

ÇAĞLA YAVUZ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2019

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**HLA-DR53 HAPLOTİPLERİNDEKİ PRKRAP1
PSÖDOGENİNİN AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ İLE
İLİŞKİSİ**

ÇAĞLA YAVUZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. FATMA SAVRAN OĞUZ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans öğrencisi **Çağla YAVUZ** tarafından Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ'un danışmanlığında hazırlanan "HLA-DR53 HAPLOTİPLERİNDEKİ PRKRAP1 PSÖDOGENİNİN AKUT LENFEBLASTİK LÖSEMİ İLE İLİŞKİSİ" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 26/06/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı-Danışman
Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri
Prof. Dr. Nevin YALMAN
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri
Prof. Dr. Filiz AYDIN
Bilim Üniversite Tıp Fakülte
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri
Doç. Dr. Çiğdem KEKİK ÇINAR
İstanbul Üniversite, İstanbul Tıp Fakülte
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri
Doç. Dr. Kürşat ÖZDİLLİ
Medipol Üniversite Tıp Fakülte
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ÇAĞLA YAVUZ (İmza)

C. Yavuz

İTHAF

Canım Ağabeyime ithaf ediyorum...



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamız sırasında değerli bilgi, deneyimleri ve hoşgörüsü ile bana her konuda destek olan, çalışmamızın en iyi şartlarda tamamlanabilmesi için tüm imkan ve olanakları sağlayan ve öğrencisi olduğum için her zaman kendimi şanslı hissettiğim kıymetli danışmanım Tıbbi Biyoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ'a, akademik hayata başlama ve akademik hayat serüveninde hissettirdiği inanç ve güven duygusu ile yoluma daha emin adımlarla devam ettiğim ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Prof. Dr. Filiz AYDIN'a, tez çalışmam sürecinde her konuda desteğini esirgemeyen ve her koşulda yanımda olan Prof. Dr. Sacide PEHLİVAN'a, fikir ve deneyimleri ile yardımlarını ve desteğini hiç esirgemeyen, tez çalışmamıza çok büyük katkıları olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Tevfik DORAK'a, akademik hayatımda daha emin adımlarla ilerlememi sağlayan, tezimin her aşamasında deneylerim ve örneklerim için beni yönlendiren çok sevdiğim kıymetli hocam Doç. Dr. Çiğdem KEKİK ÇINAR'a, sonuçlarımızın istatistiki değerlendirmelerinde çok büyük destek sağlayan, güler yüzü ve enerjisi ile hep yanımda olan Dr. Hayriye ŞENTÜRK ÇİFTÇİ'ye, tez çalışmamın düzen kısmında desteğini hiç esirgemeyen sevgili arkadaşım Demet KIVANÇ'a, tez çalışmamın örnek toplama aşamasında çok büyük katkıları olan Ferhat TAYLAN'a, veri toplama aşamasında güler yüzleri ve ilgileri ile benden desteklerini hiç esirgemeyen fakültemizin Kemik İliği Bankası çalışanlarına, her koşulda her zaman kendimi hep güvende hissetmemi sağlayan, beni hiç yalnız bırakmayan Tıbbi Biyoloji ABD ailesine teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23378

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akut Lenfoblastik Lösemi	3
2.1.1. ALL Hastalık Tablosu ve Görülme Sıklığı	3
2.1.2. ALL Hastalığının Sebepleri ve Belirtileri	3
2.1.3. ALL Hastalık Tanısı.....	5
2.1.4. ALL Hastalık Tedavisi.....	6
2.2. İnsan Büyük Doku Uygunluk Kompleksi.....	7
2.2.1. İnsan Büyük Doku Uygunluk Kompleksi Antijenlerinin Özellikleri	7
2.2.2. MHC Moleküllerinin Kanserdeki Rolü.....	8
2.3. HLA Nomenklatür	8
2.4. HLA-DRB4 (HLA-DR53) Haplotipleri.....	10
2.5. HLA DRB4 (HLA-DR53) Haplotip Belirteci rs2395185.....	13
2.6. İnterferon İndükleyici Çift Zincirli RNA Bağlayan Protein Kinaz A, PRKRA	14
2.6.1. HLA Kompleksi DR Alt Bölgesinde Çift Zincirli RNA Bağlayan Gen Lokalizasyonunun Analizi	14
2.6.2. HLA Sınıf II Bölgesinde <i>PRKRA</i> Geninin Haplotipe Spesifik Kodlanması	15
2.6.3. <i>PRKRA</i> Geninin Moleküler Yapısı ve Özellikleri	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Çalışmanın Kurgusu.....	22

3.2. Hasta ve Kontrol Grubu	22
3.3. Multiple PZR ve Agaroz Jel Elektroferezi.....	23
3.3.1. Multiple PZR.....	23
3.3.1.1. Oligonükleotit Sentezi.....	23
3.3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Plastik Malzemeler.....	23
3.3.1.3. Multiple PZR Reaksiyon Solüsyonu Hazırlama	23
3.3.1.4. Termal Döngü	24
3.3.2. Agaroz Jel Elektroferezi.....	24
3.3.2.1. Kullanılan Cihazlar, Plastik ve Cam Malzemeler	24
3.3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
3.3.2.3. Agaroz Jel Elektroferezi Hazırlama ve Görüntüleme	25
3.4. Gerçek Zamanlı PZR	25
3.4.1. Gerçek Zamanlı PZR Kit İçeriği	25
3.4.2. Kullanılan Cihazlar ve Plastik Malzemeler	25
3.4.3. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü.....	26
3.4.3.1. Resüspanسیون Protokolü	26
3.4.3.2. Gerçek Zamanlı PZR Saptama Protokolü	26
3.4.3.3. Gerçek Zamanlı PZR Amplifikasyon Protokolü.....	28
3.4.4. Souçların Yorumlaması.....	28
3.5. İstatistiksel Yöntemler	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Özellikleri	29
4.1.1. Hasta ve Kontrol Grubunda Yaş ve Cinsiyet Durumu.....	29
4.1.2. Hasta ve Kontrol Grubunda DR Süptipleri	29
4.1.2.1. Hasta Grubunda DR Süptipleri ve Cinsiyetlere Göre Dağılımı.....	29
4.1.2.2. Kontrol Grubunda DR Süptipleri ve Cinsiyetlere Göre Dağılımı.....	30
4.2. Multiple PZR Sonuçları	31
4.2.1. Multiple PZR Jel Elektroferezi Görüntüleri.....	31
4.2.2. Hasta Grubunda <i>PRKRA</i> Sonuçlarının DR Süptiplerine ve Cinsiyetlere Göre Dağılımı.....	32
4.2.3. Kontrol Grubunda <i>PRKRA</i> Sonuçlarının DR Süptiplerine ve Cinsiyetlere Göre Dağılımı	33
4.2.4. Tüm Grupta <i>PRKRA</i> Sonuçlarının DR Gruplarına Göre Dağılımı	34

4.2.5. <i>PRKRA</i> Gen Sıklığının Değerlendirilmesi.....	35
4.3. HLA-DRB1 Alellerinin ve HLA-DR Süptiplerinin Değerlendirilmesi.....	36
4.3.1. Hasta ve Kontrol Grubunda HLA-DRB1 Alellerinin ve HLA-DR Süptip Sıklığının Karşılaştırılması	38
4.4. HLA-DR53 Haplotip Sıklığı.....	43
4.5. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	44
4.5.1. Gerçek Zamanlı PZR Sonuç Grafiklerinin Yorumlanması.....	44
4.5.2. Hasta ve Kontrol Grubunda rs2395185'in Karşılaştırılması.....	48
5. TARTIŞMA	52
KAYNAKLAR	59
FORMLAR	68
ETİK KURUL KARARI	73
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	74
ÖZGEÇMİŞ	75

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: HLA-DRB4 alellerinin serolojik ekivalentleri.....	11
Tablo 2-2: Ortak HLA-DRB4 haplotipleri	12
Tablo 2-3: HLA-DRB1 lokusu homozigot hücre hatları	16
Tablo 3-1: Suda resüspansiyon	26
Tablo 3-2: Şablon hazırlama bufferında resüspansiyon	26
Tablo 3-3: Komponent içeriği.....	27
Tablo 3-4: Pozitif kontrol dilüsyon faktörü	27
Tablo 3-5: Precision FAST2X Q-PZR master mix için protokol	28
Tablo 4-1: Hasta grubu HLA-DR süpertiplerinin yüzdelik dağılımı.....	29
Tablo 4-2: Kontrol grubu HLA-DR süpertiplerinin yüzdelik dağılımı	30
Tablo 4-3: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında <i>PRKRA</i> geninin taşınma sıklığı	35
Tablo 4-4: Kontrol grubunda erkek ve kadınlar arasında <i>PRKRA</i> geninin taşınma sıklığı	35
Tablo 4-5: Tüm grupta hasta ve kontroller arasında <i>PRKRA</i> geninin taşınma sıklığı....	36
Tablo 4-6: Hasta grubunda HLA-DRB1 alel yüzdesi.....	36
Tablo 4-7: Hasta grubunda HLA-DRB*3,-4,-5 süpertip homozigotluğunun yüzdesi....	37
Tablo 4-8: Kontrol grubunda HLA-DRB1 alel yüzdesi	37
Tablo 4-9: Kontrol grubunda HLA-DRB*3,-4,-5 süpertip homozigotluğunun yüzdesi	38
Tablo 4-10: Hasta ve kontrol grubu arasında HLA-DRB1 alellerinin sıklığının karşılaştırılması.....	39
Tablo 4-11: Hasta ve kontrol grubu arasında HLA-DR süpertip sıklığının karşılaştırılması.....	40
Tablo 4-12: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında HLA-DRB1 alellerinin sıklığının karşılaştırılması	41
Tablo 4-13: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında HLA-DR süper tip sıklığının karşılaştırılması	42
Tablo 4-14: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında homozigot veya heterozigot olarak HLA-DR53 alellerinin taşınma yüzdesi	43
Tablo 4-15: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında HLA-DR53 alellerinin homozigot olarak taşınma yüzdesi.....	43

Tablo 4-16: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında HLA-DR53 alellerinin heterozigot olarak taşınma yüzdesi	44
Tablo 4-17: Tüm grupta hasta ve kontroller arasında homozigot veya heterozigot HLA-DR53 alellerinin taşınma yüzdesi	44
Tablo 4-18: Hasta ve kontroller arasında rs2395185 genotiplerinin karşılaştırılması....	49
Tablo 4-19: Hasta ve kontroller arasında varyant rs2395185'in homozigot veya heterozigot varlığının karşılaştırılması	49
Tablo 4-20: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında rs2395185 genotiplerinin karşılaştırılması.....	50
Tablo 4-21: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında varyant rs2395185'in homozigot veya heterozigot varlığının karşılaştırılması.....	50
Tablo 4-22: Kontrol grubunda erkek ve kadınlar arasında rs2395185 genotiplerinin karşılaştırılması.....	51
Tablo 4-23: Kontrol grubunda erkek ve kadınlar arasında varyant rs2395185'in homozigot veya heterozigot varlığının karşılaştırılması.....	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Sağlıklı ve ALL hastası bireyin kemik iliği hücreleri	5
Şekil 2-2: MHC sisteminin 6. kromozomdaki lokalizasyonu	8
Şekil 2-3: HLA nomenklatür	9
Şekil 2-4: İnsan HLA-DR gruplarının şematik çizimi	10
Şekil 2-5: rs2395185'in şematik gösterimi	14
Şekil 2-6: PAC HS265J14 ve muhtemel çift zincirli RNA bağlayan proteini kodlayan bölgenin büyütülmüş hali	15
Şekil 2-7: <i>PRKRA</i> geninin PZR ile tespiti	17
Şekil 2-8: <i>PRKRA</i> geninin pozisyonu	18
Şekil 2-9: <i>PRKRA</i> geninin FISH profili	19
Şekil 2-10: <i>PRKRA</i> geni ve psödogenin ekzon-intron bağlantıları	19
Şekil 2-11: PKR yolağı	20
Şekil 3-1: Çalışmanın kurgusu	22
Şekil 4-1: Hasta grubunun DR süper tiplerinin cinsiyetlere göre dağılımı	30
Şekil 4-2: Kontrol grubunun DR süper tiplerinin cinsiyetlere göre dağılımı	31
Şekil 4-3: Multiple PZR jel elektroforezi görüntüleri	31
Şekil 4-4: Hasta grubunun <i>PRKRA</i> sonuçlarına göre dağılımı	32
Şekil 4-5: Hasta grubunun <i>PRKRA</i> sonuçlarının cinsiyetlere göre dağılımı	32
Şekil 4-6: Kontrol grubunun <i>PRKRA</i> sonuçlarına göre dağılımı	33
Şekil 4-7: Kontrol grubunun <i>PRKRA</i> sonuçlarının cinsiyetlere göre dağılımı	33
Şekil 4-8: Hasta ve kontrol grubunda pozitif <i>PRKRA</i> sonuçlarının DR gruplarına göre dağılımı	34
Şekil 4-9: Hasta ve kontrol grubunda negatif <i>PRKRA</i> sonuçlarının DR gruplarına göre dağılımı	34
Şekil 4-10: Örnek olarak sekiz hasta ile çalışılmış gerçek zamanlı PZR sonuç grafiklerinin yorumlanması	46
Şekil 4-11: Örnek olarak altı kontrol ile çalışılmış gerçek zamanlı PZR sonuç grafiklerinin yorumlanması	48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A	: Adenine
ABL	: Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ALL	: Acute lymphoblastic leukemia
APC	: Antigen presenting cell
ATF4	: Activating transcription factor 4
BCR	: The breakpoint cluster region protein
BF	: Properdin factor B
BMFR2	: BamHI-M rightward reading frame 2
C	: Cytosine
Ci	: <i>Cytenopharyngodon idella</i>
CD4	: Cluster of differentiation 4
CD8	: Cluster of differentiation 8
CHOP	: CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
DNA	: Deoxyribonucleic acid
dNTP	: Deoksinükleosid trifosfat
EBV	: Epstein-Barr virus
EDTA	: Etilen diaminetraasetik asit
eIF2a	: Eukaryotic initiation factor 2a
ER	: Endoplazmik retikulum
ESTs	: Expressed sequence Tags
ETV6	: ETS (E twenty-six) variant 6
FAM8A5P	: Family with sequence similarity 8 member A5, pseudogene
FISH	: Fluorescence in situ hybridization
G	: Guanine
GVHH	: Graft versus host hastalığı
GWAS	: Genome wide association study
HIV-1	: Human immunodeficiency virus type-1
HLA	: Human leukocyte antigen

HU-1	: Human-1
HUGO	: Human genome organisation
HSPA1B	: Heat shock 70kDa protein 1B
HsRBP	: <i>Homo sapiens</i> ribonucleic acid binding protein
ICP34.5	: Infected cell protein 34.5
IGH	: Immunoglobulin heavy
IL3	: Interleukin 3
IRF2	: Interferon regulatory factor 2
iAMP21	: Intrachromosomal amplification of chromosome 21
KMT2A	: Lysine spesific methyltransferase 2A
LA	: Leukocyte antigen
LOC100294188	: protein FAM136A-like
LOC100507714	: HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-7 beta chain-like
m	: mesajcı
MHC	: Major histocompatibility complex
miRNA	: Micro ribonucleic acid
MLL	: Mixed lineage leukemia
NK	: Naturel killer
Q	: Quantitative
P	: Phosphor
PAC	: P1-derived artificial chromosome
PACT	: Protein activator of protein kinaz R
PBX1	: Pre-B-cell leukemia transcription factor 1
PCR	: Polymerase chain reaction
PKR	: Protein kinaz R
PRKRA	: Protein kinase, interferon inducible double_stranded ribonucleic acid dependent activator
PRKRAP1	: Protein kinase, interferon-inducible double stranded ribonucleic acid dependent activator pseudogene 1
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAX	: PKR (Protein Kinaz R) associated protein X
RNA	: Ribonucleic acid

SNP	: Single nucleotide polymorphism
SPSS	: Statistic packet of social science
SSP	: Sequence spesific primer
T	: Thymine
TAR	: Transactivation response
TBE	: Tris-borate-EDTA (etilen diaminetraasetik asit)
TCF3	: Transcription factor 3
TM	: TaqMan
TNF	: Tumor necrosis factor
TRBP	: Human cellular protein bound to the transactivation response of human immunodeficiency virus type-1 ribonucleic acid
UV	: Ultraviyole
WHO	: World health organization
Xlrpb	: <i>Xenopus laevis</i> double-stranded ribonucleic acid binding protein

ÖZET

Yavuz Ç. 2019. HLA-DR53 Haplotiplerindeki PRKRAP1 Psödogenininin Akut Lenfoblastik Lösemi ile İlişkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2019.

Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) lenfoblastların anormal bir şekilde kontrolsüz ve aşırı çoğalmasından oluşur. Gen yeniden düzenlenmeleri, kromozom sayısındaki değişiklikler ve anormal karyotip ALL'de risk faktörleridir. Pek çok çalışmada İnsan Lökosit Antijen (HLA) genlerinin sınıf II gen bölgesine ait HLA-DRB4 alel ve homozigot sıklığının çocukluk çağı ALL'sinde erkeğe özgü olarak yüksek oranda olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda ALL hastalığının HLA-DRB4 alel sıklığı ve İnterferon İndükleyici Çift Zincirli Ribonükleik Asit Bağlayan Protein Kinaz A Psödogen 1 (PRKRAP1) ile ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca hasta ve sağlıklı grupta Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile PRKRAP1 psödogen pozitifliğinin incelenmesi ve HLA-DRB4 haplotiplerinin bir diğer belirteci olan Tek Nükleotit Polimorfizmi (SNP) rs2395185'in gerçek zamanlı PZR ile tanımlanması hedeflenmiştir.

Çalışmamızda tüm grupta PRKRAP1 psödogen pozitifliği HLA-DRB4 haplotipine spesifik olarak gösterilmiştir. HLA-DRB4 alel ve HLA-DRB4 homozigot sıklığı çocukluk çağı ALL hastalarında erkeklerde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. rs2395185'in HLA-DRB4 haplotiplerine özgü olduğu saptanmıştır ve örneklerdeki HLA-DRB4 homozigotluğu SNP tiplmesi seviyesinde kanıtlanmıştır.

Çalışmamızda, HLA-DRB4 homozigotluğu ve HLA-DRB4 belirteci ile ALL ilişkisinin temelinde HLA-DRB4 haplotiplerinde henüz karakterizasyonu yapılmamış ilave DNA'nın olabileceği düşünülmektedir. HLA-DRB4 haplotiplerine spesifik olarak tanımladığımız PRKRAP1 psödogenininin yeni tanımlanabilecek spesifik bir transkripsiyon haritasındaki moleküler mekanizması araştırılıp ALL ile ilişkisi belirlenebilir.

Anahtar Kelimeler : ALL, HLA-DR53, HLA-DRB4, PRKRAP1, rs2395185

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23378

ABSTRACT

Yavuz Ç. 2019. Association of PRKRAP1 Pseudogene in HLA-DR53 Haplotypes with Acute Lymphoblastic Leukemia. Istanbul University Health Sciences Institute, Medical Biology Department. Master Thesis. Istanbul. 2019.

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) consists of abnormally uncontrolled and excessive proliferation of lymphoblasts. Gene rearrangements, changes in chromosome number and abnormal karyotype are risk factors in ALL. In many studies Human Leukocyte Antigen (HLA)-DRB4 allele and homozygote frequency of class II gene region of HLA genes was observed that there was a high rate of male specificity in childhood ALL.

In our study, it was aimed to show the relationship between ALL disease and HLA-DRB4 allele frequency and Protein Kinase, Interferon-Inducible Double Stranded RNA Dependent Activator Pseudogene 1 (PRKRAP1). In addition, in the patient and healthy group, the aim of this study was to investigate the PRKRAP1 pseudogene positivity by Polymerase Chain Reaction (PCR) and to identify Single Nucleotide Polymorphism (SNP) rs2395185 which is another marker of HLA-DRB4 haplotypes, by the real time PCR. PRKRAP1 pseudogene positivity in the whole group was shown to be specific to HLA-DRB4 haplotype. The frequency of HLA-DRB4 allele and HLA-DRB4 homozygosity were significantly higher in male patients with childhood ALL. rs2395185 was found to be specific for HLA-DRB4 haplotypes and HLA-DRB4 homozygosity in the samples was demonstrated at the level of SNP typing.

In our study, an additional non-characterized DNA in the HLA-DRB4 haplotypes for HLA-DRB4 homozygosity and HLA-DRB4 marker association is considered for ALL. The molecular mechanism of PRKRAP1 pseudogene, which we defined specifically for HLA-DRB4 haplotypes, can be investigated in a specific transcription map, that can be identified in a novel, and its relationship with ALL can be determined.

Key Words: ALL, HLA-DR53, HLA-DRB4, PRKRAP1, rs2395185

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 23378

1. GİRİŞ VE AMAÇ

6. kromozomun kısa kolu üzerinde (6p21) sentromere yakın bir bölgede yer alan ardışık bir Deoksiribonükleik Asit (Deoxyribonucleic Acid; DNA) dizisinde bulunan HLA genlerinin sınıf II gen bölgesine ait HLA-DR grubundan HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 ya da HLA-DRB1*09 alellerini taşıyan bireyler HLA-DRB4 (HLA-DR53) haplotipini taşırlar (1). HLA-DR haplotipleriyle ilişkili daha önce yapılan çalışmalarda, HLA-DRB4 belirteç sıklığının ve HLA-DRB4 kodlayan HLA-DRB4*01 homozigot sıklığının çocukluk çağı ALL'sinde erkeğe spesifik olarak yüksek oranda olduğu gözlenmiştir (2,3).

SNP rs2395185 (Guanin/Timin), HLA-DR alt gruplarının intergenik bölgesinde bulunur ve Timin (T) alel varyantı ile HLA-DRB4 haplotiplerinin belirteçidir (1). Yapılan çalışmalarda varyant rs2395185'in Hodgkin lenfoma ve ülseratif kolit için koruyucu; ALL, akciğer kanseri, romatoid artrit ve astım için risk ilişkisi ortaya koyduğu gözlenmiştir (4,5,6,7,8).

HLA-DRB4 haplotipleri psödogenler bakımından zengindir ve HLA-DRB4 bölgesinde, HLA-DRA ve HLA-DQA1 arasında yerleşik olan, yeni tanımlanmış ve henüz biyolojik rolleri tam olarak çözülememiş psödogenler bulunmuştur (9). HLA-DRB4 haplotipine spesifik *PRKRAP1* psödogeni ile ilgili 1998 yılında yapılan bir çalışmada P1 Kökenli Yapay Kromozom (P1-Derived Artificial Chromosome; PAC) HS265J14 klonlarında keşfedilen ve çift zincirli Ribonükleik Asit (Ribonucleic Acid; RNA) bağlayan yeni protein kodlaması beklenen bölgenin, insan HLA-DR alt gruplarındaki nükleotit dizisi ile %98,4 eşlenik olduğu görülmüştür. Sonrasında HLA-DR gruplarında tanımlanan ve çift zincirli RNA bağlayan protein kodladığı önerilen genin ismi *Homo sapiens* RNA-Bağlayan Protein (*Homo sapiens* Ribonucleic Acid Binding Protein; *hsRBP*) iken Human Genome Organisation (HUGO) ve Human Gene Nomenclature Committee'sinin önerileri ile İnterferon İndükleyici Çift Zincirli Ribonükleik Asit Bağlayan Protein Kinaz A (Protein Kinase, Interferon Inducible Double-Stranded Ribonucleic Acid Dependent Activator; *PRKRA*) olarak değiştirilmiştir (10,11). *HsRBP*, *Xenopus laevis* Çift Zincirli RNA Bağlayan Protein (*Xenopus laevis* Double-Stranded Ribonucleic Acid Binding Protein; *Xlrpb*) geni ve İnsan Bağışıklık Yetmez Virüs-1 (Human Immunodeficiency Virus Type-1; HIV-1)

Transaktivasyon Yanıt (Transactivation Response, TAR) RNA'sını Bağlayan İnsan Stoplazmik Proteini (Human Cellular Protein Bound to The Transactivation Response of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Ribonucleic acid; TRBP) geni ile homoloji gösterdiği gibi çift zincirli RNA bağlayan Protein Kinaz R (Protein Kinaz R; PKR) Aktivatörü Protein (Protein Activator of Protein Kinaz R; PACT) geni ile %98,4 nükleotit seviyesinde ve %99 aminoasit seviyesinde eşleniktir. Dizileme çalışmaları sonucu *HsRBP*, hem PAC klonlarında hem de insan HLA-DR alt bölgesinde intron dizisi taşımadığı için psödogen olarak düşünülmüş ve HLA Sınıf II bölgesinde aktif olmayan bir gen kalıntısı olduğu ileri sürülmüştür (10).

