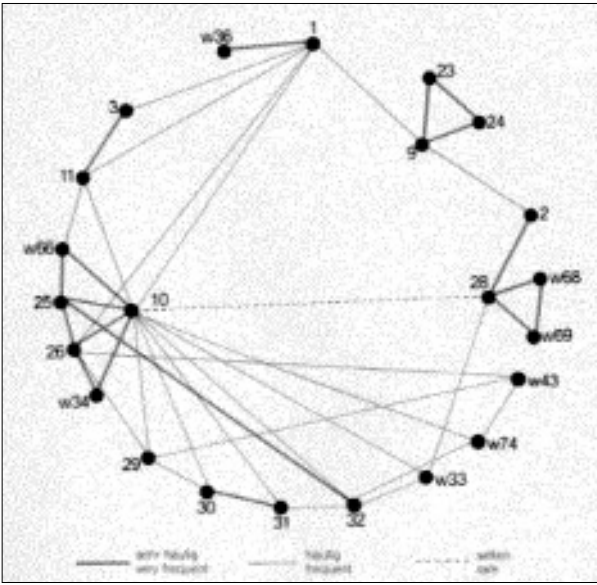
İmmün yanıtta MHC nin rolü, MHC antijenlerinin keşfi, ve fare immunogenetiğindeki başarılarından dolayı Benacerraf, Dausset ve Snell 1980 yılında Nobel Tıp ödülüne layık görülmüştür. Zinkernagel ve Doherty de 1996 da immün sistemin virüsle enfekte hücreleri tanımasının MHC ile sınırlı olduğunu kanıtlayan ve hücre immunitenin özgüllüğünü gösteren çalışmalarından dolayı Nobel Fizyolo-



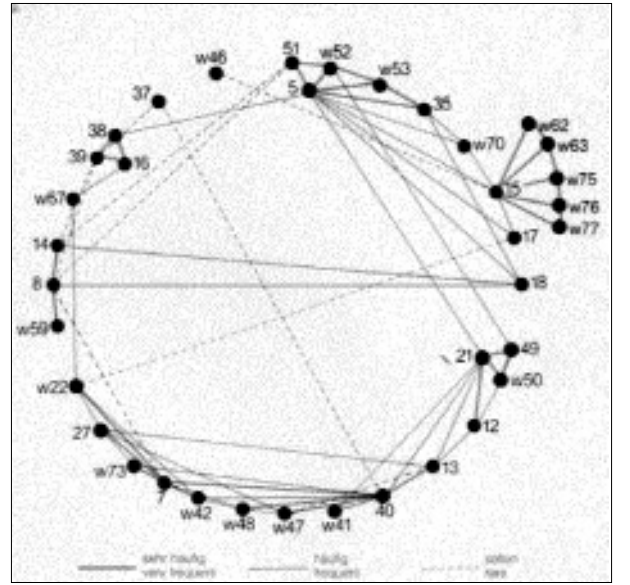
Şekil 4a. Class I ve endojen peptidlerin ilişkisi



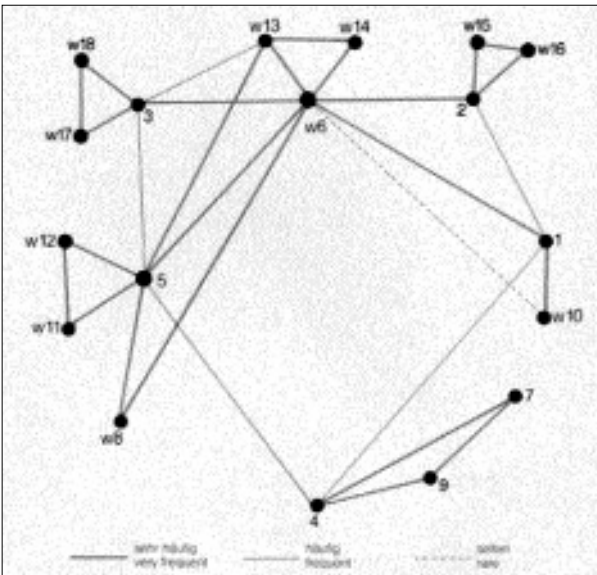
Şekil 4b. Class II ve eksojen peptidlerin ilişkisi



Şekil 5a. HLA-A antijenleri arasında çapraz reaksiyonlar



Şekil 5b. HLA-B antijenleri arasında çapraz reaksiyonlar



Şekil 5c. HLA-DR antijenleri arasında çapraz reaksiyonlar

loji ödülüne hak kazanmışlardır.

