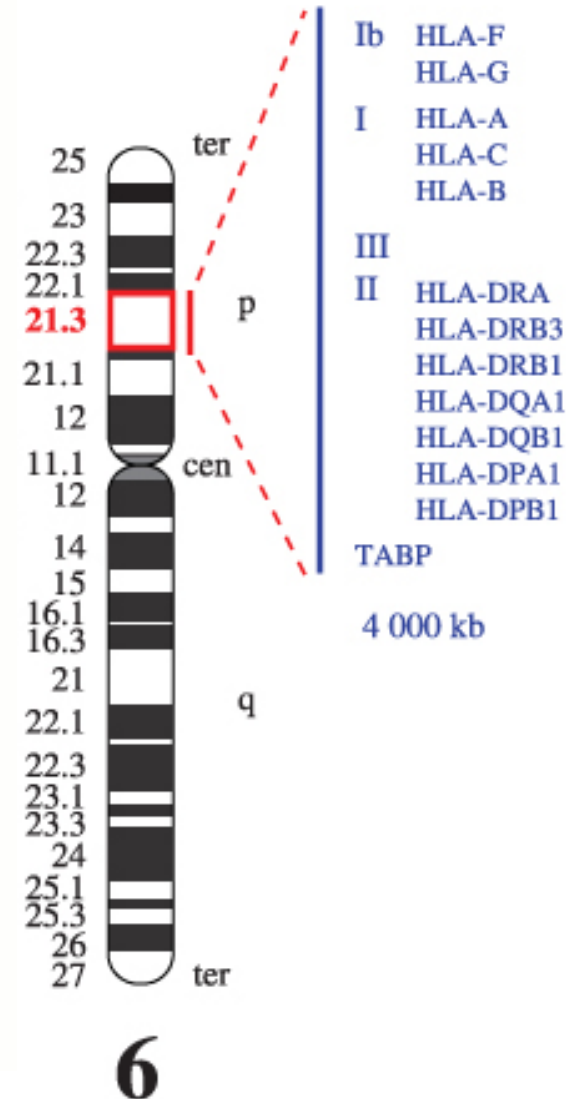
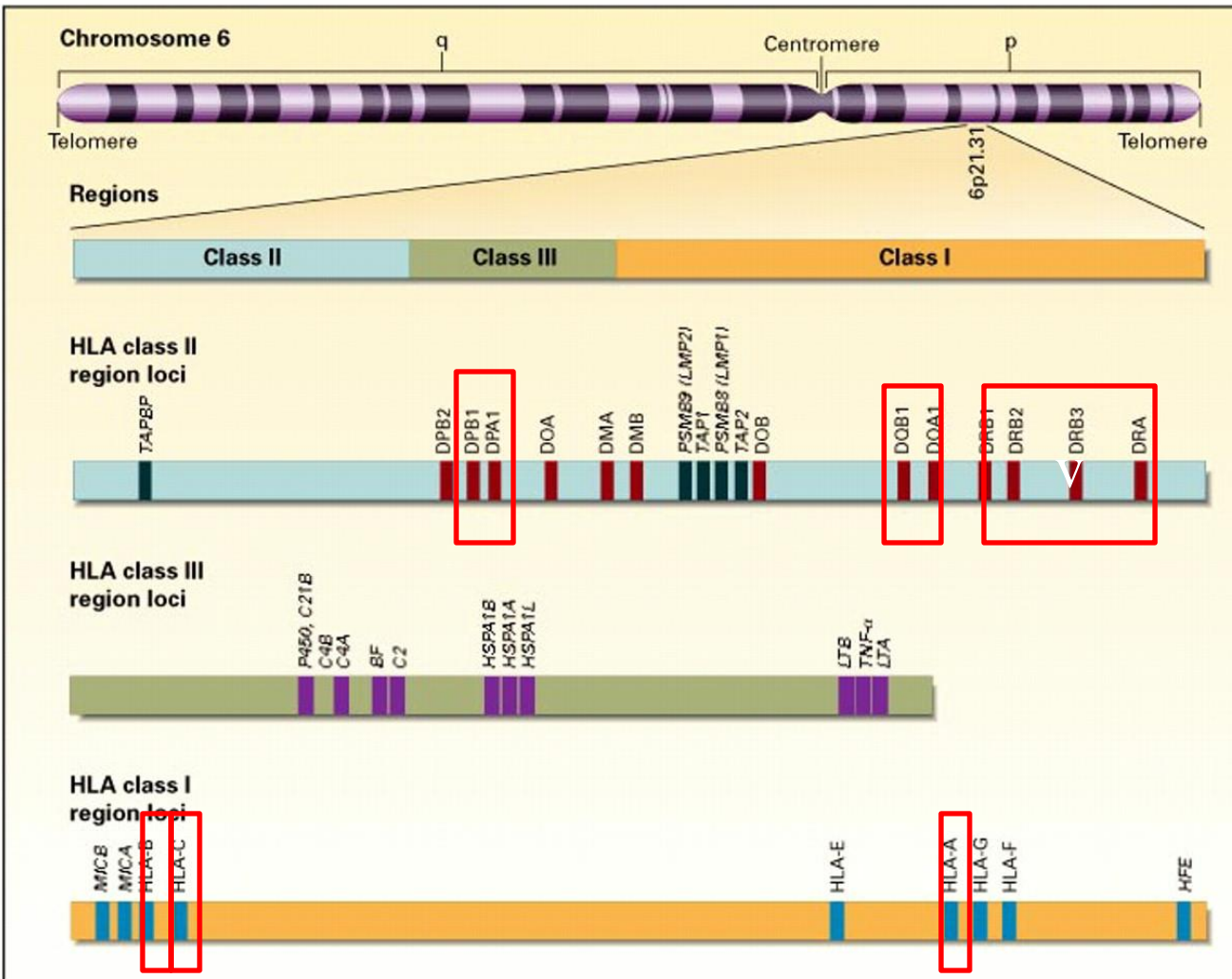


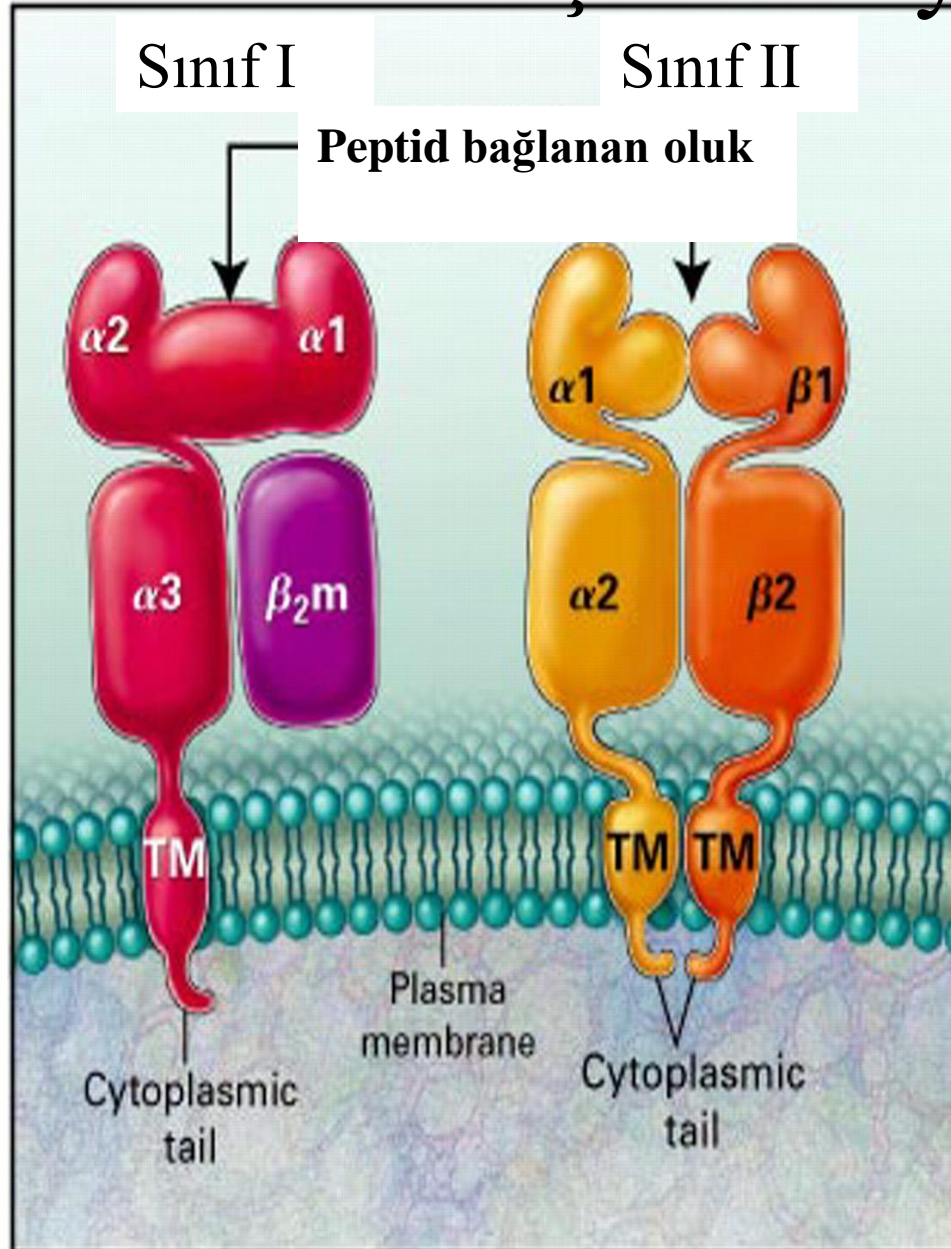
Doku uyumunu tanımlarken

- **HLA**, (**H**uman **L**eucocyte **A**ntigens, İnsan Lökosit Antijenleri) ve **MHC** (**M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex, Büyük Doku uyum antijenleri) terimlerinden yararlanılmaktadır
- Her ikisi aynı şey olmasalar da birbirlerinin yerine kullanılabilir