2011'de yapılan bir çalışmada, HLA-DRB5 ailesine ait lenfoblastoid hücre hattında HLA kompleksindeki psödogenlerin %70 oranla yüksek transkripsiyon oranına sahip olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuca göre HLA-DRB4 ailesine ait spesifik psödogenlerin de transkribe olabileceği üzerinde düşünülmektedir (9,12).

Çalışmamızda, ALL hastalığı ile HLA-DRB4 alel sıklığı ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda, HLA-DRB4 homozigotluğu ve HLA-DRB4 alel sıklığı ile ALL hastalığı arasında tanımlanan ilişkinin aslında HLA-DRB4 haplotiplerinde bildirilmiş; henüz biyolojik rolü ve fonksiyonu tam olarak belirlenememiş HLA-DRB4 haplotiplerine spesifik *PRKRAP1* psödogeninden kaynaklanıp kaynaklanmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Multiple PZR yöntemiyle hasta ve sağlıklı grupta *PRKRAP1* psödogen pozitifliğinin gösterilmesi planlanmıştır. HLA-DRB4 haplotiplerinin bir diğer belirteci olan rs2395185 SNP'sini de gerçek zamanlı PZR ile tanımlayarak örneklerde hem HLA tipleme ile HLA-DRB4 homozigotluğunun hem de rs2395185 tipleme ile SNP düzeyinde homozigotluğun gösterilmesi amaçlanmıştır. Hasta ve sağlıklı grupta, *PRKRAP1* psödogen pozitiflik oranlarının, rs2395185 genotiplerinin, HLA-DRB1 alel ve HLA-DRB süpertip sıklıklarının, HLA-DRB4 alel ve homozigot sıklığının karşılaştırılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Lenfoblastik Lösemi

2.1.1. ALL Hastalık Tablosu ve Görülme Sıklığı

ALL, kemik iliğinde lenfoblast birikimine bağlı oluşan çocukluk döneminin en yaygın malign hastalığıdır (13). Beyaz kan hücreleri (lökosit) doğru işleve sahip olgun hücre şekline dönüşemezler. Hızlı ve kontrolsüz olarak çoğalmaya başlamaları sebebiyle normal kan oluşumu olumsuz etkilenir ve bunun sonucunda artık sağlıklı lökositler, sağlıklı kırmızı kan hücreleri (eritrosit) ve sağlıklı kan pulcukları (trombosit) gereken miktarda üretilemez. ALL hastalığında lenfositlerin henüz olgunlaşmamış bir ön hücresinde habis bir kontrolden çıkma durumu görülür. Hücre gelişiminin çeşitli basamaklarında meydana gelebilen bu kontrolden çıkma durumu lenfositlerin çeşitli alt gruplarını ve bunların ön basamaklarını kapsayabilir. Böylelikle ALL hastalığının farklı şekilleri ortaya çıkar. Örneğin B-ALL, B-lenfositlerin ön hücrelerinden kaynaklanırken T-ALL, T-lenfositlerin ön hücrelerinden kaynaklanır. ALL’de daha önceki gelişim basamağı söz konusu ise hastalık isminin önüne pre sözcüğü eklenir. Bundan dolayı pre-pre-B-ALL, common ALL, pre-B-ALL, (olgun) B-ALL, pro-T-ALL ve pre-T-ALL, intermedier (kortikal) T-ALL, T-ALL gibi ALL alt tipleri belirlenmiştir (14).

Türk Hematoloji Derneği verilerine göre tüm ALL olgularının üçte ikisi çocuklarda görülür. 15 yaş altı çocuklarda ise en sık rastlanan neoplastik hastalıktır. Erişkin yaş grubunda hastalığın görülme sıklığı 1-2/100.000 arasında değişmektedir (15). ALL görülme sıklığı 3-7 yaşında en yüksektir ve hastaların %75’i 6 yaşından küçüktür. Hastaların %85’i B hücre kökenlidir, erkek ve kadın eşit derecede hastalığa yakalanır. T-ALL’nin erkeklerde görülme sıklığı ise daha fazladır (13).

Alman Çocuk Kanseri Veri Bankası açıklamalarına göre Almanya’da her sene 0 ile 14 yaş arasındaki yaklaşık 500 çocuk ve gençte ALL hastalığı tespit edilmektedir. Aynı zamanda her sene 18. yaşını doldurmuş ve daha genç olan 550 ile 600 kişi ALL hastalığına yakalanmaktadır (14).

2.1.2. ALL Hastalığının Sebepleri ve Belirtileri

ALL, Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization; WHO) tarafından B hücresi veya T hücresi ile genetik defektteki yatan genetik kusura göre alt

sınıflandırılmıştır. B-ALL'de t(9;22) veya t(12;21) translokasyonları, MLL gen yeniden düzenlenmesi veya kromozom sayısında değişiklik bulunan birkaç özel genetik alt tip vardır. T-ALL'de hastaların %50-70'inde anormal bir karyotip bulunur ve çoğu durumda notch sinyal yolağı aktivedir. ALL alt tipinin belirlenmesi optimal tedavi protokolü ve prognoz için önemli bir kılavuzdur (13).

WHO 2016'ya göre ALL (13):

- B-lenfoblastik lösemi (Başka şekilde sınıflandırılmayan)
- Tekrar eden genetik anormallikler ile birlikte B lenfoblastik lösemi/lenfoma B lenfoblastik lösemi/lenfoma
- t (9;22) (q34.1;q11.2); BCR-ABL1 ile birlikte B lenfoblastik lösemi/lenfoma B lenfoblastik lösemi/lenfoma
- t (v;11q23.3); KMT2A rearanjmanı ile birlikte B lenfoblastik lösemi/lenfoma
- t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6 ile birlikte B lenfoblastik lösemi/lenfoma
- Hiperdiploidi (kromozom b 50) ile birlikte B lenfoblastik lösemi/lenfoma
- Hipodiploidi (kromozom k 50) ile birlikte B lenfoblastik lösemi/lenfoma
- t (5;14) (q31.1;q32.3) IL3-IGH ile birlikte B lenfoblastik lösemi/lenfoma
- t (1;19) (q23;p13.3);TCF3-PBX1 ile birlikte B lenfoblastik lösemi/lenfoma
- Geçici antite: B lenfoblastik lösemi/lenfoma, BCR-ABL1-benzer
- Geçici antite: iAMP21 ile B lenfoblastik lösemi/lenfoma
- T lenfoblastik lösemi/lenfoma
- Geçici antite: Erken T hücre prekürsör lenfoblastik lösemi
- Geçici antite: Natural Killer (NK) hücreli lenfoblastik lösemi

ALL'de risk faktörleri içinde Down sendromu, lösemili kardeş, radyasyona maruz kalma, benzen gibi bazı toksinler, kimyasal maddeler ve ilaçlar sayılabilir. ALL'de artan lenfoblastlar kemik iliğinde kan yapımını engellediği ve bağışıklık sistemindeki hücrelerin yapımını bozduğu için anemi, halsizlik, çabuk yorulma, hareketle artan nefes darlığı, yüksek ateş, bademcik iltihabı ve zatürre meydana gelebilir. Artan lenfoblastlar lenf bezleri, dalak ve karaciğerde birikirse bu organlarda büyümeye sebep verir. Trombositlerin sayısındaki yetersizlik ise ciltte morluk oluşmasına, toplu iğne başı büyüklüğünde kırmızı yaygın döküntülere, burun ve diş eti kanamalarına neden olur (16).

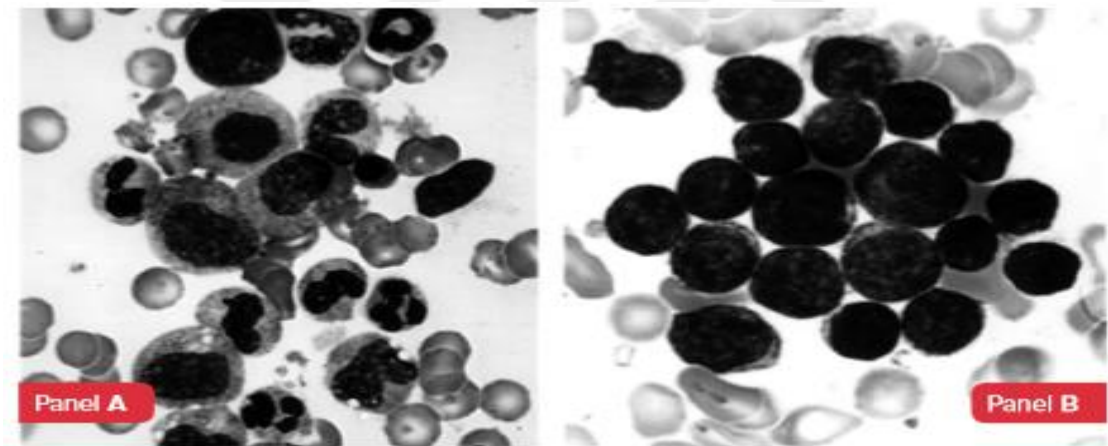
2.1.3. ALL Hastalık Tanısı

ALL hastalık tanısı için aşağıdaki yöntemler uygulanır (16,17):

Anamnez (hastalık öyküsü) ve fizik muayene: Kişinin geçmişteki hastalık öyküsü ve aldığı tedaviler öğrenilir. Fizik muayene ile morluklar, deride kanama odakları, ateş yüksekliği, büyümüş karaciğer, dalak ve lenf bezleri saptanır.

Tam kan sayımı ve biyokimyasal tetkikler: Kişinin lökosit sayısı ve hemoglobin miktarı ölçülür. Hastalarda genellikle kansızlık (anemi) ve trombosit düşüklüğü beklenir.

Periferik (çevresel) kan yayması: Kan hücrelerinin çeşitleri, birbirlerine oranları, yaklaşık olarak sayıları, hücrelerin şekillerindeki değişiklikler ve çevre kanına çıkan anormal hücreler saptanır. ALL'de periferik kan yaymasında artmış olan blastların görülmesi beklenir (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Sağlıklı ve ALL hastası bireyin kemik iliği hücreleri (17)

Panel A: Sağlıklı birey Panel B: ALL hastası

Kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi: Kemik iliği aspirasyonunda leğen kemiği bölgesel (lokal) anestezi veya genel anestezi ile uyandırılır. Kemik iliğine özel bir iğne ile girilerek enjektör yardımı ile kemik iliği örneği alınır. Biyopside ise özel biyopsi iğnesi yardımıyla kemik iliğinden küçük bir örnek alınır. Kemik iliği aspirasyon ve biyopsi numuneleri hematolog ve patolog tarafından mikroskop altında incelenir. Kromozom anormalliklerinin saptanması için aspirasyon örneğinden çeşitli kromozom inceleme testleri istenir. Kesin tanıda mutlaka kemik iliği biyopsisi yapılması gerekir.

Sitogenetik analizler: Kandan veya kemik iliğinden alınan hücreler mikroskop altında incelenerek lenfositlerdeki bazı kromozom değişikliklerinin saptanması hedeflenir. ALL'de bazen bir kromozomun bir kısmı diğer bir kromoza yapışmış olduğu için anormal kromozom (Philadelphia kromozomu, bcr/abl geni) saptanabilir. Ayrıca Floresan In situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi gibi floresan maddelerin kullanıldığı veya PZR yöntemi gibi bazı kimyasal maddelerin kullanıldığı moleküler sitogenetik testlerden de yararlanılabilir.

İmmünofenotipleme (akış sitometrisi): İmmünofenotipleme, hücre yüzeyindeki protein türlerine (antijen) özgü hücreleri tanımlamak için kullanılan bir işlemdir. Kemik iliği veya kan örneğindeki hücrelerin özel boyalarla boyanması hedeflenerek yüzeylerinde bulunan belirteçlerden yararlanılarak lösemi ve lösemnin tipleri saptanır.

2.1.4. ALL Hastalık Tedavisi

ALL'nin tedavisi için 4 çeşit yöntem kullanılmaktadır (14,16):

Kemoterapi: ALL'nin başlıca tedavi yöntemi kemoterapi uygulamasıdır. Bu uygulamada, hücre büyümesini önleyen ilaçlar (sitostatikler) kullanılmaktadır. Genellikle tek bir ilaç lösemi hücrelerinin hepsini imha edemediğinden, değişik etkilere sahip birden fazla sitostatik ilaç bir kombinasyon halinde verilir (polikemoterapi yöntemi- çoklu ilaçla tedavi).

Kök hücre nakli: Kök hücre naklinde uygun donör bulunması için öncelikle hastanın kardeşleri teste tabi tutulur. Hastanın kardeşi yoksa veya mevcut kardeşleri HLA doku grupları açısından hastayla uyumlu değilse, kök hücre bankasından akraba dışı kök hücre nakli için uyumlu donör taraması başlatılır.

Radyasyon tedavisi: Radyasyon tedavisinde radyasyon verilerek lenfoblastların öldürülmesi hedeflenmektedir.

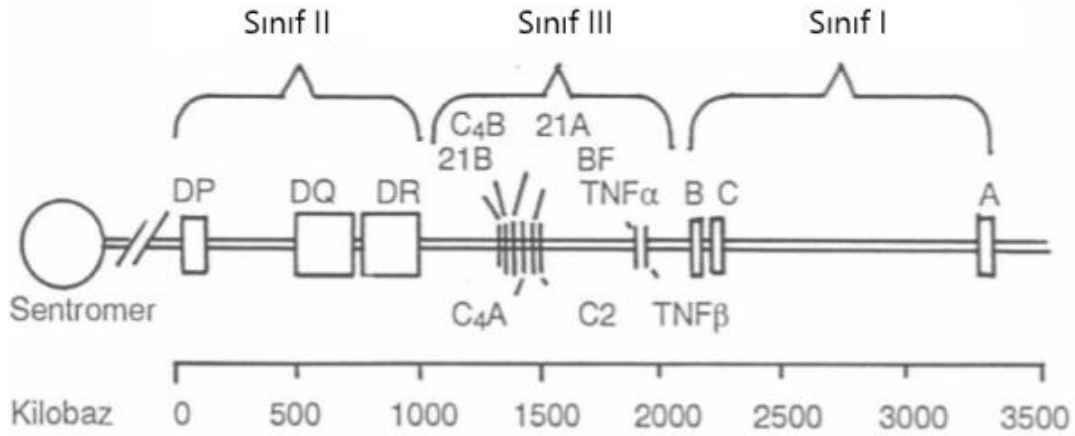
Hedefe yönelik tedavi: Hedefe yönelik tedavide normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini bulup ona saldıran ilaçlar kullanılmaktadır. ALL'de Philadelphia kromozomu (bcr/abl geni) varlığı tespit edilmesi durumunda tirozin kinaz inhibitörleri (engelleyicileri) denilen bir grup ilaç (imatinib, dasatinib veya nilotinib) mevcut kemoterapilerin yanı sıra hedefe yönelik tedavi için kullanılmaktadır.

2.2. İnsan Büyük Doku Uygunluk Kompleksi

2.2.1. İnsan Büyük Doku Uygunluk Kompleksi Antijenlerinin Özellikleri

İnsanlarda Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex; MHC) molekülleri ilk kez lökositlerde görüldüğü için insan lökosit antijenleri olarak adlandırılmıştır. MHC Sınıf I molekülleri tüm nükleuslu hücrelerde bulunurken MHC Sınıf II molekülleri ise makrofajlar, dendritik hücreler ve B hücrelerinde eksprese olur (18,19). MHC moleküllerinin ifadesi yabancı bir antijen organizmaya girdiğinde aktif hale geçen doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminin interferon ve Tümör Nekrotizan Faktör (Tumor Necrosis Factor; TNF) gibi sitokinleri sayesinde belirgin olarak artar (20). MHC Sınıf I ve MHC Sınıf II molekülleri ekstraselüler, transmembranöz ve intraselüler parçalardan oluşan benzer yapılardır (19). Antijene özgünlüğü çok yüksek olan T hücrelerine antijen sunumunu sağlayan yüzey molekülleri MHC molekülleridir (21). Antijen sunumunda belirleyiciliği oluşturan T hücre reseptörüdür. Yani farklı peptidler aynı MHC molekülüne bağlansa da yalnızca belirli bir peptite özgün olan T hücre klonu aktive olup proliferasyon gösterir (18,21).

MHC molekülleri kişinin kendi (self) antijenlerine reaksiyon oluşturmaz. Çünkü; self antijenlere reaksiyon oluşturabilecek T hücreleri santral tolerans aşamasında yok edilmiştir. Kalan T hücreleri ise periferde sıkı bir şekilde kontrol altında olduğu için reaksiyon oluşturmaz (18,22). Yabancı bir antijen vücuda girdiğinde ise artan MHC moleküllerinin ifadesi güçlü bir antijen sunumu ve özgün bir T hücre yanıtına neden olacaktır (23). Aynı zamanda özgün antijen ve self MHC molekülünün varlığında T hücresi antijeni tanıyıp reaksiyon oluşturabilir. Yani MHC molekülünün organizmanın kendi MHC molekülü olması gerekir. Bu duruma self kısıtlılık (self restriction) özelliği denir (24). MHC Sınıf I molekülleri T hücre koreseptörlerinden CD8 ile etkileşime girerek CD8+ sitotoksik T hücre yanıtını oluşturur. MHC Sınıf II molekülleri de CD4 koreseptörüne bağlanarak CD4+ yardımcı T hücre yanıtının oluşmasını sağlar (25).



Şekil 2-2: MHC sisteminin 6. kromozomdaki lokalizasyonu (26)

MHC üç ana lokustan meydana gelir. Bunlar sentromerden telomere doğru MHC Sınıf II, MHC Sınıf III ve MHC Sınıf I lokuslarıdır (Şekil 2-2) (26).

2.2.2. MHC Moleküllerinin Kanserdeki Rolü

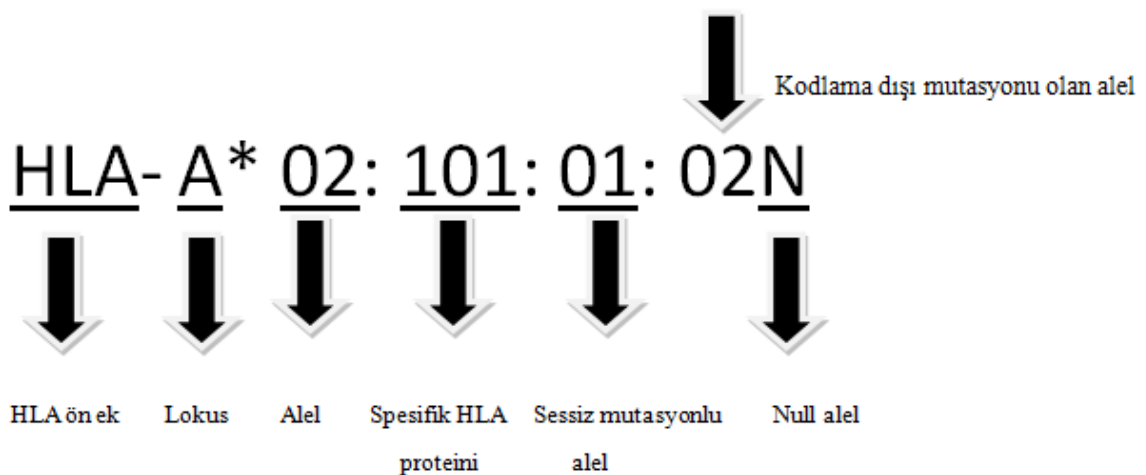
Tümör hücrelerinin ürettiği tümör antijenleri immün sistem tarafından yabancı proteinler olarak kabul edilir. Tümör antijenleri MHC Sınıf I molekülleri ile CD8⁺ T hücrelerine sunulmak üzere Antijen Sunan Hücre (Antigen Presenting Cell; APC) tarafından yakalanır ve işlenir. Bu şekilde tümör hücrelerine karşı bir sitotoksik reaksiyon başlamış olur. Ancak tümör antijenleri yabancı antijenler olsa da self antijenlerden köken aldıkları için yapıcı onlara benzer ve immün yanıtı çok iyi uyaramazlar. Aynı zamanda tümör hücrelerinde zamanla MHC ekspresyonlarının baskılandığı görülmüştür. Böylelikle tümör antijenleri immün sistemden saklanabilir (27).

2.3. HLA Nomenklatür

MHC ilk kez 1937 yılında farelerdeki transplantasyon çalışmalarıyla keşfedilirken ürünleri olan moleküller 1958 yılında tanımlanmıştır (28,29). MHC, insanlarda lökositlerin yüzeyinde keşfedilmiş ve kullanılan HLA terimi, Human-1 (HU-1) ile Lökosit Antijen (Leukocyte Antigen; LA) olarak ortaya atılan terimlerin birleşmesiyle ortaya çıkmıştır (30).

HLA sisteminin nomenklatürü WHO'nun denetiminde HLA nomenklatür komitesi tarafından düzenlenmektedir. Bu komiteye göre üç ana gruba ayrılan bu bölgede HLA Sınıf I (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G), HLA Sınıf II (HLA-DR, -DP, -DQ, -DO, -DN) ve HLA Sınıf III (C2, C4A, C4B, PF, TNF- α , β) antijenleri yer almaktadır (31).

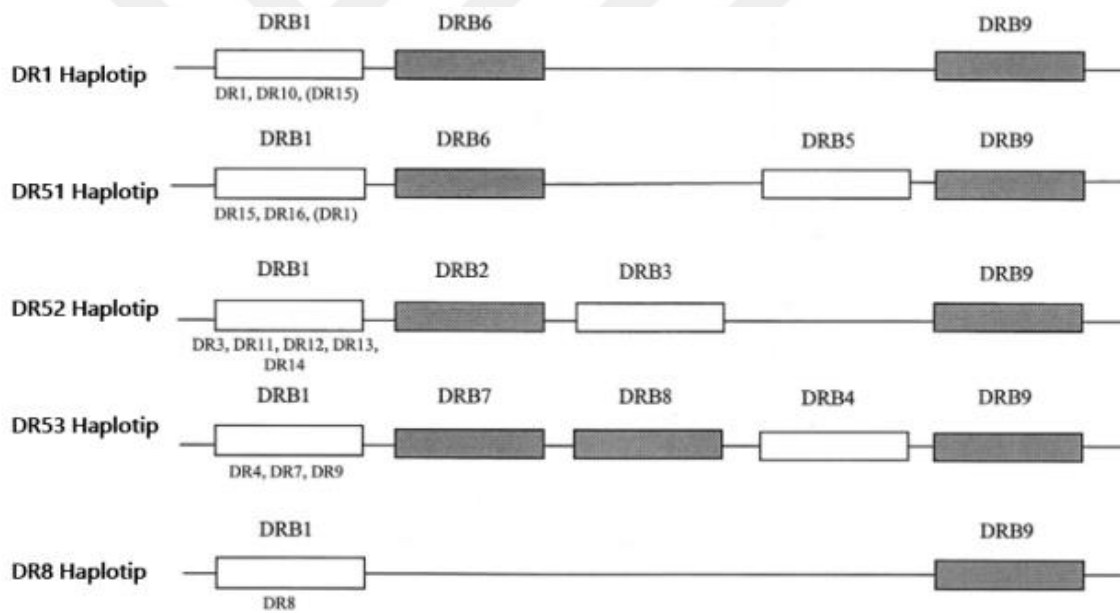
Kişilerin HLA genotipleri parental olarak kalıtılan iki haplotip kombinasyonundan oluşur. Dolayısıyla HLA gen sistemi, oldukça farklı polimorfik bir yapı ortaya koyar. Birçok bireyin HLA lokusundaki alelleri heterozigottur ve parental HLA haplotiplerinin kodladığı HLA antijenleri kodominant kalıtım gösterir. Bundan dolayı HLA bakımından heterozigot olan bireyler, her lokustaki genler tarafından kodlanan iki farklı antijene sahip olmaktadır. HLA genlerinin parental kalıtımı ve HLA gen sistemindeki polimorfik yapı kan kök hücre nakillerinde, hasta ve verici doku uyumu açısından büyük önem arz etmektedir (32). Kan kök hücre nakillerinde hastanın HLA haplotipleri arasındaki bağlantı eşitsizliği güçlü ise HLA uyumlu verici bulabilme olasılığı yüksektir. HLA uyumlu akraba içi ve kardeş adaylardan allojenik kan kök hücre nakli yapılabilirlik şansı daha yüksektir. HLA uyumlu kardeşten yapılan nakillerde Graft Versus Host Hastalığı (GVHH) görülme sıklığı akraba dışı vericiden gerçekleştirilen nakillere göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (33). HLA biriminin adlandırılmasında aşağıdaki nomenklatür kullanılmaktadır (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: HLA nomenklatür

2.4. HLA-DRB4 (HLA-DR53) Haplotipleri

HLA Sınıf II gen bölgesine ait HLA-DR grubundan HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 ya da HLA-DRB1*09 alellerini taşıyan bireyler HLA-DRB4 (HLA-DR53) haplotipini taşırlar (1). HLA-DRB1 tarafından kodlanan özel HLA-DR antijenlerine göre HLA-DRB4 daha düşük seviyede ifade edilmektedir (34,35). HLA-DRB4 promotör polimorfizmi bu lokusun farklı ekspresyonu ile ilişkilidir ve bu mesajcı (m) RNA üretim aşamasında ortaya çıkmaktadır (36). HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*12, HLA-DRB1*13 ve HLA-DRB1*14 alellerini taşıyan bireyler HLA-DRB3 (HLA-DR52) haplotipini; HLA-DRB1*15 ve HLA-DRB1*16 alellerini taşıyan bireyler HLA-DRB5 (HLA-DR51) haplotipini taşırlar (Şekil 2-4). HLA-DRB3 genleri daha yüksek transkripsiyonel aktivite göstermektedir (34,37).