HLA'nın bu kadar polimorfik olmasının nedenleri şöyle açıklanmaktadır. HLA molekülleri tiplerine göre hangi hücrelerde bulunacağı değişmekle birlikte hücre yüzeyinde yer alan glikoprotein yapısında moleküllerdir. HLA moleküllerinin en önemli görevinin hücre içi veya hücre dışı kaynaklı peptidleri bağlayarak bunların hücreden uzaklaştırılması ve bu arada da immun yanıtı düzenlemesi olduğu için doğadaki peptid polimorfizmi beraberinde HLA polimorfizmini de getirmiştir. HLA molekülleri üzerindeki küçük girintiler ve peptid bağlanma noktaları Şekil 5'te görülmektedir. HLA polimorfizmini açıklamak üzere çeşitli teoriler geliştirilmiştir. Bunlardan en çok rağbet görenler pozitif veya negatif seleksiyon teorileridir.

Tablo 1. HLA Class II haplotipleri

ANTİJEN	GEN	YALANCI GENLER	GENLER	YALANCI GEN	GEN
DR1	DRB1	DRB6		DRB9	DRA
DR51	DRB1	DRB6	DRB5	DRB9	DRA
DR52	DRB1	DRB2	DRB3	DRB9	DRA
DR53	DRB1	DRB7	DRB8	DRB9	DRA
DR8	DRB1			DRB9	DRA

Küçük Doku Uyum antijenleri (Minor Histocompatibility Antigens)

Küçük doku uyum antijenleri (mHag), MHC moleküllerine bağlanan ve T lenfositler tarafından tanınan immunojenik peptidlerdir. HLA uyumlu bireyler arasında yapılan nakillerde de GVHH na rastlanılmasının nedenleri araştırılırken Goulmy ve ark.alıcı ve vericinin mHag arasında farklılıklarını saptamışlardır. Bu peptidler de MHC ye bağlanarak T lenfositlere tanıtılırlar. Her bireyin farklı MHC antijenlerini taşıması nedeniyle minor doku uyum antijenleri farklı bireylerde farklı şekilde reaksiyona sebep olurlar. Bazı kişilerin MHC molekülleri bu peptidleri bağlayamaz ve immun yanıt oluşturamazken bazılarının bir immun yanıt oluşmasına neden olurlar. Bu peptidler genel olarak Class I moleküller aracılığı ile tanıtılır ve nakil yapılmış hastalarda verici kaynaklı bu peptidlere özgün sitotoksik T lenfositler gelişebilir. Doku ve organ nakillerinde önemi gösterilmiş mHag ler arasında HA-2, HA-3, HA-4, HA-5 ve sadece Y kromozomunda bulunan H-Y sayılabilir. Bu antijenlerin tanınması bugün için sadece moleküler yöntemlerle mümkün olabilmektedir. Panel giderek artmakla birlikte ilk olarak HLA-A02 için mHag primerleri sentezlenmiştir ve tüm HLA tipleri için henüz mümkün değildir..

2. DOKU TIPLENDİRİLMESİ YÖNTEMLERİ

2a. Serolojik Yöntemler

HLA antijenlerinin keşfini sağlayan serolojik yöntemlerdir. Başlangıçta makroaglutinasyon testi ile çok miktarda serum ve hücre süspansiyonu(2 damla=100 µl) kullanılarak HLA antikoru varlığında hücrelerin aglutine olması bekleniyordu. Bu yöntemle tüm antikorumun, özellikle IgG yapısında antikorumun saptanamayabileceği aşıkardır. Daha