MHC gen bölgesi

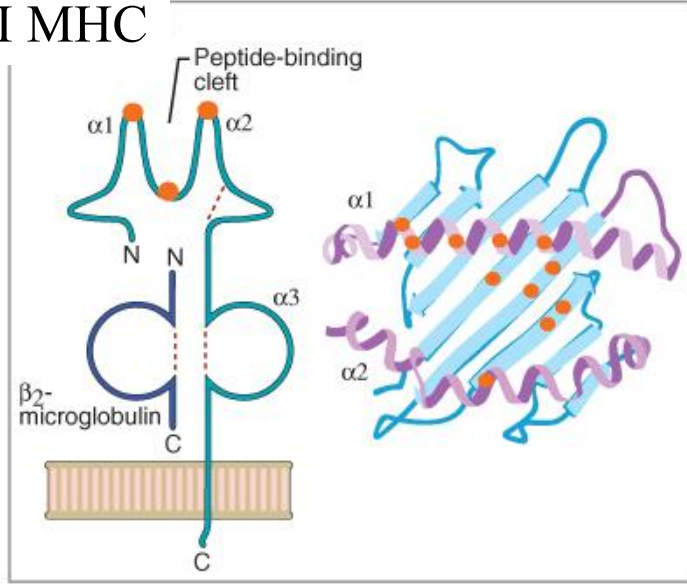


HLA molekülünün şematik yapısı



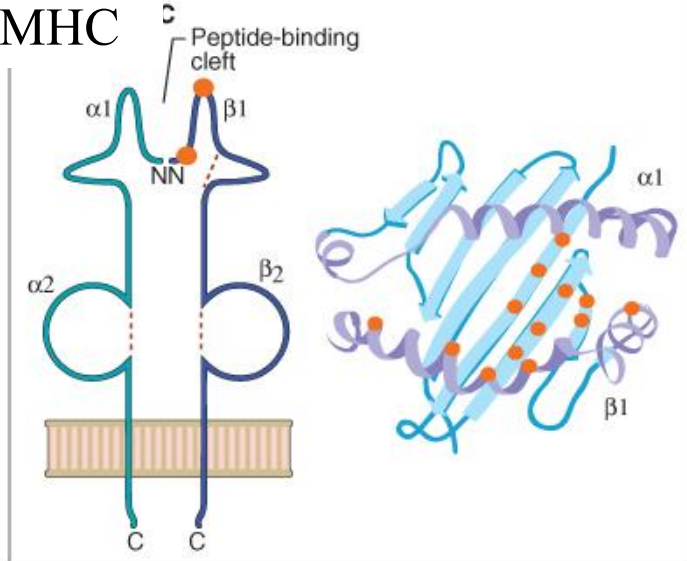
Sınıf I ve Sınıf II HLA(MHC) Molekülleri

Sınıf I MHC



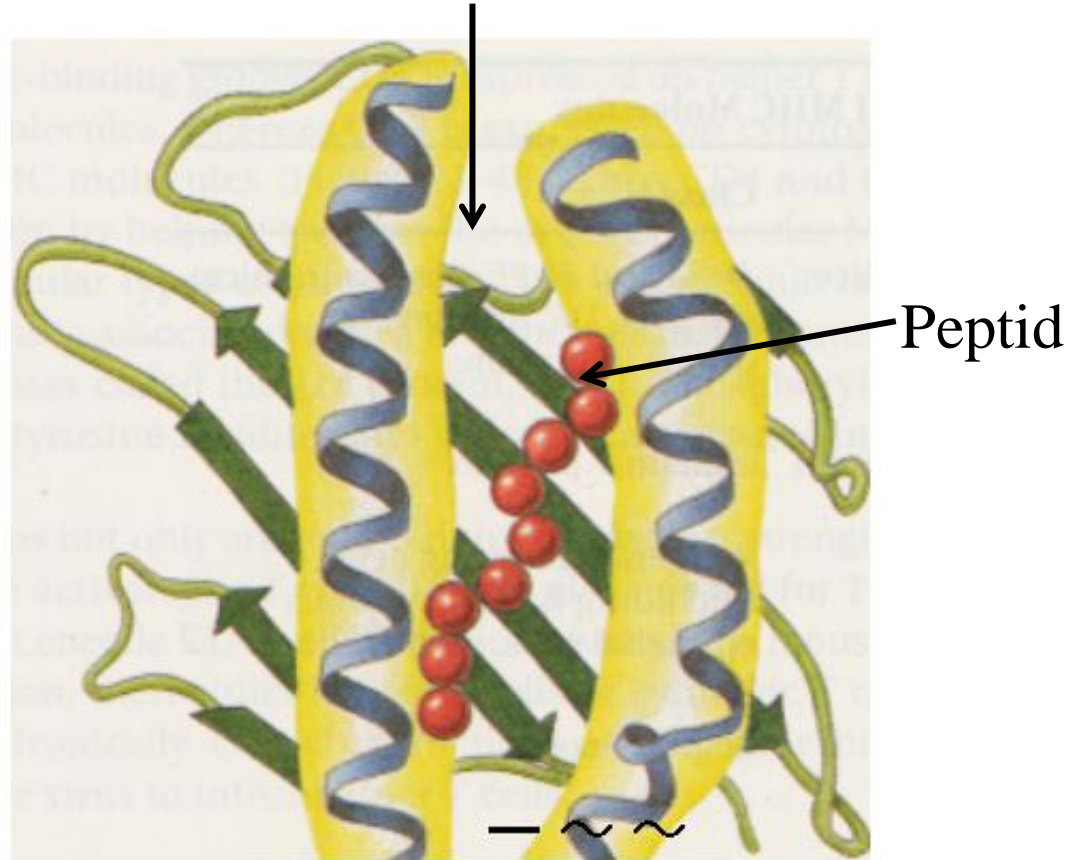
- Tüm çekirdekli hücrelerde bulunur
- Özellikle hücre içi kaynaklı peptidleri (~9-10 aa) CD8+ sitotoksik hücrelere sunar

Sınıf II MHC

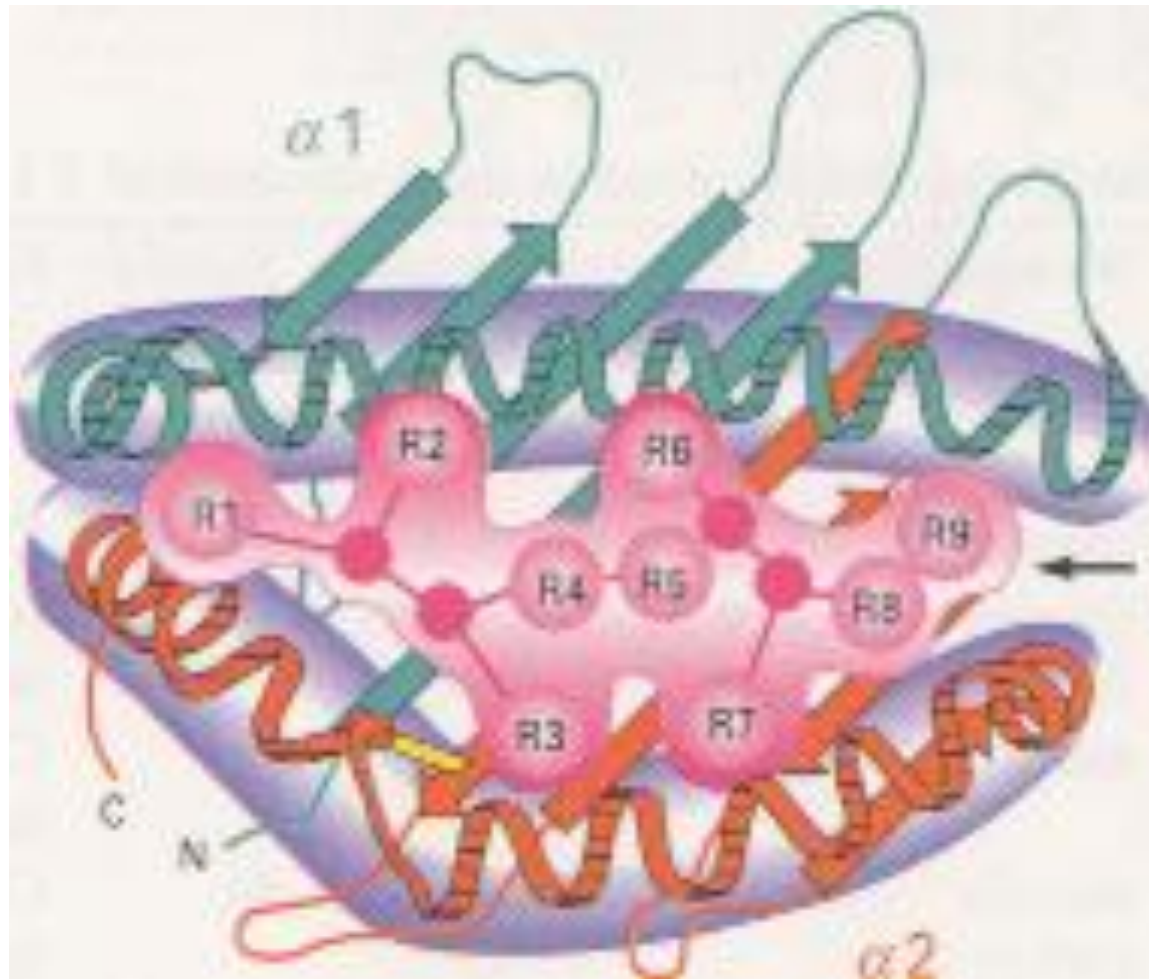


- Profesyonel olarak antijen sunan hücrelerde (APC) bulunur
- Hücre dışı proteinlerden kaynaklanan peptidlerin (~ 12-24aa) CD4+ hücrelere sunulmasında rol alır