Şekil 2-4: İnsan HLA-DR gruplarının şematik çizimi

Açık kutular aktif genleri, boyalı kutular psödogenleri ifade eder.

<https://basicmedicalkey.com/molecular-hla-typing/>

HLA-DR53 antijenini kodlayan HLA-DRB4 geni sadece HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 ve HLA-DRB1*09 haplotiplerinde vardır. HLA-DRB4 genindeki alelik farklılıklar hem ekzon 2 (beta 1 domen) hem de ekzon 3 (beta 2 domen) ile alakalıdır. HLA-DRB4*01 alelik serisine ilişkin tablo şu şekildedir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: HLA-DRB4 alellerinin serolojik ekivalentleri (9)

DRB4*01
DRB4*0101101 [DR53]
DRB4*0102 [DR53]
DRB4*0103101 [DR53]
DRB4*0103102N [null]
DRB4*01032 [DR53] [hücre hattı W778R]
DRB4*01033 [ekivalenti DRB4*0103101]
DRB4*0104 [serolojik ekivalenti tanımlı değil]
DRB4*0105 [DR53]
DRB4*02
DRB4*0201N [null]
DRB4*03
DRB4*0301N [null]

Üç ana alelden DRB4*0101101 ana aleli MOU-MANN, LKT3, LBUF-LBF, BSM ve PRIESS hücre hatlarında, DRB4*0102 CML hücre hattında, DRB4*0103101 BOLETH, JHAF, DKB ve SUD hücre hatlarında gözlenmiştir ve bir aminoasit yer değiştirmesi ile farklılık göstermektedir. DRB4*0102 beta 1 domeninin 76. kodonunda, DRB4*0103101 beta 2 domeninin 135. kodonunda diğerlerinden farklılık gösterir. DRB4*0104 ve DRB4*0105 ender alelleri de gözlenmiştir (38,39). DBB ve 12762 hücre hatlarında gözlenen DRB4*0103102N, GN016 hücre hattında gözlenen DRB4*0201N ve GN017 hücre hattında gözlenen DRB4*0301N eksprese olmayan null alellerdir (38,40, 41,42).

Tablo 2-2: Ortak HLA-DRB4 haplotipleri (9)

Atasal Haplotip	B/DRB1/DQB1	DRB4	Bw4/6	BF	TNF β	HSPA1B	Sıklık (%)
44.1	44/0401/0301	0101	4	S	1	183	5.1
44.2	44/07/0201	0101	4	F	2	183	3.9
57.1	57/07/03032	0103102N	4	S	2	183	2.7
60.1	60/0404/0302	0101	6	S	2	-	2.6
64.1	64/07/0201	0101	6	S	2	-	1.7
62.1	62/0401/0302	0101/0103	6	S	2	183	1.5 (B62.X)
62.2	62/0401/0302	0103	6	S	2	183	
62.4	62/0401/0302	0103	6	S	2	183	
13.1	13/07/0201	0101	4	S	2	188	1.0
38.1	38/0402/0302	0101	4	S	2	183	< 0.5
47.1	47/07/0201	0101	4	F	2	183	< 0.5
50.1	50/07/0201	0101	6	S	1	-	< 0.5
51.1	51/0404/0301	0103	4	F	2	183	< 0.5
(DKB)	40/0901/0303	0103	6	S	2	183	< 0.5

HLA-DRB1 ve HLA-DRB4 haplotiplerinde yüksek derecede farklılık vardır (43). Yukarıdaki tabloda görüldüğü gibi iki genin farklı evrimsel tarihe sahip olması şaşırtıcı değildir (Tablo 2-2). Bazı HLA-DRB1 alelleri bir HLA-DRB4 alellinden daha fazlasıyla ilişkilidir. Kafkaslarda ve romatoid artiritli diğer hastalarda ortak HLA-DRB4 aleli HLA-DRB4*0103'tür (44).

HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 ve/veya HLA-DRB1*09 alellerini taşıyan HLA-DRB4 haplotiplerinde ekstra DNA taşındığı gösterilmiştir (45,46). Sanger Centre tarafından yapılan HLA-DR53 haplotip dizilemesi ve son zamanlardaki çalışmalarla HLA-DRB4 bölgesinde HLA-DRA ve HLA-DQA1 arasında henüz biyolojik rolleri tam olarak tanımlanamamış *PRKRAP1*, *FAM8A5P*, *LOC100294188*, *LOC100507714* isimli dört psödogen tanımlanmıştır. Başka bir çalışmada HLA kompleksindeki psödogenlerin yüzde 70 oranla yüksek transkripsiyon oranına sahip olduğu HLA-DRB5 ailesine ait

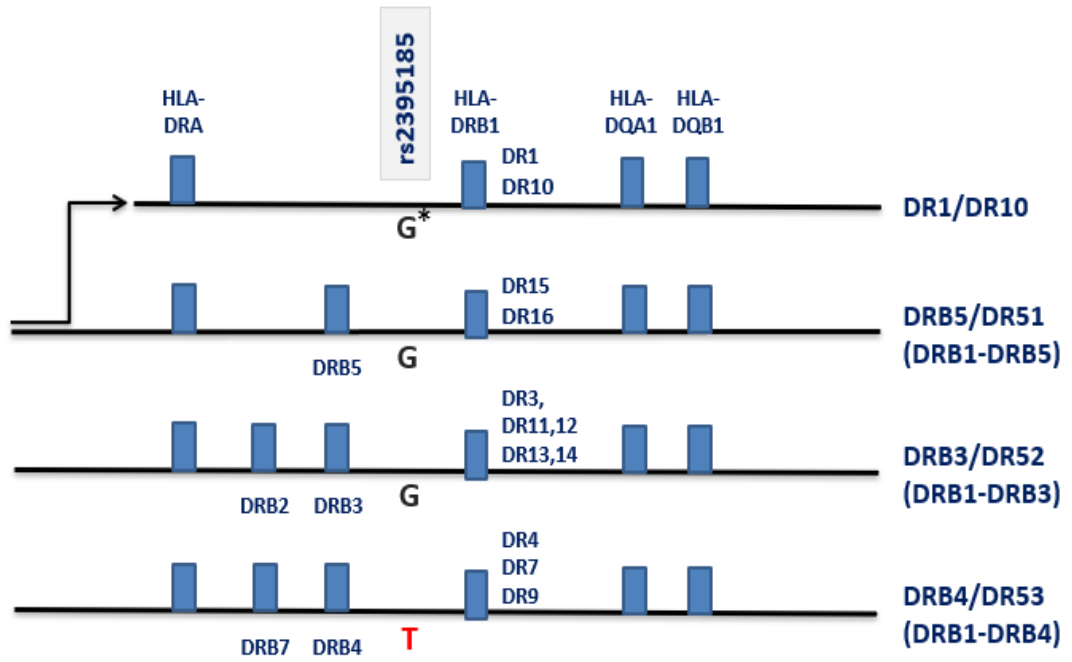
PGF lenfoblastoid hücre hattında gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuca göre HLA-DRB4 ailesine ait spesifik psödogenlerin de transkribe olabileceği üzerinde düşünülmektedir (10,11,12,47,48).

HLA-DR53 molekülü, benzersiz bir peptid bağlama motifine sahiptir ve özellikle sınıf I peptit sunum yolunda yer alan bir otoantijen calreticulin 'p278-292', L-plastin 'p581-595', gliadin, bir melanosit antijeni gp100 ve bir kanser antijeni 'NY-ESO-1' gibi peptitleri bağlar (49,50).

Türkiye’de yapılan yeni doğan popülasyonu üzerindeki çalışmada sağlıklı yeni doğan erkek popülasyonunda HLA-DRB4 homozigotluk sıklığının kız yeni doğan popülasyonuna oranla yüksek olduğu görülmüştür (51). HLA-DR haplotipleriyle ilişkili yapılan bir çalışmada, HLA-DRB4 belirteç sıklığının çocukluk çağı ALL’inde erkeğe spesifik olarak yüksek oranda olduğu gözlenmiştir (2). Aynı zamanda başka bir çalışmada da HLA-DR53 kodlayan HLA-DRB4*01 homozigot sıklığının da çocukluk çağı ALL’inde erkek hastalarda yüksek oranda anlamlı olduğu görülmüştür (3). HLA-DRB4 belirteç veya homozigot sıklığının çocukluk çağı ALL’inde erkekler için risk faktörü olduğu düşünülmektedir.

2.5. HLA DRB4 (HLA-DR53) Haplotip Belirteci rs2395185

SNP rs2395185 [Guanin(G)/T], HLA-DR alt gruplarının intergenik bölgesinde bulunur ve T alel varyantı ile HLA-DRB4 haplotiplerinin belirtecidir (Şekil 2-5). Ender olarak HLA-DRB1*01:02 haplotiplerinin de T varyantını taşıdıkları görülmüştür (1).

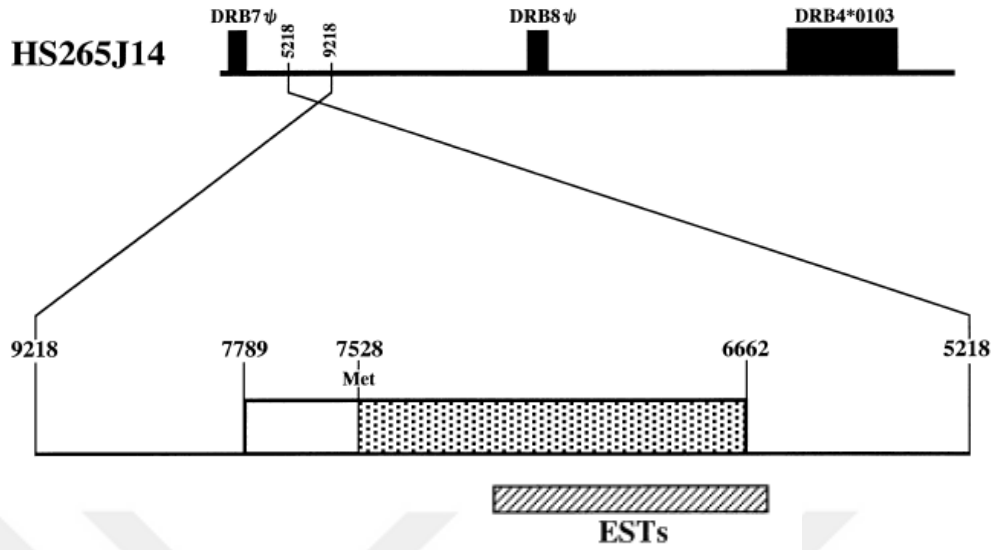


Şekil 2-5: rs2395185'in şematik gösterimi (1)

2.6. İnterferon İndükleyici Çift Zincirli RNA Bağlayan Protein Kinaz A, PRKRA

2.6.1. HLA Kompleksi DR Alt Bölgesinde Çift Zincirli RNA Bağlayan Gen Lokalizasyonunun Analizi

1998 yılında Chida ve arkadaşlarının HLA-DRB4 genini, HLA-DRB7 ve HLA-DRB8 psödogenini gösterdikleri PAC klonu HS265J14'ün 5218 ve 9218 numaralı nükleotit dizi pozisyonları arasındaki bölgenin, *Xlrp* geni ve HIV-1 TAR RNA'sını bağlayan *TRBP* geninin dizileri ile yüksek benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 2-6) (10).



Şekil 2-6: PAC HS265J14 ve muhtemel çift zincirli RNA bağlayan proteini kodlayan bölgenin büyütülmüş hali (10)

Açık ve noktalı kutuyla gösterilen açık okuma çerçevesindeki ilk Metionin kodonu Met olarak gösterilmiştir. Şekildeki noktalı kutu *Xlrp* ve *TRBP*'ye homolog bölgedir ve bu bölgenin dizisi, çok fazla ESTs (expressed sequence Tags) denilen anlatım yapan dizilerle anlamlı dizi homolojisi gösterir. Şekildeki dikey numaralandırmalar PAC HS265J14 klonundaki numaralandırma temelli nükleotit pozisyonlarını ifade eder.

PAC HS265J14 klonlarında keşfedilen yeni protein kodlaması beklenen bölgenin insan HLA-DR alt gruplarındaki nükleotit dizisi ile %98,4 eşlenik olduğu görülmüştür. Sonrasında HLA-DR gruplarında tanımlanan ve çift zincirli RNA bağlayan protein kodladığı önerilen genin ismi *hsRBP* iken HUGO ve Human Gene Nomenclature Committee'sinin önerileri ile *PRKRA* olarak değiştirilmiştir (10,11). *HsRBP*, *Xlrp* ve *TRBP* genleri ile homoloji gösterdiği gibi çift zincirli RNA bağlayan PKR aktivatörü protein geni *PACT* ile %98,4 nükleotit seviyesinde ve %99 aminoasit seviyesinde eşleniktir. Dizileme çalışmaları sonucu *HsRBP*, hem PAC klonlarında hem de insan DR alt bölgesinde intron dizisi taşımadığı için psödogen olarak düşünülmüş ve HLA Sınıf II bölgesinde aktif olmayan bir gen kalıntısı olduğu ileri sürülmüştür (10).

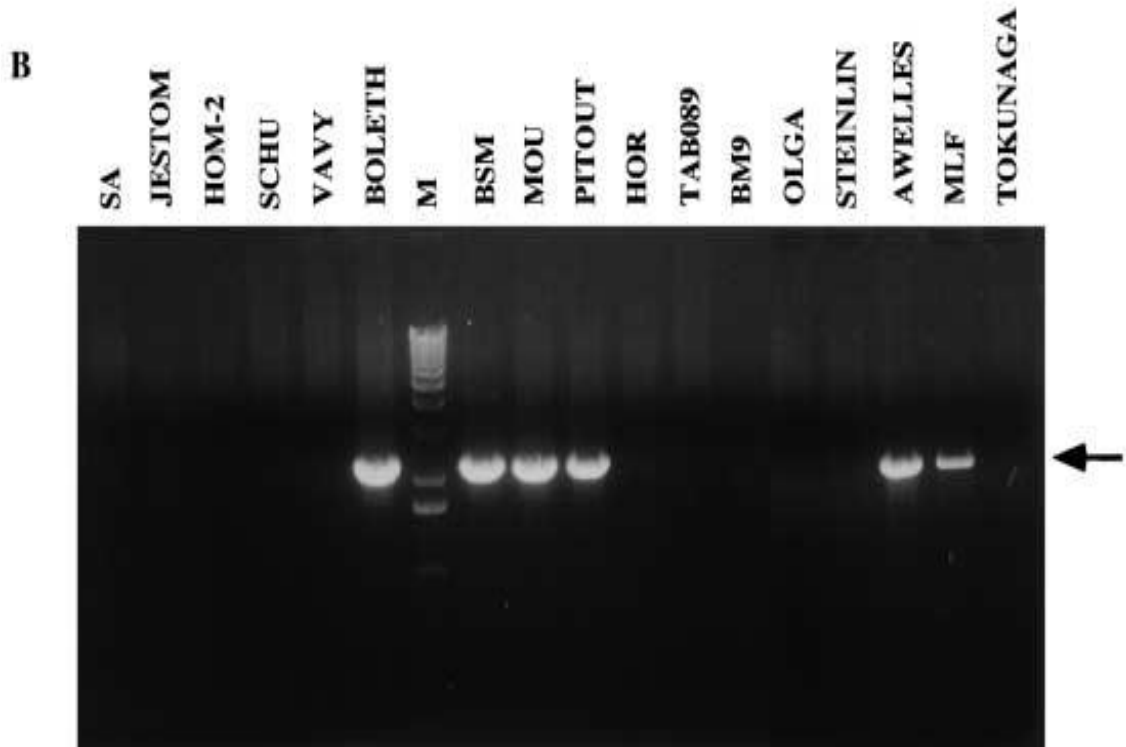
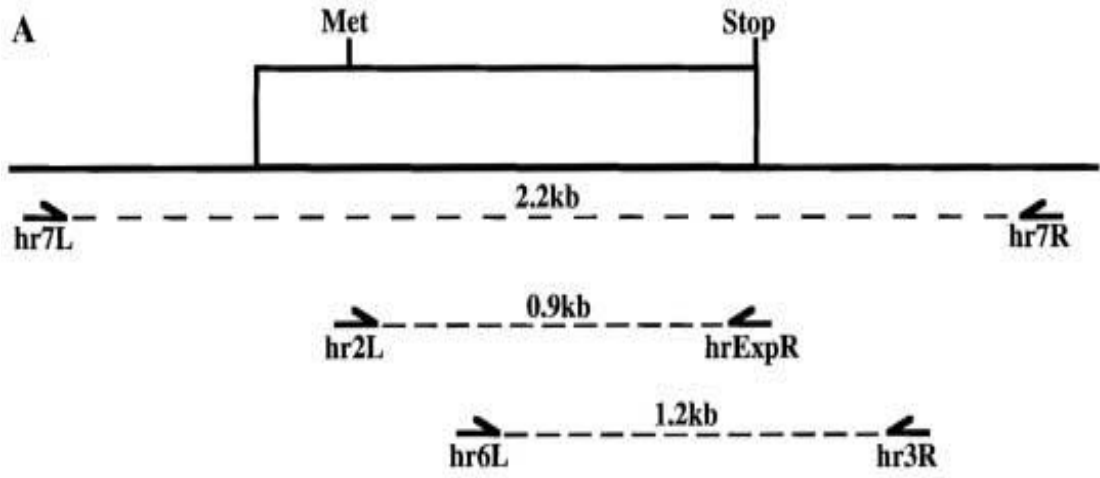
2.6.2. HLA Sınıf II Bölgesinde *PRKRA* Geninin Haplotipe Spesifik Kodlanması

Yapılan bir çalışmada sağlıklı bireylerden alınan periferik kan örneklerinin lenfositleri kullanılarak DRB1 lokusuna yönelik PZR çalışması yapılmıştır. PZR sonucu DRB1 alelleri açısından homozigot hücre hatları belirlenmiştir. Belirlenen homozigot

hücre hatlarında *PRKRA* genine özgü yapılan PZR ve %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüleme yöntemleri sonucu *PRKRA* geninin HLA-DR53 grubuna spesifik olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2-3) (Şekil 2-7) (11).

Tablo 2-3: HLA-DRB1 lokusu homozigot hücre hatları (11)

Hücre Hattı	DRB1	DR Grup
SA	*0101	DR1
JESTOM	*0101	DR1
HOM-2	*0101	DR1
SCHU	*1501	DR51
TOKUNAGA	*1502	DR51
HOR	*0301	DR52
STEINLIN	*0301	DR52
VAVY	*0301	DR52
BOLETH	*0401	DR53
BSM	*0401	DR53
AWELLES	*0401	DR53
MLF	*0401	DR53
MOU	*0701	DR53
PITOUT	*0701	DR53
BM9	*0801	DR8
OLGA	*08022	DR8
TAB089	*0801	DR8

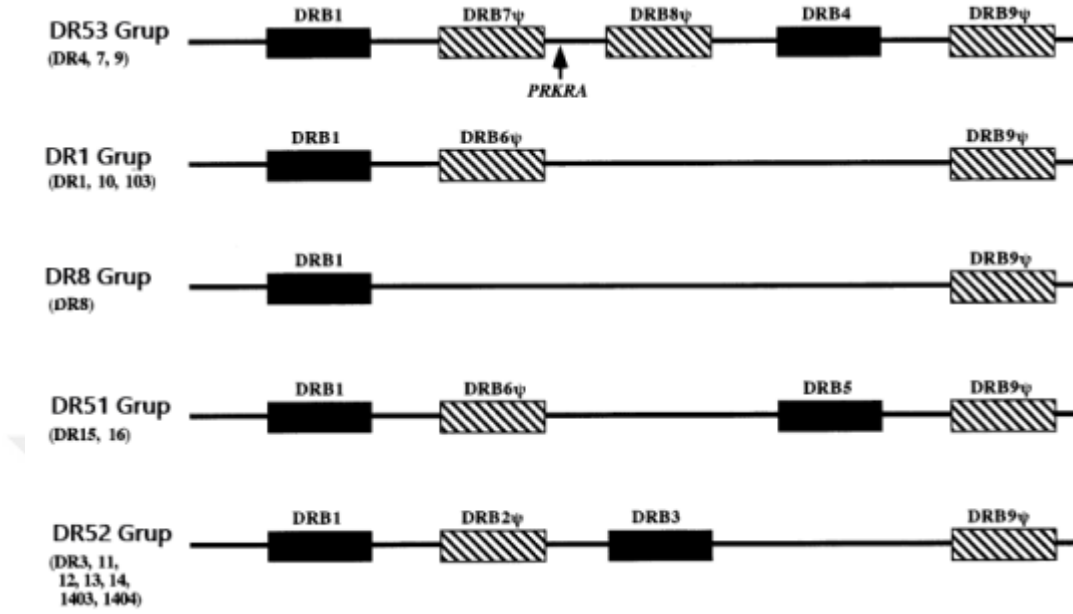


Şekil 2-7: *PRKRA* geninin PZR ile tespiti (11)

A: Homozigot hücre hatlarında *PRKRA* genini çoğaltmak için üç set primer ile PZR gerçekleştirilmiştir. (Met: Metionin kodonu, Stop: Stop kodonu)

B: M, 1 kb'lık DNA ladder marker olarak gösterilmiştir. %1'lik agaroz jel elektroferezinde etidyum bromid ile sadece HLA-DR53 grubuna ait PZR ürünleri görüntülenebilmiştir.

PRKRA geninin pozisyonu Şekil 2-8’de verilmiştir.

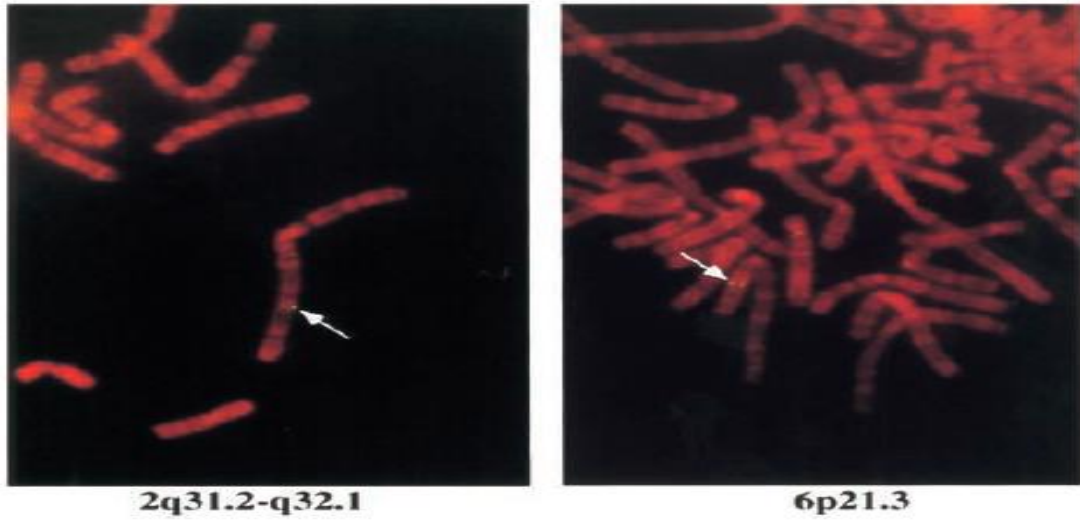


Şekil 2-8: *PRKRA* geninin pozisyonu (11)

Her DR grubunun genom organizasyonunun şematik çizimi. Boyalı ve çizgili kutular sırasıyla fonksiyonel genleri ve psödogenleri ifade eder. DR53 grubuna spesifik olan *PRKRA* nükleotit dizisinin pozisyonu okla gösterilmiştir.