sonraları Terasaki yöntemi mikro boyuta taşıyarak ve kompleman bağımlı sitotoksiteden yararlanarak halen günümüzde kullanılmakta olan mikrolenfositotoksite yöntemini (aynı zamanda National Institute of Health yöntemi olarak ta bilinir) geliştirdi. Burada kullanılan serum miktarı 1µl ye indirilmiştir. Önceden içerisine çeşitli HLA Class I veya II antijenlerine karşı elde edilmiş antikorumun dağıtıldığı 60-72 kuyucuklu plaklar hazırlanır ve derin dondurucuda saklanır. Çalışma aşamasında eritilen plaklara incelenecek bireyin lenfositleri her bir kuyuya µml olarak dağıtılır. 30 dakikalık bir inkubasyonu takiben yine her kuyuya yaklaşık 6 ml tavşan komplemanı eklenir ve tekrar inkubasyona 30-45 dakika devam edilir. Antijen-antikor bağlanmasının olduğu kuyularda hücre ölümlü gerçekleşecek diğer kuyularda ise hücreler canlılıklarını bir süre korumaya devam edeceklerdir. Ölü-canlı ayırımı yapabilecek bir boyama sistemi ile mikroskopta ilk okuma yapılır. Bunun sonucunda ölüm gerçekleşen kuyulardaki HLA antijenlerinin geniş, özgül antijenler olması ve çapraz reaksiyonlar gibi durumlar değerlendirilerek rapor hazırlanır. Bu aşamalar HLA üzerine yürütülen Workshopların yardımı ile büyük ilerleme göstermiştir. 1964 yılından beri önceleri daha sık son yıllarda ise 5 yılda bir olmak üzere Uluslararası HLA Çalıştayları düzenlenmektedir. Son Çalıştay (13.) 2001 de Kanada'da gerçekleşmiştir. Buna göre HLA-A,-B,-C,-E,-F ve -G de alel sayıları sırasıyla 124,258,74,5,1 ve 14'tür. Aynı Çalıştay Class II için ise alleleri şöyle belirlemiştir: DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPA1: 221,19,39,15,84. Bunların dışında da aleller mevcut olmakla birlikte sayıları az olduğu için üzerinde durulmamaktadır. Tüm Dünya üzerinde yeni bir antijen veya alel tanımlandığında bu veri Çalıştaylara taşınmakta ve veriler

Tablo 2. HLA broad(üsttip) ve split(alttip) antijenlere örnekler

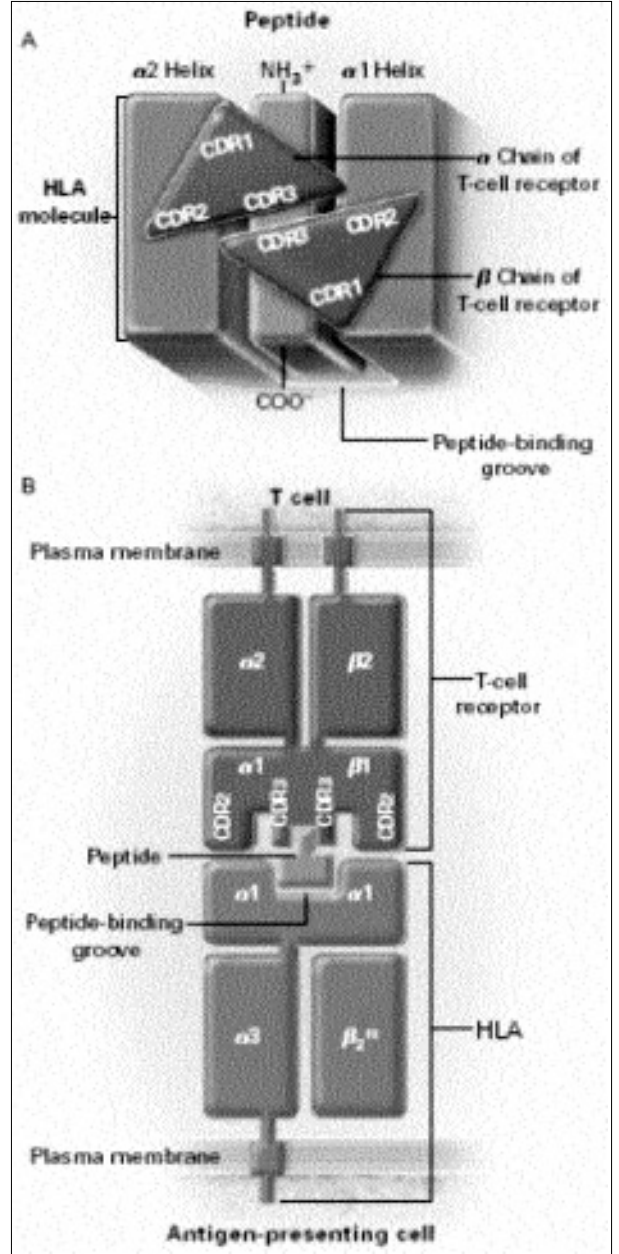
Genel isim	Sub gruplar (Split)
A9	A23, A24
A10	A25, A26, A34, A66
A19	A29, A30, A31, A32, A33, A74
A28	A68, A69
B5	B51, B52
B12	B44, B45
B14	B64, B65
B15	B62, B63, B75, B76, B77
B16	B38, B39
B17	B57, B58
B21	B49, B50
B22	B54, B55, B56
B40	B60, B61
B70	B71, B72
DR2	DR13, DR16
DR3	DR17, DR18
DR5	DR11, DR12
DR6	DR13, DR14
DQ1	DQ3, DQ6
DQ3	DQ7, DQ8, DQ9