PEPTİD BAĞLANAN KOVUK

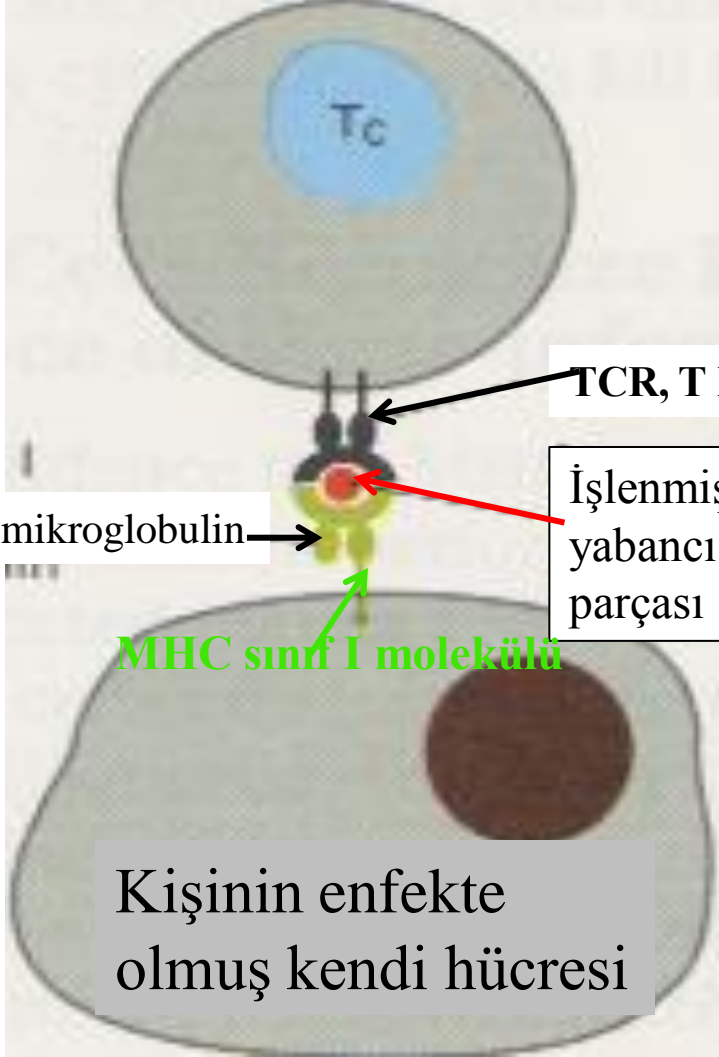


PEPTİD BAĞLANAN KOVUK

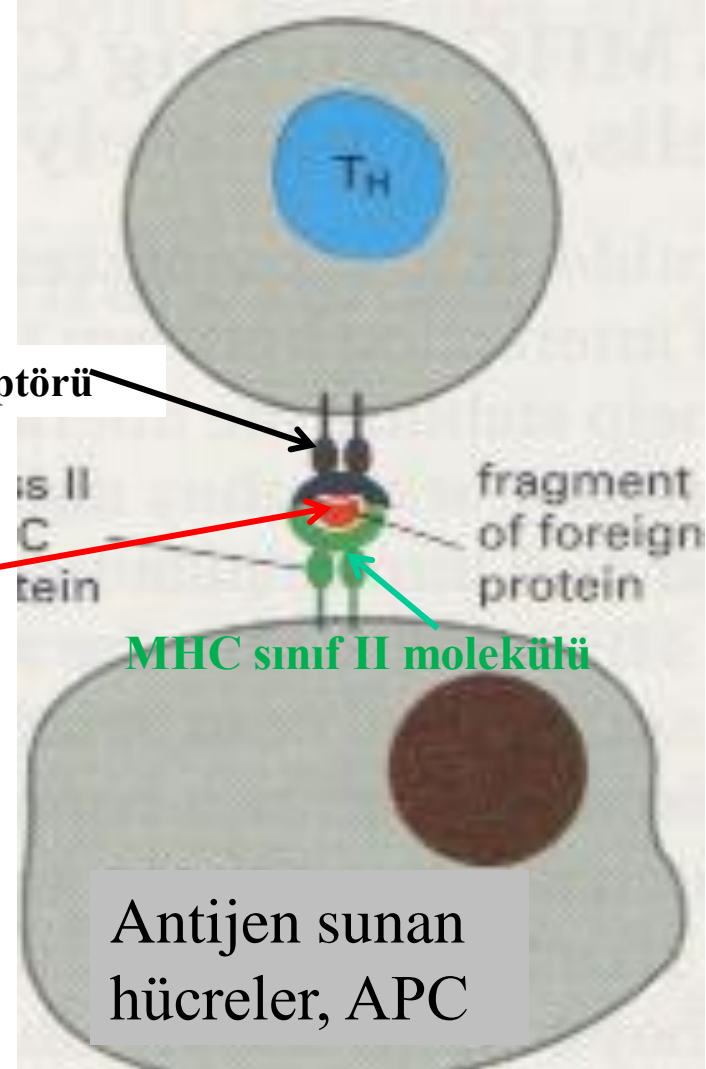


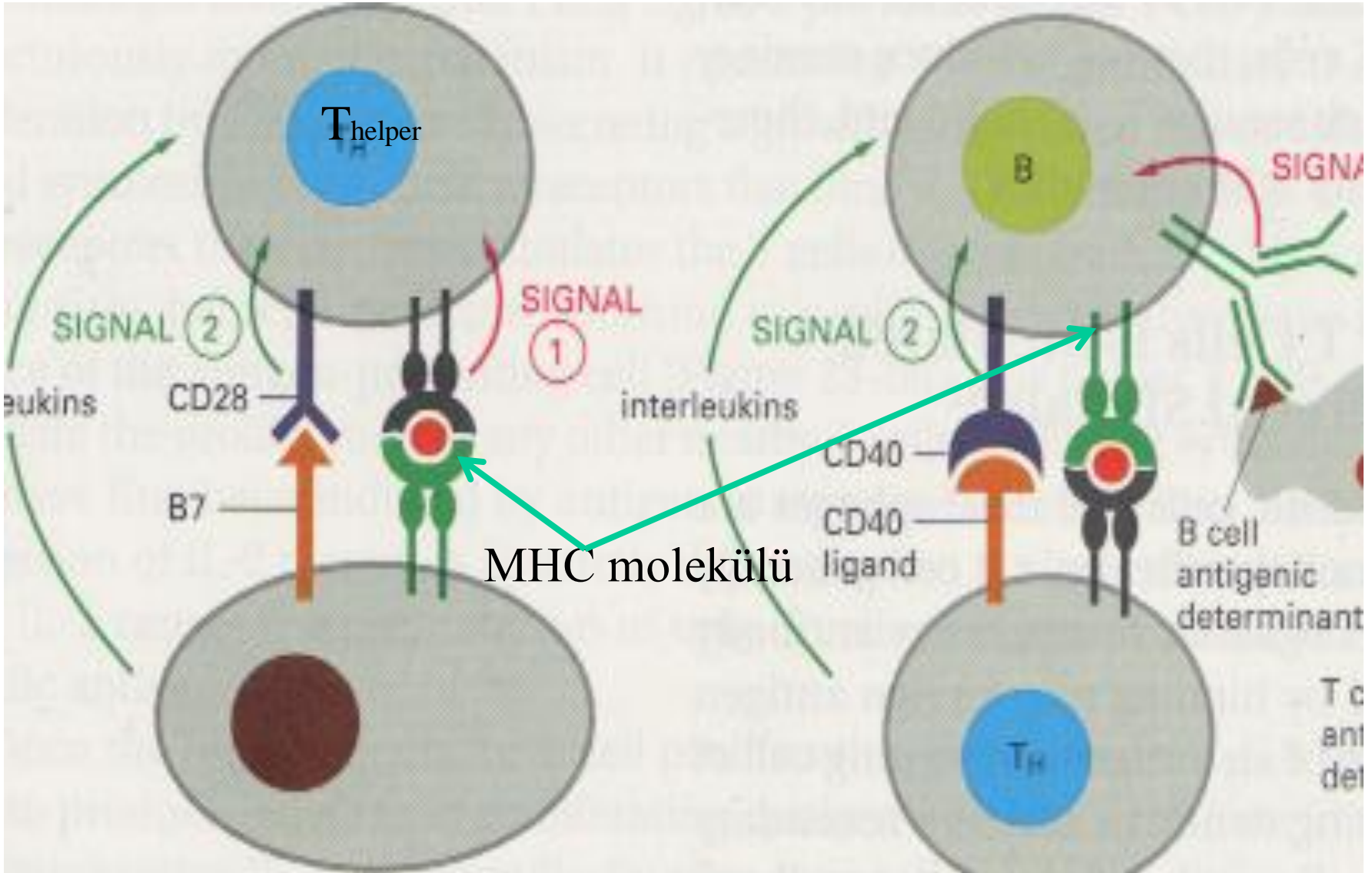
Peptid

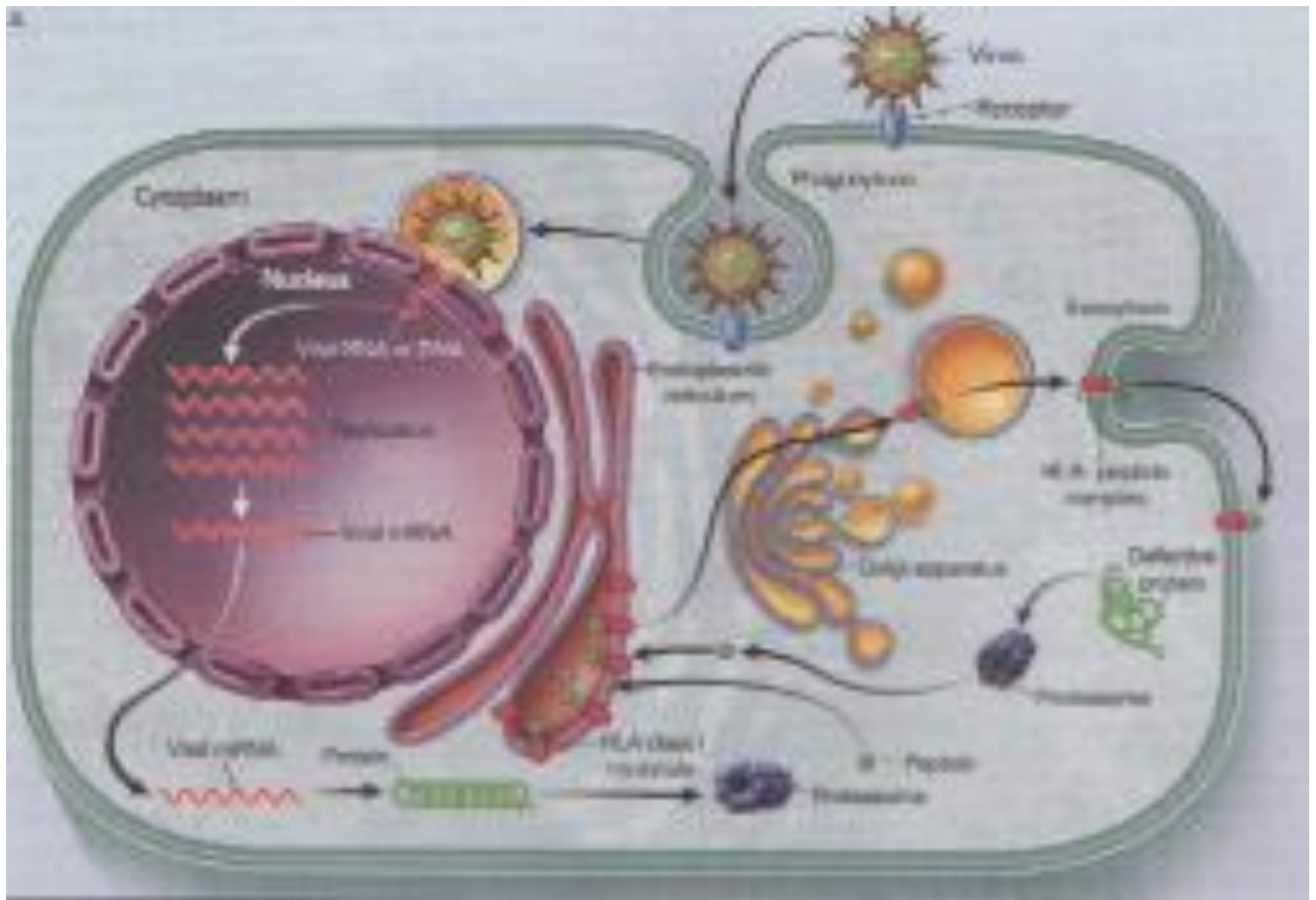
Sitotoksik T hücre CD8+

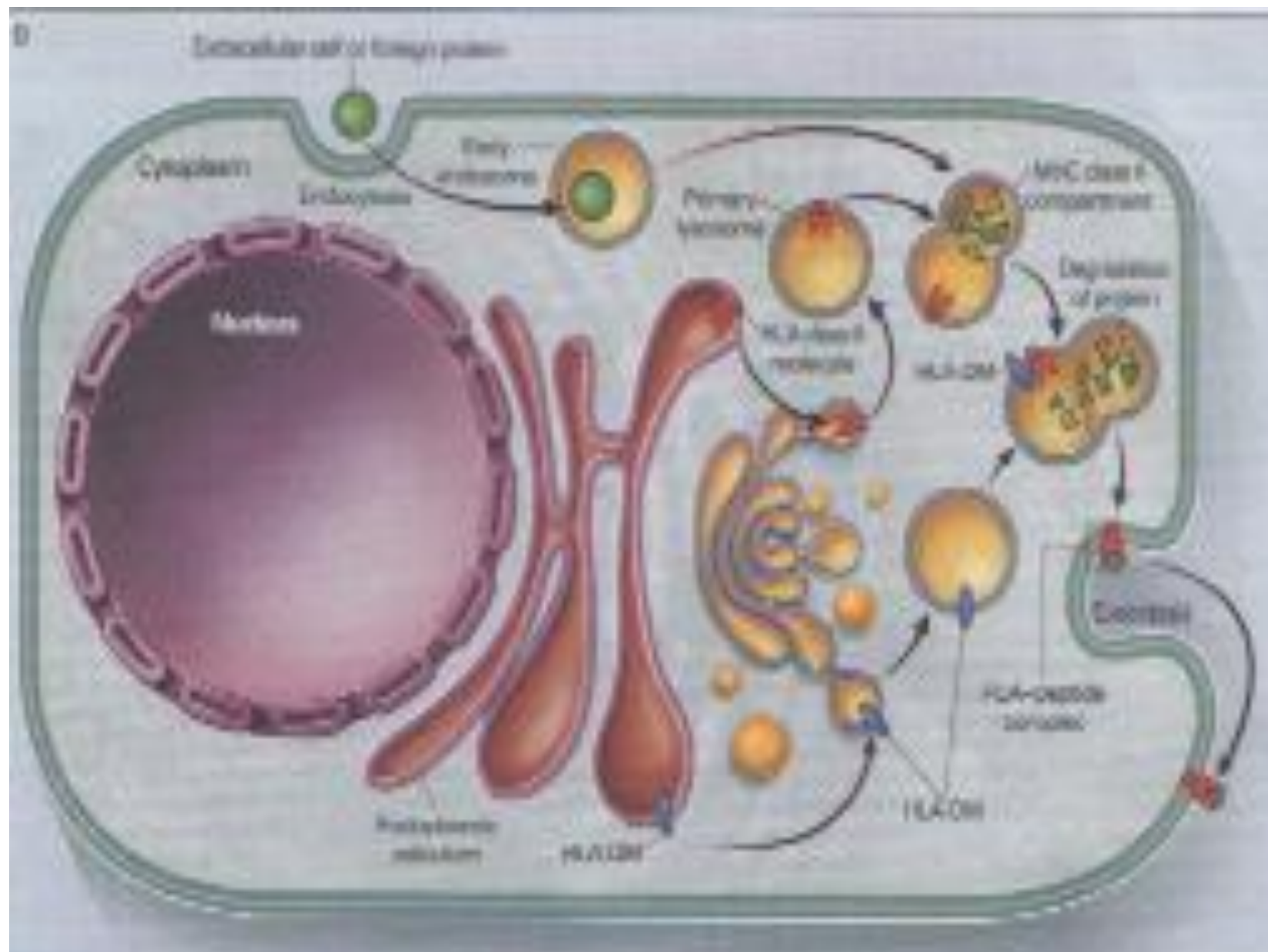


Helper T hücre, CD4+









	SINIF I Moleküller	SINIF II Moleküller
Genetik Lokuslar	HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-X, HLA-E, HLA-J, HLA-H, HLA-G, HLA-F	D, DP, DQ, DR
Zincir Yapısı	α zinciri + β 2Mikroglobin	α zinciri + β zinciri
Hücre Dağılımı	Çekirdekli hücrelerin tümü	Antijen sunan hücreler (B lenf, Aktif Monosit, Aktif T lenfosit, Dendritik hücreler..)
Antijen Sunduğu Hücreler	Sitotoksik T hücreleri (CD8)	Helper T hücreleri(CD4)
Peptid Fragmanlarının Kaynakları	Sitoplazmada sentezlenen proteinler	Plasma membranından endositozla alınanlar ve hücre dışından kaynaklanan proteinler
Polimorfik Domainleri	α 1 + α 2	α 1 + β 2

MHC Genleri: Kalıtım Özellikleri

MHC genleri Mendel kurallarına göre ve her bir ebeveynden gelen HLA-A,-B,-C,-DR,-DQ bölgelerini kapsayan **HAPLOTİPLER** olarak kalıtılır