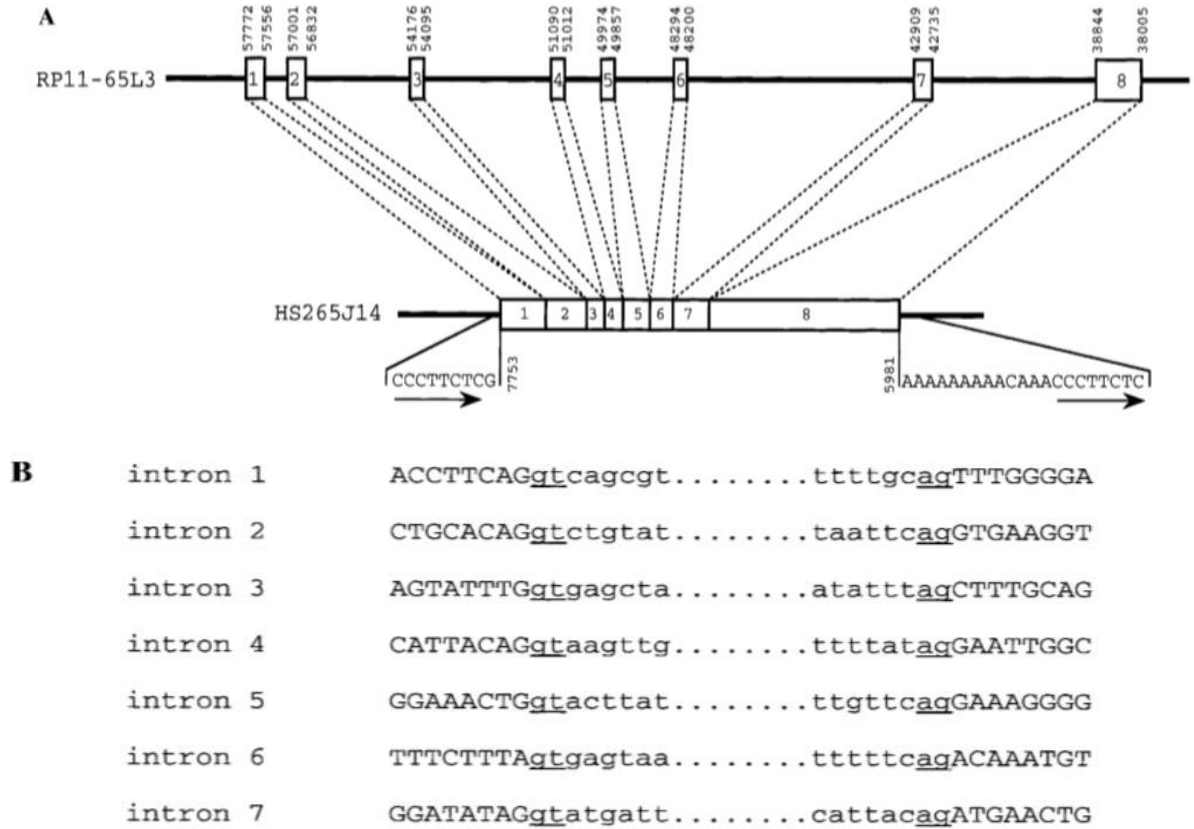
2.6.3. *PRKRA* Geninin Moleküler Yapısı ve Özellikleri

HLA-DR haplotipleri tiplendirilmiş sağlıklı bireylerle yapılan bir çalışmada, *PRKRA* geni prob olarak kullanılarak gerçekleştirilen FISH ve sekans çalışmaları sonucu *PRKRA* geninin 6. kromozomda taşındığı, DRB4 taşıyan haplotiplere özgü olduğu ve hiç intron taşımadığı belirlenmiştir. 6. kromozomda DRB4 haplotiplerine spesifik olan *PRKRA* geni intron dizisi olmadığı için psödogen olarak önerilip *PRKRAP1* olarak adlandırılmıştır. Bütün haplotiplerde 2q31.2-q32.1 kromozmunda görülen sinyal ve ardından gelen sekans çalışmaları *PRKRAP1* psödogeninin ana kopyasının 2. kromozomda olduğunu ve 8 ekzon, 7 intron içerdiğini göstermiştir (Şekil 2-9) (Şekil 2-10) (11).



Şekil 2-9: *PRKRA* geninin FISH profili (11)

HLA-DRB1*0405 haplotipini homozigot taşıyan sağlıklı bir bireyin periferik kan örneği kullanılarak hazırlanan *PRKRA* geninin FISH profillerinde hem 2. kromozomda hem de 6. kromozomda sinyal görülmüştür.



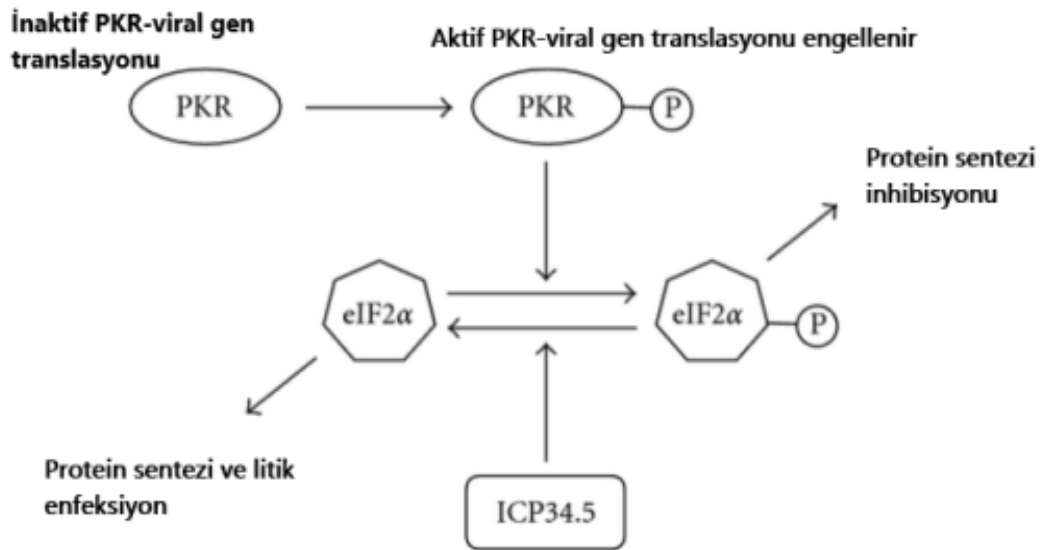
Şekil 2-10: *PRKRA* geni ve psödojeninin ekzon-intron bağlantıları (11)

A: RP11-65L3 ve HS265J14 klonunda sırasıyla *PRKRA* geni ve *PRKRA* psödogeni gösterilmiştir. Numaralı kutular ekzonları ifade ederken dikey numaralandırmalar nükleotit pozisyonlarını ifade eder. (A: Adenin C: Sitozin T:Timin G:Guanin)

B: *PRKRA* geninin ekzon-intron bağlantılarında nükleotit dizisi gösterilmiştir. Büyük harfler ekzon dizilerini gösterirken küçük harfler gösterilen intron dizilerinde altı çizili olarak GT-AG rolünün izlendiği görülmüştür. (A,a: Adenin C,c: Sitozin T,t:Timin G,g:Guanin)

Apoptoz, kalıcı Endoplazmik Retikulum (ER) stresi ve virüs enfeksiyonu gibi ekstrasellüler ve intrasellüler uyarıların kombinasyonu ile tetiklenmiş hücre ölümüdür (52,53). PKR interferon aracılı antiviral immün yanıtın majör faktörü olarak apoptoz, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, antiviral immün yanıt ve hücrel sinyal iletiminde rol oynar (54,55,56). *PRKRA*, *PACT* ya da *RAX* (PKR aracılı protein X) olarak da adlandırılan PKR aktivatör proteindir ve ER stresi ya da virüsle uyarılmış yolaklardaki hücrelerin adaptasyonunu düzenleyen koruyucu bir proteindir (57,58).

Viral gen translasyonu ile çift zincirli RNA olması durumunda PKR fosforillenerek PKR aktivasyonu olur ve aktivasyon transkripsiyon faktörü eIF2a'nın fosforilasyonuna, eIF2a'nın fosforilasyonu da translasyon inhibisyonuna ve apoptoz indüksiyonuna yol açar (Şekil 2-11) (59, 60, 61).



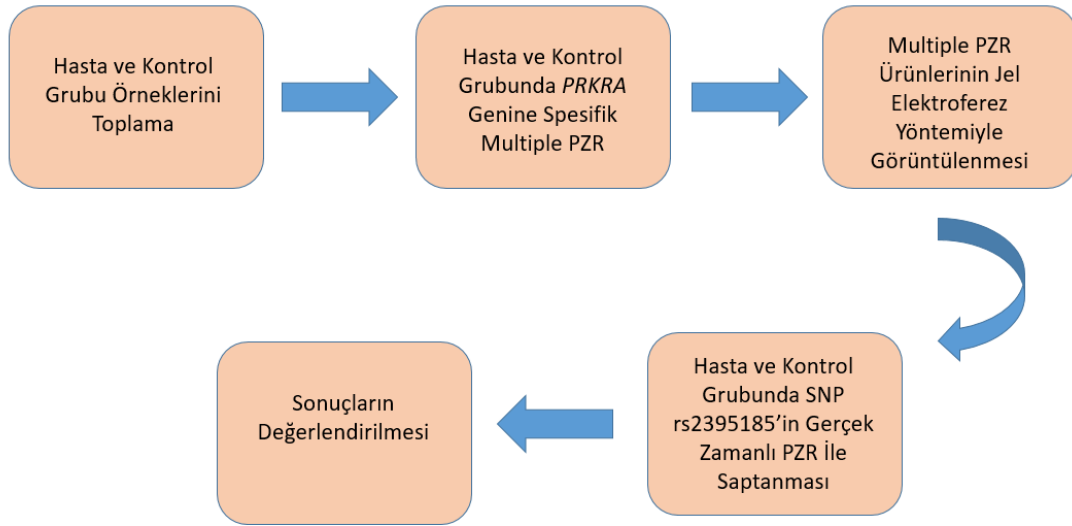
Şekil 2-11: PKR yolu

https://www.researchgate.net/figure/Oncolytic-mechanism-of-Herpes-Simplex-Virus-Viral-RNA-activates-the-double-stranded-RNA_fig1_230686324

PRKRA'nın üç domeni vardır. İlk iki domeni çift zincirli RNA bağlar (62,63); fakat bu yapı PKR aktivasyonu için yeterli değildir. PRKRA'nın üçüncü domeni PKR'nin C terminal domenine direk bağlanarak PRKRA'nın çift zincirli RNA bağlamış diğer iki domeninin de PKR'ye bağlanmasını kolaylaştırarak PKR aktivasyonunu tetikler (64,65). ER stresi de PRKRA aracılı PKR aktivasyonu ile eIF2a/ATF4/CHOP (Eukaryotic Initiation Factor 2a/Activating Transcription Factor 4/CCAAT-Enhancer-Binding Protein Homologous) aracılı apoptatik ölüm yolağına neden olur (66,67). Yapılan bir çalışmada ot sazanı (*Ctenopharyngodon idella*) PRKRA promotör bölgesine in vitroda ot sazanı interferon regüle edici faktör (CiIRF2) ve ot sazanı transkripsiyon aktifleştirici 4 (CiATF4)'ün yüksek afinite ile bağlandığı; fakat in vivo'da CiIRF2 ve CiATF4'ün CiPRKRA'sının promotör aktivitesini ve transkripsiyon seviyesini azalttığı görülmüştür (68).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın Kurgusu



Şekil 3-1: Çalışmanın kurgusu

3.2. Hasta ve Kontrol Grubu

2008 ve 2015 yılları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doku Tipleme Laboratuvarlarında PZR-Sequence Specific Primer (SSP) yöntemiyle düşük çözünürlük seviyesinde HLA-DRB1/3/4/5 lokusları tiplendirilmiş, DNA'sı yeterli miktarda olan ve ailelerinden katılımcı onayı alınan 17 yaş ve altı ALL'li 60 çocuk hasta çalışmaya alınmıştır. Çalışmamızda kontrol grubu için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doku Tipleme Laboratuvarlarında PZR-Sequence Specific Primer (SSP) yöntemiyle düşük çözünürlük seviyesinde HLA-DRB1/3/4/5 lokusları tiplendirilmiş ve katılımcı onayı alınan 18 yaş ve üstü 40 gönüllü verici seçilmiştir.

3.3. Multiple PZR ve Agaroz Jel Elektroferezi

3.3.1. Multiple PZR

3.3.1.1. Oligonükleotit Sentezi

6. kromozomdaki *PRKRA* genine spesifik her6l (5'-TTGGTTCATTACAGGAATTGG-3') ve her3r (5'-CAAAGAAGAGCTTAAGCACC-3') oligonükleotitleri sipariş edilmiştir. her6l ve her3r asıl primerleri kullanılarak 6. kromozomdaki 1.2 kb'lık bir bölgenin multiple PZR ile çoğaltılması hedeflenmiştir.

Çalışmamızda *PRKRA* geni ile birlikte internal kontrol (TAPA) dizisinin çoğaltılması hedeflenerek PZR işleminin gerçekleşip gerçekleşmediği test edilmek istenmiştir. Bu nedenle internal kontrolün 5'-TCATGCCCCCTCCCAACCC-3' ve 5'-CCCACCCTCTACCCCTG-3' primerleri de asıl primerlerle birlikte satın alınmıştır.

3.3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Plastik Malzemeler

- Otomatik pipet (10, 100 ve 1000 µl'lik) (Eppendorf)
- Otomatik pipet ucu (10, 100 ve 1000 µl'lik)
- 96 kuyucuklu eppendorf PZR tabağı
- 0,2 ml'lik PZR tüpleri
- Buzdolabı (+40 °C) (Regal)
- Vorteks (Heidolph)
- Thermal döngü cihazı (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)

3.3.1.3. Multiple PZR Reaksiyon Solüsyonu Hazırlama

Her bir örnek için otomatik pipetler ve uçları yardımıyla 0,2 ml'lik eppendorf tüplerinde 25µl'lik reaksiyon solüsyonu hazırlanmıştır. Reaksiyon solüsyonu içeriği aşağıdadır:

- Deoksinükleosid trifosfat (dNTP), MgCl₂ ve stabilizatör içeren 8 µl master mix
- 1 µl her6l primer (13,33 µM),
- 1 µl her3r primer (13,33 µM),
- 0,5 µl TAPA sense primer (20 µM),
- 0.5 µl TAPA antisense primer (20 µM),
- 1 µl Taq polimeraz (FastStart™ Taq DNA Polymerase),
- 2µl hedef DNA örneği (20-60 ng),

- 11 µl ribonükleaz (RNaz) serbest su.

3.3.1.4. Termal Döngü

Thermal döngü cihazı olarak Thermo Fisher Scientific tarafından sunulan Applied Biosystems kullanılmıştır. Thermal döngü cihazının profili aşağıdadır:

- 96 °C’de 10 dk denatürasyon,
- 35 döngü süren ampfikasyon için 96 °C’de 30 sn denatürasyon, 59 °C’de 30 sn bağlanma, 72 °C’de 2.3 dk uzama,
- 72 °C’de 5 dk final uzama.

3.3.2. Agaroz Jel Elektroferezi

3.3.2.1. Kullanılan Cihazlar, Plastik ve Cam Malzemeler

- Otomatik pipet (10, 100 ve 1000 µl’lik) (Eppendorf)
- Otomatik pipet ucu (10, 100 ve 1000 µl’lik)
- Alüminyum folyo
- Jel elektroferez görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, PRIZMA ve SONY)
- Jel elektroferez tankı (Cleaver Scientific LTD.)
- Tartı (Sartorius)
- Erlen
- Mikrodalga fırın (Beko)
- 5 ml’lik cam pipet (ISOLAB)

3.3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- TBE [Tris-borate-EDTA (etilen diaminetraasetik asit)] buffer (10X TBE Buffer, Liquid, MULTICELL)
- Agaroz (Lonza)
- Etidyum bromid (Olerup SSP AB Lot No: 89v)
- Distile su
- Yükleme bufferı

3.3.2.3. Agaroz Jel Elektroferezi Hazırlama ve Görüntüleme

1,5 gr olarak tartılmış agaroz, erlende 5ml’lik TBE solüsyonu ve distile su ilavesi ile 100 ml’ye tamamlanır. Kaynatılmış solüsyon ılık hale 1 damla Etidyum Bromid ilavesi ile karıştırılarak agaroz jel elektoferez tankına dökülür.

Multiple PZR DNA ürünleri yükleme bufferi karışımı ile boyanmış olarak agaroz jel elektroferez tankında 15 dk 170 Volt altında yürütülür. Jel elektroferezi Ultraviyole (UV) ışık altında görüntülenir.

3.4. Gerçek Zamanlı PZR

3.4.1. Gerçek Zamanlı PZR Kit İçeriği

Çalışmamızda rs2395185 SNP’nin saptanması için gerekli kit Primerdesign tarafından sunulan Genesig’ten sağlanmıştır. Gerçek zamanlı PZR kit içeriği aşağıdadır:

- ROX ve VIC işaretli rs2395185 genotipleme primer/prob mix
- Yabanıl tip pozitif kontrol şablonu
- Varyant tip pozitif kontrol şablonu
- Primer/prob mix resüspansiyonu için RNaz/Deoksiribonükleaz (DNaz) serbest su
- Pozitif kontrol şablonu resüspansiyonu için şablon hazırlama bufferi
- Precision®FAST 2X Kantitatif (Quantitative; Q) PZR master mix

3.4.2. Kullanılan Cihazlar ve Plastik Malzemeler

- VIC ve ROX kanalları aracılığıyla floresan okuyabilen gerçek zamanlı PZR cihazı (Rotor Gene Q, Qiagen)
- Otomatik pipet (10, 100 ve 1000 µl’lik) (Eppendorf)
- Otomatik pipet ucu (10, 100 ve 1000 µl’lik)
- Vorteks (Heidolp)
- Spin cihazı (Multi-Spin, Bioasan)
- İnce duvarlı 1.5 ml PZR reaksiyon tüpleri
- 0,1 ml’lik gerçek zamanlı PZR cihazı tüpleri
- Gerçek zamanlı PZR tüpleri tabağı soğuk tankı
- Buzdolabı (+40 °C) (Regal)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000)

3.4.3. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü

3.4.3.1. Resüspansiyon Protokolü

- 1- Liyofilize edilmiş primer ve prob mixlerinin dökülmemesi için açmadan önce her tüp yüksek devirde kısa sürede santrifüj edilir.
- 2- Aşağıdaki tabloya göre RNaz/DNaz serbest suda primer/prob mixi süspanse edilir. Yeniden süspansiyonu tamamlamak için tüp iyice vortekslenir (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Suda resüspansiyon

Komponent - Suda Resüspansiyon	Hacim
pre-PZR paketi	
rs2395185 primer/prob mix	55 µl

- 3- Aşağıdaki tabloya göre, şablon hazırlama bufferında pozitif kontrol şablonları süspanse edilir. Yeniden süspansiyonu tamamlamak için tüpler iyice vortekslenir (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: Şablon hazırlama bufferında resüspansiyon

Komponent-Şablon Hazırlama Bufferında Resüspansiyon	Hacim
Post-PZR ısı yalıtımlı folyo	
Yabanıl tip pozitif kontrol şablonu *	500 µl
Varyant tip pozitif kontrol şablonu *	500 µl

*Bu bileşen, yüksek kopya numarası şablonu içerir ve çok önemli bir kontaminasyon riskidir. Diğer bileşenlerden ayrı bir laboratuvar ortamında açılmalı ve kullanılmalıdır.

3.4.3.2. Gerçek Zamanlı PZR Saptama Protokolü

- 1- Aşağıdaki tabloya göre her bir primer/prob mixi için tamamlayıcı genotipleme reaksiyonu karışımı hazırlanır. Tüm örnekler, pozitif ve negatif kontroller için yeterli reaksiyonları içerir (Tablo 3-3).

Tablo 3-3: Komponent içeriği

Komponent	Hacim
Precision®FAST2X Q-PZR master mix	10 µl
rs2395185 primer/prob mix	1 µl
RNaz/DNaz serbest su	4 µl
Final Hacim	15 µl

2- Her bir Q-PZR deney plate kuyusuna hazırlanan bu karışımdan 15 µl eklenir.

3- Her örnek için DNA şablonları hazırlanır.

4- Her bir Q-PZR deney plate kuyusuna 5 µl DNA örneği eklenir. Güçlü bir sinyal elde etmek için, önerilen DNA konsantrasyonu 0.2-2ng/µl (toplamda 1-10ng) ve ideal toplamı 5 ng olmalıdır. Her oyuktaki son hacim 20 µl'dir.

5- Negatif kontrol kuyusu için DNA yerine 5µl RNaz/DNaz serbest su, yabancı tip kontrol kuyusu için DNA yerine 5 µl yabancı tip pozitif kontrol şablonu ve varyant tip kontrol kuyusu için DNA yerine 5 µl varyant tip pozitif kontrol şablonu ile final hacim 20 µl'ye tamamlanır. Resüspanse edilmiş pozitif kontrol şablonları 1-5 ng DNA örnekleri için 1:250 oranında dilüsyon faktörü ile sulandırılarak kullanılmalıdır. Şablon hazırlama tamponunda pozitif kontrol DNA'sı seyreltilir. Pozitif kontrol DNA'sı için kopya sayısının her bir reaksiyona ilave edilen örnek DNA miktarıyla eşleşmesi önemlidir. Pozitif kontrol DNA'sı aşağıdaki tabloya göre seyreltilmelidir (Tablo 3-4).

Tablo 3-4: Pozitif kontrol dilüsyon faktörü

Örnek DNA	Pozitif Kontrol Dilüsyon Faktörü
10ng	1:25
5ng	1:50
1ng	1:250

3.4.3.3. Gerçek Zamanlı PZR Amplifikasyon Protokolü

Gerçek zamanlı PZR amplifikasyon protokolü Tablo 3-5'te verilmiştir.

Tablo 3-5: Precision FAST2X Q-PZR master mix için protokol

	Adım	Zaman	Sıcaklık
	Enzim Aktivasyonu	2 dk	95 °C
Döngüx10	Denatürasyon	10 sn	95 °C
	Uzama	60 sn	60 °C
Döngüx50	Denatürasyon	10 sn	95 °C
	Uzama (DATA TOPLAMA) *	60 sn	68 °C

*Bu aşamada ROX ve VIC kanalları aracılığıyla floresan veriler toplanmalıdır.

3.4.4. Sonuçların Yorumlaması

Yabancı tip prob, ROX kanalı boyunca okunacak şekilde etiketlenirken, varyant prob VIC kanalı üzerinden okunacak şekilde etiketlenir. Yabancı tip sekanslarda, ROX kanalı güçlü bir amplifikasyon grafiği verirken VIC kanalının çok düşük saptama vermesi ya da hiç saptamama vermemesi beklenir. Heterozigot örnekler, hem ROX hem de VIC kanalları aracılığıyla sinyal verecektir. Her bir numunenin genotipi, iki kanal arasındaki sinyallerin oranı karşılaştırılarak hesaplanır.

3.5. İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri Statistic Packet of Social Science (SPSS 21.0) yazılım programı kullanılarak yapılmıştır.

Tanımlayıcı analizler, descriptive fonksiyonu ile yapılmıştır. Kontrol ve hastaların temel demografik verilerini değerlendirmek için tanımlayıcı istatistik yöntemleri kullanılmıştır.

Kategorik verilerin karşılaştırılması sıklık ve oranlar ile belirlenmiş ve sonuçlar yüzde değerler şeklinde temsil edilmiştir. Gruplar arası farkları belirlemek için ki-kare testi kullanılmıştır.

Normal dağılıma uygun olup iki grup arası sayısal karşılaştırmalarda parametrik testlerden Student t testi, normal dağılıma uymayan iki grup arası karşılaştırmada ise Mann Whitney Testi kullanılmıştır. Normal dağılıma uymayan veriler ve ikiden fazla grup arasındaki sayısal karşılaştırmalarda ise Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Özellikleri

4.1.1. Hasta ve Kontrol Grubunda Yaş ve Cinsiyet Durumu

Çalışmamızda hasta grubu 46'sı erkek (%76.7) ve 14'ü kadın (%23.3) olmak üzere 60 kişiden oluşuyordu. Hasta grubunun yaş aralığı 1-17 (7.83 ± 4.9) iken hasta grubunda erkek yaş aralığı 1-17 (7.79 ± 5.1) ve hasta grubunda kadın yaş aralığı 1-17 (7.93 ± 4.8) idi. Hasta grubunda erkek ve kadınların yaşları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0.926$).