paylaşmaktadır. Serolojik yöntemlerde elde edilen sonuçlar split(alt grup) sonucu olarak verilmelidir. Broad(üst grup) sonucu yeterli veri değerine sahip değildir (Tablo-2). Örneğin HLA-DR5 bir broad antijendir. DR11 ve DR12 bunun split antijenleridir. Birbirlerinden önemli aminoasit farklılıkları göstermektedir. Bir raporda DR5 olarak gösterilen bir hasta sonucu başka bir merkezde kardeşine ait sonuç DR12 olarak gösterildiğinde konuya yabancı olan kişilerce farklılık olarak değerlendirilmektedir. Alt grup raporlandırılma bu sorunu da ortadan kaldırmaktadır. Bazı lokus isimlerinden sonra görülen "w" harfi, HLA allelerinin yeni tanımlandığı dönemlere dayanan bir terminolojidir. Bu tarihlerde üzerinde halen çalışılmakta olan antijenleri tanımlamak için kullanılmışsa da artık gen dizilerinin tanımlanması nedeniyle buna gerek kalmamıştır. Ancak bazı durumlarda örneğin Bw4 ve 6 ve Cw gibi antijenler için kullanımı sürmektedir.

Serolojik tiplendirme eğer Class II için yapılabırsa B lenfosit izolasyonu veya T lenfosit, monosit eliminasyonu gereklidir. Her zaman yeterli B lenfosit elde edilemeyebilir. Ayrıca ortama monosit vs gibi kolay ölen hücrelerin karışması sonuçların özgüllüğünü engellemektedir. Bunun dışında kullanılan plakların farklı olması gereklidir. Günümüzde Class II için moleküler yöntemlerin daha güvenilir olması nedeniyle serolojik yöntemlerin yerini almıştır. Ancak bir Doku Tiplendirmesi Laboratuvarının karşılaştırmak amacıyla bu yöntemi de koruması gereklidir.

2b. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri

Son yıllarda tüm alanlarda olduğu gibi HLA konusunda da moleküler yöntemler hızla gelişme göstermiştir. Ayrıca DNA boyutunda bu kadar polimorfizmin olduğu bir gen için ideal olan da bu-

**Şekil 6.** HLA Class I ile T-hücre reseptör bağlantısı

dur. Bu gelişme kandan hücre ayrıştırılması gibi zahmetli ve pahalı yöntemleri ortadan kaldırırken nötrojenik bireylerde de çalışma yapılabilmesini, kan dışı dokulardan da DNA izolasyonunu mümkün kılmaktadır.