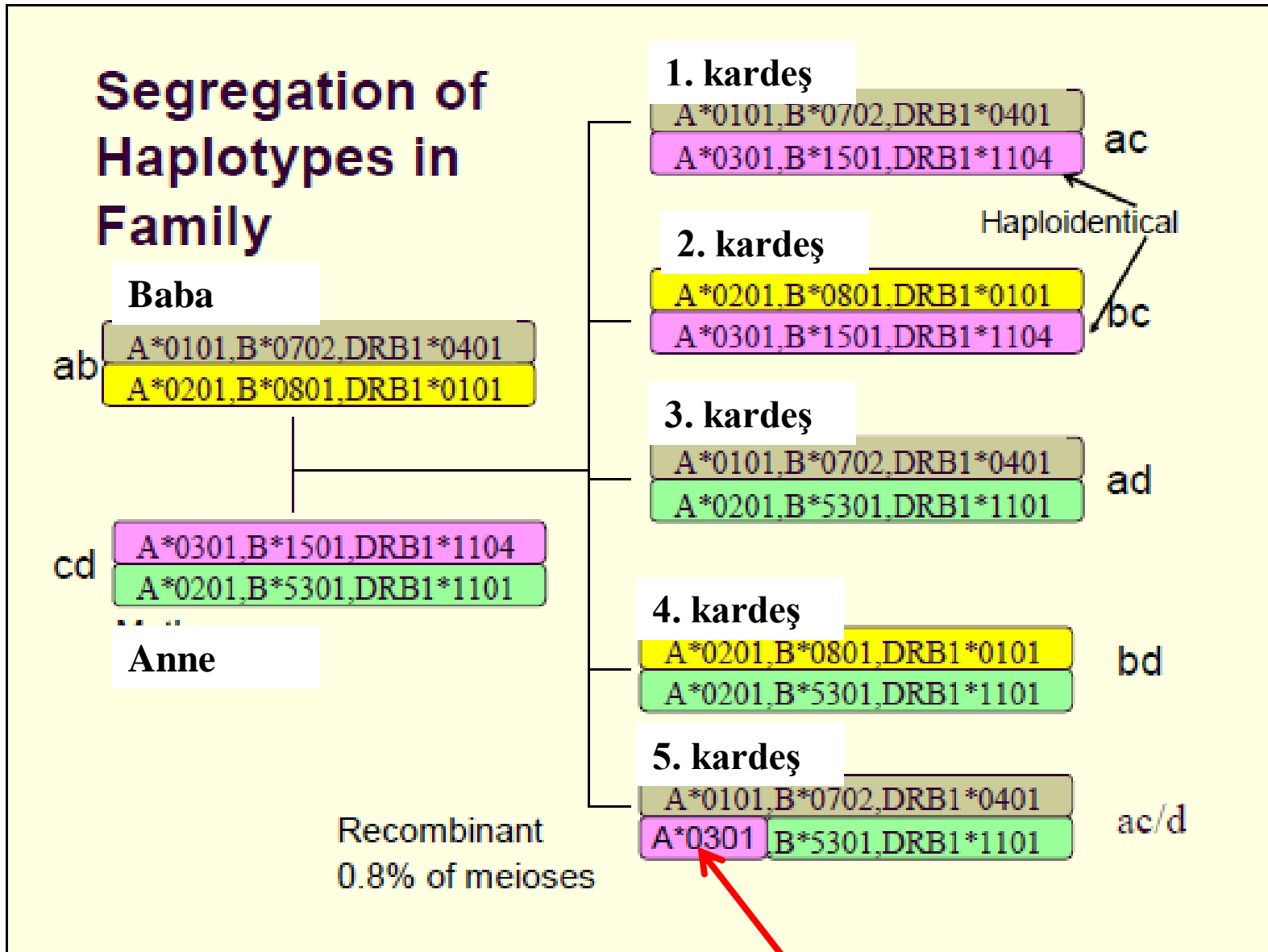
Buna göre HLA identik bir kardeş bulunma oranı %25

HLA sistemi içinde rekombinasyonlar görülebilir (~ %2)

Tüm kalıtılan antijenler hücre yüzeyinde birlikte (**ko-dominant**) ifade edilebilir

Bazı HLA antijenleri rastlantısal olmayan bir şekilde birbirleriyle daha sık bir arada bulunurlar (**Linkage Disequilibrium**)

Haplotipler ve bir Rekombinasyon Örneği



HLA nın test edilmesi 1950 lerde lam üzerinde yapılan aglutinasyon testleri ile başlayıp; moleküler çalışmaların çok öne geçtiği test çeşitliliği ve kullanım alanlarının da genişleyerek önemini arttırdığı günümüze kadar gelinmiştir

Klinik önemi

- Transplantasyon (organ/doku nakilleri)
 - Böbrek
 - Pankreas
 - Kalp
 - Karaciğer
 - Kornea
 - KEMİK İLİĞİ

Trombosit

Kan Transfüzyonları

Klinik önemi

- Hastalık çalışmaları
 - Aile çalışmaları
 - Hastalığı kontrol eden bir gen ile HLA lokusu arasında genetik bir bağlantı var mı? aileden kalıtılmış mı?
 - Popülasyon çalışmaları
 - Hastalık ile bir HLA antijeninin birlikte kalıtılması söz konusu mu?
 - Ör: Ankilozan Spondilit : B27
 - Behçet Hastalığı: B5

Kullanılan Teknikler

- **Serolojik**

Sitotoksite yöntemi kullanılarak
monoklonal, poliklonal antikorlar aracılığı ile

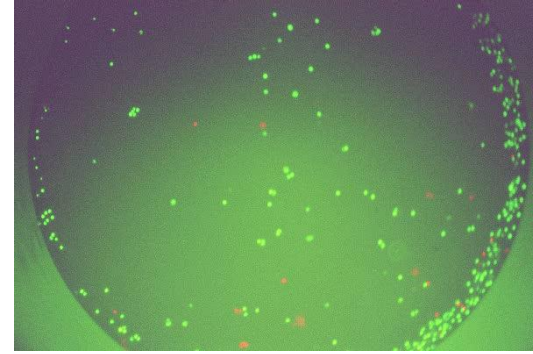
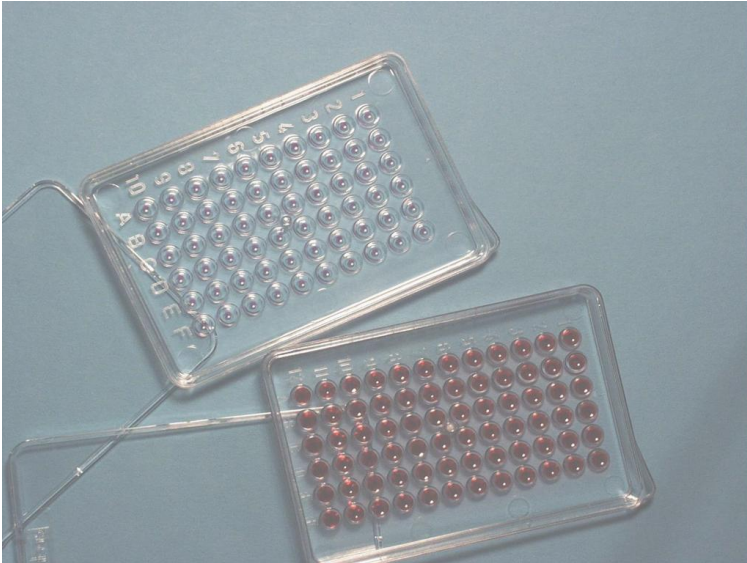
- **Moleküler**

- Sekansa özgü primerler ile (SSP)
- Sekansa özgü oligonukleotidler kullanarak(SSO)
- Sekans dizilimini tespit ederek (SBT)
-

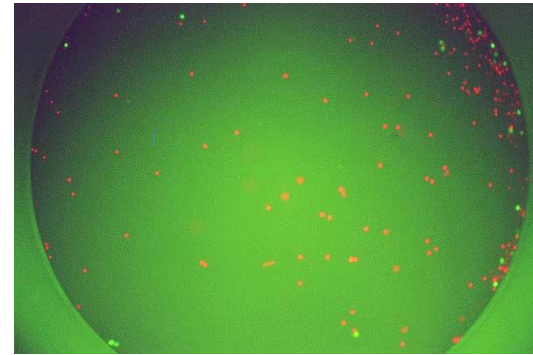
Serolojik Yöntem (Mikrositotoksite)

HLA Antijenleri, bilinen bir antikor paneli kullanılarak, komplemana bağlı sitotoksitenin ölçülmesi ile belirlenir

Antijen kaynağı olarak Saflaştırılmış T(Sınıf I için) ve B hücreler (Sınıf II için) kullanılır



(-)



(+)

Antikorlar; poliklonal (multipar kadınların serumu) ya da monoklonal olabilir

- Sitotosite testinde SKORLAMA sistemi

<u>Ölü hücre oranı</u>	<u>SKOR</u>	<u>Değerlendirme</u>
%0 - %10	1	Negatif
%11 - %20	2	Olası negatif
%21 - %50	4	Zayıf pozitif
%51 - %80	6	Pozitif
%81 - %100	8	Kuvvetli pozitif
	0	Değerlendirme dışı

Örnek 1a

A32, -
B 52, 27, 49 ?????

Worksheet – Lymphotype HLA-AB 144/1

2 x 72 WELL TRAY WITH PRE-DROPPED ANTI-HLA-ABC REAGENTS

For use in the microlymphocytotoxicity test (see directions) – Subject to change

Last Name A32, A^{3?}, B5-2, B27, B49, 10thuler B ile dogruklumun First Name NU Born _____ Specimen No. _____ Complement Lot No. 1120902

Result _____ Test Date 18.12.2003 By _____

ROW	■ 1 →						■ 2 →						■ 3 →						■ 4 →						■ 5 →						■ 6 →						
COLUMN	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	
REACTION	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HLA-ABC SPECIFICITY	Neg. Ctrl.	Pos. Ctrl.	A1	A1	A1 36	A1 36 80	A2	A2	A2 69	A2 69	A3	A3	A3	A23	A23	A24	A24 2403	A23 24 80	A25	A25	A26	A26 66 66 6602	A26 43 66 6602	A66 11 6602	A34	A34	A25 26 34 66 43	A11	A11	A11	A68 69	A68 69	A68 69 2	A29 43	A29 43		
ID-NUMBER	1110901	1110701	6617	6668	2620	2467	6575	6757	6656	6541	2807	6619	2838	6050	6684	1084	6884	6412	6435	5073	2682	6719	6675	1928	2152	2705	6729	6620	6621	6164	6769	6638	6599	2408	6312	2430	
ROW	■ 7 →						■ 8 →						■ 9 →						■ 10 →						■ 11 →						■ 12 →						
COLUMN	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	
REACTION	-	-	-	-	8	8	-	-	-	8	8	-	-	-	-	8	8	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HLA-ABC SPECIFICITY	A30	A31	A30 31	A30 31	A32 wk25	A32 wk25	A33 34	A33 68 69 wk11	A33 68 33 43 wk29	A74 31 33 10 3 11 wk34	A74 32 36 11	A74 31 33 11 wk34	B51	B51	B52 49	B52 37 47 wk18 wk39	B51 52 52 78	B7	B7 31	B7 81 2708	B7 73 81	B8	B8 89	B44	B44	B45 75	B45 45	B44	B13	B13	B64 wk8	B65	B64 65	B6 6			
ID-NUMBER	6597	2516	6281	6884	2485	6635	6518	2780	6742	6834	2837	2838	6171	6623	6794	2837	6763	6646	6532	6594	6651	6200	6267	6085	6112	6607	6721	6314	6351	6764	6707	5072	2942	6216	1628	6649	