Çalışmamızda kontrol grubu 19'u erkek (%47.5) ve 21'i kadın (%52.5) olmak üzere 40 kişiden oluşuyordu. Kontrol grubunun yaş aralığı 21-41 (29.03 ± 5.4) iken kontrol grubunda erkek yaş aralığı 21-41 (29.11 ± 5.5) ve kontrol grubunda kadın yaş aralığı 21-41 (28.95 ± 5.5) idi. Kontrol grubunda erkek ve kadınların yaşları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0.931$).

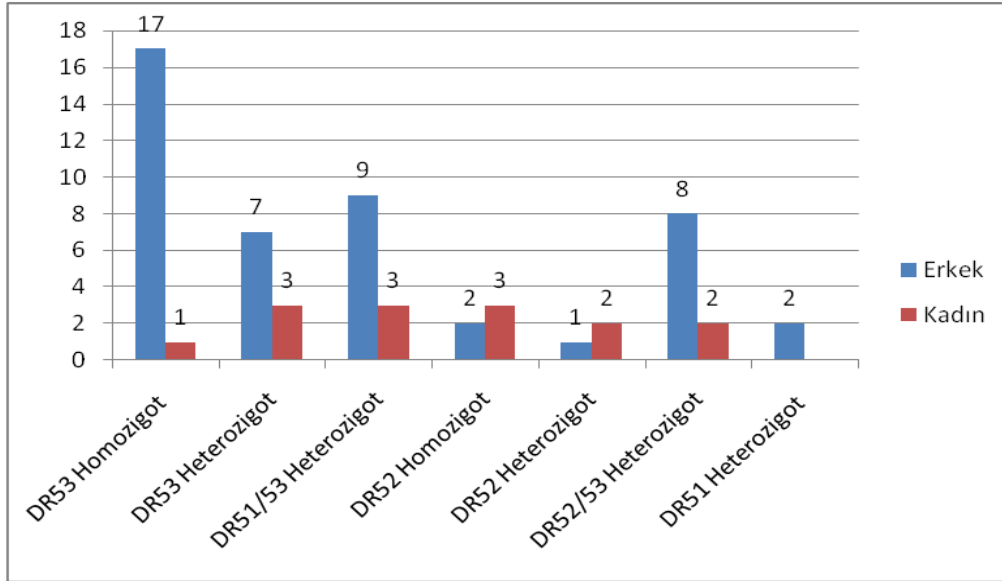
4.1.2. Hasta ve Kontrol Grubunda DR Süpertipleri

4.1.2.1. Hasta Grubunda DR Süpertipleri ve Cinsiyetlere Göre Dağılımı

ALL tanılı 60 hastanın 18'i (17 E, 1K) DR53 homozigot, 10'u (7 E, 3K) DR53 heterozigot, 12'si (9E, 3K) DR51/53 heterozigot, 5'i (2E, 3K) DR52 homozigot, 3'ü (1 E, 2K) DR52 heterozigot, 10'u (8E, 2K) DR52/53 heterozigot, 2'si (2E) DR51 heterozigot idi (Tablo 4-1) (Şekil 4-1).

Tablo 4-1: Hasta grubu HLA-DR süpertiplerinin yüzdelerle dağılımı

HLA-DR Süpertip /DRB1 alel	Hasta (n=60)
DR51 /Heterozigot	2 (%3.3)
DR52 /Heterozigot	3 (%5.0)
DR53 /Heterozigot	10 (%16.7)
DR52 /Homozigot	5 (%8.3)
DR53 /Homozigot	18 (%30.0)
DR51/53 /Heterozigot	12 (%20.0)
DR52/53 /Heterozigot	10 (%16.7)



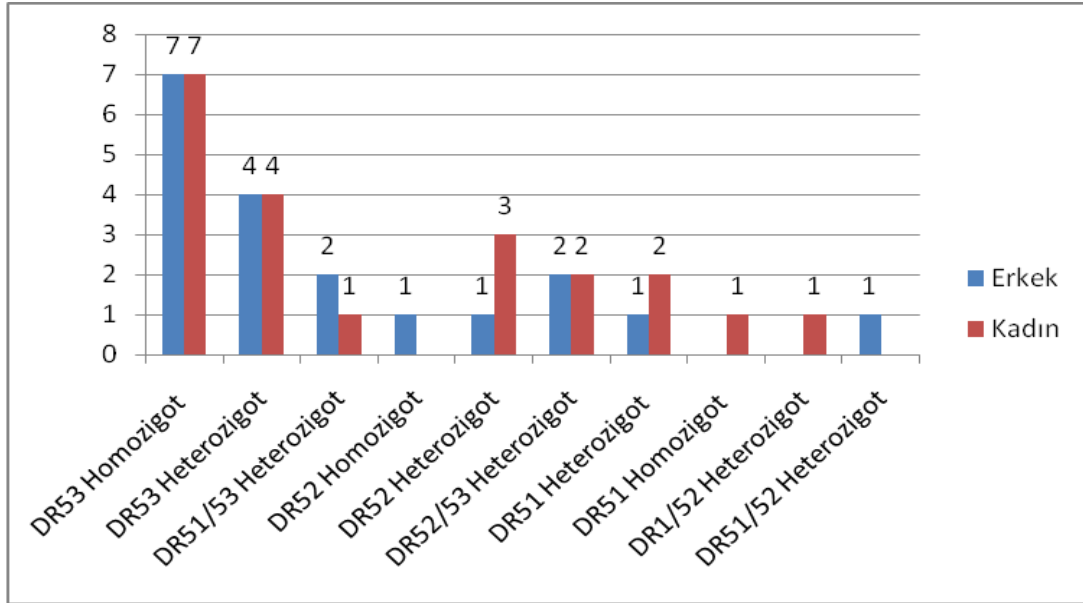
Şekil 4-1: Hasta grubunun DR süper tiplerinin cinsiyetlere göre dağılımı

4.1.2.2. Kontrol Grubunda DR Süper tipleri ve Cinsiyetlere Göre Dağılımı

40 kişilik kontrol grubunun 14'ü (7E, 7K) DR53 homozigot, 8'i (4E, 4K) DR53 heterozigot, 3'ü (2E, 1K) DR51/53 heterozigot, 1'i (1E) DR52 homozigot 4'ü (1E,3K) DR52 heterozigot, 4'ü (2E, 2K) DR52/53 heterozigot, 3'ü (1E, 2K) DR51 heterozigot, 1'i (1K) DR51 homozigot, 1'i (1K) DR1/52 heterozigot, 1'i (1E) DR51/52 heterozigot idi (Tablo 4-2) (Şekil 4-2).

Tablo 4-2: Kontrol grubu HLA-DR süper tiplerinin yüzdelik dağılımı

HLA-DR Süper tip /DRB1 alel	Kontrol (n=40)
DR51 /Heterozigot	3 (%7.5)
DR52 /Heterozigot	4 (%10.0)
DR53 /Heterozigot	8 (%20.0)
DR52 /Homozigot	1 (%2.5)
DR53 /Homozigot	14 (%35.0)
DR51/ Homozigot	1 (%2.5)
DR51/53 /Heterozigot	3 (%7.5)
DR52/53 /Heterozigot	4 (%10.0)
DR51/52 /Heterozigot	1 (%2.5)
DR52/01 /Heterozigot	1 (%2.5)

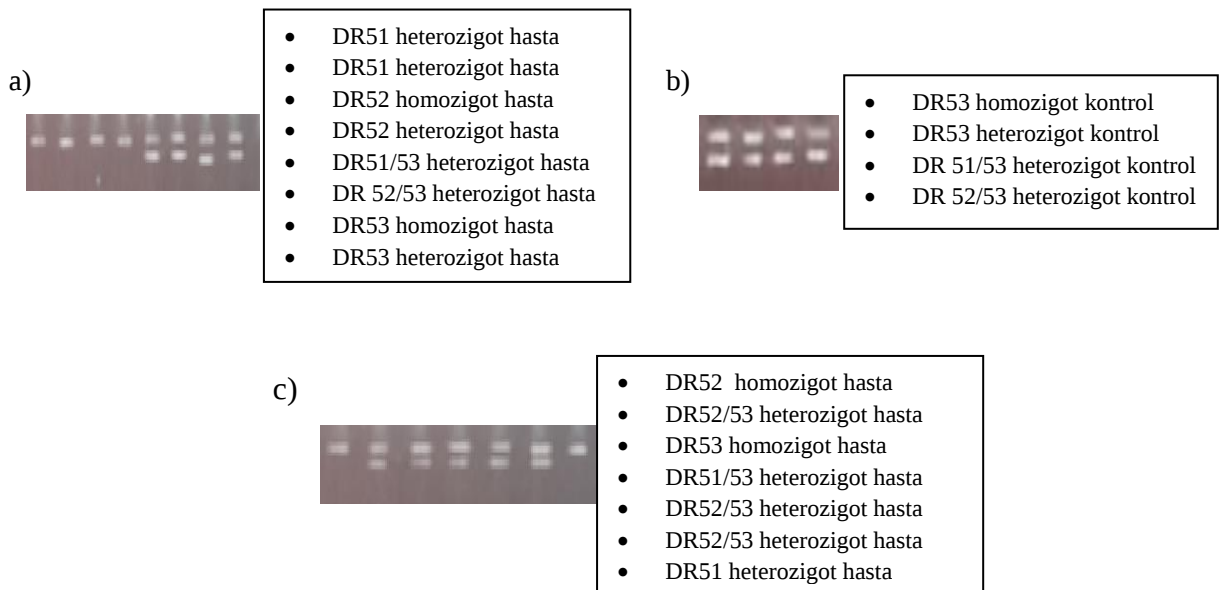


Şekil 4-2: Kontrol grubunun DR süper tiplerinin cinsiyetlere göre dağılımı

4.2. Multiple PZR Sonuçları

4.2.1. Multiple PZR Jel Elektroferezi Görüntüleri

Hasta ve kontrol grubunda *PRKRA* genine spesifik olarak gerçekleştirilen multiple PZR jel elektroferezi görüntüleri değerlendirilmiştir. Internal kontrol tüm örneklerde pozitif iken, hem hasta hem de kontrol grubunda *PRKRA* genine ait bant HLA-DR53 haplotipini taşıyan bireylerde tespit edilmiştir (Şekil 4-3).

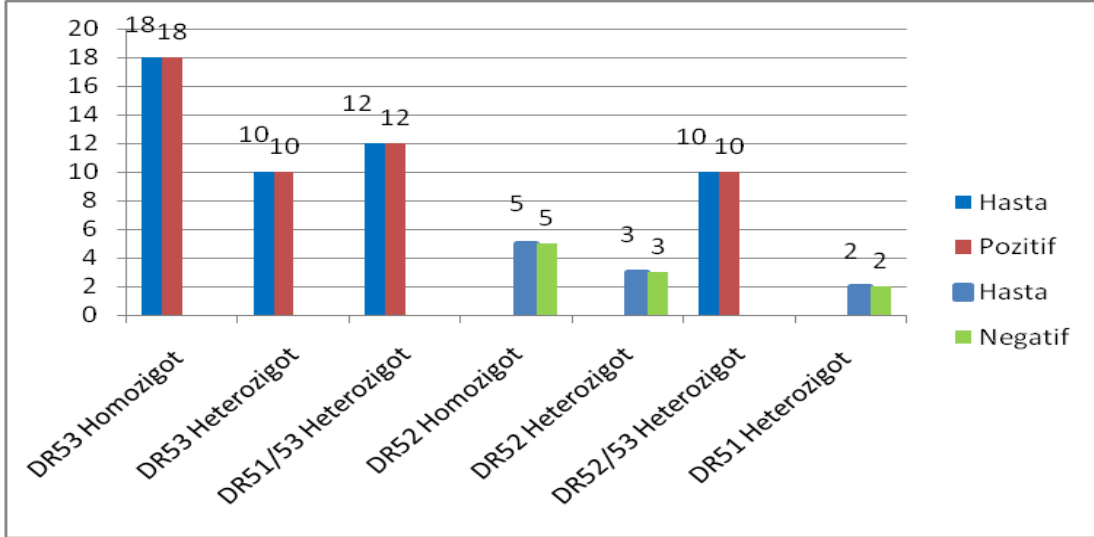


Şekil 4-3: Multiple PZR jel elektroferezi görüntüleri

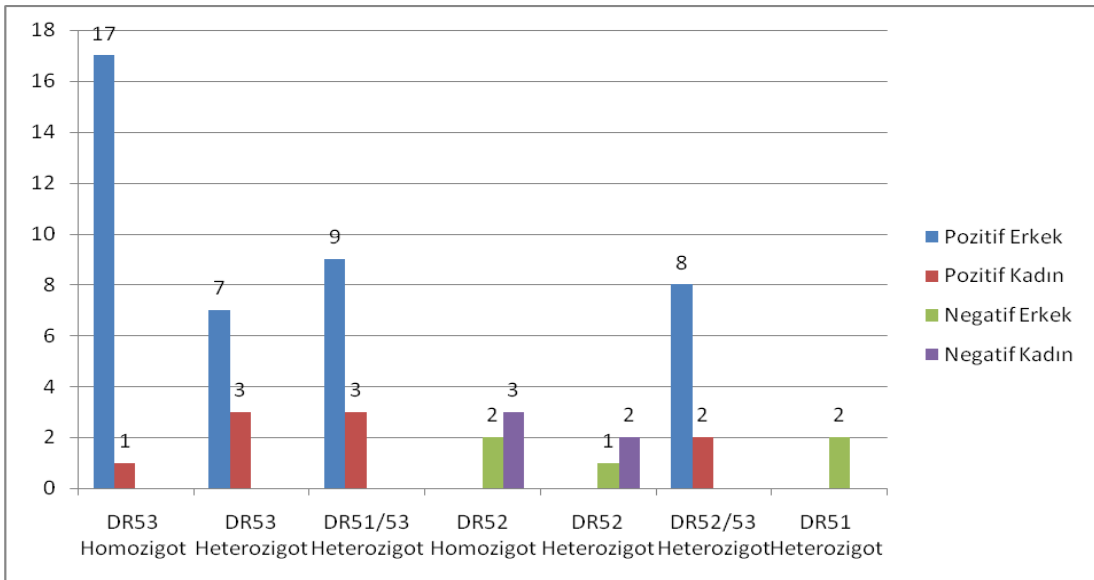
a) Hasta jel elektroferezi görüntüsü b) Kontrol jel elektroferezi görüntüsü c) Hasta jel elektroferezi görüntüsü

4.2.2. Hasta Grubunda *PRKRA* Sonuçlarının DR Süpertiplerine ve Cinsiyetlere Göre Dağılımı

Multiple PZR jel elektroferezi görüntüleme yöntemi sonuçlarına göre *PRKRA* geninin 60 hastanın 41'i erkek 9'u kadın olan 50 hastada pozitif olduğu, 5'i erkek 5'i kadın 10 hastada ise negatif olduğu saptanmıştır (Şekil 4-4) (Şekil 4-5).



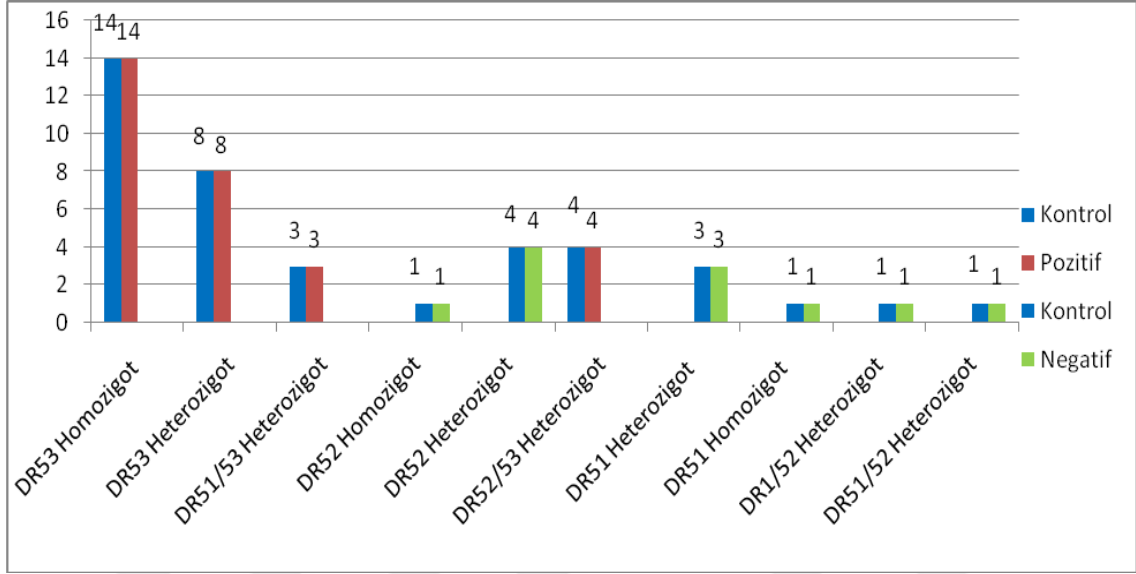
Şekil 4-4: Hasta grubunun *PRKRA* sonuçlarına göre dağılımı



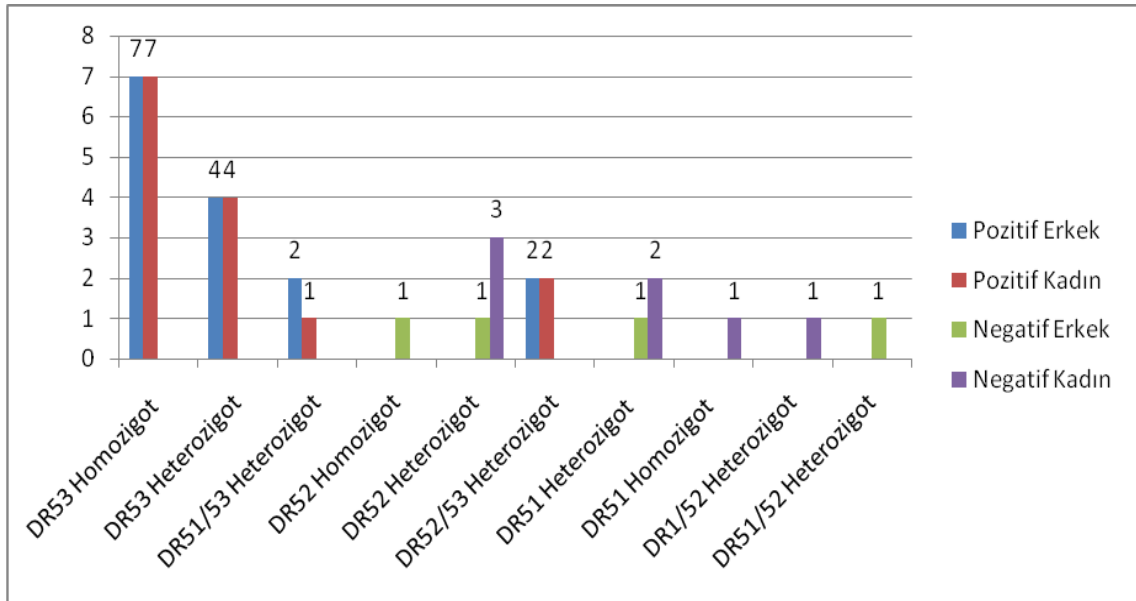
Şekil 4-5: Hasta grubunun *PRKRA* sonuçlarının cinsiyetlere göre dağılımı

4.2.3. Kontrol Grubunda *PRKRA* Sonuçlarının DR Süpertiplerine ve Cinsiyetlere Göre Dağılımı

PZR multiple jel elektroferezi görüntüleme yöntemi sonuçlarına göre *PRKRA* geninin 40 kişilik kontrol grubunda 15'i erkek 14'ü kadın olan 29 kişide pozitif olduğu, 4'ü erkek 7'si kadın 11 kişide ise negatif olduğu saptanmıştır (Şekil 4-6) (Şekil 4-7).



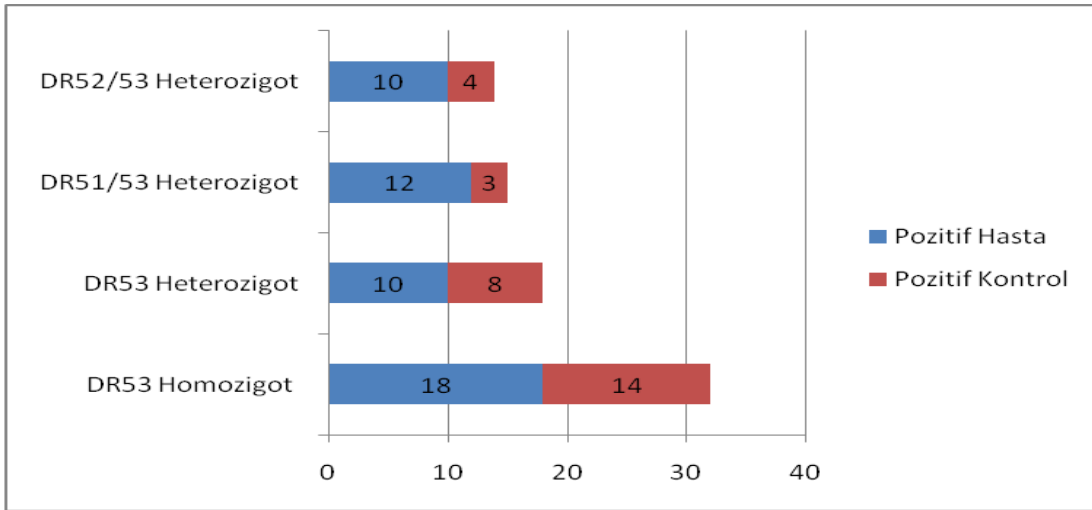
Şekil 4-6: Kontrol grubunun *PRKRA* sonuçlarına göre dağılımı



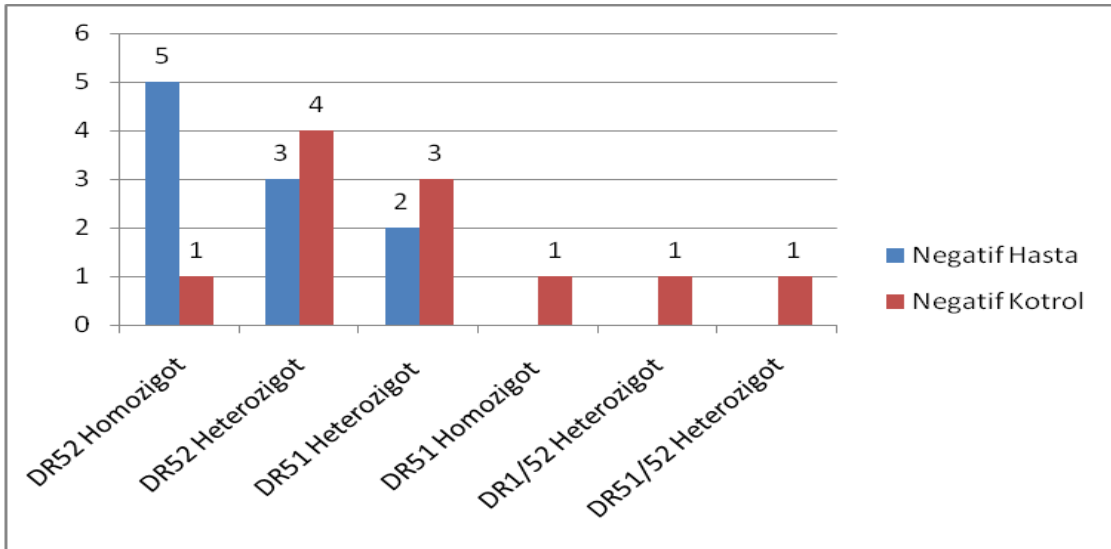
Şekil 4-7: Kontrol grubunun *PRKRA* sonuçlarının cinsiyetlere göre dağılımı

4.2.4. Tüm Grupta *PRKRA* Sonuçlarının DR Gruplarına Göre Dağılımı

Multiple PZR jel elektroforezi görüntüleme yöntemi sonuçlarına göre *PRKRA* geni hem hasta hem de sağlıklı tüm örneklerde sadece DR53 haplotipini taşıyan bireylerde tespit edilirken, DR53 haplotipini taşımayan bireylerde gözlenmemiştir. *PRKRA* geni 50 hastada (41E, 9K) ve 29 kontrolde (15 E, 14K) olmak üzere toplam 100 kişiden 79'unda (56E, 23K) pozitif, 10 hastada (5E, 5K) ve 11 kontrolde (4E,7K) olmak üzere toplam 100 kişiden 21'inde (9E, 12K) negatif saptanmıştır (Şekil 4-8) (Şekil 4-9).