Bu amaçla kullanılan PCR tabanlı yöntemler şunlardır:

Dizilime Özgü Oligonükleotidlerin Kullanıldığı Tiplendirme(Sequence Specific Oligonucleotide typing (SSO))

Hedeflenen dizilimdeki en değişken bölgeleri

tiplendirmeye yöneliktir. Bu amaçla kullanılan problemler oldukça kısa (yaklaşık 18-22 baz) uzunlukta olup işaretlenmiştir. Hibridizasyon öncesinde thermal cycler cihazında lokusa özgün primerler kullanılarak incelenecek HLA lokusu amplifiye edilir. DNA'nın amplifikasyonu sırasında biotin ile işaretlenmiş primerler kullanılır. Amplifikasyonu takiben oluşan ampliconlar kullanılarak yapılan hibridizasyon işlemi solid bir ortam üzerinde (ör: naylon bir membran, kuyucuklar ya da boncuklar) gerçekleşir. Oligonükleotid problemler, DNA'daki allele özgün ise membran üzerinde bu problemler ile amplifiye olmuş DNA arasında hibridleşme olur ve bir yıkama işlemi takiben ortama enzim ile işaretlenmiş olan avidin eklenmesi biotin-avidin etkileşmesinden yararlanarak hibridizasyon sonucunda membrana bağlanan DNA'nın da enzim ile işaretlenmesini sağlar. Daha sonra ortama enzimin substratı eklenerek hangi oligonükleotid prob ile bağlanma olduğu; dolayısıyla bireyin hangi HLA allelini taşıdığı gösterilmiş olur. Solid ortama bağlı olanın amplifiye olmuş DNA değil de oligonükleotidler olması durumunda olay "Reverse" olarak tanımlanır. Son zamanlarda geliştirilmiş olan bir teknikte ise aynı reaksiyon tübünde bulunan 100 farklı renkli boncuk üzerine bağlanmış olan herbiri farklı olan problemler kullanılarak yapılan çalışmalar vardır (Luminex). Bu yöntemde tüplerdeki floresans ölçümüne dayalı bir değerlendirme sistemi kullanılır. HLA class II için genellikle en polimorfik olan ekson 2, Class I için ise ekson 2 ve 3'e yönelik primer setleri kullanılmaktadır. Hibridizasyonu değerlendirme aşamasında elektroforez üzerinde oluşan bantlar, DNA ya bağlanan etidium bromür gibi bir boya kullanılarak ultraviyole ışık altında fotoğraflanır veya striplerde veya mikrokuyucuklu plaklarda kemoluminisansa dayalı olarak ortaya çıkarılıp görüntülenir. Kompliment bölge mevcutsa pozitif reaksiyon saptanır aksi takdirde negatif reaksiyon gözlenir. Reaksiyonların değerlendirilmesi için basit bilgisayar programlarına gereksinim vardır.

Dizilime Bağlı Hazırlama (Sequence Specific Priming (SSP))

Bu metod da bir önceki bilgileri kullanır ancak farklı olarak hedef bölgeyi (alel) amplifiye edecek primerler kullanılır. Amplifikasyondan sonra oluşan ampliconların gösterilmesi için genellikle jel veya benzeri bir ortamda elektroforez işlemi gerektirir. PCR reaksiyonunun çalıştığından emin olmak için her reaksiyon tübüne internal kontrol amacıyla polimorfik olmayan hücresel bir proteini kodla-

yan gene özgün bir primer seti daha eklenir. Böylece pozitif reaksiyon olan tüplerde iki adet PCR ürünü görünür hale gelirken, negatif olarak değerlendirilen reaksiyonlarda sadece internal kontrol için kullanılan genin amplifiye olduğu görülür. Değerlendirme aşamasında bilgisayar programlarına gereksinim vardır.

Elde edilen sonuçların karmaşıklığını çözmek ve daha duyarlı sonuçlar verebilmek için 2. ve 3. ekson dışındaki bölgelere özgün amplifikasyonların da yapılması gerekebilir.