A32

B52

Specificities and splits:

A9 (23, 24, 2403)

B6 (51, 52)

B17 (57, 58)

B67 = B39 creg

Codes:

A1 = anti-HLA-A1

Caution:

HLA cross reactions

Art. No.: 823 070

A	B		C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	B49(21)	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B50(21)	Cw2	Dw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	B51(5)	Cw3	Dw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	B5102	Cw4	Dw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	B5103	Cw5	Dw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B52(5)	Cw6	Dw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B53	Cw7	Dw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	B54(22)	Cw8	Dw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	B55(22)	Cw9(w3)	Dw9	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B56(22)	Cw10(w3)	Dw10	DR9		
A24(9)	B18	B57(17)		Dw11(w7)	DR10		
A2403	B21	B58(17)		Dw12	DR11(5)		
A25(10)	B22	B59		Dw13	DR12(5)		
A26(10)	B27	B60(40)	W?	Dw14	DR13(6)		
A28	B2708	B61(40)		Dw15	DR14(6)		
A29(19)	B35	B62(15)		Dw16	DR1403		
A30(19)	B37	B63(15)		Dw17(w7)	DR1404	Sınıf I-II Antijenler	
A31(19)	B38(16)	B64(14)		Dw18(w6)	DR15(2)		
A32(19)	B39(16)	B65(14)		Dw19(w6)	DR16(2)		
A33(19)	B3901	B67		Dw20	DR17(3)		
A34(10)	B3902	B70		Dw21	DR18(3)		
A36	B40	B71(70)		Dw22			
A43	B4005	B72(70)		Dw23	DR51		
A66(10)	B41	B73		Dw24	DR52		
A68(28)	B42	B75(15)		Dw25	DR53		
A69(28)	B44(12)	B76(15)		Dw26			
A74(19)	B45(12)	B77(15)					
A80	B46	B78					
	B47	B81					
	B48	Bw4, Bw6					

Avantaj, Dezavantajları

Düşük çözünürlükte bir tiplendirme mümkün

Yeterli sayıda canlı hücre gereksinimi var

Kullanılan antikörlerin, komplemanın kalitesi önemli

standardizasyon zor olabilir

Çapraz reaksiyonlar sorun yaratabilir

Hücre yüzeyinde ifade edilmeyen (“Null”) bir allelik varyatın tesbitinde yardımcı olur

Moleküler Yöntemler

SBT



Tüm sekans



HLA allelinin tam fotoğrafı

DNA ile Tipleme



SSOP

SSP



Sekans fragmanları



Fotoğraftaki
parçalardan seçmeler



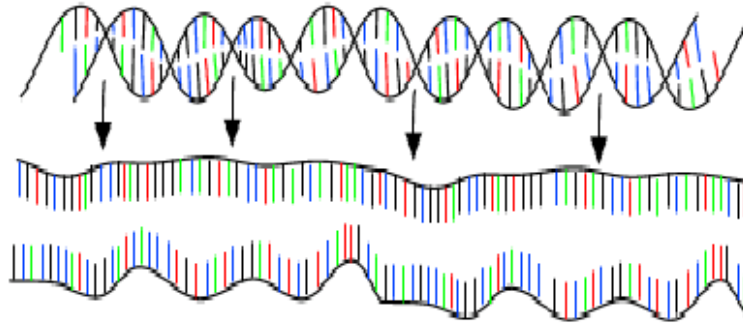
Rutin çalışmalarda
yaygın olarak kullanılıyor

PCR-SSP

(Sekansa Spesifik Primerler)

- Özgünlüğü sağlayan seçilen primerlerle yapılan çoğaltma işlemidir. Grup/allele özgün primerler kullanılır
- Polimorfik olmayan bir gen, kontrol olarak kullanılıyor
- Elektroforez işlemi takiben görüntü alınıyor
- Çeşitli yazılımlar aracılığı ile değerlendiriliyor (Ör: SCORE)
- Daha zahmetli , otomasyon zor
- Fazla miktarda DNA kullanımı gerekiyor

30 - 40 cycles of 3 steps :



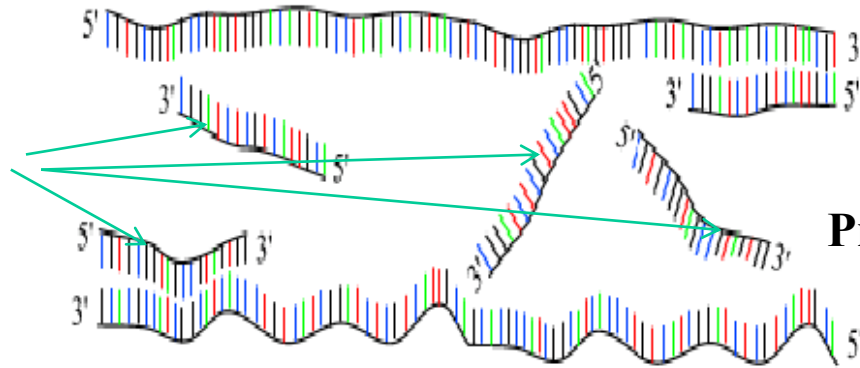
Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C

DENATURASYON

Tek sarmal DNA eldesi

PCR



primer

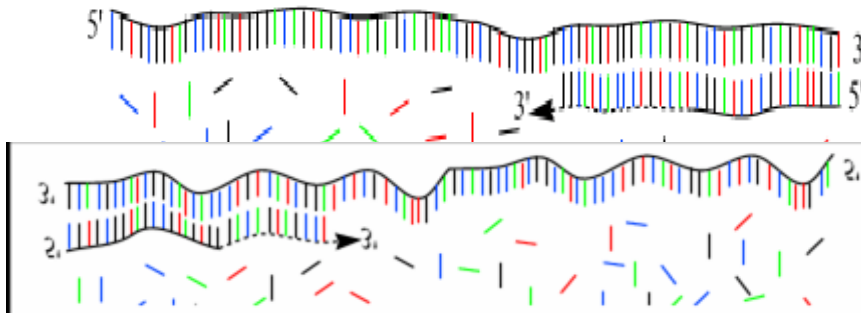
Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

ANNEALING

Probu tek sarmal DNA ya yapışması

forward and reverse primers !!!