Şekil 4-8: Hasta ve kontrol grubunda pozitif *PRKRA* sonuçlarının DR gruplarına göre dağılımı



Şekil 4-9: Hasta ve kontrol grubunda negatif *PRKRA* sonuçlarının DR gruplarına göre dağılımı

4.2.5. *PRKRA* Gen Sıklığının Değerlendirilmesi

60 kişilik ALL hasta grubunda multiple PZR jel elektroferezi görüntüleme yöntemi sonuçlarına göre 46 erkek hastanın 41'i (%89.1) ve 14 kadın hastanın 9'u (%64.3) *PRKRA* genini taşımaktaydı. *PRKRA* geninin taşınma sıklığı erkek hastalarda kadın hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.044$) (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında *PRKRA* geninin taşınma sıklığı

Hasta (n=60)	PRKRA (+)		PRKRA (-)		p
	n	%	n	%	
Erkek (n=46)	41	89.1	5	10.9	0.044
Kadın (n=14)	9	64.3	5	35.7	

40 kişilik kontrol grubunda 19 erkeğin 15'i (%79) ve 21 kadının 14'ü (%66.7) *PRKRA* genini taşımaktaydı. Erkek ve kadın kontroller arasında *PRKRA* geninin taşınma sıklığı değerlendirildiğinde anlamlılık saptanmadı ($p=0.488$) (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Kontrol grubunda erkek ve kadınlar arasında *PRKRA* geninin taşınma sıklığı

Kontrol (n=40)	PRKRA (+)		PRKRA (-)		p
	n	%	n	%	
Erkek (n=19)	15	79.0	4	21.0	0.488
Kadın (n=21)	14	66.7	7	33.3	

Tüm grupta 60 kişilik hastanın 50'si (%83.3) ve 40 kişilik kontrolün 29'u (%72.5) *PRKRA* genini taşımaktaydı. Hasta ve kontroller hastalar arasında *PRKRA* geninin taşınma sıklığı değerlendirildiğinde anlamlılık saptanmadı ($p=0.217$) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Tüm grupta hasta ve kontroller arasında PRKRA geninin taşınma sıklığı

Tüm Grup (n=100)	PRKRA (+)		PRKRA (-)		p
	n	%	n	%	
Hasta (n=60)	50	83.3	10	16.7	0.217
Kontrol (n=40)	29	72.5	11	27.5	

4.3. HLA-DRB1 Alellerinin ve HLA-DR Süpertiplerinin Değerlendirilmesi

Hasta grubundaki HLA-DRB1 alelleri içinde HLA-DRB1*04 aleli %39.2 ile en yüksek taşınma oranına sahipti. HLA-DRB1*04 alelinden sonra HLA-DRB1*07 %24.2 ve HLA-DRB1*11 %10.8 ile yüksek oranda taşınmaktaydı. Hasta grubunda HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*08, HLA-DRB1*10 ve HLA-DRB1*12 alelleri bulunmamaktaydı (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Hasta grubunda HLA-DRB1 alel yüzdesi

HLA-DRB1 Alel	Hasta (n=60) Alel (2n=120) (%)
*01	0 (%0.0)
*03	4 (%3.3)
*04	47 (%39.2)
*07	29 (%24.2)
*08	0 (%0.0)
*09	2 (%1.7)
*10	0 (%0.0)
*11	13 (%10.8)
*12	0 (%0.0)
*13	7 (%5.8)
*14	2 (%1.7)
*15	7 (%5.8)
*16	9 (%7.5)

60 kişilik hastadan 5 hasta homozigot olarak HLA-DRB3, 18 hasta ise homozigot olarak HLA-DRB4 alellerini taşıymaktaydı. HLA-DRB5 alellerini homozigot olarak taşıyan hasta bulunmamaktaydı (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: Hasta grubunda HLA-DRB*3,-4,-5 süpertip homozigotluğunun yüzdesi

HLA-DRB Süpertip Homozigotluğu	HLA-DRB1 Alel	Hasta (n=60)
DRB3 (DR52)	11,12,13,14,03	5 (%8.3)
DRB4 (DR53)	04,07,09	18 (%30.0)
DRB5 (DR51)	15,16	-

Kontrol grubundaki HLA-DRB1 alelleri içinde HLA-DRB1*04 aleli %47.5 ile en yüksek taşınma oranına sahipti. HLA-DRB1*04 alelinden sonra HLA-DRB1*07 %15 ve HLA-DRB1*11 %10 ile yüksek oranda taşınmaktaydı. Kontrol grubunda HLA-DRB1*08 ve HLA-DRB1*10 alelleri bulunmamaktaydı (Tablo 4-8).

Tablo 4-8: Kontrol grubunda HLA-DRB1 alel yüzdesi

HLA-DRB1 Alel	Kontrol (n=40) Alel (2n=80) (%)
*01	1 (%1.3)
*03	1 (%1.3)
*04	38 (%47.5)
*07	12 (%15.0)
*08	0 (%0.0)
*09	1 (%1.3)
*10	0 (%0.0)
*11	8 (%10.0)
*12	0 (%0.0)
*13	4 (%5.0)
*14	2 (%2.5)
*15	6 (%7.5)
*16	6 (%7.5)

40 kişilik kontrol grubunda 1 kontrol homozigot olarak HLA-DRB3, 14 kontrol homozigot olarak HLA-DRB4 ve 1 kontrol homozigot olarak HLA-DRB5 alellerini taşımaktaydı (Tablo 4-9).

Tablo 4-9: Kontrol grubunda HLA-DRB*3,-4,-5 süpertip homozigotluğunun yüzdesi

HLA-DRB Süpertip Homozigotluğu	HLA-DRB1 Alel	Kontrol (n=40)
DRB3 (DR52)	11,12,13,14,03	1 (%2.5)
DRB4 (DR53)	04,07,09	14 (%35.0)
DRB5 (DR51)	15,16	1 (%2.5)

4.3.1. Hasta ve Kontrol Grubunda HLA-DRB1 Alellerinin ve HLA-DR Süpertip Sıklığının Karşılaştırılması

Hasta ve kontrol grubunda HLA-DRB1 alellerinin sıklığı değerlendirildiğinde hasta grubunda HLA-DRB1*04 aleli %39.2, HLA-DRB1*07 aleli %24.2 ve HLA-DRB1*11 aleli %10.8 ile yüksek frekansta bulundu. Kontrol grubunda ise HLA-DRB1*04 aleli %47.5, HLA-DRB1*07 aleli %15.0 ve HLA-DRB1*11 aleli %10.0 ile yüksek frekansa sahipti. Hasta ve kontrol grubu arasında HLA-DRB1 alellerinin sıklıkları açısından anlamlılık saptamadı (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: Hasta ve kontrol grubu arasında HLA-DRB1 alellerinin sıklığının karşılaştırılması

HLA-DR	ALL Hasta (2n=120)		Kontrol (2n=80)		p	OR (%95 CI)
	n=60	Frekans	n=40	Frekans		
DRB1*01	0	(%0.0)	1	(%1.3)	0.837	0.219 (0.009-5.471)
DRB1*03	4	(%3.3)	1	(%1.3)	0.650	2.724 (0.298-24.843)
DRB1*04	47	(%39.2)	38	(%47.5)	0.306	0.711 (0.401-1.261)
DRB1*07	29	(%24.2)	12	(%15.0)	0.163	1.806 (0.859-3.795)
DRB1*08	0	(%0.0)	0	(%0.0)	-	-
DRB1*09	2	(%1.7)	1	(%1.3)	0.812	1.339 (0.119-15.026)
DRB1*10	0	(%0.0)	0	(%0.0)	-	-
DRB1*11	13	(%10.8)	8	(%10.0)	0.850	1.093 (0.431-2.772)
DRB1*12	0	(%0.0)	0	(%0.0)	-	-
DRB1*13	7	(%5.8)	4	(%5.0)	0.800	1.177 (0.332-4.161)
DRB1*14	2	(%1.7)	2	(%2.5)	0.680	0.661 (0.091-4.793)
DRB1*15	7	(%5.8)	6	(%7.5)	0.860	0.764 (0.246-2.364)
DRB1*16	9	(%7.5)	6	(%7.5)	1.000	1.000 (0.341-2.928)

60 kişilik ALL hasta grubu ile 40 kişilik kontrol grubu arasında HLA-DR alt gruplarının sıklığı değerlendirildiğinde herhangi bir HLA-DR süpertipi için hasta ve kontrol grubu arasında anlamlılık saptanmadı (Tablo 4-11).

Tablo 4-11: Hasta ve kontrol grubu arasında HLA-DR süpertip sıklığının karşılaştırılması

HLA-DR Süpertip	ALL Hasta		ALL Kontrol		p	OR (%95 CI)
	n=60	Frekans	n=40	Frekans		
DR51 Heterozigot	2	(%3.3)	3	(%7.5)	0.386	0.425 (0.067-2.269)
DR52 Heterozigot	3	(%5.0)	4	(%10.0)	0.432	0.473 (0.100-2.242)
DR53 Heterozigot	10	(%16.7)	8	(%20.0)	0.791	0.800 (0.285-2.242)
DR52 Homozigot	5	(%8.3)	1	(%2.5)	0.699	1.727 (0.318-9.376)
DR53 Homozigot	18	(%30.0)	14	(%35.0)	0.664	0.795 (0.339-1.868)
DR51/53 Heterozigot	12	(%20.0)	3	(%7.5)	0.151	3.083 (0.810-11.730)
DR52/53 Heterozigot	10	(%16.7)	4	(%10.0)	0.394	1.800 (0.522-6.198)
DR51/52 Heterozigot	0	(%0.0)	1	(%2.5)	0.958	0.952 (0.578-5.201)
DR52/01 Heterozigot	0	(%0.0)	1	(%2.5)	0.958	0.952 (0.578-5.201)
DR51 Homozigot	0	(%0.0)	1	(%2.5)	0.958	0.952 (0.578-5.201)

60 kişilik ALL hasta grubunda 46 erkek ve 14 kadın hasta arasında HLA-DRB1 alellerinin sıklığı değerlendirildiğinde sadece HLA-DRB1*13 alelinin kadın hastalarda erkek hastalara göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($p=0.007$) (Tablo 4-12).

Tablo 4-12: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında HLA-DRB1 alellerinin sıklığının karşılaştırılması

HLA-DR	ALL Erkek Hasta (2n=92)		ALL Kadın Hasta (2n=28)		p	OR (%95 CI)
	n=46	Frekans	n=14	Frekans		
DRB1*01	0	(%0.0)	0	(%0.0)	-	-
DRB1*03	4	(%4.3)	0	(%0.0)	0.572	2.898 (0.151-55.531)
DRB1*04	40	(%43.5)	7	(%25.0)	0.120	2.308 (0.892-5.966)
DRB1*07	23	(%25.0)	6	(%21.4)	0.804	1.222 (0.441-3.386)
DRB1*08	0	(%0.0)	0	(%0.0)	-	-
DRB1*09	2	(%2.2)	0	(%0.0)	0.999	1.339 (0.119-15.026)
DRB1*10	0	(%0.0)	0	(%0.0)	-	-
DRB1*11	8	(%8.7)	5	(%17.9)	0.179	0.438 (0.130-1.468)
DRB1*12	0	(%0.0)	0	(%0.0)	-	-
DRB1*13	2	(%2.2)	5	(%17.9)	0.007	0.102 (0.018-0.561)
DRB1*14	0	(%0.0)	2	(%7.1)	0.999	1.575 (0.073-33.790)
DRB1*15	7	(%7.6)	0	(%0.0)	0.198	5.000 (0.276-90.386)
DRB1*16	6	(%6.5)	3	(%10.7)	0.434	0.581 (0.135-2.494)

60 kişilik ALL hasta grubunda 46 erkek hasta ve 14 kadın hasta arasında HLA-DR süpertip sıklığı değerlendirildiğinde sadece HLA-DR53 homozigotluk sıklığının erkek hastalarda kadın hastalara göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($p=0.045$) (Tablo 4-13).

Tablo 4-13: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında HLA-DR süper tip sıklığının karşılaştırılması

HLA-DR Süpertip	ALL Erkek Hasta		ALL Kadın Hasta		p	OR (%95 CI)
	n=46	Frekans	n=14	Frekans		
DR51 Heterozigot	2	(%4.3)	0	(%0.0)	0.999	1.629 (0.073-35.964)
DR52 Heterozigot	1	(%2.2)	2	(%14.3)	0.133	0.134 (0.011-1.599)
DR53 Heterozigot	7	(%15.2)	3	(%21.4)	0.685	0.658 (0.145-2.977)
DR52 Homozigot	2	(%4.3)	3	(%21.4)	0.078	0.166 (0.024-1.123)
DR53 Homozigot	17	(%28.0)	1	(%1.7)	0.045	7.621 (0.914-63.537)
DR51/53 Heterozigot	9	(%19.6)	3	(%21.4)	0.999	0.891 (0.205-3.880)
DR52/53 Heterozigot	8	(%17.4)	2	(%14.3)	0.999	1.263 (0.235-6.780)
DR51/52 Heterozigot	0	(%0.0)	0	(%0.0)	-	-
DR52/01 Heterozigot	0	(%0.0)	0	(%0.0)	-	-
DR51 Homozigot	0	(%0.0)	0	(%0.0)	-	-

4.4. HLA-DR53 Haplotip Sıklığı

60 kişilik ALL hasta grubunda 46 erkek hastanın 41'i (%89.1) ve 14 kadın hastanın 9'u (%64.3) HLA-DR53 alellerini homozigot veya heterozigot olarak taşımaktaydı. HLA-DR53 alellerinin homozigot veya heterozigot olarak taşınma sıklığı erkek hastalarda kadın hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.044$) (Tablo 4-14).

Tablo 4-14: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında homozigot veya heterozigot olarak HLA-DR53 alellerinin taşınma yüzdesi

Hasta (n=60)	DR53 (+)		DR53 (-)		P
	n	%	n	%	
Erkek (n=46)	41	89.1	5	10.9	0.044
Kadın (n=14)	9	64.3	5	35.7	

60 kişilik ALL hasta grubunda 46 erkek hastanın 17'si (%37.0) ve 14 kadın hastanın 1'i (%7.1) HLA-DR53 alellerini homozigot olarak taşımaktaydı. HLA-DR53 alellerinin homozigot taşınma sıklığı erkek hastalarda kadın hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.045$) (Tablo 4-15).

Tablo 4-15: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında HLA-DR53 alellerinin homozigot olarak taşınma yüzdesi

Hasta (n=60)	DR53 homozigot (+)		DR53 homozigot (-)		p
	n	%	n	%	
Erkek (n=46)	17	37.0	29	63.0	0.045
Kadın (n=14)	1	7.1	13	92.9	

60 kişilik ALL hasta grubunda 46 erkek hastanın 7'si (%15.2) ve 14 kadın hastanın 3'ü (%21.4) HLA-DR53 alellerini heterozigot olarak taşımaktaydı. HLA-DR53

alellerinin heterozigot taşınma sıklığı açısından erkek ve kadın hastalar arasında anlamlılık saptanmadı ($p=0.685$) (Tablo 4-16).

Tablo 4-16: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında HLA-DR53 alellerinin heterozigot olarak taşınma yüzdesi

Hasta (n=60)	DR53 heterozigot (+)		DR53 heterozigot (-)		p
	n	%	n	%	
Erkek (n=46)	7	15.2	39	84.8	0.685
Kadın (n=14)	3	21.4	11	78.6	

Tüm grupta 60 hastanın 50'si (%83.3) ve 40 kontrolün 29'u (%72.5) HLA-DR53 alellerini homozigot veya heterozigot olarak taşımaktaydı. HLA-DR53 alellerinin homozigot veya heterozigot olarak taşınma sıklığı değerlendirildiğinde hasta ve kontroller arasında anlamlılık saptamadı ($p=0.217$) (Tablo 4-17).

Tablo 4-17: Tüm grupta hasta ve kontroller arasında homozigot veya heterozigot HLA-DR53 alellerinin taşınma yüzdesi

Tüm Grup (n=100)	DR53 (+)		DR53 (-)		p
	n	%	n	%	
Hasta (n=60)	50	83.3	10	16.7	0.217
Kontrol (n=40)	29	72.5	11	27.5	

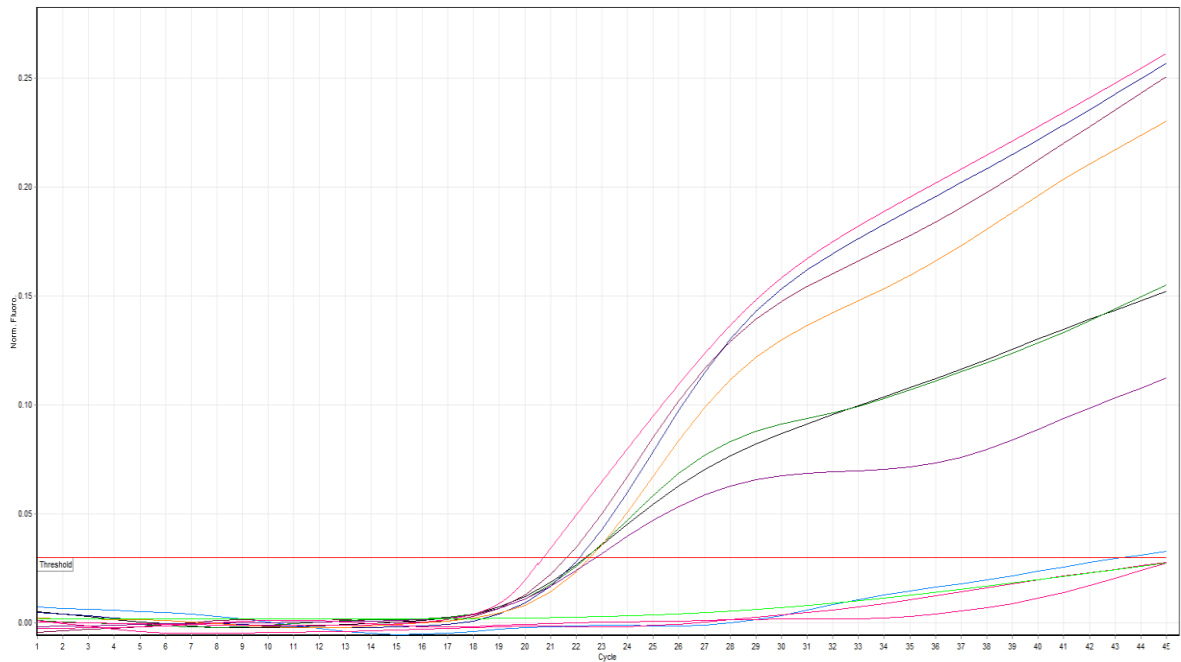
4.5. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

4.5.1. Gerçek Zamanlı PZR Sonuç Grafiklerinin Yorumlanması

Çalışmamızda 60 hasta ve 40 kontrol, 5-15'erli örnekler olarak Qiagen gerçek zamanlı PZR cihazında SNP rs2395185 genotiplemesinin tespit edilmesi için çalışmaya

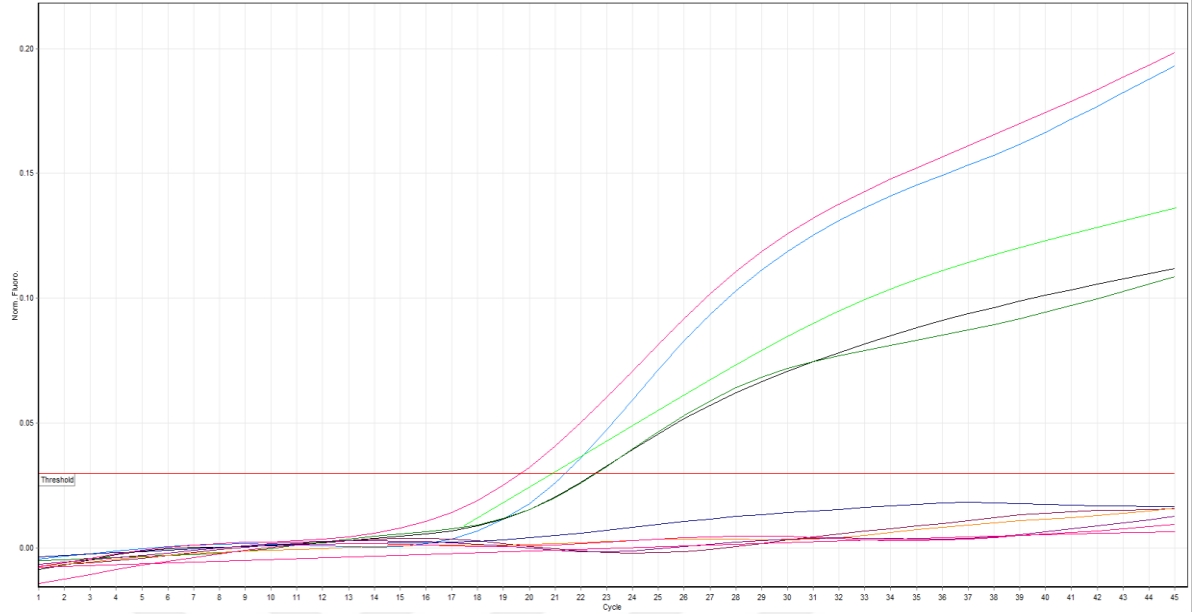
alınmıştır. VIC kanalda yabancı tip sinyaller, ROX kanalda varyant tip sinyaller okunmuştur. Böylelikle örneklerin rs2395185 için varyant homozigot, varyant/yabancı tip heterozigot veya yabancı tip homozigot olup olmadıkları belirlenmiştir. Her iki kanalda da örneklerin pozitiflikleri veya negatiflikleri DNA örneği yerine RNaz/DNaz serbest su ile hazırladığımız negatif kontrol ile test edilmiştir.

a)



Sırasıyla pembe: yabancı tip pozitif kontrol, lacivert: DR51 heterozigot hasta, mor: DR52 homozigot hasta, turuncu: DR52 heterozigot hasta, koyu yeşil: DR52/53 heterozigot hasta, siyah: DR51/53 heterozigot hasta, açık mor: DR51 heterozigot hasta, mavi: DR53 heterozigot hasta, yeşil: DR53 homozigot hasta, pembe: varyant tip pozitif kontrol, pembe: negatif kontrol

b)



Sırasıyla pembe: varyant tip pozitif kontrol, mavi: DR53 heterozigot hasta, yeşil: DR53 homozigot hasta, siyah: DR51/53 heterozigot hasta, koyu yeşil: DR52/53 heterozigot hasta lacivert: DR51 heterozigot hasta, mor: DR52 homozigot hasta, açık mor: DR51 heterozigot hasta, turuncu: DR52 heterozigot hasta, pembe: yabancı tip pozitif kontrol, pembe: negatif kontrol

c)

Hasta Listesi	Yabancı tip	Varyant tip	Sonuç
DR53 HETEROZİGOT HASTA	negatif	pozitif	Varyant homozigot (TT)
DR51/53 HETEROZİGOT HASTA	pozitif	pozitif	Yabancı tip/varyant heterozigot (GT)
DR52 HOMOZİGOT HASTA	pozitif	negatif	Yabancı tip homozigot (GG)
DR52/53 HETEROZİGOT HASTA	pozitif	pozitif	Yabancı tip/varyant heterozigot (GT)
DR51 HETEROZİGOT HASTA	pozitif	negatif	Yabancı tip homozigot (GG)
DR52 HETEROZİGOT HASTA	pozitif	negatif	Yabancı tip homozigot (GG)
DR53 HOMOZİGOT HASTA	negatif	pozitif	Varyant homozigot (TT)
DR51 HETEROZİGOT HASTA	pozitif	negatif	Yabancı tip homozigot (GG)
Yabancı tip kontrol	pozitif	negatif	
Varyant tip kontrol	negatif	pozitif	
Negatif kontrol	negatif	negatif	