Dizilim Analizine Dayanan Tiplendirme (Sequence Based Typing (SBT))

Bu yöntemde hedef dizilim, yüksek özgüllükte primerler ve her biri farklı renkte boyanmış bazlar kullanılarak saptanır. İlk aşamada yine dizilime özgün primerler ile oluşturulan ampliconlar bu çalışmanın "template" ini oluşturur. Uzama aşamasında reaksiyon durdurularak dizilim tam olarak saptanır. Böylece serolojik olarak saptanamayan birbiri ile yüksek benzeşim gösteren allelerin ayırt edilmesi, mutasyonların saptanması mümkün olabilmektedir. Bu yöntem kardeşler arası nakiller için gerekli olan bir tiplendirme yöntemi değildir. Ancak nadiren serolojik karşılığı olmayan veya SSP veya SSO ile moleküler tiplendirme yapılamayan nadir veya tuhaf HLA tiplerinde, akraba dışı nakillerde alıcı-verici farklılıklarını saptamada kullanılması yararlıdır.

Bu sayılanlar dışında da hücresel, biyokimyasal veya moleküler tabanlı ama yaygın olarak kullanılmayan yöntemler bulunmaktadır. Az kullanılmaları nedeniyle bu konulara değinilmemiştir. Tüm yöntemlerin kullanılmasına karşılık yine de problemler engellenememektedir. Bunlara ambigüites (tuhaflıklar) denilmektedir. Birçok HLA aleli arasında ortak olan dizilimler mevcuttur. Bu da moleküler tiplendirme sırasında heterozigot kombinasyonların oluşmasına yol açmaktadır. Bu durumda başka yöntemler ve başka doku örnekleri ile çalışmaların tekrarlanması önerilir. Bu çalışmalar sırasında anne ve babanın incelenmesi homozigotluk, linkeage disequilibrium ve haplotip tanımlaması açısından gerekebilir.

Son gelişmelerin ve moleküler yöntemlerin kullanıma girmesi ile HLA tiplendirilmesinde güvenilirlik oranı %45 (Class I) ve %31 (Class II) den her ikisi için %97 ye yükselmiştir.

Ancak burada çok önemli husus Doku Tiplendirmesi ile uğraşanların bu konuda devamlı ve kaliteli eğitim alması, performanslarını Uluslararası Kalite Programları ve yine Uluslararası akreditasyon

ile kanıtlamaları gerekliliğidir. Maalesef yurdu-muzda henüz sadece iki Laboratuvar bu aşamaya gelebilmiştir ama en az 20 adet Doku Tiplendiril-mesi yapan Laboratuvar mevcuttur. Bu koşullarda Ülkemizde akraba dışı gönüllü verici Bankalarının veri kalitesinin ne düzeyde homojen olacağı tartış-malıdır. Tüm gelişmelerin ışığında HLA'nın önemi azımsanmamalı veya abartılmamalı ne kadar pa-halı yöntemler olduğu unutulmadan yerinde ve doğru analizlerle ideal alıcı-verici çiftlerinin sap-tanması hedeflenmelidir.

KAYNAKLAR

1. New diagnostic methods in Oncology and Hemato-logy. Ed. D. Huhn.Springer. 1998: New HLA typing methods. Sayfa:143-196.
2. Current methodologies of human leukocyte antigen typing utilized for bone marrow donor selection. A.M.Little, S.G.E.Marsh, J.A.Madrigal. Current Opin-ion in Hematology. 1998(5):419-428.
3. The HLA Facts Book. Ed.S.G.E.Marsh,P.Par-ham,L.D.Barber. Academic Press.2000:Human Le-ukocyte antigens determine Histocompatibility in transplantation.sayfa:5-6
4. The HLA Facts Book. Ed.S.G.E.Marsh,P.Par-ham,L.D.Barber. Academic Press.2000:HLA Class I&II antigens and alleles: Workshops and nomencla-ture. Sayfa: 14-36.
5. Nomenclature for factors of the HLA system. SGE Marsh ve ark. Tissue Antigens. 2000(60):407-464.
6. The HLA System-First of Two Parts . J Klein, A Sato, New England Journal of Medicine.2000; 343(10): 702-709.