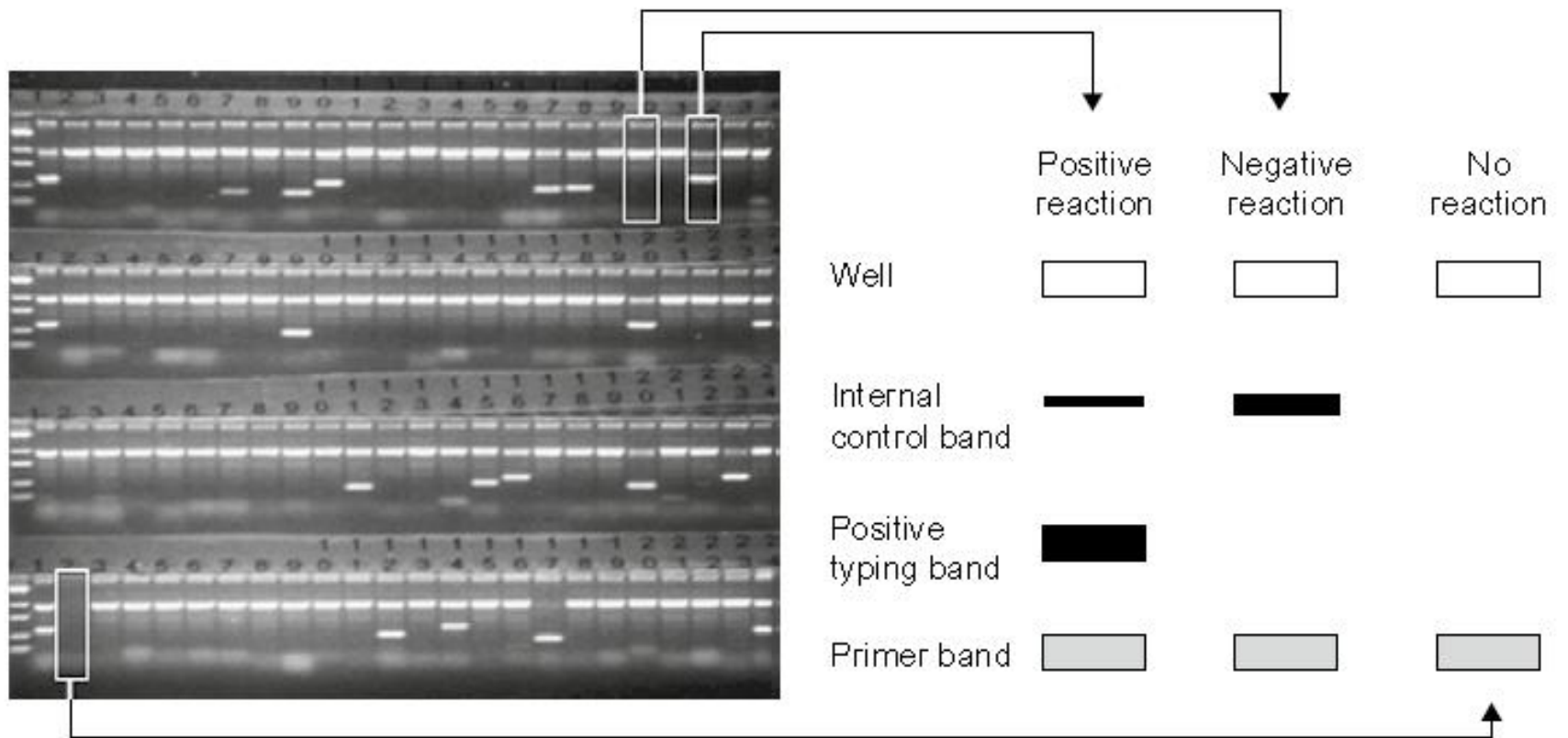
Step 3 : extension

Polimeraz aracılığı ile

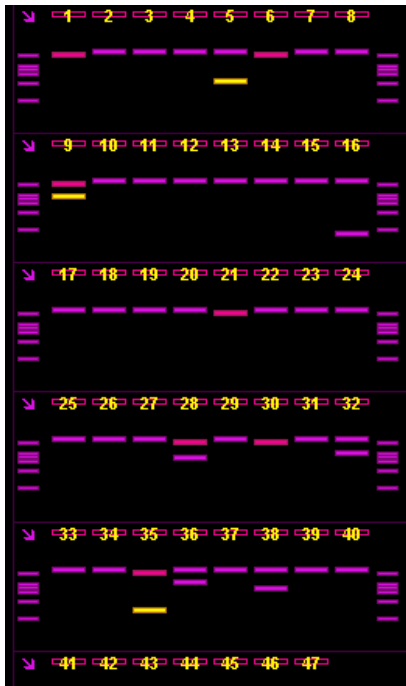
Nukleotidler ile zincirin uzatılması

5 minutes 72 °C

EXTENSION



Örnek: Moleküler HLA B çalışması, “SCORE” Yazılımı ile analizi



HLA-B

(approval pending)

summarised typing interpretation: B*27 - B*52 (tolerance 0)

Tested SSO/SSP Kits:

HLA-B low resolution/K73

- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------------------------------------|----|--------------------------|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|--------------------------|----|-------------------------------------|
| 1 | <input type="checkbox"/> | 2 | <input type="checkbox"/> | 3 | <input type="checkbox"/> | 4 | <input type="checkbox"/> | 5 | <input checked="" type="checkbox"/> | 6 | <input type="checkbox"/> | 7 | <input type="checkbox"/> | 8 | <input type="checkbox"/> |
| 9 | <input checked="" type="checkbox"/> | 10 | <input type="checkbox"/> | 11 | <input type="checkbox"/> | 12 | <input type="checkbox"/> | 13 | <input type="checkbox"/> | 14 | <input type="checkbox"/> | 15 | <input type="checkbox"/> | 16 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 17 | <input type="checkbox"/> | 18 | <input type="checkbox"/> | 19 | <input type="checkbox"/> | 20 | <input type="checkbox"/> | 21 | <input type="checkbox"/> | 22 | <input type="checkbox"/> | 23 | <input type="checkbox"/> | 24 | <input type="checkbox"/> |
| 25 | <input type="checkbox"/> | 26 | <input type="checkbox"/> | 27 | <input type="checkbox"/> | 28 | <input checked="" type="checkbox"/> | 29 | <input type="checkbox"/> | 30 | <input type="checkbox"/> | 31 | <input type="checkbox"/> | 32 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 33 | <input type="checkbox"/> | 34 | <input type="checkbox"/> | 35 | <input checked="" type="checkbox"/> | 36 | <input checked="" type="checkbox"/> | 37 | <input type="checkbox"/> | 38 | <input checked="" type="checkbox"/> | 39 | <input type="checkbox"/> | 40 | <input type="checkbox"/> |
| 41 | <input type="checkbox"/> | 42 | <input type="checkbox"/> | 43 | <input type="checkbox"/> | 44 | <input type="checkbox"/> | 45 | <input type="checkbox"/> | 46 | <input checked="" type="checkbox"/> | 47 | <input type="checkbox"/> | | |

entered: 15/01/20

modified: 15/01/20

0)

01/2

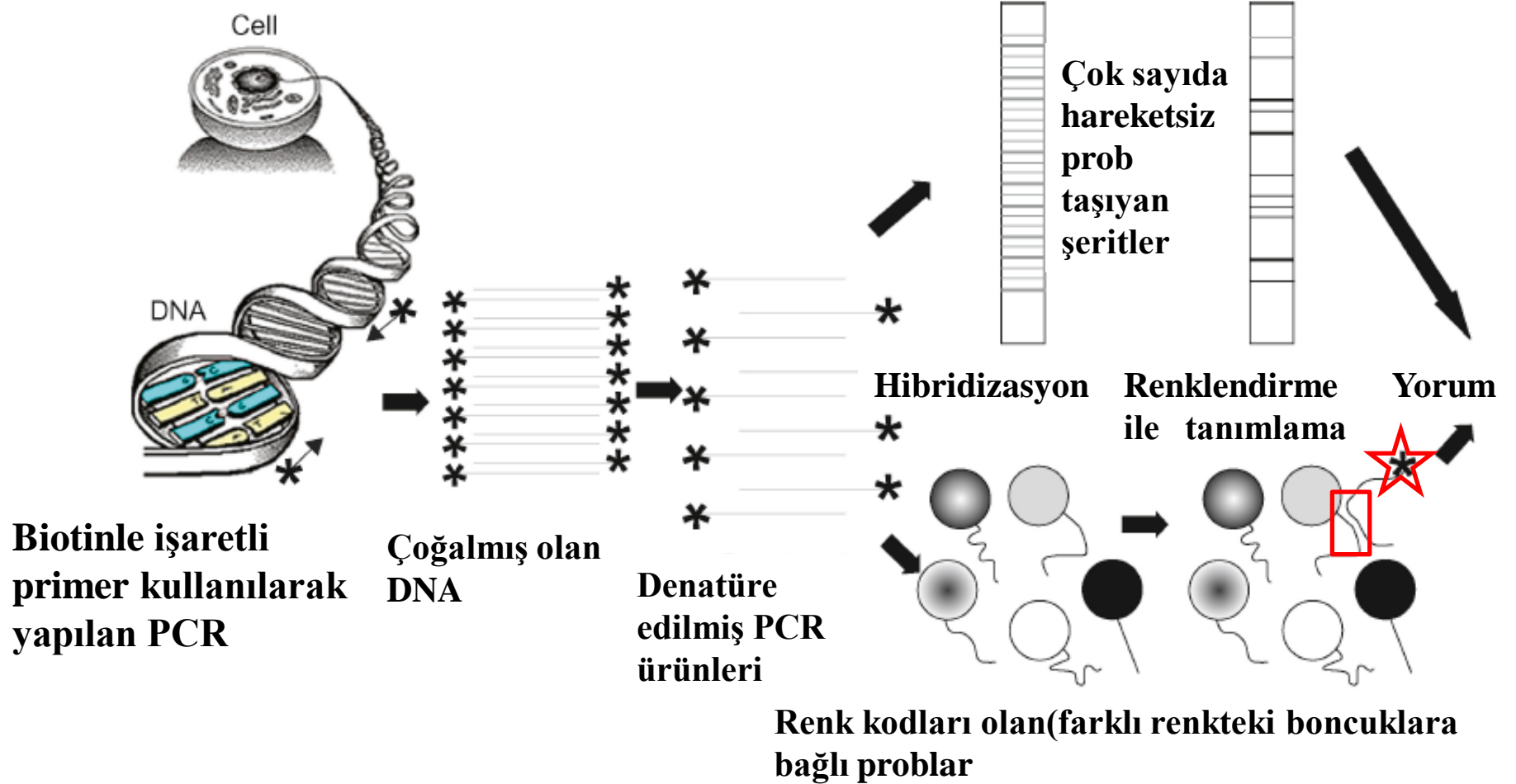
01/2

PCR SSOP

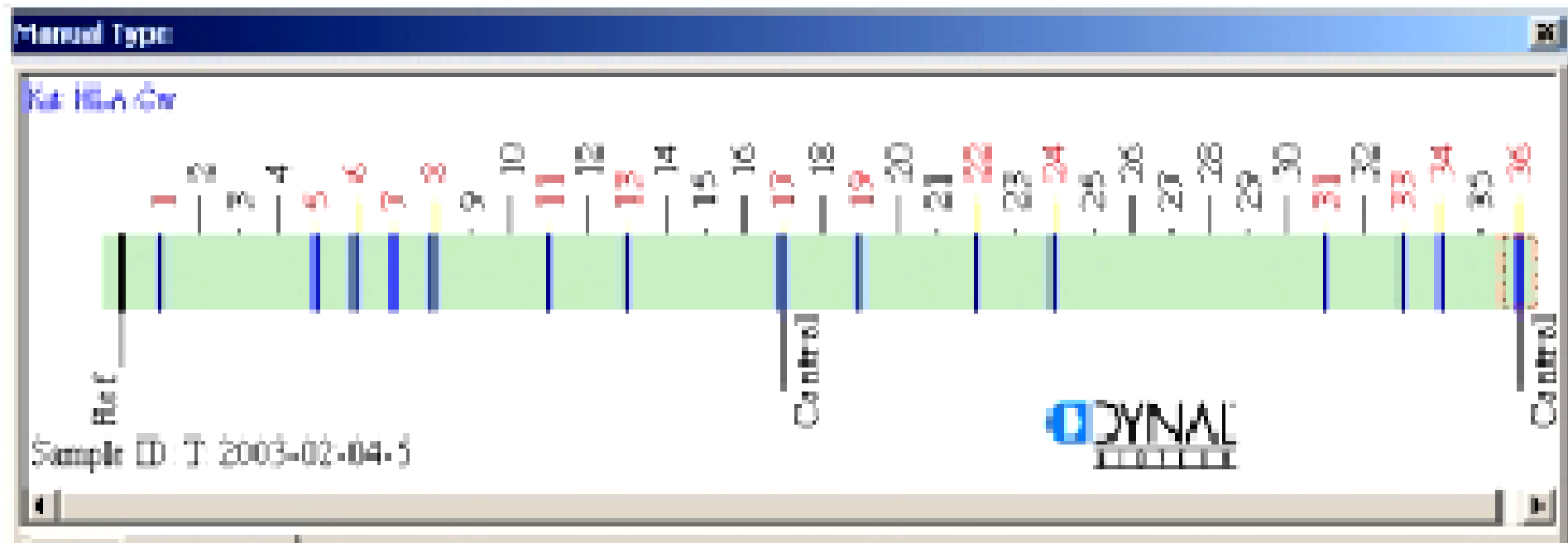
(Sekansa Spesifik Oligonukleotid Problar)