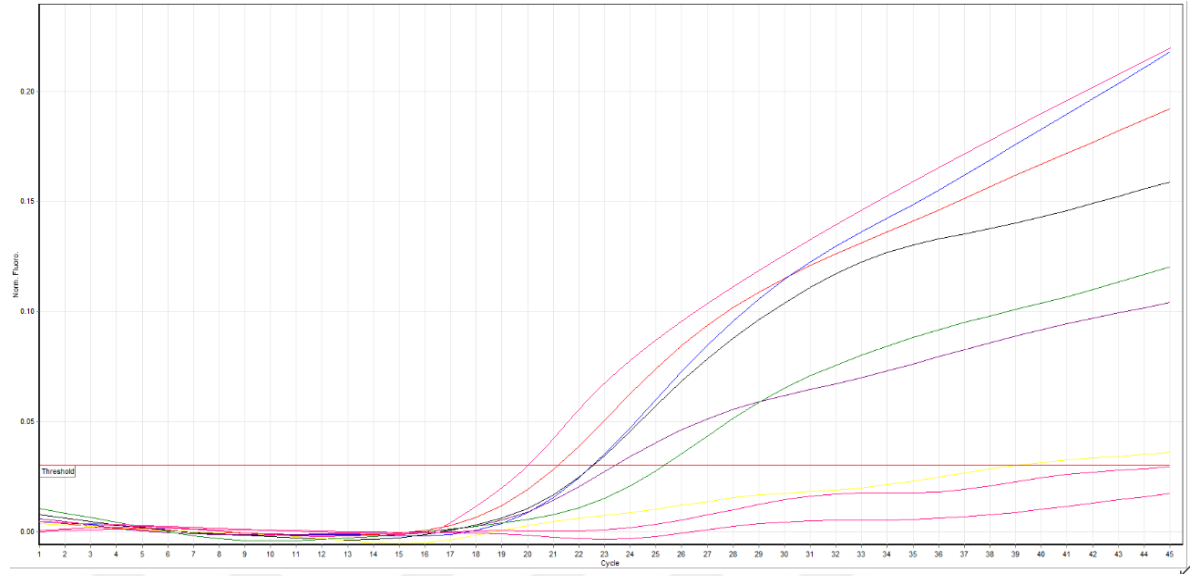
Şekil 4-10: Örnek olarak sekiz hasta ile çalışılmış gerçek zamanlı PZR sonuç grafiklerinin yorumlanması

a: Threshold değeri 0.03'e ayarlanmış hasta VIC/Orange kanal grafik görüntüsü

b: Threshold değeri 0.03'e ayarlanmış hasta ROX/Yellow kanal grafik görüntüsü

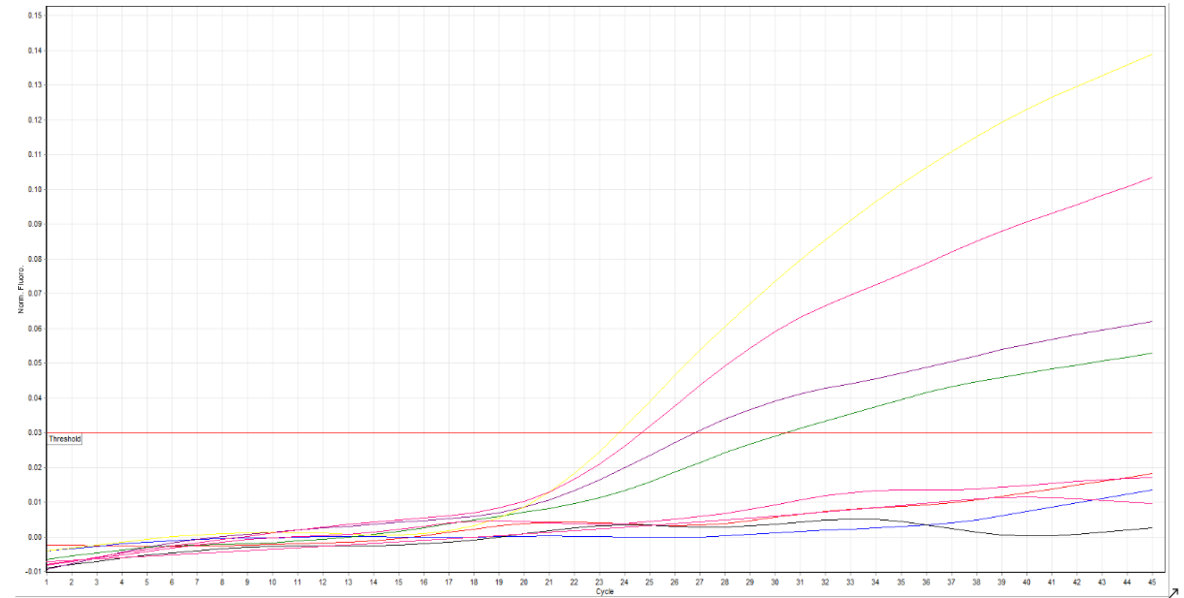
c: Hastalarda SNP rs2395185 genotiplemesinin değerlendirilmesi

a)



Sırasıyla pembe: yabancı tip pozitif kontrol, mavi: DR51 heterozigot kontrol, kırmızı: DR52 heterozigot kontrol, siyah: DR51 heterozigot kontrol, yeşil: DR52/53 heterozigot kontrol, mor: DR52/53 heterozigot kontrol, sarı: DR53 homozigot kontrol, pembe: varyant tip pozitif kontrol, pembe: negatif kontrol

b)



Sırasıyla sarı: DR53 homozigot kontrol, pembe: varyant tip pozitif kontrol, mor: DR52/53 heterozigot kontrol, yeşil: DR52/53 heterozigot kontrol, pembe: varyant tip pozitif kontrol, pembe: negatif kontrol, kırmızı: DR52 heterozigot kontrol, mavi: DR51 heterozigot kontrol, siyah: DR51 heterozigot kontrol

c)

Kontrol Listesi	Yabanıl tip	Varyant tip	Sonuç
DR52 HETEROZİGOT KONTROL	pozitif	negatif	Yabanıl tip homozigot (GG)
DR51 HETEROZİGOT KONTROL	pozitif	negatif	Yabanıl tip homozigot (GG)
DR51 HETEROZİGOT KONTROL	pozitif	negatif	Yabanıl tip homozigot (GG)
DR52/53 HETEROZİGOT KONTROL	pozitif	pozitif	Yabanıl tip/varyant heterozigot (GT)
DR52/53 HETEROZİGOT KONTROL	pozitif	pozitif	Yabanıl tip/varyant heterozigot (GT)
DR53 HOMOZİGOT KONTROL	negatif	pozitif	Varyant homozigot (TT)
Yabanıl tip kontrol	pozitif	negatif	
Varyant tip kontrol	negatif	pozitif	
Negatif kontrol	negatif	negatif	

Şekil 4-11: Örnek olarak altı kontrol ile çalışılmış gerçek zamanlı PZR sonuç grafiklerinin yorumlanması

a: Threshold değeri 0.03'e ayarlanmış kontrol VIC/Orange kanal grafik görüntüsü

b: Threshold değeri 0.03'e ayarlanmış kontrol ROX/Yellow kanal grafik görüntüsü

c: Kontrollerde SNP rs2395185 genotiplemesinin değerlendirilmesi

Çalışmamızda HLA-DR53 homozigot ve heterozigot örneklerde varyant rs2395185 homozigotluğu, HLA-DR53 içermeyen örneklerde yabanıl tip rs2395185 homozigotluğu bulunmuştur. HLA-DR53 homozigot ve HLA-DR53 heterozigot örneklerin dışındaki HLA-DR53/51 ve HLA-DR53/52 heterozigot örneklerde yabanıl/varyant tip rs2395185 heterozigotluğu saptanmıştır (Şekil 4-10) (Şekil 4-11).

4.5.2. Hasta ve Kontrol Grubunda rs2395185'in Karşılaştırılması

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında rs2395185'in varyant tip homozigotluk ve yabanıl tip homozigotluk sıklığı için anlamlılık saptanmadı. rs2395185 varyant/yabanıl tip heterozigot sıklığı ise hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.045$) (Tablo 4-18).

Tablo 4-18: Hasta ve kontroller arasında rs2395185 genotiplerinin karşılaştırılması

SNP rs2395185	Hasta (n=60)		Kontrol (n=40)		p
	n	%	n	%	
Varyant homozigot (TT)	28	46.7	22	55	0.540
Varyant/yabanıl tip heterozigot (TG)	22	36.7	7	17.5	0.045
Yabanıl tip homozigot (GG)	10	16.6	11	27.5	0.217

Tüm grupta hasta ve kontroller arasında homozigot veya heterozigot olarak rs2395185'in varyant varlığının sıklığı anlamlı bulunmamıştır ($p=0.217$) (Tablo 4-19).

Tablo 4-19: Hasta ve kontroller arasında varyant rs2395185'in homozigot veya heterozigot varlığının karşılaştırılması

Tüm Grup (n=100)	Varyant alel (T) (+)		Varyant alel (T) (-)		p
	n	%	n	%	
Hasta (n=60)	50	83.3	10	16.7	0.217
Kontrol (n=40)	29	72.5	11	27.5	

Hasta grubunda rs2395185'in varyant homozigotluğu ve varyant/yabanıl tip heterozigotluğu erkek ve kadınlar arasında anlamlı bir farklılık ortaya koymazken, rs2395185'in yabanıl tip homozigotluğu kadınlarda erkeklere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.043$) (Tablo 4-20).

Tablo 4-20: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında rs2395185 genotiplerinin karşılaştırılması

SNP rs2395185	Erkek (n=46)		Kadın (n=14)		p
	n	%	n	%	
Varyant homozigot (TT)	24	52.1	4	28.6	0.140
Varyant/yabanıl tip heterozigot (TG)	17	37	5	35.7	0.999
Yabanıl tip homozigot (GG)	5	10.9	5	35.7	0.043

Hasta grubunda homozigot veya heterozigot olarak rs2395185'in varyant varlığının sıklığı erkek hastalarda kadınlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.044$) (Tablo 4-21).

Tablo 4-21: Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında varyant rs2395185'in homozigot veya heterozigot varlığının karşılaştırılması

Hasta (n=60)	Varyant alel (T) (+)		Varyant alel (T) (-)		p
	n	%	n	%	
Erkek (n=46)	41	89.1	5	10.9	0.044
Kadın (n=14)	9	64.3	5	35.7	

Kontrol grubunda erkek ve kadınlar arasında rs2395185'in varyant tip homozigotluğu, varyant/yabanıl tip heterozigotluğu ve yabanıl tip homozigotluğu açısından anlamlılık saptanmamıştır (Tablo 4-22).

Tablo 4-22: Kontrol grubunda erkek ve kadınlar arasında rs2395185 genotiplerinin karşılaştırılması

SNP rs2395185	Erkek (n=19)		Kadın (n=21)		p
	n	%	n	%	
Varyant homozigot (TT)	11	57.9	11	52.4	0.760
Varyant/yabanıl tip heterozigot (TG)	4	21.05	3	14.3	0.688
Yabanıl tip homozigot (GG)	4	21.05	7	33.3	0.488

Kontrol grubunda homozigot veya heterozigot olarak rs2395185'in varyant varlığının sıklığı değerlendirildiğinde erkek ve kadınlar arasında anlamlılık saptanmamıştır (p=0.488) (Tablo 4-23).

Tablo 4-23: Kontrol grubunda erkek ve kadınlar arasında varyant rs2395185'in homozigot veya heterozigot varlığının karşılaştırılması

Kontrol (n=40)	Varyant alel (T) (+)		Varyant alel (T) (-)		p
	n	%	n	%	
Erkek (n=19)	15	79.0	4	21.0	0.488
Kadın (n=21)	14	66.7	7	33.3	

5. TARTIŞMA

HLA gen bölgesi çok polimorfik bir bölgedir. Bu genler, bir belirteç veya başka genler ile gösterdiği bağlantı dengesizliği nedeniyle başka bir genin ekspresyonuna katkıda bulunabilir. Özellikle HLA Sınıf II bölgesindeki HLA-DRB genleri olmak üzere HLA haplotipleri geniş çaplı polimorfizmlere sahiptir (69,70). İnsan MHC'sinin gen haritalarında HLA-DRB4 taşıyan haplotiplerin HLA-DRB3 taşıyan haplotiplerle kıyaslandığında 160 kb'lık karakterizasyonu yapılmamış ilave DNA içerdiği gözlenmiştir (69,71,72). HLA-DRB4 bölgesinde, HLA-DRA ve HLA-DQA1 arasında yerleşik olan, yeni tanımlanmış ve henüz biyolojik rolleri tam olarak çözilememiş psödogenler bulunmuştur (9). *PRKRA* geninin de HLA-DRB4 ailesi ile birlikte kalıtıldığı ve psödogen olduğu gösterilmiştir. Ayrıca psödogenlerin fonksiyonel olmayan eski kalıntılar olduğu düşüncesi son zamanlarda değişmiştir. Yapılan bir çalışmada Tip 1 diyabet, sistemik lupus eritematozus ve multiple skleroz gibi otoimmün hastalıklarla güçlü şekilde ilişkisi olan üç yaygın HLA haplotipinin (HLA-A1-B8-Cw7-DR3, HLA-A3-B7-Cw7-DR15 ve HLA-A26-B18-Cw5-DR3-DQ2) ilk yüksek çözünürlüklü HLA spesifik transkripsiyon haritası çıkarılmıştır. Çalışmada haplotipe spesifik olarak gen ifadesi profillerinin değiştiği ve HLA-DRB5 ailesine ait PGF hücre hattında psödogenlerin %70 oranla yüksek transkripsiyona sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuca göre HLA-DRB4 ailesine ait spesifik psödogenlerin de transkribe olabileceği üzerinde düşünülmektedir (9,12).

Çalışmamızda 60 kişilik hasta ve 40 kişilik kontrol grubunda internal kontrol kullanılarak *PRKRA* genine özgül olarak gerçekleştirilen multiple PZR ve jel elektroforezi görüntüleme yöntemleri sonucu internal kontrolün tüm örneklerde pozitif olduğu tespit edilmiştir. Hem hasta hem de kontrol grubunda *PRKRA* genine ait bant HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 ve HLA-DRB1*09 alellerini kendi içinde homozigot veya heterozigot taşıyan bireylerde veya bu alelleri diğer HLA-DRB1 aleleriyle heterozigot taşıyan bireylerde gözlenmiştir. HLA-DR53 haplotipini taşımayan bireylerde bant görülmemesi *PRKRA* geninin HLA-DR53'e spesifik taşındığını, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 ve HLA-DRB1*09 alellerine özgü olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, sağlıklı bireylere ait HLA-DRB1 lokusu homozigot hücre hatlarındaki PZR ve yüzde 1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüleme yöntemleri sonucu *PRKRA* geninin

HLA-DR53 grubuna spesifik olduğunun tespit edildiği çalışmayı destekler niteliktedir (11).

Dizileme çalışmaları sonucu *PRKRA*, hem PAC klonlarında hem de insan HLA-DR alt bölgesinde intron dizisi taşımadığı için psödogen olarak düşünülmüş ve HLA Sınıf II bölgesinde aktif olmayan bir gen kalıntısı olduğu ileri sürülmüştür (10). HLA-DR haplotipleri tiplendirilmiş sağlıklı bireylerle yapılan bir çalışmada, *PRKRA* geni prob olarak kullanılarak gerçekleştirilen FISH ve dizileme çalışmaları sonucu *PRKRA* geninin 6. kromozomda taşındığı, DRB4 taşıyan haplotiplere özgü olduğu ve hiç intron taşımadığı belirlenmiştir. 6. kromozomda DRB4 haplotiplerine spesifik olan *PRKRA* geni intron dizisi olmadığı için psödogen olarak önerilip *PRKRAP1* olarak adlandırılmıştır. FISH çalışmalarında *PRKRA* geni prob olarak kullanıldığında 6. kromozomda görülen sinyal sadece DR53 haplotipini taşıyan sağlıklı bireylerde saptanmıştır. DR53 haplotipine sahip sağlıklı bireylerde 6. kromozomun yanında tespit edilen 2. kromozomdaki sinyal da dahil olmak üzere diğer haplotipleri taşıyan tüm sağlıklı bireylerde 2. kromozomda sinyal görülmüştür. Bütün haplotiplerde 2q31.2-q32.1 kromozomunda görülen sinyal ve ardından gelen dizileme çalışmaları, *PRKRAP1* psödogeninin ana kopyasının 2. kromozomda olduğunu ve 8 ekzon, 7 intron içerdiğini göstermiştir. Aynı çalışmada DR53 haplotipine sahip homozigot hücre hatlarında 6. kromozomdaki *PRKRA* genine yönelik primerler pozitif sonuç vermişken, diğer hücre hatlarında negatif sonuç görülmesi de 2. kromozomdaki ana kopyanın uzun intron dizilerine sahip olduğu için primerlerin bu bölgede etkili olmadığını ve sadece 6. kromozoma etki edebileceğini düşündürmektedir (11). Çalışmamızda da kullandığımız primerlerin sadece HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 ve HLA-DRB1*09 alellerine özgü örneklerde etkili olması 2. kromozomdaki ana kopyanın önerildiği üzere uzun intron dizilerinden dolayı primerler tarafından çoğaltılamadığını göstermiştir.

HLA-DRB4 homozigotluk etkisi bağlı bir genin katılımı ile hastalıklara duyarlılığı etkileyebilir. Bağlantının gücüne bağlı olarak ilişki, baskın etkiye sahip başka bir genden kaynaklanıyorsa, bazı popülasyonlarda heterozigot bir DRB4 aleli de etkili olabilir. Ancak bazılarında homozigotluk gerektirir. Böyle bir bağlantılı gen için olası bir lokalizasyon, DRB4 haplotiplerinin HLA-DR alt bölgesinde ilave DNA miktarıdır, ancak nispeten keşfedilmemiş HLA Sınıf III bölgesi de dikkate alınmalıdır. Bir DRB4 haplotipinin sadece tam dizilimi bu olasılığı ortadan kaldırabilir (2).

Çocukluk çağı ALL'sinde HLA-DR ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada 114 çocuk ALL hastası ve kontrol olarak 325 yeni doğanın PZR ile HLA-DRB1 alelleri tanımlanmıştır. HLA-DRB1*04 alelinin tüm grupta erkeğe spesifik olarak yüksek oranda olduğu görülmüştür. HLA-DRB4*01 homozigot sıklığının da hasta grubunda kontrol grubuna göre ve hasta grubunda da erkekler için yüksek oranda anlamlı olduğu görülmüştür (3). Çalışmamızda HLA-DRB1*04 alel sıklığı hasta grubunda kontrol grubuna göre ve hasta grubunda erkek hastalarda kadın hastalara göre anlamlı bir farklılık ortaya koymamıştır. Aynı zamanda HLA-DRB4*01 homozigot sıklığı hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık ortaya koymazken, erkek hastalarda kadın hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu sonuç HLA-DRB1 alellerinden HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 ve HLA-DRB1*09 alellerini kodlayan HLA-DRB4 geninin çocukluk çağı ALL'sinde erkeklerde risk faktörü oluşturduğunu desteklemektedir. Daha önceki çalışmalar çocukluk çağı ALL'sinin yaygın bir viral enfeksiyona karşı HLA bağlantılı nadir bir yanıt oluşturabileceğini göstermiştir. HLA-DRB4 genotipinin herhangi bir virüs ile uzun şüpheli bağlantı oluşturduğuna dair doğrudan bir kanıt bulunmamasına rağmen, kendiliğinden oluşan prelösemik klonların teşviki için adenovirüsler ile işbirliği yapabileceği öne sürülmüştür. Çocukluk çağı ALL özellikle erkek çocuklarda en sık 1-4 yaş arasında görülür. Önceki virolojik araştırmalar, herhangi bir aday virüs ortaya çıkarmasa da 1-3 yaş arasındaki lösemili çocuklarda adenovirüse karşı ilginç bir şekilde düşük antikor seviyelerinin oluştuğunu söylemiştir. Adenovirüsler lenfoid hücrelerde kalıcılığa izin veren mekanizmalara sahiptir. HLA Sınıf I antijen ekspresyonunu düşürürler ve benzerlik yoluyla HLA Sınıf II antijenlerine karşı bir otoimmün reaksiyonu tetikleyebilirler. Adenoviral kalıcılık, A2 ve DR53 antijenleri ile kolaylaştırılabilir. Böylece prelösemik klonun bağışıklık gözetiminden kaçmasına ve lösemiye ilerlemesine izin verilmesine neden oldukları söylenebilir. Adenovirüs taşıyan lenfositlerin HLA-DR53'e yönelik bir immün cevaptan kaçabileceği ve sonrasında ifade edilen antijen miktarının arttırılmasıyla, HLA-DR53 homozigotluğunun immün fonksiyon bozukluğunun uyarılmasında anahtar faktör olabileceği ileri sürülmüştür (73). Adenovirüsün bu modeldeki varsayılan rolü, mutajenik değildir ve transforme prelösemik klona karşı bir immün yanıt kaçışında HLA-DR53 ile etkileşimi içerir. HLA-DR53 epitopu ile bir adenoviral protein arasındaki çok yüksek moleküler taklit derecesi bu görüş için uygun olabilir. Epstein-Barr Virüsü (EBV) 'nin büyük tegument proteini yedi ardışık amino asit ile *Bam*HI-

M'nin Sağ Okuma Çerçevesi 2 (BamHI-M rightward reading frame 2; BMFR2) erken nükleer proteini 5 ardışık amino asit ile aynı HLA-DR53 epitopu ile benzerlik gösterir. HLA-DR53 bağlantısının, çocukluk çağı ALL'sinin gelişiminde rol oynayan aday bir virüs olarak EBV'yi hedef alabileceği düşünülebilir (74). Bir vaka kontrol çalışması olarak tasarlanan 38 ayrı çalışmadan elde edilen 0-19 yaş arası 12496 ALL'li çocuk ve 2356288 sağlıklı çocukta yapılan değerlendirmeler sonucu herhangi bir enfeksiyonun, sıklığının ve zamanlamasının ALL ilişkili olmadığı görülmüştür. Çalışmada adenovirüs değerlendirilmemiş ve 6 yaş altı lösemili çocuklarda EBV'ye karşı antikor prevalansının arttığı gösterilmiştir (75).

Başka bir çalışmada, 114'ü çocuk 98'i yetişkin 212 yüksek riskli veya relaps ALL hastası ile 118'i çocuk, 132'si yetişkin yetişkin 250 sağlıklı kontrolün PZR-SSP yöntemi ile HLA-DR tiplemesi yapılmıştır. HLA-DRB4 ailesinden HLA-DRB1*04 aleli çocukluk çağı ALL' sinde erkek hastalarda sağlıklı erkek çocuk kontrollere göre anlamlı olarak yüksek çıkmıştır. HLA-DRB1*12 ve HLA-DRB1*13 alelleri anlamlı olmak üzere HLA-DRB3 ailesinin hastalarda daha az görüldüğü tespit edilmiştir. Çocukluk çağı ALL tanılı hasta grubu, yaş eşleştirilmesi yapılmış sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HLA-DRB3 homozigotluğunun çocukluk çağı ALL'sinde koruyucu bir faktör olduğu saptanmıştır. HLA-DRB4 belirteç sıklığının erkek çocuk ALL hastalarında yaş ve cinsiyet eşleştirilmesi yapılmış kontrollere ve bayan hastalara göre anlamlı olarak yüksek oranda olduğu gözlenmiştir. HLA-DRB4 homozigotluğu ise erkek çocuk hastalar ile sağlıklı erkek çocuklar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Genel sonuçlar lösemilere karşı duyarlılığın HLA-DR53 homozigotluğu gerektirmediğini göstermiştir (2). Çalışmamızda herhangi bir HLA-DRB1 aleli yada HLA-DR süper tip sıklığı hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık ortaya koymamıştır. HLA-DRB4 homozigotluğu erkek hastalarda kadın hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunurken HLA-DRB1*13 alel sıklığı kadın hastalarda erkek hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. HLA-DRB4 belirteç sıklığı da erkek hastalarda kadın hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Çalışmamız HLA-DRB4 homozigot sıklığının ve HLA-DRB4 belirteç sıklığının çocukluk çağı ALL'sinde erkekler için risk faktörü olduğunun gösterildiği çalışmaları desteklemiştir. Çalışmamızda da gözlemlediğimiz gibi insan lösemisi ile HLA-DRB4 arasındaki ilişki, sadece immünolojik bir mekanizmaya bağlı olmayabilir. Cinsiyet etkisi altında çocukluk çağı ALL'si ile HLA arasındaki sürekli gözlenen ilişkinin immünolojik bir

mekanizma ile bağdaştırılması kolay olmamıştır. Endokrinolojik faktörler ve cinsiyet kromozomları ile etkileşimler de dikkate alınmalıdır.

SNP rs2395185 (G/T), HLA-DR alt gruplarının intergenik bölgesinde bulunan ve HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 ve HLA-DRB1*09 alellerine özgü T alel varyantı ile HLA-DRB4 haplotiplerinin belirteçidir (1). Fonksiyonunu tanımlayan henüz bir biyoinformatik araç olmamasına rağmen yapılan çalışmalarda varyant rs2395185'in Hodgkin lenfoma ve ülseratif kolit için koruyucu; ALL, akciğer kanseri, romatoid artrit ve astım için risk ilişkisi ortaya koyduğu gözlenmiştir (4,5,6,7,8). Çalışmamızda HLA-DRB4 haplotiplerinin bir diğer belirteci olan SNP rs2395185'i gerçek zamanlı PZR ile tanımlayarak, örneklerdeki HLA tiplmesi ile belirlenmiş HLA-DRB4 haplotiplerinin varlığı rs2395185 genotiplmesi düzeyinde gösterilmiş oldu. Çalışmamızda HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 ve HLA-DRB1*09 alellerini birlikte taşıyan HLA-DRB4 homozigot veya HLA-DRB4 heterozigot örneklerde rs2395185 varyant homozigot, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 ve HLA-DRB1*09 alellerinden birini taşıyan örneklerde rs2395185 varyant/yabanıl tip heterozigot ve HLA-DR53 haplotipini taşımayan tüm örneklerde rs2395185 yabanıl tip homozigot olarak bulunmuştur. Varyant tip rs2395185 homozigotluğu ve yabanıl tip rs2395185 homozigot sıklığı hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık ortaya koymazken, hasta grubunda rs2395185 varyant/yabanıl tip heterozigot sıklığı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Hasta grubunda erkek ve kadınlar arasında varyant rs2395185'in sıklığı erkeklerde anlamlı oranda yüksek bulunurken rs2395185'in yabanıl tip homozigot sıklığı kadın hastalarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda varyant rs2395185'in çocukluk çağı ALL'sinde erkeklere özgü güçlü bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Yüzaltmış bir çocuk ALL hastası ve 231 sağlıklı çocuk kontrol ile multi-etnik bir popülasyonda çocukluk çağı ALL riskinde HLA aracılı lenfoma genetik belirteçlerinin rolünün araştırıldığı bir çalışmada Hodgkin lenfoma için koruyucu belirteç olan varyant rs2395185'in çocukluk çağı ALL'sinde sadece erkeklere özgü güçlü bir risk faktörü olduğu tanımlanmıştır (5). Benzer bir çalışmada 159 çocuk ALL hastası ve 176 sağlıklı çocuk kontrolde SNP rs2395185 genotiplmesi sonucu varyant rs2395185'in bir HLA-DRB4 belirteci olarak erkeklerde önemli bir hastalık risk faktörü olduğu belirlenmiştir (76). Yapılan çalışmalarda HLA-DRB1*01:02 haplotiplerinin de T varyantını taşıdıkları görülmüştür (1). Fakat çalışmamızda HLA-DRB1*01:01 alelline sahip HLA-DRB1*01:02 heterozigot tek bir örnekte T varyantı görülmemiştir.

Çalışmamızda, HLA-DRB4 homozigotluk sıklığı ve HLA-DRB4 belirteç sıklığının özellikle erkek hastalarda çocukluk çağı ALL'si için önemli bir risk ilişkisi oluşturduğu saptanmıştır. HLA-DRB4 taşıyan ALL'li erkek çocuklarda, ALL'nin seyrini bozarak hastalığın şiddetini artıran bir faktör olabilir; fakat çalışmamızda klinik takip değerlendirilmemiştir. Bu çalışmanın yarattığı hipotezleri test etmek için, ileriye dönük bir çalışmada hastalığın seyri sırasındaki hastalardaki duyarlılık ve koruma belirteçlerinin sıklığı incelenebilir. HLA-DRB4 homozigotluğu ve HLA-DRB4 belirteci ile ilişkilendirilen ALL ilişkisinin temelinde HLA-DRB4 haplotiplerinde henüz karakterizasyonu yapılmamış 160 kb'lık ilave DNA'nın olabileceği düşünülmektedir. İleriye dönük olarak HLA-DRB4 haplotiplerinin tam dizilimi ve HLA-DRB4 haplotiplerine spesifik bir transkripsiyon haritası ile sonuçlarımızın daha ileri düzeyde fonksiyonel çalışmalar için bir rehber olarak kullanılmasını ve dikkate alınmasını umuyoruz. Ayrıca daha önceki çalışmaları destekler nitelikte HLA-DRB4 haplotiplerine özgün olarak tanımladığımız ve henüz moleküler mekanizması bilinmeyen *PRKRA* psödogenininin de HLA-DRB4 haplotiplerindeki diğer psödogenler gibi yeni tanımlanabilecek transkripsiyon haritasındaki transkripsiyon mekanizması araştırılabilir ve ortaya çıkan sonuca göre ALL ile ilişkisi olabilecek moleküler mekanizması belirlenebilir. HLA-DRB4 homozigotluğu ile ALL hastalığı arasında tanımlanan ilişkinin aslında HLA-DRB4 haplotiplerinde bildirilmiş; henüz biyolojik rolü ve fonksiyonu tam olarak belirlenememiş olan ilave DNA içinde kodlanan bir genden kaynaklandığı gösterilebilir. İleri çalışmalarda ilave DNA'nın yeni nesil dizileme yöntemleriyle karakterize edilmesi ile sadece ALL hastalığı için değil, HLA-DRB4'ün Genome Wide Association Study (GWAS) çalışmalarında ilişki gösterdiği Hodgkin lenfoma, akciğer kanseri ve ülseratif kolit ve belki romatoid artrit ilişkilerinin moleküler mekanizması belirlenebilir. İdeal sonuç olarak, HLA-DRB4 haplotiplerindeki ilave DNA içinde bir mikroRNA (miRNA) gözlemlenebilir ve HLA-DRB4 haplotipine özgü bir miRNA'nın hedef genin ifadesine etki ediyor olduğu saptanabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda, HLA-DRB4 belirteç sıklığı ve HLA-DRB4 homozigot sıklığı çocukluk çağı ALL hastalarında erkeklerde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. SNP rs2395185'in HLA-DRB4 haplotiplerine özgü olduğu kanıtlanmış ve örneklerde HLA-DRB4 homozigotluğu SNP tipleme seviyesinde de gösterilmiştir. Tüm grupta *PRKRAP1* psödogenininin HLA-DRB4 haplotiplerine özgü olduğu gösterilmiştir. ALL ile HLA-DRB4 belirteç sıklığı ilişkisinin temelinde HLA-DRB4

haplotiplerinde henüz karakterizasyonu yapılmamış *PRKRAP1* psödogenininin olduğu bu çalışmada da düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Kennedy AE, Singh SK, Dorak MT. Re: Genome-Wide Association Study of Classical Hodgkin Lymphoma and Epstein–Barr Virus Status–Defined Subgroups. Correspondence, *JNCI* 2012; **11**: 1-2.
2. Dorak MT, Oguz FS, Yalman N, Diler AS, Kalayoglu S, Anak S, Sargin D, Carin M. A male-specific increase in the HLA-DRB4 (DR53) frequency in high-risk and relapsed childhood ALL. *Leukemia Research* 2002; **26**: 651-656.
3. Dorak MT, Lawson T, Machulla HKG, Darke C, Mills KI, Burnett AK. Unravelling an HLA-DR association in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 694-700.
4. Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet.* 2009; **41**: 216-220.
5. Kennedy AE, Kamdar KY, Lupo PJ, Okcu MF, Scheurer ME, Dorak MT. Genetic markers in a multi-ethnic sample for childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Leukemia&Lymphoma* 2015; **56**: 169-174.
6. Lan Q, Hsiung CA, Matsuo K, Hong YC, Seow A, Wang Z, et al. Genome-wide association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci in never-smoking women in Asia. *Nat Genet.* 2012; **44**: 1330-1335.
7. Li X, Ampleford EJ, Howard TD, Moore WC, Torgerson DG, Li H, Busse WW, Castro M, Erzurum SC, Israel E, Nicolae DL, Ober C, Wenzel SE, Hawkins GA, Bleeker ER, Meyers DA. Genome-wide association studies of asthma indicate opposite immunopathogenesis direction from autoimmune diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; **130**: 861-868.
8. Urayama KY, Jarrett RF, Hjalgrim H, et al. Genome-wide association study of

classical Hodgkin lymphoma and Epstein-Barr virus status-defined subgroups. *J Natl Cancer Inst.* 2012; **104**: 240-253.

9.Dorak MT. *HLA-DR53 fact file*. Eriřim 14.07.2013.HLA-DR 53 Fact File [M.Tevfik DORAK]-M.Tevfik DORAK Website:<http://www.dorak.info/hla/hla-dr53.html>

10. Chida S, Hohjoh H, Tokunaga K. Molecular analyses of the possible RNA-binding protein gene located in the human leukocyte antigen (HLA) -DR subregion. *Gene*.1999; **240**: 125-132.

11. Chida S, Hohjoh H, Hirai M, Tokunaga K. Haplotype-specific sequence encoding the protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator in the human leukocyte antigen class II region. *Immunogenetics* 2001; **52**: 186-194.

12. Vandiedonck C, Taylor MS, Lockstone HE, Plant K, Taylor JM, Durrant C, Broxholme J, Fairfax BP, Knight JC. Pervasive haplotypic variation in the spliceo-transcriptome of the human major histocompatibility complex. *Genome Research* 2011; **21**: 1042-1054.

13. Hoffbrand AV, Moss PAH. *Hoffbrand'ın Temel Hematolojisi*. 7. baskı İstanbul: Ema Tıp Kitapevi; 2016. pp.187-188.

14. Yiallourous M. *Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)-Kısa Bilgiler*. Eriřim 28.11.2018 . Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)-Kısa Bilgiler-Kinderkrebsinfo: https://www.kinderkrebsinfo.de/hastalklar/loesemiler/pohpatinfoall120060414/pohpatinfoallkurz/index_tur.html

15. Türk Hematoloji Derneği. Erişkin lenfoblastik lösemi tedavi kılavuzu. *Akut Lösemiler Tanı ve Tedavi Kılavuzu: Ulusal Tedavi Kılavuzu* 2011; **3**: 40.

16. Lösemi Lenfoma Miyelom Hastaları ve Araştırma Eğitim Birlięi Derneği. *Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)*. Eriřim 2011. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL):

<https://www.losemilenfomamiyelom.org/TR,14/alternatif-tedaviler.html>

17. The Leukemia&Lymphoma Society (LLS). *Acute Lymphoblastic Leukemia*. Güncellenme 2014. Acute Lymphoblastic Leukemia - Leukemia & Lymphoma Society : https://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/all.pdf

18. Abbas KA, Andrew HL, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. pp. 97-111.

19. Rothbard JB, Geftter ML. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Annu Rev Immunol* 1991; **9**: 527-565.

20. Van den Elsen PJ. Expression regulation of major histocompatibility complex class II encoding genes. *Front Immunol* 2011; **4**: 2:48.

21. Abbas KA, Andrew HL, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. pp. 189-214.

22. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol*. 2009; **9**: 833-844.

23. Sieker F, May A, Zacharias M. Predicting affinity and specificity of antigenic peptide binding to major histocompatibility class I molecules. *Curr Protein Pept Sci* 2009; **10**: 286-296.

24. Kazansky DB. MHC restriction and allogeneic immune responses. *J Immunotoxicol* 2008; **5**: 369-384.

25. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 2006; **24**: 419-466.

26. Akçam FS. HLA sistemi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2005; **25**: 829-834.

27. Biragyn A, Longo DL. Neoplastic “Black Ops”: cancer’s subversive tactics in overcoming host defenses. *Semin Cancer Biol* 2012; **22**: 50-59.
28. Klein J. George Snell’s first foray into the unexplored territory of the major histocompatibility complex. *Genetics* 2001; **159**: 435-439.
29. Degos L. Jean Dausset a scientific pioneer. Intuition and creativity for the patients. *Heamatologica* 2009; **94**: 1331-1332.
30. Terasaki P. Jean Dausset. *American Journal of Transplantation* 2009; **9**: 2441-2442.
31. Oğuz FS, Çarın M. MHC genlerinin organizasyonu. *Sendom* 1999; **11**: 126-127.
32. Petersdorf EW. Optimal HLA matching in haematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2008; **20**: 588-593.
33. Bacigalupo A, Socie G, Hamladji RM, Aljurf M, Maschan A, Kyrz-Krzemien S, Cybicka A, Sengelov H, Unal A, Beelen D, Locasciulli A, Dufour C, Passweg JR, Oneto R, Signori A, and Marsh JC. Current outcome of HLA identical sibling vs. unrelated donor transplants in severe aplastic anemia: an EBMT analysis. *Heamatologica* 2015; **100**: 696-702.
34. Vincent R, Louis-Plence P, Gaillard F, Clot J, Eliaou JF. Qualitative and quantitative analysis of HLA-DRB gene expression. *Journal of Rheumatology* 1997; **24**: 225-226.
35. Bell JI, Denney D, Jr., Foster L, Belt T, Todd JA, McDevitt HO. Allelic variation in the DR subregion of the human major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1987; **84**: 6234-6238.

36. Stunz LL, Karr RW, Anderson RA. HLA-DRB1 and -DRB4 genes are differentially regulated at the transcriptional level. *Journal of Immunology* 1989; **143**: 3081-3086.
37. Louis P, Vincent R, Cavadore P, Clot J, Eliaou JF. Differential transcriptional activities of HLA-DR genes in the various haplotypes. *Journal of Immunology* 1994; **153**: 5059-5067.
38. Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tissue Antigens* 1997; **49**: 297-321.
39. Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED, et al. Nomenclature for the factors of the HLA system, 2000. *Tissue Antigens* 2001; **57**: 236-283.
40. Marsh SG, Parham P, Barber LD. *The HLA Facts Book*. San Diego: Academic Press, 2000; 5: 26-36.
41. Schreuder GM, Hurley CK, Marsh SG, et al. The HLA dictionary 1999: A summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Human Immunology* 1999; **60**: 1157-1181.
42. Schreuder GM, Hurley CK, Marsh SG, et al. The HLA dictionary 2001: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Human Immunology* 2001; **62**: 826-849.
43. Naruse TK, Ando R, Nose Y, et al. HLA-DRB4 genotyping by PCR-RFLP: diversity in the associations between HLA-DRB4 and DRB1 alleles. *Tissue Antigens* 1997; **49**: 152-159.
44. Voorter CE, de Bruyn-Geraets D, van den Berg-Loonen M. High-resolution HLA typing for the DRB3/4/5 genes by sequence-based typing. *Tissue Antigens* 1997; **50**:

283-290.

45. Dunham I, Sargent CA, Dawkins RL, Campbell RD. An analysis of variation in the long-range genomic organization of the human major histocompatibility complex class II region by pulsed-field gel electrophoresis. *Genomics* 1989; **5**: 787-796.
46. Kendall E, Todd JA, Campbell RD. Molecular analysis of the MHC class II region in DR4, DR7, and DR9 haplotypes. *Immunogenetics* 1991; **34**: 349-357.
47. The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 1999; **401**: 921-923.
48. Beck S, Trowsdale J. Sequence organisation of the class II region of the human MHC. *Immunological Reviews* 1999; **167**: 201-210.
49. Verreck FA, Elferink D, Vermeulen CJ, et al. DR4Dw4/DR53 molecules contain a peptide from the autoantigen calreticulin. *Tissue Antigens*. 1995; **45**: 270-275.
50. Kobayashi H, Lu J, Celis E. Identification of helper T-cell epitopes that encompass or lie proximal to cytotoxic T-cell epitopes in the gp100 melanoma tumor antigen. *Cancer Research* 2001;**61**: 7577-7584
51. Sunguroğlu A, Güç D, Sipahi TU, Dorak MT. A sex-specific difference in homozygosity for HLA-DR53 in newborns. *Turk J Pediatr*. 1998; **40**: 211-216.
52. Felt SA, Moerdyk-Schauwecker MJ, Grdzlishvili VZ. Induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* 2015; **474**: 163-173.
53. Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I, et al. The role of PERK/elf2a/ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during Endoplasmic Reticulum stress. *Curr. Mol. Med.* 2016; **16**: 533-544.

54. Der SD, Lau AS. Involvement of the double-stranded-RNA-dependent kinase PKR in interferon expression and interferon-mediated antiviral activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1995; **92**: 8841-8845.
55. Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C, et al. Impact of protein kinase PKR in cell biology; from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006; **70**: 1032-1060.
56. Hu YS, Li W, Li DM, Liu Y, Fan HI, Rao ZC, et al. Cloning, expression and functional analysis of PKR from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish&Shellfish Immunology* 2013; **35**: 1874-1881.
57. Bennett RL, Blalock WL, May WS. Serine 18 phosphorylation of RAX, the PKR activator, is required for PKR activation and consequent translation inhibition. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 42687-42693.
58. Bennett RL, Blalock WL, Choi EJ, Lee YJ, Zhang Y, Zhou L, et al. RAX is required for fly neuronal development and mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 2008; **125**: 777-785.
59. Peters GA, Searchrist DD, Keri RA, Sen GC. The double-stranded RNA-binding protein, PACT, is required for postnatal anterior pituitary proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2009; **106**: 10696-10701.
60. Dickerman BK, White CL, Kessler PM, Sadler AJ, Williams BR, Sen GC. The protein activator of protein kinase R, PACT/RAX, negatively regulates protein kinase R during mouse anterior pituitary development. *FEBS J.* 2015; **282**: 4766-4781.
61. Yong Y, Luo J, Ke ZJ. dsRNA binding protein PACT/RAX in gene silencing, development and diseases. *Front. Biol.* 2014; **9**: 382-388.
62. Peters GA, Hartmann R, Qin J, Sen GC. Modular structure of PACT; distinct domains for binding and activating PKR. *Mol. Cell Biol.* 2001; **21**: 1908-1920.

63. Patel RC, Sen GC. PACT, a protein activator of the interferon γ -induced protein kinase, PKR. *EMBO J.* 1998; **17**: 4379-4390.
64. Peters GA, Dickerman B, Sen GC. Biochemical analysis of PKR activation by PACT. *Biochemistry* 2009; **48**: 7441-7447.
65. Peters GA, Li S, Sen GC. Phosphorylation of specific serine residues in the PKR activation domain of PACT is essential for its ability to mediate apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2006; **281**: 35129-35136.
66. Lee ES, Yoon CH, Bae YS. The double strand RNA dependent protein kinase PKR plays a significant role in a sustained ER stress-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 2007; **581**: 4325-4332.
67. Tseng YY, Liao GR, Sen GC, Lin FY, Hsu WL. Regulation of PACT-mediated protein kinase activation by the OV20.0 protein of Orf Virus. *J. Virol.* 2015; **89**: 11619-11629.
68. Huang K, Qi G, Sun Z, Liu X, Xu X, Wang H, Wu Z, Wan Y, Hu C. *Cytenopharyngodon idella* IRF2 and ATF4 down-regulate the transcriptional level of *PRKRA*. *Fish&Shellfish Immunology* 2017; **64**: 155-164.
69. Kendall E, Todd JA, Campbell RD. Molecular analysis of the MHC class II region in DR4, DR7, and DR9 haplotypes. *Immunogenetics* 1991; **34**: 349–357.
70. Dunham I, Sargent CA, Dawkins RL, Campbell RD. An analysis of variation in the long-range genomic organization of the human major histocompatibility complex class II region by pulsed-field gel electrophoresis. *Genomics* 1989; **5**: 787–796.
71. The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 1999; **401**: 921–923.

72. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC . *Immunol. Today*. 1993;**14**: 349-352.
73. Dorak MT. The implications for childhood leukemia of infection with adenovirus. *Trends. Microbiol*. 1996; **4**: 60-63
74. Dorak MT, Burnett AK. Molecular mimicry of an HLA-DR53 epitope by viruses. *Immunol. Today*. 1994; **15**:138-139.
75. Schlehofer B, Blettner M, Geletneky K, Haaf HG, Kaatsch P, Michaelis J, Mueller-Lantzsch N, Niehoff D, Winkelspecht B, Wahrendorf J, Schlehofer JR. Sero-epidemiological analysis of the risk of virus infections for childhood leukaemia. *Int. J. Cancer*. 1996; **65**: 584-590.
76. Kennedy AE, Singh SK, Scheurer ME, Okcu MF, Dorak MT. 146-P: Association of HLA-linked Lymphoma Risk Markers With Childhood Lymphoblastic Leukemia. *Human Immunology*. 2012; **73**: 49-167.

FORMLAR

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın,

Katılmış olduğunuz çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı “**HLA-DR53 Haplotiplerindeki PRKRAP1 Psödogeninin Akut Lenfoblastik Lösemi İle İlişkisi**” dir.

Bu araştırmanın amacı, bir çeşit kemik iliği hastalığı olan Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) hastalığına sebep olan genetik faktörleri incelemektir. Anne ve babadan kalıtımla yeni bireye geçen HLA-DR53 haplotipleri ile ALL hastalığı arasındaki ilişkinin, HLA-DR53 haplotiplerindeki ekstra DNA ile ilişkili olup olmadığını göstermek için ekstra DNA belirteci olan *PRKRAP1* geninin ALL’li hastalarda ve sağlıklı kişilerde olup olmadığını karşılaştırarak genetik olarak ALL hastalığı ile ilişkili faktörleri tanımlamayı planlıyoruz. Böylece ALL hastalığına yeni teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için ileriki çalışmalara öncülük etmeyi amaçlıyoruz.

Bu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda HLA-DR dokuları tiplendirilmiş ALL hastalarının DNA örnekleri ile kök hücre bağıışı için İstanbul Tıp Fakültesi Kemik İliği Bankası’na başvuran ve HLA-DR dokuları tiplendirilmiş sağlıklı kök hücre bağışçısı adayların DNA örneklerinin kullanılması amaçlanmaktadır. DNA örnekleriniz ile yer alacağınız bu çalışmada öngörülen süre 1 yıl olup, çalışmada yer alacak hastaların sayısı 60 ve gönüllülerin sayısı 40’dır.

Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0-554-596-45-17 nolu telefondan Çağla Yavuz’a başvurabilirsiniz.

Bu çalışmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır; bu çalışma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı olduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu çalışma BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) tarafından desteklenmektedir.

Bu çalışmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Çalışmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada çalışmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır ve “**HLA-DR53 Haplotiplerindeki PRKRAP1 Psödogeninin Akut Lenfoblastik Lösemi İle İlişkisi**” çalışması kapsamında biyolojik örneğiniz sadece bahsi geçen

bu araştırmada kullanılacaktır.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Bu araştırma ile ilgili olarak araştırıcının önerilerine uyma sizin sorumluluklarınızdır.

Katılımcının Beyanı

Hasta/Sağlıklı Beyanı

Sayın Çağla Yavuz tarafından İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi ve “**HLA-DR53 Haplotiplerindeki PRKRAP1 Psödogenininin Akut Lenfoblastik Lösemi İle İlişkisi**” araştırması kapsamında biyolojik örneğimin sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında herhangi bir sorun ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Çağla Yavuz'u 0-554-596-45-17 İTF Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Araştırma konusu hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

XXXXXX

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 374

Tarih : 14.03.2016

Konu : Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ

Sayın Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İlgil : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının 07/03/2016 gün ve 88865 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Çağla YAVUZ' un yürüteceği 2016/347 dosya numaralı "HLA-DR53 Haplotiplerindeki PRKRAP1 Psödogeninin Akut Lenfoblastik Lösemi ile ilişkisi" başlıklı çalışma kurulumuzun 11/03/2016 tarih ve 05 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

HLA-DR53 HAPLOTİPLERİNDEKİ PRKRAP1 PSÖDOGENİNİN
AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ İLE İLİŞKİSİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 17	% 13	% 8	% 9
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	musabatmaz.org İnternet Kaynağı	% 3
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
3	www.kinderkrebsinfo.de İnternet Kaynağı	% 2
4	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	% 2
5	www.nature.com İnternet Kaynağı	% 1
6	www.onkoloji.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	Başak Yalçın. "Major doku uygunluk kompleksi (MHC) molekülüleri: genel özellikleri ve hastalıklarla ilişkisi", TURKDERM, 2013 Yayın	% 1
8	"Poster Presentations", Klinik Psikofarmakoloji	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Çağla	Soyadı	YAVUZ
Doğ.Yeri	ZONGULDAK	Doğ.Tar.	26.08.1991
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	25442618248
Email	caglay91@hotmail.com	Tel	05545964517

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD	2019
Lisans	İ.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2013
Lise	Zonguldak Atatürk Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Fatura Kontrol Görevlisi	Gayrettepe Florence Nigtingale Hastanesi	2017-2018
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	-	50 (YDS)

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	72,9	74,7	68,1
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office (Word, Excell, Power point)	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap Okumak