- Özgünlüğü sağlayan Amplifikasyonu takiben kullanılan hibridizasyon problarıdır. Amplifikasyonda ise Lokusa veya gruba özgün primerler kullanılır.
- PCR ile çoğaltılan ürün(forward) veya Problar(reverse) katı bir taşıyıcı ortamda(naylon/nitrosellüloz membranlar, boncuklar) tutulur.
- Hibridizasyon işlemini takiben oluşan Ürün –Prob kompleksi görüntülenir (Enzim aracılığı ile renklendirme, floresan ile işaretleme...)
- Aynı anda çok sayıda örnek çalışılabilir
- Gerekli DNA miktarı nisbeten azdır

PCR SSOP



SSO sonuç örneği



Dizilim (Sekans) Analizi ile HLA Tiplendirimi

Sekansa Bağlı Tiplendirme,
(SBT)

SBT Yönteminin Basamakları

DNA İzolasyonu



PCR Amplifikasyonu



PCR Ürününün Temizlenmesi



Sekanslama Reaksiyonu (PCR)



Ürünün saflaştırılması



Ürünlerin Cihaza Yüklenmesi, elektroforez

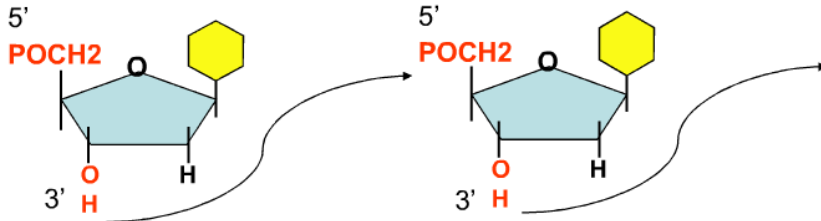


ANALİZ

dNTP ve ddNTP Farkı

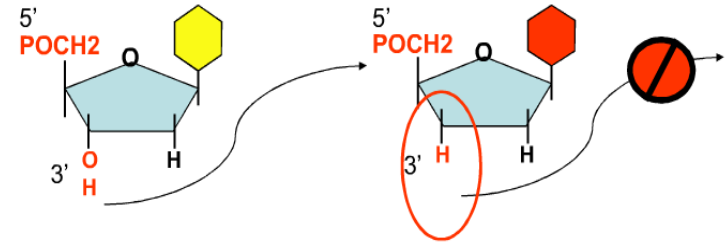
DNA zincirinin uzar

DNA zincirinin uzaması sona erer



Deoxynucleotide - **dNTP**

Deoxynucleotide - **dNTP**



Deoxynucleotide - **dNTP**

Dideoxynucleotide - **ddNTP**
Chain Terminator

The elongation of DNA chain terminated by incorporation of a dideoxynucleotide

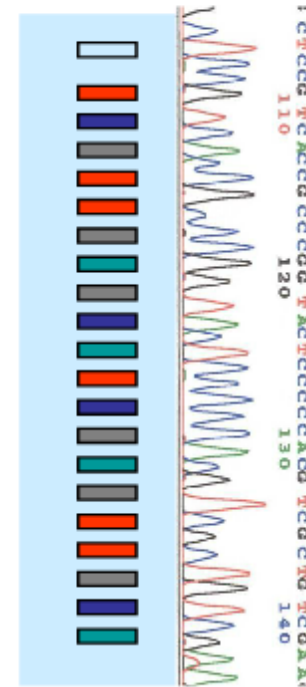
Sekanslama Reaksiyonu

SBT with Dye-Terminator Chemistry

Aynı anda dört farklı renk kullanarak her baz tanımlanabiliyor



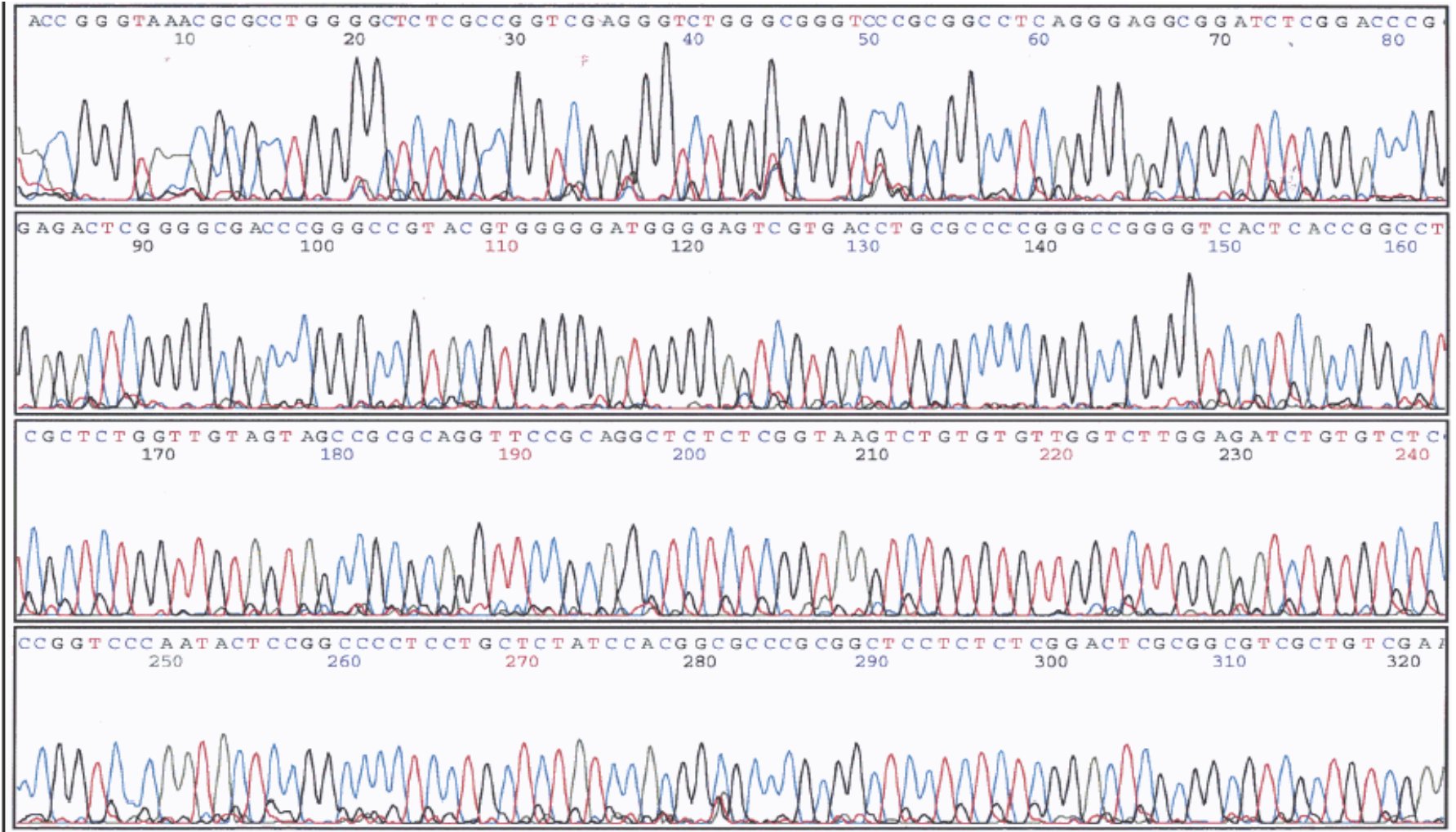
---ACGCTAGATGAACGTTGAGCTAC---
ACGCTAGATGAA*
ACGCTAGATGAAC*
ACGCTAGATGAACG*
ACGCTAGATGAACGT*
ACGCTAGATGAACGTT*
ACGCTAGATGAACGTTG*
ACGCTAGATGAACGTTGA*
ACGCTAGATGAACGTTGAG*
ACGCTAGATGAACGTTGAGC*
ACGCTAGATGAACGTTGAGCT*
ACGCTAGATGAACGTTGAGCTA*
ACGCTAGATGAACGTTGAGCTAC---



Gerekli
bazlar

dATP, dCTP, dGTP, dTTP; **ddATP***, **ddCTP***, **ddGTP***, **ddTTP***

SBT sonuç örneği



Moleküler Teknikler

Avantajları

- Özgün, esnek
- İstenen duyarlılıkta çalışma imkanı var,
- Yeni aleller tanımlandıkça yeni reaktifler geliştirilebiliyor,
- Serolojik olarak tanımlanamayan aleller tanınabilir
- Canlı hücre gerektirmiyor
- Hastalık / tedavi durumundan etkilenmiyor
- Otomasyona uygun
- Çok sayıda örnek eş zamanlı çalışılabilir